UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE LA DYNAMIQUE INTRACELLULAIRE DE L'UBIQUITINE E3 LIGASE RNF13 DANS LE CONTEXTE DE MALADIES RARES

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR

VALÉRIE CABANA

NOVEMBRE 2025

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Ce travail marque la fin d'un parcours de six ans au cours duquel plusieurs personnes ont contribué, chacune à sa façon, à la réussite de celui-ci. Tout d'abord, je remercie mon directeur de thèse, le Pr. Marc Lussier, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'acceptant dans son laboratoire alors que j'avais eu un début de parcours universitaire plus difficile. Je suis reconnaissante pour son écoute, sa compréhension et son soutien dans les moments les plus sombres, ainsi que pour les discussions, ses conseils et ses enseignements qui ont contribué à mon évolution et à ma réussite en tant que scientifique. Par le fait même, je remercie les membres du laboratoire qui m'ont précédée, Layal El Cheikh-Hussein et Kim Ghilarducci, pour m'avoir appris et aidée avec les diverses techniques, ainsi qu'Audrey Sénécal pour sa participation à certaines expériences.

Je souligne et remercie les membres du jury, les Prs. Stéphane Lefrançois (INRS), Marc Germain (UQTR) et Benoît Vanderperre (UQAM), qui ont accepté de prendre de leur temps précieux afin d'évaluer cette thèse. Je remercie également le Pr. Borhane Annabi pour l'opportunité de travail qu'il m'a offerte et qui m'a permis d'appliquer mon expertise dans un contexte de recherche industrielle.

Je remercie nos collaborateurs, les Prs. Laurent Cappadocia, Saïd Kourrich et Gilles Gouspillou, avec qui du financement a été obtenu afin de financer l'avancement de nos recherches. De plus, je remercie les Fonds de Recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) pour la bourse de doctorat offerte (DOI: doi.org/10.69777/326578). Je remercie également le Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois pour les trois bourses d'études supérieures, pour la bourse de recherche Félix-Antoine Aublet 2023 et pour les opportunités offertes grâce auxquelles j'ai eu la chance de présenter mon projet de recherche à trois reprises à l'oral lors du colloque annuel et à deux reprises lors de Pauses-Conférences. Je remercie d'avance le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) ainsi que les Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS) (DOI: doi.org/10.69777/368115) pour l'octroi de bourses postdoctorales qui me permettront de poursuivre ma formation dans le laboratoire de la Pre. Christine Lavoie, en co-direction avec les Prs. Richard Leduc et Jean-Luc Parent.

Je souhaite souligner les belles rencontres faites au fil de ce parcours. Les moments et les soirées passées avec Ali Harake, Julien Plamondon et Fabian Ortner sont de précieux souvenirs que je conserve. Il en est de même pour les activités en compagnie des membres du laboratoire de la Pr. Claire Bénard qui m'ont accueillie comme si j'étais l'une des leurs, notamment Raphaël Dima, Ivan Valette, Marin Pascal et Noémie Frébault. Je tiens aussi à souligner et chaleureusement remercier Yannick Arnold Nombre et Georges Hraoui pour leur support et leur aide au cours de mon déménagement jusqu'à la lointaine contrée de Sherbrooke.

J’aimerais aussi souligner l’impact qu’a eu Antoine Bouchard au cours de cette aventure qu’est le doctorat. Nous avons débuté presque en même temps, et sa bonne humeur et son humour ont rendu très agréable les moments où il était de passage dans notre laboratoire. En plus de son implication dans mes projets de recherche, pour lesquels il a toujours effectué le travail dans des délais impressionnants, sa présence et son amitié ont été un pilier lors de moments plus difficiles. Je le remercie sincèrement pour tout.

Bien qu’à l’extérieur du cadre académique, mes amies de patinage artistique synchronisé occupent également une place très importante dans ma vie. Durant plusieurs années au cours de ce doctorat, nous avons eu des pratiques hebdomadaires et cette passion qui nous unit fait en sorte que notre équipe est notre deuxième famille. En particulier, Joani Gagné-Beauchamp, Joannie Demers, Jade Dupuis et Alexandra Fauchon ont su être là à des moments particulièrement difficiles et je les remercie de faire partie de ma vie.

J’aimerais remercier toute ma famille pour leur soutien constant et inconditionnel. Depuis mon plus jeune âge, mes parents, Renée Cloutier et Serge Cabana, ont toujours été là pour m’épauler et m’encourager dans tout ce que j’entreprends, tant sur le plan scolaire que sportif. J’accorde une mention spéciale à Chantal Drapeau qui a été présente pour moi comme si j’étais sa propre fille pendant un moment significatif de ma vie, ainsi qu’à Roger Roy, avec qui je partage plusieurs intérêts et qui me traite lui aussi comme sa fille. Mon frère, Sébastien Cabana, est également toujours disponible lorsque j’ai besoin de lui, comme lorsqu’il m’a accueilli chez lui pour que je puisse assister au congrès de Signalisation Québec 2024. Je remercie ma sœur d’être aussi présente dans ma vie. Je suis choyée d’avoir une si belle relation avec elle et de partager autant de moments ensemble. Lors de périodes plus difficiles, elle est présente sans que je n’aie à le lui demander et m’offre un support constant et sans faille. Sans qu’elle le sache, sa fille et ma nièce, Yasmine, qui est née au milieu de mon parcours, a particulièrement contribué à la réussite de la fin de ce projet en me redonnant de l’énergie et de la motivation quand j’en manquais, et en m’aidant à débuter la journée du bon pied avec ses appels FaceTime et sa bonne humeur contagieuse, très tôt le matin.

Finalement, l’une des plus belles rencontres que j’ai eues la chance de faire au cours de ce doctorat a été celle de Yann Aghiles Chabi. Au-delà de son aide, de son écoute et de ses encouragements constants lorsque je traversais des périodes plus difficiles, il m’a aidée à devenir une meilleure version de moi-même, autant au niveau personnel que scientifique, en me poussant dans mes questionnements et mes réflexions, ce qui a renforcé ma pensée critique. Son amitié a été significative dans mon parcours, et son appui ainsi que sa confiance en moi m’ont permis de poursuivre malgré les moments de découragement et de remise en question. Je suis très choyée de l’avoir dans ma vie et je le remercie pour sa présence et son aide infaillible.

DÉDICACE

Pour ceux qui ont laissé des traces invisibles mais
indélébiles dans ces pages,
dans le fil invisible des encouragements,
des conseils murmurés,
et de la confiance donnée quand je doutais,
et qui ont façonné ce travail autant que ma propre plume.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ii

DÉDICACE iv

LISTE DES FIGURES xi

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES xv

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS xxiv

RÉSUMÉ xxvi

ABSTRACT xxvii

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE 3

1.1 L'organisation cellulaire 3

1.1.1 Les compartiments cellulaires 3

1.1.1.1 La membrane plasmique et autres membranes 3

1.1.1.2 Le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi 4

1.1.1.3 Les endosomes et les lysosomes 5

1.1.2 La structure neuronale 5

1.1.2.1 Le soma 5

1.1.2.2 L'axone 6

1.1.2.3 Les dendrites 6

1.1.2.4 Les synapses 7

1.1.3 Le développement du cortex cérébral 9

1.1.3.1 Les encéphalopathies développementales et épileptiques 10

1.1.3.1.1 Les malformations du cortex 10

1.1.3.1.2 L'épilepsie 11

1.2 La synthèse de protéines 12

1.2.1 L'ARNm et le code génétique 12

1.2.1.1 Les mutations génétiques 13

1.2.2 La traduction 13

1.2.3 Les modifications post-traductionnelles 14

1.2.3.1 La phosphorylation 14

1.2.3.2 La glycosylation 15

1.2.3.2.1 *N*-glycosylation 16

1.2.3.2.2 *O*-GlcNAcylation 18

1.2.3.2.3 Les glycosaminoglycanes et la matrice extracellulaire 21

1.2.3.3 L'ubiquitination 22

1.2.4 Le contrôle de qualité 24

1.2.4.1 Le cycle de calnexine et calréticuline 24

1.2.4.2 La réponse aux protéines non repliées 25

1.3 La dégradation de protéines 26
1.3.1 Le système de l'ubiquitine-protéasome 26
1.3.1.1 Les mécanismes ERAD et EGAD 28
1.3.2 La protéolyse lysosomale 29
1.3.2.1 L'acidification des lysosomes 29
1.3.2.2 Les maladies de surcharge lysosomale 30
1.3.2.2.1 Iduronate 2-sulfatase 31
1.4 Le routage intracellulaire 33
1.4.1 Le cytosquelette et le transport de vésicules 33
1.4.2 La fusion des vésicules 37
1.4.3 La voie endolysosomale 40
1.4.3.1 L'endocytose et le tri aux endosomes précoces 41
1.4.3.2 La maturation des endosomes 44
1.4.3.3 La formation de l'autophagosome 47
1.4.3.4 Le positionnement des endosomes et des lysosomes 51
1.4.4 Les complexes de protéines adaptatrices 53
1.4.4.1 Le complexe AP-1 56
1.4.4.2 Le complexe AP-2 60
1.4.4.3 Le complexe AP-3 61
1.4.5 Les récepteurs de tri lysosomal 63
1.4.6 La famille de E3 ubiquitine ligase PA-TM-RING 64
1.4.6.1 RNF167 65
1.4.6.2 RNF13 68
1.5 La problématique et les hypothèses et objectifs de l'étude 71
CHAPITRE 2 ARTICLE 1 - RNF13 DILEUCINE MOTIF VARIANTS L311S AND L312P INTERFERE WITH ENDOSOMAL LOCALIZATION AND AP-3 COMPLEX ASSOCIATION 73
2.1 Résumé 76
2.2 Abstract 77
2.3 Introduction 78
2.4 Materials and Methods 80
2.4.1 Antibodies 80
2.4.2 Molecular biology 80
2.4.3 Cell culture and transfection 81
2.4.4 Immunostaining 81
2.4.5 Uptake and trafficking of EGF and Transferrin 82
2.4.6 Fluorescence microscopy image acquisition 82
2.4.7 Image analysis 82
2.4.8 Statistical analysis 83
2.4.9 TOPP2 E. Coli transformation and culture 83
2.4.10 Purification of recombinant C-Terminal RNF13 from TOPP2 83
2.4.11 GST-pulldown and immunoprecipitation assays 84
2.4.12 SDS-PAGE and Western Blot 84
2.4.13 Predicted structure 85
2.4.14 AP3D1 knockdown 85

2.5 Results 85
2.5.1 RNF13 variants L311S and L312P show reduced presence in lysosomes and alter endosomal vesicle size 85
2.5.2 RNF13 variants L311S and L312P alter EGF sorting at early endosomes 88
2.5.3 RNF13 variants L311S and L312P do not alter transferrin trafficking 89
2.5.4 RNF13 variant L311L312/AA shows reduced presence in lysosomes and increases endosomal vesicle size 91
2.5.5 RNF13 variants L311S and L312P do not interact with AP-3 complex 92
2.5.6 Model of RNF13 and AP3S1 complex association 93
2.5.7 Knockdown of AP-3 gene expression reduces RNF13 localization to lysosomes 96
2.6 Discussion 98
2.7 Supplementary materials 103
CHAPITRE 3 ARTICLE 2 - AP-1 CONTRIBUTES TO ENDOSOMAL TARGETING OF THE UBIQUITIN LIGASE RNF13 VIA A SECONDARY AND NOVEL NON-CANONICAL BINDING MOTIF 107
3.1 Résumé 110
3.2 Abstract 110
3.3 Introduction 111
3.4 Materials and Methods 113
3.4.1 Antibodies 113
3.4.2 Molecular biology 113
3.4.3 Cell culture and transfection 114
3.4.4 AP3D1 and AP1G1 knockdown 114
3.4.5 Immunostaining 115
3.4.6 Phalloidin staining 115
3.4.7 Fluorescence microscopy image acquisition 116
3.4.8 Widefield live-cell imaging 116
3.4.9 Image analysis and statistical analysis 117
3.4.10 Immunoprecipitation and GST-pulldown assays 117
3.4.11 Glycosylation assays 118
3.4.12 SDS-PAGE and Western Blot 118
3.4.13 Protein abundance and statistical analysis 118
3.4.14 Predicted structure 119
3.5 Results 119
3.5.1 Predicted interaction between RNF13 and AP-1 119
3.5.2 RNF13 interacts with AP-1 120
3.5.3 RNF13 interacts with AP-1 through both dileucine and triple-valine motifs 124
3.5.4 Alteration of both dileucine motif and triple valine of the VVVQLQ motifs alters endosomal localization and traps RNF13 in the Golgi 125
3.5.5 Knockdown of both AP-1 and AP-3 interferes with RNF13 endosomal localization 129
3.5.6 Knockdown of AP-1 alters RNF13 AA endosomal localization 131
3.5.7 Exogenous RNF13 increases F-actin abundance 133
3.6 Discussion 136
3.7 Supplementary materials 141

CHAPITRE 4 ARTICLE 3 - RNF13 VARIANTS L311S AND L312P ASSOCIATED WITH DEVELOPMENTAL EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY ALTER DENDRITIC ORGANIZATION IN HIPPOCAMPAL NEURONS 148

4.1 Résumé 151

4.2 Abstract 152

4.3 Introduction 153

4.4 Materials and Methods 155

4.4.1 Antibodies 155
4.4.2 Molecular biology 155
4.4.3 Cell culture and transfection 156
4.4.4 Neuronal cultures and transfection 156
4.4.5 AP3D1 and AP1G1 knockdown 157
4.4.6 Immunostaining 157
4.4.7 Fluorescence microscopy image acquisition 157
4.4.8 Image analysis and statistical analysis 158
4.4.9 Cell lysis and glycosylation assays 158
4.4.10 SDS-PAGE and Western Blot 159

4.5 Results 159

4.5.1 RNF13 variants L311S and L312P traffic through an AP-1-dependent pathway 159
4.5.2 Increased presence of RNF13 variants in dendrites 162
4.5.3 Alterations in the dileucine motif act as a dominant negative and redistribute early endosomes in dendrites 164
4.5.4 Lysosomes number is decreased in proximal dendrites in the presence of RNF13 167
4.5.5 RNF13 WT increases the number of PSD-95 particles in distal dendrites 169
4.5.6 Dileucine-altered variants decrease Gephyrin abundance in dendrites 170

4.6 Discussion 172

4.7 Conclusion 177

CHAPITRE 5 ARTICLE 4 - RNF13 IS A NOVEL INTERACTOR OF IDURONATE 2-SULFATASE THAT MODIFIES ITS GLYCOSYLATION AND MATURATION 178

5.1 Résumé 181

5.2 Abstract 182

5.3 Introduction 183

5.4 Materials and Methods 186

5.4.1 Antibodies 186
5.4.2 Molecular biology 186
5.4.3 Cell culture and transfection 187
5.4.4 RNF13 and RNF167 knockdown 188
5.4.5 Cell lysis and co-immunoprecipitation assays 188
5.4.6 Glycosylation assays 189
5.4.7 SDS-PAGE and Western Blot 189
5.4.8 Protein abundance and statistical analysis 190
5.4.9 Immunostaining 190
5.4.10 Fluorescence microscopy image acquisition 191

5.4.11 Image analysis and statistical analysis 191
5.4.12 Predicted structure 191
5.5 Results 192
5.5.1 RNF13 interacts with IDS, altering its glycosylation and maturation 192
5.5.2 RNF13 trafficking to late endosomes/lysosomes is delayed by presence of IDS 195
5.5.3 IDS glycosylation site Asn246 is important for its maturation 196
5.5.4 RNF13 alters IDS glycosylation 197
5.5.5 RNF13 does not affect IDS glycosylation by inducing ER stress 199
5.5.6 RNF13/RNF167 heterodimerize and modify the interaction and abundance of IDS precursor and underglycosylated forms 204
5.5.7 Knocking down RNF13 or RNF167 modifies how the other E3 ligase affects IDS 205
5.5.8 RNF13 E3 ligase activity is required for a proper interaction with IDS and to increase the underglycosylated form 206
5.5.9 RNF13 protects IDS underglycosylated form and its C-terminal fragment from rapid proteasomal degradation 212
5.6 Discussion 214
CHAPITRE 6 DISCUSSION 218
6.1 La DEE73 : une maladie de surcharge lysosomale ? 218
6.1.1 L'hypothèse initiale revisitée 218
6.1.2 L'effet dominant négatif ou gain de fonction 219
6.1.3 Les fonctions endolysosomales de RNF13 altérées par les variants 222
6.2 Les limites de portée et contraintes expérimentales de l'étude 225
6.2.1 L'activité E3 ubiquitine ligase des variants et les autres domaines de RNF13 225
6.2.2 Les isoformes de RNF13 229
6.2.3 Les modifications post-traductionnelles 231
6.2.4 Les diverses voies de routage 232
6.2.5 La portée des résultats obtenus en culture neuronale 235
6.2.6 Lien entre la DEE73 et la MPS II ? 236
6.3 Les limites techniques et méthodologiques de l'étude 238
6.3.1 La transfection transitoire, la surexpression et le modèle cellulaire 238
6.3.2 L'expression tissulaire et temporelle 240
6.3.3 La microscopie à épifluorescence 242
CONCLUSION 244
ANNEXE A EFFET DE RNF13 SUR L'ABONDANCE DE PROTÉINES ENDOGÈNES 248
ANNEXE B POSSIBLE LIEN ENTRE L'AUTOPHAGIE ET LE ROUTAGE PAR AP-1 DE RNF13 250
ANNEXE C EFFET DE LA PRÉSENCE DE IDS SUR DES FONCTIONS DE RNF13 253
APPENDICE A REVIEW - FROM DROSOPHILA TO HUMAN: BIOLOGICAL FUNCTION OF E3 LIGASE GODZILLA AND ITS ROLE IN DISEASE 254

APPENDICE B CONTRIBUTION SECONDAIRE D'ARTICLE - QUANTITATIVE IMMUNOBLOTTING ANALYSES REVEAL THAT THE ABUNDANCE OF ACTIN, TUBULIN, SYNAPTOPHYSIN AND EEA1 PROTEINS IS ALTERED IN THE BRAINS OF AGED MICE 281

APPENDICE C CONTRIBUTION SECONDAIRE D'ARTICLE - FUNCTIONAL INTERACTION OF UBIQUITIN LIGASE RNF167 WITH UBE2D1 AND UBE2N PROMOTES UBIQUITINATION OF AMPA RECEPTOR.....282

APPENDICE D CONTRIBUTION SECONDAIRE D'ARTICLE - MEMBRANE TARGETING AND GTPASE ACTIVITY OF RAB7 ARE REQUIRED FOR ITS UBIQUITINATION BY RNF167.....283

APPENDICE E CONTRIBUTION SECONDAIRE D'ARTICLE - RNF13 REGULATES THE ENDOLYSOSOMAL PATHWAY THROUGH INTERACTION WITH THE SMALL GTPASE ARL8B 284

APPENDICE F CONTRIBUTION SECONDAIRE D'ARTICLE - A SHORT SUMOYLATION TAG MODULATES TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVITY 285

RÉFÉRENCES.....286

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: La structure et les composantes des différents domaines de neurones communiquant entre eux 8

Figure 1.2: Type de liaison glycosidique des polysaccharides 17

Figure 1.3: Étape de la *N*-glycosylation dans le RE 19

Figure 1.4: Maturation de la *N*-glycosylation dans l'appareil de Golgi 20

Figure 1.5: Les filets périneuronaux entourent les neurones inhibiteurs pour réguler la plasticité synaptique 22

Figure 1.6: La cascade d'ubiquitination et les possibilités de modification sur une protéine 23

Figure 1.7: Les protéines motrices se déplacent sur le cytosquelette dans une cellule et dans les domaines spécifiques d'un neurone 35

Figure 1.8: La fusion d'une vésicule synaptique 39

Figure 1.9 : Le cycle d'activation d'une Rab GTPase 42

Figure 1.10: L'identité d'un compartiment cellulaire est définie par la présence d'une Rab et un PIP spécifique 43

Figure 1.11: L'endocytose des récepteurs de la Tf et de l'EGF et les voies de tri du système endolysosomal 46

Figure 1.12: Les mécanismes induits lors d'un jeûne et l'exemple d'un type d'autophagie spécifique 50

Figure 1.13: Les petites GTPases Rab7 et Arl8b régulent le transport des endolysosomes. 52

Figure 1.14: Le transport intracellulaire régulé par les complexes de protéines adaptatrices 58

Figure 1.15: Les mécanismes cellulaires régulés par la E3 ubiquitine ligase RNF167 67

Figure 1.16: Les fonctions cellulaires identifiées à ce jour pour RNF13 70

Figure 1.17 : Domaines de la protéine RNF13 72

Figure 2.1: RNF13 L311S and L312P variants alter the size of endolysosomal vesicles 87

Figure 2.2: RNF13 variants L311S and L312P alter EGF sorting at early endosomes 90

Figure 2.3: Altered lysosomal targeting of RNF13 L311L312/AA mutant increases the size of endolysosomal vesicles 92

Figure 2.4: Alterations of the dileucine motif of RNF13 abrogates AP-3 complex binding 94

Figure 2.5: Predicted structure of a complex between AP3S1 and RNF13 95

Figure 2.6: Knockdown of AP-3 interferes with RNF13 localization to lysosomes 97

Figure 2.S1: RNF13 protein variants do not extensively localize in endoplasmic reticulum, mitochondria or Golgi compartments 103

Figure 2.S2: RNF13 variants L311S and L312P do not alter transferrin recycling 104

Figure 2.S3: Localization of RNF13 is not affected by the presence of either HA- or GFP-tag..... 105

Figure 2.S4: Chemically induced endoplasmic reticulum stress does not promote extensive ER localization of RNF13 in HeLa cells..... 106

Figure 3.1: RNF13 interacts with AP-1..... 122

Figure 3.2: Live-cell imaging shows partial colocalization of RNF13 and AP1M1 over time..... 123

Figure 3.3: Alteration to RNF13 dileucine motif disrupts binding to AP-1 complex *in vitro* but not completely *in cellulo* 126

Figure 3.4: Alteration of both the dileucine and VVVQLQ motifs affects the endosomal localization of RNF13, whereas alteration of only one motif does not 128

Figure 3.5: Golgi fragmentation by brefeldin A redistributes RNF13 AA/GGG in vesicle-like structures 130

Figure 3.6: Knockdown of both AP-1 and AP-3 interferes with RNF13 endosomal localization 132

Figure 3.7: Knockdown of AP-1 is sufficient to disrupt endosomal localization of RNF13 AA but not of RNF13 WT or GGG 134

Figure 3.8: WT RNF13 modifies F-actin abundance, but alterations in the dileucine motif and in the E3 ligase catalytic site or knockdown of AP-3 are sufficient to prevent this effect 135

Figure 3.S1: Comparison of predicted interactions by AlphaFold between RNF13 with AP1M1, AP1S1, AP3M1 and AP3S1 141

Figure 3.S2: AP1M1-GFP is specifically inserted into the AP-1 complex..... 142

Figure 3.S3: Alterations to the dileucine and VVVQLQ motifs do not increase ER localization 143

Figure 3.S4: Knockdown efficiency using DsiRNA against AP-1 and AP-3 143

Figure 3.S5: Knockdown of AP-1 or AP-3 interferes with the intracellular distribution of cargo proteins 144

Figure 3.S6: Tyrosine 375 is unnecessary for RNF13's interaction with AP-1, while alteration to the glutamines in the VVVQLQ motif disrupts endosomal targeting 145

Figure 3.S7: Both AA and AA/GGG variants are expressed at similar levels but higher than the WT and to similar levels than RNF13 WT when AP-3 is repressed 147

Figure 4.1: RNF13 variants L311S and L312P use an AP-1-dependent pathway for endosomal targeting 161

Figure 4.2: RNF13 variants L311S and L312P show increased localization in dendrites and alter their morphology..... 163

Figure 4.3: Alterations in the dileucine motif and the Ub ligase catalytic site change the distribution of early endosomes in dendrites..... 166

Figure 4.4: The number of Lamp1-positive lysosomes is reduced in the proximal dendrites of neurons expressing RNF13 whereas only WT RNF13 alter their distribution 168

Figure 4.5: An intact dileucine motif and Ub ligase activity of RNF13 are requird to increase PSD-95 abundance in proximal dendrite..... 171

Figure 4.6: Alterations to RNF13 dileucine motif decrease Gephyrin presence in dendrites 173

Figure 4.7: Graphic summary of RNF13's impact on various dendritic components..... 176

Figure 5.1: Schematic of IDS different forms based on the maturation and processing..... 185

Figure 5.2: RNF13 interacts with precursor underglycosylated IDS and alters its processing 194

Figure 5.3: RNF13 trafficking to late endosomes/lysosomes is delayed by the presence of IDS 198

Figure 5.4: IDS glycosylation site N246 is important for its processing but is not the site affected by RNF13 200

Figure 5.5: IDS N246Q has a higher colocalization with RNF13 than IDS WT 201

Figure 5.6: RNF13 decreases Endo H resistant species of the mature form and greatly modifies the SD2 glycosylation..... 202

Figure 5.7: RNF13 inhibits IDS maturation but not ER stress induction..... 203

Figure 5.8: RNF13/RNF167 heterodimer modifies the interaction with IDS, increasing the abundance of the underglycosylated form 207

Figure 5.9: Knockdown of endogenous RNF13 or RNF167 modifies how the other E3 ligase affects IDS 209

Figure 5.10: RNF13 E3 ligase activity is required to increase the underglycosylated form, but not RNF167, and mutation in the RING domain of RNF13 alters the interaction with IDS..... 211

Figure 5.11: IDS is not degraded by the lysosomes but by the proteasome while RNF13 protects some forms from degradation 213

Figure 6.1: Les découvertes et les perspectives ouvertes par les travaux présentés dans cette thèse..... 221

Figure A.1 : L'abondance de la protéine IREα n'est pas modifié par RNF13 WT ou les variants DEE73 248

Figure A.2 : RNF13 WT diminue l'abondance de Rab5 alors que les variants DEE73 diminuent également celle de Rab7 249

Figure B.1 : RNF13 LL/AA colocalise davantage avec LC3 en condition basale que le WT, mais n'augmente pas lorsque la fonction lysosomale est altérée par des traitements pharmacologiques 250

Figure B.2 : L'abondance protéique de RNF13 est augmentée par la présence de AP1M1 ou par un traitement de BFA avec un effet additif lorsque combinés 251

Figure B.3 : RNF13 WT augmente les autophagosomes p62 positifs et LC3-II négatifs alors que RNF13 LL/AA altère la dégradation de p62 252

Figure C.1 : La présence de IDS empêche l'augmentation de l'actine F causée par RNF13, mais pas l'induction de l'autophagie 253

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ACC	Agénésie du corps calleux
ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique (*Deoxyribonucleic acid*)
AMPAR	Récepteur acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolopropionique
AMPK	*Adenosine monophosphate-activated protein kinase*
AnkG	Ankyrine G
AP	Protéine adaptatrice (*Adaptor protein*)
AP1G1	*Adaptor-related protein complex 1 subunit gamma 1*
AP3D1	*Adaptor-related protein complex 3 subunit delta 1*
Arf	Facteurs d'ADP-ribosylation (*Adenosine ribosylation factors*)
ARN/RNA	Acide ribonucléique (*ribonucleic acid*)
ARNm	ARN messager
ASK1	*Apoptosis signal-regulating kinase 1*
ATG	*Autophagy-related*
BDNF	*Brain-derived neurotrophic factor*
BFA	Brefeldin A
BiP	*Binding immunoglobulin protein*
BLOC-1	*Biogenesis of lysosome-related organelle complex 1*
BORC	*BLOC-one-related complex*
BST2	*Bone marrow stromal antigen 2*
C-RZF	*Chicken RING zinc finger*

CAM	*Cell adhesion molecule*
CASTOR1	*Cytosolic arginine sensor for mTORC1 subunit 1*
CC	Corps calleux
CCV	Vésicule recouverte de clathrine (*Clathrin-coated vesicle*)
CD-MPR	Cation-dépendant MPR (*Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor*)
CHX	Cycloheximide
CI-MPR	Cation-indépendant MPR (*Cation-independent mannose-6-phosphate receptor*)
CNX	Calnexine
COP	*Coat Protein Complex*
CORVET	*Class C core vacuole/endosome tethering*
CQ	Chloroquine
CRT	Calréticuline
CS	Chondroïtine sulfate
CSPG	Protéoglycane à chaîne de chondroïtine sulfate
CTL	*Control*
DEE	Encéphalopathie épileptique et développementale
DIST	*Distal*
DIV	*Day in vitro*
DMSO	Dimethylsulfoxide
DN	*Dominant negative*
dsiRNA	*Dicer-substrate siRNA*

DUB	Désubiquitinase
Dyn2	Dynamine 2
E1	Enzyme d'activation de l'Ub
E2	Enzyme de conjugaison d'Ub
E3	Enzyme Ub ligase
EB	*End-binding*
EDEM	*ER degradation enhancing α-mannosidase like protein*
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic acid*
EEA1	*Early endosome antigen 1*
EGAD	Dégradation associée au Golgi et aux endosomes
EGF	*Epidermal growth factor*
EGFR	Récepteur de l'EGF
Endo H	Endoglycosidase H
EPSP	Potentiel postsynaptique excitateur
ERAD	Dégradation associée au RE (*ER-associated degradation*)
ERGIC	*ER-Golgi intermediate compartment*
ESCRT	*Endosomal sorting complex required for transport*
GABA	Acide gamma-aminobutyrique (*Gamma-aminobutyric acid*)
GAG	Glycosaminoglycane
GAP	*GTPase-activating protein*
GATOR	*GAP activity toward Rags*

GDI	*GDP dissociation inhibitor*
GEF	*Guanine nucleotide exchange factor*
GFP	*Green fluorescent protein*
Glc	Glucose
GlcNAc	*N*-acétylglucosamine
GM-CSF	*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*
GNPT	GlcNAc-1-phosphotransférase
GnT	GlcNAc-transférase
GOF	*Gain-of-function*
GS	Golgi satelitte
HECT	*Homology to E6AP Carboxyl Terminus*
HOPS	*Homotypic fusion and vacuole protein sorting*
IDS	Iduronate 2-sulfatase
IF	Immunofluorescence
Ii	*Invariant chain*
IL	*Interleukin*
ILV	Vésicule intraluminale
IP	*Immunopurified protein*
IPC	Cellule progénitrice intermédiaire
IRE1α	*Inositol-requiring enzyme 1α*
JNK	c-*Jun N-terminal kinase*

KIF	Kinésine
Lamp1	*Lysosomal-associated membrane protein 1*
LC3	*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*
LGALS	Galectine
LIMP-II	*Lysosome membrane protein 2*
LOF	*Loss-of-function*
LSD	Maladie de surcharge lysosomale (*Lysosomal storage disorder*)
LTP	Potentialisation à long terme
LYST	*Lysosomal trafficking regulator protein*
M6P	Mannose-6-phosphate
Man	Mannose
MAP2	*Microtubule-associated protein 2*
MEC/ECM	Matrice extracellulaire (*Extracellular matrix*)
MMP	Métalloprotéinase matricielle (*Matrix metalloproteinase*)
MOC	*Manders overlap coefficient*
MP	Membrane plasmique
MPR	Récepteur M6P
MPS II	Mucopolysaccharidose de type II (*Mucopolysaccharidosis type II*)
MT	Microtubule
mTORC1	*Mammalian target of rapamycin complex 1*
MVB	Corps multivésiculaire

MW	Poids moléculaire (*Molecular weight*)
NASH	Stéatohépatite non alcoolique
Nav	Canaux sodique voltage-dépendants
Nef	*Negative factor*
NF-κB	*Nuclear factor-kappa B*
NMDAR	Récepteur N-méthyl-D-aspartate
NPC1	*NPC intracellular cholesterol transporter 1*
NRF2	*Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2*
NT	*Non-transfected*
NTs	Neurotransmetteurs
PA	*Protease-associated*
PDI	*Protein disulfide-isomerase*
PG	Protéoglycane
PI	Phosphatidylinositol
$PI(3,5)P_2$	PI-3,5-biphosphate
PI(3)P	PI-3-phosphate
$PI(4,5)P_2$	PI-4,5-biphosphate
PI(4)P	PI-4-phosphate
PIP	PI-phosphate
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate

PNGase F	Peptide-N-glycosidase F
PNN	Filet périneuronaux
PROX	*Proximal*
PSD-95	*Postsynaptic density protein 95*
PTM	Modification post-traductionnelle
RBR	*RING between RING*
RCAS1	*Receptor binding cancer antigen expressed in SiSo cells*
RE/ER	Réticulum endoplasmique (*Endoplasmic reticulum*)
RES	RE satellite
RGC	Cellule gliale radiale
RIDD	*IRE1-dependent mRNA decay*
RIM	*Rab3-interacting molecules*
RIM-BP	*RIM binding protein*
RING	*Really Interesting New Gene*
RM	*Repeated measure*
RMR	*Receptor-homology-transmembrane-RING-H2*
RNF	*Ring finger protein*
Rpn	*Regulatory particle of non-ATPase*
SEM	*Standard error of the mean*
SIA	Segment initial de l'axone
SM	*Sec1/Munc-18 like proteins*

SNAP-25	*Synaptosome associated protein 25*
SNAPIN	*SNARE-associated protein*
SNARE	*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*
SNC	Système nerveux central
SNX18	*Sorting nexin 18*
SP	Signal peptide
STING	*Stimulator of interferon genes protein*
SV	Vésicule synaptique (*Synaptic vesicle*)
Tf	Transferrine
TfR	Récepteur de la Tf
Tg	Thapsigargine
TGN	Réseau transgolgien (*trans-Golgi network*)
TLR	*Toll-like receptor*
TM	*Transmembrane*
Tn	Tunicamycine
TNF	*Tumor necrosis factor*
TRAF2	*TNF receptor-associated factor 2*
TRIM	*Tripartite motif-containing*
TYR	*Tyrosinase*
Ub	Ubiquitine (*Ubiquitin*)
UDP	Uridine diphosphate

UGGT	Glucosyltransférases de glycoprotéines UDP-glucose
UPR	Réponse aux protéines non repliées (*Unfolded protein response*)
UPS	Système de l'ubiquitine-protéasome (*Ubiquitin-proteasome system*)
USP32	*Ubiquitin-specific protease 32*
V-ATPase/ATP6	ATPase de type vacuolaire
VAMP	*Vesicle-associated membrane protein*
VGAT	*Vesicular GABA transporter*
VGCC	Canaux calcique voltage-dépendant
Vps	*Vacuolar protein sorting*
Vpu	*Viral protein u*
VSD	*Vacuolar sorting determinant*
VSR	*Vacuolar sorting receptor*
WB	*Western Blot*
WDR81	*WD repeat domain 81*
WIPI	*WD repeat domain PI-interacting protein*
WT	Protéine sauvage (*Wild-type*)
XBP1	*X-box binding protein 1*
XBP1s	XPB1 *spliced*
XylT	Peptide-O-xylosyltransférase
ZNRF	*Zinc and RING finger protein*

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

α	Alpha
A	Ampère
β	Beta
°C	Degré Celsius
δ	Delta
ε	Epsilon
γ	Gamma
g	Gramme
κ	Kappa
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µm	Micromètre
µM	Micromolaire
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
µ	Mu

ng	Nanogramme
nL	Nanolitre
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire
Ω	Omega
ϕ	Phi
rpm	Rotation par minute
σ	Sigma
U	Unité
V	Volt
ζ	Zeta

RÉSUMÉ

L'encéphalopathie épileptique et développementale (DEE) est un groupe de troubles neurologiques rares et graves. Identifiée en 2019, la DEE73 est causée par des mutations dans le gène *RNF13* menant aux variants L311S et L312P de la protéine. Cependant, les connaissances entourant la DEE73 sont principalement limitées aux altérations génétiques et aux manifestations cliniques. Les variants altèrent un motif dileucine connu pour permettre l'interaction avec les complexes de protéines adaptatrices (AP), impliqués dans le transport de protéines. Comme RNF13 est une E3 ubiquitine ligase connue pour être localisée dans les endosomes tardifs et les lysosomes, notre hypothèse est que les variants ont une localisation cellulaire altérée par une perte d'interaction avec le complexe AP-3, responsable pour le transport vers les lysosomes. De plus, comme AP-3 est connu pour transporter les protéines axonales et est impliqué dans la biogenèse des vésicules synaptiques, une seconde hypothèse est qu'une perte d'interaction avec celui-ci entrave la fonction neuronale normale de RNF13. Les objectifs de l'étude sont de déterminer si le motif dileucine est impliqué dans l'interaction avec AP-3, de caractériser la conséquence de la perte du motif et d'identifier de nouveaux mécanismes cellulaires régulés par RNF13. En utilisant des techniques biochimiques, de biologie cellulaire et moléculaire, nous avons démontré que les variants altèrent l'interaction avec le complexe AP-3. Ils ne sont plus localisés aux lysosomes et affectent la taille des vésicules endolysosomales. RNF13 WT avec une répression de AP-3 réplique également ces effets. Cependant, les variants sont toujours retrouvés dans les endosomes tardifs, suggérant une seconde voie de transport. Grâce à AlphaFold, nous avons identifié un second motif permettant aux variants d'interagir avec AP-1, responsable du transport entre le Golgi et les endosomes. Une répression de AP-1 ou AP-3 seul n'affecte pas la localisation de RNF13 WT alors que la double répression empêche son export du Golgi. Les variants sont bloqués au Golgi en présence de la répression de AP-1 seul, suggérant qu'ils empruntent exclusivement une voie AP-1-dépendante. Dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat, nous avons noté une présence des variants accrue dans les dendrites. Nous avons observé une redistribution spatiale des endosomes précoces, une diminution des lysosomes près du noyau et une diminution préférentielle de l'abondance des synapses inhibitrices en développement dans les dendrites en présence des variants. Finalement, grâce à AlphaFold, nous avons identifié deux nouveaux interacteurs de RNF13, soit l'enzyme lysosomale iduronate-2-sulfatase (IDS), impliquée dans une maladie chevauchant les symptômes de DEE73, et l'ubiquitine E3 ligase RNF167, une protéine de la même famille que RNF13. Des essais biochimiques démontrent que RNF13 altère la glycosylation d'IDS et modifie son transport vers les lysosomes. L'hétérodimérisation avec RNF167 modifie la dynamique intracellulaire de RNF13 et RNF167 et, de façon intéressante, le phénotype observé sur IDS est différent. En résumé, notre recherche décrit le transport intracellulaire de RNF13, découvre un nouveau motif d'interaction avec AP-1, identifie IDS et RNF167 comme nouveaux partenaires d'interaction et ouvre de nouvelles perspectives en ciblant des mécanismes cellulaires pouvant être affectés par les variants causant la DEE73.

Mots-clés : RNF13, Routage intracellulaire, Motif dileucine, Protéines adaptatrices, Variants génétiques, Système endolysosomal

ABSTRACT

Developmental epileptic encephalopathy (DEE) is a group of rare and severe neurological disorders. Identified in 2019, DEE73 is caused by mutations in the *RNF13* gene leading to the L311S and L312P variants of the protein. However, RNF13 being a protein whose functions are poorly characterized, knowledge surrounding DEE73 is mainly limited to genetic alterations and clinical manifestations. The genetic variants alter a canonical dileucine motif well known to allow interaction with adaptor protein (AP) complexes, involved in protein transport. As RNF13 is an E3 ubiquitin ligase known to be localized in late endosomes and lysosomes, the hypothesis is that the variants have an altered cellular localization due to a loss of interaction with the AP-3 complex, which is responsible for lysosomal targeting. Furthermore, as AP-3 is known to transport axonal proteins and is involved in synaptic vesicle biogenesis, a second hypothesis is that a loss of interaction with the variants would impair normal neuronal function of RNF13. The objectives of the study are to determine whether the dileucine motif is involved in the interaction with AP-3, to characterize the consequences of the loss of the motif, and to identify novel cellular mechanisms regulated by RNF13. Using biochemical, cellular and molecular biology techniques, we demonstrated that the variants impair the interaction with the AP-3 complex. The variants are no longer localized in the lysosomes and affect the size of endolysosomal vesicles. RNF13 combined with a gene repression of the AP-3 complex also replicates these effects. Interestingly, the variants are still found in late endosomes, suggesting a second transport pathway. Using AlphaFold, we identified a second and previously unknown motif that allows the variants to interact with AP-1, which is responsible for transport between the Golgi and endosomes. Gene repression of AP-1 or AP-3 alone does not affect the localization of RNF13 WT while dual repression prevents its export from the Golgi. Interestingly, the variants are blocked at the Golgi when AP-1 is repressed alone, suggesting that they exclusively use an AP-1-dependent pathway. Using primary rat hippocampal neuron cultures, we noted an increased presence of variants in dendrites. We observed a spatial redistribution of early endosomes, a decrease in lysosomes close to the soma and a preferential reduction in the abundance of inhibitory developing synapses in dendrites in the variants presence. Finally, using AlphaFold, we identified two novel RNF13 interactors: the lysosomal enzyme iduronate-2-sulfatase (IDS), implicated in a disease with overlapping symptoms of DEE73, and the ubiquitin E3 ligase RNF167, a protein from the same family as RNF13. Biochemical assays show that RNF13 WT alters IDS glycosylation and modifies its lysosomal targeting. Heterodimerization with RNF167 alters the intracellular dynamics of RNF13 and RNF167, and, interestingly, the phenotype observed on IDS is different. Overall, our study characterizes the intracellular transport of RNF13, uncovers a novel interaction motif for AP-1, identifies IDS and RNF167 as novel interaction partners, and provides new insights into the cellular and molecular mechanisms altered by DEE73-associated variants.

Keywords: RNF13, Intracellular trafficking, Dileucine motif, Adaptor proteins, Genetic variants, Endolysosomal system

INTRODUCTION

Le cerveau est un organe complexe qui joue un rôle crucial dans diverses tâches, telles que la formation de la mémoire, l'apprentissage ainsi que le contrôle, la planification et la transmission des commandes motrices au système musculosquelettique. Pour y arriver, les cellules du système nerveux central se doivent de communiquer entre elles. Elles y parviennent par le biais des synapses, sites de contact spécialisés (Shepherd, 2004). Les synapses ont la capacité de se remodeler et de modifier la force de leurs connexions, phénomène appelé plasticité synaptique, pour permettre l'intégration de nouvelles informations. De nombreux mécanismes cellulaires assurent la plasticité synaptique (Citri et Malenka, 2008). Malheureusement, l'altération de ces mécanismes conduit souvent à des maladies cérébrales, comme dans le cas de l'épilepsie (Zaitsev *et al.*, 2021).

L'encéphalopathie épileptique et développementale (DEE) est un groupe hétérogène de troubles caractérisés par une déficience intellectuelle sévère aggravée par des crises d'épilepsie réfractaire (Scheffer *et al.*, 2024). Alors que certaines DEE peuvent survenir de causes non génétiques, la majorité des cas sont liés à des mutations dans un segment spécifique de l'ADN permettant la fabrication de protéines, appelé gène. Les récentes avancées dans les technologies de diagnostic génétique ont permis de grandement élargir nos connaissances grâce à l'identification de plusieurs nouveaux gènes causatifs (Scheffer *et al.*, 2024). Par exemple, en avril 2019, soixante-quatorze DEEs étaient rapportées dans la base de données Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). En 2024, à pareille date cinq ans plus tard, la liste s'allonge jusqu'à DEE116. Plus spécifiquement, la DEE73 a initialement été identifiée en 2019 chez trois patients n'ayant pas de liens familiaux et portant des mutations dans le gène *RNF13* (Edvardson *et al.*, 2019). En plus de l'épilepsie et de la déficience intellectuelle, le phénotype des patients inclut, mais ne se limite pas, à une microcéphalie congénitale, des troubles respiratoires, de la surdité et des troubles squelettiques (Edvardson *et al.*, 2019). Dans les dernières années, plusieurs autres mutations dans ce gène ont été identifiées et rapportées pour causer des symptômes similaires (Taylor *et al.*, 2023). RNF13 est une protéine importante au niveau de la prolifération et de la mort cellulaire dont les fonctions commencent à peine à être élucidées (Lin *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2024b; Miyakawa *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2009). Dans ce contexte, les connaissances de la DEE73 sont limitées aux altérations génétiques et conséquences cliniques, alors que les mécanismes cellulaires et moléculaires affectés par les protéines variantes restent à déterminer.

De façon intéressante, une région spécifique dans le gène a été liée à la DEE73, alors qu'une majorité des mutations dans *RNF13* sont plutôt associées avec d'autres maladies, telles que le cancer. Plus précisément, des mutations dans cette région entraîneront la perte ou la modification d'une petite séquence sur la protéine

connue comme étant un motif de type dileucine (Taylor *et al.*, 2023). Ce motif est caractérisé pour permettre l'interaction avec les complexes de protéines adaptatrices (AP) (Park et Guo, 2014). Une cellule est subdivisée en différents compartiments, chacun ayant une fonction précise. Les complexes AP assurent le transport des protéines résidentes vers les endroits appropriés (Park et Guo, 2014). Bien qu'on ait identifié cinq AP à ce jour, seules AP-1, AP-2 et AP-3 sont connues pour reconnaître le motif dileucine (Sanger *et al.*, 2019). Elles ont des rôles critiques pour le transport au sein du système endolysosomal qui est nécessaire à la dégradation de protéines et au maintien de l'homéostasie de l'organisme. En effet, une altération au niveau de ce système cause les maladies dites de surcharge lysosomale (Vitner *et al.*, 2010). Ces maladies sont aussi causées par des mutations génétiques causant la déficience d'une protéine lysosomale, altérant la fonction de l'organite (Platt *et al.*, 2012). Les patients présentent souvent des symptômes étant similaires à ceux d'une DEE. Les plus communes sont les mucopolysaccharidoses (MPS) chez qui l'absence d'une enzyme entraîne l'accumulation de protéines avec de longues chaînes de sucres (Giugliani *et al.*, 2010). À ce jour, une seule enzyme a une interaction avec un complexe AP rapportée sur la base de données BioGRID, qui répertorie les interactions protéine-protéine obtenues par diverses techniques (Oughtred *et al.*, 2021). Cette enzyme est iduronate 2-sulfatase, responsable de la MPS de type II, aussi connue sous le nom de syndrome de Hunter (D'Avanzo *et al.*, 2020; Huttlin *et al.*, 2017; Huttlin *et al.*, 2015). Bien que la sévérité de cette maladie soit hétérogène avec environ deux tiers des patients ayant des atteintes neurologiques, plusieurs symptômes sont partagés avec la DEE73 (D'Avanzo *et al.*, 2020). Curieusement, chez les plantes, la famille de protéines qui est équivalente à celle de RNF13 permet de transporter les enzymes vers la vacuole, un organite équivalent aux lysosomes chez l'humain. Il n'est pas connu si RNF13 possède une fonction similaire, mais le domaine permettant cette fonction chez les plantes est important pour la localisation lysosomale de RNF13, ainsi que pour celle d'un second membre de la famille, soit RNF167.

Les complexes AP ont des rôles particuliers au sein du système nerveux pour le bon développement des synapses (Guardia *et al.*, 2018). Des mutations génétiques de ces protéines ont également été rapportées pour causer des maladies neurodéveloppementales, dont la DEE48, qui est liée au complexe AP-3 (Assoum *et al.*, 2016). Puisque les variants ont un motif dileucine altéré, l'hypothèse de cette étude est que l'interaction avec les complexes AP est abolie, ce qui entraînera une mauvaise localisation des protéines au sein de la cellule et l'empêchera d'effectuer ses fonctions normales dans le système endolysosomal. De plus, puisque les patients présentent des symptômes neurologiques graves, l'interaction altérée anticipée pourrait causer des défauts au niveau des synapses. Les objectifs de cette étude sont de caractériser les conséquences de la perte du motif dileucine sur l'interaction avec les complexes AP et sur le routage intracellulaire de RNF13 ainsi que d'identifier de nouveaux mécanismes cellulaires impliquant RNF13 afin de mieux comprendre la DEE73.

CHAPITRE 1
REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 L'organisation cellulaire

La cellule est l'unité composant l'entièreté du corps humain. En effet, les tissus, formant les organes, sont en réalité plusieurs cellules regroupées et maintenues en place par la matrice extracellulaire (MEC). Puisque les organes ont chacun des rôles spécifiques, il existe plusieurs types de cellules qui auront des caractéristiques particulières. Cela dit, les cellules partagent tous les mêmes éléments de base. À plus grande échelle, il est possible de regrouper plusieurs types cellulaires afin de former un système. Par exemple, le système nerveux est un réseau complexe permettant de coordonner des actions, d'intégrer des informations sensorielles et de réguler le fonctionnement des autres organes (Zimmer, 2011). Ce système est divisé en deux parties : le système nerveux central (SNC), composé du cerveau et de la moelle épinière, et le système nerveux périphérique regroupant les terminaisons nerveuses reliant le SNC aux autres parties du corps. Le cerveau humain contient plusieurs milliards de neurones, unités structurelles et fonctionnelles de base du système nerveux (Widmaier et Strang, 2013). Dans le contexte de cette thèse, nous aborderons des aspects fondamentaux de la cellule, tels que des voies de signalisation impliquées dans la synthèse, le transport et la dégradation de protéines, puis appliquerons certains de ces éléments spécifiquement aux neurones.

1.1.1 Les compartiments cellulaires

La cellule est compartimentalisée et divisée en différents organites. Ceci permet d'isoler des environnements locaux afin de permettre à des processus incompatibles entre eux de se produire dans une seule cellule (Shim et Youn, 2024). Chaque compartiment possède des fonctions précises et doit maintenir une homéostasie pour la bonne santé de la cellule. Bien qu'ils soient considérés comme étant distincts et indépendants, les organites forment des contacts fonctionnels les uns avec les autres, de sorte qu'une dysfonction de l'un d'entre eux aura d'importantes conséquences sur les autres (Voeltz *et al.*, 2024). Plusieurs maladies sont causées par la perte de fonction d'un organite, incluant le cancer et les maladies génétiques, neurodégénératives ou métaboliques (Shim et Youn, 2024). Un survol rapide de différents compartiments est d'abord présenté afin de mettre en contexte l'ordre de ceux-ci au niveau de la voie biosynthétique, un concept important pour la présente étude, puis ils seront revus plus en détail dans les sections appropriées.

1.1.1.1 La membrane plasmique et autres membranes

La membrane plasmique (MP) permet de séparer le cytoplasme, qui représente l'entièreté de l'intérieur de la cellule ainsi que le cytosol dans lequel baignent les organites, de l'environnement extracellulaire et

d'offrir une protection à la cellule. Certains organites sont également entourés d'une membrane, partageant la même structure générale (Morita et Ikeda, 2022). Spécifiquement, les membranes cellulaires sont composées d'une bicouche lipidique, retenues ensemble principalement par des interactions non covalentes. Comme le nom l'indique, la bicouche lipidique est formée de deux couches de lipides, dont le groupe le plus abondant est les phospholipides (Morita et Ikeda, 2022). Composés d'une tête hydrophile et de deux queues hydrophobes, les phospholipides se regroupent en milieu aqueux de façon à cacher les parties hydrophobes, laissant les têtes hydrophiles exposées au milieu et créant ainsi la double couche. Les lipides étant à l'intérieur de la bicouche, leurs propriétés hydrophobes permettent à la membrane d'avoir une barrière imperméable à la plupart des molécules hydrophiles (Alberts *et al.*, 2002). Pour permettre les échanges entre les milieux séparés par la membrane, des protéines transmembranaires y sont insérées grâce à des régions hydrophobes dans leur séquence. Alors que les lipides forment la membrane, les protéines effectuent la majorité des fonctions associées à la membrane (Alberts *et al.*, 2002). En plus de faciliter les échanges entre les milieux, les protéines transmembranaires peuvent être responsables, entre autres, de la transduction d'un signal provenant du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire (Alberts *et al.*, 2002).

1.1.1.2 Le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi

Le RE est composé d'un réseau de tubules et de sacs appelés citernes entourées d'une membrane qui les sépare du cytosol. La lumière du RE fait référence à l'espace à l'intérieur des membranes. Le RE est l'usine biosynthétique de la cellule, puisqu'il est responsable de la synthèse des lipides et des protéines (Reece *et al.*, 2011). Le RE se divise en deux régions, ayant certaines divergences au niveau des caractéristiques moléculaires et fonctionnelles, soit le RE lisse ou rugueux. Le premier n'a pas de ribosomes sur sa face cytoplasmique, lui donnant ainsi son aspect lisse. Celui-ci permet la synthèse des lipides, des phospholipides et des stéroïdes (Cole et Kramer, 2016). Le RE rugueux est ainsi nommé, car il présente un aspect granulaire causé par la présence de ribosomes qui lui sont liés. Il sert principalement à synthétiser des protéines. Les protéines nouvellement synthétisées se retrouvent dans la lumière du RE, les séparant du cytosol (Cole et Kramer, 2016). Ces protéines sont ensuite envoyées vers l'appareil de Golgi afin de les entreposer, trier et expédier dans les bons compartiments (Frisbie *et al.*, 2019). L'appareil de Golgi a une polarité structurale dont les citernes ont diverses fonctions selon l'emplacement (Schoberer *et al.*, 2010). Plus spécifiquement, les protéines entrent par la face *cis*, située près du RE, et ressortent par la face *trans* (Schoberer *et al.*, 2010). Lors du passage dans le Golgi, les protéines sont modifiées afin d'être acheminées au bon endroit, soit vers la MP, les endosomes, les lysosomes ou les vésicules extracellulaires (Reece *et al.*, 2011). Suivant la partie *trans*-Golgi, on retrouve le réseau transgolgien (TGN), caractérisé par une structure de vésicules tubulaires, contrairement aux citernes du *trans*-Golgi (Day *et al.*, 2013).

1.1.1.3 Les endosomes et les lysosomes

Les endosomes et lysosomes sont des vésicules membranaires. Il existe plusieurs types d'endosomes avec des caractéristiques particulières en fonction de leur destination de départ et de fin (Naslavsky et Caplan, 2018). En effet, ceux-ci sont responsables du routage intracellulaire et permettent de trier les protéines en provenance ou en direction de l'appareil de Golgi, la MP ou les lysosomes (Fritzler et Chan, 2007). Pour les lysosomes, la principale caractéristique est le pH très acide (4.5 à 5.5), ce qui confère un environnement optimal pour la dégradation de macromolécules ou de composantes cellulaires (Zeng *et al.*, 2020). Ils ont d'ailleurs longtemps été considérés comme ayant cette unique fonction. Cependant, au cours des dernières années, il est devenu évident que les lysosomes peuvent réguler d'autres mécanismes cellulaires. Ils sont largement distribués dans la cellule, mais il est généralement possible de distinguer deux populations distinctes (Cabukusta et Neefjes, 2018). Les lysosomes regroupés autour du noyau sont plus dégradatifs alors que ceux en périphérie de la cellule exercent généralement d'autres fonctions, tels que la présentation d'antigène, la régulation de gène, la réparation de la MP, la signalisation métabolique, l'apoptose, le transport du cholestérol et la migration et l'adhésion cellulaire, entre autres (Cabukusta et Neefjes, 2018; Pu *et al.*, 2016). Les endosomes et lysosomes travaillent de pair et forment ensemble le système endolysosomal, où une maturation graduelle des endosomes caractérisée par une diminution du pH et une conversion de la composition des protéines qui lui sont associées mènera à la fusion avec le lysosome (Liu *et al.*, 2016b).

1.1.2 La structure neuronale

Afin de relayer l'information au sein du système nerveux, les neurones se doivent de communiquer entre eux. Surtout, l'information doit pouvoir parcourir plusieurs mètres, afin de permettre à un signal d'être perçu d'une extrémité à l'autre du corps humain. Pour ce faire, la structure particulière du neurone permet la création d'une jonction, qu'on appelle synapse, entre deux neurones (Vardalaki *et al.*, 2025). Le neurone est séparé en trois principaux domaines, soit le soma, les dendrites et l'axone.

1.1.2.1 Le soma

Le soma, ou corps cellulaire constitue le site principal de synthèse et de dégradation de macromolécules où on retrouve tous les organites nécessaires (Fig. 1.1A) (Hammond, 2015). Pour la dégradation, les lysosomes les plus acides et dégradatifs se retrouvent dans le soma (Fig. 1.1A) (Yap et Winckler, 2022). Il est en continuelle communication avec les extensions qui émergent de son corps, soit l'axone et les dendrites (Fig. 1.1A) (Hammond, 2015). Ces derniers permettent le transfert d'information entre les neurones par des signaux électriques et chimiques (Desai-Chowdhry *et al.*, 2022). Le soma agit comme centre d'intégration, entre autres puisque le noyau contenant l'ADN s'y retrouve (Hammond, 2015; Schiefer et Tyler, 2015).

1.1.2.2 L'axone

Chaque neurone possède un seul axone et celui-ci agit comme transmetteur, conduisant l'information en provenance du corps cellulaire (Fig. 1.1) (Hammond, 2015). L'axone est généralement très long, pouvant s'allonger sur plus d'un mètre pour certains types de neurones chez l'humain (Hagemann *et al.*, 2022; Saito et Cavalli, 2016). L'axone peut faire des branches complexes et précises, lui permettant de communiquer avec plusieurs autres neurones à la fois (Rubio-Teves *et al.*, 2021). Dans le SNC, les axones ayant un diamètre supérieur à 0.5 μm sont généralement recouverts d'une gaine de myéline, qui agit comme un isolant électrique afin d'augmenter la vitesse de conduction de l'influx nerveux (Fig. 1.1) (Suminaite *et al.*, 2019). L'axone débute par un sous-domaine, appelé segment initial de l'axone (SIA), mesurant entre 20 à 60 μm de longueur, et sépare l'axone du corps cellulaire (Fig. 1.1B) (Huang et Rasband, 2018). Ce segment est caractérisé par une forte abondance en canaux ioniques voltage-dépendants permettant d'initier les potentiels d'action (Fig. 1.1B) (Donato *et al.*, 2019). De plus, le SIA a une composition structurale distincte avec un cytosquelette spécifique (sera discuté dans la section 1.4.1) (Kevenaar et Hoogenraad, 2015), ce qui lui permet d'agir comme barrière de transport pour les cargos destinés aux dendrites (Kemal *et al.*, 2022; Koppers et Farías, 2021). Le SIA contient également des organites cisternaux, un type de RE spécialisé avec plusieurs couches de membranes aplaties, servant principalement à entreposer et relâcher des ions de calcium (Fig. 1.1B) (Han *et al.*, 2024). Si présente, la première gaine de myéline se retrouve directement après le SIA puisque ce dernier en est dépourvu (Fig. 1.1) (Suminaite *et al.*, 2019). On retrouve du RE et de l'appareil de Golgi dans la tige de l'axone et des organites satellites de ces compartiments (RES: RE satellite; GS: Golgi satellite) se déplacent afin d'assurer la synthèse et la maturation de protéines locale, notamment dans les boutons synaptiques qui constituent les terminaisons axonales (Fig. 1.1C) (Kemal *et al.*, 2022). Des endosomes et des lysosomes régulent le transport et la signalisation des protéines membranaires (Fig. 1.1C) (Kemal *et al.*, 2022). Seuls les 25 premiers microns près du soma contiennent des lysosomes dégradatifs, ce qui correspond généralement au SIA (Fig. 1.1B). Finalement, l'extrémité de l'axone se divise en fines branches qu'on définit comme étant l'arborisation terminale (Fig. 1.1) (Mihailoff et Haines, 2018).

1.1.2.3 Les dendrites

Contrairement à l'unique axone, il y a en moyenne de un à neuf dendrites qui s'étendent du soma et qui se divisent ensuite jusqu'à la formation d'un arbre dendritique (Hammond, 2015). On identifie les dendrites qui sont liés au soma comme étant primaires alors que les subséquents sont classifiés selon l'embranchement (Hammond, 2015). Par exemple, les dendrites secondaires sont des branchements provenant des primaires, les tertiaires proviennent des secondaires, et ainsi de suite (Fig. 1.1) (Li *et al.*, 2015). Puisque le diamètre des dendrites diminue à mesure que les branchements s'éloignent du noyau, les différents types ne possèdent

pas les mêmes propriétés (Hammond, 2015). À l'inverse de l'axone, les dendrites permettent de propager un signal jusqu'au soma (Desai-Chowdhry *et al.*, 2022). Un groupe de chercheurs a étudié la relation entre le type de dendrite et le signal obtenu dans le noyau. En mesurant le niveau d'activation d'une cascade de signalisation selon l'emplacement de la stimulation, ils ont démontré que les dendrites secondaires permettaient la meilleure activation, grâce à un diamètre plus petit que les primaires en combinaison avec un emplacement plus près du noyau que les types subséquents, démontrant bien les différentes caractéristiques (Li *et al.*, 2015). De plus, les lysosomes les plus dégradatifs se retrouvent également dans les 25 premiers microns près du soma, ce qui correspond généralement aux dendrites primaires (Yap et Winckler, 2022). Les organites nécessaires pour la synthèse et le transport sont particulièrement abondants aux points d'embranchement, et les organites satellites peuvent se déplacer dans les épines dont l'activité est stimulée (Fig. 1.1E) (Grochowska *et al.*, 2022). Les épines dendritiques sont de minuscules protubérances qui forment des synapses excitatrices avec les axones des autres neurones (Fig. 1.1) (Pchitskaya et Bezprozvanny, 2020). La forme et la grosseur des épines changent constamment en réponse à l'activité neuronale, un aspect critique pour l'apprentissage et la mémoire (Pchitskaya et Bezprozvanny, 2020). Un changement au niveau de la morphologie est lié à une expression altérée des protéines du cytosquelette, des facteurs neurotrophiques et du remodelage de la MEC, expliquant pourquoi la morphologie est grandement liée à la fonction de la synapse (Jean *et al.*, 2023; Kumari et Brewster, 2024).

1.1.2.4 Les synapses

Les synapses peuvent être électriques ou chimiques, mais le premier groupe est peu présent chez les mammifères (Angevine, 2002). Les synapses chimiques sont appelées ainsi puisqu'elles utilisent les neurotransmetteurs (NTs), l'agent chimique, afin de relayer un message. De plus, il existe des synapses excitatrices ou inhibitrices qui augmentent ou diminuent, respectivement, la probabilité d'induire un potentiel d'action sur le neurone receveur (Moini et Piran, 2020). Bien que tous les domaines puissent former des synapses (Arslan, 2016), les synapses sont typiquement entre l'axone d'un neurone et le dendrite (axo-dendritique) ou le soma (axo-somatique) d'un autre neurone (Cover et Mathur, 2021). Les boutons synaptiques des axones constituent les terminaux présynaptiques alors que les receveurs forment les terminaux postsynaptiques (Fig. 1.1) (Donato *et al.*, 2019). Il y a des différences moléculaires, morphologiques et chimiques entre les terminaux postsynaptiques des synapses excitatrices et inhibitrices. En effet, les synapses excitatrices utilisent les épines dendritiques (Fig. 1.1), alors que les synapses inhibitrices sont formées directement sur la tige du dendrite ou avec le soma (non représenté) (Sheng et Kim, 2011). Entre les terminaux pré- et postsynaptiques, on retrouve la fente synaptique, un espace large de 20 à 50 nm où les NTs sont relargués par les vésicules synaptiques (SVs), qui sont retrouvés à proximité de la membrane présynaptique (Fig. 1.1C, E) (Mihailoff et Haines, 2018). Finalement, une fois relargués, les NTs

se lient à des récepteurs spécifiques situés sur la membrane postsynaptique (Fig. 1.1E), permettant l'entrée d'ions et provoquant une dépolarisation ou hyperpolarisation de la membrane si la synapse est excitatrice ou inhibitrice, respectivement (Moini et Piran, 2020). Ce changement de polarisation génère ce qu'on appelle des potentiels postsynaptiques. Les potentiels postsynaptiques excitateurs (EPSP) ou inhibiteurs (IPSP) sont des potentiels gradués pouvant varier en voltage selon l'intensité du signal et dont la force diminue avec la distance (Moini *et al.*, 2024). Un seul EPSP permet une dépolarisation d'environ 0.5 mV alors qu'un potentiel d'action est déclenché dans le SIA lorsqu'il y a atteinte du seuil de potentiel qui est de +10 à +15 mV que la membrane au repos (Moini *et al.*, 2024). Cependant, contrairement au potentiel d'action qui est un événement « tout ou rien », les EPSP et IPSP s'additionnent de manière temporelle ou spatiale et si le seuil est atteint par cette somme, le potentiel d'action est déclenché (Moini *et al.*, 2024).

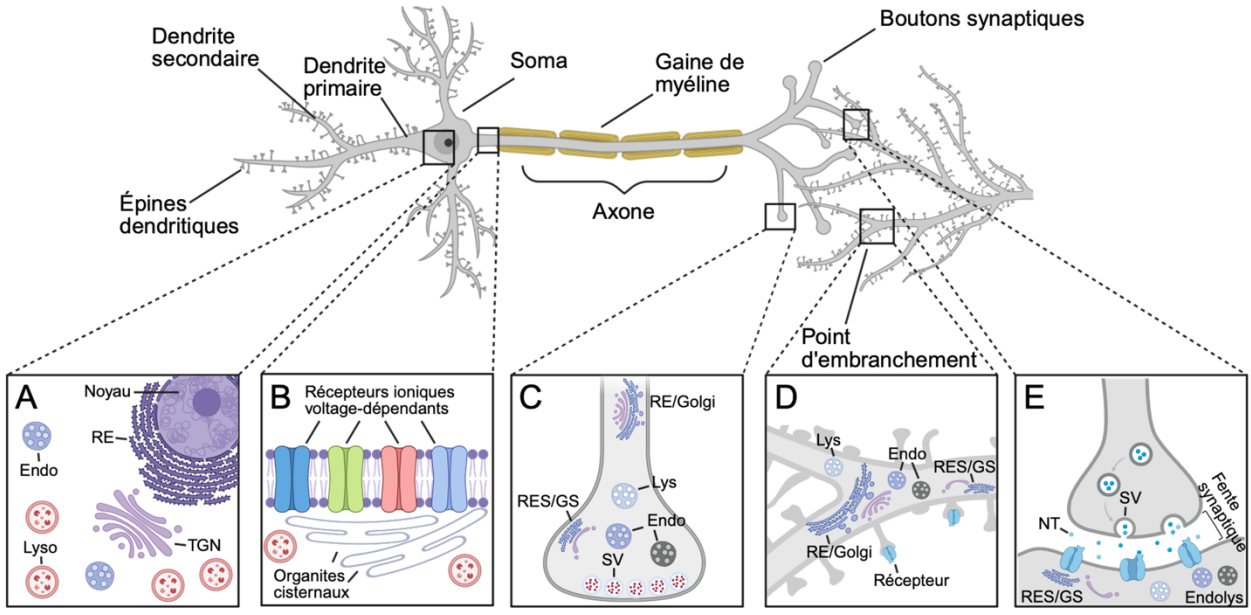


Figure 1.1: La structure et les composantes des différents domaines de neurones communiquant entre eux.

(**A**) Le soma contient le noyau et les organites nécessaires à la synthèse, au transport et à la dégradation des protéines. Les lysosomes (Lys) les plus dégradatifs sont dans ce domaine (en rouge). (**B**) Le SIA est retrouvé entre le soma et la première gaine de myéline et contient des organites cisternaux et plusieurs types de récepteurs voltage-dépendants. Il contient un cytosquelette particulier (non représenté, décrit dans la section 1.4.1). (**C**) L'axone et (**D**) les points d'embranchement des dendrites contiennent du RE et de l'appareil de Golgi. Des satellites de ces organites (RES/GS) se déplacent dans les boutons synaptiques, les dendrites et les épines. Plusieurs types d'endosomes (Endo) et des lysosomes non dégradatifs (en bleu) sont présents. (**E**) Les boutons synaptiques forment la portion présynaptique et les épines dendritiques, la portion postsynaptique. Les SVs relâchent les NTs dans la fente synaptique. Des organites RES et GS sont recrutés dans les épines dendritiques soumises à une forte activité synaptique. Schéma créé avec BioRender.com.

1.1.3 Le développement du cortex cérébral

Les neurones sont des cellules post-mitotiques. Ceci signifie qu'une fois que la cellule progénitrice se différentie pour donner un neurone, ce dernier ne peut plus se diviser (Uzquiano *et al.*, 2018). Lors du début du développement, les cellules souches neuroépithéliales sont situées dans la zone ventriculaire et se transforment en cellules gliales radiales (RGCs) (Subramanian *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2024). Chez l'humain, les RGCs s'amplifient en se divisant de façon symétrique, ce qui augmente l'épaisseur et l'aire de surface de la zone ventriculaire (Zarzor *et al.*, 2024). Ensuite, une division asymétrique permet de garder un RGC et d'obtenir soit un neurone, une cellule proliféatrice intermédiaire (IPC) ou un RGC externe (Subramanian *et al.*, 2020). Les IPCs, retrouvés dans la zone subventriculaire située au-dessus de la zone ventriculaire, et les RGCs externes de la zone subventriculaire externe sont utilisés pour amplifier le nombre de neurones produits. En effet, les deux types peuvent se diviser de façon symétrique une ou plusieurs fois ou de façon asymétrique, où un IPC/RGC externe et un neurone seront formés (Subramanian *et al.*, 2020). Les RGCs externes se différencient des IPCs par un comportement migratoire distinct qui contribue à l'expansion de la zone subventriculaire externe (Subramanian *et al.*, 2020). Les neurones se positionnent de façon « *inside-out* » en migrant de façon radiale sur les RGCs pour former la plaque corticale (Hatanaka et Hirata, 2020). Cependant, les interneurones inhibiteurs migrent différemment en utilisant plusieurs courants de migration (Moffat *et al.*, 2015). Ils migrent de façon tangentielle dans la zone intermédiaire, située entre la zone subventriculaire externe et la plaque corticale, jusqu'à ce qu'ils arrivent au bon endroit, puis de façon radiale pour atteindre la plaque corticale (Budday *et al.*, 2015). Après la neurogenèse, les RGCs génèrent des progéniteurs intermédiaires multipotents basaux qui se divisent plusieurs fois pour obtenir des cellules précurseurs d'astrocyte ou d'oligodendrocytes (Yang *et al.*, 2022a). Les deux types sont formés et s'établissent dans la zone subventriculaire externe, alors que seulement les astrocytes peuvent aussi être formés dans la zone ventriculaire pour migrer radialement et atteindre la plaque corticale (Allen *et al.*, 2022). De façon importante, le début de la myélinisation des axones par les oligodendrocytes transforme la zone intermédiaire en matière blanche alors que la plaque corticale devient la matière grise (Budday *et al.*, 2015). La gliogenèse est accompagnée de la synaptogenèse qui permet d'établir les connexions et se prolonge après la naissance où le moment exact d'établissement dépend de la région (Zhou *et al.*, 2024). Par exemple, le cortex auditif atteint sa synaptogénèse maximale vers 3 mois postnatal alors que le cortex visuel se situe entre 8 à 12 mois et que le cortex préfrontal nécessite 2 à 4 ans (Subramanian *et al.*, 2020). La gliogenèse et la synaptogenèse sont liées puisque les astrocytes permettent d'éliminer les synapses inappropriées alors que les oligodendrocytes produisent la gaine de myéline et offrent un support structurel aux neurones (Subramanian *et al.*, 2020).

1.1.3.1 Les encéphalopathies développementales et épileptiques

Les encéphalopathies développementales et épileptiques (DEE) sont un groupe hétérogène de maladies infantiles rares, généralement de causes génétiques, caractérisées par un retard du développement et une déficience intellectuelle aggravés par la présence d'une activité épileptique récurrente (Scheffer et Liao, 2020). De façon importante, l'épilepsie et le retard du développement sont causés indépendamment, de sorte qu'un traitement pour l'épilepsie n'aura pas d'effet positif sur le développement, contrairement à une encéphalopathie épileptique où le retard de développement directement causé par l'épilepsie peut être amélioré (Scheffer et Liao, 2020; Specchio et Curatolo, 2021). Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents peuvent être non exclusifs malgré la progression indépendante (Guerrini *et al.*, 2023). Par exemple, le variant d'une protéine qui induit des défauts synaptiques peut entraîner une connectivité aberrante causant les crises d'épilepsie, en plus d'altérer la plasticité synaptique et induire les déficits cognitifs (Hamdan *et al.*, 2017). De plus, alors que certaines DEEs n'affectent que le SNC, d'autres ont des présentations cliniques multisystémiques (Guerrini et Conti, 2024).

1.1.3.1.1 Les malformations du cortex

La microcéphalie est communément présente chez les patients atteints de DEE, bien que certains présentent plutôt une macrocéphalie (Guerrini *et al.*, 2023). La microcéphalie et la macrocéphalie sont caractérisées par une grosseur de tête de plus de trois écarts-types en dessous et au-dessus de la moyenne, respectivement (Pirozzi *et al.*, 2018). La microcéphalie est caractérisée par un nombre de neurones anormalement réduit et est généralement causée par soit une diminution du nombre de cellules progénitrices ou une augmentation de l'apoptose (Ossola et Kalebic, 2022). En effet, les neurones étant post-mitotiques, les mécanismes entourant l'étape commettante de différentiation doivent être bien régulés spatiotemporellement pour éviter qu'elle se fasse de façon précoce. Si c'est le cas, il n'y aurait pas d'amplification du bassin de progéniteurs, ce qui mènerait à un nombre total réduit de neurones (Uzquiano *et al.*, 2018). Spécifiquement, le cycle cellulaire joue un rôle critique sur le sort des RGCs (Hardwick et Philpott, 2014). Plusieurs études ont démontré que des manipulations permettant de prolonger la phase G1 entraînent la différenciation des neurones alors qu'une phase plus courte favorise la division cellulaire et permet aux progéniteurs d'accroître leur nombre (Hardwick et Philpott, 2014). Les différentes familles de protéines cycline sont impliquées séquentiellement lors du cycle cellulaire où les cyclines D permettent la progression de la phase G1 (Pellarin *et al.*, 2025). Une surexpression des cyclines D accélère la progression du cycle et favorise la prolifération des progéniteurs alors qu'une répression allonge significativement la phase G1 (Hardwick et Philpott, 2014). En concordance, des variants stabilisant la cycline D2 causent une macrocéphalie alors que des variants avec perte de fonction sont causateurs de la microcéphalie (Saleban *et al.*, 2023). Il y a de multiples voies de signalisation qui peuvent affecter le cycle cellulaire et altérer le développement neuronal.

Le corps calleux (CC; *corpus callosum* en latin) est le plus grand faisceau de fibres du cerveau humain et permet d'interconnecter les hémisphères gauche et droit (Hofer et Frahm, 2006). Avec plus de 200 millions d'axones, le CC constitue la plus grosse structure de matière blanche du cerveau humain (Hofman *et al.*, 2020; Luders *et al.*, 2010). Le nombre de fibres calleuses est stable dès la naissance, mais les changements structuraux continuent lors du développement postnatal, accompagnant la gliogenèse et la synaptogenèse (Luders *et al.*, 2010). Le développement du CC se produit en quatre phases débutant par la polarisation neuronale et la spécification de l'axone, suivi du guidage de l'axone et du croisement de la ligne médiane pour finir avec l'adressage (Gavrish *et al.*, 2023). L'une des malformations congénitales du cortex les plus fréquentes est l'agénésie du corps calleux (ACC), caractérisée par l'absence partielle ou totale du CC et généralement accompagnée de troubles fonctionnels (Gavrish *et al.*, 2023). L'ACC a souvent une composante génétique et est causé par un défaut lors d'une des quatre étapes du développement du CC (Hofman *et al.*, 2020). Spécifiquement, des défauts liés à l'adhésion, la prolifération ou la différenciation cellulaire ou aux voies de guidage ou de migration axonale peuvent mener à l'ACC (Hofman *et al.*, 2020). Par exemple, la microcéphalie causée par une déficience du bassin de cellules progénitrices et, conséquemment, un manque de connectivité est fréquemment associée à l'ACC (Subramanian *et al.*, 2020).

1.1.3.1.2 L'épilepsie

L'épilepsie cause des troubles cognitifs qui s'additionnent ou non à une seconde cause sous-jacente. En effet, il est connu qu'une activité épileptique fréquente mène à une détérioration des fonctions cognitives où la durée de la crise est proportionnelle à la sévérité du déclin (Wang *et al.*, 2025). Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas bien compris. Par ailleurs, il existe plusieurs types d'épilepsie différents selon la cause, la région du cerveau affectée et les caractéristiques électroencéphalographiques (Specchio *et al.*, 2022). Concrètement, une crise d'épilepsie est provoquée par une activation incontrôlée et synchronisée des neurones dans une ou plusieurs régions du cerveau (Lindquist *et al.*, 2023; Shariff *et al.*, 2024). Même des changements subtils au niveau de l'organisation spatiotemporelle viennent modifier les circuits neuronaux, modifier la plasticité, la structure et la connectivité, menant à un changement de synchronisation et à des oscillations anormales (Subramanian *et al.*, 2020). Les mécanismes moléculaires causant l'épilepsie sont complexes et ne sont toujours pas bien compris, mais le consensus est qu'il y a un débalancement des signaux excitateurs et inhibiteurs dans le cerveau, causant l'activité incontrôlée (Shariff *et al.*, 2024). Dans le contexte, plusieurs mécanismes cellulaires altérés par un variant peuvent augmenter la transmission excitatrice ou diminuer l'inhibition (Lindquist *et al.*, 2023).

1.2 La synthèse de protéines

Notre corps est en continuelle adaptation à son environnement. Par exemple, si une infection ou une blessure survient, les mécanismes cellulaires enclenchés seront différents. Les protéines sont des macromolécules essentielles pour le maintien de l'homéostasie de l'organisme, étant responsable de la majorité des fonctions cellulaires (Jayaraj *et al.*, 2020). L'abondance requise de chaque protéine varie donc selon le contexte cellulaire. La vie d'une protéine débute par sa synthèse, ce dont nous discuterons dans la prochaine section.

1.2.1 L'ARNm et le code génétique

Les protéines sont synthétisées grâce à l'information obtenue par l'acide désoxyribonucléique (ADN) retrouvé dans le noyau (Gerbi, 2018). Cependant, afin de protéger l'information génétique, ce sont plutôt des copies qui sont utilisées, soit l'acide ribonucléique (ARN) messager (ARNm). La composition chimique et structurale de l'ADN et de l'ARN est similaire (Shen, 2019). L'ADN est composé de quatre bases azotées, soit l'adénine, la guanine, la cytosine et la thymine qui sont liées au sucre désoxyribose. En comparaison, le sucre de l'ARN est le ribose. Les bases azotées restent les mêmes entre l'ADN et l'ARN, à l'exception de la thymine, qui est remplacée par l'uracile (Shen, 2019). Étant donné les similarités, on dit que l'ARNm est transcrit, puisqu'il s'agit du même « langage » (Reece *et al.*, 2011). L'ARN est d'abord transcrit en tant que prémessager et sera modifié dans le noyau. Une coiffe 5' et une queue poly-A sont ajoutées à chaque extrémité. Cela permet de faciliter l'export du noyau, d'augmenter la stabilité de l'ARNm et d'aider à la fixation des ribosomes (Vorländer *et al.*, 2022). Il y a également un épissage de l'ARNm où certaines régions, appelées introns, ne sont pas codantes pour la protéine et sont retirées afin que l'ARNm ne soit composé que des parties codantes, les exons (Vorländer *et al.*, 2022). Dans le contexte neuronal, ces éléments se produisent également dans le noyau, mais de récentes études ont aussi démontré que l'épissage de l'ARNm peut se produire dans le cytoplasme des axones et dendrites afin de fournir une régulation locale et rapide de la synthèse de protéines (Kiebler et Ninkovic, 2022; Wells, 2012). Alors que l'ARNm contient une séquence ne comprenant que quatre différentes bases, il existe vingt différents acides aminés communs (Koonin et Novozhilov, 2017). La production de protéine provenant d'un ARNm nécessite alors la traduction d'un langage à un autre. Le code génétique standard permet de traduire l'information de l'ARNm en protéines (Cavalcanti et Landweber, 2004). Plus spécifiquement, des petites séquences de trois nucléotides font un codon (Cavalcanti et Landweber, 2004). Sachant qu'il y a quatre bases, il y a donc soixante-quatre possibilités de codons, dont un permet d'indiquer le début de la protéine et trois permettent d'identifier la fin (codon d'arrêt) (Koonin et Novozhilov, 2017). Les soixante codons restants permettent d'identifier les vingt acides aminés. Spécifiquement, les deux premières bases du codon sont critiques pour déterminer le bon acide aminé alors qu'il peut généralement avoir plus d'un choix au niveau de la troisième base pour un même acide aminé (Cavalcanti et Landweber, 2004).

1.2.1.1 Les mutations génétiques

Il existe divers types de mutations et elles peuvent être catastrophiques au niveau de la séquence de la protéine comme elles peuvent n'avoir aucun effet (Koonin et Novozhilov, 2017). Effectivement, selon le code génétique, il est possible qu'une mutation soit silencieuse (Shen *et al.*, 2022). Par exemple, une mutation qui modifierait le troisième nucléotide du codon peut tout de même donner le même acide aminé que prévu. Le type de mutation appelé non-sens fait référence à une mutation qui modifie le codon d'un acide aminé pour un codon d'arrêt, ce qui terminera la chaîne polypeptidique prématurément (Yuan *et al.*, 2015). La dernière mutation ponctuelle fait référence à une mutation faux-sens où un seul acide aminé est remplacé par un autre (Yuan *et al.*, 2015). Des insertions ou des délétions de base peuvent mener à des mutations du cadre de lecture où toute la séquence sera décalée et la protéine obtenue pourrait n'avoir aucun lien avec la protéine attendue, particulièrement si la mutation était au début de l'ARNm (Xu et Zhang, 2021). Les maladies génétiques surviennent lorsqu'il y a une mutation dans l'ADN, ce qui conduit souvent à un variant de la protéine. Dans ce contexte, les variants peuvent affecter la fonction, la localisation ou la stabilité de la protéine (Wu et Yan, 2002). Cependant, il est à noter que le type de mutation n'est pas toujours un indicatif de la pathogénicité de celle-ci. En effet, alors que les mutations silencieuses étaient associées à un effet neutre puisqu'elles n'affectent pas la séquence de la protéine, elles ont récemment été liées au développement du cancer, entre autres. Elles peuvent affecter le niveau de protéine en modifiant la stabilité de l'ARNm ou en affectant l'épissage (Kikutake et Suyama, 2023). À l'inverse, certaines mutations non-sens et faux-sens ne sont pas nocives pour l'organisme (Potapova, 2022; Wu et Yan, 2002). Au contraire, les mutations génétiques sont la force motrice derrière l'évolution et la sélection naturelle où des variants sont avantagés pour répondre aux besoins et aux différents stress de l'environnement (Galhardo *et al.*, 2007).

1.2.2 La traduction

Pour les protéines cytosoliques, toutes les étapes de la traduction se font au niveau du cytosol (Reid et Nicchitta, 2015). Pour les protéines transmembranaires et les protéines solubles devant rejoindre la voie biosynthétique, la traduction est initiée dans le cytosol. Ces protéines contiennent une séquence, le signal peptide (SP), qui est reconnu par le complexe de particule de reconnaissance du signal (PRS) (Choo *et al.*, 2005). Ce complexe se lie au récepteur PRS qui amène le ribosome vers le complexe de translocation protéique (Reid et Nicchitta, 2015). Le début du polypeptide traverse la membrane par le canal du complexe et la traduction continue (Reece *et al.*, 2011). Le SP est clivé et la protéine soluble synthétisée est relarguée dans la lumière du RE. Pour les protéines transmembranaires, un deuxième signal indiquant la portion transmembranaire permet le relargage du complexe de translocation. Dans le cas des protéines comportant plusieurs segments transmembranaires, la traduction alterne entre des signaux d'ancrage et de relargage, permettant l'insertion de plusieurs domaines hydrophobes à travers la membrane (Alberts *et al.*, 2002; Reid

et Nicchitta, 2015). Dans les neurones, la présence de la machinerie dans les dendrites et les axones permet de traduire des protéines rapidement après un stimuli (Öztürk *et al.*, 2020; Perez-Alvarez *et al.*, 2020).

1.2.3 Les modifications post-traductionnelles

Comme le nom l'indique, les modifications post-traductionnelles (PTMs) sont des modifications qui se produisent sur les protéines après leur synthèse. De façon générale, les PTMs font référence à l'ajout ou au retrait enzymatique d'un groupe chimique ou d'une macromolécule sur un acide aminé spécifique (Zhong *et al.*, 2023). Elles sont généralement réversibles, mais certaines peuvent être irréversibles, comme le clivage de la protéine par exemple (Bobalova *et al.*, 2023). Il existe plus de 600 différents types, mais seulement une dizaine sont bien étudiés (Bradley, 2022; Zhong *et al.*, 2023). Les PTMs permettent de réguler l'activité, la fonction, la stabilité et la localisation des protéines suite à des changements de l'environnement interne ou externe, permettant une réponse beaucoup plus rapide que si une nouvelle protéine devait être synthétisée à chaque fois (Beltrao *et al.*, 2013). Les fonctions protéiques sont d'autant plus complexifiées et amplifiées par le fait que les PTMs sont liées et jouent les unes sur les autres (Leutert *et al.*, 2021).

1.2.3.1 La phosphorylation

La phosphorylation est l'une des premières PTM à avoir été découverte dans les années 1920 (Keenan *et al.*, 2021). Cette PTM consiste en l'ajout réversible d'un groupement phosphate sur le groupement hydroxyle des acides aminés sérine, thréonine ou tyrosine d'une protéine (Bilbrough *et al.*, 2022). Plus récemment, une étude de spectrométrie de masse du phosphoprotéome a également démontré que des sites non canoniques de phosphorylation sur les résidus d'histidine, d'acide aspartique et glutamique, de lysine, d'arginine et de cystéine sont également présents dans des cellules humaines (Hardman *et al.*, 2019). Cette étude estime non seulement que ces 6 sites non canoniques pourraient compter pour un tiers du phosphoprotéome total, mais que ceux-ci, à l'exception de l'histidine, sont approximativement aussi fréquents que ceux de phosphotyrosine (Hardman *et al.*, 2019). L'ajout du groupement phosphate permet de modifier la structure de la protéine, la charge et l'environnement local. Ceci peut changer l'activité de la protéine ou offrir un nouveau site de liaison (Bilbrough *et al.*, 2022). La phosphorylation est donc un mécanisme de régulation extrêmement important dans la plupart des processus cellulaires, incluant sans se limiter à la synthèse de protéines, la transduction de signal et la survie cellulaire (Ardito *et al.*, 2017). Chez l'humain, plus de 500 gènes codent pour des kinases, les enzymes responsables de la phosphorylation et plus de 200 gènes codent pour les phosphatases, permettant le retrait du groupement phosphate (Ostalé *et al.*, 2021). La grande majorité des fonctions associées aux sites de phosphorylation d'une protéine sont toujours inconnues. Par ailleurs, des combinaisons de résidus phosphorylés sur une protéine peuvent être biologiquement distinctes (Bilbrough *et al.*, 2022). Par exemple, la famille des récepteurs couplés aux

protéines G (RCPGs), une des plus grandes classes de protéines transmembranaires, est cruciale pour la transduction de signal (Chen *et al.*, 2022b). La combinaison des sites permet à la protéine β-arrestine de reconnaître et de lier le récepteur sous différentes conformations, permettant différentes fonctions en aval, incluant la désensibilisation ou l'endocytose du récepteur ou, à l'inverse, la continuation de la transmission du signal (Chen *et al.*, 2022b). On compare ce phénomène à un « code-barre », permettant une régulation de plusieurs fonctions d'une même protéine selon le contexte cellulaire (Chen *et al.*, 2022b).

1.2.3.2 La glycosylation

La glycosylation, qui consiste à ajouter des chaînes oligosaccharides sur des acides aminés spécifiques, est l'une des modifications les plus fréquentes, complexes et hétérogènes (Tian *et al.*, 2025). Contrairement à la phosphorylation, qui est une modification rapide et réversible, la glycosylation est plus stable et moins dynamique. La *N*-glycosylation peut se produire de façon co- ou post-traductionnelle, tandis que la *O*-glycosylation est essentiellement post-traductionnelle (Reily *et al.*, 2019; Shrimal *et al.*, 2015). Spécifiquement, la *N*-glycosylation se caractérise par l'attachement covalent du *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) sur des résidus d'asparagine (He *et al.*, 2024; Reily *et al.*, 2019) alors que la *O*-glycosylation se produit sur les acides aminés ayant des groupes hydroxyles fonctionnels, le plus souvent sur des sérines ou thréonines (Reily *et al.*, 2019). Malgré la grande diversité, une fois présente, la glycosylation est généralement stable (Varki, 2009). La glycosylation se produit dans le RE et/ou dans l'appareil de Golgi, où la complexité augmente en passant par les compartiments *cis*-, *medial*- puis *trans*-Golgi (Reily *et al.*, 2019). Les polysaccharides ajoutés sur les protéines sont des monosaccharides reliés entre eux par des liaisons glycosidiques. Les monosaccharides impliqués dans la glycosylation ont une structure cyclique (Fig. 1.2) (Agirre, 2017). Selon la nomenclature établie, il est possible de numéroter les atomes de carbone en commençant par celui qui est lié à l'oxygène dans l'anneau et à un groupement hydroxyle (Fig. 1.2) (Agirre, 2017). L'énumération des carbones permet de déterminer ceux impliqués lors des liaisons glycosidiques. Par ailleurs, deux conformations sont possibles, soit alpha et beta. La liaison de type alpha se produit si le groupe hydroxyle lié au carbone se retrouve sous le plan de l'anneau. À l'inverse, si le groupe se retrouve au-dessus du plan, ce sera un type de liaison beta (Agirre, 2017). Leurs différences permettent non seulement de grandement modifier la conformation du polysaccharide, mais également de réguler les types de glycanes, puisque les enzymes permettant d'ajouter ou de retirer les monosaccharides sont spécifiques à une liaison glycosidique (Fig. 1.2) (Varki, 2009). Par exemple, les β- et α-mannosidases clivent les résidus de mannose (Man) de lien glycosidique beta et alpha, respectivement (Michalski et Klein, 1999). Il peut y avoir des spécificités supplémentaires au sein d'un même type. Les α-mannosidases de classe I sont très spécifiques en reconnaissant et en clivant uniquement les résidus Man d'un lien glycosidique α-1,2 (Mast et Moremen, 2006). En comparaison, les α-mannosidases de la classe II présentent

une spécificité élargie, pouvant reconnaître et cliver les liaisons α-1,2, α-1,3 et α-1,6 (Hansen *et al.*, 2004). Alors que la première classe se localise dans le RE et dans le Golgi, la deuxième classe se retrouve dans le Golgi, les lysosomes et le cytosol. De façon importante, les enzymes présentent des différences au niveau des domaines structuraux et des mécanismes catalytiques, permettant d'inhiber et d'étudier les classes séparément (Moremen et Nairn, 2014). La kifunensine permet d'inhiber la classe I et la swainsonine, la classe II (Fagioli et Sitia, 2001).

1.2.3.2.1 *N*-glycosylation

La première étape de ce type de glycosylation commence par la formation d'un précurseur lipidique où un résidu de GlcNAc est ajouté sur le dolichol-phosphate (Dol-P) sur la face cytoplasmique du RE par l'enzyme DPAGT1 (*UDP-GlcNAc:Dolichol Phosphate GlcNAc-1-Phosphate Transferase*), dont l'activité catalytique peut être inhibée par la tunicamycine (Tn) (Fig. 1.3A) (Belaya *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2018). Par la suite, plusieurs résidus de GlcNAc, Man et glucose (Glc) sont ajoutés de façon séquentielle afin de former la structure de 14 sucres, le $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ (voir Fig. 1.3A, C) (Esmail et Manolson, 2021). Le complexe d'oligosaccharyltransférase (OST) permet le transfert du glycane sur le site Asn-X-Ser/Thr (où X peut être n'importe quel acide aminé à l'exception d'une proline) d'une protéine (Fig. 1.3A) (Reily *et al.*, 2019). Ensuite, les trois résidus de Glc et un résidu de Man sont retirés de façon séquentielle par les enzymes α-glucosidases et α-mannosidase I, respectivement (Fig. 1.3B-C) (Reily *et al.*, 2019). La protéine est repliée lorsqu'il reste un résidu de Glc grâce à un mécanisme qui sera discuté dans la section 1.2.5 (Fig. 1.3B). Si la protéine passe le contrôle de qualité du RE, elle est envoyée vers l'appareil de Golgi. Dans le *cis*-Golgi, le retrait de trois résidus additionnels de Man de lien α-1,2 permet l'ajout d'un résidu de GlcNAc par la GlcNAc-transférase (GnT)-I (Fig. 1.4). Cette espèce peut soit être envoyée tel quel vers le *trans*-Golgi ou, toujours dans le *cis*-Golgi, peut se faire retirer deux résidus par l'α-mannosidase II (Fig. 1.4) (Schaub *et al.*, 2006; Vasconcelos-dos-Santos *et al.*, 2015). Dans le *medial*-Golgi, des résidus de GlcNAc et de fucose sont ajoutés par différentes enzymes (voir Fig. 1.4). Les enzymes peuvent travailler de pair, à l'exception de la GnT-III qui ajoute une GlcNAc « bissectrice » et empêche l'action des autres GnTs, inhibant donc la biosynthèse de chaînes plus complexes (Fig. 1.4) (Nakano *et al.*, 2019). Dans le *trans*-Golgi, le galactose est ajouté sur les résidus de GlcNAc, puis des résidus d'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac), un type d'acide sialique, sur le galactose (voir Fig. 1.4) (Reily *et al.*, 2019; Vasconcelos-dos-Santos *et al.*, 2015).

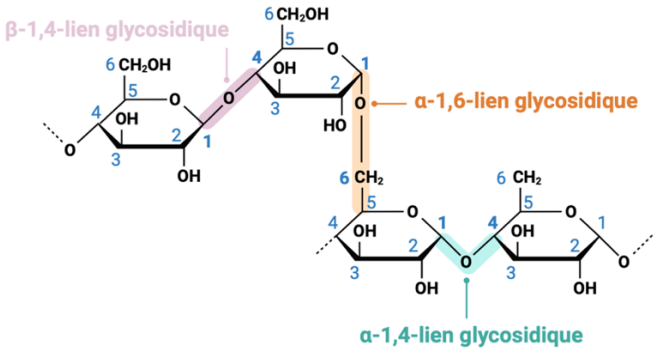


Figure 1.2: Type de liaison glycosidique des polysaccharides.

Les carbones sont numérotés en bleu. La liaison glycosidique beta relie les carbones 1, 4 (rose). Les liaisons alpha représentées relient les carbones 1, 6 (orange) ou 1, 4 (turquoise). Schéma créé avec BioRender.com.

Les *N*-glycanes peuvent être divisés en trois types : riches en Man, complexes ou hybrides (Fig. 1.4) (Esmail et Manolson, 2021). Puisqu'ils se situent dans le RE, les glycanes riches en Man sont importants lors du repliement des protéines et augmentent la stabilité de la protéine (Esmail et Manolson, 2021). De plus, ils sont impliqués dans le routage grâce à la phosphorylation des résidus de Man (Seo et Oh, 2022). Cette modification est effectuée d'une manière différente comparativement à une phosphorylation typique. Spécifiquement, les protéines lysosomales sont reconnues par la GlcNAc-1-phosphotransférase (GNPT) dans le *cis*-Golgi (Fig. 1.4) (Bohnsack *et al.*, 2009). Elle agit sur les types riches en Man, avant l'action de la GnT-I (Fig. 1.4). D'ailleurs, la GNPT et la GnT-I utilisent toutes les deux le même donneur de GlcNAc, soit l'UDP-GlcNAc (Fig. 1.4) (Gorelik *et al.*, 2022). Alors que la GnT-I catalyse l'ajout du GlcNAc seul et que l'UDP (uridine diphosphate) est par la suite relâché (Ünligil *et al.*, 2000), la GNPT catalyse un phosphotransfer, permettant l'ajout de GlcNAc-1-phosphate et le relargage d'UMP (uridine monophosphate) (Fig. 1.4) (Gorelik *et al.*, 2022). Le résidu est ajouté en liant le phosphate au groupement hydroxyle du carbone 6 du Man (Bohnsack *et al.*, 2009). Dans le *trans*-Golgi, l'enzyme GlcNAc-1-phosphodiester-N-acétylglucosaminidase (NAGPA) retire le résidu de GlcNAc, laissant le phosphate lié au Man et créant ce qu'on appelle le Man-6-phosphate (M6P) (Fig. 1.4) (Čaval *et al.*, 2019). La GNPT peut ajouter jusqu'à deux résidus de GlcNAc-phosphate sur cinq différents résidus de Man, puisque sa structure lui permet de lier autant les liens α-1,2 que α-1,3. Comme les types riches en Man sont largement clivés dans le *cis*-Golgi, cette caractéristique confère à l'enzyme la capacité de reconnaître et de se lier aux glycanes de taille et d'orientation variées (Gorelik *et al.*, 2022). Bien qu'ils ne soient pas considérés comme un type à part, les M6Ps ont une fonction biologique spécifique en étant reconnus par les récepteurs M6P (MPRs), qui seront

discutés dans la section 1.4. Pour étudier les différents types, l'enzyme Endoglycosidase H (Endo H) permet de cliver les types riches en Man et certains hybrides alors que la Peptide-N-glycosidase F (PNGase F) retire presque tous les types de *N*-glycosylation, une distinction utile pour évaluer le routage d'une protéine dans la voie biosynthétique (Freeze et Kranz, 2010). Une protéine peut avoir plusieurs sites de glycosylation et ceux-ci n'ont pas nécessairement tous le même type (Esmail et Manolson, 2021). Selon la conformation de la protéine, les sites peuvent être plus ou moins accessibles aux enzymes impliquées dans la synthèse. Il peut donc y avoir les trois types sur une même protéine (Esmail et Manolson, 2021). De plus, un site peut être modifié par plus d'un type. Ceci dit, les mécanismes de régulation et les fonctions associées ne sont pas bien compris (Barton *et al.*, 2020).

1.2.3.2.2 *O*-GlcNAcylation

La *O*-GlcNAcylation est un type spécifique de *O*-glycosylation (Reily *et al.*, 2019). Ce type de glycosylation est particulier, car il consiste en l'ajout d'un seul résidu qui sera ajouté et retiré plusieurs fois au cours de la vie de la protéine, ayant une dynamique ressemblant plus à de la phosphorylation qu'aux autres types de glycosylation (Reily *et al.*, 2019; Varki, 2009). Elle est initiée par l'ajout d'un résidu de GlcNAc sur une sérine ou une thréonine. Ce type est régulé par les enzymes *O*-GlcNAc transférases (OGTs) et *O*-GlcNAcases (OGAs), qui ajoutent et retirent le monosaccharide, respectivement (Dupas *et al.*, 2022). En plus de sa dynamique différente, elle est effectuée dans le cytoplasme, le noyau et la mitochondrie (Biwi *et al.*, 2018). Par ailleurs, étant donné que le site de *O*-GlcNAcylation est une sérine ou une thréonine, cette modification compétitionne avec des sites de phosphorylation, ajoutant un niveau de complexité aux mécanismes régulateurs de la cellule (Reily *et al.*, 2019). Malgré sa localisation intracellulaire différente, il semblerait qu'elle puisse réguler les autres types de glycosylation. Spécifiquement, la *O*-GlcNAcylation est intimement liée au métabolisme, en étant induite lorsqu'il y a un changement au niveau des nutriments dans la cellule, ce qui entraîne une modification de la synthèse et de la disponibilité des donneurs nucléotides de sucre permettant la création des autres types de glycanes (Biwi *et al.*, 2018; Matheny-Rabun *et al.*, 2024). On associe de plus en plus de fonctions biologiques à la O-GlcNAcylation, incluant mais ne se limitant pas à la régulation d'expression de gènes et de protéines, la transduction de signal, le cycle cellulaire, le routage intracellulaire et la réponse au stress (Biwi *et al.*, 2018; Hanover *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2021).

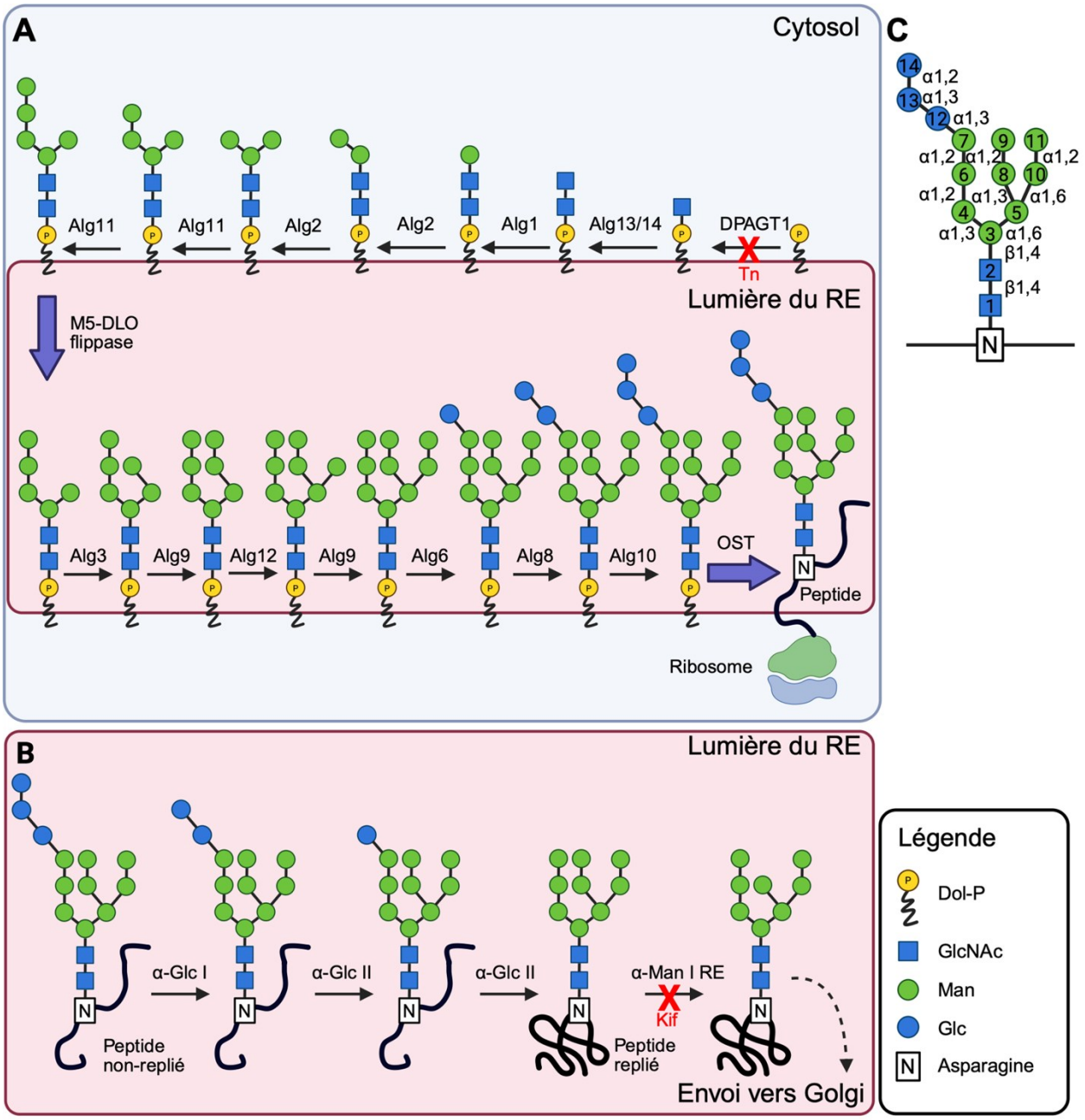


Figure 1.3: Étape de la *N*-glycosylation dans le RE.

(**A**) Le mécanisme débute par l'ajout de GlcNAc sur le lipide Dol-P. Plusieurs résidus de GlcNAc et de Man sont séquentiellement ajoutés par les enzymes mannosyltransférases Alg. La M5-DLO flippase permet de retourner le précurseur du cytosol vers la lumière du RE. Des résidus supplémentaires de Man et de Glc sont ajoutés. Le complexe OST permet de transférer la chaîne de sucre du lipide précurseur sur l'asparagine de la protéine en synthèse. (**B**) Une fois sur la protéine, il y a retrait séquentiel des résidus de Glc. La protéine est repliée lorsqu'il reste un Glc. Si la protéine est bien repliée, elle peut passer au Golgi lorsqu'elle a le sucre $Man_8GlcNAc_2$. La kifunensine (Kif) permet d'inhiber l'α-mannosidase de la classe I. (**C**) Afin d'alléger le schéma, les liens glycosidiques (β-1,4; α-1,2; α-1,3; α-1,6) sont représentés une seule fois. Les étapes d'ajout séquentiel sont numérotées. Schéma créé avec BioRender.com.

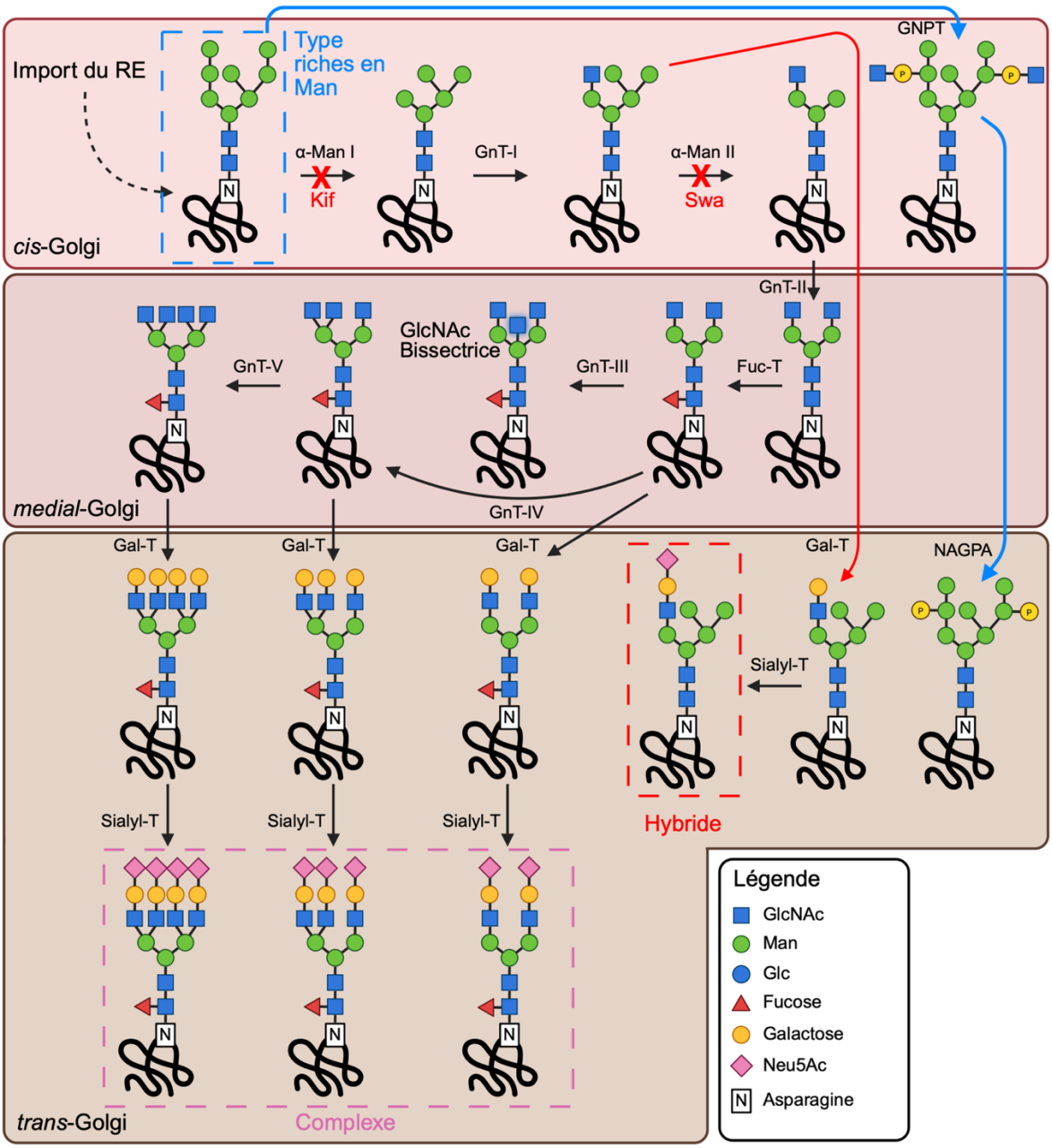


Figure 1.4: Maturation de la *N*-glycosylation dans l'appareil de Golgi.

La glycoprotéine avec le sucre $Man_8GlcNAc_2$ (types riches en Man; encadré bleu) est importée du RE dans le *cis*-Golgi. Dans le *cis*- et *medial*-Golgi, les α-mannosidases permettent le retrait de Man alors que les enzymes GnT et fucosyl-transférase (FucT) ajoutent du GlcNAc et du fucose, respectivement. Les enzymes galactosyltransférase (GalT) et sialyltransférases (Sialyl-T) sont localisés dans le *trans*-Golgi et permettent d'ajouter du galactose et Neu5Ac, respectivement, pour coiffer chaque résidu de GlcNAc. Les types complexes (encadré pointillé rose) ont des résidus de GlcNAc sur les liens α-1,3 et α-1,6. Le type hybride (encadré pointillé rouge) n'a pas reçu de modification dans le *medial*-Golgi (flèche rouge). Ce type est caractéristique de substitutions des résidus de Man par GlcNAc sur le lien Man α-1,3, mais pas sur le α-1,6. La création des M6Ps se fait par l'ajout d'un GlcNAc-1-phosphate dans le *cis*-Golgi suivi du retrait de GlcNAc dans le *trans*-Golgi (flèches bleues). Schéma créé avec BioRender.com.

1.2.3.2.3 Les glycosaminoglycanes et la matrice extracellulaire

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont une famille de polysaccharides linéaires exprimés de façon ubiquitaire et abondante en surface et dans la MEC. Les GAGs sont liés de façon covalente par une *O*-glycosylation à des protéines pour créer les protéoglycanes (PGs), à l'exception de l'acide hyaluronique qui est libre (Ricard-Blum *et al.*, 2024). Les PGs les plus communs ont des chaînes d'héparane sulfate (HSPG), de dermatane sulfate (DSPG) et de chondroïtine sulfate (CSPG) (Benito-Arenas *et al.*, 2019). Les PGs contribuent à la régulation de la matrice extracellulaire (MEC) en interagissant avec divers facteurs (Hayashida *et al.*, 2022). Lors du développement du SNC, les composants de la MEC régulent, entre autres, la migration, la prolifération, la différenciation, la morphologie, l'élongation et la connectivité axonales et dendritiques (Long et Huttner, 2022). La MEC est composée de protéines fibreuses structurales, telles que l'élastine, les laminines et les collagènes, qui fournissent un échafaudage organisé, et de récepteurs à la surface de la cellule permettant de lier ces composantes (Barros *et al.*, 2011). Des molécules sécrétées, incluant des facteurs de croissance ou des NTs, sont également retrouvées dans la MEC (Soles *et al.*, 2023). De plus, dans le SNC, il existe une forme spécialisée de MEC, les filets périneuronaux (PNNs), qui entourent principalement les interneurones inhibiteurs (Fig. 1.5). Ceux-ci sont composés de la famille lecticane des CSPGs, incluant l'aggrécane, le versicane, le neurocane et le brevicane, qui interagissent avec l'acide hyaluronique et les ténascines (Fig. 1.5) (Fawcett *et al.*, 2022; Soles *et al.*, 2023). La fenêtre de développement des PNNs est importante puisqu'ils sont créés à la fermeture des périodes de plasticité critiques, permettant de limiter la plasticité adulte (Sorg *et al.*, 2016). Les PNNs sont condensés, agissant comme barrière physique, afin de fournir une protection, d'altérer la possibilité de former de nouveaux contacts avec les neurones voisins et de diminuer la diffusion des récepteurs et des NTs (Fig. 1.5) (Fawcett *et al.*, 2022; Sorg *et al.*, 2016; Woo *et al.*, 2025). Cependant, il est possible de dégrader cette matrice et rétablir des états de plasticité pour induire la croissance axonale ou régénérer des neurones endommagés (Sorg *et al.*, 2016). La dégradation des PNNs est possible grâce à des protéases sécrétées, comme, entre autres, la famille de métalloprotéase matricielle (MMP) (Fig. 1.5) (Testa *et al.*, 2019). Il a été démontré que plusieurs MMPs sont sécrétées en réponse à l'activité neuronale et que leur activité était nécessaire pour le changement de plasticité (Fawcett *et al.*, 2022). De façon importante, puisque les PNNs entourent principalement les interneurones inhibiteurs, des études ont démontré qu'une digestion enzymatique de chondroïtinase pour dégrader les CSPGs et, par le fait même, les PNNs, entraîne une altération de l'activité des synapses inhibitrices (Chu *et al.*, 2018; Dzyubenko *et al.*, 2021; Lensjø *et al.*, 2017). Une augmentation de la force d'une synapse inhibitrice individuelle a été observée, mais l'ensemble du réseau et la densité des synapses inhibitrices étaient diminués, alors que les synapses excitatrices étaient épargnées, causant une altération de la balance des courants excitateurs/inhibiteurs, une caractéristique importante de l'épilepsie (Chu *et al.*, 2018; Dzyubenko *et al.*, 2021; Lensjø *et al.*, 2017).

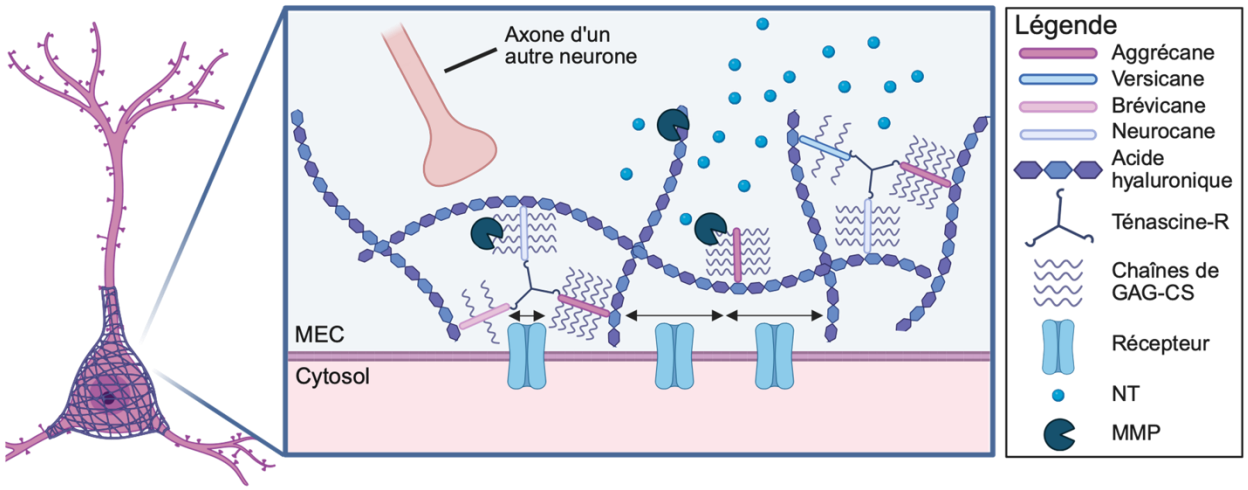


Figure 1.5: Les filets périneuronaux entourent les neurones inhibiteurs pour réguler la plasticité synaptique. Les PNNs agissent comme barrière physique pour empêcher la formation de nouvelles synapses et réguler la diffusion des NTs. Un PNN dense diminue la mobilité des récepteurs à la surface (flèches au-dessus des récepteurs). Les MMPs permettent la dégradation des GAGs. Schéma créé avec BioRender.com.

1.2.3.3 L'ubiquitination

L'ubiquitination est une PTM réversible où une ou plusieurs molécules d'ubiquitine (Ub), une protéine de 76 acides aminés, sont liées de façon covalente à la lysine d'un substrat. La réaction se produit dans le cytosol ou dans le noyau et dépend d'une cascade enzymatique impliquant l'action séquentielle de l'enzyme d'activation de l'Ub (E1), l'enzyme de conjugaison d'Ub (E2) et l'enzyme ligase Ub (E3) (Groothuis *et al.*, 2006). Spécifiquement, la E1 active l'Ub en formant un lien thioester entre la cystéine de son propre site actif et le groupe carboxyle du C-terminal de l'Ub dans un processus dépendant de l'ATP (Fig. 1.6A). Grâce à une réaction de transthiolation, la E2 facilite le transfert de l'Ub du conjugué E1~Ub sur le résidu de cystéine actif de la E2 pour former le conjugué E2~Ub (Fig. 1.6A). Finalement, la E3 permet de transférer l'Ub du conjugué E2~Ub en formant un lien isopeptidique entre la lysine de la protéine cible et la glycine du C-terminal de l'Ub (Fig. 1.6A) (Hicke et Dunn, 2003). Les E3 peuvent être divisés en trois catégories selon le domaine catalytique : HECT (*Homology to E6AP Carboxyl Terminus*), RING (*Really Interesting New Gene*) et RBR (*RING between RING*) (Zhong *et al.*, 2023). Les E3 de type HECT ont une cystéine active et catalysent le transfert de l'Ub du conjugué E2~Ub sur celle-ci pour former E3~Ub avant de transférer l'Ub vers la lysine du substrat (Fig. 1.6A). À l'inverse, les E3 de type RING n'ont pas de cystéine active et transfèrent l'Ub de l'E2~Ub directement sur le substrat en se liant seulement à la E2 (Fig. 1.6A). Les RBRs sont un hybride entre les E3 de type HECT et de type RING et possèdent deux

domaines RING, dont un permet la liaison à l'E2, alors que le deuxième a une cystéine active pour lier l'Ub et former E3~Ub (Fig. 1.6A) (Zheng *et al.*, 2016). Une protéine peut être modifiée par une seule molécule (mono-ubiquitination) ou plusieurs molécules d'Ub (Fig. 1.6B). Lors d'une multimonoubiquitination, plusieurs lysines du substrat sont modifiées avec une molécule d'Ub (Fig. 1.6B). En comparaison, la polyubiquitination fait référence à l'ajout de molécules d'Ub sur soit la méthionine du N-terminal ou une des sept lysines présentes dans la séquence protéique de l'Ub elle-même (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) (Fig. 1.6B). L'Ub peut être toujours ajouté sur la même lysine, donnant une chaîne homotypique, ou sur différentes lysines pour une chaîne hétérotypique (Fig. 1.6B). Tout comme pour la phosphorylation, les différentes chaînes sont associées à des fonctions spécifiques, menant à l'hypothèse du « code-barre » (Komander et Rape, 2012). Par exemple, une mono-ubiquitination est impliquée dans l'endocytose, la réparation à l'ADN et la transduction de signal (Sigismund *et al.*, 2004; Sun et Chen, 2004). Les chaînes K48, les plus abondantes, permettent d'identifier les protéines à dégrader par le protéasome alors que les chaînes K63 sont associées à l'endocytose, à l'activation de protéine kinase ou à la réponse de dommage à l'ADN (Chen, 2005; Kravtsova-Ivantsiv *et al.*, 2013). La réaction étant réversible, les désubiquitinases (DUBs) permettent de retirer et de recycler les molécules d'Ub (Fig. 1.6A) (Komander et Rape, 2012).

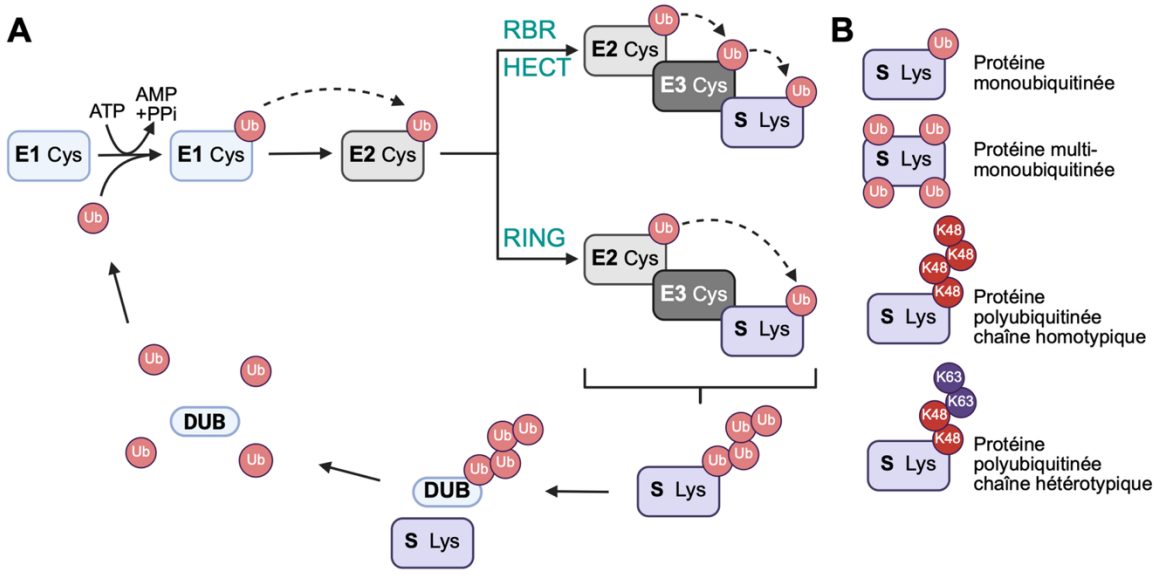


Figure 1.6: La cascade d'ubiquitination et les possibilités de modification sur une protéine.

(**A**) La E1 crée un lien entre la cystéine (Cys) de son site actif et l'Ub en présence d'ATP. L'Ub est transféré sur la Cys active de l'enzyme E2. L'Ub peut être transféré sur (RBR, HECT) la Cys active de la E3 puis sur la lysine (Lys) du substrat (S) ou (RING) directement sur la Lys du substrat. Une DUB retire l'Ub pour qu'elles soient réutilisées. (**B**) Une protéine peut être mono-, multimono- ou poly-ubiquitinée avec des chaînes homo- ou hétérotypiques. Schéma créé avec BioRender.com.

1.2.4 Le contrôle de qualité

Avant d'être fonctionnelles, les protéines doivent d'abord être repliées sous une structure tridimensionnelle (Dubnikov *et al.*, 2017). Cependant, même en condition normale, il arrive fréquemment qu'une protéine soit mal repliée (Adams *et al.*, 2019a). En outre, divers facteurs environnementaux ou métaboliques peuvent entraîner une augmentation de la production de protéines mal repliées (Adams *et al.*, 2019a). Une mauvaise conformation rend les protéines susceptibles d'agréger et une accumulation incontrôlée de ces agrégats est la cause de plusieurs maladies, incluant la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington (Dubnikov *et al.*, 2017). Il existe trois stratégies afin de maintenir une homéostasie protéique, soit le repliement, la dégradation ou la séquestration (Chen *et al.*, 2011). Pour chaque stratégie, plusieurs mécanismes différents peuvent être utilisés afin d'assurer un contrôle de qualité des protéines (Buchberger *et al.*, 2010).

1.2.4.1 Le cycle de calnexine et calréticuline

La plupart des protéines synthétisées dans le RE sont glycosylées. Par conséquent, l'un des mécanismes de repliage des protéines est régulé par une forme spécifique de contrôle de qualité dépendant de la *N*-glycosylation (Adams *et al.*, 2019a). Plus spécifiquement, calnexine (CNX) et calréticuline (CRT) sont des protéines chaperonnes constituées d'un domaine lectine, d'un domaine flexible riche en proline et d'un domaine C-terminal riche en résidus acides (Schrag *et al.*, 2001). Leur cycle commence lorsque les glucosidases I et II ont retiré les deux premiers résidus de Glc du sucre $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ sur une protéine (Fig. 1.3). Le sucre monoglucosylé se lie au domaine lectine de CNX/CRT, et leur domaine riche en proline recrute une des protéines chaperonne permettant l'isomérisation de liaisons peptidiques ou disulfures (Adams *et al.*, 2019a). Par la suite, la glucosidase II retire le dernier résidu de Glc permettant le relargage de la glycoprotéine de CNX/CRT (Adams *et al.*, 2019a). Si la protéine est bien repliée, la *N*-glycosylation continue telle que décrite précédemment (Fig. 1.3B). Cependant, si elle n'a pas la bonne conformation, une glucosyltransférase de glycoprotéines UDP-glucose (UGGT) ajoute un résidu de Glc afin que la protéine soit reconnue par CNX/CRT à nouveau (Ninagawa *et al.*, 2024). Ce cycle peut être répété jusqu'à ce que la protéine soit bien repliée. Cependant, si les protéines sont mal repliées de façon permanente, elles seront plutôt identifiées comme étant à dégrader par la dégradation associée au RE (ERAD) grâce au retrait de résidus de Man par des mannosidases (détaillé dans la section 1.3) (Adams *et al.*, 2019a). Parfois, le mauvais repliement d'une protéine est systématiquement causé par un variant d'une protéine dont le changement d'acide aminé déstabilise la conformation. Une étude a démontré que l'utilisation de kifunensine (Fig. 1.3; 1.4) permet de diminuer le mécanisme ERAD et augmente le repliement, le routage intracellulaire et l'activité de deux enzymes lysosomales variantes (Wang *et al.*, 2011a). Cela dit, le mécanisme existe pour une raison et l'inhibition d'ERAD en présence de ces variants a également entraîné une augmentation du stress du RE et l'activation du mécanisme UPR (*Unfolded protein response*) (Wang *et al.*, 2011a).

1.2.4.2 La réponse aux protéines non repliées

Lorsque des quantités excessives de protéines incorrectement repliées s'accumulent, les protéines chaperonnes atteignent leur capacité maximale, entraînant ainsi le stress du RE (Gardner *et al.*, 2013). Le mécanisme UPR peut être enclenché afin de réduire la charge de repliage grâce à trois protéines transmembranaires détectrices du stress du RE, une d'entre elles étant IRE1α (*inositol requiring enzyme 1α*) (Gardner *et al.*, 2013). IRE1α possède un domaine kinase sérine/thréonine et un domaine d'endoribonucléase dans sa partie cytosolique (Read et Schröder, 2021). Dans des cellules saines, son domaine luminal est lié à la protéine chaperonne BiP (*binding immunoglobulin protein*). Lorsque des protéines mal repliées s'accumulent, la protéine BiP se dissocie, ce qui active IRE1α (Hetz *et al.*, 2020). Elle peut également être activée par la liaison directe de protéines mal repliées ou par un changement de la composition en lipides de la membrane en activant son domaine transmembranaire (Junjappa *et al.*, 2018). Une fois activée, l'activité d'endoribonucléase permet de retirer un intron dans l'ARNm encodant la protéine XBP1 (*X-box-binding protein 1*), ce qui change le cadre de lecture et introduit un nouveau codon-stop (Hetz *et al.*, 2020) . Cet événement induit l'expression de ce facteur de transcription actif (XBP1s pour *spliced*), qui transloque vers le noyau afin d'augmenter l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le mécanisme ERAD ainsi que des chaperonnes pour favoriser le repliage (Junjappa *et al.*, 2018). De plus, IRE1α permets le clivage d'ARNm codant pour des protéines du RE dans un processus nommé RIDD (*IRE1-dependent mRNA decay*), afin de réduire la traduction et la charge de repliage (Adams *et al.*, 2019b). RIDD permet aussi le clivage de certains microARNs, une classe d'ARN non codant qui régule la traduction d'ARNm (O'Brien *et al.*, 2018). Ces mécanismes de stress aigu permettent de promouvoir la survie cellulaire grâce à une réponse UPR adaptative (Junjappa *et al.*, 2018). Si le stress ne se résout pas et devient chronique, IRE1α permet d'activer différentes voies qui mèneront à la mort cellulaire avec une réponse UPR apoptotique. Entre l'UPR adaptative et l'UPR apoptotique, il existe une phase de transition (Chen et Brandizzi, 2013). Plus spécifiquement, la phase de l'UPR adaptative augmente la capacité et diminue la demande de repliage de protéine. Lors de la phase de transition, IRE1α cesse de cliver l'ARNm de XBP1 et RIDD cible maintenant des gènes codant pour les protéines augmentées lors de la phase adaptative, comme la chaperonne BiP par exemple (Chen et Brandizzi, 2013). Ceci augmente davantage le stress du RE et, lorsque le seuil est atteint, RIDD initie l'apoptose en ciblant le microARN qui réprime l'expression de la caspase-2, un facteur proapoptotique (Chen et Brandizzi, 2013). De plus, le domaine kinase de IRE1α interagit avec TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) et ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) (Siwecka *et al.*, 2021). Ceci permet la phosphorylation de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), qui phosphoryle plusieurs substrats, tels que Bcl-2 ou Bim, afin d'initier une cascade d'apoptose (Siwecka *et al.*, 2021). Pour étudier le stress du RE, les traitements de thapsigargine (Tg), qui

épuise les réserves de calcium du RE, et de Tn (Fig. 1.3A) sont couramment utilisés puisqu'ils altèrent ultimement le repliement de protéines (Dibdiakova *et al.*, 2019).

Il est intéressant de noter comment IRE1α peut à la fois promouvoir la survie et la mort cellulaire avec son mécanisme RIDD. Un modèle proposé pour dicter la spécificité et les cibles appropriées est la formation d'oligomères basée selon le niveau de stress du RE (Adams *et al.*, 2019b). Afin d'être active, IRE1α doit d'abord se dimériser afin de s'autophosphoryler (Adams *et al.*, 2019b). De façon intéressante, la dimérisation peut se produire de deux façons : en arrangement face à face ou dos à dos (Belyy *et al.*, 2022). La première conformation permet la trans-autophosphorylation mais a une activité endoribonucléase minimale (Belyy *et al.*, 2022). À l'inverse, la conformation dos à dos permet à IRE1α d'effectuer ses fonctions d'endoribonucléase, mais ne peut pas s'autophosphoryler (Belyy *et al.*, 2022; Orsi *et al.*, 2024). Les dimères peuvent ensuite s'oligomériser et les conformations dos à dos peuvent maintenant effectuer la trans-autophosphorylation (Belyy *et al.*, 2022). L'oligomérisation est variable, pouvant aller d'un tétramère jusqu'à un agrégat de IRE1α (Adams *et al.*, 2019b). La dimérisation est suffisante pour activer le clivage de XBP1s et l'initiation de RIDD, bien que la phosphorylation des récepteurs soit minimale (Back *et al.*, 2006; Orsi *et al.*, 2024; Siwecka *et al.*, 2021). Cependant, la reconnaissance des substrats proapoptotiques de RIDD nécessite l'oligomérisation des récepteurs (Le et Kimata, 2021). Dans ce contexte, il est suggéré que l'activation de IRE1α est proportionnelle à son oligomérisation où les agrégats modulent la puissance de la réponse UPR (Belyy *et al.*, 2022; Coelho et Domingos, 2014; Le et Kimata, 2021; Orsi *et al.*, 2024).

1.3 La dégradation de protéines

L'importance du mécanisme ERAD a été soulignée plus haut dans le contexte de protéines mal ou non repliées. Cela dit, les mécanismes de dégradation de la cellule ne se limitent pas aux protéines dysfonctionnelles. En effet, la dégradation permet également de mettre fin à des voies de signalisation, de recycler des acides aminés ou même de se débarrasser d'organites endommagés (Higuchi-Sanabria *et al.*, 2020; Klionsky et Emr, 2000; Samarasinghe *et al.*, 2021). Il existe deux principales voies de dégradation, soit le système de l'ubiquitine-protéasome (UPS) et la protéolyse lysosomale. Malgré qu'ils soient indépendants l'un de l'autre, ils sont tout de même interconnectés entre eux (Samarasinghe *et al.*, 2021). La prochaine section sera dédiée à présenter ces systèmes cruciaux pour le maintien de l'homéostasie cellulaire.

1.3.1 Le système de l'ubiquitine-protéasome

Comme le nom l'indique, la voie UPS se base sur les molécules d'Ub qui identifient les protéines à dégrader pour qu'elles soient reconnues par le protéasome, un gigantesque complexe multiprotéique servant de

machinerie de dégradation. Il a longtemps été considéré qu'une chaîne d'au minimum quatre molécules d'Ub sur la lysine K48 est le signal reconnu par le protéasome (Thrower *et al.*, 2000). Cependant, une étude faite sur des levures a démontré que toutes les chaînes d'Ub, à l'exception de la K63, étaient augmentées à la suite d'une inhibition pharmacologique du protéasome avec le MG132, bien que la K48 restait la plus abondante (Xu *et al.*, 2009). Par ailleurs, la K11 serait la chaîne la plus abondante au niveau du mécanisme ERAD (Xu *et al.*, 2009). En revanche, plusieurs études ont maintenant démontré que des chaînes hétérotypiques où la K48 est ajoutée sur les chaînes K6, K11, K29 ou K63 servent de signal de dégradation (Du *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2017; Meyer et Rape, 2014; Ohtake *et al.*, 2018). Puisque la K48 est ajoutée, il est possible de se demander si celle-ci reste celle qui est importante au niveau de la reconnaissance par le protéasome. Très récemment, une équipe de recherche a développé une nouvelle technologie permettant d'évaluer la déubiquitination et la dégradation à haute résolution temporelle grâce à l'administration intracellulaire de la protéine fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) ubiquitinée (Kiss *et al.*, 2025). Dans cette étude, les auteurs démontrent qu'une protéine portant une chaîne homotypique d'au moins trois molécules de K48 est dégradée en quelques minutes seulement alors qu'une chaîne de K63 est désassemblée encore plus rapidement (Kiss *et al.*, 2025). De façon intéressante, les chaînes hétérotypiques démontraient une hiérarchie selon la chaîne associée au substrat. Spécifiquement, un substrat avec la chaîne K48 modifiée par K63 (K48-K63) était principalement dégradé, mais une certaine proportion était déubiquitinée (Kiss *et al.*, 2025). L'inverse a été obtenu pour un substrat avec la chaîne K63 modifiée par K48 (K63-K48) où la déubiquitination était prévalente par rapport à la dégradation (Kiss *et al.*, 2025). Cependant, une autre étude a démontré *in vitro* qu'une chaîne K63 était plus efficace que K48 si elle est attachée près du C-terminal d'un substrat (Martinez-Fonts *et al.*, 2020). De plus, les études faites sur les récepteurs *Regulatory particle of triple-ATPase* (Rpn) permettant la reconnaissance des chaînes peuvent également nous donner des indices à ce niveau. Une étude a démontré que Rpn10 est le récepteur principal où les chaînes homotypiques K48 le lient presque exclusivement (Martinez-Fonts *et al.*, 2020). De son côté, Rpn1 agirait principalement en tant que corécepteur à Rpn10 pour les chaînes K63 (Martinez-Fonts *et al.*, 2020). Cependant, cette étude faite *in vitro* avec seulement des chaînes homotypiques n'a obtenu aucune dégradation pour la chaîne K11, qui est normalement connue pour être associée à ERAD, suggérant que les chaînes hétérotypiques sont potentiellement reconnues différemment (Martinez-Fonts *et al.*, 2020). En concordance, alors que cette étude démontre une faible reconnaissance de Rpn13 pour les chaînes K48, plusieurs études ont démontré que celle-ci a en réalité une préférence pour K48 sous forme de diUb (Chen *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019b; Lu *et al.*, 2020; Martinez-Fonts *et al.*, 2020). L'hétérogénéité du type, de l'endroit et du nombre d'Ub ajouté sur un substrat constitue un défi énorme afin de comprendre les signaux reconnus par le protéasome.

1.3.1.1 Les mécanismes ERAD et EGAD

Le mécanisme ERAD permet la dégradation des protéines considérées comme étant mal repliées de façon permanente. Il existe plusieurs stratégies demandant divers cofacteurs selon le substrat destiné au mécanisme ERAD, bien que tous convergent vers une dégradation par le système UPS (Christianson *et al.*, 2023). Pour les protéines dans la lumière du RE, elles doivent d'abord être rétrotransloquées vers le cytosol où la machinerie UPS est localisée. Divers mécanismes existent, mais lorsque le contrôle de qualité utilisé est dépendant de la *N*-glycosylation comme présenté plus haut (section 1.2.5.1), les protéines sont identifiées comme étant à dégrader grâce à un mécanisme modèle de « minuterie de mannose » (Christianson et Carvalho, 2022). Spécifiquement, alors que l'UGGT ajoute un résidu de Glc pour des cycles CNX/CRT, le retrait de résidus de Man par les enzymes EDEM (*ER degradation-enhancing α-mannosidase-like protein*) cible plutôt la protéine vers ERAD (Adams *et al.*, 2019a). Puisque ces enzymes agissent plus lentement que UGGT, l'exposition prolongée dans le RE, indiquant que la protéine est passée par plusieurs cycles, permettrait aux mannosidases d'effectuer leur action (Christianson et Carvalho, 2022). En concordance, une répression génique de UGGT a été démontrée pour accélérer l'envoi vers ERAD, puisqu'il n'y avait plus de compétition entre l'ajout de Glc et le retrait de Man (Ninagawa *et al.*, 2024). De plus, des cofacteurs s'associent avec les enzymes EDEM afin de réduire les liaisons disulfures, ce qui favorise l'activité des mannosidases et facilite les événements subséquents du mécanisme ERAD (Christianson *et al.*, 2023). Par la suite, les récepteurs OS-9 et XTP3B sont des lectines qui reconnaissent les glycoprotéines. De façon importante, ces récepteurs peuvent seulement reconnaître un Man de lien α-1,6 terminal (van der Goot *et al.*, 2018). Ceci signifie que minimum trois résidus de Man doivent être préalablement retirés, ce qui assure que les protéines sont bien terminales (Shenkman et Lederkremer, 2019). OS-9/XTP3B se lient au complexe de translocation SEL1L/HRD1, puis la protéine est transloquée vers le cytosol (van der Goot *et al.*, 2018). HRD1 a un domaine RING cytosolique, lui permettant de s'autoubiquitiner en plus d'ubiquitiner la protéine à même son passage dans le complexe (Betegon et Brodsky, 2020). L'autoubiquitination de HRD1 permet le recrutement du complexe Cdc48, une ATPase cytosolique, qui permettra le relargage de la protéine dans le cytosol en hydrolysant de l'ATP (Luo *et al.*, 2023). La protéine ubiquitinée et cytosolique est finalement reconnu par le protéasome, puis dégradée (Luo *et al.*, 2023).

Alors qu'on pensait que seuls les lysosomes étaient responsables de la dégradation post-RE, la dégradation associée au Golgi et aux endosomes (EGAD) est un mécanisme ressemblant grandement à ERAD découvert en 2019 (Fonseca et Carvalho, 2019). À ce jour, les quatre articles de recherche disponibles ont été effectués dans les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Schmidt *et al.*, 2019). Spécifiquement, EGAD est régulé par le complexe Dsc, partageant une homologie de structure avec le complexe HRD1, qui permet de débuter la rétrotranslocation du substrat et de l'ubiquitiner (Fonseca et Carvalho, 2019). Tout comme ERAD, le

complexe Cdc48 termine la translocation et la protéine est envoyée vers le protéasome (Fonseca et Carvalho, 2019). Le mécanisme reste à être découvert chez l'humain, mais des orthologues de certaines composantes de la machinerie ont été identifiés (Schmidt *et al.*, 2019). Par ailleurs, le système UPS est bien conservé, et ERAD est souvent comparé entre les levures et les mammifères (Luo *et al.*, 2023). Il est connu depuis plusieurs années que le Golgi peut cibler des protéines vers le protéasome, bien qu'il soit suggéré que les protéines sont d'abord retournées vers le RE pour emprunter la voie ERAD (Sun et Brodsky, 2019).

1.3.2 La protéolyse lysosomale

Pour cette voie de dégradation, les lysosomes sont les acteurs principaux. Comme décrit dans la première section, les lysosomes sont caractérisés par un pH très bas, ce qui est essentiel pour l'activité enzymatique de plusieurs protéines impliquées dans la dégradation (Xun et Tan, 2025). Les lysosomes sont des organites sphériques de 200 à plus de 1000 nm (Klumperman et Raposo, 2014). En tout, le génome humain code environ 70 enzymes lysosomales hydrolytiques solubles, incluant des protéases, des lipases, des glycosidases, des nucléases, des phosphatases et des sulfatases (Braulke *et al.*, 2024). Dans l'ensemble, ces enzymes décomposent les différentes classes de macromolécules biologiques, permettant de dégrader une grande variété de substrats (Xun et Tan, 2025). La plupart de ces enzymes sont synthétisées sous forme de précurseur *N*-glycosylée et seront activées par protéolyse lysosomale (Braulke *et al.*, 2024). Les lysosomes contiennent également environ 25 protéines membranaires, ayant pour fonction l'acidification de la lumière lysosomale, la fusion membranaire, l'import de protéines et l'export de produits de dégradation vers le cytoplasme (Saftig et Klumperman, 2009). Par ailleurs, les protéines membranaires sont généralement hautement glycosylées afin de créer une couche continue de glycoprotéines et de protéger la membrane contre les actions catalytiques des hydrolases lysosomales (Sabry *et al.*, 2023). Par exemple, Lamp1 et Lamp2 (*Lysosomal-associated membrane protein*) représentent environ 50% de toutes les protéines membranaires lysosomales et ont plus de 25 sites de glycosylation (Reggiori *et al.*, 2021). Elles sont couramment utilisées par les biologistes cellulaires comme marqueurs subcellulaires (Reggiori *et al.*, 2021). De façon générale, les protéines lysosomales résidentes peuvent y être transportées en provenance de la voie biosynthétique ou endolysosomale, alors que les substrats ciblés pour la dégradation peuvent s'y rendre par deux principales voies : l'endocytose ou l'autophagie (Hu *et al.*, 2015). Toutes ces voies de transport seront discutées dans la section 1.4.

1.3.2.1 L'acidification des lysosomes

L'homéostasie du pH des compartiments cellulaires est un processus complexe et dynamique, qui implique un grand nombre de protéines (Chen *et al.*, 2022a). Les lysosomes sont caractérisés par un pH très bas (~4.5-5.5), mais tous les compartiments ont également des pH spécifiques (RE: ~7.2; Golgi: ~6.0-6.7; endosomes

précoces: ~6.0-6.5; endosomes tardifs: ~5.5-6.0) (Ma *et al.*, 2017). Le principal complexe protéique impliqué dans l'acidification des compartiments, l'ATPase de type vacuolaire (V-ATPase ou ATP6), est responsable de la translocation de protons à travers la membrane (Lafourcade *et al.*, 2008). Spécifiquement, ce complexe hydrolyse de l'ATP afin de faire entrer un proton dans la lumière du compartiment (Mindell, 2012). La V-ATPase est composée de 14 sous-unités, dont certaines présentent différentes stœchiométries, pour un total d'environ 30 polypeptides et est séparée en deux structures importantes : le domaine catalytique V1 et le domaine mécanique V0 (Freeman *et al.*, 2023; Oot *et al.*, 2017). Alors que le premier domaine est cytosolique, le deuxième est intégré dans la membrane (Freeman *et al.*, 2023). Un mécanisme de régulation pour contrôler le pH est le désassemblage réversible entre les domaines V1 et V0 afin d'empêcher que l'activité catalytique (V1) soit près de la membrane. Une augmentation de la disponibilité cytosolique en glucose favorise l'assemblage des domaines pour diminuer le pH, alors qu'une augmentation du niveau d'acide aminé dans le cytosol favorise le désassemblage (McGuire *et al.*, 2016). Certaines sous-unités de la V-ATPase ont plusieurs isoformes où une est ubiquitaire et les autres sont spécifiques à un tissu (Smith *et al.*, 2003). Cependant, seule la sous-unité ATP6V0a possède des isoformes qui sont spécifiques aux compartiments cellulaires (Marshansky et Futai, 2008). Spécifiquement, les isoformes ATP6V0a1, ATP6V0a2 et ATP6V0a3 sont localisées sur les lysosomes, les endosomes précoces/Golgi et aux endosomes tardifs/lysosomes, respectivement (Banerjee et Kane, 2020; Mitra *et al.*, 2023). Ces différentes isoformes peuvent affecter les propriétés catalytiques de la pompe et modifier les mécanismes régulateurs, permettant de moduler leur activité selon le compartiment cellulaire (Banerjee et Kane, 2020). De plus, l'entrée de proton catalysée par la V-ATPase crée un gradient électrochimique et génère une différence de voltage, ce qui inhibe la pompe (Mindell, 2012). Pour garder une acidification efficace, la charge doit être rétablie, soit par l'entrée d'ions négatifs ou la sortie d'ions positifs (Mindell, 2012). Dans ce contexte, les canaux ioniques et transporteurs permettant de contrôler l'échange d'ions sont également importants au niveau du maintien du pH (Chen *et al.*, 2022a). Deux agents pharmacologiques, la chloroquine (CQ) et la bafilomycine A1 (BafA1) sont couramment utilisés par les biologistes cellulaires pour inhiber l'acidification des lysosomes et étudier la fonction lysosomale. Spécifiquement, le CQ entre dans le lysosome par diffusion où il est protoné, l'empêchant de sortir (Fedele et Proud, 2020). En absorbant les protons, ce traitement augmente le pH et inhibe la protéolyse lysosomale et la fusion avec l'autophagosome (présenté dans la section 1.4.3.3) (Fedele et Proud, 2020). De son côté, la BafA1 inhibe l'acidification en agissant sur la pompe V-ATPase, ce qui l'empêche de transférer les protons dans le lysosome (Dinter et Berger, 1998).

1.3.2.2 Les maladies de surcharge lysosomale

Les maladies de surcharge lysosomale (LSD) sont un groupe hétérogène de maladies, causées par un défaut de fonctionnement des lysosomes. Ceci entraîne une accumulation de substrats dans divers organes selon la

maladie. Elles sont rares individuellement, mais la prévalence devient significative lorsqu'elles sont regroupées, justifiant l'intérêt de les étudier en tant que groupe. En effet, environ 1 personne sur 5 000 en est atteinte (Platt *et al.*, 2018). Les LSDs sont génétiquement et phénotypiquement hétérogènes, mais elles se présentent fréquemment sous forme de maladie neurodégénérative infantile avec la présence de viscéromégalie, une hypertrophie des organes abdominaux, comme le foie et la rate, causée par l'accumulation des substrats (Platt *et al.*, 2018). Le SNC est souvent affecté, étant donné l'importance des lysosomes au sein de celui. Un programme de surveillance des cas de maladies neurodégénératives pédiatriques au Royaume-Uni a révélé que les LSDs étaient responsables de 45% des cas de neurodégénérescence (Platt *et al.*, 2012). Notamment, les DEE-93 et -104 sont causées par des mutations dans les gènes codants pour des sous-unités de la V-ATPase, altérant la fonction lysosomale (Guerrini et Conti, 2024; Li *et al.*, 2024). Les mutations génétiques causant ces maladies peuvent altérer l'activité des enzymes solubles, les protéines membranaires régulant la fonction des lysosomes ou le routage intracellulaire (Platt *et al.*, 2018). Des sous-classifications basées sur le type de matériel biochimique accumulé regroupent certaines LSDs entre elles, telles que les sphingolipidoses, les mucopolysaccharidoses (MPS) et les oligosaccharidoses (Vitner *et al.*, 2010). Cependant, certaines LSDs ont des mécanismes moléculaires plus complexes et peuvent difficilement être classées selon ces catégories. Par exemple, la déficience multiple en sulfatase présente une activité enzymatique réduite pour les 13 membres de la famille de sulfatase, entraînant l'accumulation de plusieurs classes de substrats (Futerman et van Meer, 2004). Puisque tous les membres de cette famille nécessitent la PTM d'une cystéine spécifique dans le centre catalytique de l'enzyme, une mutation dans le gène codant pour l'enzyme responsable de cette PTM, la FGE (*Cα-formylglycine-generating enzyme*), cause cette maladie (Schmidt *et al.*, 1995). En tout, ces maladies démontrent bien l'importance de la fonction des lysosomes au sein de l'organisme.

1.3.2.2.1 Iduronate 2-sulfatase

La mucopolysaccharidose de type II (MPS II), aussi connue sous le nom de syndrome de Hunter, est une maladie génétique rare, dégénérative et mortelle causée par une mutation dans le gène *iduronate 2-sulfatase* (*IDS*) situé sur le chromosome Xq28 (D'Avanzo *et al.*, 2020). La maladie étant récessive et liée au chromosome X, ce sont presque exclusivement les hommes qui en sont atteints (D'Avanzo *et al.*, 2020). Le syndrome a été rapporté pour la première fois en 1917 par le Canadien Charles Hunter, bien que ce soit seulement en 1968 qu'on l'associe à une dégradation fautive des GAGs (Fratantoni *et al.*, 1968; Hunter, 1917). L'incidence est d'environ ~1 sur 100 000 naissances, mais varie considérablement selon les régions géographiques (Demydchuk *et al.*, 2017). En effet, environ 50% des patients atteints de MPS ont la MPS II dans les pays de l'Asie de l'Est comparativement à 29% dans certains pays européens (Allemagne, Irlande, Portugal et Pays-Bas) (Khan *et al.*, 2017). La MPS II peut être divisée en deux formes, soit la MPS IIA et

MPS IIB, différenciées par la sévérité des symptômes neurologiques. En effet, alors que la MPS IIB présente peu ou pas d'atteinte neurologique, les individus atteints de la MPS IIA présentent une dégénérescence progressive du SNC, incluant une affectation cognitive sévère, de l'hyperactivité et de l'agressivité (Zhou *et al.*, 2020). Les autres symptômes sont multisystémiques et partagés par les deux formes, dont des déformations squelettiques, des traits du visage grossiers, une hépatosplénomégalie, des problèmes cardiaques et respiratoires et des hernies inguinales et ombilicales (Zhou *et al.*, 2020). Bien que cette maladie soit rare, plus de 650 mutations ont été rapportées dans le gène *IDS* pouvant causer des variants faux- ou non-sens, des insertions ou des délétions (D'Avanzo *et al.*, 2020). Certaines mutations sont retrouvées dans des régions non codantes mais causent des variations au niveau de l'épissage. Cependant, il n'est toujours pas compris pourquoi deux types de la maladie existent et il est toujours difficile de prédire la sévérité du phénotype liée à son génotype (D'Avanzo *et al.*, 2020).

La protéine IDS est une enzyme lysosomale soluble impliquée dans l'hydrolyse des chaînes des HS/DSPGs. IDS est synthétisée dans le RE sous la forme d'une protéine précurseur de 500 acides aminés (Demydchuk *et al.*, 2017). En accord avec les notions vues dans les précédents chapitres, elle contient un SP et huit sites de *N*-glycosylation (Demydchuk *et al.*, 2017). Avec sa glycosylation dans le RE, la protéine est de ~75 kDa alors qu'une forme sans glycosylation serait de ~60 kDa (Verma *et al.*, 2021). IDS contient six cystéines, dont quatre forment des liaisons disulfures (C171-C184 et C422-C432) (Demydchuk *et al.*, 2017). La cystéine 53 est libre à l'extrémité d'une boucle de 18 résidus et relie un feuillet β à une hélice α du N-terminal (Demydchuk *et al.*, 2017). Finalement, la cystéine 84 est oxydée en aldéhyde, modifiant l'acide aminé en formylglycine et formant le résidu clé du site actif (Marazza *et al.*, 2020). Au cours de sa maturation dans le Golgi, IDS acquiert des types complexes et riches en Man, menant à une forme de ~90 kDa. Les types riches en Man permettent la création de résidus M6P qui seront reconnus par les MPRs (Verma *et al.*, 2021). Une fois dans les lysosomes, la protéine subit une protéolyse permettant de séparer ses deux domaines, le SD1 et le SD2 (Froissart *et al.*, 1995). Spécifiquement, le SD1 correspond à la portion N-terminale de la protéine (acides aminés 34 à 443; 42 kDa) alors que le SD2 est la partie C-terminale (acides aminés 455 à 550; 14 kDa) (Verma *et al.*, 2021). Les résidus se trouvant entre les deux domaines correspondent à une boucle désordonnée (Demydchuk *et al.*, 2017; Verma *et al.*, 2021). Ensemble, le SD1 et le SD2 sont associés afin de former la forme majeure intermédiaire de 58 kDa, qui est enzymatiquement active (Demydchuk *et al.*, 2017). Cependant, une plus récente étude suggère que la protéolyse se produit plutôt dans le Golgi, avant d'atteindre les lysosomes (Osaki *et al.*, 2018). De nouvelles études seront nécessaires afin de déterminer quelles enzymes sont impliquées dans ce processus. Une étude présentant la structure par cristallographie d'IDS suggère que près de 90% des variants faux-sens causant la MPS II se retrouve sur des acides aminés enfouis, et propose que la sévérité d'un variant pourrait être liée à la

déstabilisation de la structure, entraînant une dégradation précoce par le mécanisme ERAD (Demydchuk *et al.*, 2017). Alors que la pathophysiologie de la maladie est considérée être causée par l'accumulation de GAGs, une récente étude a purifié IDS de cerveaux de souris et a identifié 187 partenaires d'interaction, incluant des hydrolases, des protéines du cytosquelette, des transporteurs, des protéines du routage intracellulaire et des chaperonnes, entre autres. Par ailleurs, en utilisant des outils bio-informatiques, ces interactions ont été regroupées par nœud, dont les fonctions moléculaires sont associées à la migration cellulaire, la défense immunitaire et le transport vésiculaire et axonal (Cardona *et al.*, 2019).

1.4 Le routage intracellulaire

Plusieurs molécules intracellulaires, qu'elles soient synthétisées ou internalisées passent par un mécanisme de routage intracellulaire au cours de leur vie. En effet, ce mécanisme englobe tout type de transport au sein de la cellule. Par ailleurs, en raison de leur structure et de leur polarité, les mécanismes discutés dans cette section sont particulièrement critiques au niveau des neurones et une attention particulière leur sera portée.

1.4.1 Le cytosquelette et le transport de vésicules

La vaste compartimentalisation de la cellule repose sur le transport efficace des protéines aux endroits cibles par des vésicules. Le cytosquelette permet à la cellule d'être de la bonne forme, d'être physiquement robuste et d'organiser sa composition interne (Alberts *et al.*, 2002). Il y a trois majeurs filaments qui font partie du cytosquelette : (1) les filaments intermédiaires, qui offrent la force et la résistance mécanique nécessaire pour réagir au stress, (2) les filaments d'actine, qui déterminent la forme et qui sont nécessaires pour la locomotion de la cellule, et (3) les microtubules (MTs), composés de tubuline, qui déterminent la position des organites et la direction du transport intracellulaire (Alberts *et al.*, 2002). Les MTs sont rigides et peuvent former des filaments relativement droits qui s'étendent sur toute la longueur de la cellule (Fig. 1.7A). De façon importante, les MTs sont polarisés, avec une extrémité positive, qui pointe vers la périphérie de la cellule, et une négative, qui est périnucléaire (Fig. 1.7A) (Gross *et al.*, 2007). Le transport est effectué par les protéines motrices qui, par un mécanisme dépendent de l'ATP, génèrent le mouvement sur les filaments (Sweeney et Holzbaur, 2018). En tout, il existe trois superfamilles de protéines motrices, dont deux sont associées aux MTs (Sweeney et Holzbaur, 2018). Les kinésines (KIF) régulent le transport antérograde (du pôle négatif vers le positif) et les dynéines permettent le transport rétrograde (du pôle positif vers le négatif) (Fig. 1.7A) (Sweeney et Holzbaur, 2018). Cependant, la famille de KIF-14 se dirige plutôt vers le pôle négatif, contrairement au reste de la superfamille (She *et al.*, 2017). En tout, il existe 45 KIFs chez l'humain, divisées en 15 familles et dont certaines ont une spécificité d'expression cellulaire et tissulaire (Hirokawa *et al.*, 2009; Miki *et al.*, 2001). Elles ont toutes un domaine moteur globulaire qui s'attache aux MTs et un domaine qui interagit avec des adaptateurs ou cargos spécifiques (Pu *et al.*, 2016). En comparaison,

seulement une dynéine impliquée dans le transport vésiculaire est connue (Cabukusta et Neefjes, 2018; Nagpal *et al.*, 2024). Cette protéine dimérique est composée de plusieurs sous-unités et a besoin d'un cofacteur, la dynactine, et d'un adaptateur de cargo pour être complètement active (Chaaban et Carter, 2022). Plusieurs facteurs établissent la directionnalité d'une vésicule. Cependant, il est courant qu'une vésicule se retrouve attachée à une KIF et à une dynéine au même moment (Kendrick et Christensen, 2022). Une compétition entre les deux protéines motrices, appelée « *tug-of-war* » dans la littérature, est enclenchée pour déterminer la direction de la vésicule (Kendrick et Christensen, 2022). Le modèle prédominant suggérait que le moteur le plus fort détermine la direction (Gicking *et al.*, 2022). Bien que le concept de compétition soit bien accepté dans le milieu, il semblerait que le gagnant n'est pas déterminé par la force ou la vitesse du moteur, mais plutôt par des mécanismes régulés par les adaptateurs (Gicking *et al.*, 2022). Par exemple, les différents adaptateurs de cargo qui lient le complexe dynéine/dynactine permettent évidemment de dicter la spécificité du cargo, mais ont également été démontrés pour réguler la vélocité du complexe (Elshenawy *et al.*, 2019). De plus, certains adaptateurs peuvent recruter une deuxième dynéine dans le complexe, ce qui augmente sa force motrice et son efficacité lors du « *tug-of-war* » contre une KIF (Elshenawy *et al.*, 2019).

Les filaments d'actine sont également polarisés mais sont plutôt organisés en réseau réticulé dense qu'on retrouve particulièrement concentré sous la MP et autour des organites (Fig. 1.7A) (Cabukusta et Neefjes, 2018; Chakrabarti *et al.*, 2021; Mullins, 2010). Cette caractéristique accorde une importance particulière aux filaments d'actine pour la régulation du trafic membranaire (Lanzetti, 2007). Les filaments sont très dynamiques, pouvant être rapidement assemblés et désassemblés selon le contexte cellulaire (Lanzetti, 2007). L'actine G (G pour globulaire) est la forme de la protéine monomérique qui peut être polymérisée pour devenir un filament d'actine F (F pour fibrillaire) (Ulferts *et al.*, 2021). L'assemblage peut être effectué par plusieurs protéines différentes, avec la famille de formins qui permet d'allonger les branches de façon linéaire, comparativement au complexe Arp2/3, qui crée des embranchements (Goode et Eck, 2007). Ce dernier est prédominant dans la polymérisation en lien avec la régulation des organites (Chakrabarti *et al.*, 2021). Spécifiquement, le complexe Arp2/3 est activé par un des sept membres de la famille WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*), avec leur fonction de facteurs favorisant la nucléation, sur des filaments d'actine préexistants (Alekhina *et al.*, 2017; Chakrabarti *et al.*, 2021). La troisième famille de protéines motrices mentionnée plus haut correspond à la famille des myosines, qui utilisent les filaments d'actine pour se déplacer (Sweeney et Holzbaur, 2018). De façon similaire aux KIFs, il existe autour de 40 myosines, séparées dans 13 classes et se déplacent, à l'exception de la myosine VI, vers l'extrémité positive (Fig. 1.7A) (Sweeney et Holzbaur, 2018). Par ailleurs, étant concentré sous la MP, il est commun qu'une vésicule destinée vers le milieu extracellulaire doive d'abord passer d'une KIF à myosine, avant d'atteindre la destination finale (Fig. 1.7A) (Cabukusta et Neefjes, 2018; Kapitein *et al.*, 2013; Pu *et al.*, 2016).

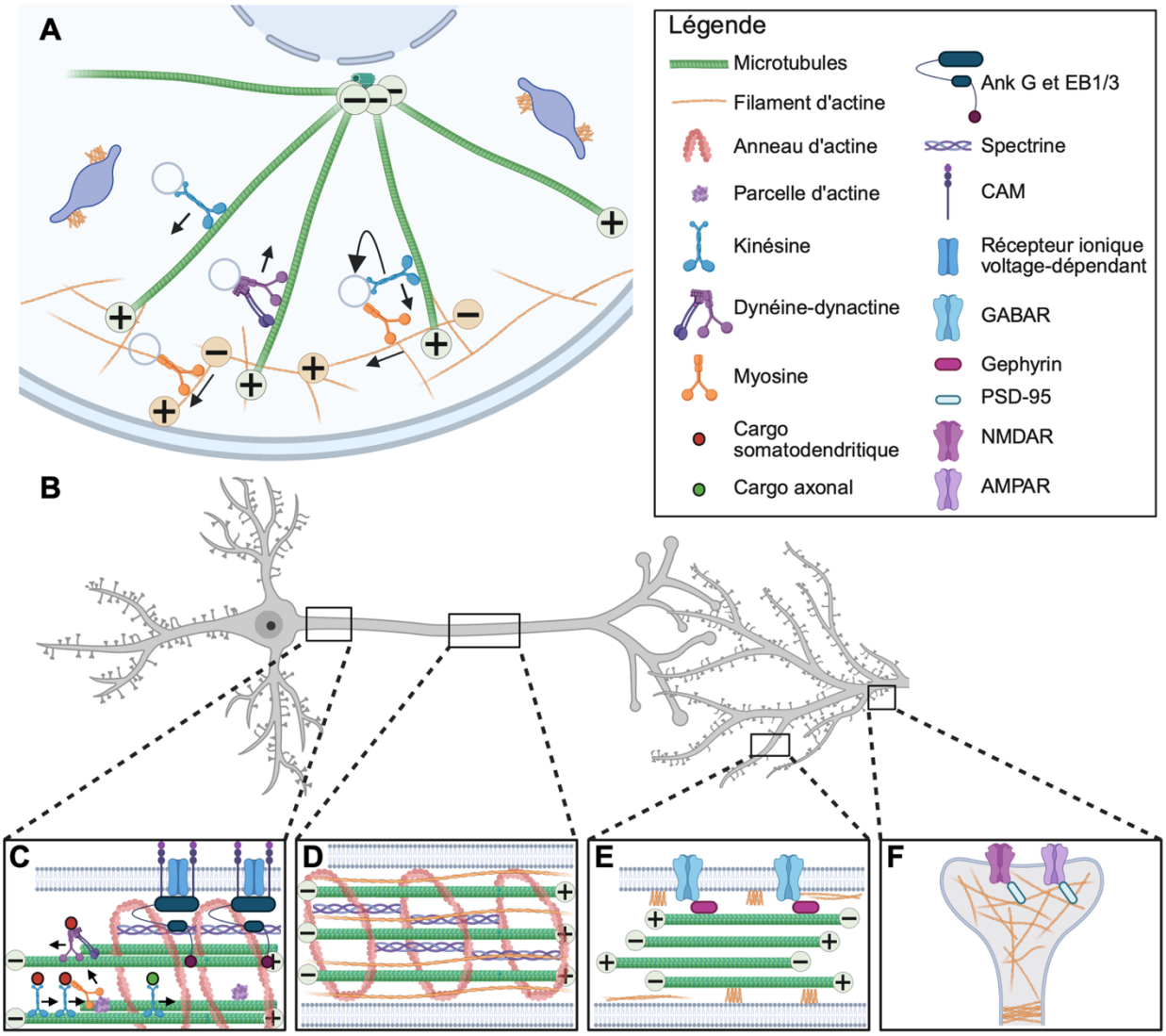


Figure 1.7: Les protéines motrices se déplacent sur le cytosquelette dans une cellule et dans les domaines spécifiques d'un neurone.

(**A**) Les MTs sont allongés du noyau à l'extrémité de la cellule avec les pôles positifs en périphérie. Les filaments d'actine sont concentrés sous la MP et autour des organites. Les kinésines permettent le transport antérograde alors que la dynéine permet le transport rétrograde sur les MTs. Les myosines bougent généralement sur les filaments d'actine vers le pôle positif. Près de la MP, une vésicule sur une kinésine passe par une myosine avant d'atteindre la membrane. (**B-E**) Dans un neurone, les sous-domaines ont des cytosquelettes spécifiques. On peut voir le cytosquelette du (**C**) segment AIS, (**D**) de l'axone, (**E**) de la tige des dendritiques et (**F**) des épines dendritiques. (**C**) Les myosines sur les parcelles d'actine reconnaissent les cargos somatodendritiques (rouge) et les transfèrent à la dynéine pour les retourner au soma. Les cargos axonaux (vert) continuent leur chemin. Schéma créé avec BioRender.com.

Le cytosquelette des neurones est critique pour conserver une polarité morphologique et fonctionnelle ainsi que pour contrôler le transport des macromolécules au sein de l'axone et des dendrites (Fig. 1.7B). Le cytosquelette du SIA peut être divisé en trois parties : la membrane plasmique, le cytosquelette sous-membranaire et la partie interne, organisés par la protéine d'échafaudage ankyrine G (AnkG) (Jones et Svitkina, 2016). Cette protéine permet de recruter les récepteurs à la membrane, principalement les canaux ioniques à voltage-dépendant, importants pour les potentiels d'action, et les CAMs (*Cell adhesion molecules*), impliqués dans les interactions avec la MEC (Fig. 1.7C) (Jones et Svitkina, 2016). Dans la région sous-membranaire, AnkG forme un complexe avec spectrine, qui maintient la stabilité et la structure de la membrane et qui agit comme protéine d'échafaudage (Fig. 1.7C) (Teliska et Rasband, 2021). La spectrine interagit avec des anneaux d'actine où ceux-ci semblent limiter la diffusion et compartimentaliser les protéines membranaires au sein du SIA (Fig. 1.7C) (Leterrier, 2018). Dans la partie interne, les protéines associées aux MTs EB1 et EB3 (*end-binding*) interagissent avec le C-terminal de AnkG et permet de concentrer les MTs en fascicules où les pôles positifs sont tous vers les bouts des axones (Fig. 1.7C) (Leterrier, 2018). On retrouve également des parcelles d'actine, qui agissent comme barrière au niveau du transport pour filtrer les cargos somatodendritiques (Fig. 1.7C) (Arnold et Gallo, 2014). Spécifiquement, par l'orientation des MTs, les cargos sont transportés par les kinésines pour quitter le corps cellulaire (Arnold et Gallo, 2014). Les protéines somatodendritiques ont des motifs reconnus par les myosines sur les parcelles d'actine, qui arrête leur transport (Arnold et Gallo, 2014). Le cargo est ensuite récupéré par la dynéine, puis retourné vers le soma (Fig. 1.7C) (Arnold et Gallo, 2014). Comparativement aux MTs en fascicules dans le SIA, les MTs sont plus espacés pour le reste de l'axone, bien qu'ils soient orientés dans le même sens (Fig. 1.7D) (Jones et Svitkina, 2016). Des filaments d'actine sont présents ainsi que le complexe spectrine-actine, mais AnkG est spécifique au SIA (Fig. 1.7D) (Kevenaar et Hoogenraad, 2015).

Pour les dendrites, on retrouve des MTs orientés dans les deux sens, où le pôle positif peut être vers ou à contresens du soma (Fig. 1.7E) (Nirschl *et al.*, 2017). Comme les synapses inhibitrices sont faites sur les tiges des dendrites, les MTs interagissent avec la protéine d'échaudage Gephyrin, qui permet l'ancrage des récepteurs acide gamma-aminobutyrique (GABA), impliqués dans la transmission synaptique inhibitrice (Fig. 1.7E) (Bucher *et al.*, 2020). Pour les synapses excitatrices, il y a une grande concentration de branchement d'actine dans les épines dendritiques, contrairement aux MTs qui s'y retrouvent occasionnellement et transitoirement (Fig. 1.7F) (Butler-Hallissey et Leterrier, 2024). L'actine interagit avec la protéine d'échafaudage PSD-95, qui régule l'expression de surface des récepteurs acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolopropionique (AMPARs) et des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDARs) (Fig. 1.7F) (Bucher *et al.*, 2020). Ces récepteurs médient la majorité de la transmission synaptique excitatrice et l'expression de surface des AMPARs est déterminante pour la plasticité et la

conservation ou la diminution de la force de la synapse, nommées potentialisation ou dépression à long terme (LTP; LTD), respectivement (Bassani *et al.*, 2013). Par ailleurs, il est maintenant bien établi qu'une LTP entraîne le réarrangement de l'actine F, puis l'élargissement des épines dendritiques (Bonilla-Quintana et Wörgötter, 2021).

1.4.2 La fusion des vésicules

La fusion vésiculaire est un mécanisme clé du routage intracellulaire, puisqu'elle permet la distribution du matériel d'une vésicule au compartiment ciblé. La fusion peut s'effectuer de façon homotypique lorsque deux types de compartiment semblable fusionnent (ex. endosome-endosome) ou de façon hétérotypique lorsque les types sont différents (ex. l'exocytose d'une SV) (Martens et McMahon, 2008). Ce mécanisme est effectué en trois étapes majeures : (1) l'attachement (*tethering*), (2) l'amarrage (*docking*), et (3) la fusion (James et Martin, 2013). La première étape permet de rapprocher la vésicule de la membrane cible et nécessite une Rab GTPase active et ancrée à la membrane (prochaine sous-section) qui sera reconnue par des protéines d'attache (Wickner et Schekman, 2008). Ces protéines peuvent être divisées en deux groupes : les protéines à longues bobines enroulées, telles que la famille de golgins ou EEA1 (*Early endosome antigen 1*), ou les complexes à plusieurs sous-unités, tels que les complexes CORVET (*Class C core vacuole/endosome tethering*) ou HOPS (*Homotypic fusion and vacuole protein sorting*) (Grosshans *et al.*, 2006). L'étape d'amarrage permet de passer d'un état d'attache/rapprochement à un état amarré serré afin d'immobiliser la vésicule à son site de relargage (Nofal *et al.*, 2007; Witkowska *et al.*, 2021). Les protéines SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor*) permettent de réguler la spécificité et la réaction de fusion (Martens et McMahon, 2008). La superfamille regroupe plus de 35 membres identifiés chez l'humain, dont la majorité est transmembranaire ou accrochée à la membrane par une PTM (Jahn *et al.*, 2003). Les SNAREs varient grandement en taille et en structure, mais ont toutes une séquence homologue, le motif SNARE, caractérisé par la présence de 60 à 70 acides aminés formant une hélice α (Jahn *et al.*, 2003). Spécifiquement, il est proposé depuis longtemps que cette famille englobe les t-SNAREs (*target* SNARE) sur la membrane cible et les v-SNAREs (*vesicle* SNARE) sur la vésicule. Quatre SNAREs, une sur la vésicule et trois sur la membrane, interagissent afin de former un complexe *trans*-SNARE (Jahn *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2012). Cependant, la bidirectionnalité des voies de transport ainsi que la localisation étendue de certaines SNAREs enfreignent cette classification, puisque plusieurs peuvent être classées dans les deux groupes (Jahn *et al.*, 2003; Yadav *et al.*, 2024). Dans le contexte, une classification basée sur la structure est plus couramment utilisée. Le complexe SNARE est formé par une interaction entre les quatre hélices α des membres et au centre du complexe, l'interaction repose sur la présence de trois glutamines et une arginine. La nouvelle classification de sous-famille repose sur la position spécifique dans le complexe où le membre sera identifié par l'acide aminé qu'il fournit lors de l'interaction

(Qa-, Qb-, Qc- et R-SNARE) (Jahn *et al.*, 2003; Yadav *et al.*, 2024). Afin d'être formé, le complexe SNARE nécessite une des protéines de la famille *Sec1/Munc-18 like proteins* (SM), puisque la délétion d'une de ces protéines peut empêcher l'événement de fusion qu'elle régule (Jahn *et al.*, 2003; Wickner et Schekman, 2008). Récemment, il a été démontré que les protéines SM catalysent la formation du complexe en interagissant avec les protéines SNAREs afin de former un « *template complex* » (Baker *et al.*, 2015; Jiao *et al.*, 2018). Ce dernier est formé par deux des quatre hélices formant une fermeture éclair intermédiaire, dans un processus de « *zippering* », avant d'induire progressivement le *zippering* du complexe complet (Baker *et al.*, 2015; Jiao *et al.*, 2018). Cependant, une étude plus récente démontre que plusieurs mécanismes semblent contribuer à la fonction des protéines SM. En utilisant Sly1, un SM spécifique au RE-Golgi, ils ont démontré que celui-ci pouvait ouvrir la conformation de la Qa-SNARE Sed5 et permettait le rapprochement de la vésicule, en plus d'agir dans la formation du complexe SNARE (Duan *et al.*, 2024). Pour terminer, lors de l'étape de fusion, l'interaction complète en fermeture éclair du complexe SNARE rapproche les membranes et l'énergie relâchée durant le processus de *zippering* surpasse les forces répulsives entre les membranes, conduisant à leur fusion (Azimi *et al.*, 2023).

Comme mentionné plus haut, les neurones communiquent entre eux avec le relargage de NTs dans la fente synaptique (Fig. 1.1). Les étapes de fusion entre la SV et la membrane plasmique de l'axone sont les mêmes, à l'exception de l'ajout d'une étape supplémentaire, l'amorçage (*priming*), qui est retrouvée entre l'amarrage et la fusion (Martens et McMahon, 2008). Cette étape est critique pour permettre une fusion rapide en réponse à un stimuli. Spécifiquement, les protéines d'attache RIMs (*Rab3-interacting molecules*) interagissent avec Rab3, Munc13, et les canaux calciques voltage-dépendant (VGCCs) (Fig. 1.8) (Mochida, 2022). Bien que les RIMs peuvent lier les VGCCs, les protéines RIM-BPs (*RIM binding protein*) sont également impliquées en agissant comme protéine d'ancrage pour stabiliser l'interaction (Fig. 1.8) (Kaeser *et al.*, 2011). La formation de ce complexe est clé pour l'étape d'attachement (Fig. 1.8) (Wu *et al.*, 2023). Après avoir été recruté par RIM, Munc13 recrute à son tour la protéine SNAP-25 (*Synaptosome associated protein 25*) et Munc18, qui est liée à syntaxine, pour initier le complexe SNARE (Fig. 1.8) (Kalyana Sundaram *et al.*, 2021; Wang et Ma, 2022). SNAP-25 contribue deux hélices (Qb- et Qc-SNARE) au complexe, avec un motif dans sa région C-terminale et un en N-terminal (Gonzalo *et al.*, 1999). Syntaxine contient l'hélice Qa-SNARE et synaptobrévine, retrouvée sur la SV, qui fournit l'hélice R-SNARE (Fig. 1.8) (Powell, 2006). De façon importante, RIM interagit avec synaptotagmine, une protéine retrouvée sur les SVs qui change de conformation en présence de calcium (Fig. 1.8) (Mittelstaedt *et al.*, 2010). Ce changement de conformation permet l'interaction entre synaptotagmine et SNAP-25 dans le complexe SNARE pour initier l'étape de fusion (Fig. 1.8) (Zhu *et al.*, 2024b). On parle donc d'étape d'amorçage puisque toutes les protéines nécessaires sont recrutées à l'avance pour que la SV soit prête à fusionner

rapidement. En effet, lorsqu'un potentiel d'action traverse l'axone, les VGCCs s'ouvrent et un influx de calcium est disponible (Fig. 1.8). L'organisation régulée par RIM permet à synaptotagmine d'être près des VGCCs et donc près de cet influx, permettant un changement de conformation rapide suite à l'ouverture des récepteurs afin de promouvoir l'étape finale de fusion (Fig. 1.8) (Südhof, 2013). De façon intéressante, des souris déficientes de Rab3 ne démontrent qu'une faible réduction dans le relargage de NTs (Binotti *et al.*, 2016). En effet, il existe une redondance fonctionnelle avec Rab27 qui partage plusieurs partenaires d'interaction, incluant RIM et Munc-13 (Pavlos et Jahn, 2011). Notamment, plusieurs références décrivant le mécanisme de fusion indiquent les deux protéines, comme représentées dans la Fig. 1.8. Rab27 est retrouvé sur environ la moitié des SVs ayant Rab3 (Pavlos et Jahn, 2011). Il semble y avoir des différences au niveau du cycle où Rab3 est spontanément dissocié lors de l'exocytose déclenchée par le calcium, alors que Rab27 persiste sur la membrane (Pavlos et Jahn, 2011). Cependant, les fonctions précises et les rôles distincts des deux GTPases ne sont toujours pas bien compris.

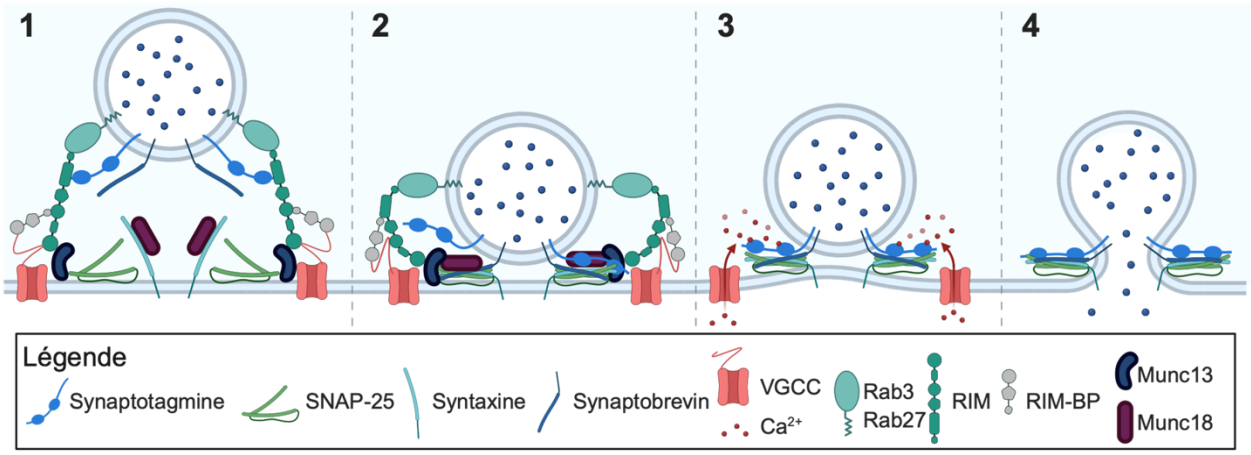


Figure 1.8: La fusion d'une vésicule synaptique.

L'étape 1 (attachement) rapproche la vésicule de la membrane grâce à Rab3/27, RIM et RIM-BP. L'étape 2 combine l'amarrage et l'amorçage qui se produisent presque simultanément. Le complexe représenté à gauche de la vésicule démontre que Munc13 et Munc18 catalysent la formation du complexe SNARE. Le complexe de droite démontre que RIM a permis de rapprocher synaptotagmine pour l'interaction avec SNAP-25. À l'étape 3, les vésicules sont déjà amorcées. L'influx de calcium représenté permet la fusion rapide à l'étape 4. Le schéma est allégé dans ces étapes. Schéma créé avec BioRender.com.

1.4.3 La voie endolysosomale

Le système endolysosomal est au sein du routage intracellulaire et de la protéolyse lysosomale. Ce système est divisé en plusieurs compartiments ayant des caractéristiques différentes permettant de recevoir et d'acheminer les protéines vers la bonne destination (Elkin *et al.*, 2016). L'identité du compartiment est déterminée par son pH et par la composition de sa membrane, particulièrement au niveau d'une Rab GTPase qui est recrutée ainsi que par la présence d'une espèce spécifique de phosphatidylinositol (PI), un type de phospholipide retrouvé dans les membranes (Fig. 1.9; 1.10) (Jongsma *et al.*, 2022). Les protéines Rab font partie de la superfamille de petites GTPases Ras, ayant comme caractéristique de passer par des cycles actifs et inactifs par la liaison du GTP et GDP, respectivement (Fig. 1.9) (Wandinger-Ness et Zerial, 2014). Après leur synthèse, les Rabs subissent une PTM, la prénylation, qui ajoute des groupements géranyl-géranyl sur un ou deux résidus conservés de cystéine dans la portion C-terminale, permettant l'association aux membranes (Fig. 1.9) (Guo *et al.*, 2008; Wandinger-Ness et Zerial, 2014). Ils sont d'abord maintenus solubles dans le cytosol par l'association aux GDI (*GDP dissociation inhibitor*) et la première étape d'activation implique la dissociation du complexe GDP-Rab/GDI (Fig. 1.9) (Wilmes et Kümmel, 2023). Une fois à la membrane, ils sont activés par des GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*) spécifiques à chaque Rab qui permettent l'échange du GDP pour le GTP (Fig. 1.9) (Seabra et Wasmeier, 2004). Pour être inactivées, les GAPs (*GTPase-activating proteins*) augmentent l'activité catalytique de la Rab afin qu'elle hydrolyse la GTP qui lui est liée en GDP (Fig. 1.9) (Barr et Lambright, 2010). Dans sa forme liée au GDP, les GDIs extraient la Rab de la membrane pour le maintenir inactif dans le cytosol en attendant le prochain cycle (Fig. 1.9) (Wilmes et Kümmel, 2023). Chaque Rab a une fonction et une localisation précise (Fig. 1.10A). Par exemple, Rab4 est associée aux endosomes de recyclage rapide, Rab5 se retrouve aux endosomes précoces alors que Rab11 caractérise les endosomes de recyclage lent. Rab7 et Rab9 sont aux endosomes tardifs et permettent le routage vers les lysosomes et vers le TGN, respectivement (Fig. 1.10A) (Stenmark, 2009). Rab2 permet de réguler le transport du Golgi vers le RE et, plus récemment identifié, se trouve aussi aux autophagosomes, aux endosomes tardifs et aux lysosomes alors que Rab27 régule l'exocytose (Fig. 1.10A) (Ding *et al.*, 2019; Lőrincz et Juhász, 2020; Matsumoto *et al.*, 2018)

L'identité du compartiment repose aussi sur la composition en PI. Spécifiquement, le PI est synthétisé dans le RE, puis est modifié par la phosphorylation ou déphosphorylation d'un groupement hydroxyle de l'anneau d'inositol, permettant la création de sept différentes espèces de PI-phosphate (PIP) (Fig. 1.10B) (Di Paolo et De Camilli, 2006). Chaque espèce permet le recrutement et l'interaction de domaines spécifiques parmi les différentes protéines impliquées dans le routage intracellulaire, permettant d'instituer un « code-barre » à chaque compartiment (Di Paolo et De Camilli, 2006). Par ailleurs, il est connu que les différentes isoformes ATP6V0a ont des préférences au niveau des espèces de PIPs, ce qui régule leur

localisation intracellulaire spécifique (Mitra *et al.*, 2023). Le PI-4,5-biphosphate ($PI(4,5)P_2$) et le PI-3,4,5-triphosphate ($PI(3,4,5)P_3$) sont concentrés à la MP alors que le PI-3,4-biphosphate ($PI(3,4)P_2$) se trouve à la MP et dans les vésicules endocytiques (Fig. 1.10A) (Di Paolo et De Camilli, 2006; Marat et Haucke, 2016). Le PI-4-phosphate (PI(4)P) peut être retrouvé au Golgi et à la MP ainsi que sur les vésicules d'exocytose, telles que les SVs (Fig. 1.10A) (Posor *et al.*, 2022; Yoshida *et al.*, 2025). De plus, le PI-3-phosphate (PI(3)P) est aux endosomes précoces et aux autophagosomes, alors que sa conversion en PI-3,5-biphosphate ($PI(3,5)P_2$) permet d'identifier les endosomes tardifs (Fig. 1.10A) (Marat et Haucke, 2016). Lors de la maturation, des vésicules intraluminales (ILVs) se forment dans un type d'endosome tardif spécialisé, qu'on qualifie de corps multivésiculaire (MVB) (Gruenberg, 2001). Ceux-ci conservent l'espèce de PI(3)P des endosomes précoces (Fig. 1.10A) (Kutateladze, 2010). Certains ILVs deviennent des exosomes lorsque le PI(3)P est converti en PI(4)P (Fig. 1.10A) (Posor *et al.*, 2022). Les lysosomes sont décorés de plusieurs types différents (Posor *et al.*, 2022). En effet, bien que le PI(3)P et $PI(3,5)P_2$ soient les espèces prédominantes, on retrouve également des groupements mineurs de PI(4)P, $PI(4,5)P_2$ et $PI(3,4)P_2$ (Fig. 1.10A) (Ebner *et al.*, 2019). La présence des différents groupes corrèle avec l'état fonctionnel et la sous-population du lysosome (Ebner *et al.*, 2019). Par exemple, $PI(3,5)P_2$ se trouve sur les lysosomes dégradatifs avec une V-ATPase grandement active (Posor *et al.*, 2022). Finalement, le PI-5-phosphate (PI(5)P), le PIP le plus récemment identifié et le plus rare représentant seulement 0.5% du total des PIPs présents dans la cellule (Poli *et al.*, 2019), semble plutôt être localisé de façon ubiquitaire au sein de la cellule, incluant des organites ne faisant pas partie du système endolysosomal tel que le noyau ou la mitochondrie (non représenté) (Rameh et Blind, 2023).

1.4.3.1 L'endocytose et le tri aux endosomes précoces

L'endocytose en son sens large fait référence à un transport actif permettant d'internaliser divers composés, ce qui inclut les mécanismes de phagocytose, de pinocytose et d'endocytose médiée par les récepteurs (Richards et Endres, 2016). Ce troisième mécanisme permet d'internaliser des cargos spécifiques requis par la cellule, généralement un récepteur et son ligand, et de les acheminer à divers endroits dans la cellule (Khan et Steeg, 2021). Par exemple, la transferrine (Tf) est une protéine qui circule et lie les molécules de fer afin de les transporter aux cellules. Lorsque la Tf arbore deux molécules de fer, elle peut lier son récepteur, le récepteur de la Tf (TfR), qui est situé à la MP de la cellule (Brandsma *et al.*, 2011). Cette interaction induit une homodimérisation de TfR et ceux-ci sont internalisés (Fig. 1.11A) (Gammella *et al.*, 2020). De façon similaire, l'EGF (*epidermal growth factor*) se lie à son récepteur (EGFR) qui dimérise pour activer des voies de signalisation et ce complexe est rapidement internalisé (Fig. 1.11A) (Pinilla-Macua et Sorkin, 2015). L'endocytose médiée par les récepteurs peut être dépendante d'un manteau, tel que la clathrine (discuté dans la section 1.4.4), ou être indépendante, mais les deux mécanismes convergent vers

la formation de vésicules endocytiques (Rennick *et al.*, 2021). Ensuite, la fusion hétérotypique entre les vésicules endocytiques et les endosomes précoces est régulée par Rab5-GTP, qui recrute ses effecteurs d'attache EEA1 et Rabenosyn-5 pour initier la première étape de fusion. EEA1 permet de lier PI(3)P et les SNAREs alors que Rabenosyn-5 interagit avec Vps45 (*Vacuolar protein sorting*) de la famille des protéines SM (Fig. 1.11B) (Gautreau *et al.*, 2014). Les endosomes précoces peuvent également fusionner entre eux (fusion homotypique) en utilisant d'autres effecteurs, bien que les différences entre ces mécanismes ne soient toujours pas bien comprises (Gautreau *et al.*, 2014). Dans la fusion homotypique, Rab5 recrute le complexe d'attache CORVET, composé de six sous-unités (Vps11, Vps18, Vps16, Vps33, Vp3 et Vps8) (Fig. 1.11B) (Spang, 2016). Les trois premières sous-unités forment le cœur du complexe, alors que Vps33 fait partie de la famille des protéines SM et permet l'interaction avec le complexe SNARE (Lobingier et Merz, 2012; Spang, 2016). Les deux dernières sous-unités sont responsables de la reconnaissance de Rab5 et, plus récemment démontrée, de PI(3)P (Shvarev *et al.*, 2024). Une activation constitutive ou surexpression de Rab5 entraîne des endosomes élargis, résultat d'une augmentation de la fusion entre les endosomes précoces (Kälin *et al.*, 2015). De plus, des observations semblables ont été constatées si la GEF de Rab5, Rabex-5, était surexprimée (Mattera et Bonifacino, 2008).

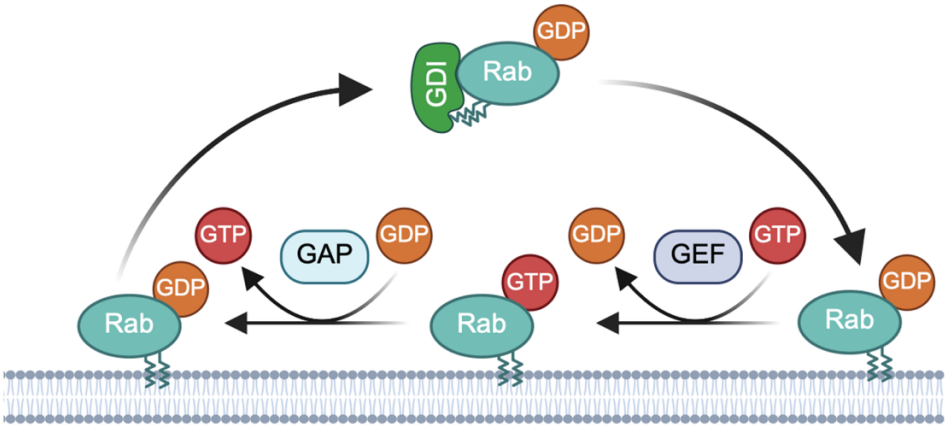


Figure 1.9 : Le cycle d'activation d'une Rab GTPase.

GDI camoufle les groupements géranyl-géranyl de Rab dans le cytosol. La dissociation permet à la Rab d'être recrutée à la membrane et activée par GEF. GAP catalyse l'hydrolyse du GTP en augmentant l'activité catalytique de la Rab. Schéma créé avec BioRender.com.

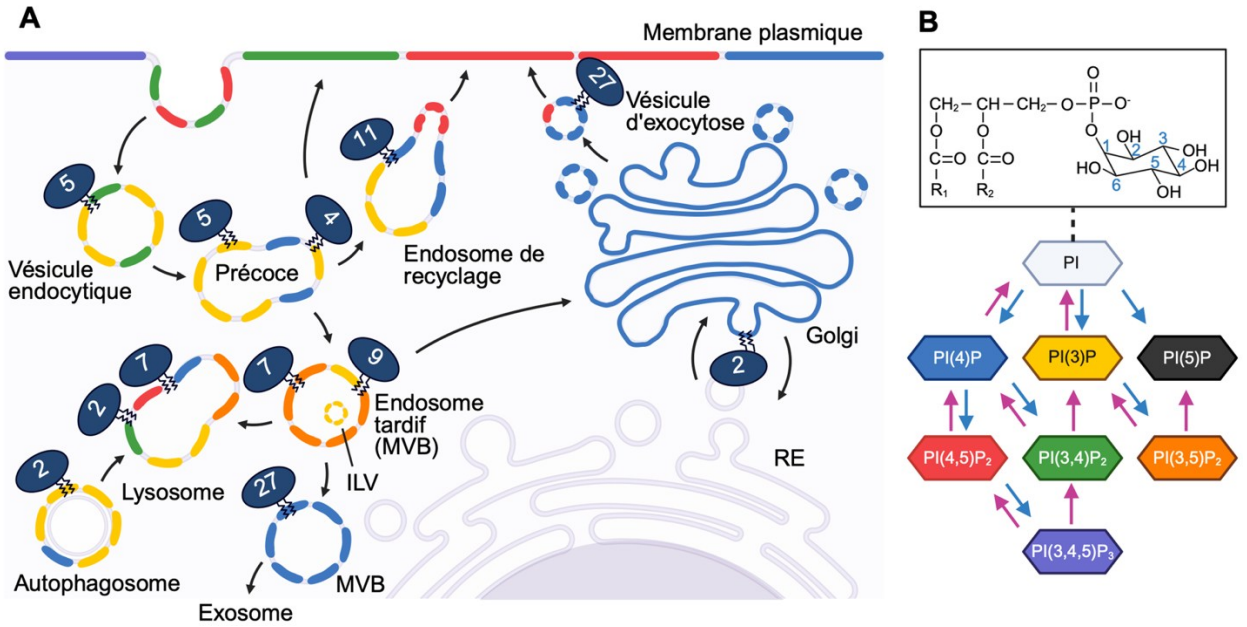


Figure 1.10: L'identité d'un compartiment cellulaire est définie par la présence d'une Rab et un PIP spécifique.

(**A**) Les combinaisons Rab/PIP permettent d'identifier le compartiment cellulaire. Seuls les numéros des Rabs sont indiqués pour alléger le schéma. Les PIPs sont représentés par des parcelles de couleur sur les organites correspondant aux couleurs présentées dans le panneau **B**. (**B**) La structure du PI est démontrée et la phosphorylation est possible sur les groupements hydroxyles des carbones 3, 4 et/ou 5 (numérotés en bleu). Les différents PIPs sont présentés dans des encadrés de couleur, servant de légende pour le panneau **A**. Les kinases (flèches bleues) et les phosphatases (flèches roses) permettent la conversion des différents PIPs. Schéma créé avec BioRender.com.

Les endosomes précoces sont aussi appelés endosomes de tri (*sorting endosomes*), puisqu'ils agissent comme une station permettant de redistribuer les cargos vers divers endroits dans le système endolysosomal. Plus spécifiquement, les endosomes précoces sont des vésicules rondes ou ovales de 100 à 500 nm de diamètre, mais ont également des extensions tubulaires de 40 à 60 nm de diamètre (Gopaldass *et al.*, 2024; Gruenberg, 2001; Klumperman et Raposo, 2014). Alors que la majorité du volume se retrouve dans les vésicules, les tubules constituent la majorité de la surface de la membrane (Huotari et Helenius, 2011). La membrane des endosomes précoces est composée de plusieurs microdomaines avec des compositions et des fonctions différentes. Les domaines vésiculaires maturent en endosomes tardifs alors que les extensions tubulaires permettent de générer des vésicules de transport vers d'autres organites (Huotari et Helenius, 2011). Si nous reprenons nos exemples de TfR et EGFR, lorsque le TfR atteint les endosomes précoces, le fer est libéré de la Tf par l'acidité du compartiment. Le complexe Tf/TfR est ensuite recyclé vers la MP grâce aux endosomes de recyclage (Fig. 1.11A) (Gammella *et al.*, 2020). En comparaison, la liaison

EGF/EGFR est stable jusqu'à pH ~4.5, signifiant que le récepteur continue d'activer sa signalisation en provenance des compartiments endosomaux (Fig. 1.11A) (Khan et Steeg, 2021). Selon le contexte cellulaire, son sort est déterminé dans les endosomes de tri : le recyclage ou la dégradation (Khan et Steeg, 2021). Il existe deux types de recyclage, soit le rapide et le lent. Le recyclage rapide est régulé par Rab4, qui est localisé sur un des microdomaines des endosomes précoces. Spécifiquement, le TfR passe, sur la même vésicule, d'un microdomaine positif pour Rab5 vers un microdomaine avec Rab4 avant d'être rapidement retourné vers la MP ou d'être trié vers le compartiment de recyclage endosomal (Fig. 1.11A) (Jovic *et al.*, 2010). Rab4 a plusieurs effecteurs et régule diverses fonctions biologiques, mais comment il contrôle le triage au niveau temporel et spatial est toujours peu compris (Zhang *et al.*, 2022). Le compartiment de recyclage endosomal provient des extensions tubulaires des endosomes précoces et en émergeront les endosomes de recyclage (Grant et Donaldson, 2009). En passant par ce compartiment, on considère cette voie de recyclage comme étant lente. Cette voie est contrôlée par Rab11, qui a également été démontré pour être important dans le recyclage des TfR et EGFR (Fig. 1.11A) (Fraser *et al.*, 2019; Jovic *et al.*, 2010). De façon importante, le recyclage est critique pour la neurotransmission. Il est bien connu qu'une augmentation de l'expression de surface des AMPARs est liée à la LTP (Hausser et Schlett, 2019). Rab4 et Rab11 ont toutes les deux étés démontré pour être critique dans le recyclage des AMPARs (Hausser et Schlett, 2019). Spécifiquement, le dominant négatif de Rab11 empêche la formation de LTP, alors que Rab4 a seulement un petit effet (Brown *et al.*, 2007). Cependant, Rab4 est nécessaire pour le recyclage en condition basale puisque le dominant négatif cause une réduction de la taille des épines dendritiques (Brown *et al.*, 2007).

1.4.3.2 La maturation des endosomes

Plutôt que d'utiliser la fusion, les domaines vésiculaires des endosomes précoces subissent des changements morphologiques et de composition, d'où le terme maturation, pour devenir des endosomes tardifs avant de pouvoir fusionner avec les lysosomes. Les endosomes tardifs sont également ronds ou ovales et ont un diamètre de 250 à 1000 nm, soit environ deux fois la grosseur des endosomes précoces (Huotari et Helenius, 2011; Klumperman et Raposo, 2014). Deux caractéristiques différencient les endosomes précoces des endosomes tardifs, soit la conversion de Rab5 à Rab7 et de PI(3)P à PI(3,5)P_2 (Liu *et al.*, 2016b). Tout d'abord, l'activation de Rab5 par sa GEF Rabex-5 sur les endosomes précoces permet de recruter Rabaptin-5, qui se lie sur une hélice auto-inhibitoire de Rabex-5 afin de l'activer. Ceci mène à une amplification de l'activation de Rab5 grâce à un mécanisme de rétroaction positive (Fig. 1.11C) (Kümmel et Ungermann, 2014). Rab5 recrute le complexe d'endocytose II contenant Vps34, une kinase de PI3 de classe III, pour produire du PI(3)P présent à la membrane (Fig. 1.11A) (Liu *et al.*, 2016b; Tremel *et al.*, 2021). Le complexe Mon1-Ccz1 est recruté par la grosseur de l'endosome précoce et son niveau de PI(3)P présent et interagit également avec Rab5-GTP (Fig. 1.11C) (Liu *et al.*, 2016b). Bien que ce complexe soit un effecteur de Rab5,

il agit comme GEF afin d'activer Rab7 (Fig. 1.11C) (Poteryaev *et al.*, 2010). En effet, il a d'ailleurs été démontré que l'interaction du complexe avec Rab5 stimule grandement l'activité catalytique de la GEF et que Rab5 est critique et constitue l'étape limitante pour l'activité du complexe (Langemeyer *et al.*, 2020). De façon intéressante, Mon1-Ccz1 permet de déloger Rabex-5, ce qui arrête le mécanisme de rétroaction positive permettant d'activer Rab5 (Fig. 1.11C) (Poteryaev *et al.*, 2010). De plus, lorsque Rab7 est activé, il recrute ses effecteurs, incluant TBC-2, une GAP de Rab5 pour l'inactiver, et le complexe HOPS (Liu *et al.*, 2016b). Le mécanisme entourant la transition des PIPs lors de la maturation est beaucoup moins connu. La kinase PIKfyve est recrutée aux endosomes précoces grâce à son domaine FYVE, un domaine qui lie spécifiquement PI(3)P, afin de phosphoryler ce dernier, mais la dynamique entourant son recrutement reste élusive (Fig. 1.11C) (Vines *et al.*, 2023).

La maturation des endosomes est également accompagnée de la formation des ILVs, des vésicules de 50 à 100 nm de diamètre (Huotari et Helenius, 2011). Celles-ci se retrouvent à l'intérieur des endosomes et permettent de trier les cargos vers la dégradation grâce aux quatre complexes ESCRT (*Endosomal sorting complex required for transport*), soit ESCRT-0, -I, -II et -III (Klumperman et Raposo, 2014). Les complexes sont recrutés de manière séquentielle en débutant par ESCRT-0 puisqu'il a un domaine FYVE, lui permettant de lier PI(3)P (Fig. 1.11D) (Marat et Haucke, 2016). Il reconnaît les récepteurs ubiquitinés pour la dégradation et les transfère au complexe ESCRT-I (Marat et Haucke, 2016). Ce dernier recrute ensuite ESCRT-II et l'interaction entre les deux permet d'initier la déformation de la membrane de l'endosome précoce, puis ESCRT-III permet la scission afin de libérer les ILVs dans la lumière de l'endosome (Fig. 1.11D) (Boura *et al.*, 2012). Notamment, cette machinerie est responsable de l'arrêt de la signalisation de l'EGFR puisque la portion cytosolique du récepteur se fait séparer du reste de la cellule en étant intégré dans les ILVs (Fig. 1.11A) (Khan et Steeg, 2021). Bien que la maturation des endosomes dépende de la conversion des Rabs et de la fonction des complexes ESCRT, la coordination entre les deux mécanismes n'est pas bien décrite. Cependant, une étude très récente démontre qu'en l'absence des complexes ESCRT-0 ou -I, la présence de cargos ubiquitinés augmente. Rabex-5 lie ceux-ci et cette interaction empêche le complexe Mon1-Ccz1 de le déloger, ce qui inhibe la conversion de Rab5 à Rab7 (Fig. 1.11D) (Ott *et al.*, 2025). Ces données suggèrent que la formation d'ILV par les complexes ESCRTs est critique pour la maturation et pourrait procéder la conversion des Rabs (Ott *et al.*, 2025).

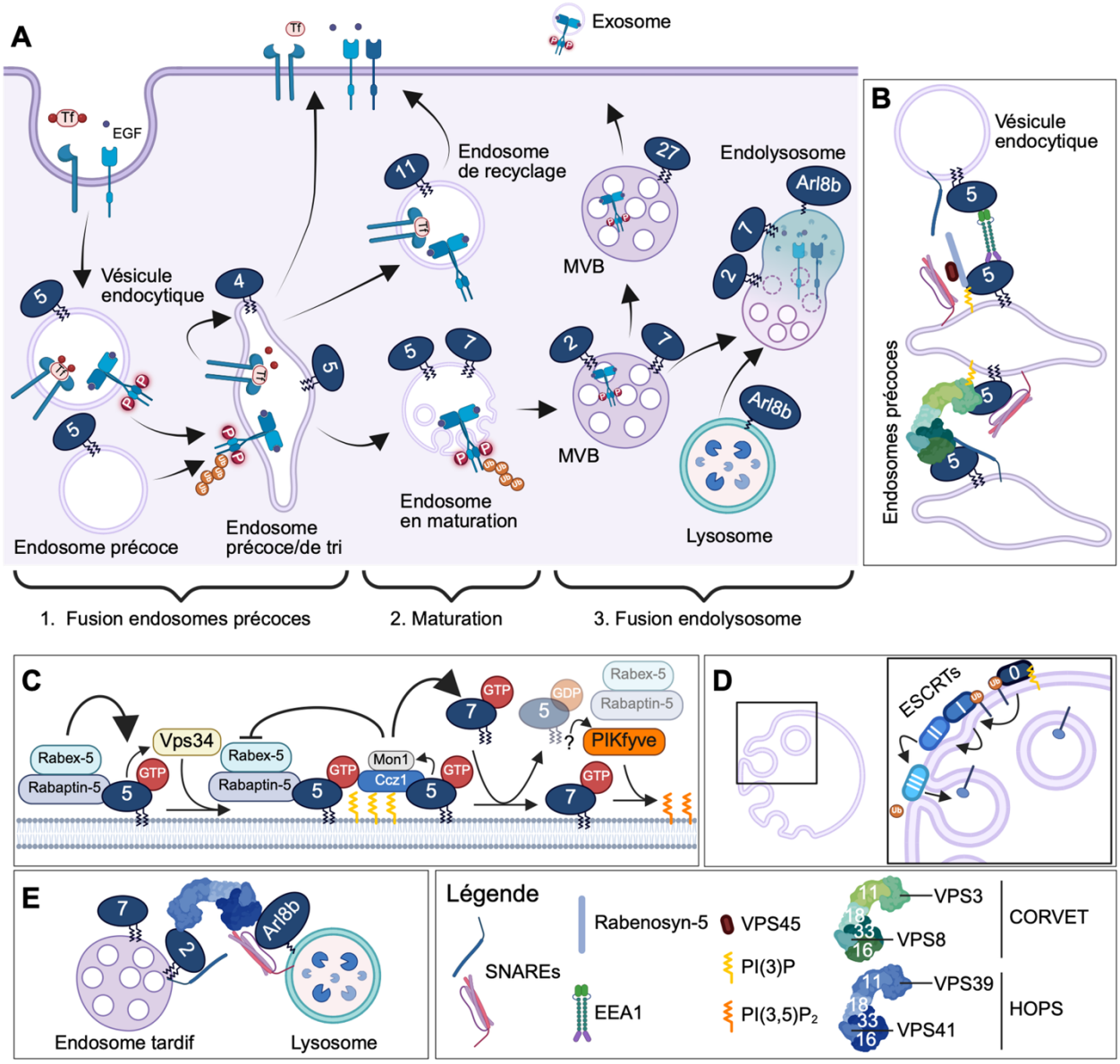


Figure 1.11: L'endocytose des récepteurs de la Tf et de l'EGF et les voies de tri du système endolysosomal.

(**A**) TfR et EGFR sont internalisés avec leur ligand. TfR et EGFR peuvent être recyclés par Rab4 ou Rab11 alors que l'EGFR ubiquitiné est envoyé vers les endosomes tardifs. Des ILVs se forment dans les MVBs qui peuvent être relargués dans le milieu extracellulaire, lorsque régulés par Rab27 ou fusionner avec un lysosome. (**B**) La fusion hétérotypique et homotypique des endosomes précoces. (**C**) La cascade permettant le remplacement de Rab5 par Rab7 sur les endosomes tardifs. (**D**) Le tri des cargos ubiquitinés par les complexes ESCRT. (**E**) La fusion des endosomes tardifs et des lysosomes. Schéma créé avec BioRender.com.

Les MVBs font de 300 à 400 nm de diamètre (Gruenberg, 2001) et ils peuvent fusionner avec les lysosomes pour la dégradation ou avec la MP afin de relarguer le contenu des ILVs à l'extérieur de la cellule, ce qui constitue d'ailleurs deux possibles voies que l'EGFR peut prendre (Fig. 1.11A) (Xu *et al.*, 2023). Les ILVs relâchés sont nommés exosomes (Xu *et al.*, 2023). Les ILVs destinées à devenir des exosomes sont distinguées de la dégradation par la conversion de PI(3)P en PI(4)P au lieu du $PI(3,5)P_2$, et la fusion de ces compartiments avec la MP est régulée par Rab27 (Fig. 1.11A) (Posor *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2023). Pour l'envoi vers la dégradation, le complexe HOPS, recruté par Rab7, est le complexe d'attache permettant de catalyser la fusion entre les endosomes tardifs et les lysosomes (Spang, 2016). Ce complexe partage les mêmes sous-unités que CORVET, à l'exception des deux responsables de la liaison à la Rab GTPase, où Vps39 remplace Vps3 et Vps41 remplace Vps8 (Fig. 1.11E) (Spang, 2016). Alors que CORVET permet la fusion d'endosomes et de vésicules portant Rab5 (Ungermann et Moeller, 2025), les endosomes tardifs (Rab7) se distinguent des lysosomes qui sont marqués de la petite GTPase Arl8b (*ADP-ribosylation factor-like 8b*) (Jongsma *et al.*, 2020; Khatter *et al.*, 2015). Celle-ci utilise un modèle d'activation similaire aux Rabs, avec des cycles GTP/GDP (Fig. 1.9). Cependant, elle ne possède pas les résidus conservés en C-terminal pour la prénylation et c'est plutôt une méthionine acétylée et une hélice amphipathique sur son N-terminal qui permet son ancrage à la membrane (Kendrick et Christensen, 2022). Le courant modèle, basé sur des données obtenues avec la levure (Brett *et al.*, 2008; Bröcker *et al.*, 2012), implique que Vps39 permet de lier Rab7 alors que Vps41 interagit avec Arl8b afin de fusionner les deux compartiments (Fig. 1.11E) (Jongsma *et al.*, 2020; Khatter *et al.*, 2015). Cependant, de nouvelles études suggèrent que Rab7 ne lie que très peu (ou pas) le complexe HOPS (Gillingham *et al.*, 2014; Lőrincz *et al.*, 2017; Schleinitz *et al.*, 2023). Ce serait plutôt Rab2 qui interagirait avec Vps39 (Gillingham *et al.*, 2014; Lőrincz *et al.*, 2017), concordant avec le nombre grandissant d'études démontrant son importance dans la fusion endolysosomale (Fig. 1.11E) (Fujita *et al.*, 2017; Guo et Wang, 2010; Lund *et al.*, 2018; Schleinitz *et al.*, 2023). Cependant, il est incontestable que Rab7 est requis dans le mécanisme (Fujita *et al.*, 2017; Guo et Wang, 2010). Il est suggéré que la fonction de Rab7 serait plutôt au niveau du positionnement des endosomes (Schleinitz *et al.*, 2023), mais des études supplémentaires sont requises pour décortiquer les mécanismes régulés par Rab2 et Rab7.

1.4.3.3 La formation de l'autophagosome

Le terme autophagie provient des mots grecs « auto » et « phagy » qui veulent dire « soi » et « manger », respectivement (Yang et Klionsky, 2010). Ce mécanisme est stimulé lorsque la cellule manque de nutriments et permet la dégradation d'une partie du cytoplasme afin de recycler les constituants moléculaires (Feng *et al.*, 2014). Il existe trois principaux types, la macroautophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes et la microautophagie (Parzych et Klionsky, 2014). Ici, nous nous concentrerons sur la macroautophagie et, ci-après, le terme autophagie y fera référence. L'autophagie débute par la formation *de*

novo d'une vésicule à double membrane, l'autophagosome, dans laquelle les cargos sont séquestrés puis transportés vers les lysosomes (Melia *et al.*, 2020). La biogenèse débute par la nucléation et l'expansion d'une membrane en forme de coupe, le phagophore, qui donnera l'autophagosome avec la fermeture de la membrane (Nishimura et Tooze, 2020). Il est maintenant bien accepté que la source d'origine provient principalement de l'omégasome, un domaine spécialisé du RE qui a la forme de la lettre grecque oméga (Ω) et qui est enrichi de PI(3)P, un type de PI qui n'est généralement pas présent sur le RE (Nähse *et al.*, 2024). Le mécanisme moléculaire pour la formation de l'omégasome n'est toujours pas bien compris ainsi que la relation entre celui-ci et le phagophore, bien que certaines évidences suggèrent qu'ils sont des compartiments distincts (Norell *et al.*, 2024). La biogenèse de l'autophagosome nécessite l'activation et le recrutement de plus d'une vingtaine de protéines ATG (*autophagy-related*) (Zhang *et al.*, 2021c). La première étape est initiée par le complexe ULK qui phosphoryle plusieurs protéines lorsqu'il est activé (Fig. 1.12A) (Melia *et al.*, 2020; Parzych et Klionsky, 2014). Le complexe ULK est constitutivement assemblé, mais maintenu inactif par le complexe mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) en présence de nutriments (Fig. 1.12A) (Hosokawa *et al.*, 2009). En condition d'énergie basse, caractérisée par un haut ratio d'AMP/ATP, la kinase AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*) phosphoryle mTORC1 pour l'inhiber, en plus du complexe ULK pour l'activer (Fig. 1.12A) (Melia *et al.*, 2020; Panwar *et al.*, 2023). Par ailleurs, AMPK permet aussi de stimuler la formation du complexe I d'autophagie de Vps34 (PI3K-I) et d'inhiber celle du complexe II d'endocytose (section 1.4.3.2) (Fig. 1.12A) (Panwar *et al.*, 2023). Lors de cette étape de nucléation, le complexe I d'autophagie permet de produire le PI(3)P sur l'omégasome, ce qui stabilise le complexe ULK, permettant une rétroaction positive (Fig. 1.12A) (Melia *et al.*, 2020; Parzych et Klionsky, 2014). Le PI(3)P permet de recruter les effecteurs WIPI1 à 4 (*WD repeat domain PI-interacting protein*) associés au complexe ATG2/ATG9A (Fig. 1.12A-B) (Zhang *et al.*, 2021c). WIPI1 et WIPI2 permettent de recruter les deux machineries de conjugaison nécessaires pour l'étape d'élongation alors que WIPI3 et WIPI4 sont associés aux voies de régulation de la production de PI(3)P (Fig. 1.12A, C) (Melia *et al.*, 2020; Parzych et Klionsky, 2014). WIPI4 interagit aussi avec ATG2 pour promouvoir l'élongation du phagophore (Melia *et al.*, 2020). Par deux cascades enzymatiques ressemblant à l'ubiquitination (voir la Fig. 1.12C), la protéine LC3 est conjuguée au phosphatidyléthanolamine (PE) (Mizushima, 2020). De façon plus commune, on réfère à la protéine LC3-II lorsqu'elle est conjuguée au PE, et à LC3-I lorsqu'elle ne l'est pas (Mizushima, 2020). Cette conjugaison entraîne un changement du poids moléculaire apparent de la protéine par immunobuvardage, les niveaux d'expression des deux formes sont donc souvent utilisés pour étudier le flux autophagique (Yoshii et Mizushima, 2017). L'étape d'élongation nécessite les vésicules contenant l'ATG9, la seule protéine ATG à être transmembranaire (Fig. 1.12B). Ces vésicules semblent être recrutées par l'activation de ULK, AMPK, Vps34 et ATG2, bien que les mécanismes restent élusifs (Holzer *et al.*, 2024; Nishimura et Tooze, 2020;

Rubinsztein *et al.*, 2012). Toutefois, les vésicules ATG9 semblent être impliquées dans les premières étapes puisqu'elles permettent le recrutement de la kinase qui transforme le PI(3)P en PI(4)P, ce qui est important pour la translocation du complexe ULK au site de nucléation (Fig. 1.12B) (Judith *et al.*, 2019). Les vésicules ATG9 sont originaires du TGN et, en présence de nutriments, sont continuellement transportées entre le TGN et les endosomes par les complexes AP-1 et AP-4, bien que les raisons de ce transport continu ne sont pas comprises (discutés dans la section 1.4.4; Fig. 1.12B) (Millard et Tooze, 2025). En condition de jeûne, SNX18 (*sorting nexin 18*) et dynamine 2 (Dyn2) permettent la formation des vésicules ATG9 en provenance des endosomes positifs à Rab11 (Fig. 1.12B) (De Tito *et al.*, 2020). Il n'est pas clair si ces vésicules fusionnent afin de fournir de la membrane et/ou, avec une activité de scramblase, permettent d'incorporer des phospholipides dans celle-ci (Holzer *et al.*, 2024; Nähse *et al.*, 2024; Zhen et Stenmark, 2023). Pour terminer, le phagophore est fermé pour donner l'autophagosome par le complexe ESCRT, bien que le mécanisme de recrutement ne soit toujours pas connu (Fig. 1.12B) (Nähse *et al.*, 2024; Zhen et Stenmark, 2023). Les autophagosomes peuvent fusionner directement avec les lysosomes ou passer par la fusion avec un endosome tardif pour former un amphisome, avant que celui-ci ne fuse avec le lysosome (Fig. 1.12B). LC3-II, Rab2, Rab7 et Arl8b régulent cette fusion avec divers effecteurs (Lőrincz et Juhász, 2020).

Le mécanisme décrit ci-haut est un type d'autophagie non sélective puisqu'il permet de séquestrer une partie du cytoplasme sans cible précise. L'autophagie peut également être sélective où un cargo ciblé pour la dégradation est reconnu par un récepteur. Les divers types d'autophagie incluent sans se limiter à la lipophagie (lipides), la lysophagie (lysosomes), la mitophagie (mitochondrie) ou la xénophagie (corps étrangers; bactérie ou virus) (Gubas et Dikic, 2022). Surtout, l'initiation de ces voies est indépendante de mTORC1 et AMPK (Schmid *et al.*, 2024). La protéine p62 est le premier adaptateur d'autophagie sélective découverte chez les mammifères. Cette protéine est impliquée dans plusieurs voies de signalisation grâce à ces divers domaines. Pour l'autophagie sélective, il reconnaît les substrats ubiquitinés par son domaine associé à l'ubiquitine et les délivre à l'autophagosome grâce à son interaction avec LC3 (Liu *et al.*, 2016c). Par exemple, une perméabilisation de la membrane des lysosomes permet à quatre galectines (LGALS1, -3, -8 et -9) d'entrer dans la vésicule pour initier la lysophagie (Fig. 1.12E) (Hoyer *et al.*, 2022). LGALS3 se lie à l'ubiquitine ligase TRIM16, qui induit l'ubiquitination de protéines membranaires, reconnu par p62, alors que LGALS8 inhibe le complexe mTORC1 (Fig. 1.12E) (Hoyer *et al.*, 2022; Papadopoulos *et al.*, 2020). TRIM16 permet aussi le recrutement du complexe ULK (Fig. 1.12E) (Hoyer *et al.*, 2022). Des cellules déficientes en LGALS3/LGALS8 ont des niveaux d'ubiquitination lysosomal normaux alors que la déficience en LGALS9 diminue ceux-ci de 50 à 60%, potentiellement puisqu'il lie et régule la DUB USP9X (Fig. 1.12E) (Hoyer *et al.*, 2022). Cependant, la lysophagie est toujours un domaine de recherche actif où les contributions précises de chaque galectine sur les processus en aval restent majoritairement incomprises.

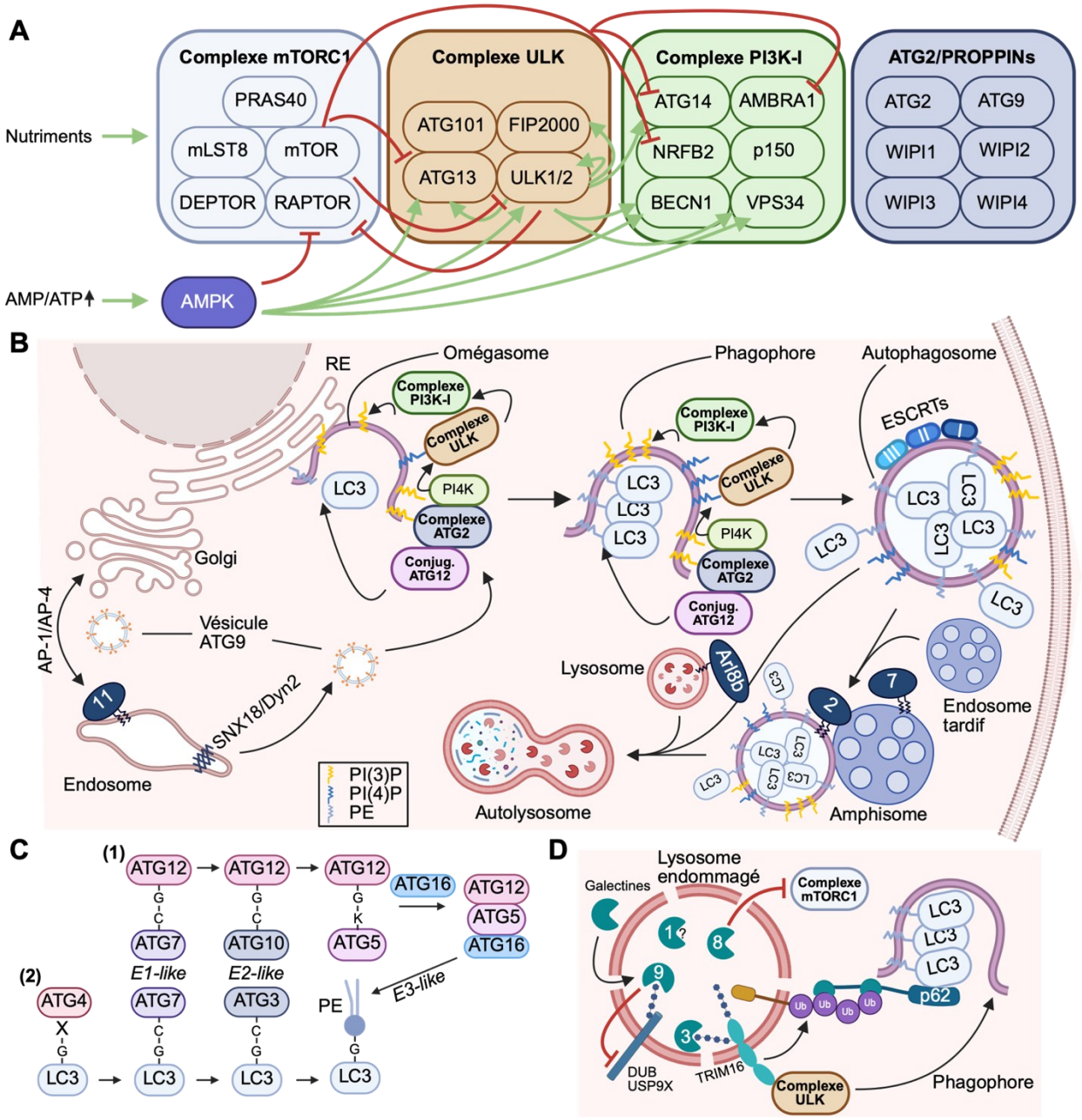


Figure 1.12: Les mécanismes induits lors d'un jeûne et l'exemple d'un type d'autophagie spécifique.

(**A**) Les composantes des complexes sont démontrées une fois pour alléger le panneau B. Les flèches vertes démontrent les voies d'activation et les flèches rouges, les voies d'inhibition. (**B**) La protéine ATG9 sur les vésicules scindées des endosomes par SNX18/Dyn2 fait partie du complexe ATG2 présenté en A. L'autophagie débute par l'omégasome situé sur une région du RE riche en PI(3)P, suivi de la formation du phagophore, la fermeture de l'autophagosome par la machinerie ESCRT et la fusion avec un endosome pour donner un amphisome ou directement avec un lysosome. (**C**) La conjugaison de LC3 se fait par deux cascades. Une première cascade permet de former le complexe ATG5/ATG12/ATG16 qui agit comme E3 pour la deuxième. La deuxième cascade débute par le clivage de LC3 par ATG4 pour exposer une glycine en C-terminal. (**D**) La lysophagie est induite par les galectines et régulée par p62. Créée avec BioRender.com.

1.4.3.4 Le positionnement des endosomes et des lysosomes

La mobilité et le positionnement du lysosome semblent être clés pour influencer sa fonction (Pu *et al.*, 2016). Il a été démontré que le pH plus alcalin des lysosomes périphériques est causé par une augmentation de la perte de proton et par une diminution de l'activité de la V-ATPase, ce qui mène à une diminution de l'activité protéolytique du lysosome (Johnson *et al.*, 2016). Du fait de ses fonctions dégradatives, les lysosomes sont clés pour le métabolisme cellulaire. En effet, les lysosomes agissent comme réservoir en conservant les nutriments obtenus par la protéolyse, concordant avec le fait que leur mobilité et positionnement soient grandement régulés par mTORC1 en réponse à la disponibilité de nutriments (Jerabkova-Roda *et al.*, 2024). En réponse à un jeûne, l'activité de mTORC1 est inhibée et il y a une augmentation du niveau de lysosomes périnucléaires, alors qu'à l'inverse, la présence de nutriments promeut les lysosomes périphériques (Korolchuk *et al.*, 2011). Ce mécanisme est particulièrement critique pour l'autophagie, puisque les autophagosomes formés en périphérie se déplacent sur les MTs vers le noyau, et fusionnent avec les lysosomes périnucléaires (Pu *et al.*, 2016). Une perturbation d'une voie augmentant le niveau de lysosomes périphériques diminue la probabilité de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Pu *et al.*, 2016).

Les voies entourant le positionnement des endosomes tardifs et des lysosomes sont complexes et loin d'être élucidées, bien que plusieurs études démontrent l'importance des GTPases Arl8b et Rab7 (Cabukusta et Neefjes, 2018). Arl8b permet le transport antérograde des lysosomes par deux types de KIF (KIF5 ou KIF1). Spécifiquement, le complexe BORC (*BLOC-one-related-complex*), composé de huit sous-unités, recrute Arl8b, qui peut soit lier directement KIF1 ou soit recruter son effecteur SKIP, afin de lier KIF5 (Fig. 1.13A) (Bonifacino et Neefjes, 2017). Ceci permet à Arl8b de promouvoir la localisation périphérique des lysosomes (Pu *et al.*, 2015). Par ailleurs, une surexpression de Arl8b est liée à une augmentation des lysosomes en périphérie alors qu'une répression regroupe les lysosomes autour du noyau (Keren-Kaplan et Bonifacino, 2021). Alors que Arl8b a longtemps été lié au transport antérograde, de plus récentes études lui confèrent également un rôle dans le transport rétrograde (Kendrick et Christensen, 2022). En effet, les protéines RUFY3 et RUFY4 peuvent interagir avec Arl8b afin de recruter l'adaptateur JIP4, qui forme un complexe avec dynéine-dynactine (Fig. 1.13A) (Keren-Kaplan *et al.*, 2022; Kumar *et al.*, 2022). Ensemble, ce complexe est nécessaire pour le repositionnement des lysosomes périnucléaires à la suite d'un jeûne (Kendrick et Christensen, 2022). Bien que les évidences semblent pointer vers une régulation basée sur le contexte cellulaire, les facteurs dictant la liaison de Arl8b à un certain effecteur ne sont pas encore bien compris (Kendrick et Christensen, 2022). Rab7 peut également contribuer au transport antérograde et rétrograde avec ses effecteurs FYCO1 et RILP pour permettre l'interaction avec KIF5 et dynéine-dynactine, respectivement (Fig. 1.13A) (Ballabio et Bonifacino, 2020; Bonifacino et Neefjes, 2017). De façon intéressante, malgré qu'ils interagissent tous les deux avec KIF5 et dynéine et ont des fonctions et

distributions qui se chevauchent, Arl8b et Rab7 semblent pouvoir agir ensemble ou à l'opposé, selon le contexte (Jongsma *et al.*, 2020; Marwaha *et al.*, 2017). Tout d'abord, Rab7 favorise le regroupement périnucléaire des endolysosomes, contrairement à Arl8b qui les positionne en périphérie (Fig. 1.13B) (Bonifacino et Neefjes, 2017). Cependant, une étude a démontré que PLEKHM1, un effecteur déjà identifié de Rab7, est également un effecteur de Arl8b (Fig. 1.13B) (Marwaha *et al.*, 2017). PLEKHM1 lie les deux GTPases simultanément, ce qui rapproche et promeut la fusion des endosomes tardifs et des lysosomes (Fig. 1.13B) (Marwaha *et al.*, 2017). De plus, PLEKHM1 compétitionne avec SKIP pour lier Arl8b, ce qui promeut le positionnement périnucléaire des endolysosomes, et suggère une voie commune entre Rab7 et Arl8b (Fig. 1.13B) (Marwaha *et al.*, 2017). Une étude plus récente a confirmé le fait qu'il existe une population qui coexprime Rab7 et Arl8b, alors que les endolysosomes périnucléaires et périphériques expriment Rab7/RILP et Arl8b/SKIP, respectivement (Fig. 1.13C) (Jongsma *et al.*, 2020). Lorsque SKIP est lié à Arl8b et au complexe HOPS, il permet de recruter TBC1D15, une GAP pour Rab7 (Fig. 1.13C) (Jongsma *et al.*, 2020). Cette dernière est responsable de l'inactivation et le retrait de Rab7 afin de conserver un compartiment arborant seulement Arl8b (Fig. 1.13C) (Jongsma *et al.*, 2020). Les mécanismes de régulation afin de choisir quelle route emprunter restent cependant à être déterminés.

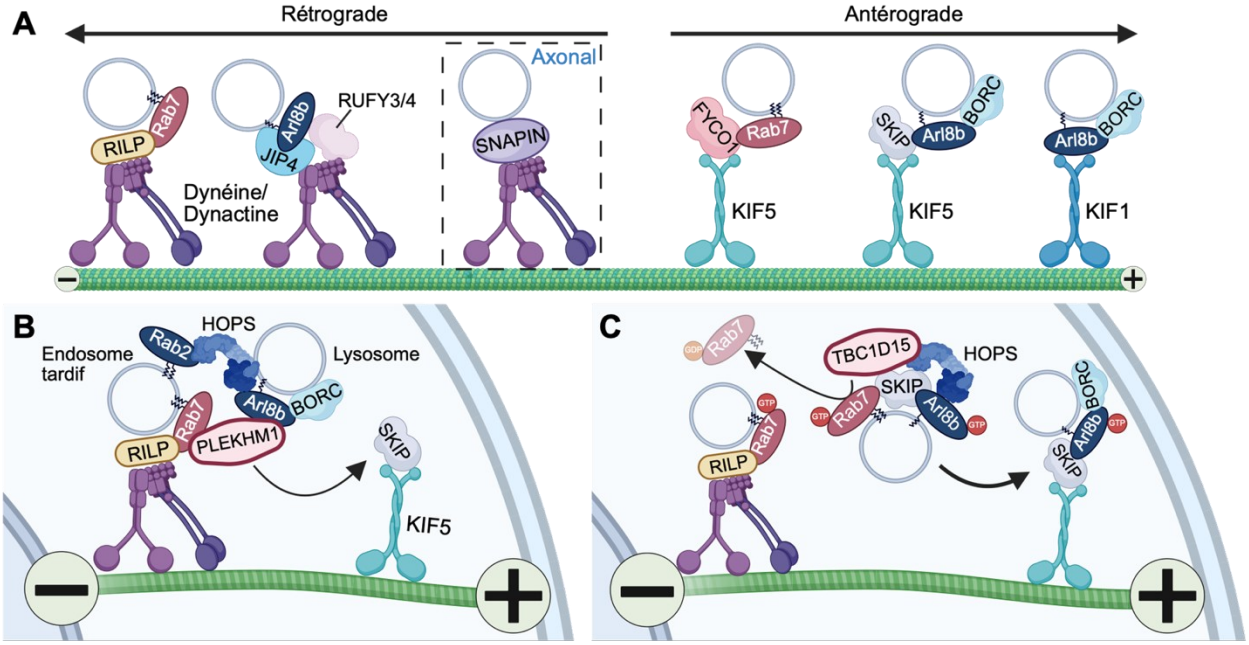


Figure 1.13: Les petites GTPases Rab7 et Arl8b régulent le transport des endolysosomes.

(**A**) Les différents effecteurs de Rab7 et Arl8b pour les transports antérograde et rétrograde. SNAPIN régule le transport rétrograde des endosomes tardifs dans l'axone. (**B**) L'effecteur de Rab7, PLEKHM1, compétitionne avec SKIP pour la liaison avec Arl8b et favorise la fusion près du noyau. (**C**) Lorsque SKIP est lié à Arl8b, il recrute la GAP de Rab7, TBC1D15, pour le déloger et favoriser le positionnement des lysosomes périphériques par Arl8b. Schéma créé avec BioRender.com.

Les lysosomes sont positionnés de façon similaire dans les neurones, où les plus dégradatifs sont près du soma ou dans les dendrites proximaux. Spatialement, les endosomes précoces sont largement distribués, mais peu mobiles. Lorsque la maturation et conversion de Rab5 à Rab7 a lieu, les endosomes tardifs deviennent mobiles et sont transportés vers le soma afin de fusionner avec les lysosomes immobiles (Yap et Winckler, 2022). Cependant, le transport est d'autant plus complexifié par la polarité et la distance à parcourir. Un défi particulier dans les dendrites, contrairement à l'axone, est qu'environ 55% des pôles positifs des MTs pointent vers la périphérie et 45% vers le soma (Yap et Winckler, 2022). Il a d'ailleurs été démontré que les compartiments positifs à Rab7 bougent progressivement vers le soma dans les axones, alors qu'ils sont mobiles dans les deux sens, où plusieurs pauses et changements de direction peuvent être observés, dans les dendrites (Yap et Winckler, 2022). Dans le contexte, le transport dans les dendrites est encore peu compris, bien que des études ont démontré que l'interaction entre Rab7 et dynéine soit nécessaire, alors qu'Arl8b serait impliqué seulement dans le transport axonal (Farías *et al.*, 2017; Koppers et Farías, 2021; Yap *et al.*, 2022). Dans l'axone, les mécanismes présentés dans le paragraphe précédent ont également été démontrés pour être importants (Roney *et al.*, 2022). Cependant, un mécanisme supplémentaire est également connu. En effet, la protéine SNAPIN (*SNARE-associated protein*) interagit avec dynéine pour transporter les endosomes tardifs vers le corps cellulaire (Fig. 1.13A) (Cai *et al.*, 2010). Une répression de SNAPIN entraîne l'accumulation d'endosomes tardifs dans l'axone et de lysosomes immatures dans le soma (Cai *et al.*, 2010). De façon intéressante, SNAPIN est l'une des huit sous-unités composant le complexe BORC, qui est impliqué dans le transport antérograde (Farías *et al.*, 2017). Une étude récente a démontré que la phosphorylation sur la thréonine 14 de SNAPIN est critique pour le transport rétrograde, mais n'a aucun effet sur le transport antérograde (Lee *et al.*, 2022). Bien qu'il ne soit toujours pas connu comment SNAPIN régule les deux types de transport, il est possible que des PTMs soient importantes pour dicter de sa spécificité. Par ailleurs, SNAPIN a d'abord été décrit pour être impliqué dans la transmission synaptique en interagissant avec SNAP-25 pour faciliter son association à synaptotagmine (Revoir Fig. 1.8) (Ilardi *et al.*, 1999). Des études ont rapporté qu'une phosphorylation de SNAPIN sur la sérine 50 augmentait l'interaction de SNAP-25/synaptotagmine alors que la phosphorylation du site thréonine 117 diminuait cette interaction (Thakur *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2013). Plus d'études seront nécessaires pour mieux comprendre comment SNAPIN régule les différents mécanismes cellulaires dans lesquels il est impliqué.

1.4.4 Les complexes de protéines adaptatrices

Jusqu'à présent, nous nous sommes surtout concentrés sur le routage intracellulaire des vésicules en tant que compartiment. Le transport d'une protéine spécifique, qu'elle soit synthétisée ou internalisée, est effectué par ces vésicules et doit donc s'y retrouver. Dans le contexte d'une protéine, on définit le transport antérograde et rétrograde par rapport au point de départ et de fin de celle-ci. Spécifiquement, comme les

protéines sont généralement transportées après leur synthèse, le transport est considéré comme étant antérograde lorsqu'il s'éloigne du noyau (RE -> Golgi -> système endolysosomal/MP) (Fig. 1.14A) (Lord et Roberts, 1998). Le transport rétrograde fait référence au chemin inverse où les protéines commencent dans les compartiments près de la MP, puis se dirigent vers le Golgi et/ou le RE (Fig. 1.14A) (Lord et Roberts, 1998). Afin d'être transportées, les protéines sont généralement emballées dans des vésicules recouvertes, aussi appelées vésicules à manteau (Alberts *et al.*, 2002). Les manteaux sont formés par des complexes de protéines cytosoliques permettant la formation de la vésicule et la reconnaissance spécifique du cargo (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019). Un cargo transmembranaire est reconnu par sa face cytosolique, alors que les protéines solubles sont transportées grâce à des récepteurs de tri lysosomal (sera présenté à la section 1.4.5) (Park et Guo, 2014; Robinson *et al.*, 2024). Il existe divers manteaux selon la localisation intracellulaire. COPI et COPII (*Coat Protein Complex*) sont responsables du transport au niveau du RE et du Golgi. Plus spécifiquement, les vésicules COPII recouvrent et concentrent les protéines aux sites de sortie du RE afin d'effectuer le transport antérograde vers le Golgi (Fig. 1.14A) (Szul et Sztul, 2011). Les vésicules COPI permettent le transport antérograde et rétrograde du RE jusqu'au *trans*-Golgi, passant par les compartiments *cis*- et *medial*-Golgi (Fig. 1.14A) (Szul et Sztul, 2011). Ce sont les vésicules à manteau à base d'un des cinq complexes de protéines adaptatrices (AP-1 à AP-5) qui sont responsables du transport dans les compartiments post-Golgi (Fig. 1.14A) (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019). Initialement et pendant plusieurs années, le transport entre les compartiments du système endolysosomal était considéré comme étant régulé par les vésicules recouvertes de clathrine (CCVs) (Robinson, 2015). Comme il s'agit du premier manteau identifié, les complexes AP-1 et AP-2 étaient alors considérés comme des composants des CCVs (Pearse et Robinson, 1984; Pearse, 1975). AP-1 et AP-2 forment une couche interne alors que la clathrine est composée de trois chaînes lourdes et de trois chaînes légères qui s'assemblent pour former un triskèle (Fig. 1.14B) (Robinson, 2015). Les triskèles interagissent ensemble et forment un réseau d'hexagones et de pentagones, qui recouvrent la vésicule (Fig. 1.14B) (Robinson, 2015). Quelques années plus tard, les sous-unités composant les vésicules COPI ont été caractérisées. Le complexe est divisé en deux sous-complexes : le COPI-B et le COPI-F (Fig. 1.14C) (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019). De façon intéressante, le COPI-F est lointainement apparenté à AP-1 et AP-2 et s'assemble de façon similaire (Fig. 1.14B-D) (Duden *et al.*, 1991). Par la suite, les complexes AP-3 et AP-4 sont identifiés et semblent être indépendants de la clathrine (Dell'Angelica *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 1997). Cependant, des études suivantes ont déterminé qu'environ la moitié des vésicules AP-3 contiennent également la clathrine (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019). Finalement, AP-5 est décrit pour la première fois en 2011, puisqu'il partage moins de similarité de séquence (Hirst *et al.*, 2011). Ce dernier est également indépendant de la clathrine (Sanger *et al.*, 2019). Dans le contexte, la clathrine est maintenant considérée comme une protéine d'échafaudage pour AP-1, AP-2 et, dans certains cas, AP-3 (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019).

Les APs sont des complexes hétérotétramériques composés de deux grosses (γ/α/δ/ε/ζ et β1-5 pour AP-1 à AP-5, respectivement), d'une moyenne (μ1-5) et d'une petite sous-unité (σ1-5) (Fig. 1.14C) (Park et Guo, 2014). Les domaines en N-terminal des deux grosses sous-unités avec les sous-unités μ et σ forment un noyau compact (Sanger *et al.*, 2019). À l'exception de ζ pour AP-5 qui n'en a pas, les domaines en C-terminal des grosses sous-unités forment des « appendices » (*appendage*), aussi appelés « oreilles » (*ear*), qui sont liées au noyau par une région flexible « charnière » (*hinge*) majoritairement non structurée (Fig. 1.14D) (Park et Guo, 2014; Sanger *et al.*, 2019). Les appendices sont généralement formés de deux sous-domaines, incluant une plateforme qui contient des hélices α et feuillets β et le sous-domaine « β-sandwich », à l'exception des sous-unités γ et β4 qui n'ont pas de sous-domaine plateforme (Fig. 1.14D) (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019; McMahon et Mills, 2004; Sanger *et al.*, 2019). Le noyau permet le recrutement des complexes AP à la membrane, ainsi que la reconnaissance des cargos. Les appendices et les régions charnières permettent quant à eux d'interagir avec les protéines accessoires (Traub et Bonifacino, 2013). Les complexes APs reconnaissent les cargos par deux motifs canoniques bien caractérisés. Ceux-ci sont le motif à base de tyrosine (Yxxϕ) et le motif dileucine ([D/E]xxxL[L/I]), où x est n'importe quel acide aminé et ϕ est un acide aminé hydrophobe volumineux. Plus spécifiquement, Yxxϕ se lie au domaine C-terminal des sous-unités μ (Canagarajah *et al.*, 2013). La chaîne latérale aromatique de la tyrosine peut interagir avec des résidus de tryptophane, tyrosine et arginine environnantes, et le groupement hydroxyle fait un pont hydrogène avec un résidu d'acide aspartique conservé. Le résidu hydrophobe se lie dans une poche hydrophobe à la jonction du sandwich de feuillets β (Canagarajah *et al.*, 2013). De façon intéressante, alors que μ1-3 sont bien conservés, la liaison avec μ4 se fait sur la face opposée comparativement aux autres complexes (Park et Guo, 2014). De plus, μ5 ne semble pas reconnaître ce motif puisqu'il ne possède pas les résidus conservés (Sanger *et al.*, 2019). En comparaison, le motif dileucine lie le noyau à l'interface de la sous-unité σ et γ/α/δ pour AP-1, -2 et -3, respectivement, alors que AP-4 et AP-5 ne semblent pas reconnaître ce motif (Canagarajah *et al.*, 2013). Les deux leucines insèrent leurs chaînes latérales dans des cavités hydrophobes sur la surface de la sous-unité σ. De son côté, le résidu acide en position -4 par rapport à la première leucine se lie à des régions basiques sur les sous-unités σ et γ/α/δ (Park et Guo, 2014). De manière générale, le motif dileucine d'une protéine peut interagir avec plusieurs complexes, mais certaines spécificités existent et semblent être dictées par les acides aminés « x » (Bonifacino et Traub, 2003; Diril *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016). AP-1 et AP-2 ont également été rapportés pour lier des régions acides ou des motifs non canoniques (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019; Guo *et al.*, 2013; Navarro Negredo *et al.*, 2017). La structure de base est bien conservée entre les complexes, mais seulement 20 à 40% d'identité de séquence est partagée par AP-1 à AP-4 alors que AP-5 partage moins de 10% avec les autres complexes (Hirst *et al.*, 2011). Par ailleurs, des isoformes existent pour certaines des sous-unités des complexes AP-1 à AP-3,

permettant une régulation et des fonctions spécifiques supplémentaires, parfois au niveau tissulaire (Zhang *et al.*, 2024). Les différences de séquences expliquent comment chaque complexe a une fonction et une localisation cellulaire différente (Sanger *et al.*, 2019). AP-1 permet le transport bidirectionnel entre le TGN et les endosomes, AP-2 régule l'endocytose, et AP-3 permet plutôt le transport provenant du TGN et/ou des endosomes tubulaires vers les endosomes tardifs, les lysosomes et les organites liés aux lysosomes (Fig. 1.14A) (Sanger *et al.*, 2019). AP-4 est impliqué dans le transport des vésicules ATG9, et AP-5 permet le transport rétrograde des endosomes tardifs vers le Golgi (Fig. 1.14A) (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019; Sanger *et al.*, 2019). De plus, ils ont des fonctions particulières dans les neurones (Fig. 1.14E). AP-1/AP-4 et AP-3 permettent le transport polarisé des protéines dendritiques et axonales, respectivement (Fig. 1.14G) (Zhang *et al.*, 2024). AP-3 est également impliqué dans la biogenèse des SVs alors que AP-2 permet leur recyclage, en plus de réguler l'endocytose des AMPARs et NMDARs et la maturation du SIA par l'accumulation de récepteurs lors du développement (Fig. 1.14F-J) (Zhang *et al.*, 2024). Étant un domaine de recherche actif, certains rôles ont plus récemment été attribués à AP-1, AP-2 et AP-3 et ne sont toujours pas bien décrits, mais ceux-ci sont présents sur la Fig. 1.14 et seront discutés dans les prochaines sections.

1.4.4.1 Le complexe AP-1

Le complexe AP-1 est régulé de manière allostérique, c'est-à-dire qu'il existe sous deux états distincts : ouvert et fermé (Canagarajah *et al.*, 2013). En état fermé, les sites de liaison des motifs dileucine et tyrosine ne sont pas accessibles (Park et Guo, 2014). AP-1 a un site permettant la liaison à PI(4)P qui est enrichi au Golgi et aux endosomes, consistent avec la localisation de AP-1 (Ren *et al.*, 2013). Cela dit, PI(4)P seul n'est pas suffisant pour recruter AP-1, puisqu'il a une faible affinité dans son état fermé (Hooy *et al.*, 2022; Ren *et al.*, 2013). La petite GTPase Arf1 (Facteur d'ADP-ribosylation), qui a une séquence d'adressage au Golgi, utilise le même modèle d'activation que les Rabs au niveau des cycles GTP/GDP (Fig. 1.9) (Donaldson et Jackson, 2011). En revanche, en comparaison avec la prénylation du C-terminal des Rabs, le N-terminal de Arf1 est modifié par une myristoylation, ajoutant un acide gras à 14 carbones (Wright *et al.*, 2010). Celui-ci s'insère dans la membrane lorsqu'un changement de conformation dans les régions *switch* I/II de Arf1 est induit par la liaison au GTP (Donaldson et Jackson, 2011). L'activation de Arf1 à la membrane permet de recruter et d'activer AP-1 (Sauvageau *et al.*, 2017). Spécifiquement, le principal site d'interaction implique le N-terminal de la sous-unité β1 et les régions *switch* I/II (Ren *et al.*, 2013). Le deuxième site d'interaction important se situe entre le N-terminal de la sous-unité γ et entre les régions *switch* I/II (Sauvageau *et al.*, 2017). Le troisième site de liaison implique la face arrière de Arf1, à l'opposé des régions *switch* I/II, et la sous-unité γ (Ren *et al.*, 2013; Sauvageau *et al.*, 2017). Ce site n'est pas nécessaire pour le recrutement et l'association entre Arf1 et AP-1, mais est important pour le changement de conformation permettant à AP-1 de passer à l'état ouvert (Ren *et al.*, 2013; Sauvageau *et al.*, 2017). De

façon importante, les régions *switch* I/II ne peuvent pas simultanément lier les sous-unités β1 et γ. En effet, la structure cristalline révèle un dimère où 2:2 Arf1:AP-1 s'assemblent, bien que ce modèle reste incompatible pour l'interaction γ/*switch* I/II (Ren *et al.*, 2013). Il a donc été proposé que AP-1 est recruté en tant que monomère à la membrane et les interactions entre β1/*switch* I/II et γ/face arrière pivotent les domaines de AP-1 afin de l'ouvrir (Ren *et al.*, 2013). Cette hypothèse est supportée par un variant de la face arrière de Arf1 qui altère l'activation allostérique et qui diminue la dimérisation (Sauvageau *et al.*, 2017). AP-1 peut également former des oligomères, qui sont stabilisés par la présence d'un cargo (Meyer *et al.*, 2005). En effet, AP-1 régule l'activité de la GAP ArfGAP1 qui permet d'inactiver Arf1 et le désassemblage du complexe. Cependant, la stimulation de la GAP est moins efficace en présence d'un cargo (Meyer *et al.*, 2005). Par son importance dans le transport intracellulaire, les lentivirus HIV-1/-2 (*human immunodeficiency virus*) détournent les voies de AP-1 grâce aux protéines accessoires Nef (*Negative factor*) et Vpu (*viral protein U*). Ceci permet au virus de faciliter l'évasion immunitaire en utilisant AP-1 pour diminuer l'expression de surface en redirigeant les récepteurs MHC-I (*major histocompatibility complex I*) et BST2 (*bone marrow stromal antigen 2*) vers les lysosomes (Shen *et al.*, 2015). Ces deux protéines ont des motifs tyrosine ayant peu d'affinité pour la sous-unité μ1. Cependant, avec son motif dileucine, Nef lie AP-1 et forme un pont afin de regrouper et de former un complexe trimérique de AP-1/Arf1, en plus de stabiliser l'interaction des motifs tyrosine des cargos et μ1 (Hooy *et al.*, 2022; Morris *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2015). De plus, des dimères Arf1/AP-1 et des trimères Arf1/AP-1/Nef s'assemblent ensemble pour former des structures pentagonales et hexagonales, ressemblant à l'alignement et l'organisation de la clathrine (Hooy *et al.*, 2022; Shen *et al.*, 2015). Cet assemblage est grandement favorisé sur les membranes tubulaires où l'assemblage est indépendant de la clathrine (Hooy *et al.*, 2022). De façon intéressante, une répression de la clathrine peut également favoriser cet assemblage pour AP-1, même en l'absence de Nef (Hooy *et al.*, 2022). Cependant, il est proposé qu'il s'agit seulement d'une étape intermédiaire avant la formation des CCVs (Hooy *et al.*, 2022). Comme AP-3 et AP-4 sont également dépendent de Arf1 pour leur activation, mais indépendant de la clathrine pour leur fonction, il est possible de se questionner sur la possibilité que AP-1 le soit également dans certaines conditions. Par ailleurs, bien qu'il soit bien établi que AP-1 nécessite l'activation par Arf1, il pourrait exister des mécanismes indépendants. La bréfeldine A (BFA) inhibe les GEFs des Arfs, altérant la formation des vésicules AP-1 (Rampérez *et al.*, 2017). Cependant, la protéine membranaire γ-BAR retient AP-1 à la membrane malgré un traitement de BFA (Neubrand *et al.*, 2005). De plus, la sécrétion des endolysosomes dépendante de AP-1 n'est pas affectée par le traitement grâce aux partenaires d'interaction Gadkin/γ-BAR (Laulagnier *et al.*, 2011). Il est possible que ces partenaires maintiennent AP-1 à la membrane s'il est préalablement activé. Comme Arf1 est critique pour l'activation de AP-1, d'autres études seront nécessaires pour mieux comprendre les potentiels mécanismes indépendants.

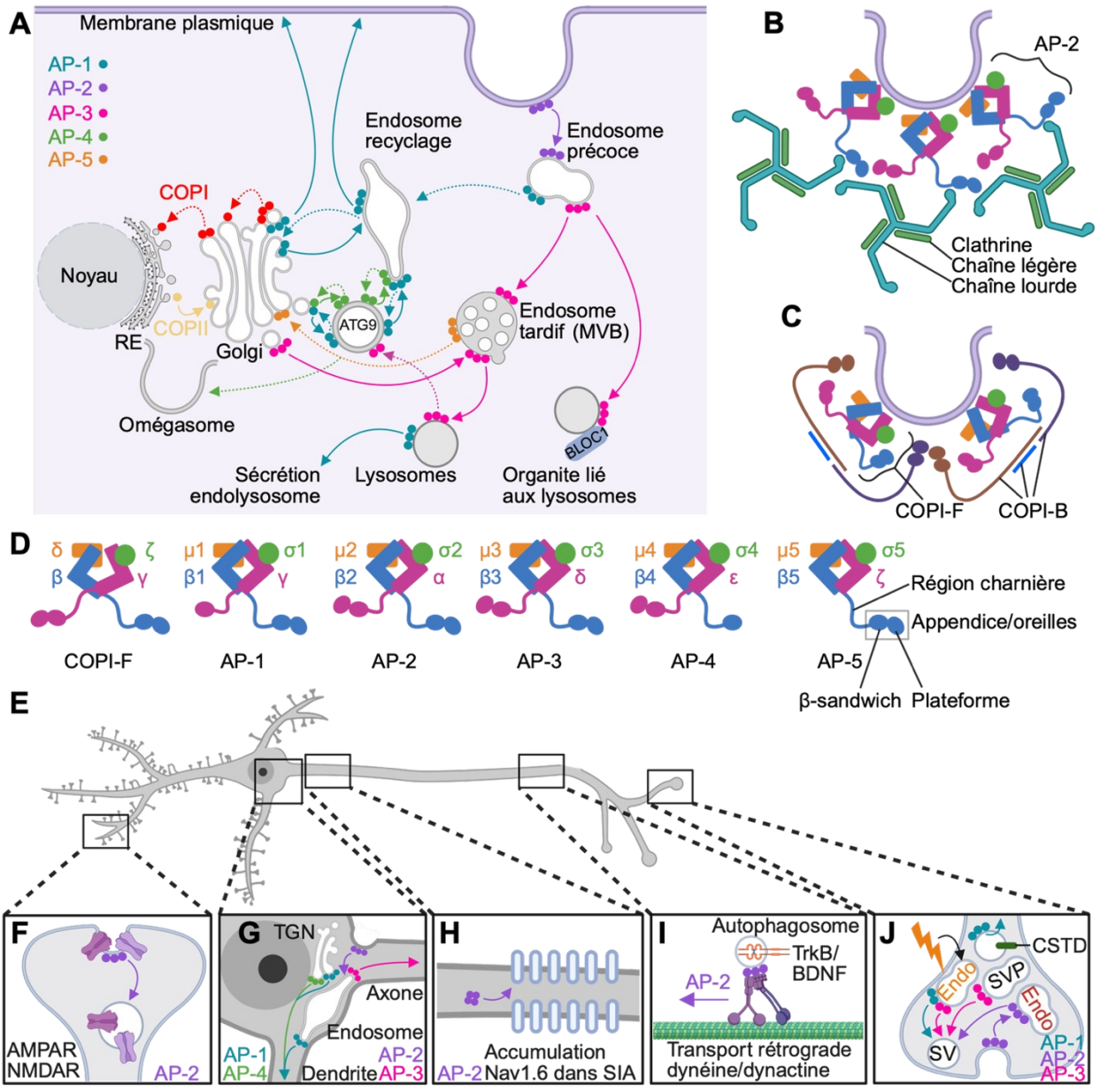


Figure 1.14: Le transport intracellulaire régulé par les complexes de protéines adaptatrices.

(**A**) Les voies de transport des complexes COPI (jaune), COPII (rouge), AP-1 (bleu), AP-2 (mauve), AP-3 (rose), AP-4 (vert) et AP-5 (orange). Les flèches pleines représentent le transport antérograde et les flèches pointillés, le rétrograde. (**B-C**) L'assemblage à la membrane des complexes (**B**) AP-2 recouvert de clathrine et (**C**) COPI. (**D**) L'homologie de structure des complexes COPI-F et APs. (**E-J**) Les fonctions spécifiques des APs en neurone incluent (**F**) l'endocytose des récepteurs postsynaptiques, (**G**) le transport du soma vers l'axone et les dendrites, (**H**) la maturation du SIA, (**I**) le transport d'autophagosome et (**J**) l'endocytose et la formation de vésicule synaptique dans le compartiment présynaptique. (**J**) Légende : CSTD, cargo somatodendritique; SVP, précurseur de vésicule synaptique; Endo (orange), Endosome créé par l'endocytose générée par l'activité neuronale (représentée par la flèche orange); Endo (rouge), Endosome créé par l'endocytose médiée par la clathrine. Les panneaux **B-D** sont adaptés de (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019). Schéma créé avec BioRender.com.

Le complexe AP-1 est associé au transport bidirectionnel entre le TGN et les endosomes ainsi qu'à la formation des autophagosomes et la sécrétion de vésicules endolysosomales, bien que ces deux dernières fonctions soient moins caractérisées (Fig. 1.14A) (De Tito *et al.*, 2020; Dell'Angelica et Bonifacino, 2019; Guo *et al.*, 2013; Laulagnier *et al.*, 2011). De plus, AP-1 est impliqué dans des types de transport polarisé, tels que le tri des protéines vers la surface basolatérale des cellules épithéliales ou les domaines somatodendritiques dans les neurones (Fig. 1.14G) (Bonifacino, 2014; Park et Guo, 2014). De façon intéressante, il est tout de même retrouvé dans les terminaux présynaptiques où il a initialement été suggéré de récupérer des protéines dendritiques mal distribuées (Fig. 1.14J) (Margeta *et al.*, 2009). Il est maintenant connu que AP-1 régule également la formation de SVs à partir d'endosomes créés par l'endocytose générée lors d'activité neuronale intense ou prolongée (Fig. 1.14J) (Asmerian *et al.*, 2024; Cheung et Cousin, 2012; Glyvuk *et al.*, 2010). Il existe des isoformes pour trois des sous-unités du complexe, soit deux pour γ (γ1/γ2), deux pour μ (μ1A/μ1B), et trois pour σ (σ1A/σ1B/σ1C), donnant une possibilité de 12 complexes différents. Cependant, une étude a démontré que γ2 et σ1C ne s'associent pas, éliminant deux possibles complexes (Mattera *et al.*, 2011). Alors que μ1B est spécifique pour les cellules épithéliales, les autres isoformes sont exprimées de façon ubiquitaire. Par ailleurs, l'isoforme μ1B a été démontré pour être responsable du transport polarisé dans ces cellules (Guo *et al.*, 2013). Il n'est pas bien compris comment les autres isoformes diffèrent, mais seule l'inactivation des isoformes γ1 et μ1A est létal, suggérant que γ2 ne peut pas compenser la perte du premier (Mattera *et al.*, 2011). Une étude récente démontre que la répression spécifique de γ2 empêche le transport rétrograde des MPRs, mais pas son export du Golgi (Tavares *et al.*, 2024). En comparaison, une répression de γ1 altère le transport antérograde de la protéine STING (*Stimulator of interferon genes protein*) du Golgi vers le système endolysosomal (Liu *et al.*, 2022b). D'ailleurs, il a été suggéré que γ2 pourrait être impliqué dans le transport rétrograde et γ1 dans le transport antérograde alors qu'une nouvelle étude suggère plutôt que AP-1 régule seulement le transport rétrograde, mais pas antérograde (Robinson *et al.*, 2024; Tavares *et al.*, 2024). Cette dernière étude est surprenante puisqu'elle contredit plusieurs résultats antérieurs. Cela dit, l'étude est effectuée exclusivement avec γ1 et suit seulement deux cargos (Robinson *et al.*, 2024). Il est possible que des différences existent entre les complexes formés par les isoformes ou pour d'autres cargos. De plus, il est possible que des variations se trouvent entre les modèles cellulaires et/ou tissus, puisqu'il est maintenant bien établi que AP-1 permet le transport du Golgi/endosomes vers les domaines somatodendritiques des neurones (Farías *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2024). Entre autres, il a été démontré pour réguler le transport de la TfR et des NMDARs (Farías *et al.*, 2012). Par ailleurs, il interagit avec des kinésines, supportant son implication dans le transport antérograde (Nakagawa *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2009). De plus en plus d'évidences semblent indiquer que les deux isoformes γ sont non redondants, bien que plusieurs questions restent ouvertes par rapport à

leur différence (Zizioli *et al.*, 2017). Les sous-unités σ1A et σ1B ont également été associées à des fonctions divergentes. Dans les neurones, σ1A forme un complexe stable avec l'isoforme spécifique du cerveau de ArfGAP1 (Candiello *et al.*, 2016). Celui-ci interagit avec Rabex-5 qui recrute et active Rab5 et favorise la maturation des endosomes (Candiello *et al.*, 2016). σ1B empêche la formation de ce complexe en interagissant directement avec Rabex-5, et ces endosomes sont destinés à devenir des SVs (Candiello *et al.*, 2016). Les auteurs suggèrent que la séquestration de ArfGAP1 dans le premier complexe inhibe son activité, comparativement au second complexe qui sera désassemblé plus rapidement et recrutera moins de Rab5, mais les mécanismes exacts restent à être élucidés (Candiello *et al.*, 2016).

1.4.4.2 Le complexe AP-2

Le complexe AP-2 est le membre de la famille le mieux caractérisé en régulant l'endocytose médiée par la clathrine (Fig. 1.14A) (Sigismund *et al.*, 2021). Il est indispensable au développement puisque les embryons meurent en moins de 3.5 jours post-coïtal pour la souris homozygote mutante de μ2 (Mitsunari *et al.*, 2005). Plusieurs types d'endocytose médiée par la clathrine existent et peuvent nécessiter divers effecteurs. Par exemple, l'internalisation du transporteur de glucose GLUT8 (*Glucose transporter 8*) se fait par la liaison de AP-2 directement sur son motif dileucine alors que la famille des RCPGs nécessite d'abord la liaison avec la protéine β-arrestine pour permettre le recrutement de AP-2 et de la clathrine (Schmidt *et al.*, 2006; Sigismund *et al.*, 2021). Dans les neurones, il permet l'endocytose des protéines des SVs (axone) et des récepteurs postsynaptiques AMPARs et NMDARs (Fig. 1.14F, J) (Zhang *et al.*, 2024). De plus, il permet l'accumulation des canaux sodiques voltage-dépendant (Nav) dans le SIA lors du développement (Fig. 1.14H) (Zhang *et al.*, 2024). Spécifiquement, la répression de AP-2 à un stade adulte n'a pas d'effet sur la fonction synaptique alors qu'une répression tôt dans le développement altère la maturation du SIA, la génération de potentiel d'action et le relargage de SV en empêchant le transport de Nav1.6 du corps cellulaire vers SIA (Fig. 1.14H) (Kyung *et al.*, 2017). Plus récemment, il a également été démontré que AP-2 contrôle le transport rétrograde des autophagosomes contenant BDNF/TrkB (*brain-derived neurotrophic factor/tropomysin receptor kinase B*) (Fig. 1.14I) (Kononenko *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2013). Comparativement à AP-1, AP-2 a seulement deux isoformes pour sa grosse sous-unité, soit αA et αC (Mattera *et al.*, 2011). De plus, αA est épissé alternativement, donnant une forme plus courte de 22 acides aminés (Scorilas *et al.*, 2002). La forme longue de αA est particulièrement enrichie dans le cerveau, alors que les deux autres isoformes sont exprimées de façon ubiquitaire (Ball *et al.*, 1995). Tout comme AP-1, AP-2 doit être activé de façon allostérique. Bien que certaines études suggèrent que la petite GTPase Arf6 pourrait interagir avec et réguler AP-2, il ne semble pas être requis pour l'activer (Krauss *et al.*, 2003; Montagnac *et al.*, 2011; Tanabe *et al.*, 2005). Contrairement à AP-1 dont l'interaction avec PI(4)P permet

de stabiliser le complexe, mais pas de l'activer, il semble que ce soit un PIP retrouvé sur la MP qui permet l'activation de AP-2. En effet, l'état fermé de AP-2 a seulement un site de liaison accessible sur sa sous-unité α, soit celui à $PI(4,5)P_2$ (Kadlecova *et al.*, 2017). Ce dernier a la charge de recruter et d'activer AP-2 qui, à l'état ouvert, présente des sites d'interaction pour les motifs tyrosine et dileucine, la clathrine, et deux autres sites pour $PI(4,5)P_2$ (Kadlecova *et al.*, 2017; Partlow *et al.*, 2022). L'un de ces sites se trouve sur la sous-unité β2 et agit de façon indépendante au site de la sous-unité α mais est nécessaire pour l'activation allostérique complète (Kadlecova *et al.*, 2017). Le troisième site est sur la sous-unité μ2 et n'est pas nécessaire pour l'initiation des CCVs, mais est critique pour la maturation de ceux-ci, suggérant une fonction en aval des premiers sites (Kadlecova *et al.*, 2017). Par ailleurs, en comparaison avec AP-1, une étude a observé que seulement ~20% des complexes AP-2 sont sous forme dimérique et cette conformation est possible seulement en présence d'un cargo avec un motif tyrosine (Kovtun *et al.*, 2020). Il est également peu probable que l'oligomérisation de AP-2 soit une étape critique pour générer la courbure de la membrane (Kovtun *et al.*, 2020). En effet, seulement deux molécules de AP-2 sont nécessaires pour initier la formation des CCVs (Cocucci *et al.*, 2012). Une fois que la membrane est suffisamment invaginée par la clathrine, la GTPase dynamine s'assemble en structure en forme d'anneaux autour du cou des CCVs, où l'hydrolyse de la GTP permettra de catalyser la fission membranaire et la libération des vésicules (Kadlecova *et al.*, 2017).

1.4.4.3 Le complexe AP-3

Le complexe AP-3 est beaucoup moins bien compris que AP-1 et AP-2. Il est bien accepté dans le milieu qu'il est responsable du transport des cargos vers les endosomes tardifs et les lysosomes chez les mammifères alors qu'il permet le transport du TGN vers la vacuole chez la levure (Fig. 1.14A) (Leih *et al.*, 2024). Cependant, il est toujours débattu à savoir s'il se localise au TGN chez les mammifères également. Plusieurs études suggèrent qu'il passe par le TGN (Chapuy *et al.*, 2008; Nishimura *et al.*, 2002; Rous *et al.*, 2002), alors que d'autres suggèrent qu'il débute sa voie sur les endosomes (Peden *et al.*, 2004; Theos *et al.*, 2005). Il est également possible que les deux voies ne soient pas mutuellement exclusives, tel que le suggère cette étude (Ihrke *et al.*, 2004). Les plus récentes études appuient également ce modèle (Fig. 1.14A) (Huang *et al.*, 2019; Schoppe *et al.*, 2021). Par ailleurs, bien qu'il possède un site d'interaction à la clathrine, certaines fonctions de AP-3 ont été démontrées pour être indépendantes, consistent avec une colocalisation faible par rapport à celle obtenue avec AP-1 (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019; Huang *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2021). De façon intéressante, une très récente étude a démontré que AP-3 pourrait même être impliqué dans le transport rétrograde des endolysosomes vers le TGN des vésicules ATG9, un rôle qui était jusqu'à présent associé à AP-4 (De Tito *et al.*, 2025). Cependant, une fonction similaire a préalablement été rapportée dans les neurones de *C. elegans*, puisque ceux-ci ne possèdent pas AP-4, où AP-3 transporte ATG-9 du TGN aux SVs (Yang *et al.*, 2022b). AP-3 possède deux isoformes pour trois de ses sous-unités, soit

β3A et β3B, μ3A et μ3B, et σ3A et σ3B (Park et Guo, 2014). De façon intéressante, les sous-unités β3B et μ3B sont spécifiques aux neurones alors que les sous-unités β3A, μ3A et les deux σ3 sont ubiquitaires (Park et Guo, 2014). Il y a donc deux complexes définis, le complexe ubiquitaire (AP-3A, composé de δ, β3A, μ3A et σ3A ou B) et le complexe neuronal (AP-3B, composé de δ, β3B, μ3B et σ3A ou B) qui se partagent la grosse sous-unité δ (Park et Guo, 2014). Les différences entre les isoformes σ ne sont pas connues. Il est proposé que le complexe AP-3A est principalement responsable du tri des cargos vers les compartiments lysosomaux, alors que AP-3B est impliqué dans le ciblage des cargos vers les SVs (Newell-Litwa *et al.*, 2009). En effet, AP-3B est responsable du transport de VGAT (*vesicular GABA transporter*), une protéine présynaptique qui permet le recyclage du GABA dans les SVs (Nakatsu *et al.*, 2004). Les deux complexes sont en compétition pour le ciblage de VGAT, puisque la répression de AP-3A entraîne une augmentation des taux de VGAT dans les SVs, alors que la répression de AP-3B les diminue (Newell-Litwa *et al.*, 2009). Notamment, des souris knock-out du complexe AP-3B présentent des crises d'épilepsie spontanée puisque le transport de VGAT dans les SVs est réduit, ce qui diminue le relargage de GABA dans la fente synaptique (Nakatsu *et al.*, 2004). AP-3 est également bien connu pour interagir avec le complexe BLOC-1 (*biogenesis of lysosome-related organelles complex 1*) pour faciliter le transport de cargos importants pour la biogenèse et la maturation des mélanosomes (Fig. 1.14A) (Di Pietro *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014). Curieusement, la répression de AP-3 affecte la composition des SVs différemment selon la région du cerveau et des souris knock-out du complexe BLOC-1 ont démontré un résultat similaire dans le gyrus denté seulement, une sous-région de l'hippocampe, où la taille est augmentée (Newell-Litwa *et al.*, 2010). Cette étude suggère que l'interaction BLOC-1/AP-3 n'est pas exclusive à la biogenèse des organites liés aux lysosomes.

Puisque AP-3 se retrouve sur les mêmes compartiments que AP-1, des mécanismes de régulation doivent exister afin d'assurer la spécificité. De récentes analyses structurales viennent nous éclairer sur ceux-ci, bien qu'ils restent loin d'être élucidés. Tout d'abord, une étude effectuée avec le complexe chez la levure démontre que AP-3 nécessite la combinaison d'un cargo, de PI(4)P et de Arf1 pour le recrutement à la membrane (Schoppe *et al.*, 2021). Contrairement à AP-1 et AP-2 qui sont recrutés avant d'être activés, AP-3 est déjà dans un état ouvert à son recrutement et possède une structure étonnamment flexible (Schoppe *et al.*, 2021). Par ailleurs, les auteurs suggèrent que le cargo est le principal responsable pour le recrutement alors que la liaison de Arf1 aurait lieu plus tard (Schoppe *et al.*, 2021). Plus récemment, une étude a confirmé la conformation ouverte et flexible à un état basal pour le complexe AP-3 humain. En revanche, le recrutement est effectué par Arf1 grâce à un site d'interaction sur la sous-unité δ, qui contraste avec la sous-unité β1 pour AP-1 (Begley *et al.*, 2024). Par la suite, l'interaction entre AP-3 et le cargo vient rigidifier la conformation de AP-3, ce qui permet à la sous-unité β3 de recruter une seconde molécule de Arf1 (Begley *et al.*, 2024). Cette interaction vient solidifier et fermer (*locked*) le complexe, en plus de fournir une interface

pour la dimérisation du complexe (Begley *et al.*, 2024). Ils ont d'ailleurs observé que la sous-unité β3 était empilé sur le site de liaison du motif dileucine lorsque le cargo à motif tyrosine était présent (Begley *et al.*, 2024). Les auteurs n'ont pas pu conclure si les deux sites se font compétition ou si la structure obtenue était un état partiellement activé, où l'activation complète impliquerait l'éjection de β3 par la présence d'un motif dileucine (Begley *et al.*, 2024). De plus, l'importance du PIP n'a pas été déterminée pour le complexe humain. Il est vrai que le PI(4)P joue un rôle dans le complexe de la levure (Schoppe *et al.*, 2021), mais la localisation de PI(4)P au Golgi concorde bien avec la fonction de AP-3 pour le transport du TGN vers la vacuole, contrairement à la localisation/fonction humaine toujours débattue. Cependant, la kinase PI4KIIα (*phosphatidylinositol 4-kinase type IIα*), permettant la formation de PI(4)P, a précédemment été démontré pour être un cargo transporté par AP-3 dans les cellules humaines. Par ailleurs, son activité kinase permettait également le recrutement de AP-3 à la membrane, suggérant son implication dans le complexe humain (Craige *et al.*, 2008). Ces différences au niveau de l'activation entre AP-1 et AP-3 pourraient expliquer la spécificité de chacun malgré le recrutement sur le même compartiment. De plus, une étude utilisant la microscopie à super-résolution a démontré que les deux complexes sont situés sur des microdomaines distincts d'un même compartiment (Huang *et al.*, 2019). Finalement, la spécificité du cargo pourrait également être clé. En effet, chez *C. elegans*, le motif dileucine de la protéine axonale SER-1 se lie à AP-3 alors que le récepteur postsynaptique CAM-1 possède deux motifs dileucine, lui permettant de lier AP-1 (Li *et al.*, 2016). Des chimères où les motifs des protéines ont été substitués (SER-1 avec un des motifs dileucine de CAM-1; CAM-1 avec le motif de SER-1) modifiaient leur ciblage respectif vers les dendrites et l'axone (Li *et al.*, 2016). Une étude faite *in vitro* avait d'ailleurs démontré que les protéines ayant une affinité de liaison préférentielle pour AP-3 présentent généralement une proline en position -1 et un résidu chargé positivement (K, R, H) en position -3 par rapport à la première leucine du motif (Rodionov *et al.*, 2002).

1.4.5 Les récepteurs de tri lysosomal

Afin d'atteindre les lysosomes, la majorité des hydrolases lysosomales acquièrent, dans le TGN, des résidus M6P leur permettant d'être reconnues par les MPRs (Park et Guo, 2014). Il existe deux types de MPRs, tous les deux membranaires, soit le cation-dépendant MPR (CD-MPR), ayant un poids moléculaire de 46 kDa, et le cation-indépendant MPR (CI-MPR) avec un poids moléculaire d'environ 300 kDa (Meraş *et al.*, 2022). De façon intéressante, les récepteurs ne sont pas retrouvés dans les lysosomes. En effet, la liaison entre le ligand et le récepteur est optimale à pH ~ 6.5 et se dissocie grâce à l'acidité des endosomes tardifs (Kim *et al.*, 2009). Les enzymes solubles sont dirigées vers les lysosomes alors que les MPRs sont recyclés par un transport rétrograde vers le TGN pour un nouveau cycle ou vers la MP (Olson *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2024). À la MP, seul le CI-MPR est capable d'effectuer l'endocytose de ligands (Braulke *et al.*, 2024). Au niveau de la structure, le CD-MPR forme des dimères où chaque récepteur possède un site de liaison au

M6P. En comparaison, le CI-MPR est monomérique et possède trois sites (Kim *et al.*, 2009). C'est d'ailleurs l'un de ces sites qui a une affinité optimale à un pH plus élevé (~7) qui lui permet d'internaliser des ligands se retrouvant à la MP, contrairement au CD-MPR où les deux sites sont en état fermé à pH > 6.5 (Dahms *et al.*, 2008). Ces sites sont situés à l'extrémité N-terminale de la protéine, alors que plusieurs motifs de tri sont retrouvés dans la queue C-terminale. Ces différences permettent de réguler les protéines adaptatrices et les voies de routage. Plus spécifiquement, un motif dileucine permet le transport entre les endosomes et le TGN par AP-1 alors qu'un motif tyrosine est reconnu par AP-2 lorsque la protéine est à la MP (Braulke *et al.*, 2024). Aucun des deux types ne peut complètement compenser la perte de l'autre, signifiant qu'ils ont des rôles non redondants. Les enzymes sont divisées en trois sous-groupes selon leur préférence où le premier groupe interagit préférentiellement avec CD-MPR, le second avec CI-MPR et le dernier interagit de façon égale entre les deux types (Kim et Dahms, 2001). Il existe aussi des voies de transport indépendantes des MPRs qui ont été identifiées grâce à l'analyse de cellules déficientes en GNPT, l'enzyme permettant la phosphorylation des résidus de Man. Spécifiquement, les récepteurs sortiline, LDLR (*low-density lipoprotein receptor*), LRP1 (*LDLR-related protein 1*), LRP2 (megalin) et LIMP-II (*lysosomal membrane protein 2*) permettent le transport de plusieurs cargos destinés vers les lysosomes. Ces récepteurs possèdent également des motifs de tri dans leur partie cytosolique pour l'interaction avec les protéines adaptatrices permettant la régulation des voies de routage bidirectionnelles (Braulke *et al.*, 2024).

1.4.6 La famille de E3 ubiquitine ligase PA-TM-RING

Contrairement aux glycans et à l'utilisation des MPRs chez les mammifères, l'adressage des protéases et des hydrolases vers les vacuoles des plantes est effectué avec de courtes séquences peptidiques, connues sous le nom de VSD (*vacuolar sorting determinant*) (Luo *et al.*, 2014). Les VSDs sont reconnus par deux types de récepteurs, soit les VSRs (*vacuolar sorting receptor*) et les RMRs (*receptor-homology-transmembrane-RING-H2*) (De Marcos Lousa *et al.*, 2012). Les deux sont des protéines transmembranaires de type I avec un domaine PA (*protease-associated*) en N-terminal (Tsao *et al.*, 2022). Le domaine PA est nécessaire pour les interactions avec les VSDs et le transport efficace des protéines (Luo *et al.*, 2014; Tsao *et al.*, 2022). Les VSRs possèdent trois répétitions de EGF, également dans le N-terminal, et un C-terminal cytosolique (Tsao *et al.*, 2022). Les RMRs ont un N-terminal plus court contenant seulement le domaine PA, mais possèdent un domaine RING cytosolique (De Marcos Lousa *et al.*, 2012). Les plantes ont deux types de vacuole : la vacuole lytique et la vacuole de stockage des protéines. Alors que les voies de transport des protéines solubles de la première, régulées par les VSRs, seraient comparables à celles des protéines humaines lysosomales, les voies du deuxième type impliquant les RMRs pourraient être exclusives aux plantes et sont toujours méconnues (Hwang, 2008; Park *et al.*, 2005). Cependant, il existe des orthologues mammifères (De Marcos Lousa *et al.*, 2012; Occhialini *et al.*, 2016), indiquant que certains mécanismes

et/ou fonctions pourraient être conservés (Wang *et al.*, 2011b). Chez les mammifères, la famille de protéine PA-TM-RING possède 9 à 12 membres, dont trois sont considérés atypiques, qui présentent les mêmes domaines que les RMRs et qui ont des fonctions et localisations cellulaires très diverses (Rusilowicz-Jones *et al.*, 2022). Par exemple, RNF133, RNF148 et ZNRF4 (RNF: *RING finger protein*; ZNRF: *Zinc and RING finger protein*) sont localisés dans le RE, RNF130 et ZNRF3 sont rapportés à la MP alors que RNF149 semble spécifique aux lysosomes (Nozawa *et al.*, 2022; Rusilowicz-Jones *et al.*, 2022; Siepe *et al.*, 2023). RNF128 et RNF43 ont une localisation plus vaste, couvrant le RE, la MP, les endosomes et les lysosomes (Rusilowicz-Jones *et al.*, 2022). De plus, ils ont des expressions tissulaires variées où RNF167 et RNF130 sont ubiquitaires alors que RNF133 et RNF148 sont exprimés seulement dans les testicules (Nozawa *et al.*, 2022; Siepe *et al.*, 2023). Contrairement aux RMRs, le domaine PA est très peu caractérisé chez les mammifères, à l'exception de son implication dans la localisation endosomale de RNF13 et RNF167, bien que le mécanisme ne soit pas connu (van Dijk *et al.*, 2014). Par ailleurs, cette fonction ne peut pas être universelle puisque certains membres ne sont pas localisés aux endosomes (Rusilowicz-Jones *et al.*, 2022).

1.4.6.1 RNF167

RNF167 est localisé à la MP, les endosomes et les lysosomes, et est exprimé dans tous les tissus (Ghilarducci *et al.*, 2021; Lussier *et al.*, 2012). Dans sa séquence protéique, il possède une séquence PEST et un motif dileucine, tous les deux en C-terminal (Yamada et Gorbsky, 2006). La séquence PEST est une région riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine qui agit comme signal de dégradation et qui est souvent retrouvée sur les protéines avec une courte demi-vie (Rechsteiner et Rogers, 1996; Yamada et Gorbsky, 2006). Alors qu'une inhibition du protéasome par le MG132 augmente l'abondance de RNF167 (Yamada et Gorbsky, 2006), la séquence PEST n'a pas été étudiée plus en détail, tout comme le motif dileucine. RNF167 est hautement glycosylé, avec deux sites de *N*-glycosylation identifié dans le domaine PA (Lussier *et al.*, 2012). Dans les dernières années, RNF167 a été identifié comme un régulateur de diverses fonctions cellulaires, à l'aide de plusieurs substrats. L'expression exogène de RNF167 cause un élargissement des endosomes précoces, une perte des endosomes de recyclage positifs à Rab11 et une altération du recyclage de la TfR (Fig. 1.15A) (Yamazaki *et al.*, 2013). Ce phénotype est causé par l'ubiquitination de Vamp3, une protéine SNARE impliquée dans la fusion des endosomes de recyclage avec la MP, suggérant que RNF167 régule le recyclage endosomal (Fig. 1.15A) (Yamazaki *et al.*, 2013). RNF167 est également impliqué dans le positionnement lysosomal en ciblant Arl8b vers la dégradation protéasomale (Fig. 1.15B) (Deshar *et al.*, 2016). La surexpression de RNF167 mène à un repositionnement périnucléaire des lysosomes, mais pas lorsque Arl8b K141R, un mutant ne pouvant pas être ubiquitiné, est présent (Deshar *et al.*, 2016). Ce repositionnement affecte également la fonction puisque la dégradation lysosomale de l'EGFR est retardée (Deshar *et al.*, 2016). Une autre étude a démontré que ce positionnement est dépendant de la dynéine, ce qui

est compatible avec un transport rétrograde à l'inverse de l'antérograde régulé par Arl8b (Fig. 1.15B) (Nair *et al.*, 2020). Comme mentionné plus haut, une des fonctions des lysosomes est la réparation de la MP. Spécifiquement, une entrée d'ions de calcium se produit lors d'un dommage, ce qui promeut le mouvement vers la périphérie et l'exocytose des lysosomes pour fusionner avec la MP (Reddy *et al.*, 2001). En concordance avec son rôle dans le transport rétrograde, la surexpression de RNF167 inhibe l'exocytose des lysosomes lors d'un traitement d'ionomycine, qui permet de perméabiliser la MP (Fig. 1.15B) (Nair *et al.*, 2020). De plus, l'isoforme court de RNF167 manquant les 35 premiers acides aminés n'est pas localisé aux lysosomes, ce qui altère sa fonction dans le positionnement des lysosomes (Fig. 1.15B) (Nair *et al.*, 2020). De façon intéressante, RNF167 permet l'ubiquitination de Rab7-GTP pour le maintenir à la membrane (Fig. 1.15C) (Ghilarducci *et al.*, 2022). Une autre étude avait précédemment démontré que la désubiquitination de Rab7 par USP32 (*ubiquitin-specific protease 32*), sur les mêmes lysines identifiées pour RNF167, augmente l'interaction avec RILP pour favoriser le transport rétrograde (Fig. 1.15C) (Sapmaz *et al.*, 2019). Il est possible de spéculer que RNF167 pourrait donc l'inhiber, un effet inverse au mécanisme impliquant Arl8b, mais cet effet reste à déterminer. De plus, RNF167 est un régulateur à double fonction de la voie de signalisation de mTORC1 où il cible et ubiquitine CASTOR1 (*cytosolic arginine sensor for mTORC1 subunit 1*) et Sestrin2 (Fig. 1.15D) (Li *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). CASTOR1 est une protéine qui détecte les niveaux d'arginine cytosolique alors que Sestrin2 détecte les niveaux de leucine (Liu *et al.*, 2024a). Spécifiquement, l'acide aminé respectif séquestre la protéine détectrice, ce qui l'empêche d'interagir avec le complexe GATOR2 (*GAP activity toward Rags 2*) qui active mTORC1 aux lysosomes (Fig. 1.15D) (Liu *et al.*, 2024a). Le manque d'acide aminé permet CASTOR1 et/ou Sestrin2 d'être actif et la cascade de signalisation mène à l'inhibition de mTORC1 (Fig. 1.15D) (Liu *et al.*, 2024a). Curieusement, RNF167 permet l'ubiquitination de chaîne K29 sur CASTOR1 et entraîne sa dégradation alors que l'ubiquitination par chaîne K63 de Sestrin2 promeut l'interaction avec GATOR2 (Fig. 1.15D) (Li *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). Ceci signifie que RNF167 permet d'activer mTORC1 en absence d'arginine mais de l'inhiber en absence de leucine (Li *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). RNF167 promeut également l'ubiquitination de chaînes K33 sur la protéine Tollip, ce qui permet d'inhiber les voies de signalisation de NF-κB (*nuclear factor-kappa B*) et de JNK, en plus de réguler l'activation des interférons de type I en ciblant les récepteurs RIG-I et MDA5 pour la dégradation par protéolyse lysosomale ou par UPS en ajoutant des chaînes K6 ou K11, respectivement (Fig. 1.15F) (He *et al.*, 2025; Yan *et al.*, 2023). Finalement, dans les neurones, RNF167 permet de réguler la neurotransmission excitatrice en diminuant l'expression de surface de GluA2, une sous-unité des AMPARs (Fig. 1.15E) (Ghilarducci *et al.*, 2022; Lussier *et al.*, 2012). Puisque RNF167 semble avoir des rôles doubles dans certaines fonctions cellulaires, des mécanismes de régulation existent probablement pour assurer la spécificité des voies activées, mais ceux-ci restent à définir.

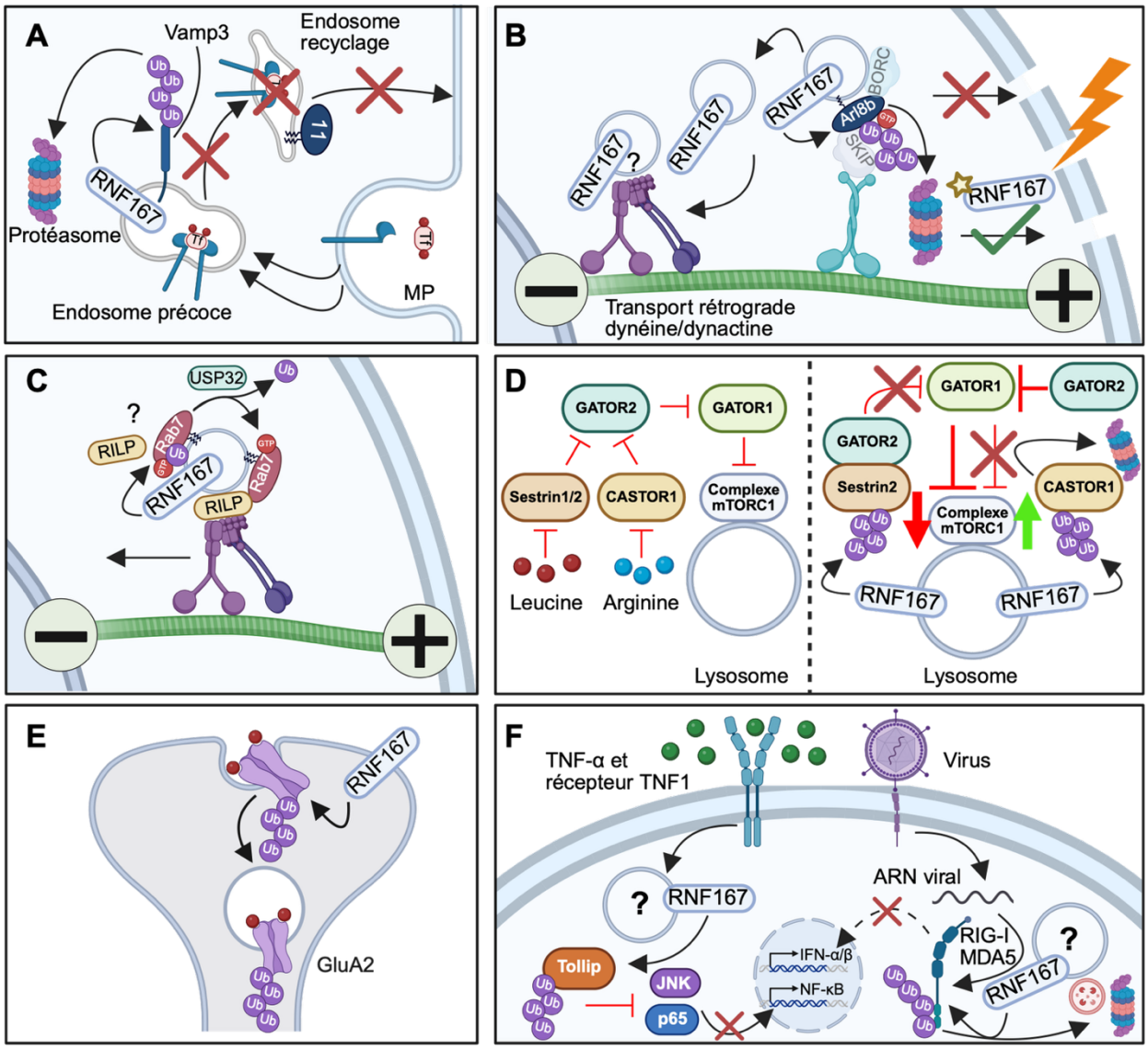


Figure 1.15: Les mécanismes cellulaires régulés par la E3 ubiquitine ligase RNF167.

(**A**) L'ubiquitination de Vamp3 entraîne une perte des endosomes positifs à Rab11 et une altération du routage du TfR. (**B**) RNF167 régule le positionnement des lysosomes par la dégradation de Arl8b. L'isoforme court qui n'est pas aux lysosomes (représenté par l'étoile) permet l'exocytose des lysosomes pour la réparation de la MP (dommage représenté par l'éclair) alors que RNF167 l'inhibe par un mécanisme dépendant de la dynéine. Il n'est pas connu si des effecteurs sont nécessaires (représenté par ?). (**C**) La DUB USP32 retire l'Ub de Rab7 pour favoriser l'interaction avec RILP. L'Ub par RNF167 permet d'ancrer Rab7 à la membrane, mais l'effet sur l'interaction avec RILP est à déterminer. (**D**) Les voies de régulation de mTORC1 par les nutriments. RNF167 inhibe mTORC1 par l'ubiquitination de Sestrin2 mais l'active par le substrat CASTOR1. (**E**) La régulation de l'expression de surface de GluA2 par RNF167. (**F**) RNF167 diminue les voies NF-κB et IFN-α/β induites par l'activation du récepteur TNF1 et par l'entrée d'un virus par ses substrats Tollip et RIG-I/MDA5, respectivement. La flèche pointillée indique que des étapes de la cascade de signalisation ont été omises dans le schéma. La localisation intracellulaire de RNF167 pour la signalisation de ces voies n'est pas connue (représenté par la vésicule ?). Schéma créé par BioRender.com.

1.4.6.2 RNF13

RNF13 a été identifié pour la première fois en 1996 en tant que C-RZF (*chicken-RING zinc finger*) où les auteurs cherchaient à identifier des gènes avec une expression différentielle en réponse à la molécule de MEC, la Ténascine, dans le cerveau d'embryon de poulet (Tranque *et al.*, 1996). L'expression de RNF13 était augmentée et la protéine a été identifiée pour être localisée dans le noyau (Tranque *et al.*, 1996). Curieusement, chez les mammifères, RNF13 est principalement localisé dans le RE, les endosomes tardifs, les lysosomes et à la MP (Arshad *et al.*, 2013; Bocock *et al.*, 2009; van Dijk *et al.*, 2014). Il semble tout de même avoir un signal de localisation nucléaire et un traitement de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), permettant d'activer la protéine kinase C (PKC), redistribue des protéines nouvellement synthétisées de RNF13 vers la membrane nucléaire interne par une voie nécessitant Rab11, bien que la fonction de cette localisation ne soit pas connue (Fig. 1.16A) (Bocock *et al.*, 2010). RNF13 a également été démontré pour subir une protéolyse extensive, donnant une protéine de pleine longueur, des fragments C-terminaux transmembranaires et un fragment intracellulaire soluble, mais ceux-ci étaient détectables seulement en présence de MG132 et on ne connait pas les différentes fonctions associées (Bocock *et al.*, 2009). Tout comme RNF167, il contient une séquence PEST, compatible avec une courte demi-vie et la difficulté à détecter la protéine en condition basale (Bocock *et al.*, 2009). De plus, il a un site de *N*-glycosylation rapporté, un site de *O*-GlcNAcylation identifié lors d'analyse de spectrométrie de masse et il possède des chaînes de CS sur un site non identifié à ce jour (Bocock *et al.*, 2009; Levine *et al.*, 2018; Vang *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2009). RNF13 est exprimé de façon ubiquitaire avec une abondance plus importante dans le cerveau, le cervelet et la moelle épinière, et avec une expression maximale dans les oligodendrocytes de la matière blanche (Kaneko *et al.*, 2016; Saito *et al.*, 2005; Siepe *et al.*, 2023; Sjöstedt *et al.*, 2020). Bien que sa localisation cellulaire soit différente de celle du poulet, l'expression de RNF13 a été démontrée pour corréler avec l'expression de Ténascine-C dans des lésions précancéreuses (Zhang *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'activité E3 ligase de RNF13 permet d'induire l'activité de la MMP-9, suggérant un remodelage de la MEC, bien que le mécanisme moléculaire exact n'ait pas été décrit (Fig. 1.16B) (Zhang *et al.*, 2009). Alors que cette étude suggère un rôle dans l'invasion cellulaire, une étude faite avec des souris knock-out démontre que la présence de RNF13 diminue la colonisation des métastases en augmentant la concentration de la cytokine GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) (Cheng *et al.*, 2015). De façon intéressante, l'inverse a été obtenu pour plusieurs cytokines, telles que TNF-α, IL-4 et IL-6 (TNF: *Tumor necrosis factor*; IL: *Interleukin*), dans les muscles squelettiques en régénération après un dommage par la cardiotoxine où l'absence de RNF13 favorisait la réparation (Meng *et al.*, 2014). Dans les macrophages, RNF13 a été démontré pour inhiber la maturation lysosomale en induisant la dégradation protéasomale de Lamp1, ce qui prolonge l'induction de la signalisation des récepteurs TLRs et mène à l'augmentation des cytokines IL-6 et IFN-β dans plusieurs organes (Fig. 1.16C) (Liu *et al.*, 2024b). Son absence dans des

cellules humaines a aussi été démontrée pour protéger contre l'apoptose (Arshad *et al.*, 2013). Plus spécifiquement, RNF13 interagit avec IRE1α pour induire la voie de signalisation TRAF2-ASK1-JNK et favoriser l'apoptose induite par le stress du RE (Fig. 1.16D) (Arshad *et al.*, 2013). Dans un modèle de souris de Parkinson, la répression de RNF13 a permis d'alléger la dysfonction motrice en diminuant l'activation de cette voie (Ji *et al.*, 2020). D'un autre côté, plusieurs études récentes démontrent que RNF13 peut avoir des effets protecteurs sur certaines conditions. La protéine HBc du virus de l'hépatite B est détruite par xénophagie à l'aide du récepteur p62 et LGALS9 (Miyakawa *et al.*, 2022). Mécanistiquement, LGALS9 lie la glycosylation de RNF13 afin de stimuler son autoubiquitination, reconnu par p62 qui recrute les autophagosomes (Fig. 1.16E) (Miyakawa *et al.*, 2022). De plus, RNF13 protège contre l'hypertrophie cardiaque et contre les lésions d'ischémie/reperfusion cérébrale en interagissant avec p62, qui augmente la voie de signalisation NRF2 (*nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2*) (Fig. 1.16F) (Guo *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2024). Une des études démontre que RNF13 active NRF2 puisqu'il stabilise p62 en bloquant sa dégradation par la E3 ligase TRIM21 (Fig. 1.16F) (Wang *et al.*, 2024). RNF13 protège également contre la stéatohépatite non alcoolique (NASH) dans un modèle de souris en induisant la dégradation de STING (Lin *et al.*, 2023). Plus spécifiquement, RNF13 ajoute des chaînes d'ubiquitine K63 sur la E3 ligase TRIM29 qui, à son tour, ajoute des chaînes K48 sur STING pour promouvoir sa dégradation protéasomale (Fig. 1.16G) (Lin *et al.*, 2023). De façon intéressante, dans des cellules humaines traitées pour reproduire le phénotype de NASH, STING active mTORC1 et inhibe la lipophagie (Fig. 1.16G) (Liu *et al.*, 2022a). Il est possible que RNF13 ait une fonction en amont jouant sur l'activation de mTORC1, faisant de lui un régulateur positif de la lipophagie, bien que cette voie reste à confirmer (Fig. 1.16G). Une récente étude démontre que Arl8b est également un substrat de RNF13 (Fig. 1.16H) (Trinh *et al.*, 2025). Spécifiquement, RNF13 permet de dégrader Arl8b afin de favoriser le transport rétrograde des lysosomes lorsque le pH intracellulaire et les niveaux de calcium, des signes d'induction d'autophagie, sont élevés (Fig. 1.16H) (Trinh *et al.*, 2025). Cette étude démontre l'implication de RNF13 dans l'autophagie où la répression de la protéine augmentait l'abondance de LC3-II et de p62, indiquant un flux autophagique altéré (Trinh *et al.*, 2025). RNF13 a aussi des rôles neurobiologiques. Bien que la raison ne soit pas connue, l'expression ectopique de RNF13 permet l'élongation spontanée de neurites dans les cellules PC12, de façon similaire à un traitement avec un facteur de croissance (Saito *et al.*, 2005). De plus, l'expression de l'ARNm de RNF13 était doublé dans des cellules B35 traitées au dibutyryl-cAMP, qui permet d'induire la croissance de neurite (Bocock *et al.*, 2009). Pour terminer, RNF13 a été démontré pour ubiquitiner par chaîne K29 la protéine SNAPIN afin de renforcer l'interaction avec SNAP-25 et favoriser la transmission synaptique (Fig. 1.16I) (Zhang *et al.*, 2013). En effet, la densité des vésicules synaptiques de la souris knock-out de RNF13 était diminuée (Zhang *et al.*, 2013). Bien que plusieurs questions restent ouvertes par rapport aux fonctions de RNF13, les études des dernières années mettent en lumière son importance dans divers mécanismes.

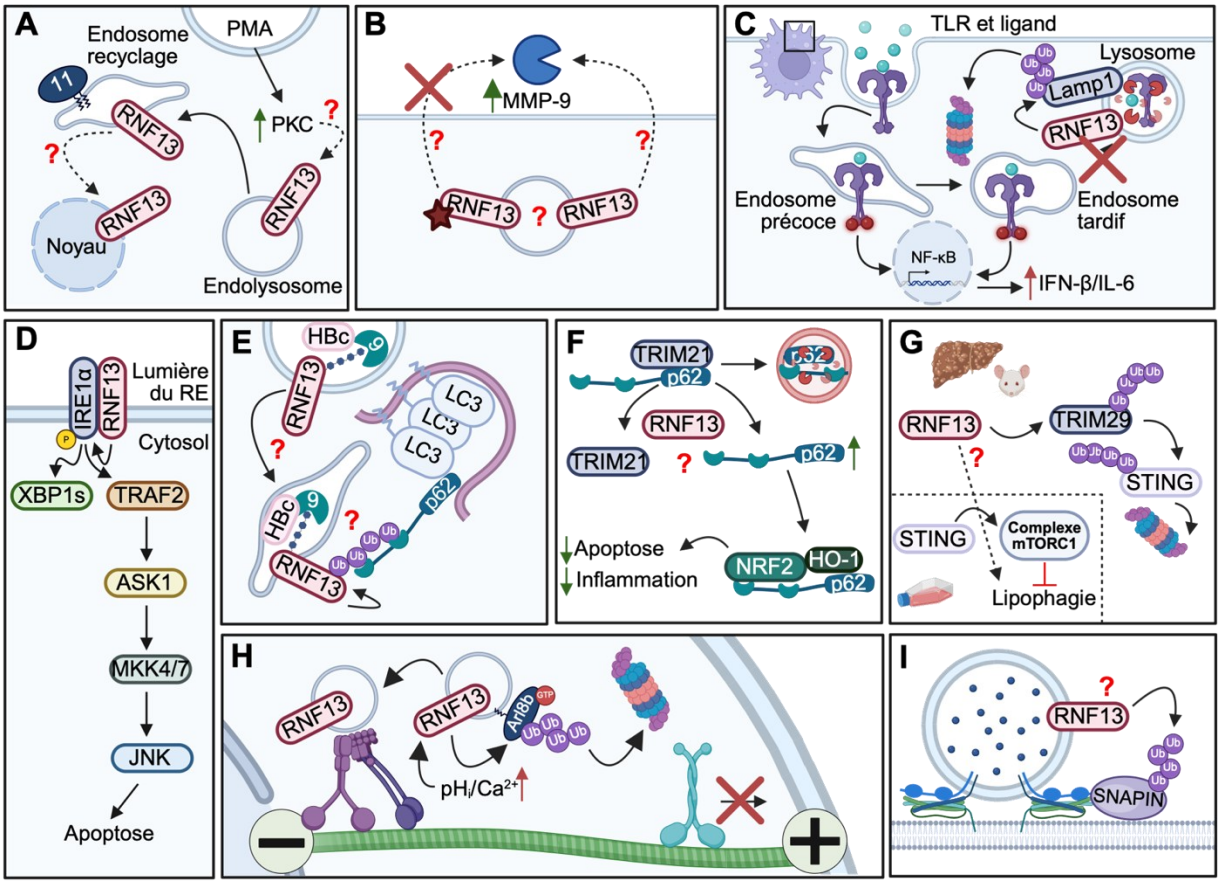


Figure 1.16: Les fonctions cellulaires identifiées à ce jour pour RNF13.

(**A**) Un traitement de PMA redistribue RNF13 vers le noyau en passant par un compartiment positif à Rab11, mais il n'est pas connu si PKC joue directement sur RNF13 ni le trajet exact jusqu'au noyau. (**B**) RNF13 augmente l'activité de MMP-9, mais pas un mutant sans activité ligase (représenté par l'étoile). (**C**) Dans les macrophages, le signal de TLR (*Toll-like receptor*) est maintenu actif par la dégradation protéasomale de Lamp1 augmentant le pH des lysosomes. (**D**) RNF13 interagit avec IRE1α et augmente sa phosphorylation. Les voies de signalisation en aval sont induites et mènent à l'apoptose. (**E**) La fonction de RNF13 dans la xénophagie par le récepteur p62. La localisation cellulaire de cette interaction n'est pas connue, mais LGALS9 doit pouvoir atteindre la glycosylation de RNF13. (**F**) RNF13 stabilise p62 en inhibant sa dégradation par TRIM21, possiblement par une compétition d'interaction, et augmente la voie de signalisation NRF2/HO-1. (**G**) RNF13 stimule la dégradation de STING en passant par TRIM29 pour diminuer l'accumulation de lipides et l'inflammation dans un modèle de souris NASH. En cellules, STING active mTORC1 pour inhiber la lipophagie. Le lien entre RNF13 et la lipophagie reste à déterminer. (**H**) RNF13 est activé lorsque le pH intracellulaire et les niveaux de calcium sont élevés afin d'ubiquitiner et de dégrader Arl8b pour favoriser le positionnement des lysosomes périnucléaire. (**I**) RNF13 régule la neurotransmission synaptique par son substrat SNAPIN où son ubiquitination favorise l'interaction avec SNAP-25 et le complexe SNARE. La localisation de RNF13 dans ce contexte n'est pas déterminée. Schéma créé avec BioRender.com.

1.5 La problématique et les hypothèses et objectifs de l'étude

Identifiée en 2019, la DEE73 est causée par des mutations dans le gène codant pour la protéine RNF13. Spécifiquement, trois individus sans liens familiaux étaient porteurs de mutations hétérozygotes *de novo* encodant les variants où les leucines 311 et 312 sont remplacées par une sérine et une proline, respectivement (L311S et L312P; Fig. 1.17) (Edvardson *et al.*, 2019). Les caractéristiques cliniques rapportées incluent un retard de croissance, une microcéphalie accompagnée d'ACC, de l'épilepsie réfractaire, une déficience visuelle et auditive, des contractures des membres, une scoliose et une hernie inguinale (Edvardson *et al.*, 2019). De façon intéressante, le *Undiagnosed Diseases Network* (UDN) a rapporté, peu de temps après, un participant présentant les mêmes symptômes de DEE et qui porte une mutation entraînant un codon-stop prématuré (E307*). La liste des symptômes décrite pour ce participant est plus exhaustive et rapporte un syndrome multisystémique incluant, mais sans s'y limiter à un élargissement de la rate, une hypermobilité des articulations et une maturation squelettique retardée (https://undiagnosed.hms.harvard.edu). À ce jour, seul l'article original donne des indices sur une possible cause mécanistique. En utilisant des lymphoblastes dérivés d'un patient avec le variant L311S et un individu témoin, les auteurs ont démontré qu'une induction du stress du RE par un traitement de Tn augmente l'apoptose de façon significative en présence de L311S comparativement au contrôle (Edvardson *et al.*, 2019). Ils suggèrent alors que les variants causant la DEE73 ont un gain de fonction et activent de façon aberrante la voie IRE1α menant à l'apoptose (Edvardson *et al.*, 2019). Cependant, il n'y a pas de résultat appuyant l'activation directe de cette voie et il n'est pas possible d'exclure un effet indirect impliquant d'autres mécanismes cellulaires altérés. De plus, le variant L312P n'a pas été étudié et un seul patient est comparé à un seul individu témoin (Edvardson *et al.*, 2019). Nos connaissances entourant la DEE73 restent donc principalement limitées aux altérations génétiques et aux présentations cliniques alors que les mécanismes moléculaires et cellulaires restent grandement inexplorés.

Quelques années suivant la publication de l'article original, un nouveau rapport décrit plusieurs mutations tous situées dans le dernier exon, codant pour des variants incomplets entre les acides aminés 292-311 de RNF13. Les auteurs proposent alors un « *hotspot* » pour le développement de la DEE73 (Taylor *et al.*, 2023). En effet, plusieurs autres variants de RNF13 retrouvés en amont dans la séquence protéique sont associés au cancer sans conséquence neurologique rapportée (van Dijk *et al.*, 2014). En étudiant la séquence de RNF13, il est possible de constater la présence d'un motif dileucine composé par les acides aminés 307 à 312 (307-EHTPLL-312), se trouvant dans le « *hotspot* » proposé (Fig. 1.17). Alors que les premiers variants rapportés entraînent une modification des acides aminés constituant le motif dileucine, les mutations plus récemment identifiées mènent à des variants perdant ce motif par la présence d'un codon-stop prématuré (Edvardson *et al.*, 2019; Taylor *et al.*, 2023). Comme RNF13 est connu pour être localisé dans les

endosomes tardifs et les lysosomes dont les voies de ciblage sont généralement régulées par AP-3, notre hypothèse de travail est que la perte du motif dileucine chez les variants causant la DEE73 entraîne une altération de l'interaction avec AP-3 et entrave le routage intracellulaire de RNF13. De plus, comme AP-3 est impliqué dans la biogenèse des SVs, que RNF13 régule l'interaction entre SNAPIN et SNAP-25 sur les SVs et que la DEE73 présente de graves conséquences neurologiques, une seconde hypothèse où l'interaction altérée entre AP-3 et les variants entraverait la fonction neuronale normale est également émise. Les objectifs de l'étude sont de (I) déterminer si le motif dileucine de RNF13 est impliqué dans l'interaction avec AP-3, (II) de caractériser la conséquence de la perte du motif dileucine sur le routage intracellulaire de RNF13, (III) d'étudier les altérations morphologiques et fonctionnelles dans des cultures neuronales exprimant les variants L311S et L312P, et (IV) d'identifier des mécanismes cellulaires altérés par les variants liés à la DEE73.

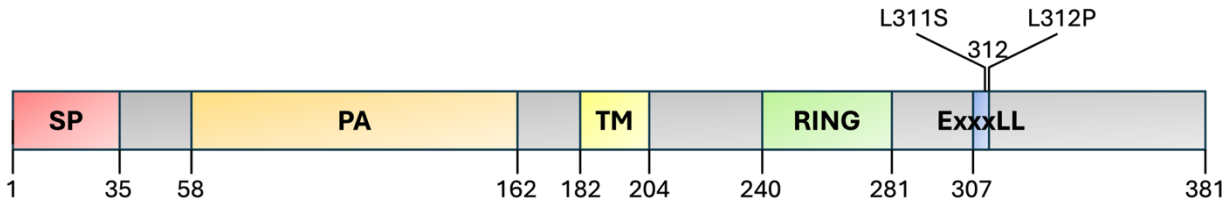


Figure 1.17 : Domaines de la protéine RNF13.

RNF13 est composé de 381 acide aminés. Les acides aminés 1 à 35 composent le peptide signal (SP). Le domaine luminal PA se situe entre les acides aminées 58 et 162. La portion transmembranaire (TM) est retrouvé entre les acides aminés 182 et 204 puis le domaine RING, entre 240 et 281. Finalement, le motif dileucine se trouve en position 307-312 où on retrouve également les variants L311S et L312P.

CHAPITRE 2
ARTICLE 1

RNF13 DILEUCINE MOTIF VARIANTS L311S AND L312P INTERFERE WITH ENDOSOMAL LOCALIZATION AND AP-3 COMPLEX ASSOCIATION

Valérie C. Cabana [1, 3], Antoine Y. Bouchard [1, 3], Audrey M. Sénécal [1, 3], Kim Ghilarducci [1, 3], Saïd Kourrich [2, 3, 4], Laurent Cappadocia [1, 3] and Marc P. Lussier [1, 3, 5]

[1] Département de Chmie, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada.

[2] Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada.

[3] Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC), Faculté des sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada.

[4] Department of Psychiatry, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA.

[5] Corresponding author: Marc P. Lussier, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Faculté des sciences, Case postale 8888, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada. Tel. (514) 987-3000 ext 5591; Fax (514) 987-4054; E-mail: lussier.marc@uqam.ca.

Research Article published in *Cells*, 2021, 10(11): 3063.

DOI: 10.3390/cells10113063.

https://www.mdpi.com/2073-4409/10/11/3063

Contributions des auteurs

Valérie C. Cabana a conceptualisé l'étude et l'article, performé les expériences, fait l'analyse des données et le montage des graphiques, interprété les résultats et rédigé l'article.

Antoine Y. Bouchard a performé les analyses, la figure et la rédaction pour la section AlphaFold et purifié les protéines GST-RNF13.

Audrey M. Sénécal a compilé une partie des données.

Kim Ghilarducci a fourni la protéine GST.

Saïd Kourrich a contribué au support financier.

Laurent Cappadocia a révisé et supervisé la réalisation de la section AlphaFold et contribué au support financier.

Marc P. Lussier a conceptualisé l'étude et l'article, fait le montage des figures, analysé les résultats, encadré et supervisé le projet, finalisé la rédaction du manuscrit et contribué au support financier.

Tous les auteurs ont lu et approuvé la publication de la verison finale de l'article.

Footnotes

Acknowledgements: This work was completed as part of the requirements for V.C.C.'s PhD thesis at the *Université du Québec à Montréal*. The authors thank Jennifer Crawford for editing the manuscript. The authors also thank Compute Canada (https://www.computecanada.ca/ (last accessed on 24 October 2021)) for computational resources and support.

Funding: This work was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2017-05392 to M.P.L.). The Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC) funded this study via its funding program for New Collaborative Research Initiatives (to M.P.L., L.C., and S.K.) and graduated scholarship awarded to V.C.C. (2020, 2021) and A.Y.B. (2020).

Conflicts of interest: No competing interests declared. Funding sources had no role in study design or in the collection, analysis, and interpretation of data.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Abbreviations: AIF, Apoptosis-inducing factor; AP, Adaptor protein; BME, Beta-mercaptoethanol; CTL, Nontargeting control; DEE, Developmental and epileptic encephalopathy; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DsiRNA, Dicer-substrate siRNA; EEA1, Early endosome antigen 1; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; EGF, Epidermal growth factor; EGFR, Epidermal growth factor receptor; ER, Endoplasmic reticulum; Ii, Invariant chain; IPTG, Isopropyl-β-D-thiogalactoside; Lamp1, Lysosomal-associated membrane protein 1; LIMP-II, Lysosome membrane protein 2; LSD, Lysosomal storage disorders; LYST, Lysosomal trafficking regulator protein; NPC1, NPC intracellular cholesterol transporter 1; NT, Non-transfected; PBS, Phosphate-buffered saline; PDI, Protein disulfide-isomerase; PMSF, Phenylmethyl-sulfonyl fluoride; RCAS1, Receptor-binding cancer antigen expressed in SiSo cells; RING, Really Interesting New Gene; RNF13, RING finger protein 13; TCE, 2,2,2-Trichloroethanol; Tf, Transferrin; TfR, Transferrin receptor; Tg, Thapsigargin; TGN, Trans-Golgi network; Tn, Tunicamycin; TYR, Tyrosinase; Ub, Ubiquitin; WT, Wild-type.

2.1 Résumé

Les encéphalopathies épileptiques et développementales (DEE) sont des troubles neurologiques rares et graves caractérisés par une épilepsie sévère avec des crises réfractaires et un retard important dans le développement. Récemment, la DEE73 a été liée à des altérations génétiques dans le gène *RNF13* qui convertissent les positions 311 ou 312 de la protéine RNF13 d'une leucine en une sérine ou une proline, respectivement (L311S et L312P). En utilisant une approche de microscopie à épifluorescence pour étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires affectés par les variants de la protéine RNF13, l'étude actuelle montre que RNF13 de type sauvage (WT) est grandement localisé dans les endosomes et lysosomes alors que L311S et L312P ne colocalise pas avec le marqueur lysosomal Lamp1. De plus, nos résultats montrent que les protéines RNF13 L311S et L312P affectent la taille des vésicules endosomales ainsi que la progression temporelle et spatiale du facteur de croissance épidermique marqué par fluorescence, mais pas de la transferrine, dans le système endolysosomal. Des essais d'interactions protéine-protéine démontrent que les variants de RNF13 perturbent l'association avec le complexe AP-3. L'inactivation de la sous-unité AP3D1 du complexe AP-3 modifie la localisation lysosomale de RNF13 WT et affecte de manière similaire la taille des vésicules endosomales. Il est important de noter que notre étude constitue une première étape vers la compréhension du mécanisme cellulaire et moléculaire altéré par les variations génétiques de RNF13 associées à DEE73.

Mots-clés : RNF13, Complexe AP-3, Endosomes, Lysosomes, Trafic intracellulaire, Mutations génétique, Encéphalopathie épileptique et développementale-73

2.2 Abstract

Developmental and epileptic encephalopathies (DEE) are rare and serious neurological disorders characterized by severe epilepsy with refractory seizures and a significant developmental delay. Recently, DEE73 was linked to genetic alterations of the RNF13 gene, which convert positions 311 or 312 in the RNF13 protein from leucine to serine or proline, respectively (L311S and L312P). Using a fluorescence microscopy approach to investigate the molecular and cellular mechanisms affected by RNF13 protein variants, the current study shows that wild-type RNF13 localizes extensively with endosomes and lysosomes, while L311S and L312P do not extensively colocalize with the lysosomal marker Lamp1. Our result show that RNF13 L311S and L312P proteins affect the size of endosomal vesicles along with the temporal and spatial progression of fluorescently labeled epidermal growth factor, but not transferrin, in the endolysosomal system. Furthermore, GST-pulldown and co-immunoprecipitation show that RNF13 variants disrupt association with AP-3 complex. Knockdown of AP-3 complex subunit AP3D1 alters lysosomal localization of wild-type RNF13 and similarly affect the size of endosomal vesicles. Importantly, our study provides a first step toward understanding the cellular and molecular mechanism altered by DEE73-associated genetic variations of RNF13.

Keywords: RNF13, AP-3 complex, Endosomes, Lysosomes, Intracellular trafficking, Genetic mutations, Developmental and epileptic encephalopathy-73

2.3 Introduction

The human genome encode approximately 600 ubiquitin (Ub) E3 ligases (Hicke et Dunn, 2003; Komander et Rape, 2012). These Ub ligases are crucial for bringing specificity to the protein ubiquitination process by recognizing the appropriate substrate protein (Ciechanover et Iwai, 2004; Hicke et Dunn, 2003; Komander, 2009). Specifically, protein ubiquitination is a post-translational modification that is implicated in various cellular processes, such as protein trafficking, cell-cycle regulation, DNA repair, apoptosis, and signal transduction (Cai *et al.*, 2018; Haglund et Dikic, 2012; Mukhopadhyay et Riezman, 2007). Ubiquitination is necessary for protein degradation, and the ubiquitin-proteasome system is critical to maintain protein homeostasis by selectively degrading abnormally folded or damaged proteins that could become toxic (Jana, 2012). Dysfunction of this pathway is implicated in the pathogenesis of multiple diseases, such as Angelman syndrome (Basel-Vanagaite *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2019), Alzheimer's disease (Cao *et al.*, 2019; Hong *et al.*, 2014), Parkinson's disease (Kumar *et al.*, 2018; Olanow et McNaught, 2006) and in many types of cancer (Hashizume *et al.*, 2001; Paul, 2008; Scheffner *et al.*, 1993).

E3 ligases can be classified into three families based on their catalytic core domain: the Homology to E6AP Carboxyl Terminus (HECT), the Really Interesting New Gene (RING) finger and the U-box protein families (Ardley et Robinson, 2005). Among the several hundred Ub E3 ligases characterized by the presence of a RING domain (Deshaies et Joazeiro, 2009), 49 of those contain integral transmembrane domains (Li *et al.*, 2008; Nakamura, 2011; Neutzner *et al.*, 2011). A phylogenetic tree constructed after analysis of the human transmembrane RING-domain Ub ligases presents subdivisions that include members of the tripartite motif-containing (TRIM), the protease-associated (PA) transmembrane (TM) RING (PA-TM-RING), the RING between RING (RBR) and the membrane-associated RING-CH (MARCH) families (Nakamura, 2011). Specifically, the PA-TM-RING family is characterized by the presence of a protease-associated domain, a single transmembrane domain, a RING-H2 domain, and usually a putative N-terminal signal peptide (Nakamura, 2011; van Dijk *et al.*, 2014). While the RING domain is needed for the ligase activity of the protein, the PA domain is a conserved sequence proposed to mediate protein-protein interaction (Nakamura, 2011; van Dijk *et al.*, 2014). Importantly, many members of the PA-TM-RING family, such as RNF167 (Deshar *et al.*, 2016; Ghilarducci *et al.*, 2021; Lussier *et al.*, 2012) or RNF13 (Bocock *et al.*, 2011; van Dijk *et al.*, 2014), localize to endosomal membranes where they can potentially impact important and complex biological events.

The RING finger protein 13 (*RNF13*) gene is evolutionarily conserved in many invertebrate and vertebrate organisms, including human. Over the years, the RNF13 protein has been shown to localize in the endoplasmic reticulum (ER), late endosomes and lysosomes, and at the plasma membrane (Arshad *et al.*,

2013; Bocock *et al.*, 2009; van Dijk *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2009). RNF13 was first identified as chicken RING zinc finger (C-RZF) and its expression was found to be upregulated when chicken embryo brain cells were treated with the extracellular matrix component tenascin-C (Tranque *et al.*, 1996). RNF13 plays a role in myogenesis, tumorigenesis, and cell proliferation (Jin *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Recent studies have shown that *RNF13* expression in atherosclerosis plaques is upregulated (Zhang *et al.*, 2020b), while it is downregulated in uveal melanoma (Ness *et al.*, 2020) and asthma (Bazan-Socha *et al.*, 2021). Ectopic expression of RNF13 inhibits myoblast proliferation whereas treatment with myostatin, a muscle growth inhibitor, upregulates *RNF13* expression (Zhang *et al.*, 2010). In PC12 cells, ectopic expression of RNF13 promoted the spontaneous growth of neurites (Saito *et al.*, 2005). Treatment of B35 neuroblastoma cells with dibutyryl-cAMP, an agent that stimulates neurite extension, increased endogenous RNF13 mRNA expression two-fold (Bocock *et al.*, 2009). Furthermore, RNF13 Ub ligase activity promotes ubiquitination of SNARE-associated protein (snapin), allowing its interaction with synaptosome-associated protein 25 (SNAP-25) to strengthen the binding between synaptotagmin I and SNAP-25. This interaction is crucial for the assembly of the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complex and the release of neurotransmitters into the synaptic cleft (Zhang *et al.*, 2013).

Recent advances in genome sequencing and the access to public databases eased the identification of various mutations within the genes of patients. For instance, consultation of the BioMuta dataset (Dingerdissen *et al.*, 2018), which catalogues single-nucleotide variations in cancer, currently displays more than 60 unique variations within the coding sequence of the human *RNF13* gene. RNF13 mutations were identified across different cancer types. Some RNF13 variant proteins resulting from somatic mutations were characterized for their involvement in tumorigenesis (van Dijk *et al.*, 2014). Additionally, a study reported that three unrelated individuals with an infantile neurodegenerative disorder were carrying *de novo* heterozygous mutations within the *RNF13* gene (c.932T>C [p.L311S] and c.935T>C [p.L312]) (Edvardson *et al.*, 2019). Clinical features include, but are not limited to, abnormally increased muscle tone, refractory epilepsy, microcephaly, and profound intellectual disability. In this specific study, fibroblasts and lymphoblasts derived from an affected individual carrying the RNF13 L311S variant protein were more prone to ER stress (Edvardson *et al.*, 2019). In this context, further characterization of RNF13 variants L311S and L312P would lead to a better understanding of altered cellular mechanisms. The present study demonstrates that RNF13 L311S and L312P variant proteins do not localize in the ER. Instead, while wild-type (WT) RNF13 protein predominantly localizes in late endosomes and lysosomes, the presence of RNF13 L311S and L312P variants in lysosomal vesicles is diminished. Cells expressing RNF13 variants display enlarged endolysosomal vesicles when compared to RNF13 WT. Moreover, this study provides evidence that RNF13 L311S and L312P alter epidermal growth factor (EGF) sorting. Finally, L311S and L312P variants disrupt

RNF13 binding to subunits of the AP-3 complex while AP-3 knockdown alters lysosomal targeting of RNF13. Overall, this work provides the first glimpse into an altered endolysosomal pathway due to the expression of RNF13 L311S and L312P variant proteins.

2.4 Materials and Methods

2.4.1 Antibodies

The following antibodies were used: Rabbit anti-HA (IF and WB: 1:1000, New England Biolabs Ltd., Whitby, ON, Canada, Cat# 3724, RRID:AB_1549585), Mouse anti-HA (IF: 1:1000, BioLegend, San Diego, CA, USA, Cat# 901502, RRID:AB_2565007), Mouse anti-GFP (IF: 1:1000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Cat# MA5-15256, RRID:AB_10979281), Rabbit anti-AIF (IF: 1:1000, New England Biolabs Ltd., Cat# 5318, RRID:AB_10634755), Rabbit anti-EEA1 (IF: 1:500, New England Biolabs Ltd., Cat# 3288, RRID:AB_2096811), Rabbit anti-Lamp1 (IF: 1:500, New England Biolabs Ltd., Cat# 9091, RRID:AB_2687579), Rabbit anti-PDI (IF: 1:250, New England Biolabs Ltd., Cat# 3501, RRID:AB_215643), Rabbit anti-RCAS1 (IF: 1:250, New England Biolabs Ltd., Cat# 12290, RRID:AB_2736985), Mouse anti-Rab5A (IF: 1:800, New England Biolabs Ltd., Cat# 46449, RRID:AB_2799303), Rabbit anti-Rab7 (IF: 1:200, New England Biolabs Ltd., Cat# 9367, RRID:AB_1904103), Rabbit anti-Rab9 (IF: 1:200, New England Biolabs Ltd., Cat# 5118, RRID:AB_10621426), Rabbit anti-AP3S1 (WB: 1:500, Bio-Techne Canada, Toronto, ON, Canada, Cat# NBP1-76588, RRID:AB_11018734), Rabbit anti-AP3D1 (WB: 1:1000, Bio-Techne Canada, Cat# NBP2-92046), AlexaFluor 405-conjugated goat anti-mouse (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada, Cat# A-31553, RRID:AB_221604), AlexaFluor 488-conjugated goat anti-mouse (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Cat# A-11017, RRID:AB_253408), AlexaFluor 647-conjugated goat anti-mouse (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Cat# A31626, RRID:AB_2535792), AlexaFluor 488-conjugated goat anti-rabbit (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Cat# A-11070, RRID:AB_2534114), AlexaFluor 647-conjugated goat anti-rabbit (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Cat# A31634), horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (1:10000, New England Biolabs Ltd., Cat# 7074, RRID:AB_2099233).

2.4.2 Molecular biology

GenScript (Piscataway, NJ, USA) synthesized wild-type, full-length human RNF13 transcript variant 1 (accession NM_007282.4) that includes the natural Kozak sequence and a C-terminus HA tag. This construct was cloned into pUC57 vector and served as the template for generating protein variants L311S, L312P and L311L312/AA via site-directed mutagenesis. WT and mutated cDNAs were excised using

standard enzymatic restriction strategies and ligated into BamHI and XbaI sites of pcDNA3.0 (+) (Thermo Fisher Scientific) for immunofluorescence assay and into NheI and XhoI sites of pCAGGS-IRES-mCherry for immunoprecipitation assay. The pUC57 vector was used as template for generating C-terminal RNF13 WT and variants proteins (a.a. 281-381). PCR was performed with Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs Ltd., Cat# M0492S). Fragments were excised using standard enzymatic restriction strategies and ligated into EcoRI and XhoI sites of pGEX-4T-1 (GE Healthcare Life Sciences, now known as Cytiva, Mississauga, ON, Canada). All plasmids were confirmed by Sanger sequencing (Genome Quebec, Montreal, QC, Canada).

2.4.3 Cell culture and transfection

HeLa (from Dr. Diana Alison Averill, Montreal, QC, Canada) and HEK293T/17 cells (American Type Culture Collection (ATCC), Gaithersburg, MD, USA, Cat# CRL-11268) were cultured at subconfluence in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Cat# 11995-065) containing 10% fetal bovine serum (FBS, VWR Life Science, Cat# MPCA97068-085) in 5% CO_2-containing humidified air at 37°C. Cells were not recently authenticated nor tested for mycoplasma contamination. For immunostaining and trafficking assay, 24 hours prior to transfection, 6 x 10^4 HeLa cells were seeded in a 24-well plate containing a 12 mm round glass coverslip #1.5 (UltiDent Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada, Cat# 170-C12MM). Two hours before transfection, the culture medium was replaced with fresh medium. For transfection, a mixture containing 0.4 µg of total plasmid DNA and 250 mM $CaCl_2$ was added dropwise to an equal volume of 2X Hanks' Balanced Salt Solution to form a calcium phosphate-DNA precipitate. After a 20-minute incubation at room temperature, the calcium-DNA complexes were added to the cells, which were further incubated for 24 hours at 37°C with 5% CO_2. When required, ER stress was induced in transfected HeLa cells using 1.25 µg/ml tunicamycin (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, Cat# 11445), 1 µM thapsigargin (Cayman Chemical, Cat #10522), or incubated with an equal volume of dimethyl sulfoxide for 3 hours before performing immunostaining as described below. For immunoprecipitation assay, HEK293T/17 cells were transfected using LipofectAMINE 2000 in poly-D-lysine treated six-well plate as described previously (Lussier *et al.*, 2005).

2.4.4 Immunostaining

Transfected HeLa cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and fixed using ice-cold 4% paraformaldehyde (PFA)/4% sucrose in PBS for 15 minutes at room temperature. Cells were permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS for 15 minutes before blocking non-specific sites with 10% normal goat serum (NGS) in PBS for 1 hour. Coverslips were incubated with primary antibodies diluted in 3% NGS/PBS for 1 hour, followed by incubation with the appropriate conjugated secondary

antibodies also diluted in 3% NGS/PBS for 1 hour. Coverslips were washed in PBS, mounted using ProLong Diamond Antifade (Thermo Fisher Scientific, Cat# P36961) and kept at 4°C before performing image acquisition.

2.4.5 Uptake and trafficking of EGF and Transferrin

Transfected HeLa cells were starved in DMEM supplemented with 0.2% bovine serum albumin (BSA) for 2 hours at 37°C. A total of 0.5 µg/ml AlexaFluor 647 EGF complex (Thermo Fisher Scientific, Cat# E35351) or 10 µg/ml CF640R-conjugated Human Transferrin (Biotium, Fremont, CA, USA, Cat# 00085) were added to the cells and incubated at 37°C for 5 minutes (pulse). For the chase, cells were incubated in fresh culture medium (DMEM+10% FBS) at 37°C for a period up to 60 minutes. Cells were washed in PBS and fixed in PFA immediately after the chase period. Once all the coverslips were fixed, the immunostaining method was performed as described above.

2.4.6 Fluorescence microscopy image acquisition

Image acquisition was performed by using an inverted epifluorescence microscope Olympus IX83 equipped with a U Plan S-Apo 60x / 1.35 numerical aperture oil objective (Olympus Canada Inc., Richmond Hill, ON, Canada), the X-Cite Xylis 365 LED-based illumination source (Excelitas Technologies Corp., Waltham, MA, USA) and the Zyla 4.2 Plus sCMOS camera (Andor, Concord, MA, USA). The Olympus CellSens Dimension software controlled the system during image acquisition. Z-stack images were acquired with 7 to 12 optical slices taken at 0.27 µm intervals with resolution set at 2048 x 2048 pixels. Intensity and exposure time for illuminating the samples were set to obtain the highest signal possible without reaching saturation. Epifluorescence images were deconvolved using the Olympus 3D Deconvolution feature in the Olympus CellSens Dimension software.

2.4.7 Image analysis

To analyze vesicle size, the diameter of the five largest vesicles per cell was measured in a deconvoluted single optical slice using the Measure - Arbitrary Line function in Olympus CellSens Dimension software. To analyze colocalization between RNF13 and endosomal markers, a deconvoluted single optical slice was separated in two channels. The threshold was adjusted to have signals only from puncta, and the Manders overlap coefficient was obtained using the JaCoP plugin in Fiji. To analyze the uptake and trafficking of EGF and transferrin, all optical sections were Z-stacked using the maximum intensity option in ImageJ, and the threshold was adjusted to have signals only from puncta. Afterward, puncta were counted using the Fiji's Analyze Particle function. Pearson's colocalization coefficient between early endosome marker EEA1 and

either EGF or transferrin was calculated using the JaCoP plugin in Fiji. For colocalization analysis, all deconvoluted optical slices were Z-stacked using the maximum intensity option.

2.4.8 Statistical analysis

At least three independent, non-blinded experiments were performed for all assays. After performing image analysis, datasets collected in Microsoft Excel were subjected to statistical analyses using GraphPad Prism 8. Outliers were excluded from datasets when identified using the ROUT method set to 1%. Because our sample size was relatively small, nonparametric tests were selected. Statistical difference was determined using either one-way ANOVA with the Kruskal-Wallis test or using two-way ANOVA with multiple comparisons.

2.4.9 TOPP2 E. Coli transformation and culture

Bacteria were transformed using 50 ng of pGEX-4T-1 vector containing the coding sequence for RNF13 residues 281-381 and 20 µL of chemocompetent TOPP2 E. coli cells (Novagen). Transformants were selected on solid LB plates (10g/L tryptone, 5g/L yeast extract, 10g/L NaCl, 15g/L agar) containing 100 µg/mL of ampicillin. One colony was randomly selected to inoculate 100 mL of liquid LB medium containing 100 µg/mL of ampicillin. This culture was incubated for 18h at 28ºC and subsequently divided into 3 flasks, each containing 1L of SB medium (35 g/L tryptone, 20 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, pH 7.35) with 100 µg/mL ampicillin. This culture was incubated at 37ºC until it reached an OD600 of 1. Induction was performed with 0.3 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) and cells were incubated for an additional 2 h at 30ºC. Cells were pelleted by centrifugation at 11,899g at 4ºC for at least 40 minutes and re-suspended in a solution containing 20% sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, and 100 µg/ml lysozyme using a ratio of 2 ml of solution per gram of bacterial cells. This solution was snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -20°C until use.

2.4.10 Purification of recombinant C-Terminal RNF13 from TOPP2

The solution containing the bacterial cells was thawed at room temperature and its composition was adjusted to include 150 mM NaCl, 1 mM beta-mercaptoethanol (BME), 1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF) and 5 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Sonication was performed for 3 cycles of 2 minutes with a minimum of 2 minutes in between cycles using a S-450A sonifier equipped with a 0.5” horn. Power was adjusted to 50% with a 50% duty cycle. The resulting cell lysate was centrifuged at 48,384g for 20 minutes at 4ºC. Supernatant was filtered using a 0.22 µm filter and the C-terminal portion of RNF13 was purified using a 1 mL GSTrap 4b column (Cytiva) and an AKTA start Fast Protein Liquid

Chromatography (FPLC; Cytiva). The column was equilibrated using 10 Column Volumes (CV) of washing buffer composed of 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF and 1 mM BME. The cell lysate was then loaded on the column at a 0.5 mL/min flow rate. The column was washed using 10 CV of washing buffer at a 1.0 mL/min flow rate and elution was performed at a 0.5 mL/min using an Elution Buffer composed of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM reduced glutathione and 1 mM PMSF. Elution fractions were combined and loaded on HiLoad 16/600 Superdex 75 (Cytiva) equilibrated with a gel filtration buffer composed of 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl and 5 mM BME. Separation was performed using an AKTA Pure 25M FPLC (Cytiva). Fractions that contain RNF13 were pooled, snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80ºC until needed.

2.4.11 GST-pulldown and immunoprecipitation assays

For GST-pulldown, 10 cm plate with HEK293T/17 cells were washed twice with PBS and lysed in 3 mL ice-cold lysis buffer composed of 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 and 1X protease inhibitor cocktail EDTA-free (Cedarlane, Burlington, ON, Canada, Cat# B14001(CA)). Cells were collected and agitated at 15 rpm for 20 mins at 4°C. The sample was then centrifuged at 21,000g for 15 mins. 250 ul of lysate was incubated overnight at 4°C with 15 ul of glutathione-sepharose 4B resin (GE Healthcare) pre-equilibrated in ice-cold lysis buffer and 25 ug of purified GST or GST-RNF13 proteins. After washing with ice-cold lysis buffer, proteins were eluted with Laemmli buffer before loading on SDS-PAGE. For immunoprecipitation assay, 6-well plates containing transfected HEK293T/17 cells were lysed with 1 ml ice-cold lysis buffer supplemented with 0.5% sodium deoxycholate (IP buffer). The lysis method was performed as described above. A total of 600 ul of lysate was incubated for 2 hours at 4°C with anti-HA affinity gel (Cedarlane, Cat# B23302(CA)) equilibrated in ice-cold IP buffer. Washes and elution were performed as described above.

2.4.12 SDS-PAGE and Western Blot

Proteins samples were separated on SDS-PAGE containing 0.5% of 2,2,2-trichloroethanol (TCE). The proteins were then transferred to a 0.45 um PVDF membrane using Trans-Blot Turbo system (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) for 10 mins, at 25V and 2.5A. Proteins on both gels and membranes were visualized using the *stainfree* mode of the ChemiDoc MP imaging System (Bio-Rad) and Bio-Rad Image Lab software. Subsequently, membranes were blocked for 1h at room temperature in 5% skim milk dissolved in TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 0.3% Tween-20). Incubation with primary antibody diluted in TBS-T containing 0.05% NaN_3 was performed overnight at 4°C, while incubation with horseradish peroxidase-coupled secondary antibody diluted in TBS-T was performed for 1h at room temperature. A total of 3x 3mins washes were performed between each step. Finally, immune complexes

were revealed with Clarity Western ECL substrate (BioRad, Cat# 1705060) and chemiluminescent signal was obtained using the ChemiDoc MP imaging system.

2.4.13 Predicted structure

The structure of the complex between RNF13 (Uniprot accession O43567) and AP3S1 (Uniprot accession Q92572) was modeled using the standalone version of AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021). Briefly, RNF13 and AP3S1 were combined into a single polypeptide chain separated by 15 glycine residues to ensure independent folding. Visualisation of the RNF13-AP3S1 complex was performed using the PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

2.4.14 AP3D1 knockdown

TriFECTa Kit Dicer-substrate siRNAs (dsiRNA) duplexes against Homo sapiens adaptor related protein complex 3 subunit delta 1 (AP3D1, NM_003938) were purchased from Integrated DNA Technology (IDT, Coralville, IA). Specifically, we acquired the negative control scrambled dsiRNA (Cat# DS NC1) or AP3D1 specific duplex sequences #1 (5'-rCrGrCrUrArCrUrGrArGrCrArArCrUrUrGrUrUrArGrArAGA-3' and 5'-rUrCrUrUrCrUrArArCrArArGrUrUrGrCrUrCrArGrUrArGrCrGrUrG-3'), #2 (5'-rGrUrCrArUrUrUrGrU-rUrGrCrGrUrUrGrArArUrUrArUrCTG-3' and 5'-rCrArGrArUrArArUrUrCrArArCrGrCrArArCrArArAr-UrGrArCrCrU-3'), and #3 (5'-rUrUrArCrArGrArUrGrUrUrGrGrGrArUrArCrGrArCrArUCA-3' and 5'-rUrGrArUrGrUrCrGrUrArUrCrCrCrArArCrArUrCrUrGrUrArArArU-3'). Briefly, 4 hours prior to transfection, 1.25 x 10^5 HeLa cells were seeded in a 24-well plate containing a 12 mm round glass coverslip #1.5 (UltiDent Scientific, Cat# 170-C12MM) (for IF) or 2.5 x 10^5 HeLa cells were seeded in a 6-well plate (for WB). A total of 10 nM DsiRNA were diluted in 50 ul Opti-MEM I and added to 0.5 ul (24-well) or 2 ul (6-well) of Lipofectamine 2000 transfection reagent diluted in 50 ul Opti-MEM I. The mixture was incubated for 20 minutes at room temperature before adding to the cells that were incubated for 72 hours before fixation or lysis. For immunofluorescence assay, cells were transfected with calcium phosphate to introduce either pcDNA3.0 or RNF13WT-HA 48 hours after DsiRNA transfection (24 hours prior fixation).

2.5 Results

2.5.1 RNF13 variants L311S and L312P show reduced presence in lysosomes and alter endosomal vesicle size

An altered cellular function for RNF13 variants L311S and L312P has been reported but a possible effect on their intracellular localization has not been investigated (Edvardson *et al.*, 2019). Because RNF13 is a known vesicular protein that localizes in endolysosomal compartments (Bocock *et al.*, 2009; Bocock *et al.*,

2010; van Dijk *et al.*, 2014), we used immunofluorescence to investigate whether RNF13 WT is located in the endolysosomal system and if RNF13 L311S and L312P variant proteins retain a similar localization. To resolve the endosomal localization of the membrane protein RNF13, we transfected HeLa cells with HA-tagged RNF13 and immunostained for endogenous endosomal markers. First, using the early endosome marker Early Endosome Antigen 1 (EEA1), our results show that RNF13 WT and its variants L311S and L312P do not extensively colocalize with EEA1, as measured using Manders overlap coefficient (Fig. 2.1A). In contrast, we observed and measured a significant overlap between RNF13 WT and the lysosomal-associated membrane protein 1 (Lamp1) (Fig. 2.1B). Additionally, a significant reduction in colocalization between both L311S and L312P with Lamp1 was measured when compared to WT RNF13 with Lamp1 (Fig. 2.1B; *** $p = 0.0004$ and **** $p < 0.0001$), therefore suggesting that the lysosomal localization of RNF13 variants is altered.

We further investigated the RNF13 endolysosomal location using the Rab family of small GTPases. These are widely used as subcellular markers since distinct members of the family localize to different compartments to control specificity and directionality of trafficking pathways (Zhen et Stenmark, 2015). For instance, Rab5 is specific to early endosomes (Feng *et al.*, 1995), Rab7 is a late endosome marker (Feng *et al.*, 1995), and Rab9 mediates vesicle transport from late endosomes to the trans-Golgi network (TGN) (Lombardi *et al.*, 1993). Our results show that RNF13, WT and its variants L311S and L312P, partially overlap with Rab5-positive vesicles (Fig. 2.1C), Rab7-positive vesicles (Fig. 2.1D) and Rab9-positive vesicles (Fig. 2.1E). Manders overlap coefficients measured with regard to a specific Rab marker were not statistically different between RNF13 WT and its variants proteins (Fig. 2.1C-E). Because RNF13 is described also as an ER protein (Arshad *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009), the localization of HA-tagged human RNF13 L311S and L312P proteins was compared to that of RNF13 WT in HeLa cells co-labeled with protein disulfide-isomerase (PDI), a marker for endogenous ER-localized proteins. The results demonstrate limited colocalization between PDI and RNF13, suggesting that HA-tagged WT RNF13 and its L311S and L312P variant proteins do not extensively localize to the ER (Fig. 2.S1A).

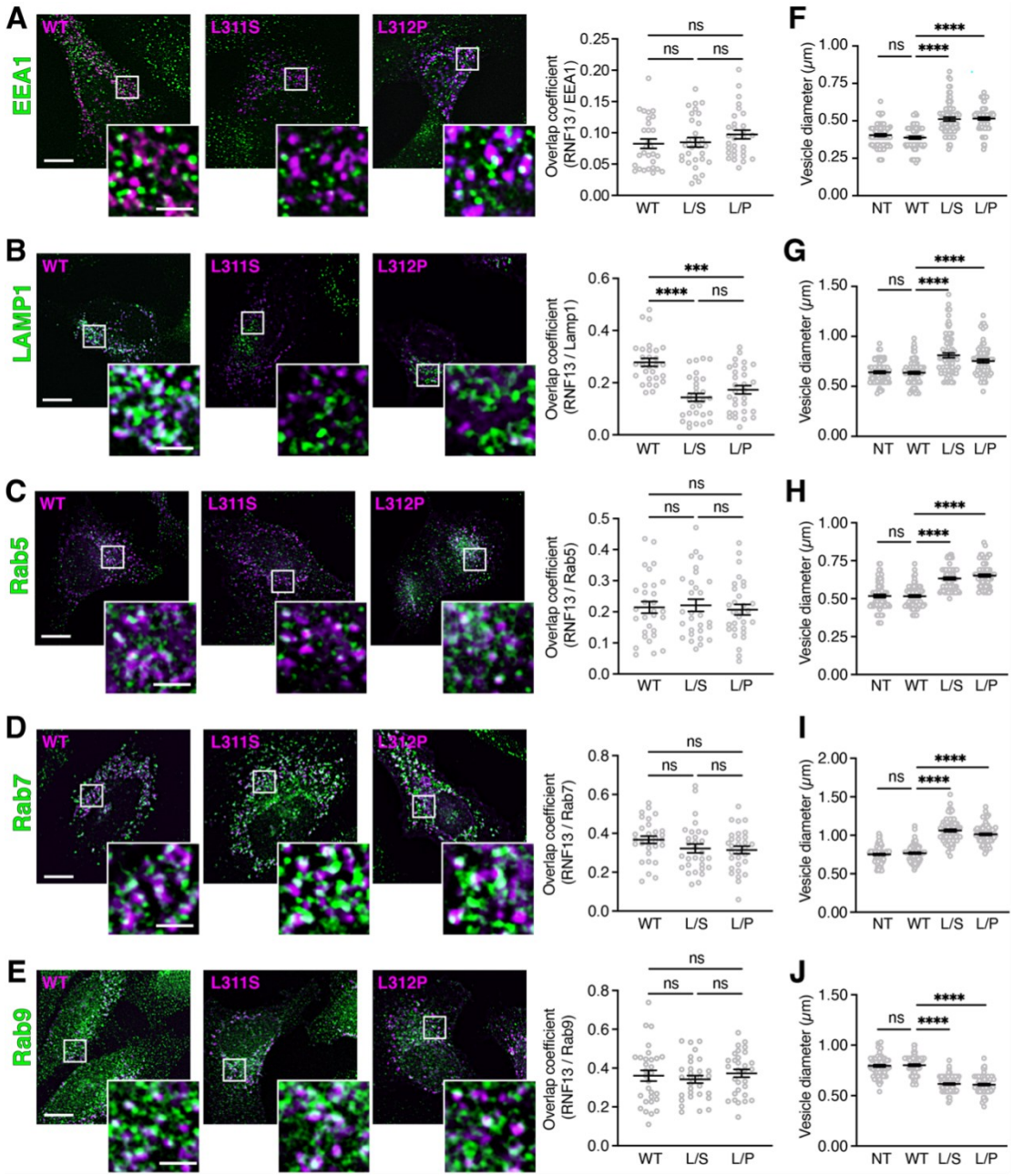


Figure 2.1: RNF13 L311S and L312P variants alter the size of endolysosomal vesicles.

(**A-E**) Plasmid constructs encoding HA-tagged WT, L311S or L312P RNF13 were transiently expressed in HeLa cells. Cells were fixed, permeabilized, and labeled with specific primary antibody against HA (RNF13) and against the endogenous subcellular markers. Representative images from three independent experiments (N=3) show RNF13-HA (in purple) and (**A**) early endosome marker EEA1, (**B**) lysosome marker Lamp1, (**C**) early endosome marker Rab5, (**D**) late endosome marker Rab7 and (**E**) recycling endosome marker Rab9 (in green). Scale bars indicate 10 μm for whole cell image and 2 μm for the boxed area shown at higher magnification. The jittered individual value plots (**A-E**) represent Manders overlap coefficient of RNF13 over (**A**) EEA1, (**B**) Lamp1, (**C**) Rab5, (**D**) Rab7 or (**E**) Rab9. For each condition analyzed: N=3, n=30 cells. Values are expressed as mean ± SEM. Not significant (ns), *** $p = 0.0004$ or **** $p < 0.0001$ using one-way ANOVA with the Kruskal-Wallis test. The jitter strip plots ((**F**), EEA1; (**G**), Lamp1; (**H**), Rab5; (**I**), Rab7; (**J**), Rab9) represent the diameter of the five largest vesicles for each cell. For each

condition analyzed: N=3, n=15 cells, 75 vesicles. Values are expressed as mean ± SEM. Not significant (ns) or **** $p < 0.0001$ using one-way ANOVA with the Kruskal-Wallis test.

During our analyses regarding the intracellular distribution of RNF13, we noticed that some vesicles appeared to be larger when cells were expressing RNF13 L311S or L312P compared to WT. Therefore, we measured the diameter of the largest vesicles positive for various markers of the endolysosomal pathway. Importantly, due to previous report showing that ectopic expression of RNF13 WT can causes various cellular phenotypes (Saito *et al.*, 2005; van Dijk *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2010), we also assessed the vesicles diameter in non-transfected (NT) cells. We found that the RNF13 L311S and L312P protein variants significantly increased the size of EEA1-positive vesicles by approximately 20% when compared to WT (Fig. 2.1F; **** $p < 0.0001$). A similar trend was found with Lamp1-positive vesicles (Fig. 2.1G; **** $p < 0.0001$), Rab5-positive vesicles (Fig. 2.1H; **** $p < 0.0001$) and Rab7-positive vesicles (Fig. 2.1I; **** $p < 0.0001$). Conversely, the presence of RNF13 L311S or L312P variants significantly decreased the diameter of Rab9-positive vesicles by approximately 25% (Fig. 2.1J; **** $p < 0.0001$). Overall, our results show no significant difference between NT and WT RNF13 for every marker (Fig. 2.1F-J; ns$P > 0.9999$), whereas both RNF13 variants L311S and L312P significantly alter the size of vesicles belonging to the endolysosomal system.

2.5.2 RNF13 variants L311S and L312P alter EGF sorting at early endosomes

Our findings suggest that RNF13 variants affect the endolysosomal system. The EGF receptor (EGFR) is a useful tool to study the trafficking and dynamics of the endolysosomal system. Upon EGF stimulation, EGFR is rapidly internalized and trafficked to be degraded in lysosomes (Ceresa et Peterson, 2014; Yasa *et al.*, 2020). To determine whether EGFR trafficking is altered by RNF13 protein variants, we performed a ligand-based EGF pulse-chase endocytosis experiment in transfected HeLa cells. Following a 5-minute pulse with fluorescent EGF complex, a chase period was performed for up to 60 minutes. By using fluorescence microscopy, EGF and EEA1 fluorescence signals were obtained to track the progression of EGF in the endolysosomal system (Fig. 2.2A). First, to evaluate the degradation of EGF over time, we analyzed the number of EGF puncta remaining after each timepoint. When HeLa cells expressed RNF13 WT, the number of puncta gradually decreased over time (Fig. 2.2B). Similar results were also obtained for RNF13 L311S, RNF13 L312P and NT control cells (Fig. 2.2B) with no significant difference when compared to WT. These results suggest that the degradation rate of EGF remains similar for all the conditions. Thus, we wondered if the progression of EGF in the endolysosomal system was also similar. We determined the Pearson's coefficient by analyzing the colocalization between EGF and EEA1 for each

condition and timepoint (Fig. 2.2C). For RNF13 WT, the Pearson's coefficient gradually decreased over time (Fig. 2.2C). Interestingly, a significant decrease was observed at t=0 for both RNF13 L311S and RNF13 L312P when compared to WT while NT was not significantly different. While there was no difference observed at 15 mins between all the conditions (Fig. 2.2C), we measured a significant difference between NT and WT at 30 mins while there was no significant difference between WT and the variants. At 60 mins, no difference was found between the conditions (Fig. 2.2C). Together, these results suggest that RNF13 variants L311S and L312P alter EGF trafficking at the early endosomes but do not affect the overall degradation.

2.5.3 RNF13 variants L311S and L312P do not alter transferrin trafficking

As described above, the variants L311S and L312P alter EGF sorting at the early endosomes. To test if other receptor trafficking may also be affected by the presence of RNF13 variants, we explored transferrin (Tf) uptake and trafficking. Similar to EGFR, Tf receptor (TfR) trafficking is a well-known and useful mean to study the dynamics of the recycling pathway. Upon stimulation with Tf, TfR are internalized and sent to the early endosomes where they deliver iron before being recycled back to the plasma membrane (Mayle *et al.*, 2012). To determine if RNF13 protein variants affect Tf trafficking, transfected HeLa cells were starved and briefly incubated with fluorescent human Tf before allowing internalization of the fluorescent Tf cargo for a period up to 60 minutes (Fig. 2.S2). Similar to the EGF analysis (Fig. 2.2), endogenous labelling of EEA1 was performed to track the progression of Tf within the endolysosomal system over time. Our results show that the number of Tf puncta decreased without a significant change for the first 30 minutes in cells expressing L311S and L312P compared to WT (Fig. 2.S2A-B). After 60 minutes, there were almost no detectable Tf puncta remaining in NT cells or in cells expressing RNF13 WT, L311S, or L312P (Fig. 2.S2A-B). These results suggest that RNF13 L311S and L312P do not affect Tf recycling. To evaluate the progression of Tf in the endolysosomal system, we analyzed the colocalization between Tf and EEA1 for each condition (Fig. 2.S2C). The measured Pearson's coefficients slowly decreased over time but did not significantly change between each timepoint in any of the four conditions (Fig. 2.S2C). Overall, our results suggest that the RNF13 genetic variants L311S and L312P do not affect Tf trafficking.

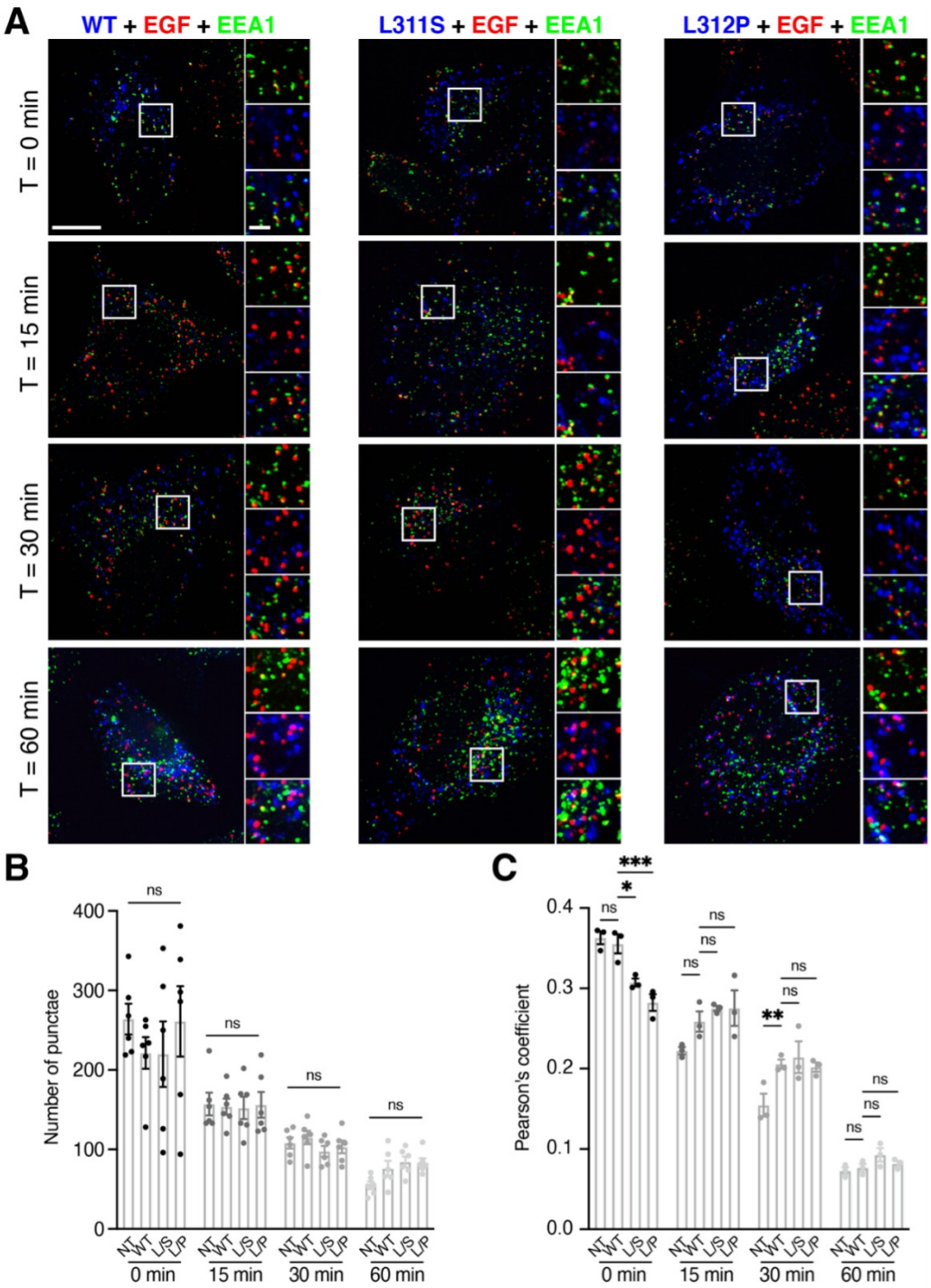


Figure 2.2: RNF13 variants L311S and L312P alter EGF sorting at early endosomes.

(**A-C**) Starved HeLa cells transiently expressing RNF13-HA WT, L311S or L312P were incubated with EGF for 5 minutes. Live cells were washed and incubated in fresh culture medium for the indicated time before being fixed, permeabilized, and labeled with specific primary antibody against HA (RNF13) and endogenous EEA1. (**A**) Representative images show EGF (red) with RNF13 (blue) and early endosome marker EEA1 (green). Scale bar = 10 µm. Boxed areas are shown at higher magnification (scale bar = 2 µm). (**B**) Quantitation of the average number of EGF puncta per cell. The bar graph presents the mean ± SEM while the strip plot represents the distribution of the average number of EGF puncta for each independent

experiment. Analyses were performed on 6-9 cells within 5 fields of view collected for each of the six independent experiments (N=6, total of 41 to 50 cells per condition). Not significant (ns) using two-way ANOVA with multiple comparison. (**C**) Quantitation of overlap between EGF and EEA1. The bar graph presents the mean ± SEM while the strip plot represents the distribution of the averaged Pearson's coefficient of each independent experiment analyzed (N=3). Each condition contains 37 to 45 cells. Not significant (ns), * $p = 0.0155$, ** $p = 0.0093$ or *** $p = 0.0002$ using two-way ANOVA with multiple comparisons.

2.5.4 RNF13 variant L311L312/AA shows reduced presence in lysosomes and increases endosomal vesicle size

RNF13 variants L311S and L312P change the dileucine motif of the WT protein (Edvardson *et al.*, 2019). The WT RNF13 307-EHTPLL-312 motif resembles to a canonical [D/E]xxxL[L/I]-type dileucine sorting signal known for binding cellular adaptor protein (AP) complexes and appropriately routing several transmembrane proteins, including vesicle-associated membrane protein 4 (VAMP4), cluster of differentiation 4 (CD4), and vesicular monoamine transporter 1 (VMAT1) (Bonifacino et Traub, 2003). Since classical examination of the roles of dileucine motifs in membrane protein trafficking usually relies on the replacement of the hydrophobic dileucine residues with alanines to obtain a non-functional motif (Bonifacino et Traub, 2003), we therefore generated the putative AP-binding defective RNF13 mutant L311L312/AA (hereafter identified as LL/AA). First, we first examined whether the RNF13 LL/AA mutant phenotypically behaves similarly to L311S and L312P variants that, as shown in figure 2.1, exhibit an altered lysosomal localization while increasing endolysosomal vesicle size. Our results show that WT or LL/AA proteins do not overlap with EEA1 in transfected HeLa cells (Fig. 2.3A). We observed that the RNF13 LL/AA exhibits a diminished overlap with Lamp1 as compared with RNF13 WT (Fig. 2.3B, **** $p < 0.0001$). Additionally, late endosomal marker Rab7 overlaps with both WT and LL/AA (Fig. 2.3C), a result highly similar to the variants L311S and L312P (Fig. 2.1D). To assess the impact of RNF13 LL/AA on endolysosomal vesicle morphology, we measured the diameter of the largest vesicles and found that RNF13 LL/AA significantly increased the size of EEA1-positive vesicles (Fig. 2.3D; **** $p < 0.0001$), Lamp1-positive vesicles (Fig. 2.3E; **** $p < 0.0001$), and Rab7-positive vesicles (Fig. 2.3F; **** $p < 0.0001$). Once again, no difference was observed between overexpressed RNF13 WT and NT cells (Fig. 2.3D-F). Overall, our results show that RNF13 LL/AA recapitulates the cellular phenotypes of L311S and L312P variants and support that RNF13 having an altered EHTPLL dileucine motif cannot be properly localized to lysosomes.

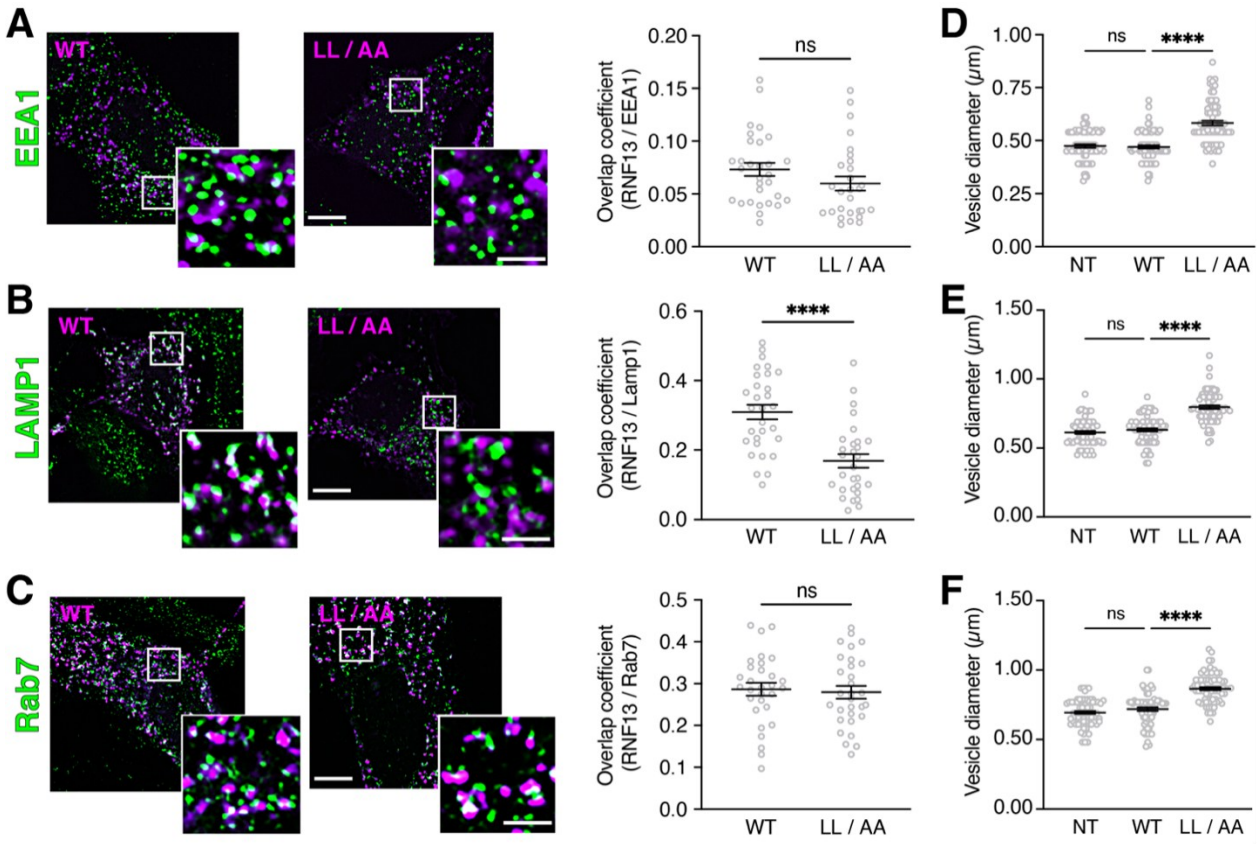


Figure 2.3: Altered lysosomal targeting of RNF13 L311L312/AA mutant increases the size of endolysosomal vesicles.

(**A-C**) Plasmid constructs encoding HA-tagged RNF13 WT or LL/AA were transiently expressed in HeLa cells. Cells were fixed, permeabilized, and labeled with specific primary antibody against HA (RNF13) and against the endogenous subcellular markers. Representative images from three independent experiments (N=3) show RNF13-HA (in purple) and (**A**) early endosome marker EEA1, (**B**) lysosome marker Lamp1, and (**C**) late endosome marker Rab7 (in green). Scale bars indicate 10 µm for whole cell image and 2 µm for the boxed area shown at higher magnification. The jittered individual value plots (**A-C**) represent Manders overlap coefficient of RNF13 over (**A**) EEA1, (**B**) Lamp1, and (**C**) Rab7. For each condition analyzed: N=3, n=30 cells. Values are expressed as mean ± SEM. Not significant (ns) or **** $p < 0.0001$ using the Mann-Whitney test. (**D-F**) The jittered individual value plots ((**D**), EEA1; (**E**), Lamp1; (**F**), Rab7) represent the diameter of the five largest vesicles for each cell. For each condition analyzed: N=3, n=15 cells, 75 vesicles. Values are expressed as mean ± SEM. Not significant (ns) or **** $p < 0.0001$ using one-way ANOVA with the Kruskal-Wallis test.

2.5.5 RNF13 variants L311S and L312P do not interact with AP-3 complex

Thus far, our results demonstrate that an intact dileucine motif within RNF13 is required for its appropriate lysosomal localization. Because intact dileucine motif are critical for binding AP complexes, we hypothesized that RNF13 would bind to AP complex and that dileucine variants, either L311S, L312P, or LL/AA, would greatly reduce if not completely abrogate the interaction with AP complexes. Amongst the

five AP complexes that exist, only AP-1, AP-2, and AP-3 appear to recognize dileucine-based ([D/E]xxxL[L/I]) signals (Park et Guo, 2014). Given that AP-3, which is responsible for transport from tubular endosomes to late endosomes and for the biogenesis of lysosome-related organelles (Park et Guo, 2014), has been recently identified by mass spectrometry analyses to bind RNF13 (Huttlin *et al.*, 2017; Huttlin *et al.*, 2015), we thus investigated whether RNF13 variants L311S and L312P variants can associate with AP-3. First, in a GST-pulldown assay, endogenous AP-3 complexes found in HEK293T/17 cell lysate were incubated with purified GST-fused RNF13 intracellular domain (amino acids 281-381) proteins immobilized on glutathione-functionalized sepharose 4B affinity resin. AP-3 complex binding to RNF13 WT was compared to variants L311S and L312P, and to the anticipated RNF13 AP-binding defective LL/AA mutant. Specific immunoblotting of GST pulldown assay samples revealed that AP3S1 and AP3D1 subunits of the AP-3 complex bind to RNF13 WT (Fig. 2.4A). In contrast, AP-3 subunits do not interact with either RNF13 LL/AA or the variants L311S and L312P (Fig. 2.4A). Next, we assessed whether RNF13 binds AP-3 complex in a cellular context by expressing HA-tagged RNF13 WT, L311S, L312P, or LL/AA in HEK293T/17 cells. HA-tagged RNF13 proteins were immunoprecipitated with an anti-HA before the presence of AP-3 complex in the immunopurified proteins was determined using AP3S1 and AP3D1 antibodies. The results show that RNF13 WT binds to AP-3 complex while all the variants fail to do so (Fig. 2.4B). Together, those results demonstrate that the tested mutations in RNF13 dileucine motif alter interaction with the AP-3 complex.

2.5.6 Model of RNF13 and AP3S1 complex association

To better understand the importance of the dileucine motif for RNF13-AP3S1 complex formation, we generated a model of the complex using AlphaFold (Fig. 2.5). Our model shows that the 307-ETHPLL-312 motif of RNF13 interacts with AP3S1. Specifically, the dileucine motif of RNF13 is inserted in a hydrophobic cavity of AP3S1, and interacts with AP3S1 residues Val105, Leu71, Tyr68, Val94, as well as with the aliphatic portions of Glu95 and Asp98 (Fig. 2.5). Leu311 of RNF13 seems to be especially important for the complex since this residue is located in a deeper hydrophobic pocket of AP3S1 (Fig. 2.5). In the case of RNF13 Leu312, although it is close to polar residues, it mostly interacts with the hydrophobic regions of these residues (Fig. 2.5). Our model also shows that the loop containing the dileucine motif is maintained in a configuration suitable for AP3S1 interaction through hydrogen bonding between Thr309 and Arg313 and through hydrophobic packing between Pro310 and the aliphatic portion of Arg313 (Fig. 2.5). Overall, this analysis illustrates the importance of the dileucine motif and neighboring residues in the interaction between RNF13 and AP3S1.

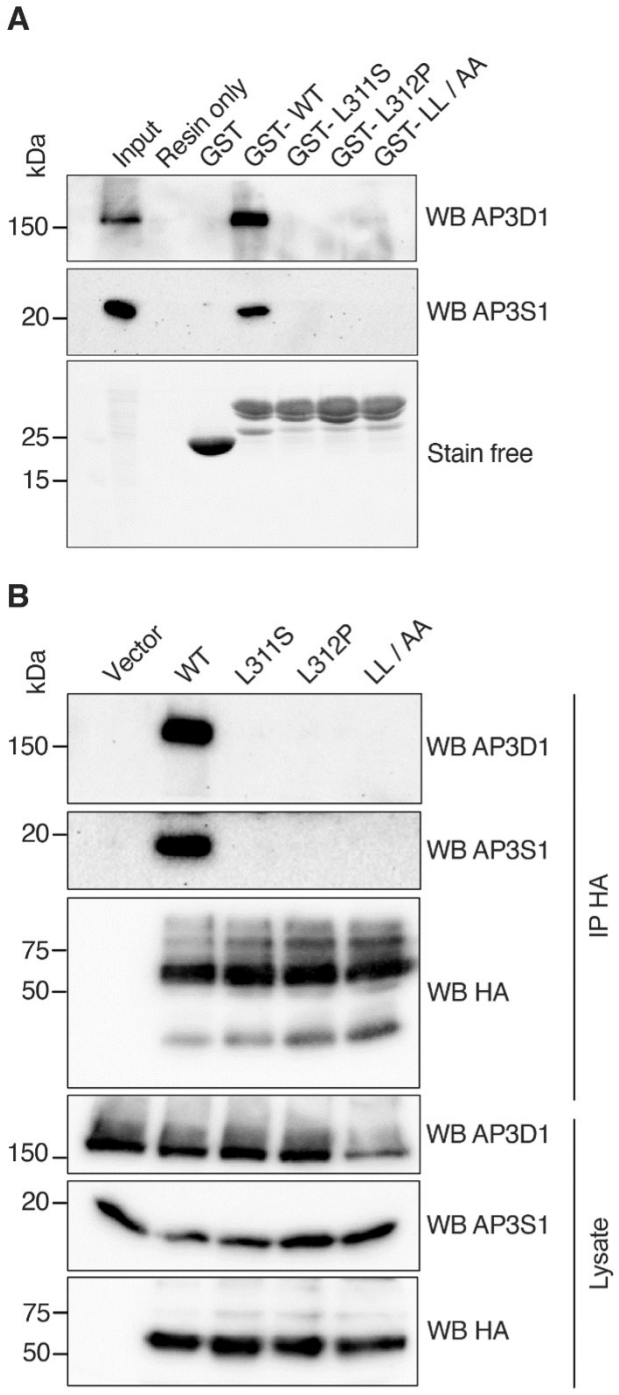


Figure 2.4: Alterations of the dileucine motif of RNF13 abrogates AP-3 complex binding.

(**A**) GST pulldown was performed with HEK293T/17 cell lysate incubated in the presence or absence of GST or purified GST-RNF13 (aa 281-381; WT, L311S, L312P, or LL/AA) immobilized on glutathione-functionalized sepharose 4B affinity resin. Complex formation was performed overnight at 4°C, followed by washes and elution in 2x Laemmli buffer. Proteins were separated on SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane which was immunoblotted using specific primary antibodies against AP3S1 and AP3D1. Representative immunoblots from three independent experiments (N=3) are shown. (**B**) Plasmid constructs

encoding HA-tagged WT, L311S, L312P, or LL/AA RNF13 were transiently expressed in HEK293T/17 cells. Following lysis, cell lysates were incubated for 2h at 4°C and anti-HA immunoprecipitated complexes were washed and eluted in 2x Laemmli buffer. Proteins were separated on SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane which was immunoblotted using specific primary antibodies against AP3S1, AP3D1 and HA (RNF13). Representative immunoblots from three independent experiments (N=3) are shown.

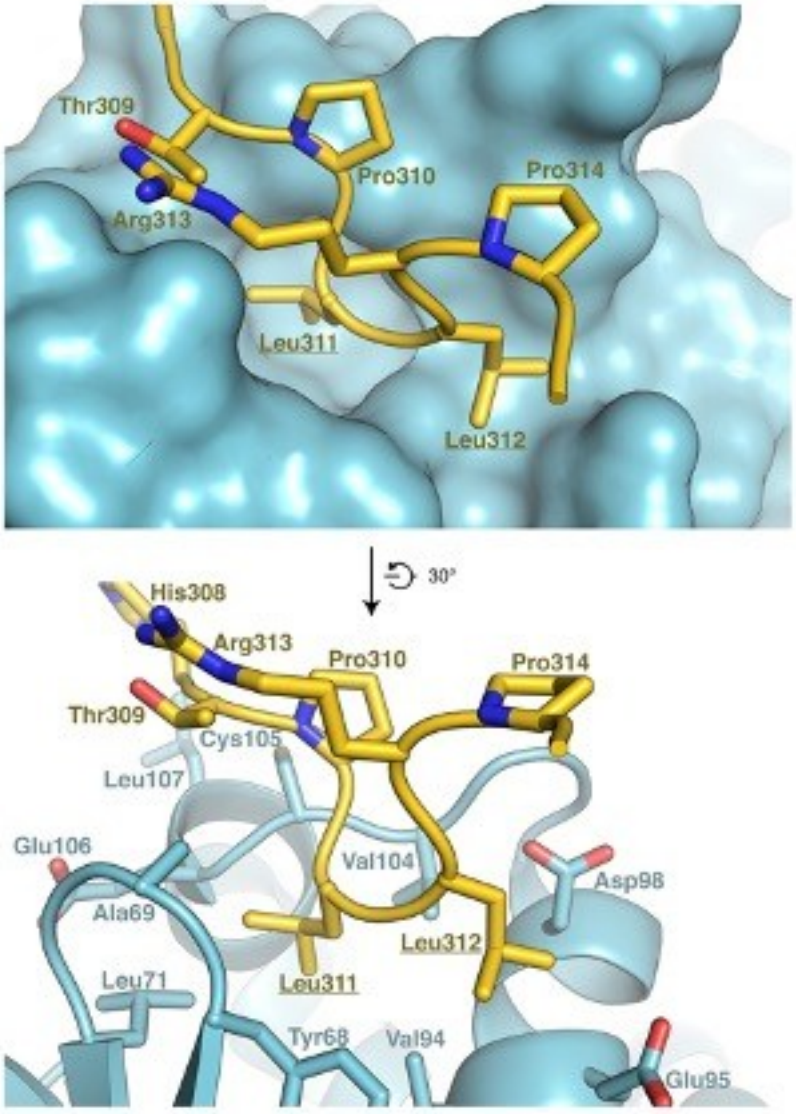


Figure 2.5: Predicted structure of a complex between AP3S1 and RNF13.

The interaction between RNF13 in yellow and AP3S1 in blue was predicted using AlphaFold. Top panel shows RNF13 in sticks and AP3S1 in surface representation. Bottom panel shows RNF13 and AP3S1 in stick representation. In both panels, the two leucine residues which are mutated in DEE73 are underlined. The residues of RNF13 that do not interact with AP3S1 were omitted from the figure for clarity.

2.5.7 Knockdown of AP-3 gene expression reduces RNF13 localization to lysosomes

Based on our findings, the RNF13/AP-3 complex association appears to regulate the targeting of RNF13 to lysosomes. As AP-3 plays a role in trafficking membrane protein to lysosomes (Park et Guo, 2014), we speculate that AP-3 might regulate the lysosomal localization of RNF13. To investigate the role of endogenous AP-3 expression on RNF13, we used Dicer-substrate siRNA (DsiRNA) duplexes to knockdown the delta subunit of AP-3 (AP3D1). After HeLa cells were transfected with a nontargeting control (CTL) and three DsiRNA against AP3D1 for 72h, cell lysate proteins were probed with specific antibody (Fig. 2.6A). We found that AP3D1 relative protein abundance has significantly declined with DsiRNAs #1 and #2 but not with DsiRNA #3 (Fig. 2.6A; CTL: 100%; siAP3D1 #1: 3.723% ± 1.337%; * $p = 0.0262$; siAP3D1 #2: 5.264% ± 2.589%; * $p = 0.0364$; siAP3D1 #3: 37.13% ± 11.99%; ns$P = 0.9143$). We then characterized the impact of reducing AP3D1 expression on RNF13 lysosomal localization and vesicle morphology. First, Lamp1 and Rab7 exhibit similar distribution and fluorescence intensity in the presence of siAP3D1 when compared to CTL (Fig. 2.6B, E). These results show that AP-3 knockdown does not affect the markers for our vesicles of interest. However, while RNF13 WT overlaps greatly with Lamp1 in control conditions (Fig. 2.6B-C), AP3D1 knockdown using both siAP3D1 #1 and #2 extensively reduce RNF13 WT and Lamp1 colocalization (Fig. 2.6B-C). These observations were confirmed using the Manders coefficients, which display a significant reduction in overlapping between RNF13 WT and Lamp1 in presence of siAP3D1 #1 and #2 when compared to control (Fig. 2.6C; *** $p = 0.0001$ and **** $p < 0.0001$). We next assessed the impact of AP-3 knockdown on endolysosomal vesicle morphology by measuring the diameter of the largest vesicles positive for Lamp1 and found that siAP3D1 #1 and #2 significantly increased the size of Lamp1-positive vesicles independently of RNF13 WT presence or absence when compared to siCTL (Fig. 2.6D). When investigating the effect of abrogating AP3D1 expression with the late endosomal marker Rab7, we found that RNF13 WT overlaps with Rab7 in control and AP3D1 depleted cells and that there is no difference in Manders overlap coefficients for each condition when compared to control (Fig. 2.6E-F). Finally, our results show that AP3D1 knockdown significantly increased the size of Rab7-positive vesicles independently of RNF13 WT presence or absence when compared to siCTL (Fig. 2.6G). Overall, our results suggest that RNF13 targeting to lysosomes depends on its association with the AP-3 complex, and that this association is critical for endolysosomal vesicle size.

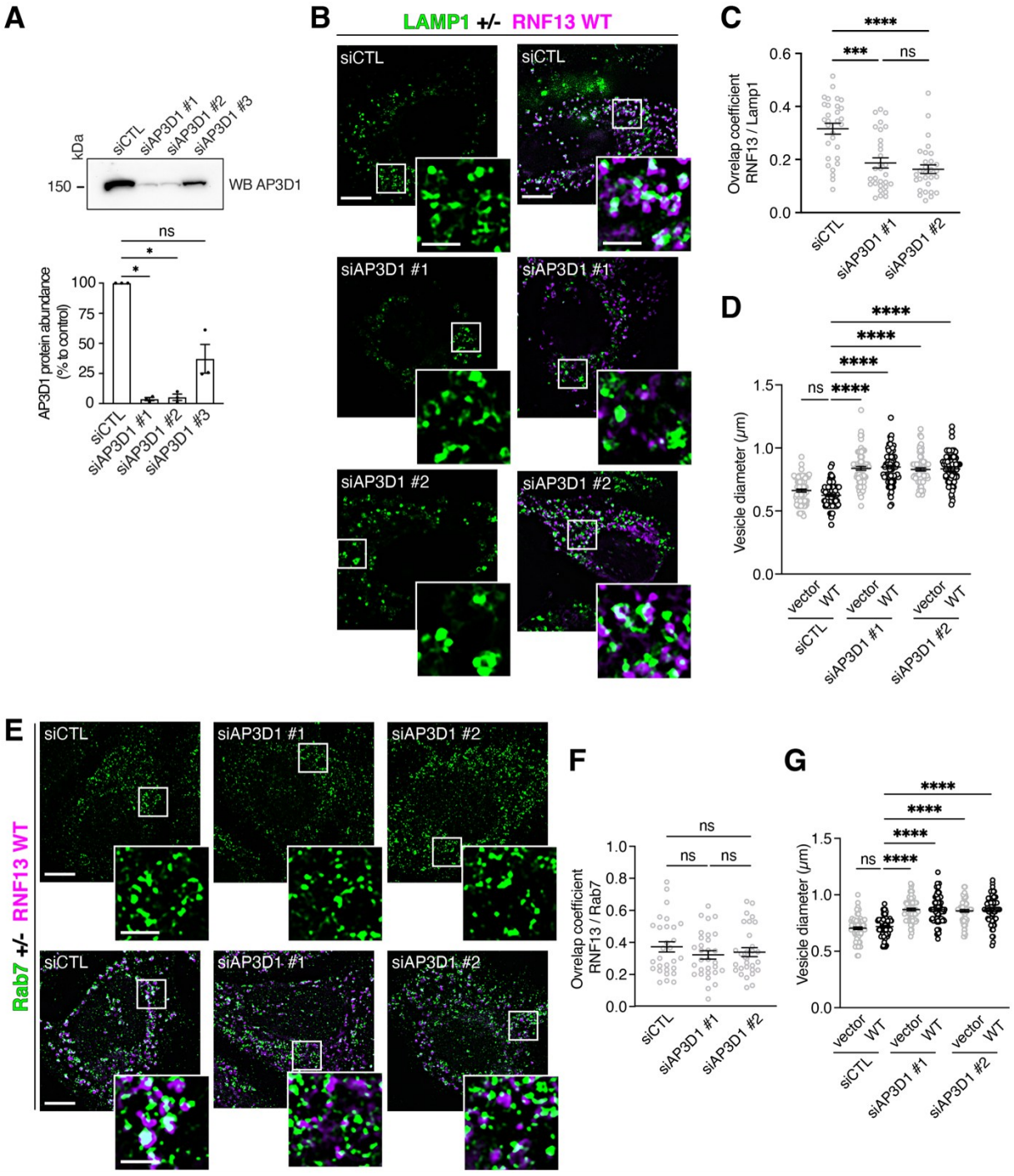


Figure 2.6: Knockdown of AP-3 interferes with RNF13 localization to lysosomes.

(**A**) HeLa cells were transfected using 10 nM of Dicer-substrate siRNAs (DsiRNAs) specific against AP3D1 or nontargeting (siCTL). Three DsiRNAs specific against AP3D1 were tested. 72 hours after transfection, cells were lysed and diluted in Laemmli buffer. Proteins were separated on SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane which was immunoblotted using specific primary antibody against AP3D1. Band densities were analyzed and normalized to the band density of CTL lane using ImageLab software. The bar graph presents the mean ± SEM while the strip plot represents the averaged relative protein abundance of

each independent experiment analyzed (N=3). Not significant (ns) or * $p < 0.05$ using one-way ANOVA with the Kruskal-Wallis test. (**B-G**) HeLa were transfected using 10 nM of DsiRNAs #1, #2 or siCTL for 72 hours. 24 hours prior to fixation, cells were transfected with either a plasmid construct encoding HA-tagged RNF13 WT or an empty vector. Cells were fixed, permeabilized, and labeled with specific primary antibody against HA (RNF13) and against the endogenous subcellular markers. Representative images from three independent experiments (N=3) show RNF13-HA (in purple) and (**B**) lysosome marker Lamp1 and (**E**) late endosome marker Rab7 (in green). Scale bars indicate 10 µm for whole cell image and 2 µm for the boxed area shown at higher magnification. The jittered individual value plots (**C, F**) represent Manders coefficient of RNF13 over (**C**) Lamp1 or (**F**) Rab7. For each condition analyzed: N=3, n=30 cells. Values are expressed as mean ± SEM. Not significant (ns), *** $p = 0.0001$ or **** $p < 0.0001$ using one-way ANOVA with the Kruskal-Wallis test. The jittered individual value plots (**D, G**) represent the diameter of the five largest vesicles for each cell. For each condition analyzed: N=3, n=15 cells, 75 vesicles. Values are expressed as mean ± SEM. Not significant (ns) or **** $p < 0.0001$ using one-way ANOVA with the Kruskal-Wallis test.

2.6 Discussion

Eukaryotic cells use several intracellular compartments where resident proteins must be appropriately directed for normal organelle function. Aberrant location and targeting of a protein can be caused by mutation, altered expression of cargo proteins, or disruption of the routing machinery all of which can lead to protein inactivation, loss of protein-protein interaction, or harmful activity in the wrong compartment (Hung et Link, 2011; Laurila et Vihinen, 2009). A recent study reported two missense genetic mutations in the gene encoding the ubiquitin ligase RNF13, resulting in protein variants L311S and L312P (Edvardson *et al.*, 2019). The lack of molecular understanding regarding the biological impact of RNF13 variants prompted us to better define the cellular mechanisms associated with RNF13. By using a fluorescence microscopy approach, the present study shows that WT RNF13 is localized to endosomes and lysosomes, while the presence of RNF13 variant proteins L311S and L312P in lysosomes is reduced. Furthermore, our results show that RNF13 variant proteins L311S and L312P affect the morphology of endosomal vesicles as well as the temporal and spatial progression of fluorescent EGF but not Tf cargos in the endolysosomal system. Interestingly, our results demonstrate that AP-3 complex interaction with RNF13 variants L311S and L312P, as well as the RNF13 AP-binding defective variant LL/AA, is abrogated, whereas the tested RNF13 variant proteins similarly affect vesicle size and lysosomal localization. Finally, knockdown of the AP3D1 subunit leads to a reduced presence of RNF13 WT in lysosomes and a similar alteration of the morphology of endosomal vesicles, as observed with the RNF13 variants.

Our analyses of endolysosomal vesicles exposed significant differences between RNF13 WT and the variants. Indeed, significantly smaller Rab9-positive vesicles were found with L311S and L312P variants, whereas Rab5-, Rab7-, EEA1- and Lamp1-positive vesicles were significantly enlarged. Over the years,

multiple mechanisms have been shown to produce enlarged endosomes. For instance, it is known that a defect in endosome maturation, such as the disruption of the Rab5-to-Rab7 switch, results in enlarged early endosomes (Girard *et al.*, 2014; Kälin *et al.*, 2015; Poteryaev *et al.*, 2010). Interestingly, overexpression of Rab5 or expression of a constitutively active mutant, Rab5Q79L, causes enlarged endosomes by accelerating the rate of endocytosis (Bucci *et al.*, 1992; Stenmark *et al.*, 1994). However, some studies have shown that even in the presence of enlarged early endosomes, Tf trafficking is not necessarily altered (Girard *et al.*, 2014; Hassink *et al.*, 2012; Rosenfeld *et al.*, 2001). Concordantly, in our study, even though early endosomes are enlarged in cells expressing RNF13 L311S and L312P, trafficking of Tf is not altered. Furthermore, EGF degradation is similar between WT- and variant-expressing cells. Based on the colocalization of EEA1 with EGF, but not Tf, EGF seems to pass through early endosomes of L311S- and L312P-expressing cells at a different rate when compared to WT. The significance of this result requires further investigation. Our analyses also demonstrate that a similar amount of EGF remains at both 30 and 60 mins, implying that the late endocytic pathway retains efficient trafficking/sorting of endocytosed cargo. In this context, if the endocytic rate is altered with the RNF13 L311S and L312P variants but EGF degradation is similar for the variants and WT RNF13, this may reveal an altered function of the enlarged late endosomes/lysosomes.

In this study, RNF13 WT primarily overlaps with endolysosomal markers, as previously reported elsewhere (Bocock *et al.*, 2009; Bocock *et al.*, 2010; van Dijk *et al.*, 2014), in contrast with RNF13 being described in the ER (Arshad *et al.*, 2013; van Dijk *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2009). While we are unsure of the reason for the discrepancy between the reported ER and endolysosomal localizations, a possible explanation could be the use of different constructs. Specifically, since RNF13 has a signal peptide on the N-terminus that is needed for its proper biosynthesis, we positioned a HA-tag at the C-terminus, which rarely interferes with the normal function and distribution of proteins (Kimple *et al.*, 2013). Because we did not find a suitable antibody to verify intracellular localization of endogenous RNF13, we used a GFP-fused protein to test whether both constructs would give similar results regarding intracellular localization. Under our tested conditions, the overall vesicle-looking localization of HA-tagged RNF13 protein was indiscernible from RNF13-GFP (Fig. 2.S3). Another putative explanation for the discrepancy between our results consistently showing an endolysosomal localization for RNF13 rather that an ER localization could be the use of different cell lines. In fact, HeLa cells were previously used as study model, where the authors reported that RNF13 possess an endolysosomal localization (Bocock *et al.*, 2009; Bocock *et al.*, 2010), which is fully consistent with our study. Regarding the RNF13 L311S and L312P variants, they did not mislocalize, at steady-state, to the ER or the Golgi, suggesting that variant proteins are likely trafficked adequately within these organelles of the biosynthetic pathway (Figure 2.S1). However, knowing that ER stress responsiveness

and apoptosis signaling are two functions previously reported for RNF13 (Edvardson *et al.*, 2019), we speculated that RNF13 WT and L311S and L312P variants could accumulate in the ER when cells are treated with ER stress-inducing drugs (Arshad *et al.*, 2013). After using the ER Ca^{2+}-ATPase inhibitor, thapsigargin, or the N-glycosylation inhibitor, tunicamycin, we did not detect an increased accumulation of RNF13 WT or the variant proteins in the ER (Figure 2.S4). Therefore, it would be rather surprising if the RNF13 L311S and L312P variant proteins increased apoptosis through ER accumulation. However, since mounting evidence suggests that organelles, such as the ER, the lysosomes, and the Golgi apparatus, are major integrators of pro-apoptotic signaling (Ferri et Kroemer, 2001), our results cannot exclude that RNF13 variants may be facilitating, from an endosomal location, apoptosis signaling as observed in L311S-expressing patient-derived cells (Edvardson *et al.*, 2019).

Our study uncovered that RNF13 L311S and L312P variants enlarge lysosomes in HeLa cells. Enlarged lysosomes are observed in a variety of diseases, such as Charcot-Marie-Tooth, Chediak-Higashi syndrome, and lysosomal storage disorders (LSD), which include approximately 50 genetic diseases (de Araujo *et al.*, 2020). LSD are caused by deficiencies in lysosomal or non-lysosomal resident proteins. These deficiencies may be due to genetic alterations that disturb the synthesis or transport of lysosomal proteins and contribute to enlarged lysosomal structures (de Araujo *et al.*, 2020). Typically, enlarged lysosomes are caused by the accumulation of nondegradable material and has multiple impacts on other organelles and overall cell function (Platt *et al.*, 2012). However, enlarged lysosomes does not necessarily indicate an endocytic degradation dysfunction. Indeed, mutations in the lysosomal trafficking regulator protein (LYST) cause Chediak-Higashi syndrome, a rare autosomal recessive disease characterized by enlarged intracellular vesicles. A study conducted by Holland *et al.* (2014) showed that RNA-depletion of LYST recapitulates the disease phenotype and, despite enlarged lysosomes, depletion of LYST protein does not affect normal rates of degradation (Holland *et al.*, 2014). Specifically, depletion of LYST protein did not affect EGF degradation and Tf trafficking, similarly to what we obtained with RNF13 variants L311S and L312P (Holland *et al.*, 2014). However, accumulation of unmetabolized substrates in lysosomes can lead to alteration of lipid trafficking and calcium homeostasis or to increase oxidative stress, inflammation, autophagy and/or ER stress (Vitner *et al.*, 2010). Compatibly, cultured cells derived from patients with different types of LSD showed that apoptosis was induced by ER and oxidative stresses (Wei *et al.*, 2008). Based on our results and the hereabove cited studies, it is therefore highly plausible that endosomal RNF13 variant proteins L311S and L312P may alter lysosomal function and cellular homeostasis, leading to the modification of apoptotic signaling. Accordingly, this hypothesis would support the increase in apoptosis markers spliced XPB1 and phosphorylated c-Jun in cells derived from an individual carrying the L311S

variant (Edvardson *et al.*, 2019). Future studies will be required to test this highly speculative molecular mechanism.

The AP complexes are heterotetrameric protein complexes that regulate intracellular trafficking (Park et Guo, 2014). Five AP complexes, known as AP-1, AP-2, AP-3, AP-4, and AP-5, are each composed by two large subunits (γ/α/δ/ε/ζ and β1-5, respectively), one medium-sized subunit (μ1-5), and one small-sized subunit (σ1-5), and each AP complex has a specific localization and function (Park et Guo, 2014). Consistent with the [D/E]xxxL[L/I]-type dileucine canonical sorting signal (Edvardson *et al.*, 2019) being recognized by AP-1, AP-2, and AP-3 (Park et Guo, 2014), our data support a model where RNF13 undergoes AP-dependent intracellular routing. AP-1 is associated with the trans-Golgi network, early and recycling endosomes whereas AP-2 is mostly found at the plasma membrane (Sanger *et al.*, 2019). Because our results with RNF13 variants L311S and L312P show a reduced presence in lysosomes, and based on the predicted model, we have exclusively studied the AP-3 complex, since this AP mediates transport from tubular endosomes to late endosomes and lysosomes and is involved in the biogenesis of lysosome-related organelles (Park et Guo, 2014; Sanger *et al.*, 2019). We demonstrate that the variants L311S and L312P alter the 307-EHTPLL-312 dileucine motif of RNF13 protein and consequently modify the intracellular distribution, likely due to a lost ability to bind AP-3, whereas the gene repression of AP-3 alters RNF13 targeting to lysosomes. In addition to AP-3, other AP complexes are expected to bind the dileucine motif of RNF13. Supporting this affirmation, recent studies used affinity-purification and mass spectrometry analyses and found that the σ (isoform 2) subunit of AP-1, as well as the δ and σ (isoform 1 and 2) subunits of AP-3 complexes, bind to RNF13 (Huttlin *et al.*, 2017; Huttlin *et al.*, 2015; Park et Guo, 2014). Interestingly, the 470-DERAPLI-476 and 509-EEKQPLL-515 signals of lysosome membrane protein 2 (LIMP-II) and tyrosinase (TYR), respectively, bind to AP-3 but not AP-1 and AP-2, whereas motifs such as 2-DDQRDLI-8 and 11-NEQLPML-17 of the invariant chain (Ii) preferentially bind to AP-1 and AP-2 but not to AP-3 (Bonifacino et Traub, 2003; Hofmann *et al.*, 1999; Höning *et al.*, 1998). Interestingly, the interaction between the [D/E]xxxL[L/I] motif and specific AP complexes seem to be dictated by the "x" residues and both AP-3 interacting proteins LIMP-II and TYR have a proline in the -1 position of the first leucine (Bonifacino et Traub, 2003). In this context, our model shows that RNF13 proline at position 310 (Pro310) interacts with the arginine 313, thus strongly suggesting that Pro310 generates a favorable structure for binding the AP3S1 subunit of AP-3 complex. Nevertheless, further studies will be required to validate not only the importance of the Pro310 for the formation of the RNF13-AP-3 complex, but also to investigate the function of the other residues within or surrounding the RNF13 dileucine motif.

An intriguing element in our study is the fact that gene expression of the AP3 δ subunit reduces the presence of WT RNF13 in Lamp1-positive structures, whereas AP3D1 knockdown does not affect RNF13 presence in Rab7-positive vesicles. Accordingly, these results are supported by our data, showing that RNF13 variants are present in Rab7-positive vesicles without being in Lamp1-positive vesicles. Knowing that Rab7 is critical for controlling many aspects of endosomal dynamics such as fusion of late endosomes with lysosomes, our data strongly suggest that the routing of RNF13 variants to late endosomes (Rab7-positive structures) occurs normally and through an AP-3-independent pathway, whereas RNF13 lysosomal localization requires AP-3 binding. To explain the proper late endosomal localization of RNF13, it is possible that RNF13 intracellular routing is similar to the NPC intracellular cholesterol transporter 1 (NPC1) protein. NPC1 predominantly localizes to late endosomes and has a C-terminal dileucine motif (Berger *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2004) that allows its late endosomal targeting through AP-3 binding (Berger *et al.*, 2007). Mutation of NPC1 dileucine motif leads to an increased trafficking via the plasma membrane, such that the NPC1 still ends up in its proper late endosomal location, suggesting that other signals contribute to NPC1 targeting (Scott *et al.*, 2004). It should be noted that the plasma membrane positioning of RNF13 was suggested previously (Bocock *et al.*, 2009) but the biological significance and the mechanism involved in the process remains currently unknown. Our study strongly supports that AP-3 has an important role in regulating RNF13 trafficking, but we cannot exclude that other signals within RNF13 and other molecular entities are contributing to RNF13 proper localization. Nonetheless, RNF13 presence in lysosomes seems to be important for proper endolysosomal vesicle morphology, because we observed a similar phenotype for all variants and AP-3 knockdown. It is possible that modified binding of RNF13 L311S and L312P with the AP-3 complex alters endolysosomal structure and dynamics because of abnormal RNF13 trafficking to lysosomes, where it would normally achieve its cellular function.

2.7 Supplementary materials

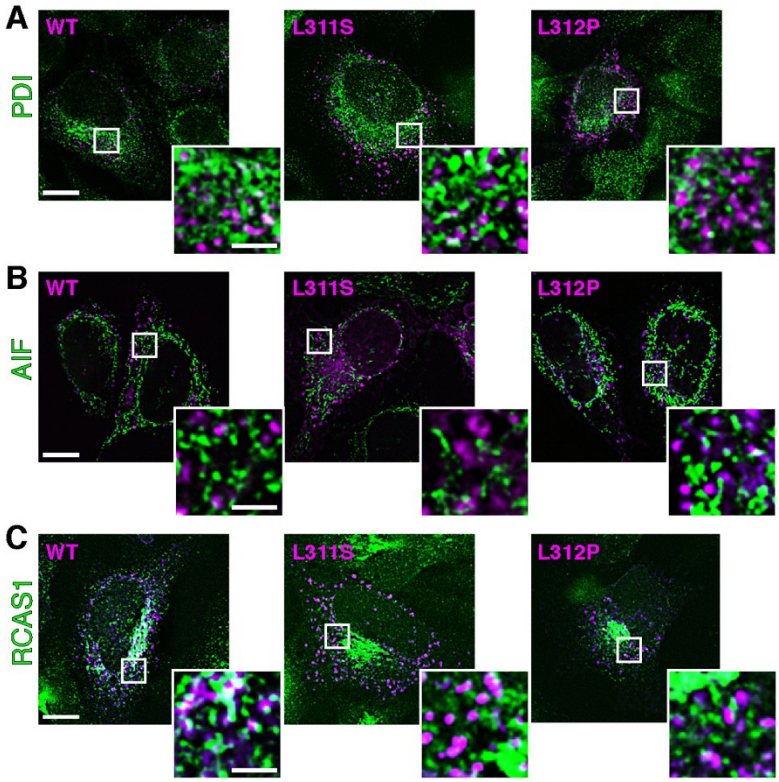


Figure 2.S1: RNF13 protein variants do not extensively localize in endoplasmic reticulum, mitochondria or Golgi compartments.

Using immunofluorescence microscopy, the localization of HA-tagged human RNF13 L311S and L312P proteins was compared to that of RNF13 WT in HeLa cells co-labeled various marker. (**A-C**) Representative fluorescence microscopy images from three independent experiments (N=3) show the subcellular distribution of HA-tagged RNF13, either wild-type (WT) or the L311S or L312P variants, transiently expressed in HeLa cells. Cells were fixed, permeabilized, and labeled with specific primary antibodies before using Alexa Fluor 488-conjugated (green) and Alexa Fluor 647-conjugated (purple) secondary antibodies. Z-stack of fluorescence images were acquired for RNF13-HA (in purple) with endogenous markers (green). (**A**) The results demonstrate limited colocalization between PDI, a marker for endogenous ER-localized proteins, and RNF13 suggesting that HA-tagged WT RNF13 and its L311S and L312P variant proteins do not extensively localize to the ER. (**B**) To eliminate the possibility that RNF13 variants L311S and L312P relocate to mitochondria, HeLa cells expressing HA-tagged RNF13 proteins were co-labeled with the endogenous mitochondrial marker Apoptosis-inducing factor (AIF). The results show that RNF13 proteins, WT and its variants L311S and L312P, do not colocalize with AIF. (**C**) RNF13 is a known highly glycosylated type I integral membrane protein that goes through the Golgi apparatus after its synthesis in the ER (Bocock *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Thus, to ensure that the trafficking of RNF13 through the Golgi apparatus is not affected by the presence of L311S and L312P variants, HeLa cells were co-labeled for HA-tagged RNF13 and the Receptor binding cancer antigen expressed in SiSo cells (RCAS1) transmembrane Golgi protein. The results show that fluorescence from neither RNF13 WT nor the variants displayed the characteristic structure of the Golgi apparatus and did not colocalize extensively with RCAS1, indicating that these proteins do not remain in the Golgi. Scale bars indicate 10 µm for whole cell image and 2 µm for boxed inset.

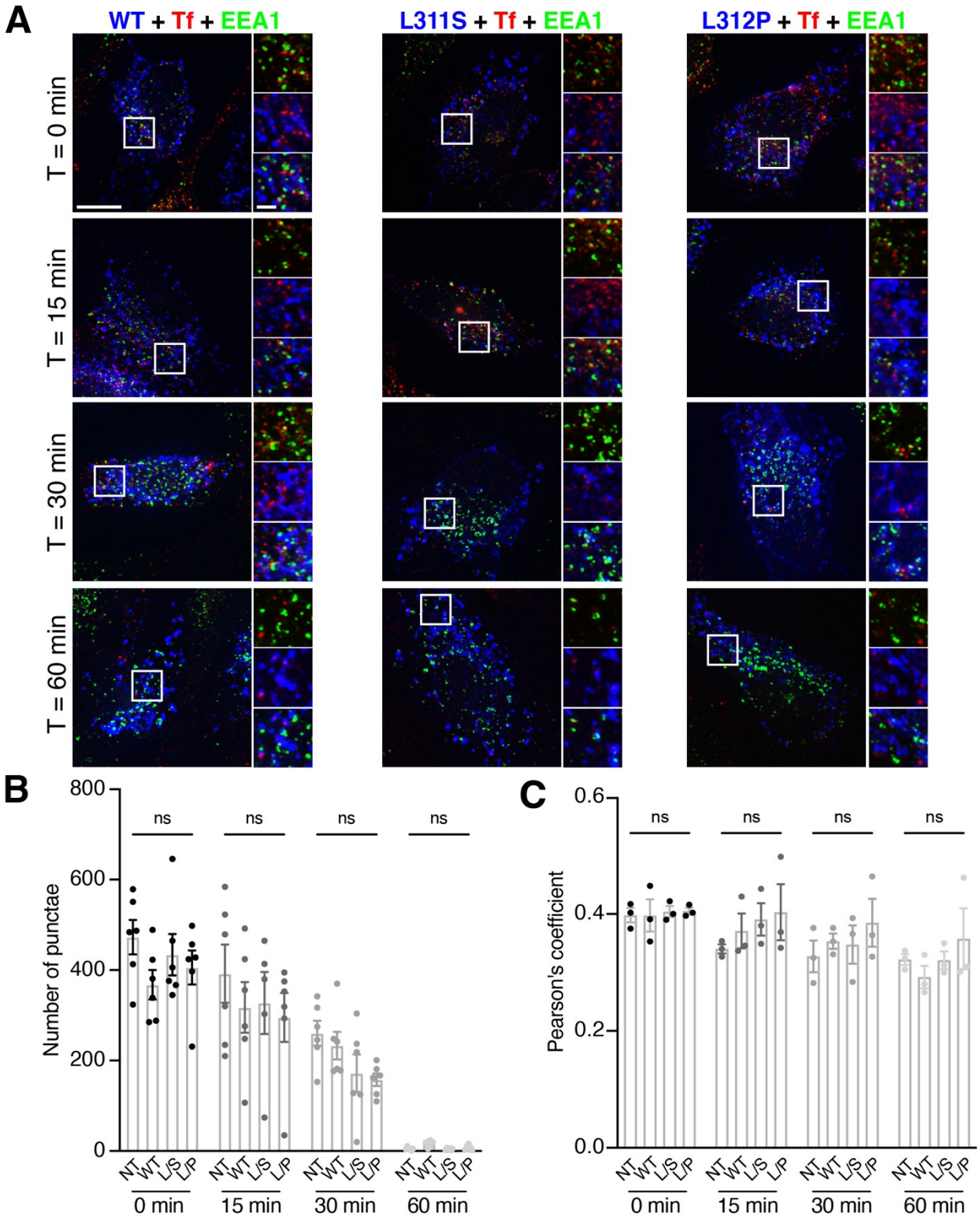


Figure 2.S2: RNF13 variants L311S and L312P do not alter transferrin recycling.

Starved HeLa cells transiently expressing HA-tagged RNF13 WT, L311S or L312P were incubated with transferrin for 5 minutes. Cells were washed and incubated in fresh culture medium for the indicated time before being fixed, permeabilized, and labeled with specific primary antibody against HA (RNF13) and endogenous EEA1. (**A**) Representative images show transferrin (Tf, red) with RNF13 (blue) and early endosome marker EEA1 (green). Scale bar = 10 µm. Boxed areas are shown at higher magnification (scale bar = 2 µm). (**B**) Quantitation of the average number of Tf puncta per cell. The bar graph presents the mean ± SEM while the scatter plot represents the distribution of the average number of Tf puncta for each independent experiment. Analyses were performed on 6-10 cells within 5 fields of view collected for each of the six independent experiments (N=6, total of 31 to 45 cells per condition). Not significant (ns) using two-way ANOVA with multiple comparisons. (**C**) Quantitation of overlap between Tf and EEA1. The bar graph presents the mean ± SEM while the scatter plot represents the distribution of the averaged Pearson's coefficient of each independent experiment analyzed (N=3). Each condition contains 35 to 42 cells. Not significant (ns) using two-way ANOVA with multiple comparisons.

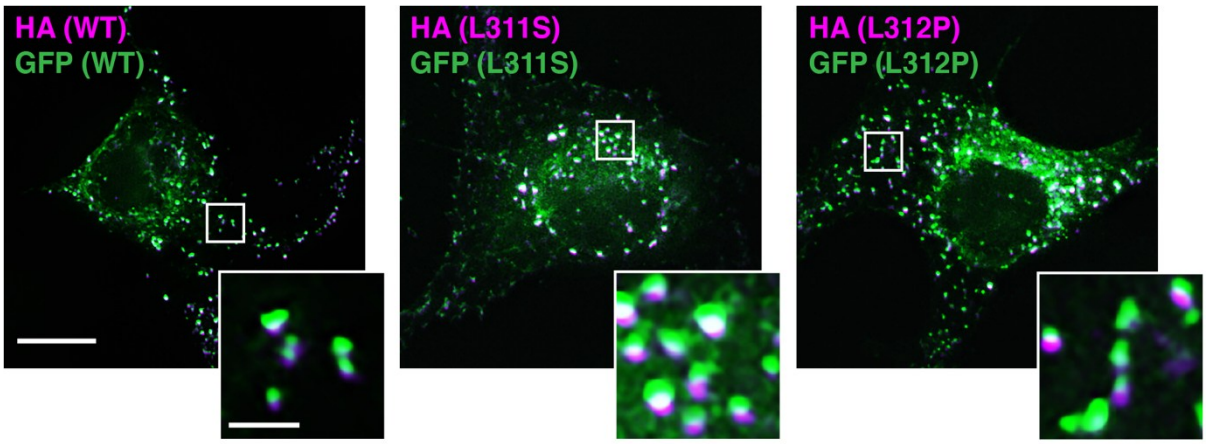


Figure 2.S3: Localization of RNF13 is not affected by the presence of either HA- or GFP-tag.

Previous studies showed an extensive ER localization for RNF13 (Arshad *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009), thus we tested the influence of the HA-tag under our conditions. HeLa cells were co-transfected with both HA-tagged RNF13 and GFP-tagged RNF13, a construct used by another group (van Dijk *et al.*, 2014). Cells were fixed, permeabilized, and labeled with specific primary antibodies against HA or GFP. Representative images from two independent experiments (N=2) show RNF13-HA (in purple) and RNF13-GFP (in green). Scale bars indicate 10 µm for whole cell image and 2 µm for boxed inset. Our results show an extensive colocalization between both tagged proteins without any obvious difference in the overall intracellular localization of RNF13.

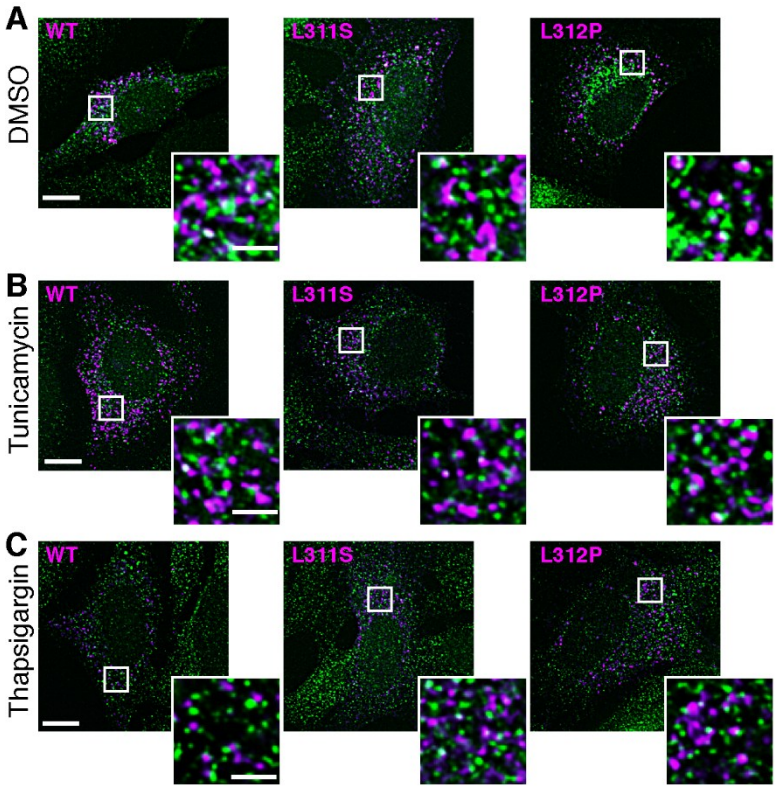


Figure 2.S4: Chemically induced endoplasmic reticulum stress does not promote extensive ER localization of RNF13 in HeLa cells.

RNF13 is known to activate the c-Jun NH_2-terminal Kinase (JNK) pathway and induce apoptosis during ER stress (Arshad *et al.*, 2013). Tunicamycin (Tn)-induced ER stress in cells expressing the RNF13 L311S mutant also increases the level of apoptosis markers, such as phosphorylated c-Jun and spliced X-box binding protein 1 (XPB1), resulting in the hypothesis that the genetic variant proteins confer a gain-of-function and alter apoptosis signalling from the ER stress response (Edvardson *et al.*, 2019). Thus far, our data show that neither RNF13 WT nor the mutant proteins extensively localize to the ER (Fig. 2.S1A). Nonetheless, we tested the possibility that RNF13 variants proteins could be relocating to or be trapped in the ER following drug-induced ER stress (Arshad *et al.*, 2013; Edvardson *et al.*, 2019). (**A-C**) Transfected HeLa cells were treated for 3 hours with (**A**) DMSO, (**B**) 1.25 µg/ml tunicamycin (Tn) or (**C**) 1 µM thapsigargin (Tg). Cells were fixed, permeabilized, and then labeled with specific primary antibody against HA (RNF13, in purple) and for endogenous ER labeling (PDI, in green). Z-stack of fluorescence images were acquired by fluorescence microscopy. Representative images were selected from three independent experiments (N=3), and the boxed area is shown at higher magnification. Scale bars indicate 10 µm for whole cell image and 2 µm for the boxed inset. The results demonstrate that Tn and Tg applications do not increase colocalization between PDI and RNF13 when compared to DMSO. Under the tested conditions, our results demonstrate that RNF13 WT and mutants L311S and L312P do not localize in the ER under basal or drug-induced stress conditions.

CHAPITRE 3
ARTICLE 2

AP-1 CONTRIBUTES TO ENDOSOMAL TARGETING OF THE UBIQUITIN LIGASE RNF13 VIA A SECONDARY AND NOVEL NON-CANONICAL BINDING MOTIF

Valérie C. Cabana [1, 2, 3], Audrey M. Sénécal [1, 2, 3], Antoine Y. Bouchard [1, 2, 3], Saïd Kourrich [2, 4, 5], Laurent Cappadocia [1, 2, 3] and Marc P. Lussier [1, 2, 3, *]

[1] Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada.

[2] Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC), Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada.

[3] Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), Montréal, QC, Canada.

[4] Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada.

[5] Center for Studies in Behavioral Neurobiology, Concordia University, Montréal, QC, Canada.

[*] Corresponding author: Marc P. Lussier, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Faculté des sciences, Case postale 8888, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada. Tel. (514) 987-3000 ext 5591; Fax (514) 987-4054; E-mail: lussier.marc@uqam.ca.

Research Article published in *Journal of Cell Science*, 2024, 137(18): jcs262035.
DOI: 10.1242/jcs.262035.
https://journals.biologists.com/jcs/article/137/18/jcs262035/362133/AP-1-contributes-to-endosomal-targeting-of-the

Contributions des auteurs:

Valérie C. Cabana a conceptualisé l'étude et l'article, performé les expériences, fait l'analyse des données et le montage des graphiques, interprété les résultats et rédigé l'article.

Audrey M. Sénécal a performé les co-immunoprécipitations.

Antoine Y. Bouchard a performé les analyses, la figure et la rédaction pour la section AlphaFold et purifié les protéines GST-RNF13.

Saïd Kourrich a contribué au support financier.

Laurent Cappadocia a révisé et supervisé la réalisation de la section AlphaFold et contribué au support financier.

Marc P. Lussier a conceptualisé l'étude et l'article, fait le montage des figures, analysé les résultats, encadré et supervisé le projet, finalisé la rédaction du manuscrit et contribué au support financier.

Tous les auteurs ont lu et approuvé la publication de la verison finale de l'article.

Footnotes

Acknowledgements: This work was completed as part of the requirements for V.C.C.'s PhD thesis at the *Université du Québec à Montréal*. The authors thank the Digital Alliance of Canada for computational resources and support (allocation 4087 to L.C.), and Jennifer Crawford for editing the manuscript.

Funding: The *Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois* (CERMO-FC) funded part of this study via its funding program New Collaborative Research Initiatives (to S.K., L.C. and M.P.L.) and graduate scholarships awarded to V.C.C. (2020-2022), A.M.S. (2022) and A.Y.B. (2020). A.Y.B. and V.C.C. were awarded a PhD graduate scholarship from *Le Fonds de recherche du Québec – Nature et Technologies*. This work was also supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2017-05392 to M.P.L.).

Conflicts of interest: The authors declare no competing or financial interests.

Data availability statement: All relevant data can be found within the article and its supplementary information.

First person: This article has an associated First Person interview with the first author of the paper: https://journals.biologists.com/jcs/article/137/18/jcs263512/362171/First-person-Valerie-Cabana

Peer-review history: The peer review history is available online at: https://journals.biologists.com/jcs/lookup/doi/10.1242/jcs.262035.reviewer-comments.pdf

Abbreviations: AP, Adaptor protein; BFA, Brefeldin A; CHX, Cycloheximide; CI-MPR, Cation-independent mannose-6-phosphate receptor; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; DMSO, Dimethylsulfoxide; DsiRNA, Dicer-substrate siRNA; Endo H, Endoglycosidase H; ER, Endoplasmic reticulum; ERGIC, ER-Golgi intermediate compartment; IP, Immunopurified protein; Lamp1, Lysosomal-associated membrane glycoprotein 1; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; NGS, Normal goat serum; PBS-T, Triton supplemented PBS; PBS, Phosphate-buffered saline; PNGase F, Peptide-N-glycosidase F; RCAS1, Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells; RNF13, RING finger protein 13; STING, Stimulator of interferon genes protein; TGN, Trans-Golgi network; WT, Wild-type.

3.1 Résumé

Le trafic cellulaire entre les organites est généralement assuré par de courts motifs qui entrent en contact avec des protéines de transport pour les destiner vers leur compartiment. La protéine RNF13, un régulateur de la prolifération, de l'apoptose et du trafic protéique, se localise dans les compartiments du système endolysosomal grâce à la liaison d'un motif dileucine au complexe adaptateur lié à la clathrine AP-3. Les mutations au sein de ce motif réduisent la capacité de RNF13 à interagir avec AP-3. Ici, notre étude montre la découverte d'un motif à base de glutamine semblable à un motif à base de tyrosine dans la région C-terminale de RNF13, qui se lie au complexe adaptateur AP-1, notamment lorsqu'il n'y a pas d'interaction fonctionnelle avec AP-3. En utilisant des approches biochimiques, moléculaires et cellulaires dans les cellules HeLa, notre étude démontre qu'une variante de RNF13 avec une mutation dans le motif dileucine utilise une voie dépendante d'AP-1 pour être exportée du Golgi vers les endosomes. Dans l'ensemble, notre étude fournit des renseignements mécanistiques sur la voie alternative utilisée par des variants du motif dileucine de RNF13.

Mots-clés : RNF13, Complexe AP-1, AlphaFold, Trafic intracellulaire, Endosomes

3.2 Abstract

Cellular trafficking between organelles is typically assured by short motifs that contact carrier proteins to transport them to their destination. The ubiquitin E3 ligase RING finger protein 13 (RNF13), a regulator of proliferation, apoptosis and protein trafficking, localizes to endolysosomal compartments through the binding of a dileucine motif to clathrin adaptor protein complex AP-3. Mutations within this motif reduce the ability of RNF13 to interact with AP-3. Here, our study shows the discovery of a glutamine-based motif that resembles a tyrosine-based motif within the C-terminal region of RNF13 that binds to the clathrin adaptor protein complex AP-1, notably without a functional interaction with AP-3. Using biochemical, molecular and cellular approaches in HeLa cells, our study demonstrates that a RNF13 dileucine variant uses an AP-1-dependent pathway to be exported from the Golgi towards the endosomal compartment. Overall, this study provides mechanistic insights into the alternate route used by variant of the dileucine sorting motif of RNF13.

Keywords: RNF13, AP-1 complex, AlphaFold, Intracellular trafficking, Endosomes

3.3 Introduction

Trafficking of membrane proteins to their correct destination is an essential cellular function. To shuttle between different cellular compartments, cargo proteins must be assembled into coated vesicular carriers to allow transport from a donor membrane toward the targeted organelle membrane (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019; Park et Guo, 2014). COPI- and COPII-coated vesicles regulate trafficking between the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi, while adaptor protein (AP) complexes are involved in many post-Golgi trafficking pathways (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019; Sanger *et al.*, 2019).

The five AP complexes, known as AP-1, AP-2, AP-3, AP-4 and AP-5, are heterotetrameric protein complexes composed of two large subunits (γ/α/δ/ε/ζ and β1-5, respectively), one medium-sized subunit (μ1-5) and one small-sized subunit (σ1-5) (Park et Guo, 2014). Each AP complex has a specific localization and function. AP-1 and AP-2 are found on clathrin-coated vesicles that bidirectionally transport cargos between the trans-Golgi network (TGN) to early or recycling endosomes or mediate endocytosis, respectively (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019; Sanger *et al.*, 2019). AP-3 is associated with trafficking from the TGN and tubular endosomal compartments to late endosomes, lysosomes and lysosome-related organelles. AP-4 is implicated in transport from the TGN toward pre-autophagosomal structures, and AP-5 allows retrieval from late endosomes to the Golgi (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019; Park et Guo, 2014).

AP complexes recognize specific sorting signals on cytoplasmic tails of transmembrane proteins. Two well-characterized sorting signal motifs are tyrosine-based (YxxΦ) and dileucine-based ([D/E]xxxL[L/I]) signals, where x is any amino acid and Φ is a bulky hydrophobic amino acid (Park et Guo, 2014; Sanger *et al.*, 2019). The tyrosine-based signal binds the μ subunit of AP-1, AP-2 and AP-3, whereas the dileucine-based motif interacts with the combination of γ-σ1, α-σ2 and δ-σ3 subunits (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019; Park et Guo, 2014). Additionally, AP-1 and AP-2 have been described to bind acidic clusters and noncanonical motifs (Guo *et al.*, 2013; Navarro Negredo *et al.*, 2017). Because three AP proteins recognize the same motif, it has been shown that each [D/E]xxxL[L/I] signal possesses distinctive preferences for different AP complexes, probably dictated by the x residues or other contextual factors (Bonifacino et Traub, 2003).

Ring Finger Protein 13 (RNF13) is a transmembrane ubiquitin E3 ligase that localizes to several cellular compartments, including the ER, Golgi, late endosomes, lysosomes and the plasma membrane (Cabana et Lussier, 2022). RNF13 might play a significant role in neurodevelopmental processes, as evidenced by its ability to cause neurite growth when exogenously expressed in PC12 cells, or as its mRNA expression is doubled in B35 cells treated with dibutyryl-cAMP (Bocock *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2005). RNF13 also induces ER stress-mediated apoptosis by interacting with inositol-requiring enzyme 1α (IRE1α) to increase

its phosphorylation, leading to active the IRE1α-TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)-c-Jun NH_2-terminal kinase (JNK) signalling pathway (Arshad *et al.*, 2013). Furthermore, several studies have linked RNF13 with tumorigenesis, cell migration, invasiveness, cell proliferation, myogenesis and selective autophagy (Cheng *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2023; Miyakawa *et al.*, 2022; Tan *et al.*, 2022; Tranque *et al.*, 1996; van Dijk *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2009). However, the molecular mechanisms for these cellular functions are yet to be established.

RNF13 is a gene associated with multiple pathological dysfunctions (Cabana et Lussier, 2022). In particular, a study reported that three unrelated individuals with an infantile neurodegenerative disorder carried *de novo* heterozygous variants within the *RNF13* gene (c.932T>C, p.L311S; c.935T>C, p.L312P) (Edvardson *et al.*, 2019). Recently, we analyzed the sequence of RNF13 and noticed that the variant proteins L311S and L312P altered a canonical [D/E]xxxL[L/I] motif (Cabana *et al.*, 2021). Both variants disrupted the association with AP-3 (Fig. 2.4), significantly reducing their presence in lysosomes compared to the wild-type (WT) protein (Fig. 2.1B). Knocking down AP-3 also affected the localization of the WT protein to lysosomes (Fig. 2.6B-C). However, both variants are still localized to late endosomes to a similar extent as the WT protein with AP-3 knockdown (Fig. 2.6E-F) (Cabana *et al.*, 2021). Therefore, another sorting signal and pathway likely contribute to the late endosomal targeting of RNF13 variants L311S and L312P. Intriguingly, there is a possible tyrosine-based motif (YxxA) at the end of the C-terminus of RNF13, which might form a signal that allows binding to either AP-1 or AP-2.

The present study shows that RNF13 uses two distinct motifs, an ExxxLL dileucine motif and a non-canonical VVVQLQ motif in its cytoplasmic tail, for its endosomal targeting. The combined disruption of both motifs importantly decreases the interaction with AP-1 and AP-3, limiting RNF13 exit from the Golgi while not significantly modifying RNF13 glycosylation. The results of using Dicer-substrate siRNAs (DsiRNAs) against AP-1 and AP-3 complexes show that WT RNF13 can traffic through both AP-1 and AP-3 pathways to reach late endosomes. Concurrent knockdown of AP-1 and AP-3 leads to significant retention of WT and variant RNF13 proteins in the Golgi, supporting the notion that a RNF13 variant with an altered dileucine motif uses an AP-1-dependent pathway. Interestingly, exogenous expression of WT RNF13 increases F-actin abundance through an AP-3-dependent sorting pathway and a ubiquitin ligase activity-dependent mechanism. Overall, this study provides new insights into the intracellular trafficking of RNF13 and better characterizes the consequence of alterations to targeting motifs of the RNF13 protein.

3.4 Materials and Methods

3.4.1 Antibodies

The following antibodies were used: rabbit anti-GFP (WB: 1:1000, Thermo Fisher Scientific, Mississauga, ON, Canada, Cat# A6455, RRID:AB_221570), rabbit anti-HA (WB and IF: 1:1000, New England Biolabs Ltd., Whitby, ON, Canada, Cat# 3724, RRID:AB_1549585), rabbit anti-AP1G1 (WB knockdown: 1:1000, Thermo Fisher Scientific, Cat# A304-771A-T, RRID:AB_2782161), mouse anti-AP1G1 clone 100/3 (WB co-ip and IF: 1:1000, SigmaMillipore Canada, Mississauga, ON, Canada, Cat# SAB4200858), rabbit anti-AP3D1 (WB: 1:1000, Bio-Techne Canada, Toronto, ON, Canada, Cat# NBP2-92046), Rabbit anti-AP3S1 (WB: 1:500, Bio-Techne Canada, Cat# NBP1-76588, RRID:AB_11018734), mouse anti-HA (IF: 1:1000, BioLegend, San Diego, CA, USA, Cat# 901502, RRID:AB_2565007), rabbit anti-RCAS1 (IF: 1:250, New England Biolabs Ltd., Cat# 12290, RRID:AB_2736985), rabbit anti-Rab7 (IF: 1:200, New England Biolabs Ltd., Cat# 9367, RRID:AB_1904103), rabbit anti-Lamp1 (IF: 1:500, New England Biolabs Ltd., Cat# 9091, RRID:AB_2687579), rabbit anti-PDI (IF: 1:250, New England Biolabs Ltd., Cat# 3501, RRID:AB_2156433), mouse anti-TGN38 (IF: 1:250, Novus Biologicals, Cat# NB300-575, RRID:AB_2240559), rabbit anti-ERGIC53 (IF: 1:200, Proteintech Cat#13364-1-AP, RRID:AB_2135994), mouse anti-CD63 (IF: 1:500, Novus Biological, Cat# NBP2-80654), mouse anti-IGF2R (IF: 1:500, Novus Biological, Cat# NBP2-80785), AlexaFluor 647-conjugated goat anti-mouse (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Cat# A31626, RRID:AB_2535792), AlexaFluor 647-conjugated goat anti-rabbit (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Cat# A31634), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse (1:10000, New England Biolabs Ltd., Cat# 7076, RRID:AB_330924) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit (1:10000, New England Biolabs Ltd., Cat# 7074, RRID:AB_2099233).

3.4.2 Molecular biology

GenScript (Piscataway, NJ, USA) synthesized wild-type, full-length human *RNF13* transcript variant 1 (accession NM_007282.4) that included the natural Kozak sequence and a C-terminus HA tag. This construct was cloned into the pUC57 vector (by Genscript) and served as the template for generating protein variants LL/AA, VVV/GGG, AA/GGG, Y/A, AA/YA, QQ/AA and AA/QA via site-directed mutagenesis. The WT construct was excised using standard enzymatic restriction strategies and ligated into NheI and XhoI sites of pCAGGS-IRES-mCherry (Katherine W. Roche, National Institutes of Health, USA). The pUC57 vector was used as a template for introducing an optimized Kozak sequence (5'-AACGAG-3') to the insert encoding the RNF13-GFP fusion protein. The pUC57 vector was also used as a template for generating the construct encoding RNF13 C-terminal region (a.a. 281-381; WT, AA, GGG and AA/GGG) fused to GST. PCR was performed with Q5 high-fidelity DNA polymerase (New England BioLabs Ltd.,

Cat# M0492S) and the fragments were cleaved using standard enzymatic restriction strategies for ligation into the BglII and SalI sites of the pEGFP-N1 vector (Clontech) and into the EcoRI and XhoI sites of pGEX-4T-1 (GE Healthcare). The AP-1 mu-1-GFP was from Addgene (plasmid # 173432, deposited by Juan Bonifacino, RRID:Addgene_173432). The cDNA for AP-1 mu-1 was excised using standard enzymatic restriction strategies and ligated into the EcoRI and BamHI sites of pmCherry-N1 to create the AP1M1-mCherry fusion protein. All plasmids were validated by Sanger sequencing (Genome Quebec, Montreal, QC, Canada).

3.4.3 Cell culture and transfection

HeLa (from Dr. Diana Alison Averill, Dept Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal) and HEK293T/17 (American Type Culture Collection, Gaithersburg, MD, USA, Cat# CRL-11268) cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Cat# 11995-065) containing 10% fetal bovine serum (FBS; VWR Life Science, Cat# MPCA97068-085). Cells were kept at subconfluence at 37°C with 5% CO_2. Cells were not recently authenticated nor tested for mycoplasma contamination. For immunoprecipitation assays, HEK293T/17 cells were transfected in poly-D-lysine-treated, six-well plates using LipofectAMINE 2000 (Thermo Fisher Scientific, Cat #11668-019) as described previously (Lussier *et al.*, 2005). Cells were maintained for 24 hours at 37°C with 5% CO_2 before being lysed. For immunostaining assay, 1.25 x 10^5 HeLa cells were seeded 24 hours before transfection in a 24-well plate containing a 12 mm round glass coverslip #1.5 (Electron Microscopy Sciences, Cat# 71887-04). For live-cell imaging assay, 1 x 10^6 HeLa cells were seeded 24 hours before transfection in a 6-well plate containing a 25 mm round glass coverslip #1.5 (Electron Microscopy Sciences, Cat# 71887-10). Cells were transfected with a calcium phosphate-DNA precipitate, as described previously (section 2.4.3) (Cabana *et al.*, 2021). Cells were maintained for another 24 hours at 37°C with 5% CO_2 before being fixed and processed for immunostaining. When required, to inhibit intracellular protein transport, transfected HeLa or HEK293T/17 cells were incubated with 10 µM brefeldin A (Sigma-Aldrich, Cat# B6542) or DMSO for 1 hour at 37°C with 5% CO_2 before being fixed or lysed. To inhibit protein synthesis, HeLa cells were incubated with 50 ug/mL cycloheximide (Sigma-Aldrich, Cat# C1988) or ethanol for 2 hours at 37°C with 5% CO_2 before being fixed and processed for immunostaining.

3.4.4 AP3D1 and AP1G1 knockdown

The following TriFECTa Kit Dicer-substrate siRNA duplexes against human *AP3D1* (NM_003938) and *AP1G1* (NM_001128) were purchased from Integrated DNA Technology (IDT, Coralville, IA, USA). Specifically, negative control scrambled dsiRNA (Cat# DS NC1), AP3D1-specific duplex sequences (#1: 5'-rCrGrCrUrArCrUrGrArGrCrArArCrUrUrGrUrUrArGrArAGA-3' and 5'-rUrCrUrUrCrUrArArCrAr-

ArGrUrUrGrCrUrCrArGrUrArGrCrGrUrG-3', and #2: 5'-rGrUrCrArUrUrUrGrUrUrGrCrGrUrUrGrAr-ArUrUrArUrCTG-3' and 5'-rCrArGrArUrArArUrUrCrArArCrGrCrArArCrArArArUrGrArCrCrU-3') and AP1G1-specific duplex sequences (#1: 5'-rGrArCrCrUrUrGrArArGrCrArUrUrGrUrUrArArArGrArCTA-3' and 5'-rUrArGrUrCrUrUrUrArArCrArArUrGrCrUrUrCrArArGrGrUrCrArG-3', #2: 5'-rGrArArArCr-GrGrUrUrUrUrGrArCrUrArUrCrArUrGrGrATA-3' and 5'-rUrArUrCrCrArUrGrArUrArGrUrCrArArAr-ArCrCrGrUrUrUrCrArU-3'). Briefly, 2 hours before transfection, 5 x 10^5 HeLa cells were seeded in 6-well plate (for WB) and 1.25 x 10^5 cells were added to 24-well plate containing a 12 mm round glass coverslip #1.5 (for IF). For transfection, 0.5 µL (24-well) or 2 µL (6-well plate) of LipofectAMINE 2000 transfection reagent diluted in 50 µL Opti-MEM I + GlutaMAX (OMGM; Thermo Fisher Scientific, Cat# 51985034) was added to a total of 10 nM DsiRNAs diluted in 50 µL OMGM. The mixture was incubated for 20 mins at room temperature and added to the cells. The cells were fixed or lysed after a 72h incubation. For immunofluorescence assay, cells were transfected with a calcium phosphate-DNA precipitate to introduce our plasmid constructs encoding RNF13 variant proteins or GFP 48h after DsiRNA transfection (24h before fixation).

3.4.5 Immunostaining

Transfected HeLa cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) before being fixed. When using antibodies against HA, AP1G1, RCAS1, Rab7, Lamp1, PDI, CD63 and CI-MPR, cells were fixed with 4% paraformaldehyde/4% sucrose in PBS for 15 mins at room temperature and then permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS (PBS-T) for 15 mins. When using antibodies against TGN38 and ERGIC53, cells were fixed and permeabilized with ice-cold 100% methanol for 7 minutes on ice, and then gradually rehydrated by replacing half the volume with PBS for 2 minutes on ice, which was repeated five times. Cells were then incubated for 10 minutes in PBS at room temperature. For both fixation methods, non-specific sites were blocked using 10% normal goat serum (NGS) in PBS for 1 hour, followed by incubation with primary antibodies diluted in 3% NGS/PBS for 1 hour. Coverslips were then incubated with the appropriate conjugated secondary antibodies also diluted in 3% NGS/PBS for 1 hour. After three washes in PBS, coverslips were mounted using ProLong Diamond Antifade (Thermo Fisher Scientific, Cat# P36961), dried at 37°C for 1 hour and kept at 4°C until performing image acquisitions.

3.4.6 Phalloidin staining

Transfected HeLa cells were washed in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde/4% sucrose in PBS for 15 mins at room temperature, and then permeabilized with PBS-T for 15 mins. Coverslips were incubated with one unit of CF 640R-conjugated phalloidin (Biotium, Fremont, CA, USA, Cat# 00050-T) diluted in 3%

NGS/PBS for 1 hour. After three washes in PBS, coverslips were mounted using ProLong Diamond Antifade, dried at 37°C for 1 hour and kept at 4°C until performing image acquisitions.

3.4.7 Fluorescence microscopy image acquisition

Widefield image acquisition was performed using an inverted Olympus IX83 microscope equipped with a U plan S-Apo 60x / 1.35 numerical aperture oil objective (Olympus), an X-Cite Xylis 365 LED-based illumination source (Excelitas Technologies Corp., Waltham, MA, USA) and a Zyla 4.2 Plus sCMOS camera (Andor, Oxford, UK). This system uses the following Semrock filters and dichroic mirror: LED-DAPI-A-OFF-ZERO with 378/52nm excitation filter (FF01-378/52-25), a 447/60nm emission filter (Semrock, FF02-447/60-25) and 409nm dichroic mirror (FF409-Di03-25×36); LED-FITC-A-OFF-ZERO with 474/27nm excitation filter (FF01-474/27-25), a 525/45nm emission filter (FF01-525/45-25) and 495nm dichroic mirror (FF495-Di03-25×36); LED-mCherry-A-OFF-ZERO with 578/21nm excitation filter (FF01-578/21-25), 641/75nm emission filter (FF02-641/75-25), and 596nm dichroic mirror (FF596-Di01-25×36); LED-Cy5-A-OFF-ZERO with 635/18nm excitation filter (FF01-635/18-25), a 680/42nm emission filter (FF01-680/42-25), and 652nm dichroic mirror (FF652-Di01-25×36). Olympus CellSens Dimension software version 2.2 (Olympus, Toronto, ON, Canada, RRID: SCR_014551) controlled the system during image acquisition. Lamp intensity and exposure time were adjusted to capture the strongest signal without causing saturation in representative cells. Under the selected imaging settings, cells that exhibited excessively high or low fluorescence of the ectopic proteins (RNF13 or AP1M1) were excluded. All variables remained constant within an independent experiment, but minor lamp intensity and exposure time adjustments were usually necessary between independent experiments. For fixed cells, the resolution was set at 2048 x 2048 pixels and z-stack images were taken at 0.28 µm intervals for 7 to 12 optical slices. Before analysis, images were deconvoluted using the Olympus 3D Deconvolution feature in the Olympus CellSens Dimension software. For live-cell imaging, the resolution was set at 1024 x 1024 pixels, with lamp intensity and exposure time kept constant for each independent experiment. The Olympus Z Drift Compensator 2 hardware (IX3-ZDC2) module was activated to enable the continuous autofocus mode, resulting in the acquisition of a single Z-slice over time. Fluorescence signals (EGFP and then mCherry) were taken every 5 seconds for 65 cycles (total of 5 mins 20s).

3.4.8 Widefield live-cell imaging

Transfected HeLa cells were incubated in FluroBrite DMEM (Thermo Fisher Scientific, Cat# A1896701) supplemented with 10% FBS and 2 mM L-Glutamine for 30 minutes before the acquisition. Coverslips were mounted in an Attofluor Cell Chamber (Thermo Fisher Scientific, Cat# A7816) before being positioned in a humidified and on a warmed stage-top incubator (Okolab UNO-T1) coupled with an objective heating

collar (Okolab). This maintains live cell samples in FluoroBrite DMEM at 37°C with 5% CO_2 during image acquisition.

3.4.9 Image analysis and statistical analysis

To analyze colocalization between RNF13 and endogenous organelle markers, a single slice from a z-stack was analyzed. After separating the two channels, the threshold was adjusted to have a minimal background. Manders' overlap coefficients were obtained using the JaCoP plugin in Fiji. At least three independent, non-masked experiments were performed for all assays. Datasets of image analysis were collected in Microsoft Excel before being subjected to statistical analysis in GraphPad Prism 8. Parametric tests were used due to the Gaussian distribution of the data. Statistical difference was determined using either ordinary one-way ANOVA with multiple comparisons when there was one grouping variable or two-way ANOVA with multiple comparisons when there were two grouping variables. To analyze the signal intensity, a sum z-stack was analyzed. The region of interest was drawn around the cell and saved in the ROI manager. The option measure was used on the selected channel. The integrated density obtained for each cell was normalized against the average of the control for one independent experiment (RNF13 WT for RNF13 intensity or GFP for phalloidin intensity). For presentation, contrast and brightness were adjusted using Adobe Photoshop 2024 before assembling the figure in Adobe Illustrator 2024.

3.4.10 Immunoprecipitation and GST-pulldown assays

Transfected HEK293T/17 cells were washed with PBS and lysed in 1 mL ice-cold lysis buffer (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % sodium deoxycholate) containing 1X EDTA-free protease inhibitor cocktail (Bimake.com, Houston, TX, USA, Cat# B14001). Lysates were incubated at 15 rpm for 20 mins at 4°C, then centrifuged at 21,000 x g for 15 mins. For co-immunoprecipitation with RNF13-HA and AP1M1-GFP, 500 µL of lysate was incubated at 15 rpm for 2h at room temperature with 10 µL of anti-HA magnetic beads (Bimake.com, Houston, TX, USA, Cat# B26201) pre-equilibrated in PBS-T. After 3x 5 min washes with PBS-T, proteins were eluted with Laemmli buffer and boiled for 5 mins at 95°C before loading on SDS-PAGE. For immunoprecipitation using AP1M1-GFP or RNF13-GFP protein, 600 µL of lysate was incubated at 15 rpm for 2h at 4°C with 10 µL of GFP-Catcher beads (Antibodies-online Inc., Limerick, PA, USA, Cat# ABIN5311508) pre-equilibrated in lysis buffer. Washes were performed with lysis buffer, then proteins were eluted in Laemmli buffer, boiled for 5 mins at 95°C and loaded on SDS-PAGE. For GST pulldown, 10-cm plates containing ~80% confluent HeLa cells were lysed in 2 mL ice-cold lysis buffer. 15 µl of glutathione Sepharose 4B resin (GE Healthcare) pre-equilibrated in ice-cold lysis buffer was incubated overnight at 4°C with 500 µl of lysate and 25 µg of purified GST or GST-RNF13 proteins. The protein purification was performed as described previously (section 2.4.10)

(Cabana *et al.*, 2021). After washing with ice-cold lysis buffer, proteins were eluted with Laemmli buffer before loading on SDS-PAGE.

3.4.11 Glycosylation assays

Transfected HEK293T/17 cells were lysed as described above. 500 µL of diluted 1:1 lysate was agitated at 15 rpm overnight at 4°C with 10 µL of anti-HA magnetic beads pre-equilibrated in PBS-T. After 3x 5 mins washes with PBS-T, immunopurified proteins were incubated at 100°C for 10 minutes in 1x Glycoprotein Denaturing Buffer (New England Biolabs, Beverly, MA, USA, Cat# P0703S). Proteins were then digested with 500 U of Endo Hf (New England Biolabs, Cat# P0703S) or PNGase F (New England Biolabs, Cat# P0704S) for 2 hours at 37°C, before stopping the reaction with Laemmli buffer and loading on SDS-PAGE.

3.4.12 SDS-PAGE and Western Blot

Protein samples were separated on an SDS-PAGE gel containing 0.5% of 2,2,2-trichloroethanol and transferred to a 0.45 µm PVDF membrane using the Bio-Rad Trans-Blot Turbo system (10 mins, 25 V, 2.5 A). Proteins on both gels and membranes were visualized using the *stainfree* mode of the ChemiDoc MP imaging System (Bio-Rad) and Bio-Rad Image Lab software. Non-specific sites on membranes were blocked using 5% skim milk in TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 0.3 % Tween-20) for 1h at room temperature. Membranes were incubated with primary antibodies diluted in TBS-T supplemented with 0.05% NaN_3 overnight at 4°C. Then, membranes were incubated with HRP-coupled secondary antibodies diluted in TBS-T for 1h at room temperature. Immune complexes were revealed using the Clarity Western ECL substrate (BioRad, Cat# 1705060). The ChemiDoc MP imaging system was used to acquire the chemiluminescent signal.

3.4.13 Protein abundance and statistical analysis

To analyze relative expression in knockdown assays, the band obtained by immunoblotting AP1G1 or AP3D1 was normalized against the corresponding stain-free lane. The results were then normalized against the siCTL lane to obtain a relative protein level. To analyze relative co-immunoprecipitated proteins, the band obtained after immunoblotting for AP1G1 or AP3D1 from the immunopurified protein (IP) sample was normalized against the corresponding IP lane blotted with anti-GFP. The results were then normalized against the WT lane to obtain a relative protein level from the IP complexes. At least three independent, non-masked experiments were performed for all assays. Datasets were collected in Microsoft Excel before being subjected to statistical analysis in GraphPad Prism 8. As the data were matched, statistical difference

was determined using repeated-measures (RM) one-way ANOVA with multiple comparisons against the control group.

3.4.14 Predicted structure

The structures of the complexes formed by RNF13 (Uniprot accession O43567) and AP1S1 (Uniprot accession P61966) or AP1M1 (Uniprot accession Q9BXS5) were modeled using the standalone version of ColabFold (Mirdita *et al.*, 2022) using computational resources of the Digital Research Alliance of Canada or the AlphaFold 3 server for Supplementary Figure S3.1 (Abramson *et al.*, 2024). The RNF13–AP1S1 and RNF13–AP1M1 complexes were visualized using the PyMOL Molecular Graphics System (version 2.0, Schrödinger, LLC). The ConSurf webserver (Ashkenazy *et al.*, 2016) was used to assess the protein conservation of RNF13. 150 protein sequences sharing between 45 and 95% sequence identity with RNF13 were obtained from the UniRef90 database and used for the analysis. Sequence logos were generated with version 3 of Weblogo (Crooks *et al.*, 2004). Structural alignment between the AlphaFold model of the RNF13–AP1M1 complex and an AP-1–Arf1-tetherin (BST2)-Nef (L164A, L165A) complex (PDBL 6D84) was performed using PyMol. The full-length proteins were used in the predicted interaction model.

3.5 Results

3.5.1 Predicted interaction between RNF13 and AP-1

Our prior work shows that the late endosomal localization of RNF13 is unaffected by either AP-3 knockdown or by a RNF13 dileucine variant with alanine substitutions at positions 311 and 312 (RNF13 LL/AA, hereafter named AA), indicating an AP-3-independent mechanism for this targeting (Fig. 2.3C; 2.6E-F) (Cabana *et al.*, 2021). The BioGRID database shows that subunits of AP-1 and AP-3, but not AP-2, interact with human RNF13 (Huttlin *et al.*, 2021; Huttlin *et al.*, 2017). Considering that the RNF13 AA variant is located in endosomes and perinuclear regions (Fig. 2.3) (Cabana *et al.*, 2021), which aligns with the positioning of AP-1 and AP-3 but not with AP-2 (Oughtred *et al.*, 2021), it is possible that RNF13 dileucine variant uses a mechanism involving a secondary sorting motif for trafficking towards the endosomal pathway. The analysis of C-terminus sequence of RNF13 revealed the presence of a putative tyrosine-based motif that exhibits an alanine in position +3 from the tyrosine (375YxxA378). Interestingly, major histocompatibility complex class I (MHC-I) molecules HLA-A uses its YSQA motif to interact with the medium (μ) subunit of AP-1 in the presence of the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein (Nef-1) (Le Gall *et al.*, 2000; Roeth *et al.*, 2004; Tavares *et al.*, 2020). This is consistent with an interaction between AP-1 and RNF13, given that AP-1 complex is responsible for transport between the TGN and endosomes (Sanger *et al.*, 2019).

To predict the structure of a complex composed of RNF13 and individual AP subunits, we used AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021). A predicted interaction was identified between the dileucine-based motif of RNF13 and both σ1 subunits of AP-1 and AP-3 (AP1S1 and AP3S1) (Fig. 3.1A; 3.S1A-B). Additionally, we observed a predicted interaction between RNF13 and the μ1 subunit of AP-1 (AP1M1) (Fig. 3.1B; 3.S1C). Although the anticipated tyrosine (position 375) is not predicted to participate in this interaction, we observed that the residues 362DVVVQLQP369 of RNF13 establish multiple contacts with the subunit μ1 of AP-1 (Fig. 3.1B; 3.S1C). The predicted interaction is centered on V365, which fits in an AP1M1 hydrophobic pocket bordered by L395, V409, V392 and the hydrophobic portion of P407. RNF13 V363 is also in a hydrophobic environment, whereas Val364 is exposed to the solvent. In the model, multiple hydrogen bonds and salt bridges also stabilize the interactions between RNF13 and AP1M1. Notably, RNF13 Q368 is located within the hydrogen-bonding distance of the AP1M1 D174 side chain and the W408 backbone. In addition, RNF13 D362 forms a salt bridge with K396 on AP1M1 (Fig. 3.1B; 3.S1C). In contrast, AlphaFold failed to predict an interaction between RNF13 and the μ subunit of AP-3 (Fig. S3.1D).

Multiple sequence alignments indicated that the central 363VVVQLQ368 motif of RNF13, which is predicted to interact with AP1M1 (Fig. 3.1B; 3.S1C), is well conserved compared to immediately adjacent residues, suggesting that this motif plays an important biological role (Fig. 3.1C). Structural comparison between the RNF13/AP1M1 complex predicted by AlphaFold with other complexes deposited into the Protein Data Bank (PDB) further revealed that the 363VVVQLQ368 motif of RNF13 binds at the same location on AP1M1 as other proteins possessing YxxΦ motifs such as bone marrow stromal antigen 2 (BST2) (Morris *et al.*, 2018). Our prediction, compared with the AP-1/Arf1/BST2-Nef complex (PDB: 6D84), reveals that the last glutamine (Q368) of RNF13 occupies the AP-1 tyrosine-binding pocket, whereas its last valine (V365) occupies the hydrophobic pocket of the YxxΦ-like motif (Fig. 3.1D-E). Although the position of Y8 of BST2 slightly differs from that of Q368 of RNF13, BST2 V11 is located at the exact same position as V365 of RNF13 in a hydrophobic pocket bordered by V409, V392 and the hydrophobic portion of P407 (Fig. 3.1E). The RNF13 VVVQLQ motif, however, runs in the opposite orientation as the YxxΦ motif of BST2. Interestingly, shifting the peptide register by two positions still positions a glutamine in the AP-1 tyrosine-binding pocket and a valine in the hydrophobic pocket of the YxxΦ motif (Fig. 3.1D).

3.5.2 RNF13 interacts with AP-1

To determine whether RNF13 forms a complex with AP-1 in cells, transfected HEK293T/17 cells lysates containing HA-tagged RNF13 and GFP-tagged AP1M1 proteins were immunoprecipitated using anti-HA magnetic beads. Detection of AP1M1-GFP in the HA-tagged RNF13 immunopurified protein complex showed that RNF13 interacts with AP1M1 (Fig. 3.1F). In a control experiment, the presence of AP1G1 and

the absence of AP3D1 in the GFP-enriched AP1M1-GFP-containing sample indicated that the AP1M1-GFP protein incorporated into the endogenous AP-1 complex (Fig. 3.S2A). Next, using brefeldin A (BFA), a fungal metabolite that inhibits the GDP/GTP exchange reaction on adenosine ribosylation factors (Arfs) on Golgi membrane (B.R *et al.*, 2023), we found that the amount of HA-RNF13 co-purified along with AP1M1-GFP was not different, suggesting that the interaction is either insensitive to BFA and/or Arf1-independent (Fig. 3.S2B-C) (Braun *et al.*, 2007; Laulagnier *et al.*, 2011; Neubrand *et al.*, 2005). An immunofluorescence assay on HeLa cells indicated that HA-tagged RNF13 and GFP-tagged AP1M1 proteins partially colocalized in a cellular context (Fig. 3.1G). To discriminate if this partial overlap occured while RNF13 was trafficked to its endolysosomal localization, we performed a cycloheximide (CHX) chase. Transfected HeLa cells expressing HA-tagged RNF13 and GFP-tagged AP1M1 proteins were incubated in the absence or presence of CHX for 2 hours. As expected, the Manders' overlap coefficient of RNF13 over AP1M1 significantly decreased after CHX treatment when compared to the vehicle treatment, suggesting that RNF13 colocalizes less with AP-1 once it reaches its final subcellular localization (Fig. 3.1H-I).

To better understand how RNF13 and AP-1 might come into contact in a cellular context, live-cell imaging was performed on transfected HeLa cells expressing AP1M1-mCherry and RNF13-GFP proteins. Figure 3.2A shows a typical result where fluorescence signals from RNF13 and AP1M1 were collected via widefield fluorescence microscopy. The results showed that RNF13 was highly dynamic from the perinuclear region towards the cellular periphery and back. This contrasted with RNF13 being relatively immobile in the perinuclear region. Similarly, AP1M1 had a high abundance in the perinuclear region but exhibited low dynamicity, moving rapidly everywhere else in the cell (Movie 1). Importantly, unless stuck in the perinuclear region, the complexes formed by RNF13 and AP1M1 were generally mobile (Fig. 3.2A; Movie 1). For instance, a single event (green and red arrowheads, Fig. 3.2B) indicates that AP1M1-mCherry and RNF13-GFP proteins dissociate at t = 2:10 before disappearing (Fig. 3.2B). A second event (blue arrow, Fig. 3.2B) shows a mobile complex, whereas a third event (white arrow, Fig. 3.2B) appears at t = 2:10 and moves rapidly before disappearing (Fig. 3.2B). Altogether, these results support the existence of transient and biologically relevant RNF13 and AP-1 complexes in cells.

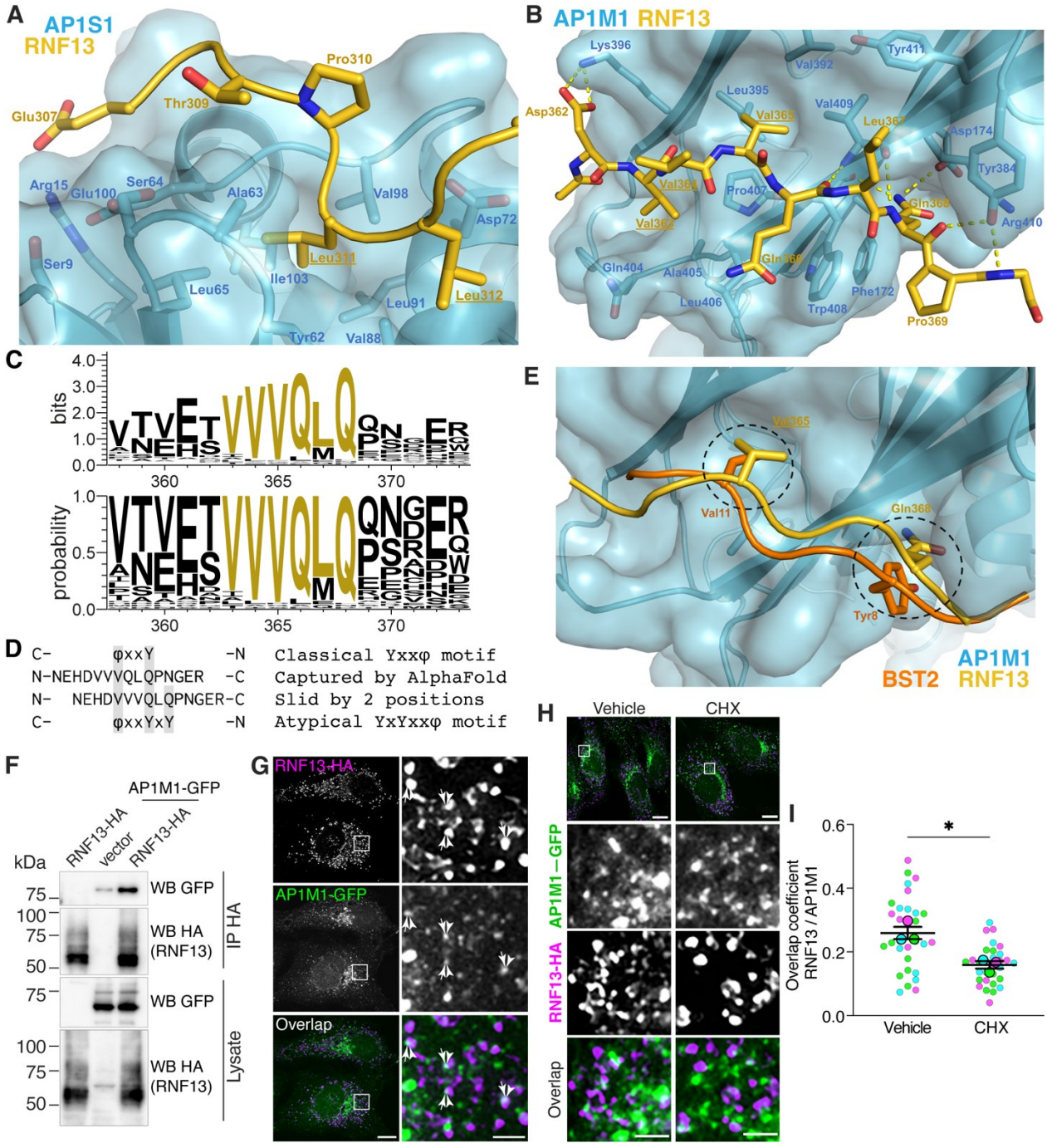


Figure 3.1: RNF13 interacts with AP-1.

(**A-B**) AlphaFold predicted the structure of complexes between (**A**) AP1S1 (light blue) and RNF13 (yellow) and (**B**) AP1M1 (light blue) and RNF13 (yellow). Both panels show RNF13 as a stick representation and AP-1 as a surface representation. Yellow dashed lines indicate hydrogen bonds between RNF13 and AP1M1. RNF13 residues that were mutated in this study are underlined in (**A**) and (**B**). (**C**) Logo representation of RNF13 sequence conservation around the VVVQLQ motif. Variability at each position is represented as bits (upper panel) or probability (lower panel). Both panels were generated using version 3 of Weblogo and sequence alignments from the ConSurf webserver. (**D**) Sequence alignment showing the similarity between RNF13 VVVQLQ motif and two consensus motifs found in other AP1M1 binding proteins. (**E**) Interaction

of BST2 (orange) or RNF13 (yellow) with AP1M1 (light blue). The structure of a AP1M1-BST2 complex was obtained from the Protein Data Bank and aligned with the AlphaFold prediction of the RNF13-AP1M1 complex shown in (**B**). (**F**) Western blot analysis of co-immunoprecipitated AP1M1-GFP with RNF13-HA from transfected HEK293T/17 cells. Representative immunoblots from four independent experiments (N=4) are shown. (**G-H**) Representative immunofluorescence images from three independent experiments (N=3) show HeLa cells expressing RNF13-HA (in purple) and AP1M1-GFP (in green) (**H**) when treated with 50 ug/mL CHX for 2 hours prior to fixation. Scale bars: 10 µm (whole-cell images); 2 µm (boxed areas shown at higher magnification). (**I**) The jittered individual value plot represents Manders' overlap coefficient of RNF13 over AP1M1. Values are expressed as mean ± SEM for N=3. Each color represents an independent experiment. Smaller circles represent individual cells analyzed (n=30 cells). Larger circles represent the mean of an independent experiment. * $p = 0.0114$ using unpaired two-tailed t-test.

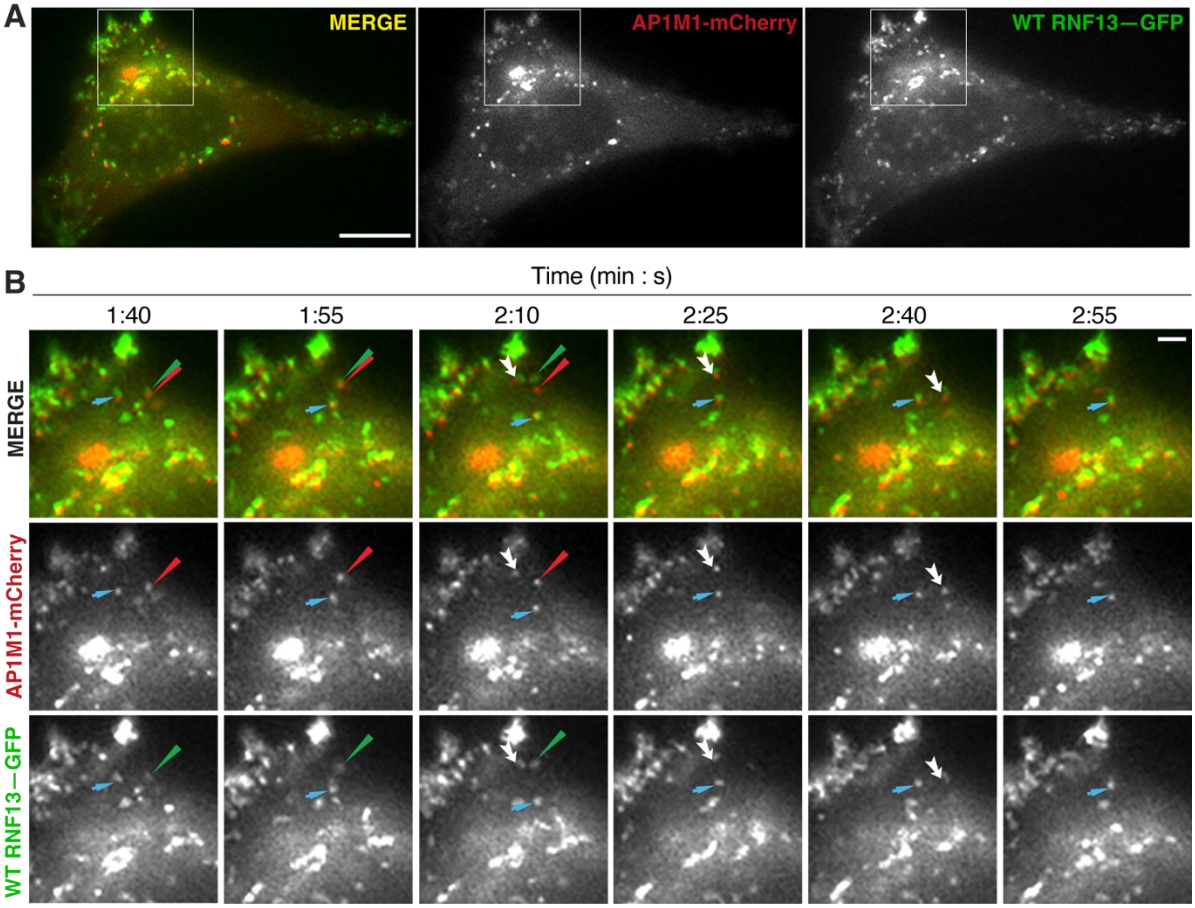
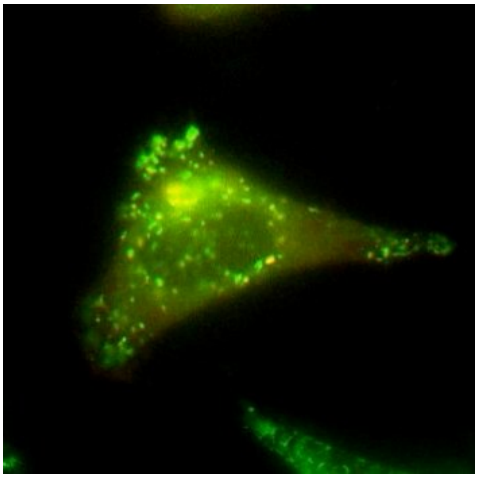


Figure 3.2: Live-cell imaging shows partial colocalization of RNF13 and AP1M1 over time.

(**A-B**) Representative live-cell images from independent experiments (N=3) show HeLa cells expressing RNF13-GFP (in green) and AP1M1-mCherry (in red) at (**A**) t = 1:40 and at (**B**) 15 seconds intervals (magnified views of the boxed region in (**A**)). Scale bars: 10 µm (**A**); 2 µm (**B**). Green and red arrowheads represent an event where RNF13-GFP and AP1M1-mCherry are initially associated, which then dissociate and disappear. The blue and white arrows represent two distincts events where the proteins associate. See Movie 3.1 for the full time lapse.



Movie 3.1: Related to Figure 3.2.

Widefield microscopy was used to visualize the fluorescent signal emitted from a transfected HeLa cell expressing RNF13-GFP (green) and AP-1-mCherry (red) proteins. Each frame of this representative cell was acquired every five seconds over 65 cycles. 4-7 cells were imaged for each of the three independent experiments performed.

3.5.3 RNF13 interacts with AP-1 through both dileucine and triple-valine motifs

Given the importance of the valine residues in establishing contact between RNF13 with AP1M1 (Fig. 3.1B), possibly in multiple protein registers (Fig. 3.1D), site-directed mutagenesis was used to substitute the three conserved valines (363VVV365) with glycine residues (363GGG365, hereafter named GGG). To investigate the importance of both motifs for the binding of RNF13 with AP-1, purified GST or the GST-RNF13 intracellular domain (amino acids 281-381; WT or variants) immobilized on glutathione-functionalized Sepharose 4B affinity resin were incubated with HeLa cell lysate. Immunobloting against the AP-1 subunit γ (AP1G1) revealed that the AP-1 complex binds to RNF13 WT and GGG similarly (Fig. 3.3A-B). However, AP1G1 did not interact with either AA or AA/GGG, suggesting the importance of the dileucine motif for a strong interaction with the AP-1 complex. As a control from a previous study (Fig. 2.4A) (Cabana *et al.*, 2021), GST-fusion protein variants containing an abrogated dileucine motif (i.e. AA and AA/GGG) completely failed to pulldown AP3S1 (Fig. 3.3A, C). To determine whether these substitutions abrogated the ability of RNF13 to bind AP-1 in a cellular context, HEK293T/17 cells were transiently transfected with plasmids encoding GFP-tagged RNF13 proteins (WT, GGG, AA, or AA/GGG). GFP-tagged RNF13-containing protein complexes were purified from cell lysates using GFP-Catcher beads. Immunoblotting with an AP1G1-specific antibody revealed the presence of AP-1 in all samples containing purified GFP-tagged RNF13 protein complexes, including the variants containing the GGG substitutions

(Fig. 3.3D-E). However, compared to the binding capacity of RNF13 WT with AP1G1, RNF13 AA co-immunoprecipitated 57% of AP1G1, whereas the AA/GGG variant retained only 20% (Fig. 3.3D-E). As expected from previous work, specific immunoblotting against the AP-3 subunit δ (AP3D1) revealed that both AA and AA/GGG variants do not interact with AP-3 (Fig. 3.3D, F). In contrast, there was no difference between RNF13 WT and GGG when binding AP-1 or AP-3 complexes (Fig. 3.3D-F).

To characterize further the RNF13 variants containing the GGG substitution, a colocalization assay with AP1G1 was performed. HeLa cells expressing GFP-tagged RNF13 WT, GGG, AA or AA/GGG were fixed and then immunolabelled with an AP1G1-specific antibody. The RNF13 AA/GGG variant displayed a diffuse distribution that contrasted with an intracellular punctate distribution of RNF13 WT, AA and GGG proteins (Fig. 3.3G). However, the Manders' overlap coefficient of RNF13 over AP1G1 was not significantly different between the conditions (Fig. 3.3H). There was only a partial overlap of RNF13 with AP1G1 for all conditions (Fig. 3G), similar to what was observed in Fig. 3.1. Altogether, the protein-protein interaction assays suggest that AP-1 binds RNF13 to some extent *in cellulo* but not *in vitro*, even when the dileucine motif is non-functional. However, only abrogating the triple valine of the VVVQLQ motif does not affect RNF13 interaction with both AP-1 and AP-3.

3.5.4 Alteration of both dileucine motif and triple valine of the VVVQLQ motifs alters endosomal localization and traps RNF13 in the Golgi

As mentioned above, the RNF13 AA/GGG variant exhibits a diffuse intracellular distribution, suggesting that functional dileucine and VVVQLQ motifs are needed for endosomal localization. To characterize this phenotype, immunofluorescence assays were performed using the expression of GFP-tagged RNF13 WT and variants in HeLa cells. Immunolabelling of endogenous subcellular marker Rab7 (for late endosomes) showed that RNF13 WT signals partially overlapped with those of Rab7 (Fig. 3.4A-B), results concordant with our previous study (Fig. 2.1C) (Cabana *et al.*, 2021). Whereas the results obtained with AA and GGG variants were very similar to those obtained with WT RNF13, the overlap coefficient of RNF13 AA/GGG with Rab7 was significantly reduced compared to that of the WT (Fig. 3.4A-B). To further characterize the intracellular distribution of the AA/GGG variant, various ER-to-Golgi markers were used to identify RNF13 variant localization. First, an immunofluorescence experiment showed that WT and all three RNF13 variants presented little overlap with the endogenous ER marker protein disulfide-isomerase (PDI) and no significant difference in Manders' coefficient between conditions (Fig. 3.S3A-B). Next, the result from an immunolabeling to detect endogenous type III transmembrane Golgi protein marker RCAS1 (receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells) showed that the overlap of RCAS1 with the AA/GGG variant was significantly different than with RNF13 WT (Fig. 3.4C-D). Similar results were obtained with

the ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) marker ERGIC-53 and TGN38, a known membrane protein resident of the TGN, in which the overlap coefficient for AA/GGG was significanly increased (Fig. 3.4E-H). Importantly, the expression of RNF13 WT or its variants did not appear to alter the distribution of the endogenous markers compared to that in cells transfected with GFP alone (data not shown). Overall, the results indicate that proper endosomal localization requires only one functional motif, either dileucine or VVVQLQ. However, endosomal localization of RNF13 is significantly disrupted when both motifs are altered.

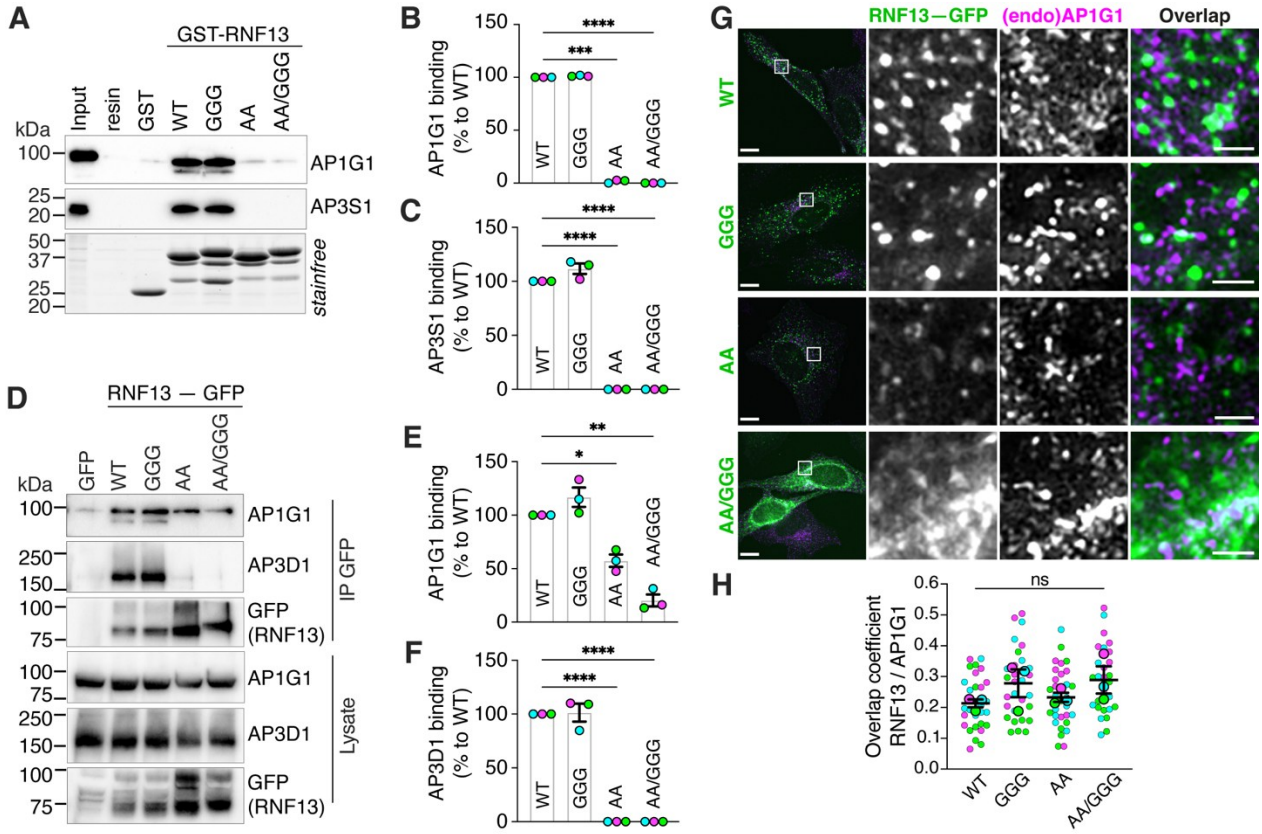


Figure 3.3: Alteration to RNF13 dileucine motif disrupts binding to AP-1 complex *in vitro* but not completely *in cellulo.*

(**A**) Representative immunoblots from independent experiments (N=3) show the detection of endogenous AP3S1 and AP1G1 from HeLa cell lysates incubated in the presence or absence of GST or purified GST-RNF13 (aa 281-381; WT, AA, GGG or AA/GGG) immobilized on glutathione Sepharose 4B affinity resin. (**B-C**) The strip plots represent the normalized relative protein levels obtained by pulldown for (**B**) AP1G1 and (**C**) AP3D1 in each independent experiment analyzed (N=3). Each color represents an independent experiment. Values are expressed as mean ± SEM. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ using RM one-way ANOVA with multiple comparisons. (**D**) Western blot analysis of co-immunoprecipitated AP1G1 and AP3D1 with GFP-tagged RNF13 (WT, GGG, AA and AA/GGG) from transfected HEK293T/17 cells. Representative immunoblots from independent experiments (N=3) show the detection of GFP (RNF13) and endogenous AP1G1 and AP3D1. (**E-F**) The strip plots represent the normalized relative protein levels co-immunoprecipitated for (**E**) AP1G1 and (**F**) AP3D1 in each independent experiment analyzed (N=3). Each

color represents an independent experiment. Values are expressed as mean ± SEM. * p = 0.0348, ** p = 0.0095 and **** p < 0.0001 using RM one-way ANOVA with multiple comparisons. (**G**) Representative immunofluorescence images from independent experiments (N=3) show HeLa cells expressing the indicated variants of RNF13-GFP (in green) and stained for AP1G1 (in purple). Scale bars: 10 µm (whole-cell images); 2 µm (boxed areas shown at higher magnification). (**H**) The jittered individual value plot represents Manders' overlap coefficient of RNF13 over AP1G1. Values are expressed as mean ± SEM for N=3. Each color represents an independent experiment. Smaller circles represent each individual cells analyzed (n=30 cells). Larger circles represent the mean of an independent experiment. Not significant (ns) using ordinary one-way ANOVA with multiple comparisons.

To gain a better understanding of RNF13 variants trafficking through the biosynthetic secretory pathway such as their potential impact on RNF13 glycosylation, we conducted digestion using endoglycosidase H (Endo H) and peptide-N-glycosidase F (PNGase F). Specifically, HEK293T/17 cells were transfected with plasmids encoding HA-tagged RNF13 proteins. RNF13 was purified from cell lysates using anti-HA magnetic beads. The results showed that undigested WT RNF13 could be immunodetected as three intense protein species at approximately 53, 58 and 62 kDa, and as two faint bands at 72 and 80 kDa (Fig. 3.4I). The action of Endo H results in a significant reduction of the bands at 58 and 72 kDa, whereas a faint 50 kDa band became the most abundant species for RNF13 (Fig. 3.4I). Furthermore, digestion with PNGase F gave similar results except that the band at 80 kDa also disappeared, whereas the 50 kDa band shift to around 48 kDa (Fig. 3.4I). Importantly, compared to the WT RNF13 protein (Fig. 3.4I), all variants including AA/GGG exhibited similar and reproducible patterns, suggesting that alteration to neither the dileucine nor the VVVQLQ motifs affect RNF13 glycosylation state.

BFA is known to inhibit the secretory pathway and induce morphological changes in the Golgi and redistribute its content into the ER (Dinter et Berger, 1998). To investigate how the RNF13 AA/GGG variant differs from WT RNF13 in its overlaps with the organelle markers ERGIC-53, RCAS1, and TGN38 (Fig. 3.4C-H), transfected HeLa cells expressing GFP-tagged WT, AA and AA/GGG RNF13 proteins were incubated in the absence or presence of BFA for one hour. After fixation, the cells were immunolabeled against endogenous RCAS1, ERGIC-53, and TGN38. The results showed that BFA treatment promoted RNF13 AA/GGG intracellular redistribution in the form of puncta, thus supporting a Golgi localization for the RNF13 AA/GGG protein (Fig. 3.5A, C, E). When compared to dimethylsulfoxide (DMSO)-treated cells, BFA treatment did not alter the measured overlap coefficient between AA/GGG and RCAS1 (Fig. 3.5B). Additionally, BFA-treated AA/GGG cells were not significantly different from cells expressing WT and AA proteins in the absence or the presence of BFA (Fig. 3.5B). BFA treatment also significantly decreased the overlap coefficient of RNF13 AA/GGG with ERGIC-53, whereas the overlap coefficients of WT and AA were unchanged (Fig. 3.5D). Finally, the overlap coefficients of RNF13 WT, AA and AA/GGG with

TGN38 were not significantly different when cells were treated with BFA compared to DMSO (Fig. 3.5F). Overall, these results strongly support that RNF13 AA/GGG is held in the Golgi apparatus.

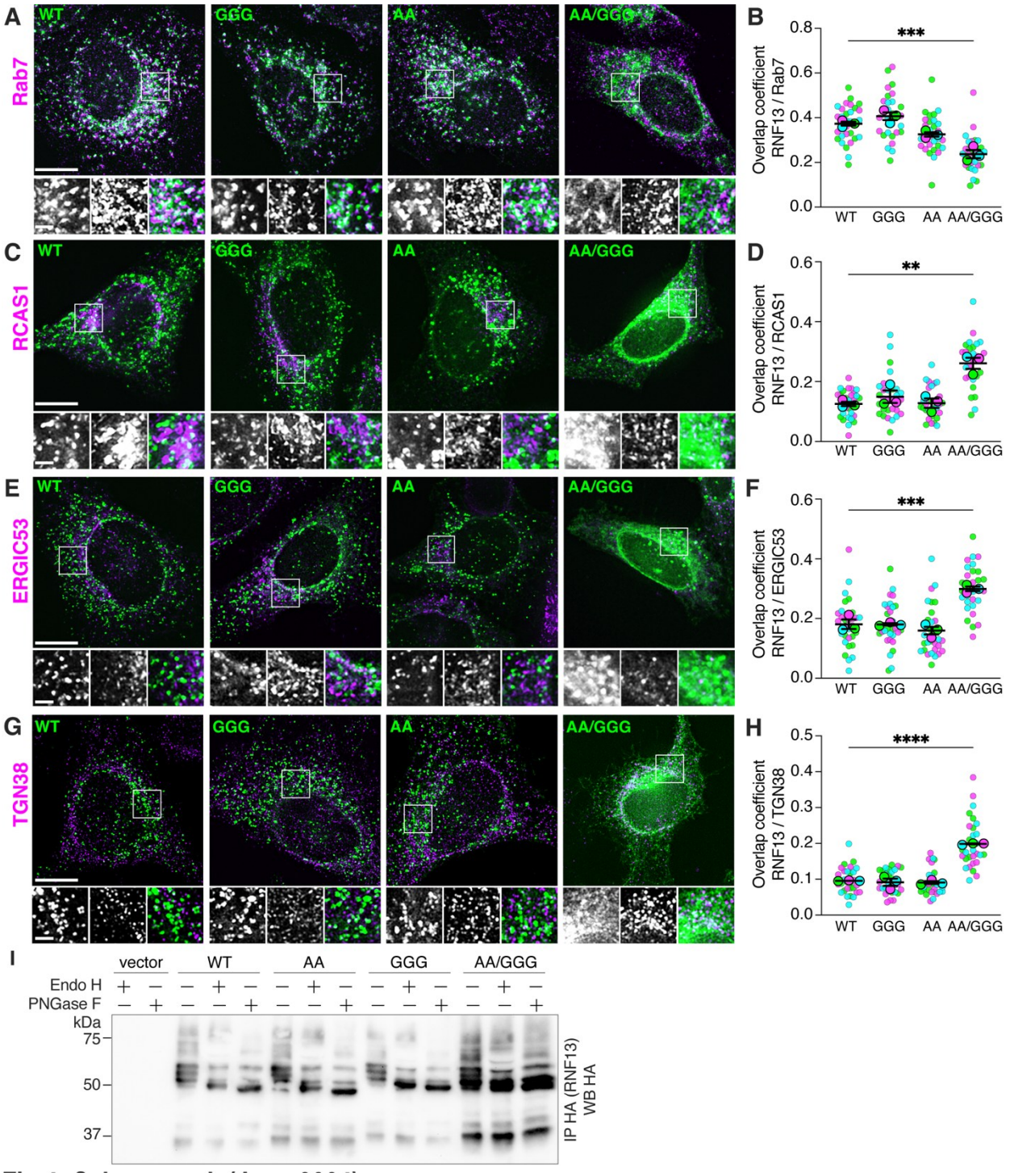


Figure 3.4: Alteration of both the dileucine and VVVQLQ motifs affects the endosomal localization of RNF13, whereas alteration of only one motif does not.

(**A, C, E, G**) Representative immunofluorescence images from independent experiments (N=3) show HeLa cells expressing the indicated variants of RNF13-GFP (in green) and stained for (**A**) the late endosomes marker Rab7, (**C**) the Golgi marker RCAS1, (**E**) the ER-Golgi intermediate compartment marker ERGIC53 and (**G**) the trans-Golgi marker TGN38 (in purple). Scale bars: (whole-cell images); 2 μm (boxed areas shown at higher magnification). (**B, D, F, H**) The jittered individual value plots represent Manders' overlap coefficient of RNF13 over (**B**) Rab7, (**D**) RCAS1, (**F**) ERGIC-53 and (**H**) TGN38. Values are expressed as mean ± SEM. Each color represents an independent experiment. Smaller circles represent individual cells analyzed (n=30 cells). Larger circles represent the mean of an independent experiment (N=3). For each condition analyzed: N=3. ** p <0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 using ordinary one-way ANOVA with multiple comparisons. (**I**) Western blot analysis of immunoprecipitated HA-tagged RNF13 (WT, GGG, AA and AA/GGG) protein complexes digested with 500 U of Endo H or PNGase F for 2 hours at 37°C. A representative immunoblot from multiple independent experiments (N=3) is shown.

3.5.5 Knockdown of both AP-1 and AP-3 interferes with RNF13 endosomal localization

Based on our findings, RNF13 can interact with both AP-1 and AP-3 through the dileucine motif, whereas only AP-1 weakly interacts with the VVVQLQ motif (Fig. 3.3A-F). Furthermore, only the AA/GGG variant protein had an altered endosomal localization (Fig. 3.4A-H). Thus, we speculated that both AP-1 and AP-3 regulate the endosomal targeting of RNF13. To investigate the role of endogenous AP-1 and AP-3 on RNF13 localization, HeLa cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) to knockdown either AP1G1 or AP3D1, or both simultaneously (AP1G1+AP3D1). Cells were lysed, and the solubilized proteins were separated on SDS-PAGE before protein-bound membranes were probed with specific antibodies (Fig. 3.S4A-B). AP1G1 and AP3D1 protein abundance was significantly reduced in the presence of DsiRNAs specific to their genes (Fig. 3.S4A, C). Notably, siAP1G1 did not affect AP3D1 protein level, nor did siAP3D1 affect AP1G1 protein abundance (Fig. 3.S4B, D). To control for the biological effectiveness of AP-1 and AP-3 knockdown, we assessed the trafficking of cargo proteins known to be transported by either one of these AP complexes. In HeLa cells transfected with siRNAs against AP1G1 and AP3D1, the Golgi localization of the endogenous Cation-independent mannose-6-phosphate receptor (CI-MPR), known to be transported by AP-1 (Stahlschmidt *et al.*, 2014; Waguri *et al.*, 2003), was compared to that of RCAS1. As expected, AP-1 knockdown altered CI-MPR distribution, whereas repression of AP-3 has no effect (Fig. 3.S5A). The Manders' overlap coefficient between CI-MPR and RCAS1 was not significantly different when AP-1 was repressed (Fig. 3.S5B). In a validation experiment with a cargo protein trafficked by AP-3, the intracellular localization of endogenous lysosomal protein CD63 (Rous *et al.*, 2002) was compared with that of lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (Lamp1). As expected, only the repression of AP3D1 significantly altered CD63 localization, which correlated with the significant decrease of Manders' overlap coefficient between CD63 and Lamp1 (Fig. 3.S5C-D). Overall, these results confirm that both AP1G1 and AP3D1 knockdown efficiently alter the trafficking of specific cargo proteins.

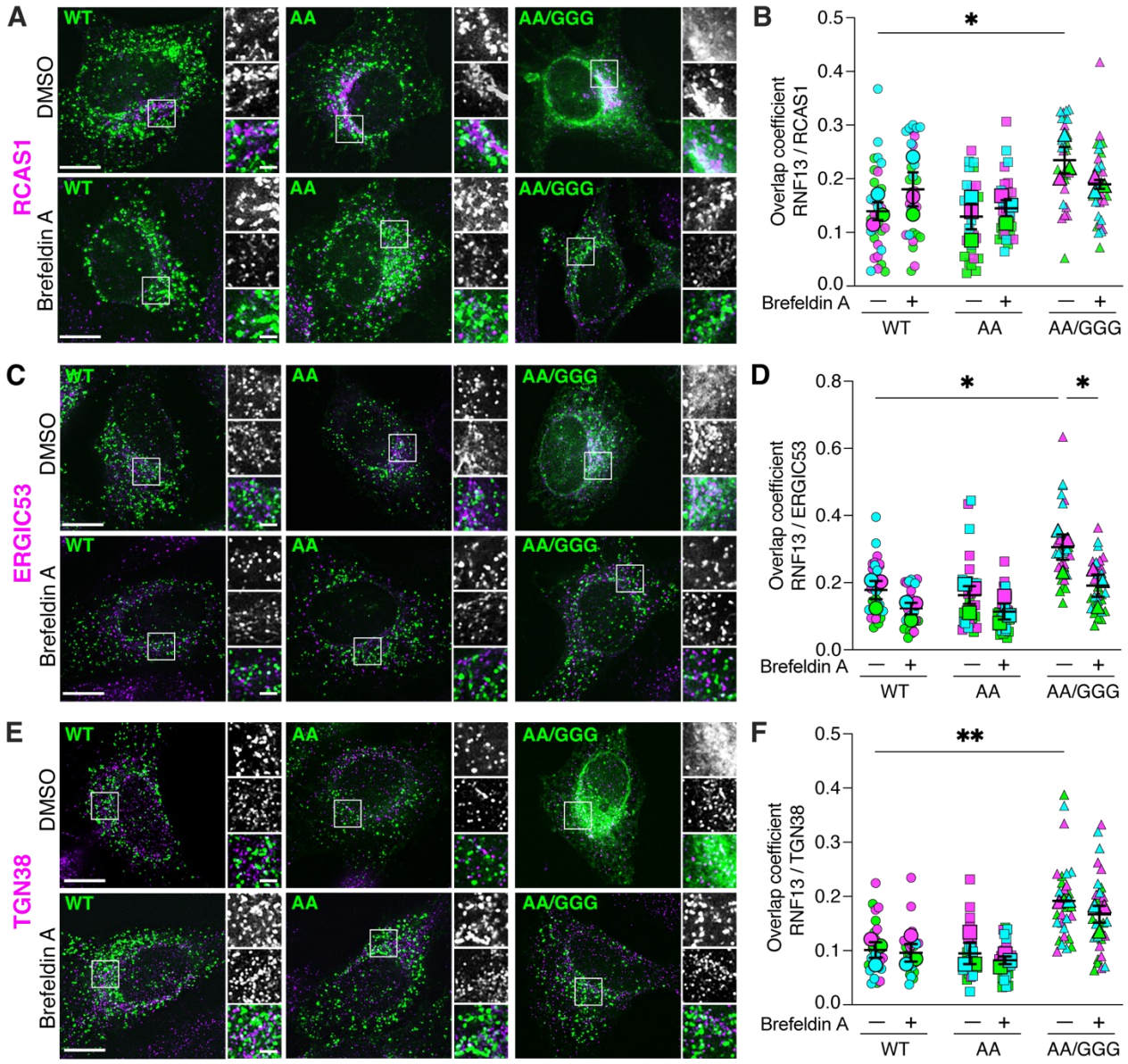


Figure 3.5: Golgi fragmentation by brefeldin A redistributes RNF13 AA/GGG in vesicle-like structures.

Representative images from independent experiments (N=3) show HeLa cells expressing RNF13-GFP (in green), treated with 10 uM BFA for 1 hour, followed by staining of (**A**) RCAS1, (**C**) ERGIC-53 and (**E**) TGN38 (in purple). Scale bars: 10 µm (whole-cell image); 2 µm (boxed areas shown at higher magnification). (**B, D, F**) The jittered individual value plots represent Manders' overlap coefficient of RNF13 over (**B**) RCAS1, (**D**) ERGIC-53 and (**F**) TGN38. Values are expressed as mean ± SEM for N=3. Each color represents an independent experiment. Smaller circles represent individual cells analyzed (n=30 cells). Larger circles represent the mean of an independent experiment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ using two-way ANOVA with multiple comparisons.

The impact of reducing AP1G1 and AP3D1 proteins on RNF13 intracellular localization was investigated. First, Rab7, RCAS1, ERGIC-53 and TGN38 appeared to show a similar intracellular distribution and fluorescence intensity between all the tested siRNAs, suggesting that AP1G1 or AP3D1 knockdown had no significant effect on these markers (Fig. 3.6A, C, E, G). Additionally, a single knockdown of either AP1G1 or AP3D1 was insufficient to alter RNF13 distribution (Fig. 3.6A-H), contrasting with the combination treatment of siAP1G1 with siAP3D1 that significantly reduced the overlap between RNF13 and Rab7 (Fig. 3.6A-B). Compared to the control, only the combination treatment of siAP1G1 with siAP3D1 had a significantly higher Manders' overlap coefficient for RNF13 over RCAS1, ERGIC-53 and TGN38 (Fig. 3.6C-H). Importantly, similar results were obtained for both siAP1G1 #1 and #2 and siAP3D1 #1 and #2, which suggests that the observed effect was not caused by nonspecific targeting of the DsiRNAs. These results suggest that RNF13 is trapped in the Golgi when both AP-1 and AP-3 complexes are repressed, whereas the presence of either the AP-1 or AP-3 complex is sufficient to target RNF13 to late endosomes.

3.5.6 Knockdown of AP-1 alters RNF13 AA endosomal localization

So far, the results suggest that AP-1 and AP-3 play a role in RNF13 post-Golgi trafficking to the endosomal pathway. Here, the importance of the interaction between AP complexes with the dileucine and VVVQLQ motifs on RNF13 trafficking was investigated. HeLa cells were transfected with a combination of siRNAs to maximize knockdown efficiency at 72 hours. 24 hours before labelling endogenous subcellular structures with antibodies against Rab7 and RCAS1, cells were transfected with plasmids encoding GFP-tagged RNF13 WT, AA or GGG proteins. As shown above, only combining siAP1G1 with siAP3D1 significantly decreased the Manders' overlap coefficient of RNF13 WT over Rab7 (Fig. 3.7A-B). A similar result was obtained for RNF13 GGG, suggesting that the dileucine motif can interact with either AP-1 or AP-3 when the other complex is repressed (Fig. 3.7A-B). There was a significant decrease in colocalization between RNF13 AA and Rab7 when only AP-1 was repressed, suggesting that this variant normally traffics through an AP-1-dependent pathway (Fig. 3.7A-B). To confirm that RNF13 AA is trapped in the Golgi when AP-1 is repressed, immunolabelling against RCAS1 was also performed. The results show that a combination treatment of both siAP1G1 and siAP3D1 is required to increase RNF13 WT and GGG's presence in the RCAS1-positive compartment, whereas siAP1G1 treatment alone was sufficient to increase the overlap of RNF13 AA with RCAS1 (Fig. 3.7C-D). Overall, these results suggest that the dileucine motif of RNF13 is needed to use the AP-3-dependent pathway but not for AP-1-dependent trafficking.

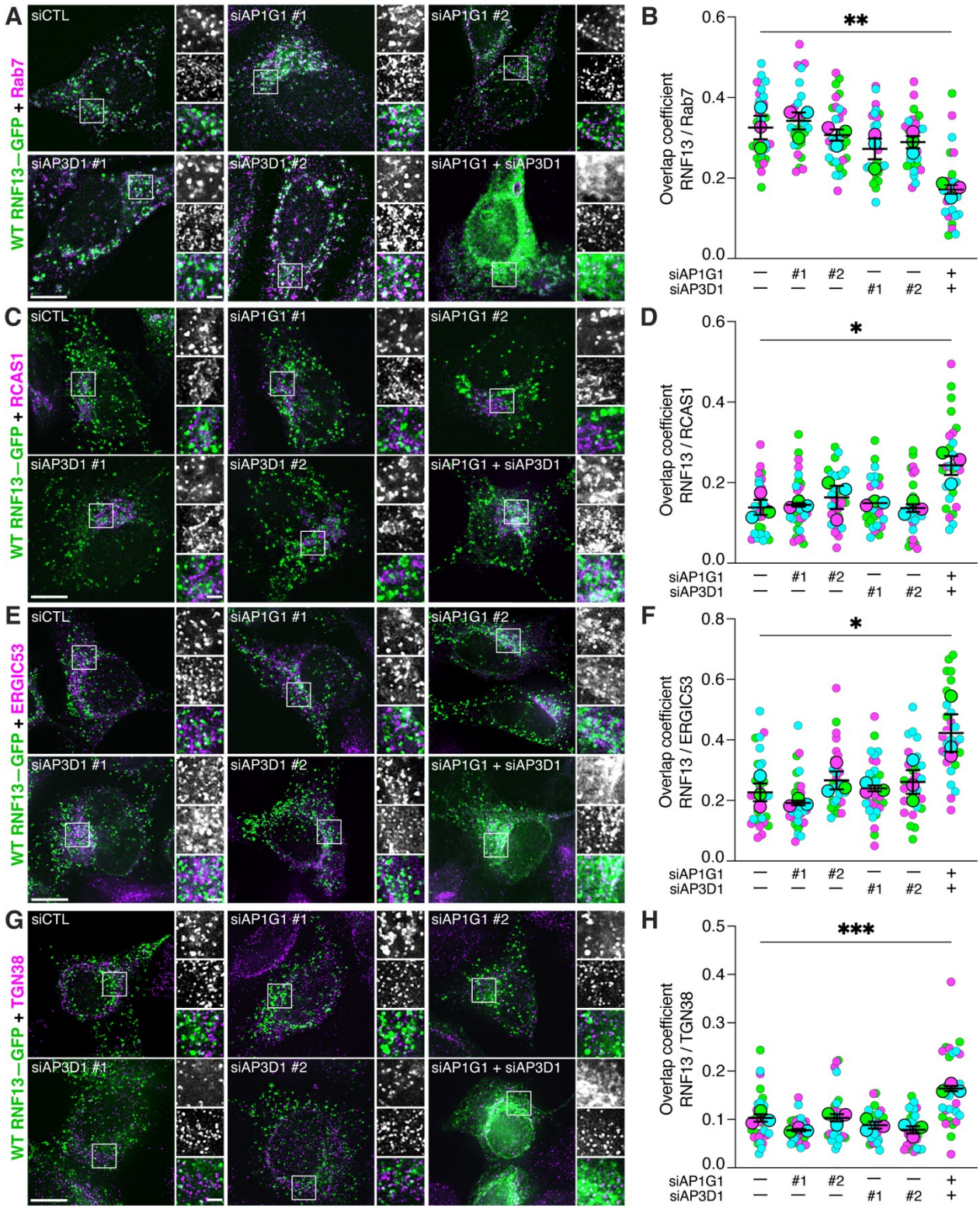


Figure 3.6: Knockdown of both AP-1 and AP-3 interferes with RNF13 endosomal localization.

(**A, C, E, G**) Representative images from independent experiments (N=3) show siRNAs-transfected HeLa cells expressing WT RNF13-GFP (in green) and stained for (**A**) Rab7, (**C**) RCAS1, (**E**) ERGIC-53 and (**G**) TGN38 (in purple). Scale bars: 10 µm (whole-cell images); 2 µm (boxed areas shown at higher

magnification). (**B, D, F, H**) The jittered individual value plots represent the Manders' overlap coefficient of RNF13 over (**B**) Rab7, (**D**) RCAS1, (**F**) ERGIC-53 and (**H**) TGN38. Values are expressed as mean ± SEM for N=3. Each color represents an independent experiment. Smaller circles represent individual cells analyzed (n=30 cells). Larger circles represent the mean of an independent experiment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ using ordinary one-way ANOVA with multiple comparisons.

3.5.7 Exogenous RNF13 increases F-actin abundance

So far, the results demonstrate that AP-1 and AP-3 regulate RNF13 trafficking but the consequences of different variants remain unknown. As numerous studies have demonstrated a connection between the actin network and dynamics and their regulation of and by the endosomal pathway (Chakrabarti *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021), we stained F-actin in HeLa cells expressing GFP-tagged RNF13 WT and variant proteins. Here, a dominant-negative variant with point mutations in the RING domain (C258A and H260A, hereafter named DN) of RNF13 was used to evaluate how its ubiquitin E3 ligase activity is involved and how it compares to mutations in the dileucine motif. There was no striking effect of expression of the different variants on cell morphology compared to that of a cell transfected with an empty vector (Fig. 3.8A). Unexpectedly, expression of RNF13 WT led to a significant increase in F-actin fluorescence intensity compared to that in GFP-expressing cells (Fig. 3.8B). The same effect was observed for the GGG variant, whereas the DN variant abrogated this effect, suggesting that the E3 ubiquitin ligase activity is likely involved in the phenotype (Fig. 3.8B). Interestingly, expression of both AA and AA/GGG also did not increase F-actin expression (Fig. 3.8B). As the mutation in the dileucine motif might alter an unidentified interaction with other proteins, knockdown of AP-1 and AP-3 was performed to evaluate whether the sorting pathways were involved (Fig. 3.8C). Importantly, phalloidin fluorescence intensity remained constant in cells expressing GFP, indicating that the knockdown did not affect the abundance of F-actin (Fig. 3.8D). RNF13 WT expression increased phalloidin fluorescence intensity compared to that upon GFP expression in cells transfected with non-targeting siRNA (Fig. 3.8D). Knockdown of AP-3 either alone or combined with knockdown of AP-1 inhibited this effect, suggesting that the AP-3 pathway is important for this function (Fig. 3.8D). Knockdown of AP-1 did not totally rescue the phenotype as the fluorescence intensity was still significantly higher when compared to that in GFP-expressing cells treated with siAP1G1, but it was significantly lower than RNF13 WT-expressing cells treated with control siRNA (siCTL) (Fig. 3.8D). Overall, these results suggest that the expression of RNF13 affects F-actin expression but requires interaction with AP-3 and its ubiquitin E3 ligase activity.

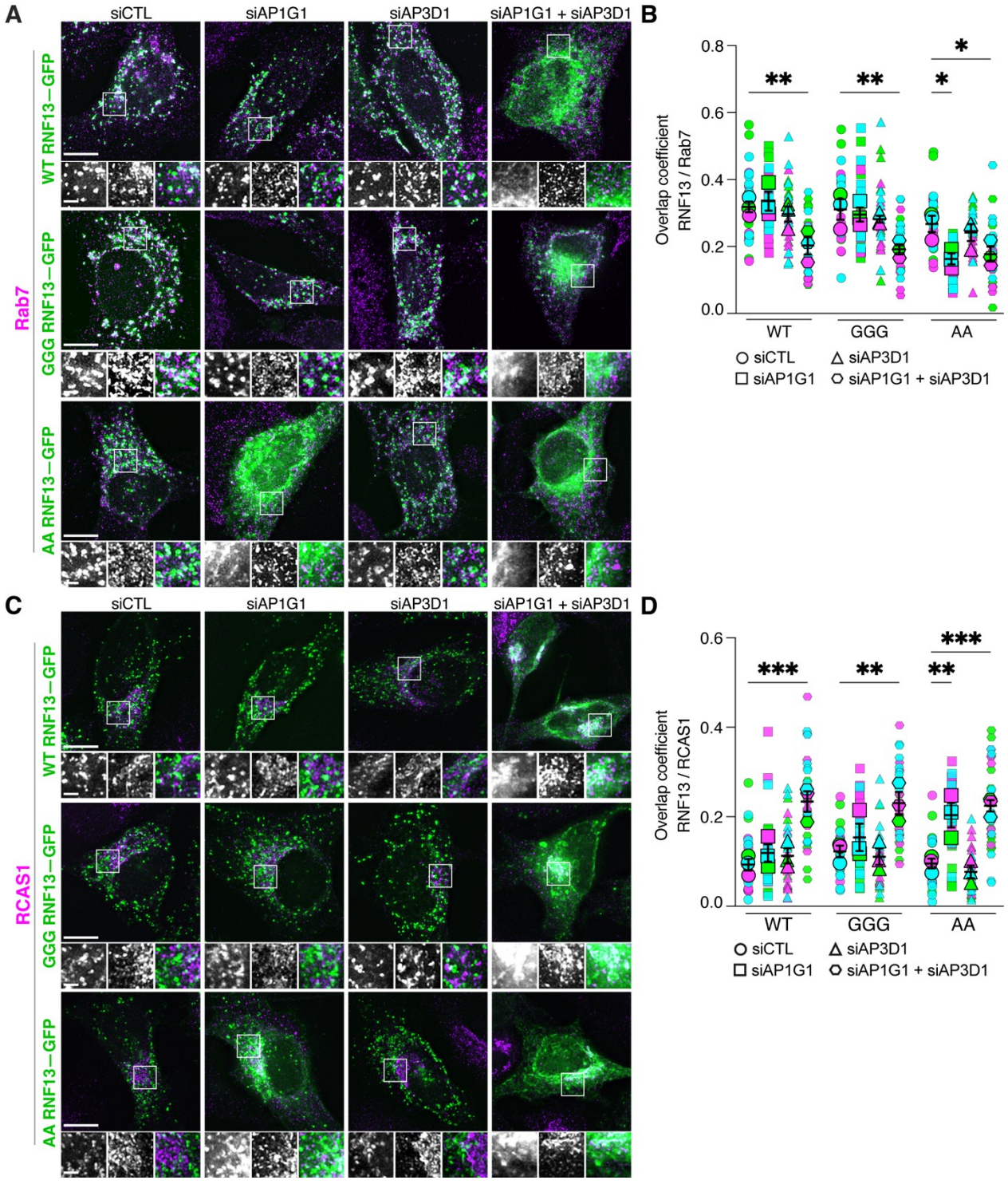


Figure 3.7: Knockdown of AP-1 is sufficient to disrupt endosomal localization of RNF13 AA but not of RNF13 WT or GGG.

(**A, C**) siRNAs-transfected HeLa cells were further transfected with constructs encoding GFP-tagged RNF13 (WT, AA or GGG) proteins. Representative images from independent experiments (N=3) show RNF13-GFP (in green) and staining of (**A**) Rab7 or (**C**) RCAS1 (in purple). Scale bars: 10 µm (whole-cell

images); 2 µm (boxed areas shown at higher magnification). (**B, D**) The jittered individual value plots represent the Manders' overlap coefficient of RNF13 over (**B**) Rab7 or (**D**) RCAS1. Values are expressed as mean ± SEM for N=3. Each color represents an independent experiment. Smaller circles represent individual cells analyzed (n=30 cells). Larger circles represent the mean of an independent experiment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ using two-way ANOVA with multiple comparisons.

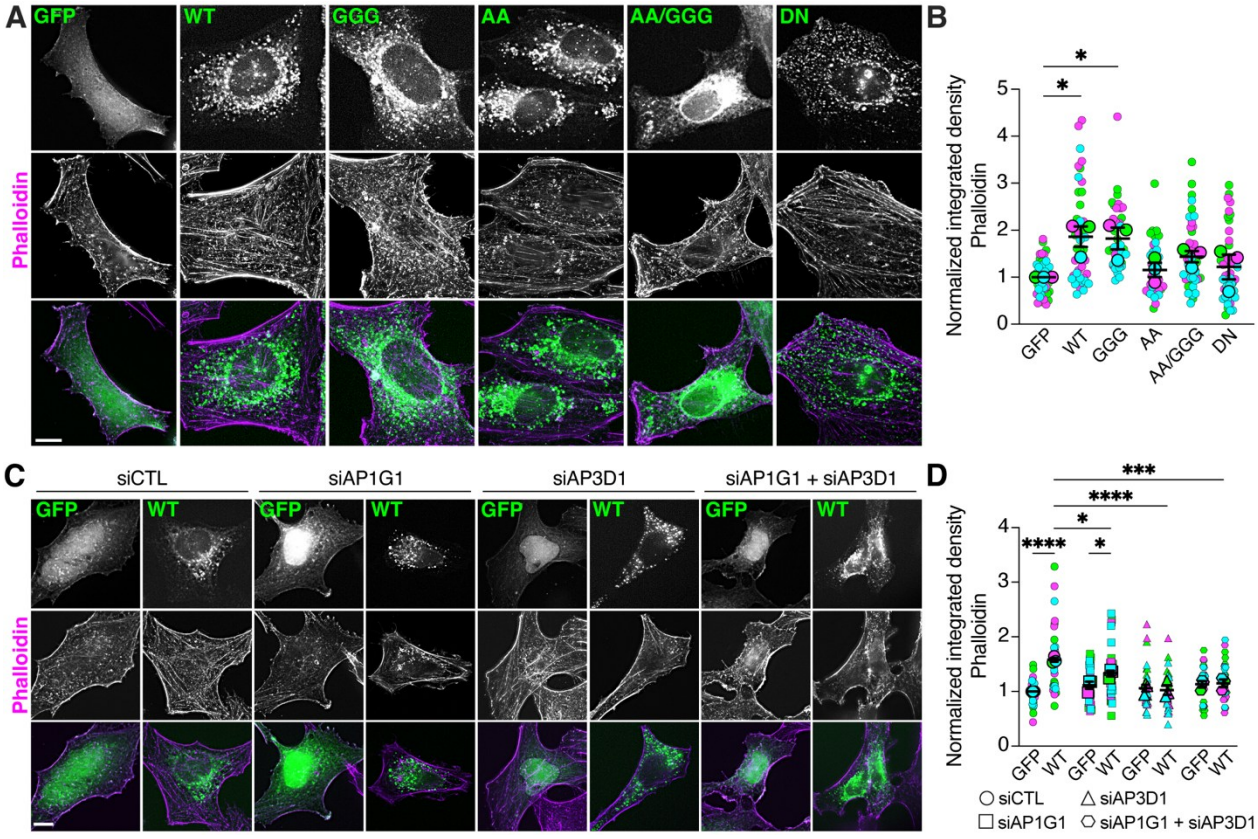


Figure 3.8: WT RNF13 modifies F-actin abundance, but alterations in the dileucine motif and in the E3 ligase catalytic site or knockdown of AP-3 are sufficient to prevent this effect.

(**A, C**) Representative images from independent experiments (N=3) show (**A**) HeLa cells expressing the indicated variants of RNF13-GFP (in green) or (**C**) siRNAs-transfected HeLa cells expressing WT RNF13-GFP (in green) and stained for phalloidin (in purple). Scale bars: 10 µm. (**B, D**) The jittered individual value plots represent the normalized integrated density of phalloidin. Values are expressed as mean ± SEM for N=3. Each color represents an independent experiment. Smaller shapes represent each individual cells analyzed (n=30-45 cells). Larger shapes represent the mean of an independent experiment. (**B**) * $p < 0.05$ using ordinary one-way ANOVA with multiple comparisons and (**D**) * $p < 0.05$, *** $p = 0.0005$, **** $p < 0.0001$ using two-way ANOVA with multiple comparisons.

3.6 Discussion

Our group recently demonstrated that alteration to the dileucine motif of RNF13, as in the L311S and L312P variants causing developmental and epileptic encephalopathy 73, abrogates the binding to the clathrin AP complex AP-3, which decreases the presence of RNF13 in lysosomes (Fig. 2.1B; 2.6B-C) (Cabana *et al.*, 2021). Here, we report a VVVQLQ motif that behaves similarly to a reverse tyrosine-like motif within the C-terminal region of RNF13. This motif interacts with the medium-sized subunit of AP-1 to regulate the trafficking of the RNF13 protein variant without an effective dileucine motif from the Golgi to the endosomal compartment.

Sorting signals conforming to the classical YxxΦ tyrosine-based motif have been well-documented for many transmembrane proteins (Ohno *et al.*, 1998). This motif is particularly important for protein targeting in the lysosome or vacuole pathway in yeast (Eising *et al.*, 2022). However, despite the presence of a non-canonical tyrosine-based motif (375YxxA378) in the endolysosomal ubiquitin E3 ligase RNF13, neither the endosomal targeting of RNF13 nor its binding to endogenous AP1G1 was abrogated by tyrosine 375 substitution with alanine (Y375A) (Fig. 3.S6A-E). Instead, AlphaFold predicted the residues 362DVVVQLQP369 as a new motif responsible for interaction with AP1M1 but not AP3M1. To understand the preference for AP1M1, we aligned both structures to identify any amino acid differences near the VVVQLQ motif-binding site. Although AP1M1 and AP3M1 structures were superposable, we noticed some changes for certain residues (Fig. 3.S1D). Notably, P407 and W408 of AP1M1 aligned, respectively, with K403 and F402 of AP3M1. This could explain why RNF13 interacts with AP-1 using its VVVQLQ motif but not AP-3 (Fig. 3.S1D).

While validating the *in sillico* analyses using biochemical assays, we compared the AlphaFold predicted QxxΦ motif of RNF13 with other known motifs that allow association with the AP1M1-containing complex. One protein that interacts with AP1M1 through a unique YxxΦ pattern is BST2, an antiviral factor that restricts the release of enveloped viruses from the cell surface (Jia *et al.*, 2014; Urata *et al.*, 2018). BST2 binds to AP1M1 using a double-tyrosine motif with valine at position Y+3 (YxYxxV) (Jia *et al.*, 2014). Interestingly, a study found that leucine was the preferred amino acid at the Y+3 position in tyrosine-based motifs for interaction with AP1M1, contrasting with valine residue which induces a less potent interaction (Ohno *et al.*, 1998). According to a report by Jia *et al.* (2014), V11 in BST2 only partially fills the hydrophobic pocket of AP1M1. However, the HIV-1 viral protein u (Vpu) has an acidic dileucine motif that allows interaction with AP-1 (Jia *et al.*, 2014). Thus, when Vpu is added to the complex formed by BST2 and AP-1, it enhances the weak affinity between BST2 and AP-1 through its dileucine motif (Jia *et al.*, 2014). Recent mass spectrometry analyses revealed that RNF13 interacts with RNF167, another

transmembrane E3 ligase harboring a dileucine motif (Cabana et Lussier, 2022; Huttlin *et al.*, 2021; Huttlin *et al.*, 2017). Although highly speculative, the concept of RNF13 dimerization could be applied in cells and act as its own enhancer (van Dijk *et al.*, 2014). The hypothesis of a homo- or heterodimeric structure could explain the difference obtained by the co-immunoprecipitation and GST pulldown assays. In GST pulldown assays, only the C-terminal was used, which could prevent RNF13 dimerization and result in the complete loss of interaction for the AA and AA/GGG variants with AP-1 (Fig. 3.3A-F). In all cases, the possibility of RNF13 having a homo- or heterodimeric structure is intriguing, especially given its role as a transmembrane endosomal ubiquitin ligase. Regarding the tyrosine-based motif of BST2, we found that Y8 of BST2 is in the same position as Q368 of RNF13, with both residues being crucial for interaction with AP1M1 (Fig. 3.1E). While comparing BST2 and RNF13 proteins, we noticed that, unlike the classical orientation of the YxxΦ motif in BST2, the RNF13 motif was reversed (365VQLQ368), generating a ΦxxQ motif. The ΦxxY motif in the H^+/K^+-ATPase β subunit was previously suspected of playing a role in sorting (Roush *et al.*, 1998), which supports our results. A QxxΦ motif was also recently reported to potentially act as a lysosomal sorting motif through the yeast VPS10 pathway, but the exact binding region was not defined (Eising *et al.*, 2022). Importantly, our study reports that the ΦxxQ motif in RNF13 acts as a tyrosine-based-like motif, which could be of great importance in other transmembrane proteins targeting to the endolysosomal pathway.

Similarly to the BST2 double-tyrosine motif discussed above, the RNF13 VVVQLQ motif is duplicated in this AP1M1 binding zone, corresponding to RNF13 residues 363VVVQ366 and 365VQLQ368 (Fig. 3.1D). While designing a variant to validate the importance of the RNF13 VVVQLQ motif, we were especially concerned that replacing the valine residues with alanines would have no significant impact on the interaction owing to their similarity (Betts et Russell, 2007). Although glycine residues are notorious for inducing high flexibility in a polypeptide chain, this was consciously considered as an advantage for altering the RNF13 VVVQLQ motif and its binding to AP1M1. Replacement of valines with cysteine residues was also tested, resulting in AA/CCC variant trafficking being altered similarly to AA/GGG (data not shown). Thus, by substituting RNF13's VVV with GGG, we expected a complete loss of interaction between AP-1 and RNF13 AA/GGG variant. Whereas the GST pulldown results support this idea, residual AP-1 complex protein binding was observed with the AA/GGG variant (Fig. 3.3D-F). To further characterize this new motif, site-directed mutagenesis was used to substitute the two glutamine (Q366 and Q368) predicted to be involved in the interaction with alanine residues (Q366A and Q368A, hereafter named QA) in the presence and absence of a functional dileucine motif (AA/QA). Immunolabelling of the endogenous subcellular marker Rab7 and RCAS1 showed that RNF13 AA/QA also had an altered endosomal targeting but RNF13 QA did not, suggesting that the glutamine is also important in this motif for the interaction with AP1M1

(Fig. 3.S6A-D). Altogether, our study supports the importance of the RNF13 YxxΦ-like motif as a backup interaction motif and redundant mechanism for RNF13 endolysosomal targeting.

In this study, the suboptimal performance of anti-RNF13 antibodies, whether commercially available or custom generated, represents a significant limitation that was circumvented using exogenous RNF13. To minimize the potential adverse effects associated with the presence of an exogenous protein in cells, we have restricted RNF13 expression to a period of 24 hours for immunofluorescence. Based on this approach, we anticipate, although have not yet definitively confirmed, that exogenous RNF13 will not accumulate in the biosynthetic pathway. Furthermore, we found that the AA/GGG variant is present at higher levels than the WT protein (see Fig. 3.3D). This could cause saturation of transport machinery, leading to Golgi retention as a secondary effect (Fig. 3.4) (Mettlen *et al.*, 2010; Theos *et al.*, 2005; Valdivia *et al.*, 2002; Warren *et al.*, 1998). However, the variant AA is also expressed at higher levels (Fig. 3.3D). To ensure that the AA/GGG was not overly expressed compared to other mutant or WT proteins, quantification of the bands signals on western blots and the fluorescence intensity from RNF13 was normalized against that of the WT for each independent experiment. Although the levels of the AA and AA/GGG variants were 1.4-fold the level of the WT protein using western blot quantification and 1.5-fold for fluorescence intensity quantification (see Fig. 3.S7A-C), it is unlikely that the observed phenotype for the AA/GGG variant is caused by transport saturation. Also, we did not find any clear correlation between the protein levels of RNF13 variants and the value of the Manders overlap coefficient with endogenous cellular markers. Interestingly, knocking down AP-3, either alone or in combination with AP-1, increased the expression of RNF13 WT to similar levels as mutants lacking the dileucine motif (Fig. 3.S7D-E). Importantly, knocking down AP-3 had no effect on the fluorescence intensity of RNF13 AA, suggesting that the increased expression of RNF13 depends on AP-3 interaction (Fig. 3.S7F-G). As previously shown, the interaction of RNF13 with AP-3 is necessary for the proper targeting to lysosomes (Fig. 2.1B; 2.4; 2.6B-C) (Cabana *et al.*, 2021), and it has been reported that RNF13 is mainly degraded through the lysosome (Lin *et al.*, 2023). It is highly possible that variants lacking the dileucine motif are not efficiently targeted for degradation into lysosomes and thus accumulate in cells.

Lysosomes not only participate in degradation but also function as signalling organelles (Settembre *et al.*, 2013). Specifically, mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) is important to activate gene expression for lysosomal function and induce autophagy during starvation (Settembre *et al.*, 2012). mTORC1 has been shown to decrease F-actin abundance when either stimulated with brain-derived neurotrophic factor (BDNF) or inhibited with rapamycin by signaling through downstream effectors (Andrews *et al.*, 2020). Interestingly, the ubiquitin ligase activity of RNF13 reportedly stabilizes the E3

ubiquitin ligase tripartite motif-containing 29 (TRIM29), which subsequently mediates the ubiquitination and degradation of stimulator of interferon genes protein (STING) (Lin *et al.*, 2023). TRIM29 is reported on BioGRID to interact with the F-actin-capping protein subunit alpha-2 (CapZA2), which is necessary to stabilize F-actin filament (Huang *et al.*, 2020). STING normally activates mTORC1 to block lipophagy, suggesting that RNF13 positively regulates this process (Lin *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2022a). Interestingly, AP-1 has been reportedly involved in STING lysosomal targeting to regulate its degradation (Liu *et al.*, 2022b). Furthermore, RNF13 regulates the formation of microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)-positive autophagosomes during xenophagy through interaction with p62 when galectin-9 binds to RNF13 and stimulates its auto-ubiquitination (Miyakawa *et al.*, 2022). As such, the selective autophagy receptor p62 interacts with the histone deacetylase 6 (HDAC6) during mitophagy and aggrephagy to regulate the recruitment of the F-actin network (Yan *et al.*, 2013). RNF13 has been increasingly recognized as an important regulator of different types of autophagy, and studies now associate selective autophagy with F-actin reorganization (Lee *et al.*, 2010). In our study, exogenous RNF13 WT increased the level of F-actin through a functional RING domain and proper targeting to the endosomal pathway (Fig. 3.8A-B). Knocking down AP-3 abolished the increased levels of F-actin promoted by the presence of WT RNF13, whereas knocking down AP-1 only partially inhibited this phenotype (Fig. 3.8C-D). While AP-1 and AP-3 might be involved in different cellular functions of RNF13 related to the F-actin network, it is conceivable that knocking down AP-1 resulted in the improper trafficking of an effector, such as STING, potentially explaining the partial effect of RNF13 on F-actin levels. Although this hypothesis is interesting, unravelling the specific molecular entities and signalling pathways responsible for this effect remains unknown as this was beyond the scope of this study.

The Golgi apparatus is an important perinuclear membrane-bound organelle in all eukaryotic cells (Li *et al.*, 2019a). It has key functions in processing, packaging and sorting newly synthesized lipid and membrane proteins into transport carriers that export them towards other intracellular membranes, such as the endosomes, lysosomes, plasma membrane or outside of the cell (Wang et Seemann, 2011). Several studies have demonstrated that BFA treatment causes the redistribution of Golgi-resident proteins in an ordered manner based on their localization in the Golgi complex (Frisbie *et al.*, 2019; Ito *et al.*, 2012; Schoberer *et al.*, 2010). Specifically, Golgi proteins in BFA-treated cells are redistributed into the ER while the TGN network fuses with endosomal membranes (Hidalgo *et al.*, 1992). Therefore, the effect of BFA on the RNF13 AA/GGG variant can be interpreted as an intracellular redistribution from the TGN (Fig. 3.5). Further supporting evidence is provided by the fact that RNF13 AA/GGG and TGN38 are mostly redistributed to the same compartment, as the Manders' overlap coefficient of these two proteins is not altered by BFA treatment (Fig. 3.5E-F). This study also determined the sensitivity of the RNF13 WT and

variants to Endo H as a way to assess protein trafficking through the biosynthetic secretory pathway (Freeze et Kranz, 2010). Endo H cleaves high mannose and some hybrid glycans but not the complex chains. Thus, Endo H-sensitive proteins localize in the ER and the early regions of the Golgi, whereas the medial Golgi complex enzyme mannosidase II cleaves α1,3-Man residue to make protein Endo H-resistant (Freeze et Kranz, 2010). Additionally, these glycoproteins are still sensitive to PNGase F, which releases most of the N-linked glycans (Freeze et Kranz, 2010). Interestingly, all RNF13 variants display the same glycosylation pattern, where the higher molecular entity (~80 kDa) is Endo H-resistant and disappears after PNGase F digestion (Fig. 3.4I). Overall, these findings support the notion that the AA/GGG variant can reach the medial Golgi complex and is most likely to accumulate in the TGN rather than in the ER.

The importance of the two motifs that allow RNF13 to interact with AP complex remains unclear. It is possible that the presence of these motifs ensures proper protein localization in case of a mutation and thus creates redundancy. This is not uncommon, as other proteins like Invariant chain (Ii) and NPC intracellular cholesterol transporter 1 (NPC1) also have multiple signals for proper targeting to different organelles. For instance, Ii has two dileucine-based signals, but only one is needed for its proper targeting to lysosomes, whereas the other one is required for efficient endocytosis (Kang *et al.*, 1998). Likewise, NPC1 protein has multiple signals responsible for lysosomal targeting and late endosome retention. In contrast, two tyrosine-based signals within transmembrane domain 3 are not needed for lysosomal targeting but are important for late endosome retention (Scott *et al.*, 2004). Regarding the dileucine-based signal of RNF13, we previously showed that alteration of this motif completely abrogates the interaction with AP-3 and significantly reduces the presence of RNF13 in lysosomes (Fig. 2.3; 2.4) (Cabana *et al.*, 2021). Here, we show that the RNF13 AA variant without a functional dileucine-based motif is trafficked toward the late endosome through an AP-1-dependent pathway. Thus, the presence of the two motifs in RNF13, namely a dileucine-based signal and a VVVQLQ motif, is likely a mechanism that ensures proper localization when one of the motifs fails. This study offers new insights into RNF13 trafficking mechanisms and, although beyond the scope of this study, highlights possible molecular mechanisms altered by developmental and epileptic 73-associated genetic variants of RNF13.

3.7 Supplementary materials

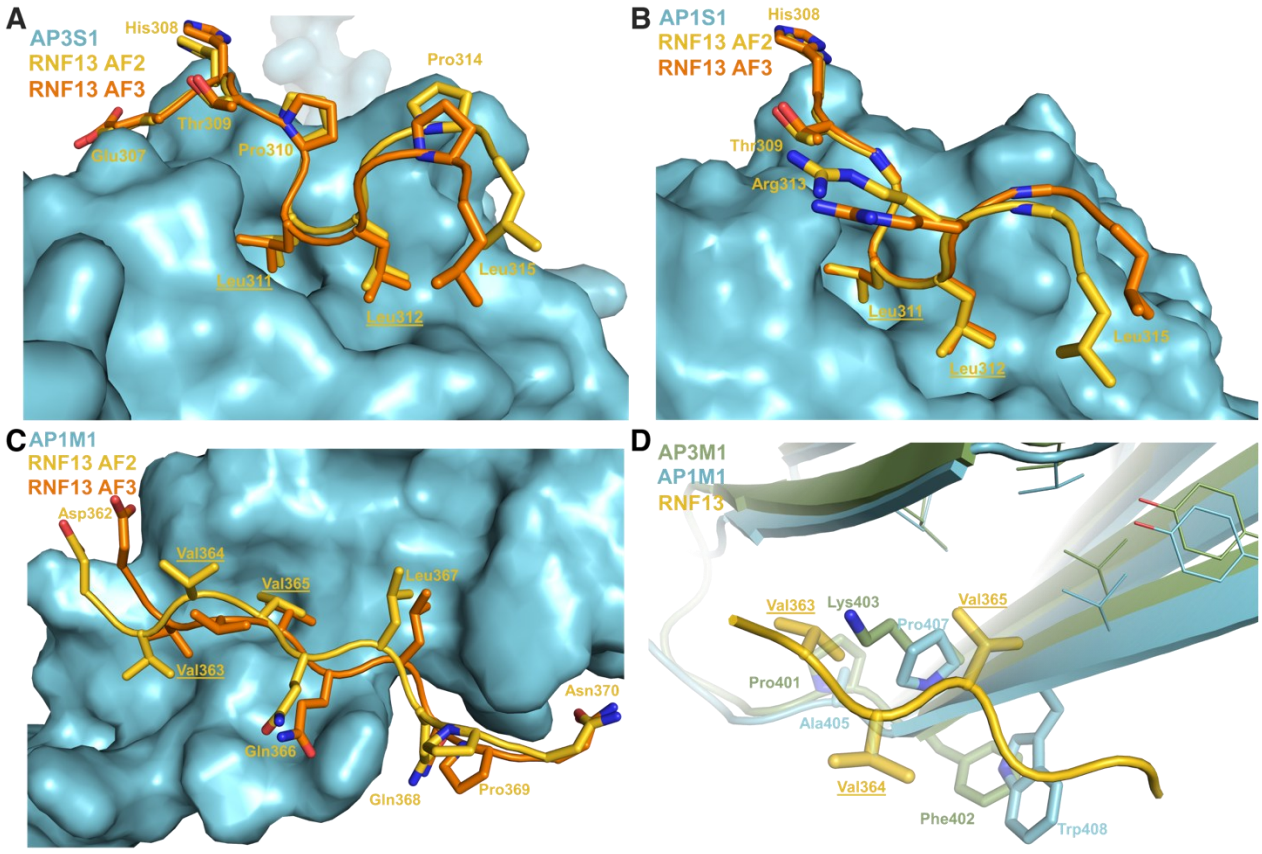


Figure 3.S1: Comparison of predicted interactions by AlphaFold between RNF13 with AP1M1, AP1S1, AP3M1 and AP3S1.

Related to Figure 3.1: Alignments were done with cealign plugin from PyMol. Structures were generated using AlphaFold-2 (RNF13 in yellow) and AlphaFold-3 (RNF13 in orange). In light blue, interaction with (**A**) AP3S1, (**B**) AP1S1 and (**C**) AP1M1. (**D**) Structure of AP1M1 (in blue) and AP3M1 (in green) were superposed to visualize the potential interaction with RNF13 (in yellow). Residues shown in lines are identical, while the ones shown as sticks change from one subunit to another. RNF13 residues that were mutated in this study are underlined.

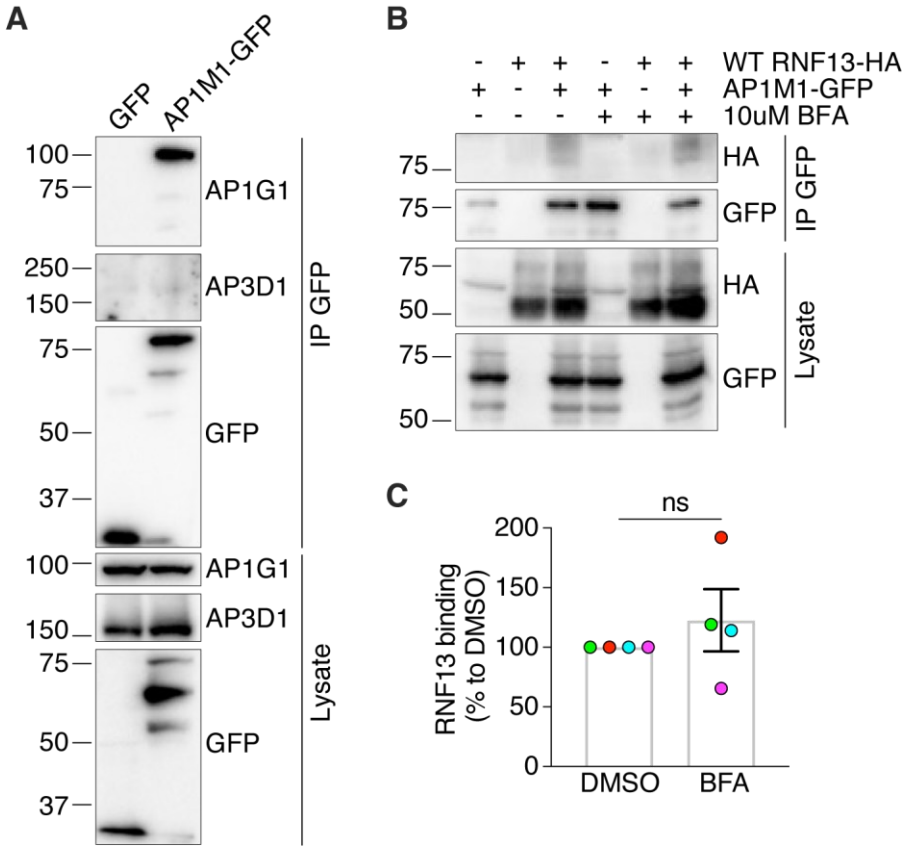


Figure 3.S2: AP1M1-GFP is specifically inserted into the AP-1 complex.

Related to Figure 3.1: (**A**) Lysates from HEK293T/17 cells expressing AP1M1-GFP were immunopurified using GFP-catcher. Eluted GFP immunoprecipitated complexes were separated on SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. Membranes were incubated with specific primary antibodies against endogenous AP1G1 and AP3D1 or GFP. Representative immunoblots from three independent experiments (N=3) are shown. (**B**) HEK293T/17 cells expressing AP1M1-GFP and RNF13-HA were treated with 10 uM BFA for 1 hour before lysis. Lysates were immunopurified using GFP-catcher. Eluted GFP immunoprecipitated complexes were separated on SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. Membranes were incubated with specific primary antibody against HA (RNF13) or GFP (AP1M1). Representative immunoblots from four independent experiments (N=4) are shown. (**C**) The strip plot represents the normalized relative protein levels co-immunoprecipitated for RNF13 in each independent experiment analyzed (N=4). Each color represents an independent experiment. Values are expressed as mean ± SEM. Not significative (ns) = 0.4495 using paired t-test.

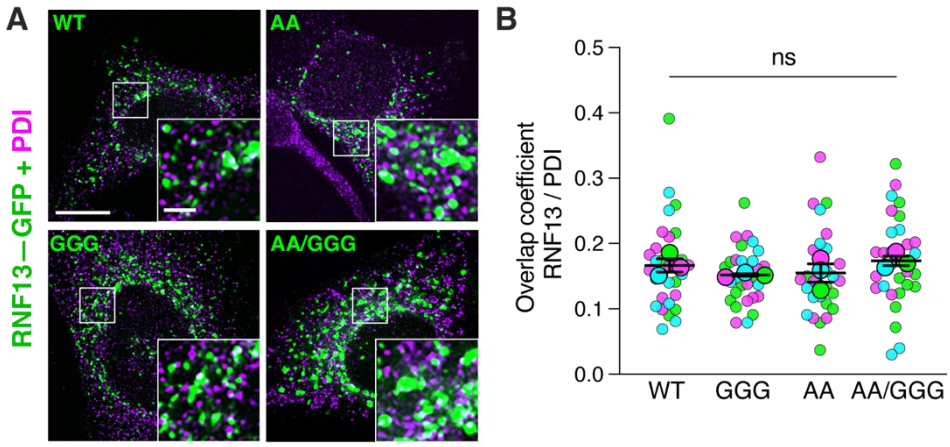


Figure 3.S3: Alterations to the dileucine and VVVQLQ motifs do not increase ER localization.

Related to Figure 3.4: (**A**) Transfected HeLa cells expressing GFP-tagged RNF13 (WT, AA, GGG, or AA/GGG) proteins were fixed, permeabilized and immunolabeled against endogenous ER marker PDI. Representative images show RNF13-GFP (green) and PDI (purple). Scale bars indicate 10 µm for whole cell image and 2 µm for the boxed areas shown in higher magnification. (**B**) The jittered individual value plots represent Manders' overlap coefficient between RNF13 and PDI. Values are expressed as mean ± SEM. Each color represents an independent experiment. Smaller dots represent each individual cell analyzed (n=30 cells). Bigger dots represent the mean of an independent experiment (N=3). For each condition analyzed: N=3. Not significant (ns) ($p > 0.05$) using ordinary one-way ANOVA with multiple comparisons.

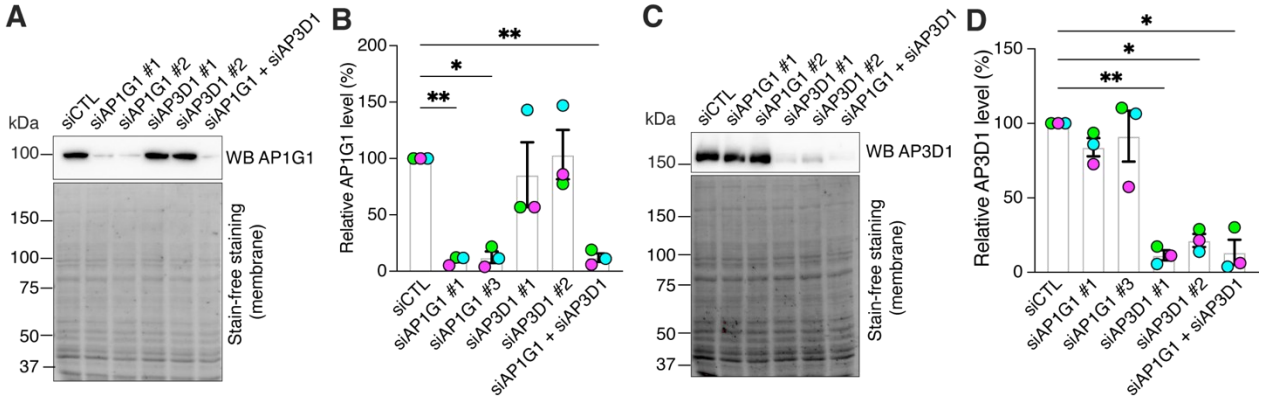


Figure 3.S4: Knockdown efficiency using DsiRNA against AP-1 and AP-3.

Related to Figure 3.6: HeLa cells were transfected with 10 nM of DsiRNAs specific to AP3D1 or AP1G1 or nontargeting control (siCTL). 72h hours after transfection, cell lysate was prepared and diluted in Laemmli buffer. Proteins were separated on SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane before being immunoblotted with specific primary antibodies against (**A**) AP1G1 or (**C**) AP3D1. (**B, D**) Band densities from (**A, C**) were analyzed and normalized to the band density of the siCTL. Normalization includes a relation with the stain-free signal that serves as loading control. The strip plot represents the averaged relative protein abundance of (**B**) AP1G1 and (**D**) AP3D1 for each independent experiment analyzed (N=3). Each color represents an independent experiment. Values are expressed as mean ± SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ using one-way repeated-measures ANOVA with multiple comparisons.

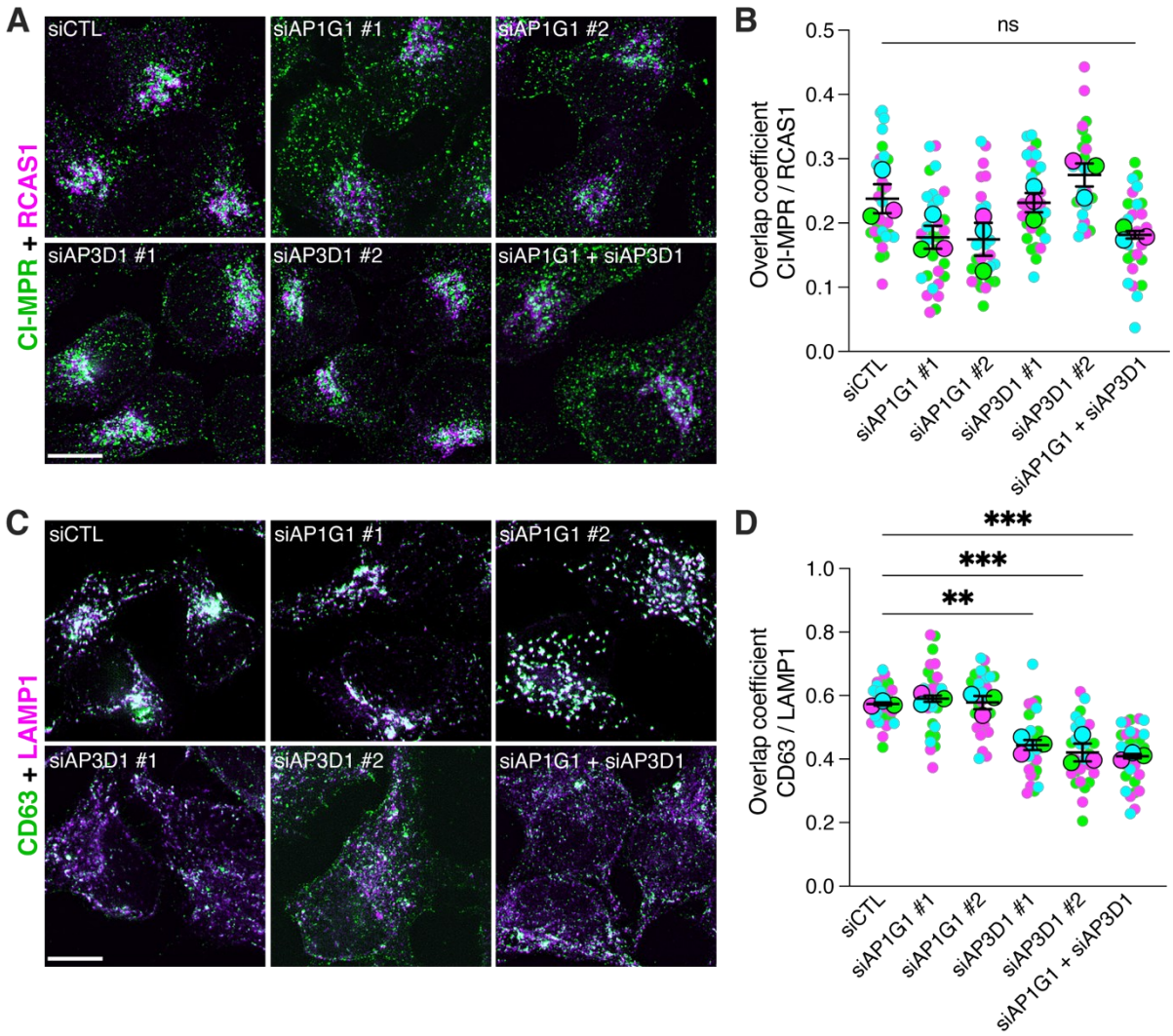


Figure 3.S5: Knockdown of AP-1 or AP-3 interferes with the intracellular distribution of cargo proteins.

Related to Figure 3.6: HeLa cells, transfected with 10 nM of nontargeting (siCTL), AP1G1, or AP3D1 specific DsiRNAs, were fixed, permeabilized and immunolabeled against endogenous subcellular markers. **(A)** Co-labeling of CI-MPR (green) and RCAS1 (purple) indicates that the CI-MPR distribution is altered by AP-1 repression but not by AP-3 knockdown. **(B)** The jittered individual value plots represent the Manders' overlap coefficient of CI-MPR over RACS1. **(C)** Co-labeling of lysosomal protein CD63 (green) with LAMP1 (purple) indicates that the CD63 intracellular distribution is affected by the repression of AP-3 but not AP-1. **(D)** The jittered individual value plots represent the Manders' overlap coefficient of CD63 over LAMP1. (**A, C**) Scale bars indicate 10 µm for whole cell image and 2 µm for the boxed areas shown in higher magnification. (**B, D**) Values are expressed as mean ± SEM. Each color represents an independent experiment. Smaller dots represent each individual cell analyzed (n=30 cells). Bigger dots represent the mean of an independent experiment (N=3). For each condition analyzed: N=3. Not significant ($p > 0.05$), ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ using ordinary one-way ANOVA with multiple comparisons.

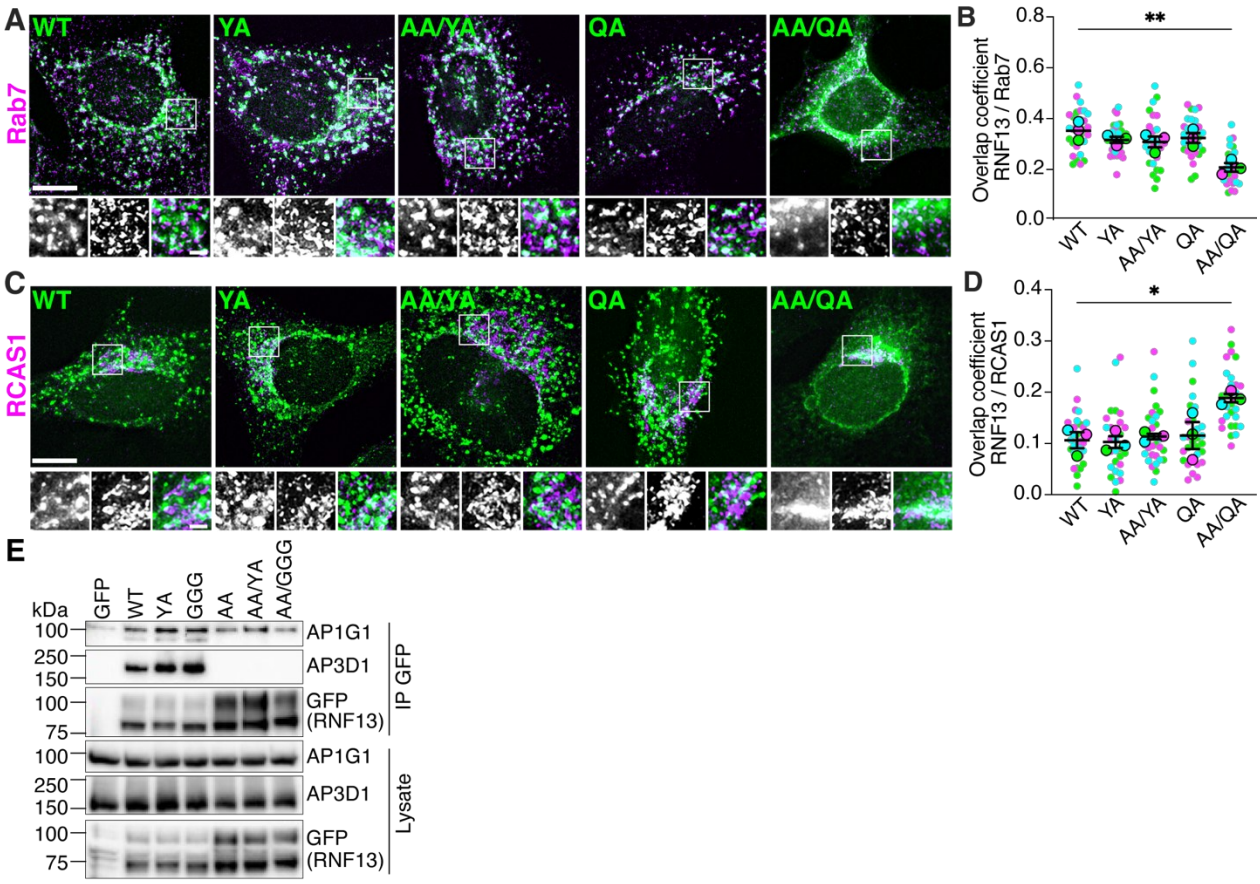
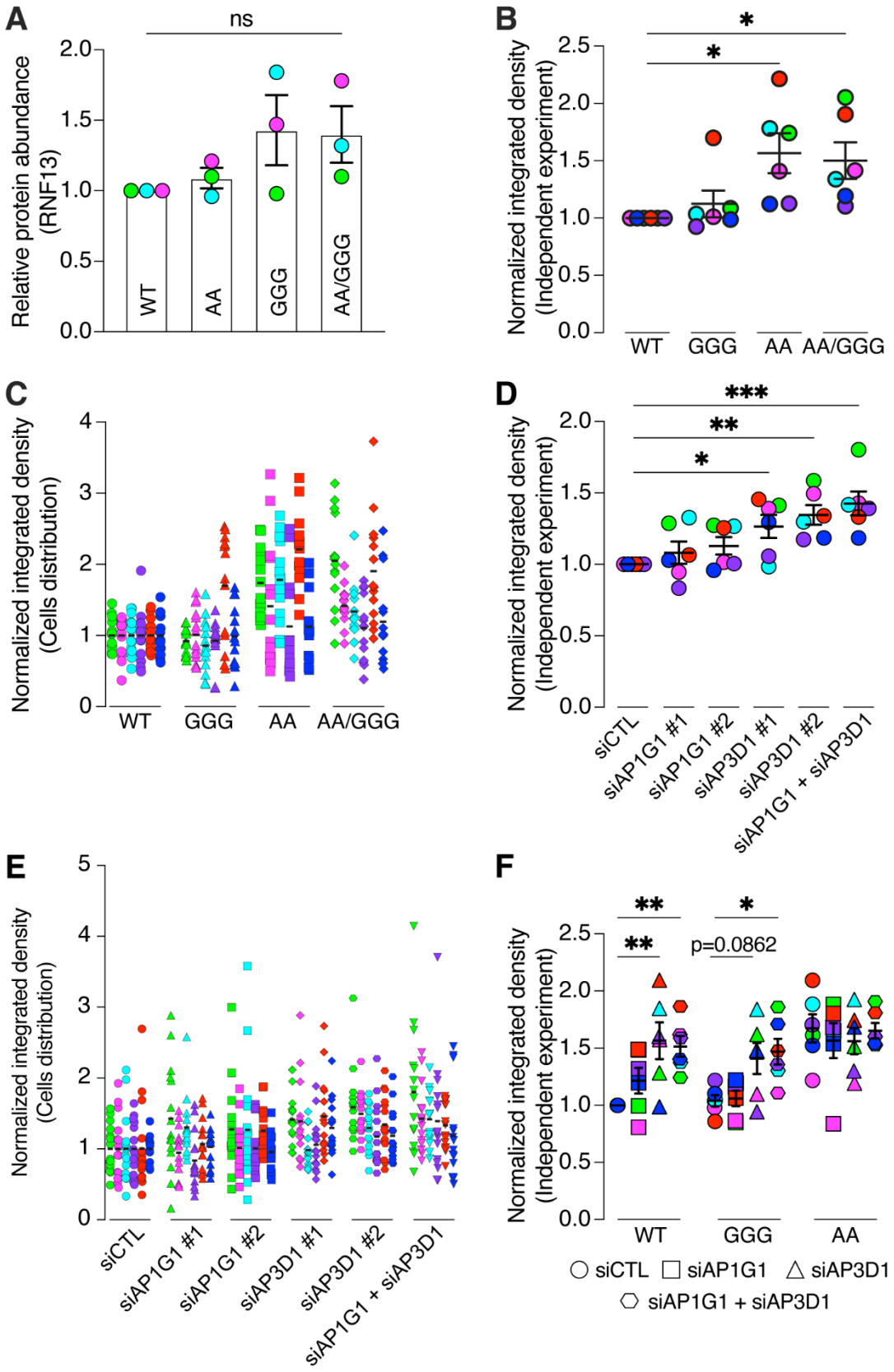


Figure 3.S6: Tyrosine 375 is unnecessary for RNF13's interaction with AP-1, while alteration to the glutamines in the VVVQLQ motif disrupts endosomal targeting.

(**A-D**) Transfected HeLa cells expressing GFP-tagged RNF13 (WT, YA, QA, AA/YA, or AA/QA) proteins were fixed, permeabilized and immunolabeled against endogenous (**A**) late endosomal marker Rab7 or the (**C**) Golgi protein marker RCAS1. Representative images show (**A**) Rab7 and (**C**) RCAS1 (in purple) with RNF13-GFP (in green). Scale bars indicate 10 µm for whole cell image and 2 µm for the boxed areas shown in higher magnification. (**B, D**) The jittered individual value plots represent Manders' overlap coefficient between RNF13 and Rab7 or RCAS1. Values are expressed as mean ± SEM. Each color represents an independent experiment. Smaller dots represent each individual cell analyzed (n=30 cells). Bigger dots represent the mean of an independent experiment (N=3). For each condition analyzed: N=3. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ using Ordinary one-way ANOVA with multiple comparisons. (**E**) Lysates from HEK293T/17 cells expressing GFP or GFP-tagged RNF13 (WT, YA, GGG, AA, AA/YA, or AA/GGG) were purified using GFP-catcher. Eluted GFP-containing complexes were separated on SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. Membranes were specifically immunoblotted against AP1G1, AP3D1 or GFP. Representative immunoblots from two independent experiments (N=2) are shown.


A
ns
Relative protein abundance (RNF13)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
WT
AA
GGG
AA/GGG
B
*
*
Normalized integrated density (Independent experiment)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
WT
GGG
AA
AA/GGG
C
Normalized integrated density (Cells distribution)
4
3
2
1
0
WT
GGG
AA
AA/GGG
D
***
**
*
Normalized integrated density (Independent experiment)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
siCTL
siAP1G1 #1
siAP1G1 #2
siAP3D1 #1
siAP3D1 #2
siAP1G1 + siAP3D1
E
Normalized integrated density (Cells distribution)
5
4
3
2
1
0
siCTL
siAP1G1 #1
siAP1G1 #2
siAP3D1 #1
siAP3D1 #2
siAP1G1 + siAP3D1
F
**
*
**
p=0.0862
Normalized integrated density (Independent experiment)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
WT
GGG
AA
siCTL
siAP1G1
siAP3D1
siAP1G1 + siAP3D1

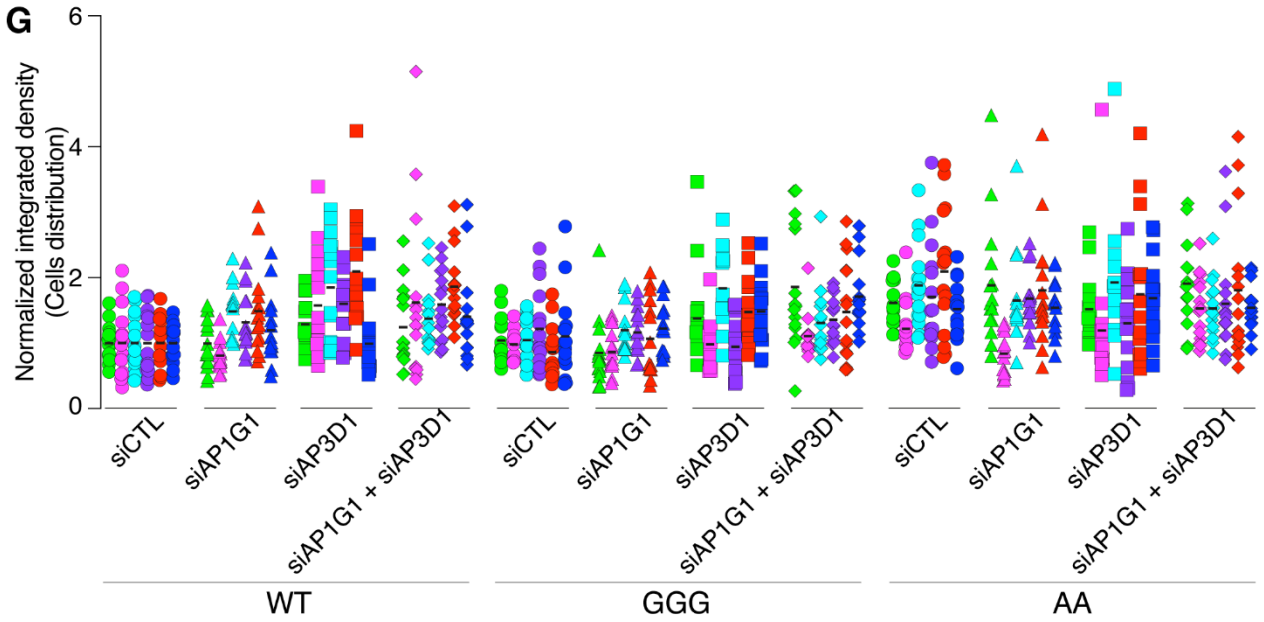


Figure 3.S7: Both AA and AA/GGG variants are expressed at similar levels but higher than the WT and to similar levels than RNF13 WT when AP-3 is repressed.

(**A**) Immunoblot bands densities of variants were analyzed and normalized to the band density of RNF13 WT. The strip plot represents the averaged relative protein abundance of RNF13 for each independent experiment analyzed (N=3). Values are expressed as mean ± SEM. Each color represents an independent experiment. It is not significant (ns) ($p > 0.05$) when using one-way ANOVA with multiple comparisons. (**B-G**) The integrated density of (**B-C**) the variants, (**D-E**) RNF13 WT with the different knockdowns and (**F-G**) the variants combined with the knockdowns was analyzed by drawing a region of interest around the cell and using the option measure in the Fiji's ROI manager. The values were normalized against the average of the (**B-C**) WT protein and the (**D-G**) WT protein with siCTL for one N. The jittered individual value plots represent the normalized integrated density of RNF13. Values are expressed as mean ± SEM. For better visualization, each individual cell and the mean of the independent experiments are separated into two graphs. Each color represents an independent experiment. (**C, E, G**) Smaller dots represent each individual cell analyzed (n=90 cells). (**B, D, F**) Bigger dots represent the mean of an independent experiment (N=6). For each condition analyzed: N=6. (**B-D**) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ using ordinary One-way ANOVA with multiple comparisons. (**F**) * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ using two-way ANOVA with multiple comparisons.

CHAPITRE 4
ARTICLE 3

RNF13 VARIANTS L311S AND L312P ASSOCIATED WITH DEVELOPMENTAL EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY ALTER DENDRITIC ORGANIZATION IN HIPPOCAMPAL NEURONS

Valérie C. Cabana [1, 2, 3] and Marc P. Lussier [1, 2, 3, *]

[1] Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada.

[2] Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC), Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada.

[3] Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), Montréal, QC, Canada.

[*] Corresponding author: Marc P. Lussier, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Faculté des sciences, Case postale 8888, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada. Tel. (514) 987-3000 ext 5591; Fax (514) 987-4054; E-mail: lussier.marc@uqam.ca.

Research Article published in *IBRO Neuroscience Reports*, 2025, 18: 559-573.

DOI: 10.1016/j.ibneur.2025.04.004

https://www.ibroneuroreports.org/article/S2667-2421(25)00052-1/fulltext

Contributions des auteurs:

Valérie C. Cabana a conceptualisé l'étude et l'article, performé les expériences, fait l'analyse des données, le montage des graphiques et des figures, interprété les résultats et rédigé l'article.

Marc P. Lussier a conceptualisé l'étude, encadré et supervisé le projet, a révisé le manuscrit et contribué au support financier.

Tous les auteurs ont lu et approuvé la publication de la verison finale de l'article.

Footnotes

Acknowledgements: This work was completed as part of the requirements for V.C.C.'s PhD thesis at the *Université du Québec à Montréal*. The authors thank Yann Aghiles Chabi for creating macros that allow automated image analysis and for commenting on the manuscript. The authors thank Jennifer Crawford for editing the manuscript.

Funding: The *Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois* (CERMO-FC) funded part of this study via its program New Collaborative Research Initiatives and graduate scholarships awarded to V.C.C. (2020-2022). V.C.C. was awarded a PhD graduate scholarship from *Le Fonds de recherche du Québec – Nature et Technologies*. This work was partly supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2017-05392) and the American Epilepsy Society (Award ID 822781).

Conflicts of interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper. Funding sources had no role in study design, data collection, analysis, or interpretation.

Abbreviations: AP, Adaptor protein; DEE, Developmental and epileptic encephalopathy; DIST, Distal; DIV, Day in vitro; DN, Dominant negative; ECM, Extracellular matrix; EEA1, Early endosome antigen 1; Endo H, Endoglycosidase H; ER, Endoplasmic reticulum; GABA, Gamma-aminobutyric acid; LL/AA, RNF13 L311A/L312A; Lamp1, Lysosomal associated membrane protein 1; MAP2, Microtubule-associated protein 2; NT, Non-transfected neuron; PNGase F, Peptide-N-glycosidase F; PROX, Proximal; PSD-95, Postsynaptic protein 95; RCAS1, Receptor binding cancer antigen expressed on SiSo cells; RNF13, RING finger protein 13; SV, Synaptic vesicle; TGN, Trans-Golgi network; Ub, Ubiquitin; WT, Wild-type.

4.1 Résumé

L'encéphalopathie épileptique et développementale est un groupe de troubles neurologiques rares et graves dans lesquels les crises aggravent les troubles du développement. Récemment, des mutations génétiques dans le gène *RNF13* ont été signalées comme étant à l'origine de DEE73. Plus précisément, deux leucines de l'ubiquitine E3 ligase RNF13 sont converties en sérine ou en proline (L311S et L312P). Ces mutations se situent dans un motif dileucine, ce qui altère la capacité de RNF13 à interagir avec AP-3. Un deuxième motif permet à RNF13 d'interagir avec AP-1 lorsque le motif dileucine est altéré. La présente étude démontre que les variantes L311S et L312P sont transportées par une voie dépendante d'AP-1 dans les cellules HeLa. Dans des cultures de neurones hippocampiques primaires de rat, les variantes sont significativement plus présentes dans les dendrites que la protéine sauvage (WT). Les variantes L311S et L312P modifient les composantes dendritiques de manière similaire à une variante avec un motif dileucine altéré ou une variante dominante-négative (DN) pour l'activité E3 ligase. Par rapport à des neurones non-transfectés (NT), les variantes modifient la distribution des endosomes précoces positifs à EEA1 dans les dendrites. Alors que le WT modifie la distribution des lysosomes dans les dendrites, les variantes diminuent uniquement leur présence dans les dendrites proximales. Contrairement aux variantes, RNF13 WT augmente l'abondance de PSD-95 dans les dendrites distales. Il est intéressant de noter que seules les variantes avec des motifs dileucine altérés diminuent le nombre total de la protéine postsynaptique inhibitrice Gephyrin. Cette étude rapporte que les variantes génétiques L311S et L312P agissent principalement comme une protéine DN. Cette recherche fournit des informations précieuses sur les défauts synaptiques qui surviennent lorsque des variantes génétiques de RNF13 associées à DEE73 sont présentes.

Mots-clés : RNF13, Encéphalopathie épileptique et développementale, Ubiquitine E3 ligase, Système endolysosomal, Dendrites

4.2 Abstract

Developmental and epileptic encephalopathy (DEE) is a group of rare and serious neurological disorders where seizures exacerbate developmental impairment. Recently, genetic mutations in the *RNF13* gene were reported to cause DEE73. Specifically, two leucines from the ubiquitin E3 ligase RNF13 are converted to serine or proline (L311S and L312P). These mutations are located within a dileucine motif, which impairs RNF13's capacity to interact with AP-3. A second motif allows RNF13 to interact with AP-1 when the dileucine sorting motif is altered. The present study demonstrates that RNF13 variants L311S and L312P are trafficked through an AP-1-dependent pathway in HeLa cells. In cultures of primary rat hippocampal neurons, the protein level of the variants is significantly higher in dendrites than for wild-type protein. L311S and L312P variants alter dendritic components similarly to an RNF13 AP-3-defective binding variant or a dominant negative for RNF13's ubiquitin ligase activity. Compared to non-transfected neurons, the variants change the distribution of EEA1-positive early endosomes throughout the dendrites. While the WT alters the distribution of lysosomes (Lamp1-positive) in dendrites, the variants only decrease their presence in proximal dendrites. Unlike the variants, RNF13 WT increases the abundance of PSD-95 in distal dendrites. Interestingly, only the variants with altered dileucine motifs decrease the total number of postsynaptic inhibitory protein Gephyrin puncta. This study reports that genetic variants L311S and L312P mainly act as a dominant negative protein. This research provides valuable insights into the synaptic defects that occur when DEE73-associated genetic variants of RNF13 are present.

Keywords: RNF13, Developmental and epileptic encephalopathy, E3 ubiquitin ligase, Endolysosomal system, Dendrites

4.3 Introduction

Neurons are highly polarized cells with three main domains (soma, axon, and dendrites) and various subdomains (dendritic spines, axon initial segment and pre- and postsynaptic terminals) (Donato *et al.*, 2019). Each neuron has a single axon exhibiting extensive terminal branches and multiple dendrites with complex arbors extending several centimeters or more (Roney *et al.*, 2022). As protein synthesis and degradation are primarily performed in the soma, efficient bidirectional transport mechanisms and spatial regulation of organelles are crucial to maintain neuron growth, survival and function (Roney *et al.*, 2022; Yap et Winckler, 2022).

Endosomes are essential for maintaining proper neuronal homeostasis by sorting, processing, recycling, storing and degrading internalized molecules or receptors (Huotari et Helenius, 2011). Endolysosomal maturation involves the gradual acidification of endocytic vesicles, leading to the degradation of internalized proteins. This progression is characterized by the transformation of early endosomes into late endosomes and ultimately into lysosomes (Hu *et al.*, 2015). Defects in endolysosomal maturation can lead to various diseases, including, but not limited to, lysosomal storage disorders, neurodegenerative diseases, cancer and infectious diseases (Chao *et al.*, 2023; Hu *et al.*, 2015; Rebiai *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2020).

Proper targeting to the correct cellular compartment requires packaging cargo proteins into coated vesicles (Sanger *et al.*, 2019). Adaptor protein (AP) complexes play a crucial role in this process as they recognize and concentrate the cargo proteins into vesicular carriers (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019). Each AP complex has a specific localization and function (Sanger *et al.*, 2019). Within the endolysosomal system, AP-1 allows bidirectional transport between the trans-Golgi network (TGN) and endosomes, AP-2 is involved in endocytosis and AP-3 regulates trafficking from the TGN and tubular endosomal compartments to late endosomes, lysosomes and lysosome-related organelles (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019; Park et Guo, 2014). These AP proteins are heterotetrameric complexes composed of two large subunits (γ/α/δ and β1-3, respectively), one medium-sized subunit (μ1-3) and one small subunit (σ1-3) (Park et Guo, 2014). AP complexes recognize cargo proteins by specific sorting signals on their cytoplasmic tails. The two canonical and well-characterized sorting signals are the tyrosine-based (YxxΦ) and dileucine-based ([D/E]xxxL[L/I]) motifs, where x is any amino acid and Φ is a bulky hydrophobic amino acid (Park et Guo, 2014; Sanger *et al.*, 2019). However, some noncanonical motifs and acidic clusters have also been reported to bind AP-1 and AP-2 (Fig. 3.3D-F) (Cabana *et al.*, 2024; Guo *et al.*, 2013; Navarro Negredo *et al.*, 2017). Importantly, AP complexes have specific neuronal functions. AP-1 is responsible for somatodendritic sorting towards postsynaptic terminals, while AP-3 is involved in axonal sorting towards presynaptic terminals and synaptic vesicle (SV) biogenesis (Guardia *et al.*, 2018). Neurological disorders have been linked to genetic mutations

in constituent subunits of both AP complexes, demonstrating their importance in neuronal function (Zhang *et al.*, 2024).

Ring Finger Protein 13 (RNF13) is a transmembrane E3 ubiquitin (Ub) ligase localized in the endoplasmic reticulum (ER), Golgi, late endosomes, lysosomes and at the plasma membrane (Cabana et Lussier, 2022). It is suggested to have a role in neurodevelopmental processes. In PC12 cells, the exogenous expression of RNF13 leads to spontaneous neurite growth, while treatment of B35 cells with differentiation-inducing molecule dibutyryl-cAMP doubled RNF13 mRNA expression (Bocock *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2005). Furthermore, RNF13 Ub ligase activity catalyzes ubiquitination of SNARE-associated protein (snapin) to strengthen binding with synaptosome-associated protein 25 (SNAP-25) to regulate the release of neurotransmitters into the synaptic cleft (Zhang *et al.*, 2013). More recently, RNF13 inhibited lysosome maturation through ubiquitination-dependent degradation of lysosomal protein Lamp1 in macrophages following Toll-like receptor (TLR)-triggered response (Liu *et al.*, 2024b). While RNF13 is also associated with tumorigenesis, cell migration, invasiveness, cell proliferation, myogenesis and selective autophagy, most molecular mechanisms are yet to be established (Cheng *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2023; Miyakawa *et al.*, 2022; Tan *et al.*, 2022; Tranque *et al.*, 1996; van Dijk *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2009).

Developmental and epileptic encephalopathy (DEE) are a heterogeneous group of disorders characterized by early-onset epileptic seizures with a developmental impairment that is worsened by epilepsy. While some DEEs result from nongenetic etiologies, an increasing number of genes are reported to cause different DEEs (Guerrini *et al.*, 2023). A recent study reported three unrelated individuals carrying de novo heterozygous mutations within the *RNF13* gene (c.932T > C, p.L311S; c.935T > C, p.L312P) causing DEE73 (Edvardson *et al.*, 2019). The phenotype is characterized by epileptic encephalopathy, blindness, congenital microcephaly, failure to thrive and profound developmental delay (Edvardson *et al.*, 2019). We recently analyzed RNF13's sequence and found that the variant proteins L311S and L312P modify a canonical dileucine [D/E]xxxL[L/I] motif, altering their binding to AP-3 and significantly reducing their presence in lysosomes (Fig. 2.1B; 2.4) (Cabana *et al.*, 2021). While the RNF13 L311S and L312P proteins are encoded by a region of the *RNF13* gene proposed as a hotspot for DEE73 (Taylor *et al.*, 2023), the cellular and molecular mechanisms by which these variants affect neuronal development and lead to a severe childhood neurodevelopmental disease remain unknown. Here, we used primary rat hippocampal neuronal culture as a model system to examine the effect of RNF13 genetic variants on dendritic protein distribution. Our findings offer the first evidence that DEE73-associated RNF13 variants, specifically L311S and L312P, impact neuronal structure.

4.4 Materials and Methods

4.4.1 Antibodies

The following antibodies were used: Rabbit anti-Rab7 (1:200, Cell Signaling Technology, Cat# 9367, RRID:AB_1904103), Rabbit anti-EEA1 (1:400, Cell Signaling Technology, Cat# 3288, RRID:AB_2096811), Mouse anti-Lamp1 (1:100, Enzo Life Sciences, Cat# ADI-VAM-EN-001, RRID:AB_1082833), Rabbit anti-HA (WB: 1:1000, IF: 1:200, Cell Signaling Technology, Cat# 3724, RRID:AB_1549585), Mouse anti-HA (1:200, BioLegend, San Diego, CA, USA, Cat# 901502, RRID:AB_2565007), Rabbit anti-RCAS1 (1:250, Cell Signaling Technology, Cat# 12290, RRID:AB_2736985), Rabbit anti-MAP2 (1:100, Cell Signaling Technology, Cat# 4542, RRID:AB_10693782), Rabbit anti-PSD95 (1:100, Cell Signaling Technology, Cat# 3450, RRID:AB_2292883), Mouse anti-Gephyrin (1:500, Synaptic Systems, Cat# 147 011, RRID:AB_887717), AlexaFluor 488-conjugated Goat anti-Rabbit (1:500, Thermo Fisher Scientific, Cat# A-11034, RRID:AB_2576217), AlexaFluor 488-conjugated Goat anti-Mouse (1:500, Thermo Fisher Scientific, Cat# A-11017, RRID:AB_253408), AlexaFluor 647-conjugated goat anti-mouse (1:500, Thermo Fisher Scientific, Cat# A31626, RRID:AB_2535792), AlexaFluor 647-conjugated goat anti-rabbit (HeLa: 1:1000, Neurons: 1:500, Thermo Fisher Scientific, Cat# A31634) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit (1:10000, Cell Signaling Technology, Cat# 7074, RRID:AB_2099233).

4.4.2 Molecular biology

GenScript (Piscataway, NJ, USA) synthesized wild-type, full-length human RNF13 transcript variant 1 (accession NM_007282.4), which included the natural Kozak sequence and a C-terminus HA tag. The gene was cloned into pUC57 by *Eco*RV (GenScript). The construct was then used as the template for generating protein variants L311S, L312P, L311A/L312A and C258A/H260A (DN variant) via site-directed mutagenesis. The plasmids were excised using standard enzymatic restriction strategies and ligated using T4 DNA ligase (New England BioLabs Ltd., Cat# M0202) into *Nhe*I and *Xho*I (New England BioLabs Ltd., Cat# R3131 and Cat# R0146, respectively) sites of pCAGGS-IRES-mCherry. The pUC57 vectors of WT, L311S and L312P were used as a template for introducing an optimized Kozak sequence (AACGAG) via PCR performed with Q5 high-fidelity DNA polymerase (New England BioLabs Ltd., Cat# M0492S). The fragments were cleaved using *Bam*HI and *Sal*I (New England BioLabs Ltd., Cat# R3136 and Cat# R3138, respectively) to perform standard ligation into *Bgl*II (New England BioLabs Ltd., Cat# R0144) and *Sal*I sites of the pEGFP-N1 vector. All plasmids were confirmed by Sanger sequencing (Genome Quebec, Montreal, QC, Canada).

4.4.3 Cell culture and transfection

HEK293T/17 (American Type Culture Collection (ATCC), Gaithersburg, MD, USA, Cat# CRL-11268) and HeLa (from Dr. Diana Alison Averill, Montreal) cells were cultured at subconfluence in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Cat# 11995-065) containing 10% fetal bovine serum (FBS, VWR Life Science, Cat# MPCA97068-085). For maintaining cultures and for the following assays, cells were kept at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. For glycosylation assays, HEK293T/17 cells were transfected with the pCAGGS-IRES-mCherry RNF13-HA vectors in poly-D-lysine-treated, six-well plates using LipofectAMINE 2000 (Thermo Fisher Scientific, Cat# 11668-019) as described previously (Lussier *et al.*, 2005). Cells were maintained for 48 hours before being lysed. For immunostaining assays, 5 x 10^4 HeLa cells were seeded in a 24-well plate containing a 12 mm round glass coverslip #1.5 (UltiDent Scientific Inc., St-Laurent, QC, Canada, Cat# 170-C12MM) 2 hours before transfection. Cells were first transfected with 10 nM DsiRNA using LipofectAMINE 2000 as described previously (section 2.4.3) (Cabana *et al.*, 2021). 48 hours later, pEGFP-N1-RNF13 vectors were incorporated using a calcium phosphate-DNA precipitate (section 2.4.3) (Cabana *et al.*, 2021). Cells were maintained for another 24 hours before being fixed and processed for immunostaining.

4.4.4 Neuronal cultures and transfection

Primary neuronal cultures were prepared using Sprague Dawley female rats purchased from Charles River (St-Constant, QC, Canada). The use of timed-pregnant female rats has been approved by the Institutional Animal Care Committee of the University of Quebec at Montreal (CIPA Protocol # 006). Rat hippocampal dissociated neuronal cultures were prepared from embryos of both sexes on day 18 of gestation, as described (Lussier *et al.*, 2012). Dissociated prenatal neurons in Neurobasal culture medium (Thermo Fisher Scientific, Cat# 21103-049) containing 2% B-27 Plus supplement (Thermo Fisher Scientific, Cat# A3582801) and 2 mM L-Glutamine (MilliporeSigma, Cat# G7513) were plated on poly-D-lysine-coated 12 mm glass coverslips #1.5 in a 24-well plate at a density of 7.5 x 10^4 cells per well. They were cultured at 37°C with a humidified atmosphere containing 5% CO_2. Transfections were performed at days in vitro (DIV) 4. Briefly, 0.5 uL LipofectAMINE 2000 transfection reagent and 1 µg DNA are separately diluted in 25 µL plain Neurobasal culture medium and incubated for 5 minutes at room temperature. The two solutions are mixed and incubated for 20 minutes at room temperature before being added to the cells. Neurons were maintained at 37°C with 5% CO_2 before being fixed at DIV10 and processed for immunostaining.

4.4.5 AP3D1 and AP1G1 knockdown

TriFECTa Kit Dicer-substrate siRNA duplexes against Homo sapiens adaptor-related protein complex 1 subunit gamma 1 (AP1G1, NM_001128) and adaptor-related protein complex 3 subunit delta 1 (AP3D1, NM_003938) were purchased from Integrated DNA Technology (IDT, Coralville, IA) and transfected as described (section 3.4.4) (Cabana *et al.*, 2024). Negative control scrambled dsiRNA (Cat# DS NC1), AP3D1-specific duplex sequences: #1: 5'-rCrGrCrUrArCrUrGrArGrCrArArCrUrUrGrUrUrArGrArAGA-3' and 5'-rUrCr-UrUrCrUrArArCrArArGrUrUrGrCrUrCrArGrUrArGrCrGrUrG-3', #2: 5'-rGrUrCrArUrUrUrGrUrUrGr-CrGrUrUrGrArArUrUrArUrCTG-3' and 5'-rCrArGrArUrArArUrUrCrArArCrGrCrArArCrArArArUrGr-ArCrCrU-3', AP1G1-specific duplex sequences: #1: 5'-rGrArCrCrUrUrGrArArGrCrArUrUrGrUrUrArAr-ArGrArCTA-3' and 5'-rUrArGrUrCrUrUrUrArArCrArArUrGrCrUrUrCrArArGrGrUrCrArG-3', #2: 5'-rGrArArArCrGrGrUrUrUrUrGrArCrUrArUrCrArUrGrGrATA-3' and 5'-rUrArUrCrCrArUrGrArUrArGr-UrCrArArArArCrCrGrUrUrUrCrArU-3'.

4.4.6 Immunostaining

Transfected HeLa cells immunostaining was performed as described (Cabana *et al.*, 2024). Transfected neurons were washed with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) supplemented with Calcium Chloride and Magnesium Chloride (Thermo Fisher Scientific, Cat# 14025-092) before being fixed with ice-cold 4% paraformaldehyde/4% sucrose in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 minutes at room temperature. Neurons were permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS for 15 minutes, except when using the Lamp1 antibody that required permeabilization with 0.05% saponin. Non-specific sites were blocked using 10% NGS in PBS for 1 hour at room temperature (+0.05% saponin for anti-Lamp1). Coverslips were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies diluted in 3%NGS/PBS (+0.05% saponin for anti-Lamp1). Coverslips were washed thoroughly and incubated with the appropriate combinations of AlexaFluor conjugated secondary antibodies diluted in 3%NGS/PBS (+0.05% saponin for anti-Lamp1) for 1 hour at room temperature. After three washes in PBS, coverslips were mounted using ProLong Diamond Antifade, dried at room temperature overnight and kept at 4°C until image acquisitions were performed.

4.4.7 Fluorescence microscopy image acquisition

Image acquisition was performed as described (section 3.4.5) (Cabana *et al.*, 2024). For neurons, the strongest signal was set in the dendrites, although saturation was inevitable in the soma under these conditions. Transfected neurons that were not hippocampal pyramidal cells were excluded from this study, as well as cells that exhibited excessively high or low expression of the ectopic proteins (RNF13) under the

selected imaging settings that remained constant within an independent experiment. Some minor lamp intensity and exposure time adjustments were done between independent experiments. The resolution was set at 2048 x 2048 pixels, and z-stack images were taken at 0.28 µm intervals for 5 to 12 optical slices. Before analysis, images were deconvoluted using the Olympus 3D Deconvolution feature in the Olympus CellSens Dimension software.

4.4.8 Image analysis and statistical analysis

For all analyses, a single slice from the middle of a z-stack was analyzed. The two channels were separated to analyze co-localization between RNF13 and endogenous organelle markers, and the threshold was adjusted to have minimal background. Manders overlap coefficients were obtained using the JaCoP plugin in Fiji. To analyze the number of puncta, area covered and the signal intensity of the markers in neurons, a 20 µm section of three dendrites from 10 neurons per independent experiment was chosen at 50 µm from the soma or directly adjacent to the soma. Specifically, using a scale bar, 20 µm horizontal and vertical rectangles were saved in the ROI manager. Dendrites that were straight in the rectangle were chosen to ensure they were 20 µm long. The section was duplicated and saved as a new image. ROI was drawn on each side of the dendrites to remove the signal from neighboring neurites. The channels were split, Fiji's "Default" threshold was applied, and both Fiji's Analyze particles and Measure functions were used. The integrated density obtained was then normalized against the control (NT) average for one independent experiment to consider possible lamp intensity and exposure time variations during image acquisition. At least three independent, non-blinded experiments were performed for all assays. Datasets were collected in Microsoft Excel before being subjected to statistical analysis in GraphPad Prism 10. Statistical difference was determined using either repeated measure (RM) one-way ANOVA or two-way ANOVA when there are one or two grouping variables, respectively. Both are analyzed using the Geisser-Greenhouse correction and Dunnett's multiple comparisons test.

4.4.9 Cell lysis and glycosylation assays

Transfected HEK293T/17 cells were washed with PBS and lysed in 1 mL ice-cold RIPA lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 0.5% sodium deoxycholate and 1X EDTA-free protease inhibitor cocktail (Bimake.com, Houston, TX, USA, Cat# B14001)). Lysates were agitated at 15 rpm for 20 minutes at 4°C before being centrifuged at maximum speed (~21,100 x g) for 15 minutes. 500 µL of diluted 1:1 lysate in RIPA buffer was agitated at 15 rpm overnight at 4°C with 10 µL of anti-HA magnetic beads (Bimake.com, Houston, TX, USA, Cat# B26201) pre-equilibrated in 0.25% Triton X-100 in PBS (PBS-T). After three 5 min washes with PBS-T, immunopurified proteins were incubated at 100°C for 10 minutes in 1x Glycoprotein Denaturing Buffer

(New England Biolabs, Beverly, MA, USA, Cat# P0703S). Proteins were then digested with 500 U of Endo Hf (New England Biolabs, Beverly, MA, USA, Cat# P0703S) or PNGase F (New England Biolabs, Beverly, MA, USA, Cat# P0704S) for 2 hours at 37°C before stopping the reaction with Laemmli buffer and loading on SDS-PAGE.

4.4.10 SDS-PAGE and Western Blot

Protein samples were separated on a 1.5 mm SDS-PAGE gel containing 0.5% of 2,2,2-trichloroethanol (TCE). Non-specific sites were blocked using 5% skim milk in TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 0.3 % Tween-20) for 1h at room temperature. Membranes were incubated with primary antibodies diluted in TBS-T supplemented with 0.05 % NaN_3 overnight at 4°C then thoroughly washed with TBS-T. At room temperature, incubation with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies diluted in TBS-T was performed for 1h. After thoroughly washing the membranes with TBS-T, immune complexes were revealed using the Clarity Western ECL substrate (BioRad, Cat# 1705060) using the ChemiDoc MP imaging system.

4.5 Results

4.5.1 RNF13 variants L311S and L312P traffic through an AP-1-dependent pathway

In our previous work, we reported that AP-3 knockdown caused the improper lysosomal localization of RNF13 WT, which resulted in the enlargement of endosomal vesicles (Fig. 2.6) (Cabana *et al.*, 2021). Moreover, L311S and L312P variants, as well as a variant lacking a dileucine motif (L311A/L312A, henceforth designated LL/AA), fail to interact with the AP-3 complex (Fig. 2.4) (Cabana *et al.*, 2021). The presence of these variant proteins in lysosomes was markedly reduced, although still localized to late endosomes (Fig. 2.1; 2.3) (Cabana *et al.*, 2021). To gain further insight into the trafficking of variants through the biosynthetic secretory pathway and the potential impact on glycosylation, we performed endoglycosidase H (Endo H) and peptide-N-glycosidase F (PNGase F) digestion. HA-tagged RNF13 proteins (WT, L311S and L312P) expressed in HEK293T/17 cells were immunoprecipitated. The results show that undigested RNF13 WT had three intense immunodetected protein species at approximately 53, 58 and 62 kDa, two fainter bands around 38 and 43 kDa, and two faint bands at 72 and 80 kDa (Fig. 4.1A). Digestion with Endo H resulted in a reduction of the 62 kDa band. At the same time, band at 50 kDa became RNF13's most abundant species (Fig. 4.1A). In contrast, the 50 kDa band shifted to around 48 kDa when digested with PNGase F (Fig. 4.1A). Importantly, both L311S and L312P variants displayed the same, reproducible patterns as the WT protein (Fig. 4.1A), suggesting that these variants traffic normally through the biosynthetic pathway.

L311S and L312P variants display normal late endosomal localization and altered lysosomal localization compared to RNF13 WT. Thus, another sorting signal and pathway likely contribute to their late endosome targeting. Accordingly, RNF13 LL/AA is trafficked from the TGN toward the endosomes through an AP-1-dependent pathway by interacting with a second motif in RNF13's C-terminus (Fig. 3.7) (Cabana *et al.*, 2024). A non-canonical VVVQLQ motif allows RNF13 interaction with AP1M1 but not AP3M1 (Fig. 3.3; S3.1) (Cabana *et al.*, 2024). We wondered whether the endosomal localization of variants L311S and L312P could be accomplished through an AP-1-dependent pathway since this second motif remains intact within both variants. To confirm this hypothesis, an immunofluorescence-based co-localization assay between RNF13 and AP1G1 was performed. HeLa cells were transfected with plasmids encoding GFP-tagged RNF13 WT, L311S and L312P proteins. The endogenous AP1G1 subunit was labelled using a specific primary antibody. The results show that signal overlap is similar in all conditions, as demonstrated by no significant difference in the Manders overlap coefficient for WT, L311S and L312P over AP1G1 (Fig. 4.1B-C).

We then assessed whether the L311S and L312P variants require the AP-1 complex to reach the endosomal compartment. HeLa cells were transfected with siCTL, siAP1G1, siAP3D1 or the previously validated combination of siAP1G1 and siAP3D1 for 72 hours (Fig. 3.S4) (Cabana *et al.*, 2024). 24 hours before labelling with endogenous subcellular markers Rab7 or RCAS1 (Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells), cells were transfected with plasmids encoding GFP-tagged RNF13 WT, L311S or L312P proteins. The results showed a partial overlap between RNF13 WT and Rab7 when the AP complexes are repressed individually, whereas this overlap significantly decreases when AP1G1 and AP3D1 are knocked down (Fig. 4.1D-E). The repression of AP3D1 did not affect RNF13 L311S or L312P late endosomal localization. This contrasts with AP1G1 knockdown that significantly decreased the overlap between Rab7 and the L311S and L312P variants (Fig. 4.1D-E).

To determine whether knocking down AP-1 or AP-3 led to a retention of L311S and L312P variants in the Golgi apparatus, HeLa cells were transfected with specific siRNA, transfected with RNF13 WT or variants, and immunolabeled to detect RCAS1. The knockdown of AP1G1 alone was sufficient to increase Manders' coefficient between RNF13 variants L311S and L312P and RCAS1, although the increase for L312P did not reach statistical significance (Fig. 4.1F-G). In contrast, the combination with AP3D1 knockdown was necessary to obtain similar results for the WT protein (Fig. 4.1F-G). These results suggest that RNF13 variants L311S and L312P are trafficked through an AP-1-dependent pathway to exit the Golgi and reach the endosomal compartment.

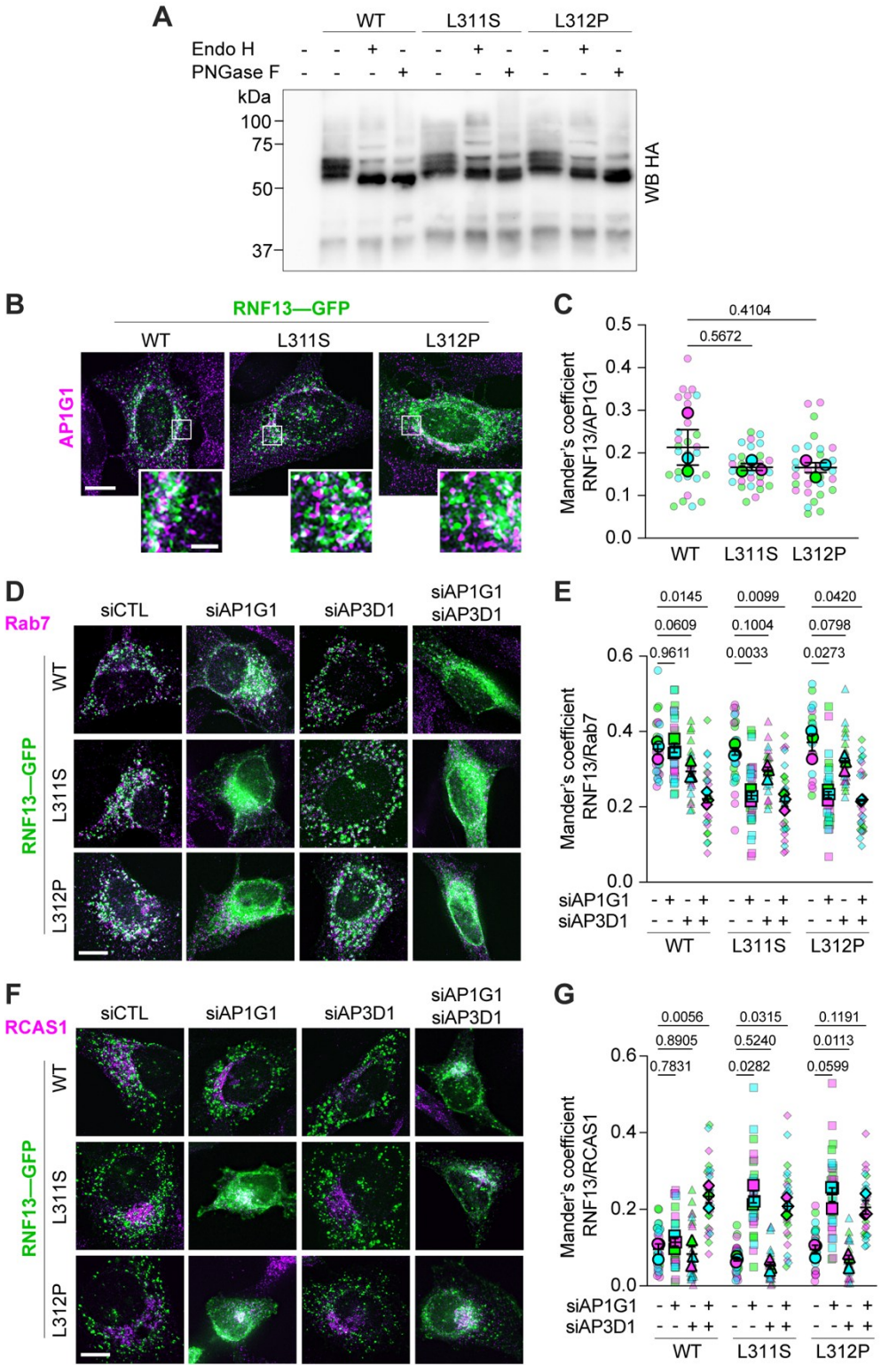


Figure 4.1: RNF13 variants L311S and L312P use an AP-1-dependent pathway for endosomal targeting.

(**A**) Representative immunoblot from three independent experiments (N = 3) of immunoprecipitated HA-tagged RNF13 (WT, L311S and L312P) digested with Endo H or PNGase F. (**B**) Representative immunofluorescence images show HeLa cells expressing RNF13-GFP (in green) and endogenous AP1G1

(in purple). Scale bars indicate 10 μm for the whole cell image and 2 μm for the boxed areas shown in higher magnification. (**C**) The jittered individual value plots represent Manders' overlap coefficient of RNF13 over AP1G1. (**D-G**) Representative images show RNF13-GFP (in green) and endogenous staining (in purple) of (**D**) late endosome marker Rab7 or (**F**) Golgi marker RCAS1 of DsiRNA-transfected HeLa cells. Scale bars indicate 10 μm for the whole cell image and 2 μm for the boxed areas shown in higher magnification. The jittered individual value plots represent Manders' overlap coefficient of RNF13 over (**E**) Rab7 and (**G**) RCAS1. (**C, E, G**) Values are expressed as mean ± SEM. Each color represents an independent experiment, with smaller points representing the data for each cell (n = 30 cells) and larger points representing the mean of an independent experiment (N = 3). For each condition analyzed (N = 3), statistical analysis was conducted using RM two-way ANOVA with the Geisser-Greenhouse correction and Dunnett's multiple comparisons test with individual variances computed for each comparison.

4.5.2 Increased presence of RNF13 variants in dendrites

While there is some redundancy in the functions of AP-1 and AP-3 complexes in most cells, they are important for compartmental complexity in neurons (Guardia *et al.*, 2018). AP-1 is responsible for sorting proteins from the TGN and endosomes toward the somatodendritic domain while AP-3 sorts proteins from endosomes toward the axon and is involved in SV biogenesis (Guardia *et al.*, 2018). As RNF13 L311S and L312P were reported to cause severe neurological symptoms (Edvardson *et al.*, 2019) and only traffic through an AP-1-dependent pathway (Fig. 4.1), we wondered if they might be unevenly distributed in the somatodendritic domain, which could lead to synaptic dysfunction. To assess their localization in neurons, rat primary cultures of hippocampal neurons were transfected with plasmids encoding HA-tagged RNF13 (WT, L311S and L312P) proteins at day in vitro (DIV) 4. As variants of RNF13 cause an infantile neurodegenerative disease, neurons were transfected early in development and fixed at DIV10 for immunofluorescence staining to allow potential defects to develop during neuronal growth. Endogenous Microtubule-associated protein 2 (MAP2) was immunolabelled using a specific antibody to detect dendrites, and RNF13 was detected using an anti-HA antibody. RNF13 WT localized in the soma and primary dendrites (Fig. 4.2A). In contrast, both variants L311S and L312P extend to secondary and tertiary dendrites, much further from the soma than the WT (Fig. 4.2A). Quantitation of RNF13 presence in a section of distal dendrite positioned 50 μm away from the soma show increase of the variants L311S and L312P when compared to WT (Fig. 4.2B). Furthermore, the area covered by RNF13 staining was significantly higher for both variants when compared to the WT protein (Fig. 4.2C). Interestingly, we observed that the dendrites appeared thinner in the presence of the variants, which was supported by a decreased MAP2-staining area for both L311S and L312P when compared to a non-transfected neuron (NT) (Fig. 4.2D). Because the dendrites expressing RNF13 WT were larger while having a smaller count of RNF13, the ratio of L311S and L312P RNF13 puncta over the MAP2 area were higher than for WT RNF13, although L311S did not

reach statistical significance (Fig. 4.2E). Together, these results show that an increased concentration of L311S and L312P variants in proximal dendrites is correlated with an altered dendritic morphology.

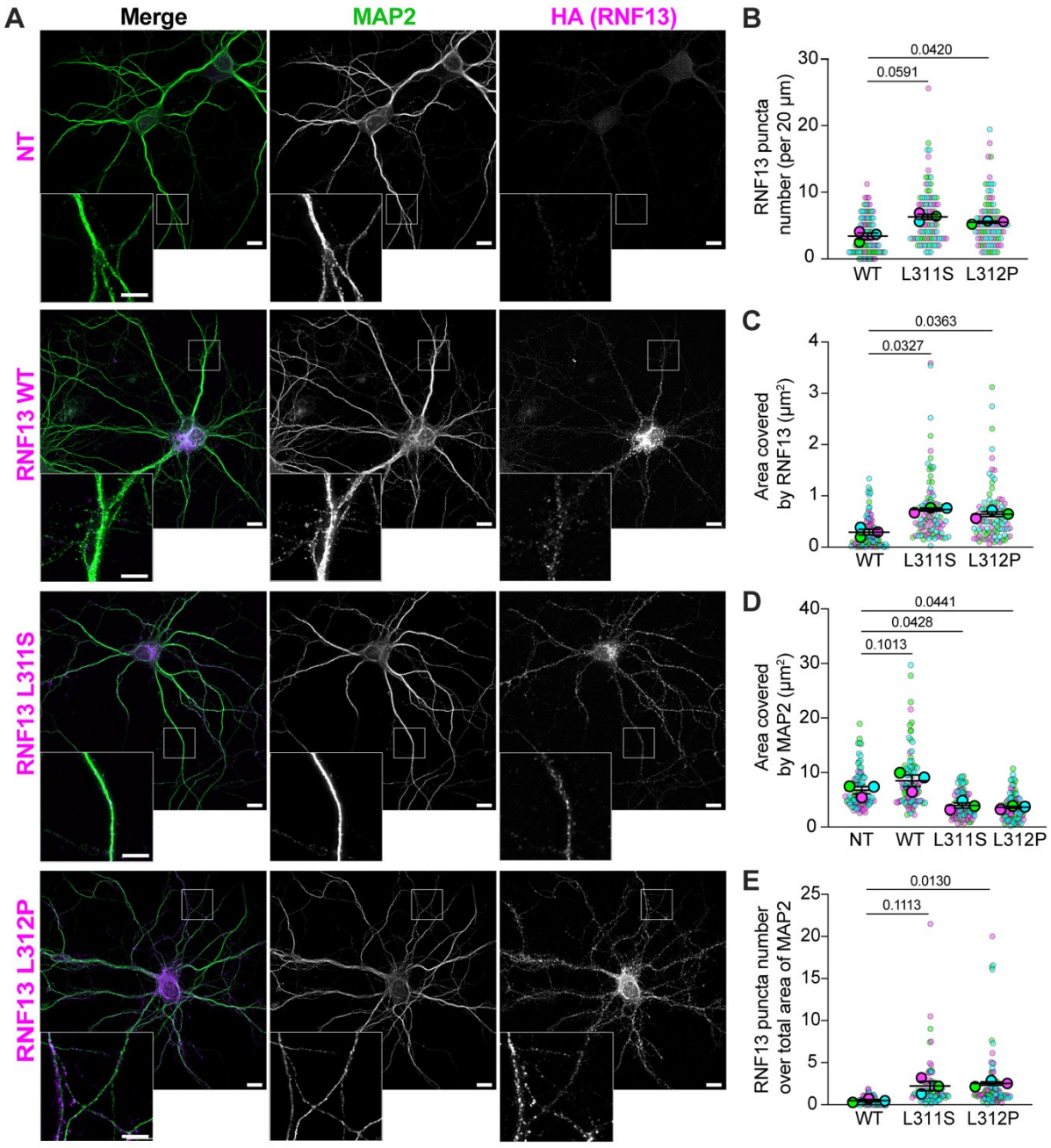


Figure 4.2: RNF13 variants L311S and L312P show increased localization in dendrites and alter their morphology.

(**A**) Representative images of primary cultures of hippocampal neurons transfected at DIV4 with HA-tagged RNF13 (WT, L311S and L312P) proteins encoding plasmids or empty vector and fixed at DIV10 show the staining of RNF13-HA (in purple) and endogenous dendrites marker MAP2 (in green). Scale bars indicate 10 µm for the whole cell image and 5 µm for the boxed areas shown in higher magnification. The jittered individual value plots represent the (**B**) number of RNF13 puncta, (**C**) area covered by RNF13 staining, (**D**) area covered by MAP2 staining, and (**E**) the number of RNF13 puncta normalized over the total area of MAP2 in a 20 µm dendrite section taken 50 µm away from the soma. Values are expressed as mean ± SEM. Each color represents an independent experiment where smaller points represent each dendrite analyzed (n = 90 dendrites), and larger points represent the mean of an independent experiment (N = 3). For each condition analyzed, N = 3 was used for RM one-way ANOVA with the Geisser-Greenhouse correction, and Dunnett's multiple comparisons test with individual variances was calculated for each comparison.

4.5.3 Alterations in the dileucine motif act as a dominant negative and redistribute early endosomes in dendrites

The importance of the endolysosomal system is well-established for proper synaptic function (Grochowska *et al.*, 2022; Winckler *et al.*, 2018). We have previously demonstrated that epidermal growth factor (EGF) progression was altered at the early endosome by RNF13 L311S and L312P variants and modification to the dileucine motif caused the enlargement of early endosome antigen 1 (EEA1)-positive vesicles in HeLa cells (Fig. 2.1F; 2.2) (Cabana *et al.*, 2021). Based on these results, we wondered if the variants would affect early endosomes in neurons. Because it was suggested that L311S might add a phosphorylation site and that L312P might increase the probability of phosphorylation to an adjacent threonine (Edvardson *et al.*, 2019), we used the previously characterized AP-3-binding defective variant LL/AA as a control to understand the importance of the dileucine motif and proper trafficking of RNF13 (Fig. 2.3; 2.4; 3.7) (Cabana *et al.*, 2021; Cabana *et al.*, 2024). Furthermore, given that RNF13 E3 Ub ligase activity is involved in most of its reported function (Arshad *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2024b; Miyakawa *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009), we compared the dileucine-altered variants' phenotypes to the dominant negative (hereafter named DN) version of RNF13 as previously characterized (Lin *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009).

To study how RNF13 variants affect early endosomes in dendrites, we transfected cultures of rat primary hippocampal neurons with plasmids encoding HA-tagged RNF13 (WT, L311S, L312P, LL/AA and DN) proteins at DIV4. Fixation and immunolabeling of endogenous early endosomes was performed at DIV10 using an EEA1-specific antibody. A 20 µm section of dendrite was drawn either directly after the soma (PROX, left zoom) or 50 µm away from the soma (DIST, right zoom) to quantify EEA1 presence in each section (Fig. 4.3A). The presence of RNF13 WT and DN significantly decreased the number of EEA1 puncta in the proximal dendrites while the dileucine-altered variants had a minor and insignificant effect compared

to NT (Fig. 4.3B). However, in distal dendrites, the DN variant decreased EEA1 puncta number to a level similar to L311S, L312P and LL/AA, while RNF13 WT had an intermediate phenotype (Fig. 4.3B).

To circumvent a potential underestimation of EEA1 presence due to differences in puncta size, we compared the area covered by EEA1 staining. The results show that the area covered by EEA1 staining decreased in proximal dendrites expressing WT and DN RNF13 compared to NT cells (Fig. 4.3C). In distal dendrites, the expression of RNF13 WT and variants significantly reduced the area covered by EEA1 when compared to NT (Fig. 4.3C). An important limitation of our methodology is the level of resolution that can be achieved with deconvoluted epifluorescence microscopy images. Puncta are thus more accurately described as clusters of proteins, given that the fluorescence intensity is proportional to the protein abundance. The difference in fluorescence intensity was significantly decreased for the WT in the proximal dendrites but not in the distal dendrites (Fig. 4.3D). In contrast, whereas the variants did not modify EEA1 fluorescence intensity in the proximal dendrites, they significantly altered EEA1-linked fluorescence in distal dendrites (Fig. 4.3D). The results also showed that all variants significantly impact the proportion of EEA1 puncta number in proximal and distal dendrites, whereas no significant modification was measured between WT and NT cells (Fig. 4.3E). Furthermore, when the number of EEA1 puncta in both sections was added to enable comparison, all variants exhibited values similar to those of the WT, which were significantly lower than those of the NT (Fig. 4.3F). Overall, these results show that the variants disrupted the spatial distribution of early endosomes, indicating that there may be a defect in the transport mechanism in dendrites.

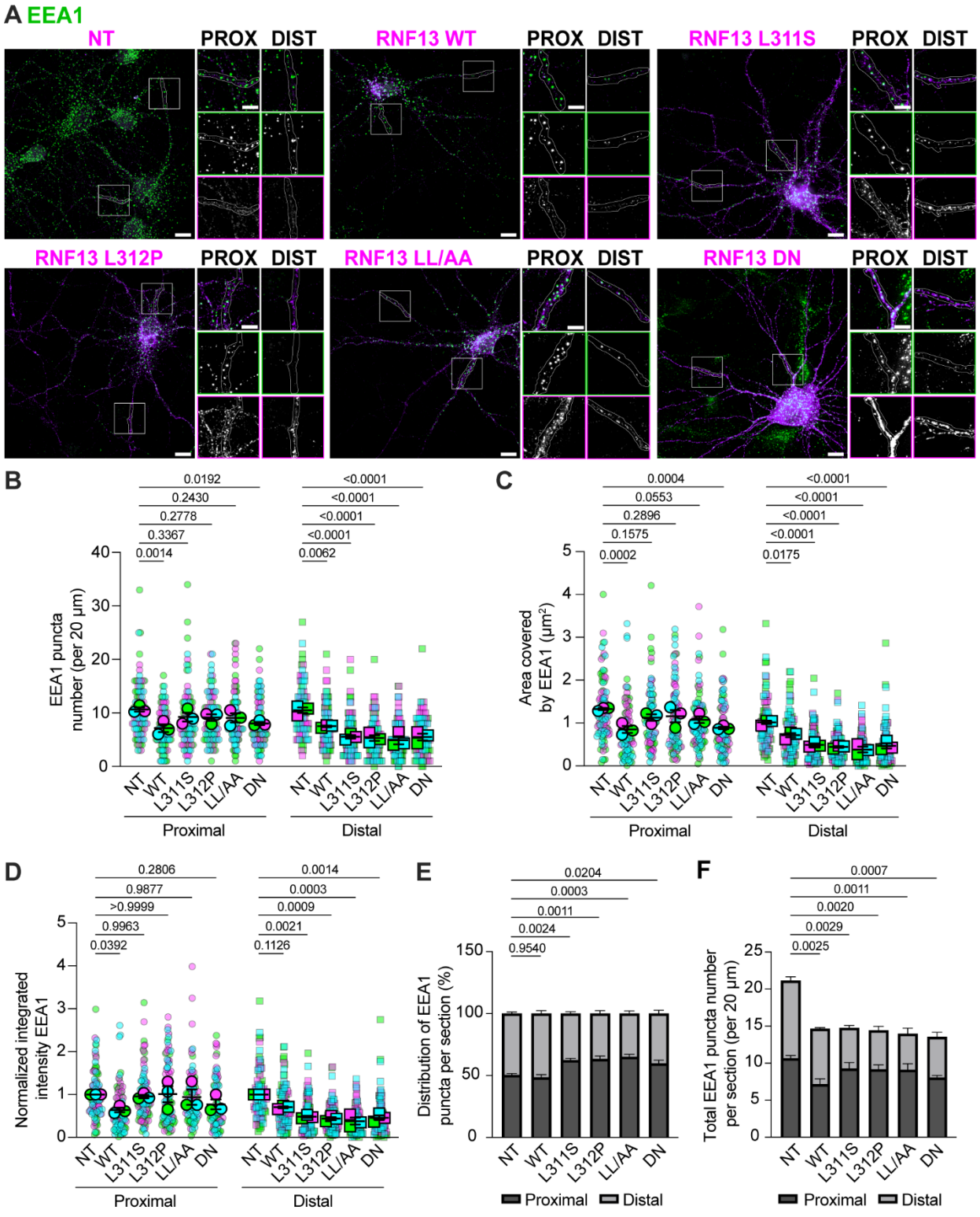


Figure 4.3: Alterations in the dileucine motif and the Ub ligase catalytic site change the distribution of early endosomes in dendrites.

Primary cultures of hippocampal neurons transfected at DIV4 with an empty vector or plasmids encoding HA-tagged RNF13 (WT, L311S, L312P, LL/AA and DN) proteins were fixed at DIV10. (**A**) Representative images show the staining of RNF13-HA (in purple) and endogenous early endosome marker EEA1 (in green). Scale bars indicate 10 µm for the whole cell image and 5 µm for the boxed areas shown in higher magnification (green boxes for EEA1, purple boxes for RNF13), where the channels are presented as merged (top) or individually separated. PROX, proximal section, DIST, distal section. The jittered individual value plots represent the (**B**) number, (**C**) area covered, and (**D**) normalized signal intensity of EEA1 in a 20 µm dendrites section taken directly after (proximal) or 50 µm away (distal) from the soma. Each color represents an independent experiment where smaller points represent each dendrite analyzed (n = 90 dendrites), and bigger points represent the mean of an independent experiment (N = 3). The summary bar plots represent the proportion of EEA1 in the proximal and distal sections (**E**) and the total number of EEA1 in both sections (**F**). The data are presented as mean ± SEM and were subjected to statistical analysis using RM two-way ANOVA with the Geisser-Greenhouse correction and Dunnett's multiple comparisons test with a single pooled variance. This compares the simple effects within columns (**B-E**) and the mean row effect (**F**).

4.5.4 Lysosomes number is decreased in proximal dendrites in the presence of RNF13

A recent study implicated RNF13 in lysosomal acidification (Liu *et al.*, 2024b). Our work shows that RNF13 is higher in late endosomes and lysosomes than in early endosomes, and that RNF13 dileucine variants are not correctly targeted to lysosomes (Fig. 2.1) (Cabana *et al.*, 2021). RNF13 L311S and L312P variants may also affect lysosomes in neurons. To determine whether RNF13 variants affect the distribution of lysosomes in dendrites, primary cultures of rat hippocampal neurons were transfected at DIV4 with plasmids encoding HA-tagged RNF13 (WT, L311S, L312P, LL/AA and DN) proteins. At DIV10, fixation and subsequent immunolabeling was performed against HA and endogenous Lamp1. As previously described, a 20 µm section of dendrite was drawn either in direct proximity to the soma (PROX, left zoom) or 50 µm away from the soma (DIST, right zoom) (Fig. 4.4A). RNF13 WT and all the variants significantly decreased Lamp1 puncta number in proximal dendrites (Fig. 4.4B). In contrast, no difference was observed in distal dendrites although the WT presented a slight but not significant increase (Fig. 4.4B). The area covered by Lamp1 and its fluorescence intensity declined, but the fluorescence intensity in proximal dendrites did not reach statistical significance (Fig. 4.4C-D). No statistical differences were measured for WT or variants RNF13 in the distal dendrites. (Fig. 4.4C-D). Unexpectedly, only RNF13 WT significantly altered the proportion of Lamp1 puncta number found in each section (Fig. 4.4E). In comparison, the presence of L311S, L312P, LL/AA and DN variants had no significant effect in the proximal dendrites (Fig. 4.4E). The total number of Lamp1 puncta in both sections was not significantly different although a slight decrease was measured for the four variants (Fig. 4.4F). Given that the proximal lysosomes are known to be the most degradative (Yap et Winckler, 2022), the results suggest that the presence of RNF13 variants might alter lysosomal maturation in neurons, while the WT variant appears to redistribute the lysosomes towards distal dendrites.

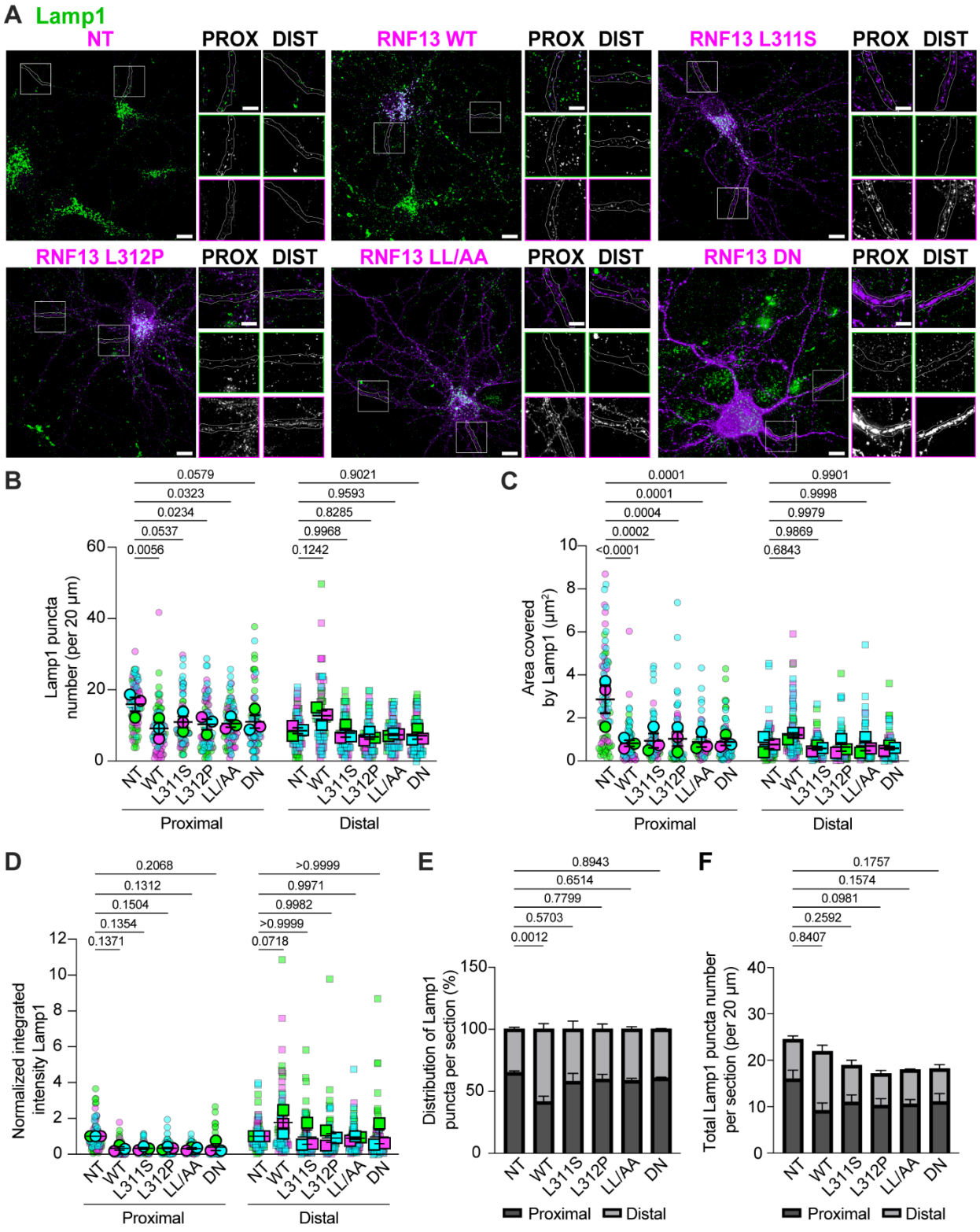


Figure 4.4: The number of Lamp1-positive lysosomes is reduced in the proximal dendrites of neurons expressing RNF13 whereas only WT RNF13 alter their distribution.

(**A**) Representative images show RNF13-HA (in purple) and staining of endogenous lysosome marker Lamp1 (in green) in primary cultures of hippocampal neurons transfected at DIV4 with HA-tagged RNF13 (WT, L311S, L312P, LL/AA and DN) proteins encoding plasmids or empty vector and fixed at DIV10. Scale bars indicate 10 μm for the whole cell image and 5 μm for the boxed areas shown in higher magnification (green boxes for Lamp1, purple boxes for RNF13), where channels are presented as merged (top) or individually separated. PROX, proximal section, DIST, distal section. The jittered individual value plots represent the (**B**) number, (**C**) area covered, and (**D**) normalized signal intensity of Lamp1 in a 20 μm dendrites section taken directly after (proximal) or 50 μm away (distal) from the soma. Each color represents an independent experiment where smaller points represent each dendrite analyzed (n = 90 dendrites), and bigger points represent the mean of an independent experiment (N = 3). The summary bar plots represent the proportion of Lamp1 for the proximal and distal sections (**E**) and the total number of Lamp1 in both sections (**F**). The results are presented as mean ± SEM. The data were subjected to statistical analysis using RM two-way ANOVA with the Geisser-Greenhouse correction and Dunnett's multiple comparisons test with a single pooled variance to compare (**B-E**) simple effects within columns and (**F**) the mean row effect.

4.5.5 RNF13 WT increases the number of PSD-95 particles in distal dendrites

It is reported that inhibition of lysosomes reduces the number of spines and that the trafficking of lysosomes in distal dendrites is highly correlated with synaptic activity (Goo *et al.*, 2017). It is also established that spine morphology is closely linked to synaptic function. Furthermore, numerous neurodegenerative and neurodevelopmental diseases display alterations in dendritic spines (Nelson et Bender, 2021; Nishiyama, 2019; Penzes *et al.*, 2011). To gain a deeper understanding of the potential impact of RNF13 variants on the development of dendritic spines in excitatory neurons, we assessed Postsynaptic density protein 95 (PSD-95) abundance. PSD-95 is an important protein that plays a role in the trafficking, localization and anchoring of glutamate receptors (Yoo *et al.*, 2019). At DIV4, rat primary hippocampal cultures were transfected with plasmids encoding HA-tagged RNF13 (WT, L311S, L312P, LL/AA and DN) proteins. At DIV10, when neurons are still at an early stage of their development, endogenous labelling was performed using a PSD-95-specific antibody. As previously outlined, a 20 μm section of dendrite was selected either directly after the soma (PROX, left zoom) or 50 μm away from the soma (DIST, right zoom) (Fig. 4.5A). When compared to NT in distal dendrite, the number, area and fluorescence intensity of PSD-95 puncta were significantly increased by the presence of RNF13 WT but not by any of the variants (Fig. 4.5B-C-D). In proximal dendrites, only the L311S variant significantly decreased the area and fluorescence intensity (Fig. 4.5B-D). As there was a significant increase in one section but not the other, RNF13 WT also significantly changed the proportion of PSD-95 found in each section (Fig. 4.5E). However, the total number of PSD-95 particles increased but did not reach statistical significance for the WT while all the variants had no effect (Fig. 4.5F). It is important to note that PSD-95 is present as puncta before spines form (Gerrow *et al.*, 2006), and that DIV10 is still early to detect fully mature spines or synapses (Barnes et Polleux, 2009). In this context, the

results suggest that RNF13 affects the development of excitatory synapses and requires both the dileucine motif and the Ub ligase catalytic site for this phenotype.

4.5.6 Dileucine-altered variants decrease Gephyrin abundance in dendrites

The RNF13 L311S and L312P variants were reported to cause refractory seizure in affected individuals (Edvardson *et al.*, 2019). It is well documented that an impairment in inhibitory neurotransmission may be a contributing factor in the occurrence of seizures (Dzyubenko *et al.*, 2021; Guerrini *et al.*, 2023; Platzer *et al.*, 2022). Given the observed differences in dendrite morphology and PSD-95 abundance, we sought to determine whether inhibitory synaptic sites are also affected by the presence of RNF13. We examined Gephyrin, a protein that anchors, clusters and stabilizes glycine and gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors at inhibitory synapses (Choii et Ko, 2015). Again, HA-tagged RNF13-expressing cultures of rat primary hippocampal neurons were fixed at DIV10 and immunolabeled using a specific antibody against Gephyrin. A 20 µm section of dendrite near the soma (PROX, left zoom) and 50 µm away from the soma (DIST, right zoom) were selected for analysis (Fig. 4.6A). The number of puncta was significantly reduced only in the distal section for all the variants (Fig. 4.6B). The area covered by Gephyrin staining was not affected in proximal dendrites, but it was significantly decreased in the distal section by the presence of the L311S, L312P and LL/AA variants (Fig. 4.6C). In addition, only RNF13 L311S, L312P and LL/AA decreased the fluorescence intensity of Gephyrin in distal dendrites with no effect observed in the proximal section (Fig. 4.6D). The proportion of Gephyrin puncta number in each segment (i.e proximal vs distal) was not significantly different for any condition (Fig. 4.6E). Notably, only the dileucine-altered variants resulted in a significant decrease in the total number of Gephyrin puncta (Fig. 4.6F). Together, these findings indicate that the RNF13 dileucine motif plays a role in the development of inhibitory synapses, whereas the RNF13 E3 ligase catalytic site exerts a partial influence on the cellular mechanism involved (Fig. 4.7).

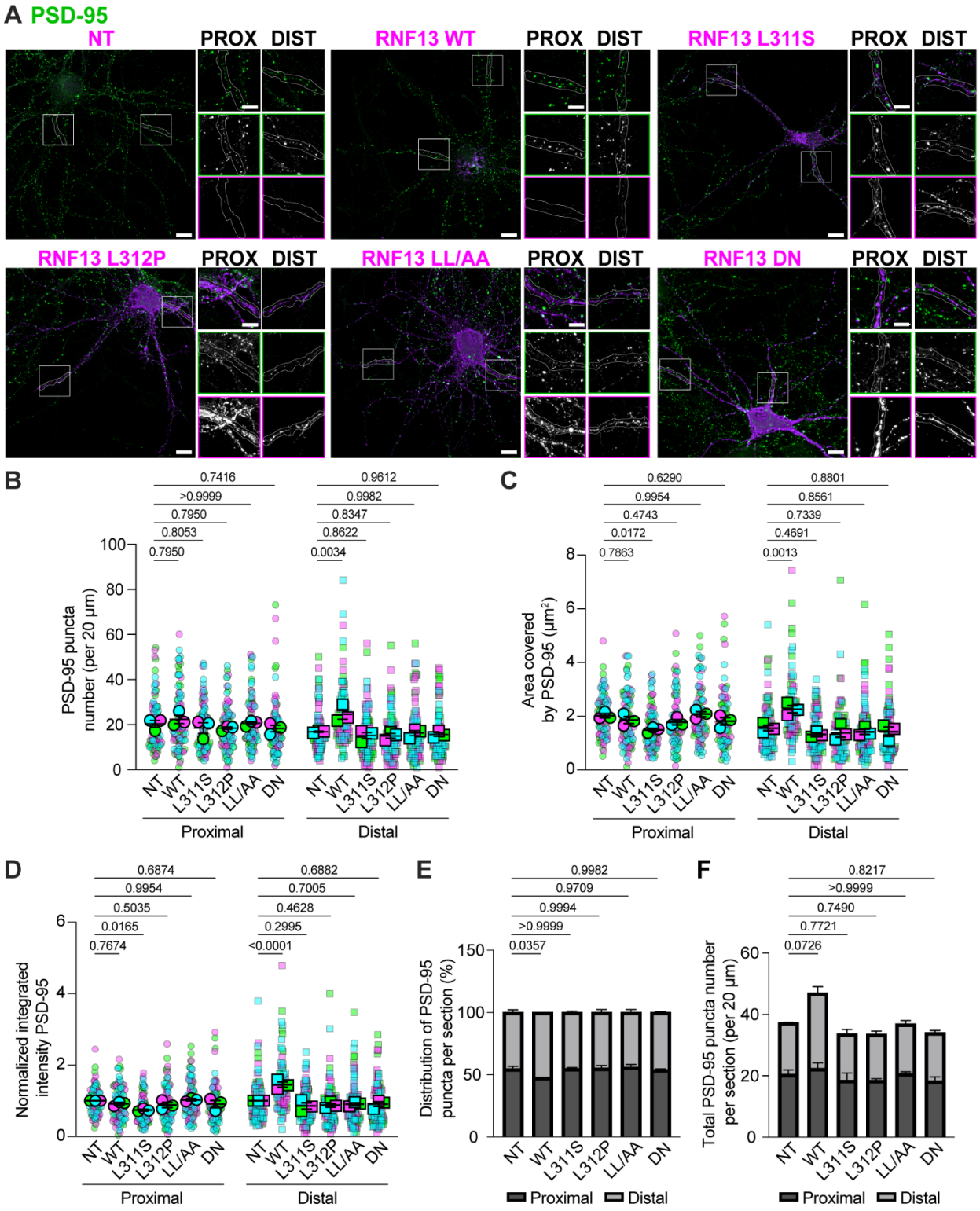


Figure 4.5: An intact dileucine motif and Ub ligase activity of RNF13 are requird to increase PSD-95 abundance in proximal dendrite.

Primary cultures of hippocampal neurons were transfected at DIV4 with HA-tagged RNF13 (WT, L311S, L312P, LL/AA and DN) protein-encoding plasmids or an empty vector and fixed at DIV10. (**A**) Representative images show the staining of RNF13-HA (in purple) and endogenous excitatory synapse marker PSD-95 (in green). Scale bars indicate 10 µm for the whole cell image and 5 µm for the boxed areas shown in higher magnification (green boxes for PSD-95, purple boxes for RNF13), where the channels are presented as merged (top) or individually separated. PROX, proximal section, DIST, distal section. The jittered individual value plots represent the (**B**) number, (**C**) area covered, and (**D**) normalized signal intensity of PSD-95 in a 20 µm dendrites section taken directly after (proximal) or 50 µm away (distal) from the soma. Each color represents an independent experiment where smaller points represent each individual dendrite analyzed (n = 90 dendrites) and bigger points represent the mean of an independent experiment (N = 3). The summary bar plots represent the proportion of PSD-95 in the proximal and distal sections (**E**) and the total number of PSD-95 in both sections (**F**). Analyzed values are expressed as mean ± SEM and analyzed using RM two-way ANOVA with the Geisser-Greenhouse correction and Dunnett's multiple comparisons test with a single pooled variance to compare (**B-E**) simple effects within columns and (**F**) the mean row effect.

4.6 Discussion

Neurons are highly polarized cells with an important compartmental complexity, which allows AP complexes to achieve different and specific functions (Donato *et al.*, 2019; Guardia *et al.*, 2018). The differential binding affinity of cargo proteins to either AP-1 or AP-3 complexes enables the targeted delivery of materials to dendritic or axonal locations, respectively (Li *et al.*, 2016). In the nematode *C. elegans*, the dileucine motif (ETKPLI) in the axonal G-protein coupled serotonin receptor/SER-1 is preferentially bound to AP-3. In contrast, the receptor tyrosine kinase CAM-1 has two dileucine motifs (DNSLL and DLHELL), which are crucial for its dendritic targeting and preferential binding to AP-1 (Li *et al.*, 2016). Substituting the SER-1 dileucine motif with those found in CAM-1 resulted in a change in SER-1 localization from axonal to dendritic (Li *et al.*, 2016). While evaluating RNF13's preferential AP complex binding is beyond the scope of this study, the fact that the variant proteins only traffic through an AP-1-dependent pathway may result in an important redistribution of the protein, which could explain their increased presence in the somatodendritic domain (Fig. 4.1 and 4.2).

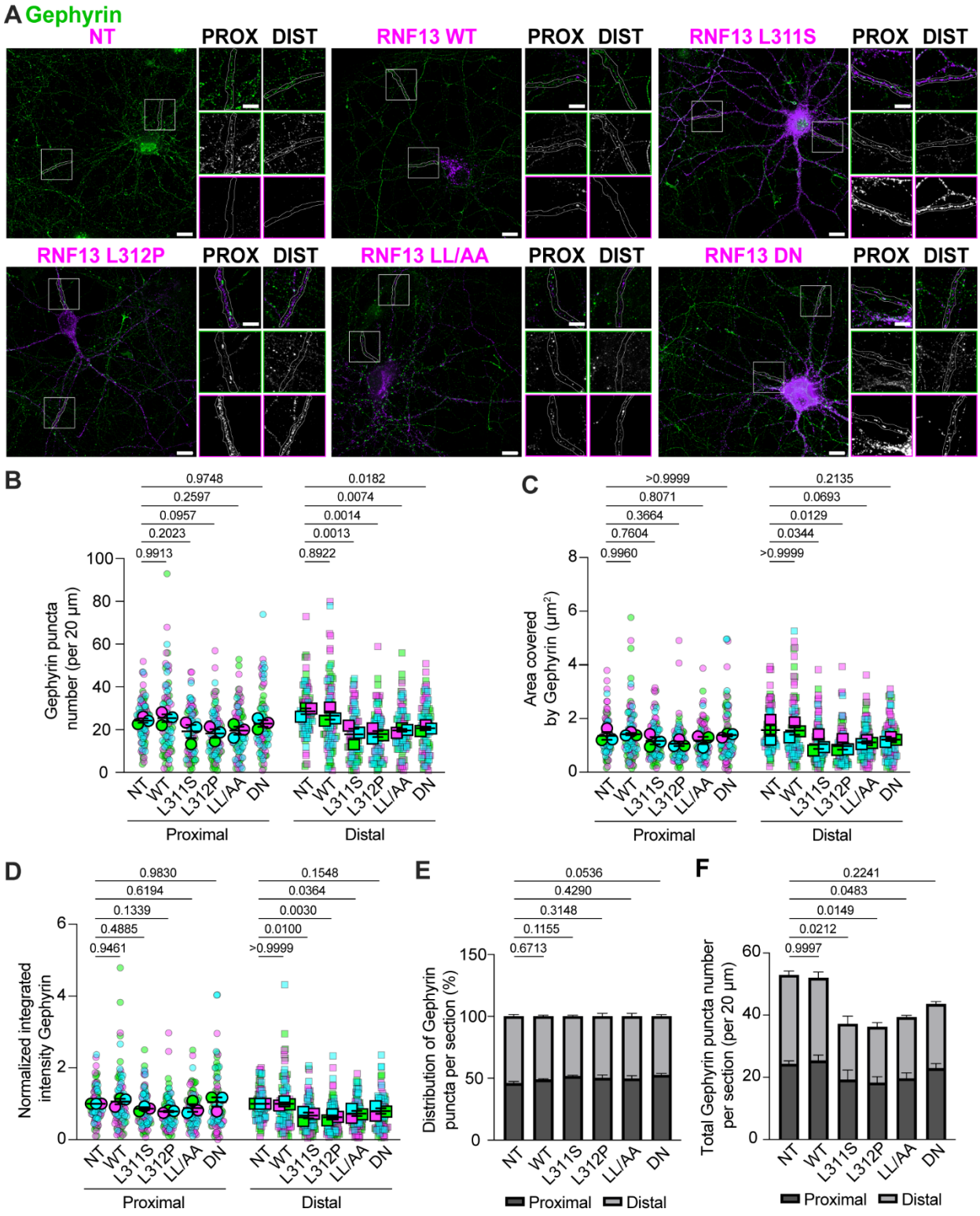


Figure 4.6: Alterations to RNF13 dileucine motif decrease Gephyrin presence in dendrites.

(**A**) Representative images of transfected primary cultures of hippocampal neurons show RNF13-HA (in purple) and the presence of endogenous inhibitory synapse marker Gephyrin (in green). Scale bars indicate

10 μm for the whole cell image and 5 μm for the boxed areas shown in higher magnification where the channels are presented as merged or separated (green boxes for Gephyrin, purple boxes for RNF13). PROX, proximal section, DIST, distal section. The jittered individual value plots represent the (**B**) number, (**C**) area covered, and (**D**) normalized signal intensity of Gephyrin in a 20 μm dendrites section taken directly after (proximal) or 50 μm away (distal) from the soma. Each colour represents an independent experiment, with smaller points representing the analysis of each dendrite segment (n = 90 dendrites) and larger points representing the mean of an independent experiment (N = 3). The summary bar plots represent the proportion of Gephyrin in the proximal and distal sections (**E**) and the total number of Gephyrin molecules in both sections (**F**). The data are expressed as mean ± SEM and analyzed using an RM two-way ANOVA with the Geisser-Greenhouse correction and Dunnett's multiple comparisons test with a single pooled variance. This was used to compare (**B-E**) simple effects within columns and (**F**) the mean row effect.

The spatial regulation of different cellular compartments is critical to ensure proper proteostasis (Grochowska *et al.*, 2022). In neurons, early endosomes particles are distributed throughout the dendrites and exhibit minimal movement compared to late endosomes particles, which display bidirectional mobility (Yap et Winckler, 2022). Specifically, Rab7 is recruited and activated at early endosomes membranes, converting them into motile late endosomes (Yap *et al.*, 2022). Notably, early endosomes were distributed uniformly throughout the dendrites when RNF13 WT was present (Fig. 4.3). However, all the variants altered this distribution, increasing the number of EEA1-positive early endosomes proximal to the soma and a decrease in distal dendrites (Fig. 4.3). Given the limited mobility of early endosomes, this observation points to a potential defect in the retrograde transport of late endosomes in the dendrites. In addition, defective retrograde transport results in alterations to dendritic morphology (Cai *et al.*, 2010), which could be the underlying cause of the reduced MAP2-covered area observed in the presence of L311S and L312P (Fig. 4.2). Although highly speculative, a potential mechanism could involve alterations in retrograde transport, allowing Rab7 to accumulate and consequently only perform the early-to-late endosome switch distally. Given that highly degradative dendritic lysosomes are predominantly within the initial 25 μm from the soma (Yap et Winckler, 2022), an altered maturation in proximal dendrites would be consistent with the observed combination of increased EEA1 and decreased Lamp1 presence across all variants (Fig. 4.3; 4.4).

RNF13 gene expression was shown to be expressed at a higher level following stimulation of the substrate adhesion molecule Cytotactin/Tenascin-C (Tranque *et al.*, 1996), and its staining was also correlated with Tenascin-C expression, an important extracellular matrix (ECM) proteoglycan (Zhang *et al.*, 2009). In addition, RNF13 enhances Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity via an E3 ligase-dependent mechanism (Zhang *et al.*, 2009). Although the precise cellular mechanisms remain to be elucidated, the evidence suggests that RNF13 plays a role in the ECM. It is known that the brain's ECM is a crucial regulator of synapses (Dzyubenko *et al.*, 2021). Specifically, alterations to the ECM using chondroitinase enzymatic digestion to deplete chondroitin sulfate proteoglycans in mature neurons preferentially reduce

the density of inhibitory synapses (Dzyubenko *et al.*, 2021). Thus, the significant decrease in the number of Gephyrin puncta observed in the distal dendrites following the expression of RNF13 DN may be indicative of an alteration to the ECM through a yet-to-be-established function of RNF13 (Fig. 4.6). As AP-3 has been shown to play a role in exocytosis (Ma *et al.*, 2021), which greatly affects the ECM (Parihar *et al.*, 2022), dileucine-altered variants may have influenced this pathway, given their loss of interaction with AP-3 (Fig. 2.4) (Cabana *et al.*, 2021) and could explain the observed phenotype from the variants (Fig. 4.6). Overall, while RNF13's role in ECM regulation remains poorly understood, it would be an avenue to pursue for a better understanding of the underlying physiopathology of DEE73.

In a recent study, Taylor *et al.* conducted a comprehensive review of the literature and disease databases, identifying several additional variants, mainly caused by nonsense mutations, that manifest a DEE73-overlapping phenotype (Taylor *et al.*, 2023). All the pathogenic or likely pathogenic variants are located between residues 292 and 312 (S292*, D293_S294ins*, Q300*, E301*, E307*, P310* and L311*), which leads to the hypothesis that a functional domain lies in this region (Taylor *et al.*, 2023). Importantly, all the variants identified are heterozygous (Taylor *et al.*, 2023). Autosomal dominant disorders are either a result of loss-of-function (LOF) caused by haploinsufficiency or by non-LOF mechanisms, which can be classified as dominant-negative (DN) or gain-of-function (GOF) effects (Gerasimavicius *et al.*, 2022). It is unlikely that haploinsufficiency causes the disease associated with DEE73 (Taylor *et al.*, 2023). In contrast, Edvardson *et al.* proposed that a GOF causes DEE73 (Edvardson *et al.*, 2019). Specifically, they reported that XBP1 splicing and c-Jun phosphorylation levels are higher in fibroblasts and lymphoblasts derived from an affected individual carrying L311S after 48 hours of tunicamycin treatment (Edvardson *et al.*, 2019). As RNF13 was demonstrated to interact with IRE1α to promote ER stress-mediated apoptosis, Edvardson *et al.* proposed that the variants act as GOF proteins by enhancing this pathway (Edvardson *et al.*, 2019). However, reducing autophagy levels increases IRE1α activity (Senft et Ronai, 2015), and RNF13 is increasingly recognized to regulate different types of autophagy (Lin *et al.*, 2023; Miyakawa *et al.*, 2022; Tan *et al.*, 2022). The improper lysosomal location of L311S and L312P may alter autophagy, potentially leading to an increased IRE1α activity. While this hypothesis is highly speculative, it suggests that the evidence presented by Edvardson *et al.* is insufficient to confirm a GOF protein effect (Edvardson *et al.*, 2019). Our findings show that L311S and L312P share characteristics comparable to those of the Ub ligase DN variant, indicating that impaired Ub ligase activity resulting from mislocalization of RNF13 might contribute to the mechanism underlying DEE73. Additionally, as supported by our experimental findings with the LL/AA variant, we propose that the functional domain associated with the DEE73-hotspot region is attributed to the residues 307 to 312 forming the dileucine motif. However, we cannot rule out the possibility of a GOF effect resulting from lysosomal degradation impairment and protein accumulation,

particularly if the variants persist in a compartment for an extended period. While the exact cellular and molecular mechanisms remain to be clarified, this study provides valuable insights into how DEE73-associated genetic variants of RNF13 impact neuronal organization (Fig. 4.7).

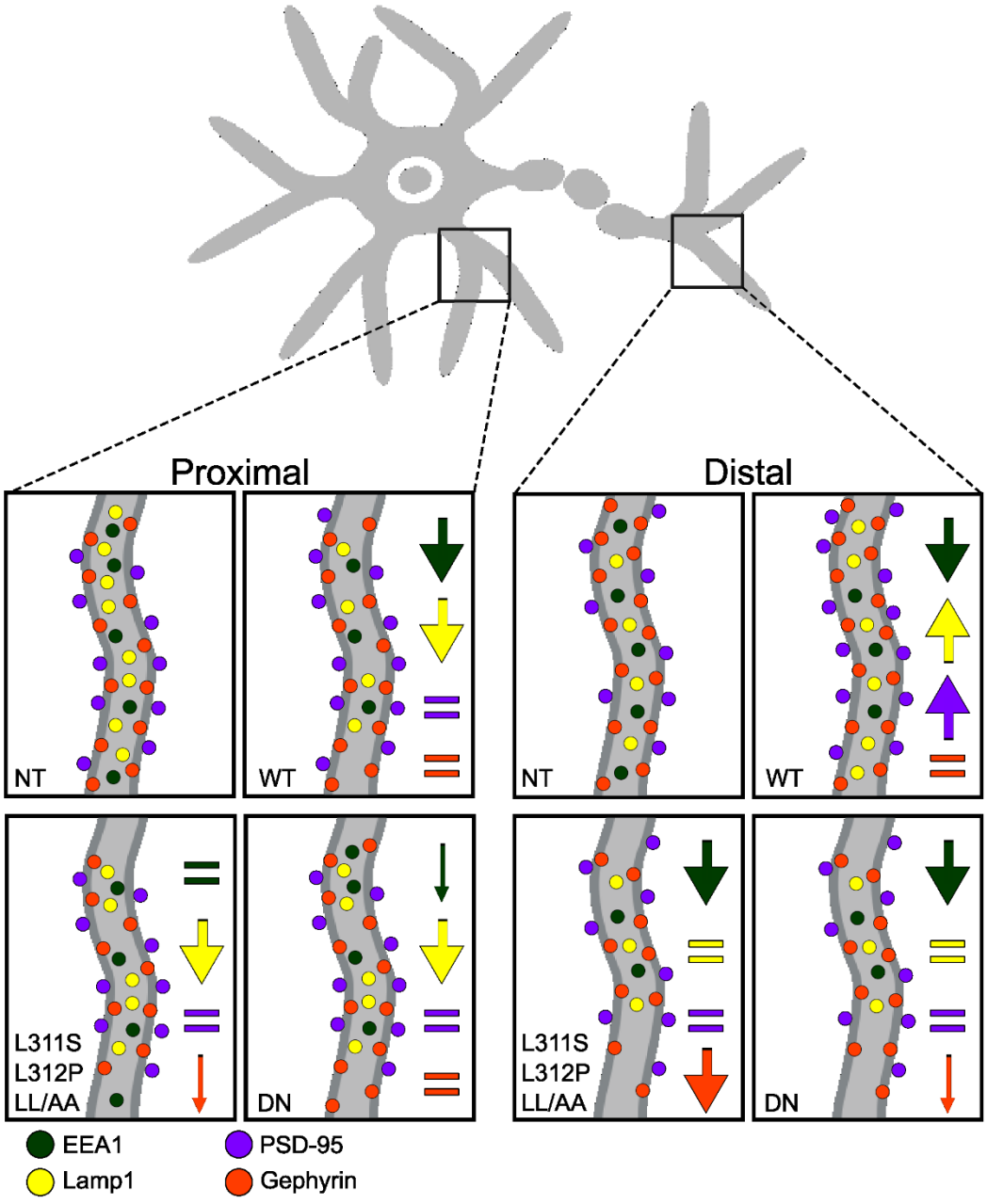


Figure 4.7: Graphic summary of RNF13's impact on various dendritic components.

This illustration summarized the effects of RNF13 on the number of EEA1 (dark green), Lamp1 (yellow), PSD-95 (purple) and Gephyrin (orange) in proximal (left columns) or distal (right columns) dendrites of neurons. The columns represent neurons from control (NT) and RNF13, including wild-type (WT), dileucine-altered (L311S, L312P, LL/AA), and dominant-negative (DN) variants. For each condition, the

larger arrows indicate significant changes compared to the NT group, while the smaller arrows denote minor and non-significant changes. The equal signs indicate no change in comparison to NT neurons.

4.7 Conclusion

Two missense mutations in the *RNF13* gene have been identified as the cause of the DEE73 disorder (Edvardson *et al.*, 2019). Our previous study showed that these mutations alter a dileucine-based motif and ultimately disrupt the interaction with AP-3, resulting in a significantly reduced presence in lysosomes (Fig. 2.1; 2.4) (Cabana *et al.*, 2021). The current study builds on these findings, demonstrating that RNF13 L311S and L312P variants are trafficked toward their late endosomal location via an AP-1-dependent pathway in HeLa cells. Given the different functions of AP-1 and AP-3 in neurons, we report a significant increase in the presence of L311S and L312P in secondary and tertiary dendrites. Analysis reveals that alteration to the dileucine motif or the RING domain of RNF13 results in a redistribution of EEA1-positive early endosomes. Concurrently, the WT redistributes Lamp1-positive lysosomes in neurons. Furthermore, we observed that WT RNF13 protein increased the level of the anchoring protein PSD-95, while the variants blocked this effect. Notably, only the variants with altered dileucine motifs decreased the presence of Gephyrin in dendrites. Intriguingly, comparable results were obtained with the DN and the dileucine-motif altered variants, except for Gephyrin. These observations underscore the necessity for further investigation to elucidate the full scope of these phenomena. Firstly, transient expression provides a valuable opportunity to investigate the effect of variant proteins, but expression of RNF13 WT causes some phenotypes (Cabana *et al.*, 2024; van Dijk *et al.*, 2014). In this context, we established a baseline by selecting NT neurons as a control group. Even when variants exhibit no discernible difference with the NT, they may still exert a dominant negative effect on WT endogenous protein function if they do not manifest the same phenotype. Also, the reported effects might be directly caused by the genetic variants or result from a compensatory mechanism. While we reported multiple differences, further investigation through functional and electrophysiological experiments is necessary to establish the biologically relevant effects of these changes. Finally, future studies could use a double RNF13 mutant to provide valuable insights. This might confirm shared molecular pathways between the RING and the dileucine domains, affecting dendritic and synaptic determinants. Overall, this study provides the first insights into the impact of DEE73-associated genetic variants of RNF13 on neurons.

CHAPITRE 5
ARTICLE 4

RNF13 IS A NOVEL INTERACTOR OF IDURONATE 2-SULFATASE THAT MODIFIES ITS GLYCOSYLATION AND MATURATION

Valérie C. Cabana [1, 2, 3], Antoine Y. Bouchard [1, 2, 3], Audrey M. Sénécal [1, 2, 3], Laurent Cappadocia [1, 2, 3] and Marc P. Lussier [1, 2, 3, *]

[1] Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada.

[2] Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC), Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada.

[3] Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), Montréal, QC, Canada.

[*] Corresponding author: Marc P. Lussier, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Faculté des sciences, Case postale 8888, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada. Tel. (514) 987-3000 ext 5591; Fax (514) 987-4054; E-mail: lussier.marc@uqam.ca.

Research article submitted in *The FEBS Journal*, 2025. Manuscript# FJ-25-09-04.R1.

Contributions des auteurs:

Valérie C. Cabana a contribué au support financier, conceptualisé l'étude et l'article, performé les expériences, fait l'analyse des données, le montage des graphiques et des figures, interprété les résultats et rédigé l'article.

Audrey M. Sénécal a contribué au support financier et performé les analyses préliminaires d'AlphaFold.

Antoine Y. Bouchard a performé les analyses, les figures et la rédaction pour la section AlphaFold.

Laurent Cappadocia a révisé et supervisé la réalisation de la section AlphaFold et contribué au support financier.

Marc P. Lussier a encadré et supervisé le projet, a révisé le manuscrit et contribué au support financier.

Tous les auteurs ont lu et approuvé la publication de la verison finale de l'article.

Footnotes

Acknowledgements: This work was completed as part of the requirements for V.C.C.'s PhD thesis at the *Université du Québec à Montréal*.

Funding: The *Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois* (CERMO-FC) funded this study via its graduate scholarship *Félix-Antoine Aublet Research Grant* awarded to V.C.C. and A.M.S. in 2023. PhD graduate scholarship from *Le Fonds de recherche du Québec – Nature et Technologies* were awarded to V.C.C. (DOI: doi.org/10.69777/326578) and A.Y.B. (DOI: doi.org/10.69777/317082).

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interest. Funding sources had no role in study design or, data collection, analysis, or interpretation.

Running title: RNF13 alters IDS glycosylation.

Abbreviations: AP, Adaptor protein; CHX, Cycloheximide; CQ, Chloroquine; DN, Dominant negative; DR, Disordered region; DsiRNA, Dicer-substrate small interfering RNA; EGAD, Endosome and Golgi-associated degradation; Endo H, Endoglycosidase H; ER, Endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated degradation; GAG, Glycosaminoglycan; IDS, Iduronate 2-sulfatase; Lamp1, Lysosomal-associated membrane protein 1; M6P, Mannose-6-phosphate; MPR, M6P receptor; MOC, Manders' overlap coefficient; MPS II, Mucopolysaccharidosis type II; MW, Molecular weight; PA, protease-associated; PNGase F, Peptide:N-glycosidase F; RING, Really Interesting New Gene; SD, Subdomain; Tg, Thapsigargin; TGN, Trans-Golgi network; TM, Transmembrane; Tn, Tunicamycin.

5.1 Résumé

La mucopolysaccharidose de type II, également connue sous le nom de syndrome de Hunter, est une maladie rare et mortelle causée par des mutations du gène codant pour l'enzyme iduronate 2-sulfatase (IDS). Les protéines variantes causant une déficience d'activité enzymatique conduisent à une accumulation pathologique de glycosaminoglycanes dans les lysosomes, provoquant un dysfonctionnement de plusieurs organes. L'IDS est exprimée comme une protéine précurseur et ses modifications post-traductionnelles et son ciblage lysosomal sont essentiels pour son activité enzymatique. Cependant, la dynamique intracellulaire d'IDS est mal comprise et une meilleure compréhension de ses mécanismes de modifications serait bénéfique au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. AlphaFold 3 a prédit une interaction entre IDS et l'ubiquitine E3 ligase RNF13. Des expériences de co-immunoprécipitation confirme cette interaction et révèlent que RNF13 interagit préférentiellement avec une forme immature d'IDS principalement peu glycosylée, ce qui entraîne une altération de la glycosylation et de la maturation d'IDS. Les résultats démontrent que le site de glycosylation Asn246 d'IDS est important pour le ciblage lysosomal, bien que sa glycosylation ne soit pas altérée par RNF13. Cette étude révèle également que RNF13 forme un hétérodimère avec l'ubiquitine E3 ligase RNF167, ce qui modifie le trafic lysosomal de RNF13 et RNF167. De plus, l'hétérodimère interagit et altère IDS différemment de RNF13 ou RNF167 seuls. L'activité catalytique de l'E3 ligase de RNF13 est nécessaire à la génération d'une forme peu glycosylée, mais pas celle de RNF167. Cette étude révèle que le protéasome dégrade rapidement les formes peu glycosylées d'IDS et que RNF13 exerce un effet protecteur. Dans l'ensemble, cette étude révèle un nouveau et double rôle de RNF13 sur la maturation et la dégradation d'IDS, offrant des informations mécanistiques sur le trafic d'IDS.

Mots-clés : RNF13, Iduronate 2-sulfatase, Mucopolysaccharidose de type II, Glycosylation, Dégradation protéasomale

5.2 Abstract

Mucopolysaccharidosis type II, also known as Hunter syndrome, is a rare and fatal disease caused by mutations in the *iduronate 2-sulfatase (IDS)* encoding gene. Enzymatically inactive IDS variants lead to pathological accumulation of glycosaminoglycans in lysosomes, resulting in dysfunction of multiple organs. IDS is expressed as a precursor protein, and its proper processing and lysosomal targeting are crucial for enzymatic activity. However, the intracellular dynamics of IDS remain poorly understood, and a better understanding of its processing mechanisms would benefit the development of new therapeutic strategies. AlphaFold 3 predicted an interaction between IDS and the E3 ubiquitin ligase RNF13. Co-immunoprecipitation assays confirmed this interaction and further revealed that RNF13 preferentially interacts with a predominantly underglycosylated immature form of IDS, leading to altered IDS glycosylation and maturation. The results demonstrate that IDS glycosylation site Asn246 is important for lysosomal targeting, although its glycosylation is not altered by RNF13. Importantly, this study demonstrates that RNF13 forms a heterodimer with the E3 ubiquitin ligase RNF167, which modulates the lysosomal trafficking of both proteins. In addition, the heterodimer interacts and alters IDS processing differently than RNF13 or RNF167 alone. RNF13 catalytic E3 ligase activity is required to generate an underglycosylated form, but not that of RNF167. This study shows that the proteasome rapidy degrades IDS underglycosylated forms, and RNF13 exerts a protective effect. Overall, this study reveals a novel and dual role of RNF13 on IDS maturation and degradation, providing mechanistic insights into IDS trafficking.

Keywords: RNF13, Iduronate 2-sulfatase, Mucopolysaccharidosis type II, Glycosylation, Processing, Proteasomal degradation

5.3 Introduction

Mucopolysaccharidosis II (MPS II), also known as Hunter syndrome, is a rare lysosomal storage disease caused by mutations in the *iduronate-2-sulfatase (IDS)* gene. IDS is an enzyme required for the lysosomal degradation of heparan sulfate and dermatan sulfate of glycosaminoglycans (GAGs) (D'Avanzo *et al.*, 2020). Enzyme deficiency leads to the progressive accumulation of GAGs, resulting in multisystemic dysfunction, with approximately two-thirds of patients exhibiting neurological impairment (Zanetti et Tomanin, 2024). While enzyme replacement therapy is currently the standard of care, it shows minimal to no effect on bones, heart or neurological symptoms, supporting the need for new therapeutic strategies (Parini et Deodato, 2020).

IDS protein is expressed as a precursor protein of 550 amino acids, with a signal peptide, and eight N-linked glycosylation sites (Fig. 5.1A) (Demydchuk *et al.*, 2017). Protein synthesis occurs in the endoplasmic reticulum (ER) as a 75 kDa glycosylated precursor, while removal of the glycosylation, an important mechanism in the proteasomal degradation of glycoproteins in the ER (Patel *et al.*, 2020), would lead to an approximately 60 kDa IDS precursor form (Fig. 5.1B-C) (Verma *et al.*, 2021). During its maturation in the Golgi, it is subjected to further glycosylation and phosphorylation to create mannose-6-phosphate (M6P) moieties recognized by M6P receptors (MPRs) in the trans-Golgi Network (TGN), leading to a 90 kDa form (Fig. 5.1D) (Verma *et al.*, 2021). Subsequent lysosomal proteolytic cleavage separates the 55 kDa mature N-terminal subdomain 1 (SD1) and the 18 kDa C-terminal subdomain 2 (SD2) (Fig. 5.1E) (Verma *et al.*, 2021). Both domains are stably associated to form an enzymatically competent complex (Demydchuk *et al.*, 2017). MPS II-causing variants have been reported to impair proteolytic cleavage, precluding IDS maturation and enzymatic activity (Marazza *et al.*, 2020; Osaki *et al.*, 2018). A variant with an attenuated phenotype of the disease was shown to regain some enzymatic activity if translocation to the lysosomes was improved (Osaki *et al.*, 2018). However, our knowledge on the trafficking pathways regulating IDS lysosomal targeting is still limited, and a better understanding would benefit the development of new therapeutic target.

For soluble proteins such as IDS to be transported in the endolysosomal system, they need to be recognized by a specific receptor and bind to its luminal side. For instance, the luminal side of MPRs recognize IDS glycosylation state, while the receptors bind and are trafficked by AP-1, one of the adaptor protein (AP) complexes, the main regulators of post-Golgi trafficking pathway (Robinson *et al.*, 2024). Although it is not known if AP-1 regulated IDS trafficking, AP-1 and AP-3 are responsible for recognizing specific sorting signals on cytoplasmic tails of transmembrane proteins for late endosomal and lysosomal targeting (Dell'Angelica et Bonifacino, 2019; Sanger *et al.*, 2019). In addition, one of the subunit of the AP-3 complex is reported on the BioGRID database to interact with IDS (Huttlin *et al.*, 2017; Huttlin *et al.*, 2015), but not

AP-1, which could suggest an alternate and unknown trafficking pathway. Intriguingly, we have previously shown that trafficking of RNF13, an ubiquitin E3 ligase whose function is associated with ER stress, various form of autophagy, and protein degradation and localization (Arshad *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2024b; Miyakawa *et al.*, 2022), is regulated by AP-1 and AP-3 that recognizes motifs in its C-terminal (Fig. 2.6; 3.7) (Cabana *et al.*, 2021; Cabana *et al.*, 2024). Furthermore, RNF13 variants that alter the lysosomal localization of the protein cause a severe neurodegenerative disease, with some symptoms overlapping with those of MPS II (Fig. 2.1) (Cabana *et al.*, 2021; Edvardson *et al.*, 2019; Taylor *et al.*, 2023). RNF13 possesses a luminal protease-associated (PA) domain, a transmembrane (TM) domain, and a cytosolic Really Interesting New Gene (RING) domain, making it a member of the PA-TM-RING family (Cabana et Lussier, 2022). While multiple functions have been recently reported for its cytosolic E3 ligase function (Cabana et Lussier, 2025; Lin *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2024b; Miyakawa *et al.*, 2022), knowledge on the function of its luminal PA domain remains limited, except that the plant ortholog of RNF13 use this domain to bind soluble proteins in the ER and transport them to the vacuole (Park *et al.*, 2005).

In this study, AlphaFold 3 was used to predict whether RNF13 could be involved in IDS trafficking to the endolysosomal pathway. This study demonstrates, using co-immunoprecipitation assays, that RNF13 interacts with a precursor form of IDS that is predominantly deglycosylated. Unexpectedly, it reveals that RNF13 alters IDS glycosylation, changes its maturation, and increases the abundance of an underglycosylated precursor form. To control that IDS alterations caused by RNF13 are specific, a second PA-TM-RING E3 ligase, RNF167, was used. Both RNF13 and RNF167 exerts different effects on IDS, and the combination further increases the underglycosylated form of IDS. Our study reveals that RNF13 and RNF167 heterodimerize, but only the E3 ligase activity of RNF13 is required to induce the underglycosylated form, which is normally rapidly degraded by the proteasome but is protected by RNF13. Our study provides new insights into IDS maturation and opens up new avenues for a deeper understanding of MPS II pathophysiology.

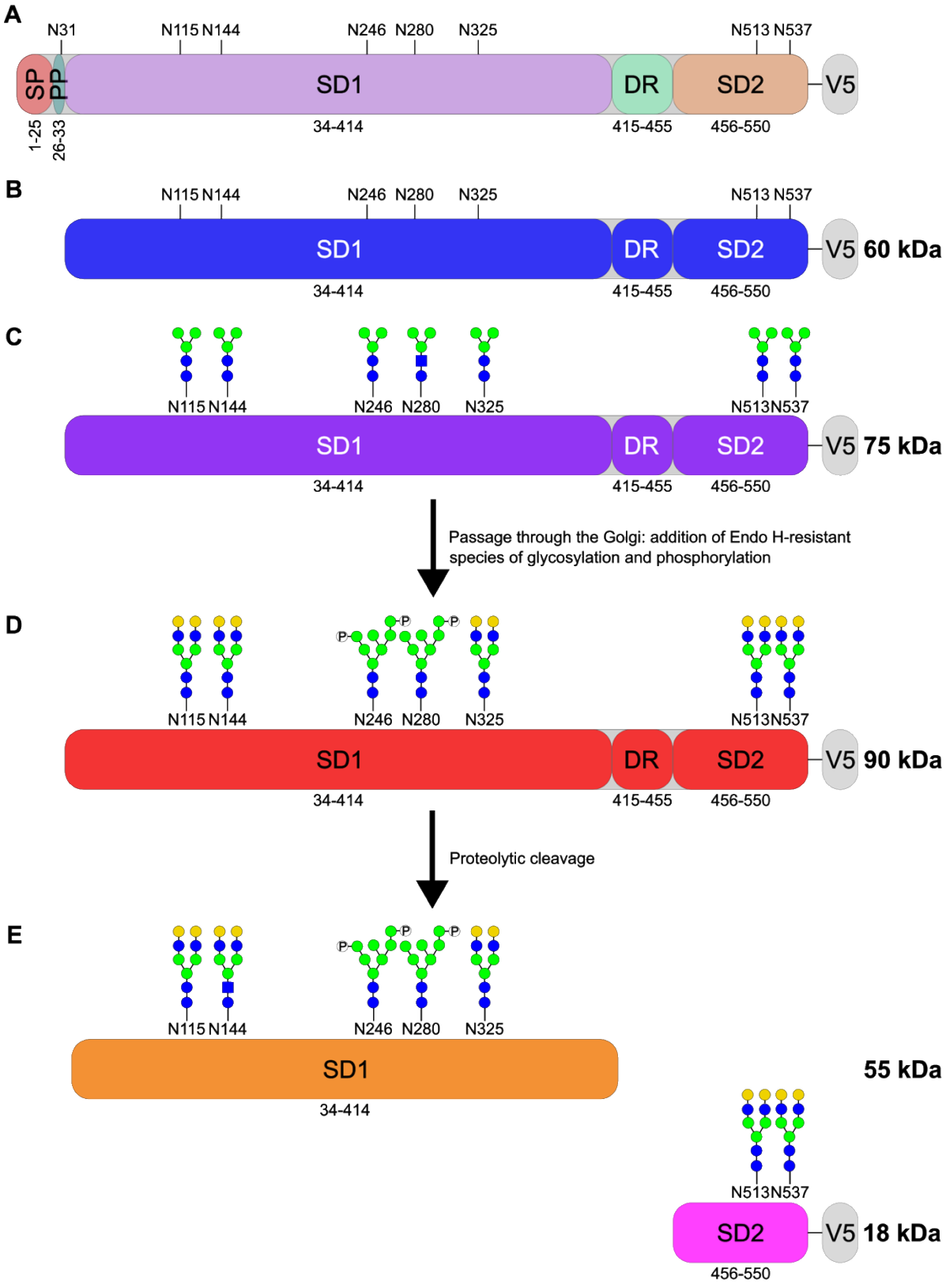


Figure 5.1: Schematic of IDS different forms based on the maturation and processing.

(**A**) The complete protein is 550 amino acids long and contains a signal peptide (SP), a propeptide (PP), a N-terminal subdomain 1 (SD1), a disordered region (DR), a C-terminal subdomain 2 (SD2), and eight N-glycosylation sites. (**B-C**) The precursor form is (**B**) 60 kDa without any N-glycosylation (blue) and (**C**) 75 kDa with the N-glycosylation added in the ER (in purple). (**D**) Further processing in the Golgi adds complex (N115, N144, N325, N513, N537) or high mannose types that are phosphorylated (N246, N280), leading to the 90 kDa form (in red). (**E**) The mature form is obtained after proteolytic cleavage, where the SD1 (in orange) and SD2 (in pink) domains are separated. (**A-E**) In this study, a V5 tag was added at the C-terminus and used to distinguish the different processed forms.

5.4 Materials and Methods

5.4.1 Antibodies

The following antibodies were used: purified anti-HA.11 rabbit polyclonal (WB and IF: 1:1,000, BioLegend Cat# 902302, RRID:AB_2565018), purified mouse monoclonal anti-HA.11 (IF: 1:1,000, BioLegend Cat# 901503, RRID:AB_2565007), rabbit anti-GFP (WB: 1:1000, ThermoFisher Scientific Cat# A6455, RRID:AB_221570), rabbit monoclonal anti-V5 (WB and IF: 1:1,000, Cell Signaling Technology Cat# 13202, RRID:AB_2687461), mouse monoclonal anti-V5 (WB: 1,5000, Invitrogen Cat# R960-25, RRID:AB_2556564), mouse monoclonal anti-IDS (WB and IF: 1:1,000, Thermo Fisher Scientific Cat# MA5-25855, RRID:AB_2723262), rabbit anti-RNF13 (WB: 1:500, Cusabio Technology LLC, Cat# MA5-25855, RRID:AB_2556564), rabbit anti-RNF167 (Custom antibody, see (Lussier *et al.*, 2012)), rabbit monoclonal anti-IRE1α (WB: 1:500, Cell Signaling Technology Cat# 3294, RRID:AB_823545), rabbit anti-Lamp1 (IF: 1:500, New England Biolabs Ltd., Cat# 9091, RRID:AB_2687579), AlexaFluor Plus 405-conjugated goat anti-rabbit (1:250, Thermo Fisher Scientific Cat# A48254, RRID:AB_2890548), AlexaFluor Plus 647-conjugated goat anti-mouse (1:1,000, Thermo Fisher Scientific Cat# A32728, RRID:AB_2633277), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse (1:10,000, Cell Signaling Technology Cat# 7076, RRID:AB_330924) and HRP-conjugated goat anti-rabbit (1:10,000, Cell Signaling Technology Cat# 7074, RRID:AB_2099233).

5.4.2 Molecular biology

The wild-type, full-length human RNF13 transcript variant 1 (accession NM_007282.4) cDNA was synthesized (GenScript, Piscataway, NJ, USA) in pUC57 vector and used as template for generating the DN variant C258A/H260A via site-directed mutagenesis. RNF13 cDNAs were then excised from plasmids using standard enzymatic restriction strategies and cloned into the NheI and XhoI sites of the pCAGGS-IRES-mCherry vector. HA- and EYFP-tagged human RNF167 were previously described (Lussier *et al.*, 2012). For the immunofluorescence assays with RNF167 and Lamp1, the pUC57 vector was used as a

template to generate an optimized Kozak (AACGAC) sequence to the insert encoding the RNF13-GFP fusion protein. Wild-type, full-length human IDS transcript variant 1 (accession NM_000202.8) cDNA was synthesized (GenScript, Piscataway, NJ, USA) and then cloned into pcDNA3.1(+) using HindIII and XhoI. This construct served as template to generate protein variant N246Q via site-directed mutagenesis. The plasmids were confirmed by Sanger sequencing (Genome Quebec, Montreal, QC, Canada).

5.4.3 Cell culture and transfection

HEK293T/17 (American Type Culture Collection (ATCC), Gaithersburg, Cat# CRL-11268) and HeLa (from Dr. Diana Averill, Montreal) cells were cultured at 37°C with a humidified atmosphere containing 5% CO_2. No antibiotics were used for maintaining the cell lines in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Cat# 11995-065) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Wisent, Cat# 090150). Cells were not recently authenticated nor tested for mycoplasma contamination. For biochemical assays, 6-well plates were treated with 0.1 mg/mL poly-D-lysine (Sigma-Aldrich, Cat# P7280) for at least 30 minutes at room temperature. For immunofluorescence assays, 24-well plates containing a 12 mm round glass coverslip #1.5 (UltiDent Scientific Inc., St-Laurent, QC, Canada, Cat# 170-C12MM) were treated with poly-D-lysine overnight at 37°C. For 6-well plates, 2 µL of LipofectAMINE 2000 transfection reagent diluted in 250 µL Extreme MEM was added to a total of 1 µg DNA plasmid (0.5 µg IDS + 0.5 µg RNF13 or 0.4 µg IDS + 0.4 µg RNF13 + 0.2 µg RNF167) diluted in 250 µL Extreme MEM in one well. The mixture was incubated for 20 mins at room temperature before HEK293T/17 cells (0.8×10^6) were diluted in 1.5 mL of culture medium and added to the mixture. For 24-well plates, the volumes and quantities were scaled down by a factor of 5 from those used for 6-well plates. Transfected cells were maintained at 37°C with 5% CO_2 for 48 hours before being lysed or fixed. For HeLa cells, a mixture containing 0.4 µg of total plasmid DNA and 250 mM $CaCl_2$ was added dropwise to an equal volume of 2X Hanks' Balanced Salt Solution to form a calcium phosphate-DNA precipitate. After a 20 mins incubation at room temperature, the calcium-DNA complexes were added to the cells and incubated for 24 hours. When required, to induce ER stress, cells were incubated at 37°C with 5% CO_2 with 1 µg/mL tunicamycin (Cayman Chemical, Cat #11445) or DMSO for 3 hours before adding 0.5 µM thapsigargin (Cayman Chemincal, Cat #10522) or DMSO for 1 hour. To inhibit protein synthesis, cells were incubated at 37°C with 5% CO_2 with 25 µg/mL cycloheximide (Sigma-Aldrich, Cat# C1988) or DMSO for 30 minutes before adding either 20 µM MG132 (UBPBio, Cat# F1101) or DMSO to inhibit proteasomal degradation or 50 µg/mL chloroquine (Sigma-Aldrich, Cat# C6628) or water to inhibit lysosomal degradation for 4 hours.

5.4.4 RNF13 and RNF167 knockdown

The TriFECTa Dicer Substrate duplex RNAi kit against human RNF13 (#1: (#1: 5'-rGrGrUrGrArArUrCr-ArUrCrArGrCrUrArA-3' and 5'-rUrCrArGrArGrArGrArArUrUrArGrCrUrGrArU-3', and #3: 5'-rCrGr-ArCrArUrUrGrArGrGrUrArC-3' and 5'-rGrUrArGrUrArCrCrUrCrArArUrG-3') and human RNF167 (#1: 5'-rArArCrUrUrUrGrArCrCrUrCrArArGrGrUrC-3' and 5'-rCrArUrUrUrArGrGrArCrCrUrUrGrArGrGr-U-3', #2: 5'-rUrCrGrArCrUrUrArCrCrArArArGrArGrCrA-3' and 5'-rUrUrUrCrArGrUrUrGrCrUrCrUr-UrUrGrGrU-3') was purchased from IDT. The negative control scramble DsiRNA (cat. #DSNC1) was used. Briefly, 2 uL of LipofectAMINE 2000 transfection reagent diluted in 250 uL Extreme MEM was added to a total of 10 nM DsiRNAs diluted in 250 uL Extreme MEM. The mixture was incubated for 20 mins at room temperature and added to the cells. For HeLa cells, the mixture was added to cells that had been seeded two hours prior to transfection. For HEK293T/17 cells, the cells were seeded directly into wells containing the transfection mixture. For assays with IDS-V5, the cells were incubated for 48h and were then split to be transfected with the appropriate plasmids as described above. Cells were incubated for another 24 hours, for a total of 72 hours of DsiRNA transfection.

5.4.5 Cell lysis and co-immunoprecipitation assays

Cells were washed two times with PBS and lysed in 1 mL (HEK293T/17) or 400 µL (HeLa) ice-cold lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate) containing 1x EDTA-free protease inhibitor cocktail (Bimake.com, Houston, TX, USA, B14001). Lysates were incubated at 15 rpm for 20 mins at 4°C, the centrifuged at 21,000g for 15 mins. For co-immunoprecipitation to detect the different form using anti-IDS, 600 µL of total lysate was agitated at 15 rpm for 2h at 4°C with 1 µg of purified anti-HA.11 rabbit polyclonal (BioLegend, Cat# 902302) and 10 µL of Protein A/G Plus-Agarose resin (Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc-2003) pre-equilibrated in lysis buffer. Washes were performed with lysis buffer before proteins were eluted in 2X Laemmli buffer and boiled for 5 mins at 95°C. 80% of the volume of the immunoprecipitations was loaded onto SDS-PAGE for separation and dectection using the IDS antibody, while 20% was used for detection with anti-HA. For co-immunoprecipitation to detect the V5 tag, 600 µL of total lysate was agitated at 15 rpm for 2h at 4°C with 10 µL of anti-HA magnetic beads (Bimake.com, Cat# B26201) pre-equilibrated in lysis buffer. After washing with the lysis buffer, proteins were eluted with 1X Laemmli buffer and boiled for 5 mins at 95°C. 90% (Fig. 5.2L) or 40% (Fig. 5.4B and Fig. 5.10B) of the immunoprecipitated complexes were loaded onto SDS-PAGE for separation and subsequent detection using the V5 antibody, while 10% (Fig. 5.2L) or 20% (Fig. 5.4B and Fig. 5.10B) was detected with anti-HA. For co-immunoprecipitation with RNF13/RNF167/IDS, 400 uL of total lysate was agitated at 15 rpm for 2h at 4°C with either 10 uL of anti-HA magnetic beads or with 10 uL of GFP-Catcher beads (Antibodies-online Inc., Limerick, PA, USA, Cat# ABIN5311508) pre-equilibrated

in lysis buffer. After washing with the lysis buffer, proteins were eluted with either 1X (anti-HA beads) or 2X (GFP-Catcher beads) Laemmli buffer and boiled for 5 mins at 95°C. 40% of the volume of the reactions was detected using the anti-V5 and anti-GFP (IP HA) or anti-HA (IP GFP), while 20% was detected with the anti-HA (IP HA) or anti-GFP (IP GFP). For co-immunoprecipitation to detect endogenous RNF13, 600 µL of total lysate was agitated at 15 rpm for 2h at 4°C with 2 µL of mouse monoclonal anti-V5 (Invitrogen, Cat# R960-25) and 10 µL of Protein A/G Plus-Agarose resin (Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc-2003) pre-equilibrated in lysis buffer. Washes were performed with lysis buffer before proteins were eluted in 2X Laemmli buffer and boiled for 5 mins at 95°C. 90% of the immunoprecipitation was detected using the anti-RNF13, while 10% was detected with the V5 antibody.

5.4.6 Glycosylation assays

45 µL of whole cell lysates were incubated at 100°C for 10 minutes in 1X Glycoprotein Denaturing Buffer (New England Biolabs, Cat# P0703). Subsequently, the proteins were digested with either 1,000 U of Endo Hf in 1X GlycoBuffer 3 (New England Biolabs, Cat# P0703) or 500 U of PNGase F in 1X GlycoBuffer 2, which was supplemented with 1% NP-40 (New England Biolabs, Cat# P0704). The digestions were performed overnight at 37°C, after which the reactions were stopped by adding Laemmli buffer. These samples were separated into three distinct SDS-PAGE gels. For the treatment of co-immunoprecipitated protein, the immunoprecipitation was performed as described above. Immunopurified proteins were incubated at 100°C for 10 minutes in 1X Glycoprotein Denaturing Buffer and digested with 500 U of EndoHf in 1X GlycoBuffer 3 overnight at 37°C, before being stopped with Laemmli buffer. 2/3 of the volume of the reactions were loaded on SDS-PAGE for separation to detect using the anti-V5 while 1/3 was detected with the anti-HA.

5.4.7 SDS-PAGE and Western Blot

For the glycosylation assay only, protein samples were separated on a 1.0 mm Criterion TGX Precast Gel Any kD (BioRad, Cat# 5671124). Otherwise, protein samples were separated on a 1.5 mm SDS-PAGE gel containing 0.5% of 2,2,2-trichloroethanol (TCE). Proteins were transferred to a 0.45 µm PVDF membrane using the Bio-Rad Trans-Blot Turbo system (7 mins for 1.0 mm; 10 mins for 1.5 mm, constant 2.5 A, 25V). Proteins on both gels and membranes were then visualized using the stain-free mode of the ChemiDoc MP imaging System (Bio-Rad) and Bio-Rad Image Lab software (except for the precast gels that did not contain TCE). Non-specific sites were blocked using 5% skim milk in TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 0.3 % Tween-20) for 1h at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBS-T supplemented with 0.05 % NaN_3. The membranes were washed three times with TBS-T before being incubated for 1h at room temperature with HRP-conjugated secondary

antibodies diluted in TBS-T. Immune complexes were revealed using the Clarity Western ECL substrate (BioRad, Cat# 1705060). The ChemiDoc MP imaging system was used to acquire the chemiluminescent signal using automatic time exposure to detect intense bands (short exposure) or automatic time exposure to detect faint bands and/or manual time exposure mode (long exposure). The acquisitions were performed using the Chemi protocol unless otherwise specified with exposure times indicated directly on the figures. The Chemi Hi Sensitivity (HiS) or Chemi Hi Resolution (HiR) protocols were sometimes used to enhance acquisition quality and are indicated accordingly in the figures.

5.4.8 Protein abundance and statistical analysis

The relative abundance of different IDS forms from immunoblots was analyzed using short exposure. As IDS immunoblots revealed some mature glycosylated forms and underglycosylated immature forms at similar MW, the quantifications were performed on the anti-V5 immunoblots. The mature and precursor forms were detected using the anti-IDS, which detected only the N-terminal SD1. The band signal obtained by immunoblotting against V5 or IDS was normalized against the corresponding stain-free lane, and the results were then normalized against the appropriate control lane. Three independent, non-blinded experiments were performed for all assays. Datasets were exported as a CSV file and collected in Microsoft Excel before being subjected to statistical analysis in GraphPad Prism 10. Parametric tests were used due to the Gaussian distribution of the data. When two groups were compared, statistical difference was determined using a two-tailed paired t-test. When multiple groups with one grouping variable were compared, statistical difference was determined by a repeated measures one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. When multiple groups with two grouping variables were compared, statistical difference was determined using a repeated measures two-way ANOVA with uncorrected Fisher's Least Significant Difference (LSD) or Dunnett's multiple comparisons test to compare means with others in its row and its column.

5.4.9 Immunostaining

Transfected HEK293T/17 or HeLa cells were washed three times in PBS before being fixed for 15 mins with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Cat# 15710) and 4% sucrose in PBS at 37°C (HEK293T/17) or room temperature (HeLa). Fixed cells were washed three times and permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS for 15 mins at room temperature. Non-specific sites were blocked using a blocking solution composed of 10% normal goat serum (NGS) (+ 0.1% Triton X-100 for HEK293T/17 cells) in PBS for 1 hour. Subsequent staining was performed by incubating with primary antibodies diluted in 5% NGS (+ 0.05% Triton X-100 for HEK293T/17 cells) in PBS overnight at 4°C (HEK293T/17) or 1h at room temperature (HeLa). Coverslips were washed three times with PBS, followed by incubation with the

appropriate conjugated secondary antibodies diluted in 5% NGS (+ 0.05% Triton X-100 for HEK293T/17 cells) in PBS for 1 hour at room temperature. After being washed in PBS, the coverslips were mounted using ProLong Diamond Antifade (Thermo Fisher Scientific Cat# P36961) and allowed to dry for 2 hours at 37°C. The mounted coverslips were then stored at 4°C until image acquisitions were performed.

5.4.10 Fluorescence microscopy image acquisition

Image acquisition was carried out using an inverted Olympus IX83 epi-fluorescence microscope equipped with a U plan S-Apo 60x / 1.35 numerical aperture oil objective (Olympus), an X-Cite Xylis 365 LED-based illumination source (Excelitas Technologies Corp.), and a Zyla 4.2 Plus sCMOS camera (Andor). The filters and dichroic mirror employed by this widefield system have been thoroughly described in section 3.4.7 (Cabana *et al.*, 2024). Image acquisition was facilitated by using the Olympus CellSens Dimension software version 2.2 (Olympus, RRID: SCR_014551). The resolution was set at 2048 x 2048 pixels, and z-stack images were captured at 0.27 µm intervals for 8 to 10 optical slices. Lamp intensity and exposure time were configured to maximize signal intensity without reaching saturation and maintained constant within an independent experiment. Prior to analysis, deconvolution was performed on the images using the Olympus 3D Deconvolution feature in the Olympus CellSens Dimension software.

5.4.11 Image analysis and statistical analysis

Colocalization assays were analyzed as previously described (section 3.4.7) (Cabana *et al.*, 2024). Three independent, non-blinded experiments were performed for all assays. The resulting image analysis datasets were exported to a CSV file and collected in Microsoft Excel before being undergoing statistical analysis in GraphPad Prism 10. Due to the Gaussian distribution of the data, parametric tests were used. When two groups were compared, statistical significance was determined using a two-tailed paired t-test. When multiple groups with one grouping variable were compared, statistical significance was determined by a repeated measures one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. When multiple groups with two grouping variables were compared, statistical difference was determined using repeated measures two-way ANOVA with uncorrected Fisher's LSD multiple comparisons test to compare means with others in its row and its column.

5.4.12 Predicted structure

The structure of the complexes formed by RNF13 (Uniprot accession O43567), RNF167 (Uniprot accession Q9H6Y7) and IDS (Uniprot accession P22304) and its glycosylated form were modeled using the AlphaFold 3 server (Abramson *et al.*, 2024). The RNF13–IDS complex was visualized using the PyMOL

Molecular Graphics System, Version 3.1 Schrödinger, LLC. The models were submitted in ModelArchive (www.modelarchive.org) with the accession codes ma-umxum (Fig. 5.2A), ma-qhveu (Fig. 5.2B), ma-4nek1 (Fig. 5.4A) and ma-3zw1x (Fig. 5.8H) (Tauriello *et al.*, 2025).

5.5 Results

5.5.1 RNF13 interacts with IDS, altering its glycosylation and maturation

To better understand IDS's trafficking, we analyzed the BioGRID database of protein-protein interaction and found that one of the AP-3 complex subunits is reported to interact with IDS (Huttlin *et al.*, 2017; Huttlin *et al.*, 2015). AP-3 is responsible for the trafficking of transmembrane proteins towards the lysosomes (Park et Guo, 2014). However, IDS is soluble in the ER lumen and would thus need to interact with a receptor. As the RNF13 plant ortholog is a reported sorting receptor that transports soluble proteins from the Golgi to the vacuole (Park *et al.*, 2005), we wondered if human RNF13 might mediate similar functions on IDS. Using AlphaFold 3, a predicted interaction was identified between the precursor form of IDS and RNF13. The predicted model shows that RNF13 PA domain engages residues that are restricted to the SD1 portion of IDS (Fig. 5.2A). The aliphatic portion of IDS residues Pro243, Glu245 and Asn246 stack against the walls of a hydrophobic cavity formed, in part, by the aliphatic part of Asn103, Phe104, and Ile130 of RNF13 (Fig. 5.2A). IDS Glu245 forms a hydrogen bond with the main chain amine of Arg99 while simultaneously forming salt bridges with the side chain of Arg99. IDS Asn246 interacts with the main chain of RNF13 Ser131 and Gly133. RNF13 Arg54 interacts with the main chain of Lys57 and Leu58 as well as the side chain of Arg60 in IDS. In turn, IDS Arg60 interacts with the side chain of RNF13 Ser131. Finally, RNF13 Asn135 forms hydrogen bonds with the main chain of Thr248 as well as the side chains of Thr248 and Glu245 in IDS (Fig. 5.2A). To better understand the consequences of IDS processing on this interaction, AlphaFold 3 was used with RNF13 and the N-terminal SD1 and C-terminal SD2 as separate proteins to mimic IDS enzymatically competent complex. This alteration changes the prediction to a model where RNF13 interacts with the hydrophobic portion of the SD2 fragments (Fig. 5.2B). Specifically, Ile36, Leu66 and the aliphatic parts of Tyr41 and Tyr43 of SD2 are both stabilized by Asn43 and Tyr164 of RNF13, respectively, the latter forming a hydrogen bond (Fig. 5.2B).

IDS/RNF13 interaction was experimentally validated using co-immunoprecipitation from HEK293T/17 cell lysates expressing RNF13-HA and IDS-V5 proteins. An anti-IDS immunoblot revealed the presence of a ~65 kDa band in the anti-HA immunopurified protein complex (Fig. 5.2C). RNF13 exogenous expression led to important modifications in the IDS bands pattern in the lysate. Specifically, the abundance of IDS precursor glycosylated form is significantly increased while also presenting a slight change in molecular

weight (MW) that could indicate the loss of a glycosylation site (purple arrow; Fig. 5.2C-D). In comparison, the mature form is significantly less abundant, while the MW is restablish to that of IDS alone (orange arrow; Fig. 5.2C, E). When comparing both forms, exogenous RNF13 increased IDS precursor proportion from 58% to 89% (Fig. 5.2F). The deglycosylated precursor form of IDS is around 60 kDa and some species of IDS glycosylated mature form have similar MW (smear extending up to ~65 kDa; Fig. 5.2C) (Osaki *et al.*, 2018; Verma *et al.*, 2021). To distinguish the different forms, a V5-tag was added onto the C-terminal, enabling detection of precursor and C-terminal-containing fragments, but not mature form, which lacks this region after cleavage (Fig. 5.1E). To confirm which IDS form interacts with RNF13, co-immunoprecipitation experiments using anti-HA were performed in HEK293T/17 cell lysates (Fig. 5.2G). Endoglycosidase H (Endo H) digestion of the immunopurified complex revealed an IDS band, detected by anti-V5, around 62 kDa and a faint band around 68 kDa, while the non-digested sample showed two bands around 65 kDa and a smear extending up to 75 kDa, suggesting that it is predominantly deglycosylated but not completely (hereafter referenced as an underglycosylated form) precursor form containing the V5-tag. Unlike the subtle changes observed for IDS, RNF13 exhibited a sharp change in MW and band intensity (Fig. 5.2G), confirming efficient Endo H digestion as previously shown (Fig. 3.4I) (Cabana *et al.*, 2024). Interestingly, a small quantity of a C-terminal fragment of IDS is also detected in the immunopurified complex, even if this form is barely present in the lysate (pink arrows; Fig. 5.2G). Furthermore, IDS underglycosylated precursor form was barely detectable when IDS was expressed alone, in contrast to when exogenous RNF13 was present (Fig. 5.2C, G). While the underglycosylated form (blue arrow; Fig. 5.2G) increased significantly, the 90 kDa form (red arrow; Fig. 5.2G) decreased when RNF13 was co-expressed (Fig. 5.2H-J). To estimate the amount of IDS-V5 immunoprecipitated with RNF13, 90% of the anti-HA-purified complex was compared to 1% of the input (Fig. 5.2K). Only a minor portion of the underglycosylated form associates with RNF13, suggesting a transient interaction during the process leading to the generation of this species (Fig. 5.2K). To assess this interaction in a more physiological context, anti-V5 immunoprecipitations were performed with lysates from HEK293T/17 cells expressing IDS-V5. Endogenous RNF13 was detected in the immunopurified complexes (cyan arrow; Fig. 5.2L), and the enriched RNF13 appeared underglycosylated, with a MW close to the predicted 43 kDa (cyan arrow; Fig. 5.2L). Overall, our results suggest that RNF13 interacts with a predominantly underglycosylated precursor form of IDS and, to some extent, a C-terminus fragment, and alters IDS glycosylation and maturation.

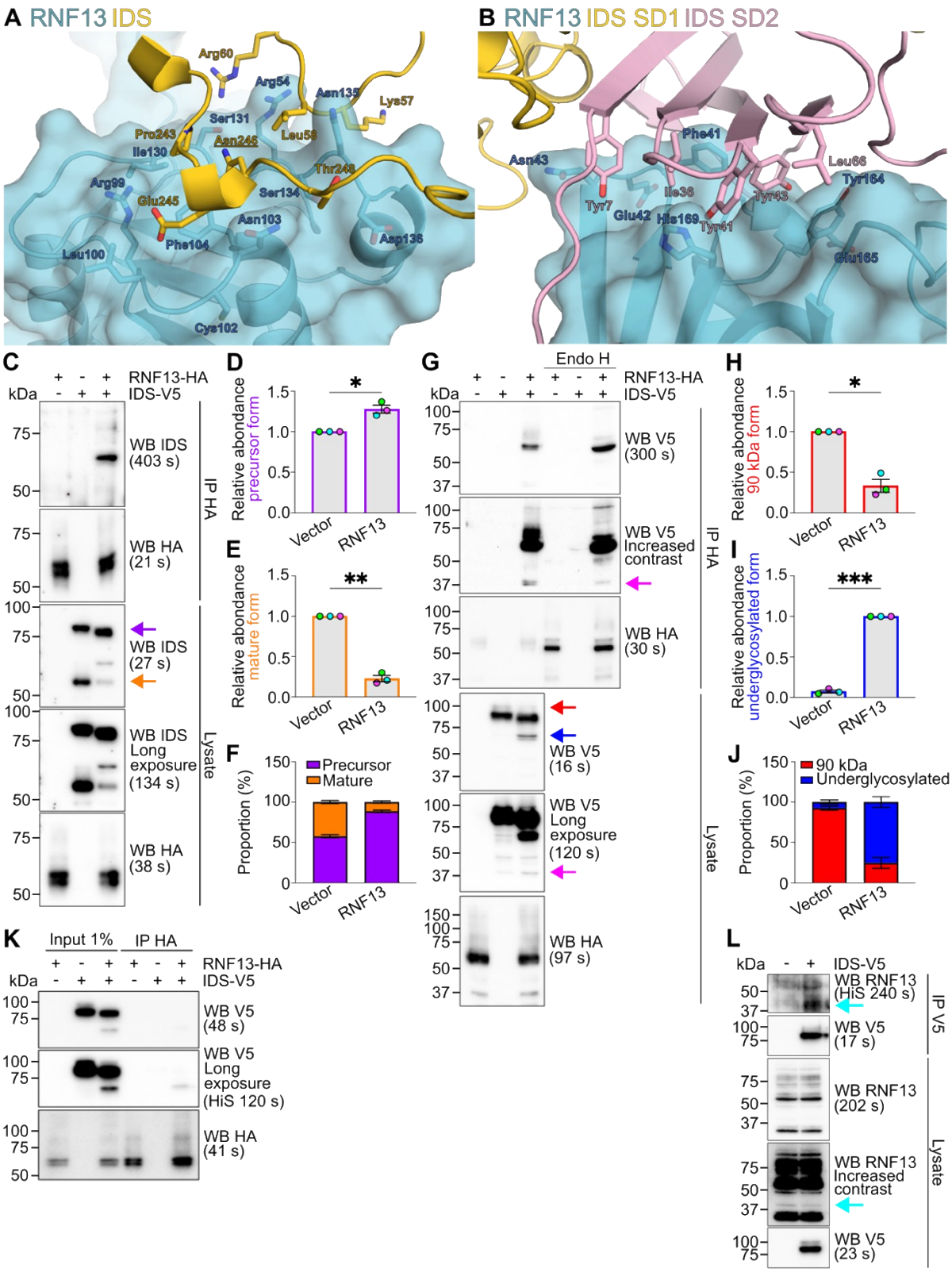


Figure 5.2: RNF13 interacts with precursor underglycosylated IDS and alters its processing.

(**A-B**) AlphaFold 3 predicted an interaction between RNF13 (cyan) and (**A**) the precursor form of IDS (yellow) or (**B**) the SD2 portion of the cleaved form of IDS (pink). (**C, G, K**) Representative (N=3) immunoblots show IDS-V5 and RNF13-HA detection using an antibody against (**C**) IDS or (**G, K**) V5 in HA-immunoprecipitated complexes from transfected HEK293T/17 cell lysates (**G**) digested with Endo H. The arrows represent the precursor (purple), mature (orange), 90 kDa (red), and underglycosylated (blue) forms, as well as the SD2 fragment (pink). (**D-E, H-I**) The strip plots represent the relative protein levels of IDS (**D**) precursor, (**E**) mature, (**H**) 90 kDa, and (**I**) underglycosylated form. (**F, J**) The summary bar plots represent the proportion of (**F**) precursor/mature and (**J**) 90 kDa/underglycosylated form. (**L**) Representative (N=3) immunoblots show endogenous RNF13 detection in V5-immunoprecipitated complexes from IDS-V5 expressing HEK293T/17 cell lysates. The cyan arrows represent the corresponding RNF13 species. Exposure times are indicated. Detections were performed using the Chemi protocol, unless the Chemi Hi Sensitivity (HiS) protocol was specified. All results are mean ± SEM from N=3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (two-tailed paired t-test).

5.5.2 RNF13 trafficking to late endosomes/lysosomes is delayed by presence of IDS

It is establish that IDS glycosylation is important for its lysosomal targeting, as MPR recognizes it (Demydchuk *et al.*, 2017; Parkinson-Lawrence *et al.*, 2005). As RNF13 alters IDS glycosylation and reduces the abundance of the mature form, an immunofluorescence assay was performed on HEK293T/17 cells expressing RNF13-HA, IDS-V5 and GFP-Rab7 to evaluate if its lysosomal targeting was affected. First, ectopic expression of late endosomal marker GFP-Rab7 did not alter the co-localization between IDS and RNF13 when compared to GFP alone (Fig. 5.3A-C). The images show that IDS is mostly found in the ER but also makes some contact with Rab7 (Fig. 5.3A). However, whereas RNF13 expression did not alter the Manders' overlap coefficient (MOC) of IDS over Rab7 (Fig. 5.3D), IDS expression diminished the MOC of RNF13 over Rab7 (Fig. 5.3E). As the anti-IDS recognizes both the precursor and mature forms, the ER signal might be predominantly from the precursor form. Detection of IDS precursor form with anti-V5 (Fig. 5.3F) showed that MOCs for IDS over RNF13 and RNF13 over IDS were similar using either anti-V5 or anti-IDS, thus suggesting that the precursor form is predominantly detected (Fig. 5.3B-C, G). To increase the detection of the lysosomal mature form, transfected HEK293T/17 cells were incubated with cycloheximide (CHX), a protein synthesis inhibitor, allowing the already synthesized proteins to mature (Osaki *et al.*, 2018) (Fig. 5.3H). The treatment decreased the overall fluorescence intensity without affecting the MOC between IDS and RNF13 (Fig. 5.3H-J). While a slight increase in MOC was observed for IDS over Rab7 following CHX treatment, RNF13 overexpression had no effect (Fig. 5.3K). However, when IDS was expressed alone, it exhibited a more punctate staining pattern after CHX treatment, a phenotype that was not observed with RNF13 (Fig. 5.3H). Notably, RNF13 alone colocalized with Rab7, while IDS overexpression decreased the MOC (Fig. 5.3E). CHX treatment rescued the colocalization between RNF13 and Rab7 (Fig. 5.3L), suggesting that IDS might delay RNF13 trafficking to late endosomes/lysosomes, which would be consistent with an interaction in the ER. Although it did not support our initial hypothesis

where RNF13 could have been a lysosomal transporter for IDS, these results suggest that RNF13 interacts with a predominantly underglycosylated precursor form of IDS, thereby affecting its glycosylation, maturation, and trafficking.

5.5.3 IDS glycosylation site Asn246 is important for its maturation

The Asn246 amino acid of IDS is modified with M6P-containing glycans (Fig. 5.1D-E) (Barton *et al.*, 2020). Given the predicted binding of Asn246 with RNF13 (Fig. 5.2A), it is hypothesized that the interaction between the two proteins would hide this site, thus explaining the change in MW and altered maturation. To gain insight into the molecular context, AlphaFold 3 was utilized to predict an interaction between RNF13 and IDS precursor form with an Asn246 glycosylated residue. Interestingly, the predicted model showed that the interaction between RNF13 and IDS was still possible, thanks to a slight repositioning of the residues. Indeed, while the interaction between Glu245 of IDS and RNF13 remains unchanged, Asn246 no longer directly participates in the interaction when modified by the glycan chain (Fig. 5.4A). Instead, it is the glycan chain that now contributes to the interaction, with Arg98 and Leu100 of RNF13 (Fig. 5.4A). To experimentally assess if RNF13 alters the glycosylation of this site, site-directed mutagenesis substituted the asparagine with a glutamine (Asn246Glu, referred to as N246Q or NQ hereafter) to inhibit glycosylation while minimizing structural alterations. Co-immunoprecipitation assays showed an increased abundance of higher MW species of N246Q variant in the immunopurified complex when compared to the WT (Fig. 5.4B). In the lysate, a difference in MW is observed for N246Q compared to WT when RNF13 is absent (purple arrow; Fig. 5.4B). An additional shift for N246Q+RNF13 suggests that RNF13 likely alters another glycosylation site. Furthermore, while the mature form abundance is significantly decreased for N246Q, a difference in MW remains, contrasting with IDS WT coexpressed with RNF13 (orange arrow; Fig. 5.4B). No significant difference is observed between WT and N246Q for the 90 kDa form, but N246Q underglycosylated abundance was higher than the WT with RNF13 (red and blue arrows, respectively; Fig. 5.4B-E). As the 90 kDa form is produced in the TGN, it could indicate that N246Q passes through the Golgi but is not recognized by M6P receptors and that RNF13 acts upstream. IDS N246Q precursor form abundance was slightly higher than the WT (purple arrow; Fig. 5.4B, F). Also, the low mature abundance of the variant N246Q was decreased by half with RNF13 (orange arrow; Fig. 5.4B, G-H), suggesting an additive effect. Overall, our results suggest that the Asn246 glycosylation site is important for IDS maturation but is not the one affected by RNF13.

To confirm if the lysosomal localization of IDS N246Q is altered, an immunofluorescence assay was performed on HEK293T/17 cells expressing RNF13, IDS WT or N246Q and Rab7. The results show that colocalization between RNF13 and N246Q is increased compared to IDS WT (Fig. 5.5A-B, D). A

significant decrease in the MOC of IDS over Rab7 is observed for N246Q only when RNF13 is present (Fig. 5.5C). Additionally, RNF13/Rab7 MOC is reduced by IDS WT and by N246Q (Fig. 5.5E). Interaction between RNF13 and IDS in the ER could be consistent with a delay in trafficking toward the endolysosomal pathway for both proteins.

5.5.4 RNF13 alters IDS glycosylation

To better understand how RNF13 affects IDS glycosylation, lysates of transfected HEK293T/17 cells were treated with Endo H or Peptide:N-glycosidase F (PNGase F). Detection with anti-IDS reveals that the Endo H-treated glycosylated precursor form shifts slightly below the underglycosylated form caused by exogenous expression of RNF13 in the non-digested sample (blue arrows; Fig. 5.6). The mature form also shifts but displays a smear corresponding to species resistant to Endo H that is hardly visible with RNF13 overexpression (orange arrows; Fig. 5.6). As Endo H-resistant glycans are added in the Golgi, the absence of smears is consistent with upstream altered trafficking. Treatment with PNGase F gives similar bands MW with or without RNF13 (Fig. 5.6), suggesting that the differences observed so far are caused by changes in glycosylation patterns. Importantly, the underglycosylated form caused by RNF13 is slightly higher than the one obtained with Endo H digestion but slightly lower than with PNGase F, suggesting that some residual Endo H-resistant species might be on this form (blue arrows; Fig. 6). Overexposition of the immunoblot to observe lower MW bands show that undigested IDS presents very different band patterns when RNF13 is present (Fig. 5.6). When treated with Endo H, the bands around 52 and 35 kDa present a small shift with RNF13 while digestion with PNGase F reestablish identical bands MW (Fig. 5.6), suggesting that changes in Endo H-resistant glycosylation cause the shift. Because the V5-tag is on IDS C-terminus, they most likely represent cleaved C-terminal SD2 fragments (Verma *et al.*, 2021). The MW is higher than expected (14 kDa) but might be caused by the dimerization of the protein through its large hydrophobic region (Demydchuk *et al.*, 2017). These results suggest that RNF13 mostly affect IDS glycosylation resistant to Endo H, which is consistent with an interaction occurring in the ER.

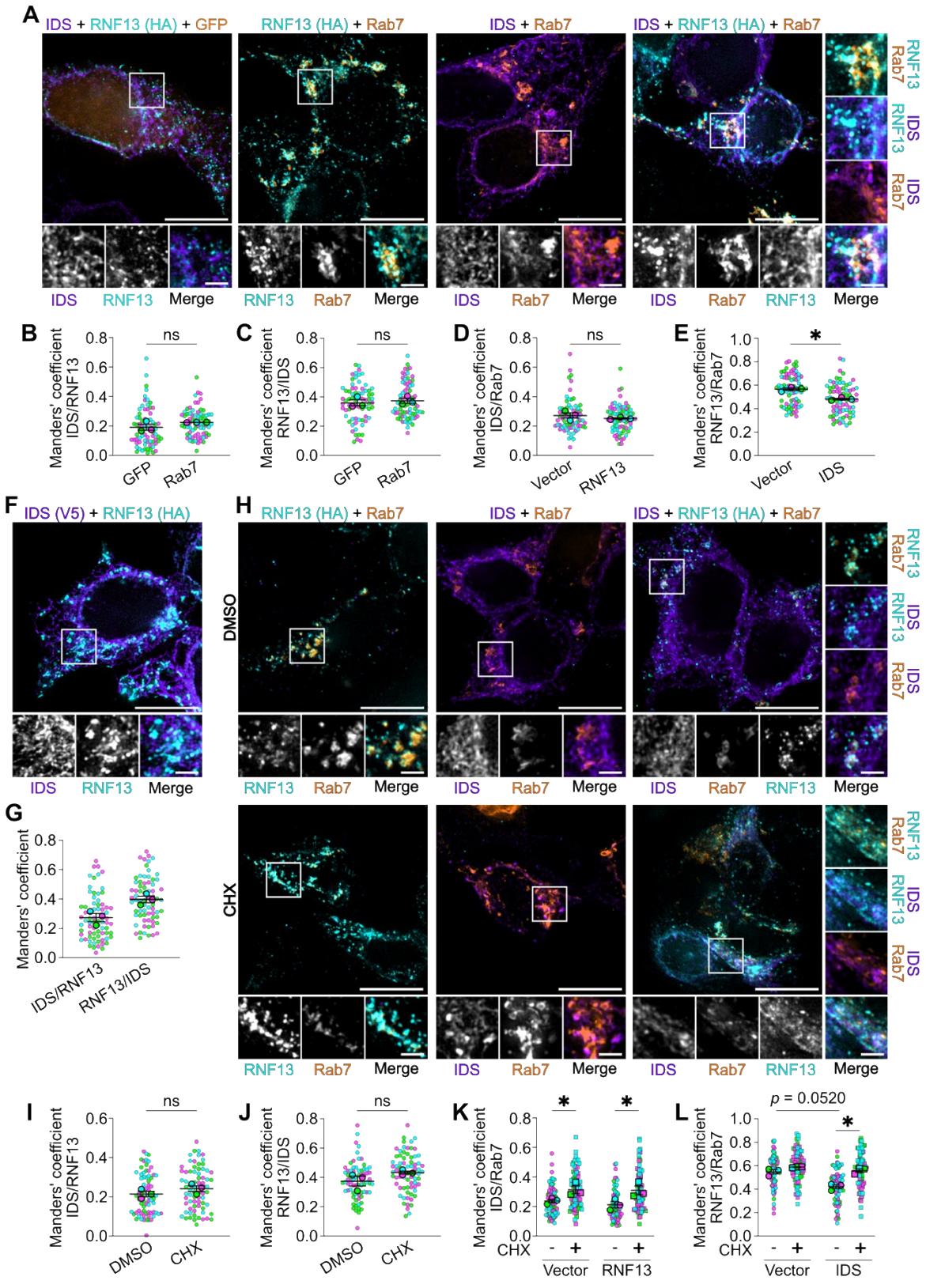


Figure 5.3: RNF13 trafficking to late endosomes/lysosomes is delayed by the presence of IDS.

(**A, F, H**) Representative immunofluorescence images show HEK293T/17 cells expressing (**A, H**) GFP-Rab7 (orange), (**A, F, H**) IDS-V5 (purple), and RNF13-HA (cyan) (**H**) treated with CHX or vehicle for 4h30. Detection was performed by staining HA and (**A, H**) IDS or (**F**) V5. Scale bars indicate 10 μm for whole cell image and 2 μm for higher magnification. (**B-E, G, I-L**) The jittered individual value plots represent MOC of (**B, G, I**) IDS over RNF13, (**C, G, J**) RNF13 over IDS and (**D, K**) IDS or (**E, L**) RNF13 over Rab7. All results are mean ± SEM from N=3. Each color represents an independent experiment (N=3). Smaller points represent individual cells analyzed (n=72). Bigger points represent the mean of an independent experiment. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ ((**B-E, I-J**) two-tailed paired t-test or (**K-L**) two-way RM-ANOVA with multiple comparisons).

5.5.5 RNF13 does not affect IDS glycosylation by inducing ER stress

Knowing that ER stress can induce glycosylation change (Gerlach *et al.*, 2012) and that exogenous RNF13 expression increases ER stress (Arshad *et al.*, 2013), it is possible that RNF13 indirectly impacts IDS glycosylation. To test this, HEK293T/17 cells expressing RNF13 and IDS were treated with either tunicamycin (Tn) to inhibit N-glycosylation or thapsigargin (Tg) to induce ER stress without directly affecting glycosylation. As expected, treatments resulted in an increased level of endogenous IRE1α protein when compared to the vehicle, confirming their efficacy (Fig. 5.7A). The IDS deglycosylated band pattern observed with Tn treatment, but not Tg, was similar to untreated IDS combined with RNF13 (blue arrow; Fig. 5.7B). While Tn treatment decreased the abundance of the IDS precursor form only when IDS is expressed alone, no treatment affected IDS mature form, regardless of RNF13 overexpression (purple and orange arrows, respectively; Fig. 5.7B-D). In contrast to IDS alone, these results suggest that the precursor form synthesized prior to the Tn treatment was unable to mature in the presence of RNF13. In addition, these results suggest that RNF13 does not affect IDS glycosylation by inducing ER stress.

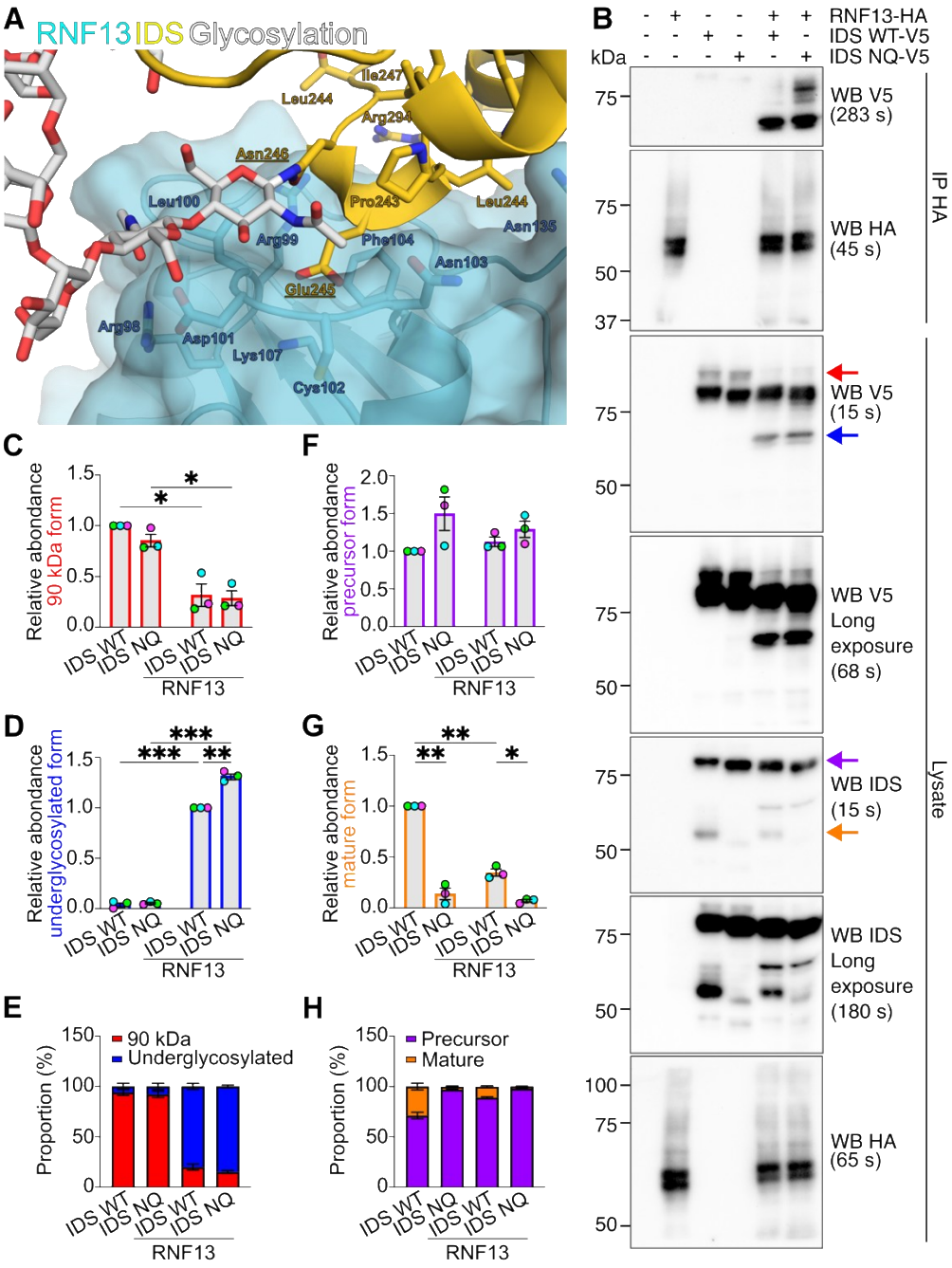


Figure 5.4: IDS glycosylation site N246 is important for its processing but is not the site affected by RNF13.

(**A**) AlphaFold 3 predicted an interaction between RNF13 (cyan) and the precursor form of IDS (yellow) when the N246 is glycosylated (white). (**B**) Representative (N=3) immunoblots show IDS-V5 and RNF13-HA detection in HA-immunoprecipitated complexes from transfected HEK293T/17 cell lysates. (**C-D, F-G**) The strip plots represent the relative protein levels of IDS, specifically (**C**) 90 kDa (red arrow), (**D**) underglycosylated (blue arrow), (**F**) precursor (purple arrow) and (**G**) mature (orange arrow) forms. (**E, H**) The summary bar plots represent the proportion of (**E**) 90 kDa/underglycosylated and (**H**) precursor/mature form. Exposure times are indicated. All results are mean ± SEM from N=3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (two-way RM-ANOVA with multiple comparisons).

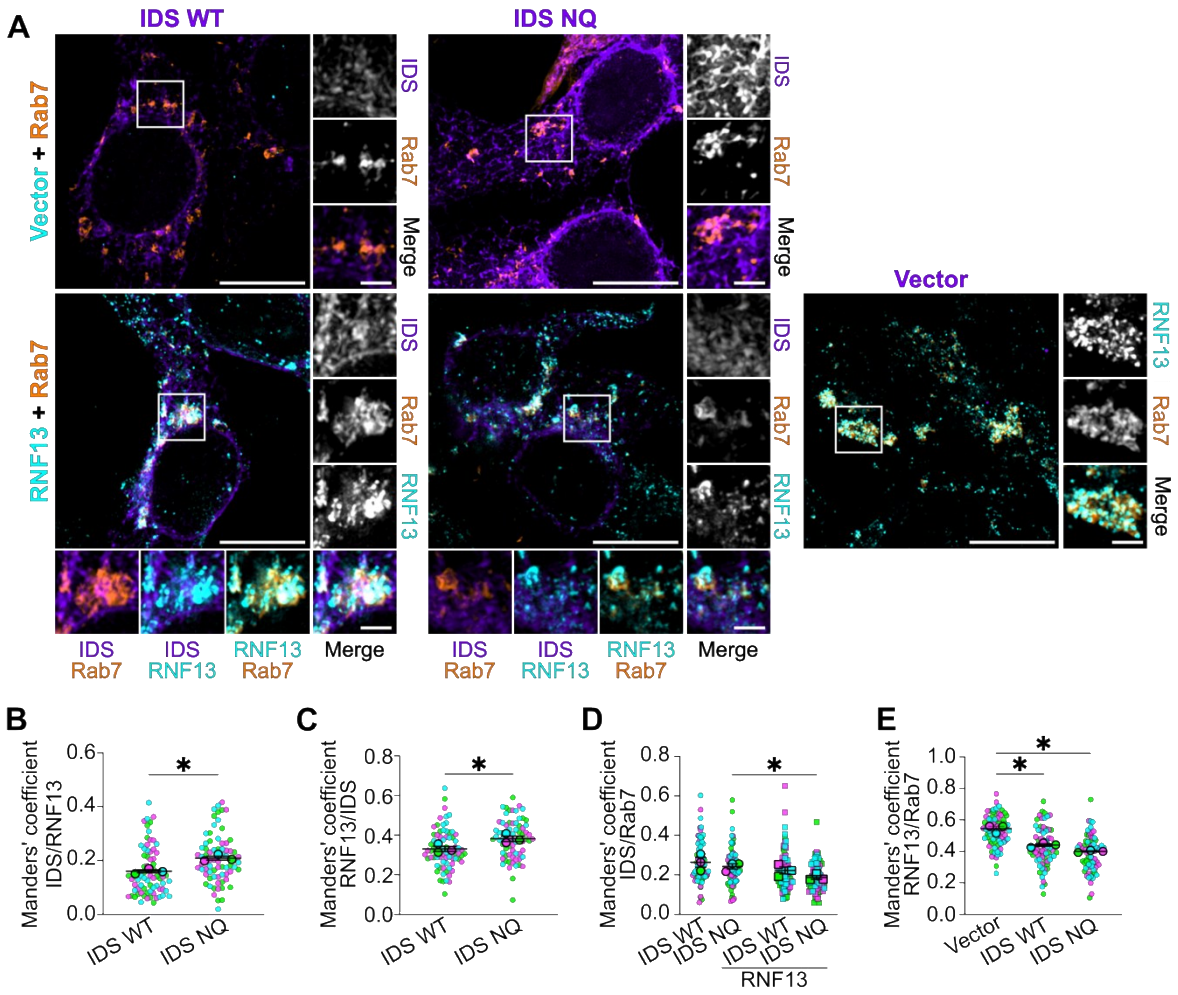


Figure 5.5: IDS N246Q has a higher colocalization with RNF13 than IDS WT.

(**A**) Representative immunofluorescence images show HEK293T/17 cells expressing IDS-V5 (purple), RNF13-HA (cyan) and GFP-Rab7 (orange). Scale bars indicate 10 µm for whole cell image and 2 µm for higher magnification. (**B-E**) The jittered individual value plots represent MOC of (**B**) IDS over RNF13, (**C**) RNF13 over IDS and (**D**) IDS or (**E**) RNF13 over Rab7. All results are mean ± SEM from N=3. Larger points represent the mean of an independent experiment (N=3) whereas smaller points represent each individual cell analyzed (n=72). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ ((**B-C**) two-tailed paired t-test) or (**E**) one- or (**D**) two-way RM-ANOVA with multiple comparisons).

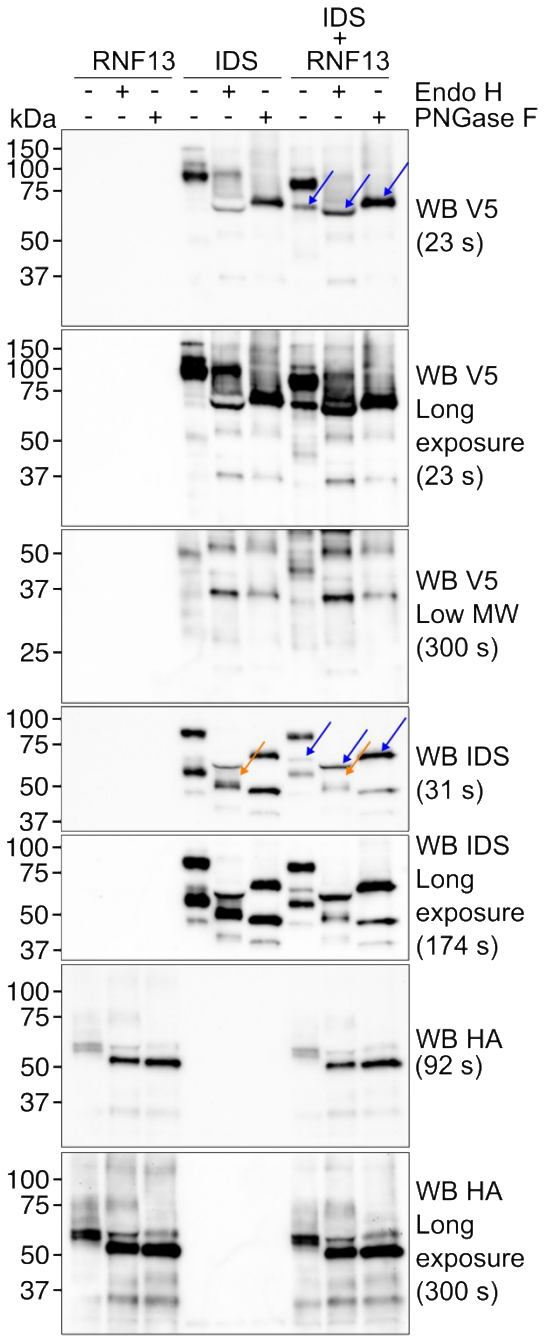


Figure 5.6: RNF13 decreases Endo H resistant species of the mature form and greatly modifies the SD2 glycosylation.

Representative immunoblots show IDS-V5 and RNF13-HA detection in transfected HEK293T/17 cell lysates digested with Endo H or PNGase F (N=4). The blue arrows represent the underglycosylated form caused by RNF13, and the orange arrows represent the Endo H-resistant glycans. Exposure times are indicated.

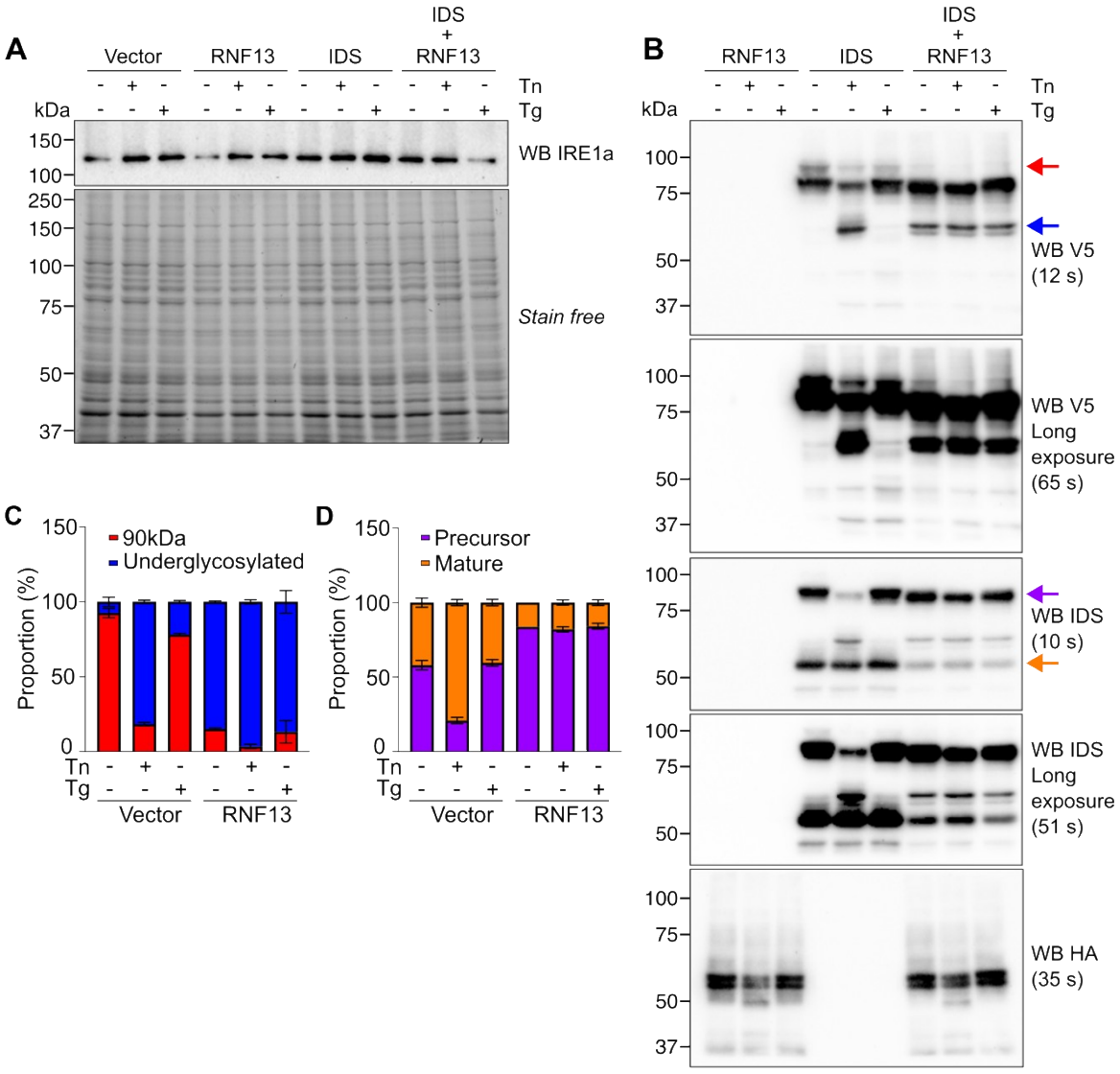


Figure 5.7: RNF13 inhibits IDS maturation but not ER stress induction.

(**A-B**) Representative immunoblots show (**A**) endogenous IRE1α or (**B**) IDS-V5 and RNF13-HA detection in transfected HEK293T/17 cell lysates treated with Tn for 4 hours or Tg for 1 hour (N=3). The arrows represent the 90 kDa (red), underglycosylated (blue), precursor (purple), and mature (orange) forms. (**C-D**) The summary bar plots represent the proportion of (**C**) 90 kDa/underglycosylated and (**D**) precursor/mature forms. Exposure times are indicated.

5.5.6 RNF13/RNF167 heterodimerize and modify the interaction and abundance of IDS precursor and underglycosylated forms

While RNF13 effect on IDS is not caused by inducing ER stress, both proteins are translated and glycosylated using similar machinery in the ER. To control for the effect of machinery saturation, HEK293T/17 cells were transiently transfected with plasmids encoding the proteins IDS-V5, RNF13-HA and RNF167-YFP, another E3 ligase from the PA-TM-RING family. Interestingly, RNF167 and RNF13 had different effects on IDS, supporting that the phenotypes observed are specific and not caused by defects in ER quality control or trafficking pathways (Fig. 5.8A). While both the 90 kDa and mature forms of IDS were similarly affected by RNF13 and RNF167, the underglycosylated form was barely present with RNF167 (red, orange and blue arrows, respectively; Fig. 5.8A-D, F-G). Intriguingly, combination of RNF13 and RNF167 highly increased this form compared to RNF13 alone (blue arrow; Fig. 5.8A, C-D). In addition, the precursor form band pattern was different with RNF167, as it appeared less intense and like a small smear where multiple bands were almost distinguishable, but the overall abundance was not significantly different (purple arrow; Fig. 5.8A, E). RNF13 increased the precursor form abundance while the addition of RNF167 restored its level (purple arrow; Fig. 5.8A, E). Intriguingly, an additional shift of the band MW is observed when RNF13 and RNF167 are combined (purple arrow; Fig. 5.8A). While decreasing the mature form, RNF167 barely modified the ratio of precursor/mature form, which importantly contrasts when RNF13 is present (Fig. 5.8A, G). RNF167 was not affected by the different conditions, but RNF13 bands were slightly shifted in the presence of RNF167 (cyan arrow; Fig. 5.8A). RING finger domain-containing E3 ligases can function as monomers, dimers or multi-subunit complexes (Metzger *et al.*, 2012). Homodimerization of RNF13 has been suggested, whereas it has been experimentally demonstrated for RNF167 (van Dijk *et al.*, 2014). In addition, RNF13 and RNF167 are identified as interactors on the BioGRID database (Huttlin *et al.*, 2021; Huttlin *et al.*, 2017). To gain insight into this possible heterodimer, AlphaFold 3 was used to predict the interaction between RNF13 and RNF167 proteins. As expected, they interact through multiple regions (Fig. 5.8H). Notably, both transmembrane domains, which are mostly composed of hydrophobic residues, interact with one another (Fig. 5.8H), although an important contribution comes from their PA domain in the N-terminal domains (Fig. 5.8H). Interestingly, the surface of RNF13 interacting with RNF167 is the same one as IDS. The C-terminal region, or RING domain, does not contribute to the dimerization (Fig. 5.8H). Immunofluorescence assays were performed in HeLa cells expressing RNF13-GFP or RNF167-HA to determine the subcellular localization of this complex by detecting the endogenous Lysosome-associated membrane protein 1 (Lamp1) protein. The images show that RNF13 and RNF167 highly colocalize together, and both proteins colocalize with Lamp1 (Fig. 5.8I). However, presence of RNF13 significantly increased the MOC of RNF167/Lamp1 while RNF167 decreased it for RNF13/Lamp1, although not significantly (Fig. 5.8I-K), which could suggest that the heterodimer

trafficking and/or function might be different than the monomers and/or homodimers. To better understand how the putative heterodimer interacts with IDS, co-immunoprecipitation assays were performed from HEK293T/17 cell lysates expressing RNF13-HA, RNF167-YFP and IDS-V5 proteins. The lysates were divided to use both anti-HA and anti-GFP beads to determine which IDS form interacts with RNF13 or RNF167, respectively. Both RNF13 and RNF167 were detected in the immunoprecipitated complex of the other ligase, confirming the heterodimerization (Fig. 5.8L). More specifically, in contrast to the two predominant bands detected in the lysate, RNF13 band pattern in the immunopurified complex revealed enrichment of the deglycosylated band (around 42 kDa) in addition to a heavily glycosylated form, represented by a smear above 50 kDa (WB HA in IP GFP; Fig. 5.8L). Interestingly, while RNF167 interacted predominantly with the precursor form of IDS and RNF13 with the underglycosylated IDS form, the complex containing RNF13/RNF167/IDS contains both forms (WB V5 in IP GFP and HA, respectively; Fig. 5.8L). In addition, a higher abundance of IDS is found in both immunopurified complexes when both RNF13 and RNF167 are present (WB V5 in both IP; Fig. 5.8L). Overall, these results suggest that RNF13/RNF167 heterodimer trafficking is regulated in a distinct manner compared to the individual proteins and that each complex (RNF13, RNF167 and heterodimer RNF13/RNF167) interacts and affects IDS differently.

5.5.7 Knocking down RNF13 or RNF167 modifies how the other E3 ligase affects IDS

Thus far, this study demonstrates that RNF13 alters IDS glycosylation and maturation, and that the addition of exogenous RNF167 enhances the phenotype. However, since we have demonstrated that RNF13 and RNF167 heterodimerize, it is possible that some of the endogenous RNF13 or RNF167 heterodimerize with the overexpressed RNF167 or RNF13, respectively, and alter the phenotype that we have characterized so far. To assess whether the phenotypes observed are caused by overexpression and to clarify the roles of the monomers and/or homodimers, HeLa cells were transfected with Dicer-substrate small interfering RNAs (DsiRNAs) targeting either RNF13 or RNF167. First, the efficiency of two different DsiRNAs against RNF13 and RNF167 was confirmed by detecting their endogenous protein levels (Fig. 5.9A-B). We determined whether the subcellular localization of RNF13 and RNF167 differed when the other ligase was repressed by detecting endogenous Lamp1 in HeLa cells expressing RNF167-HA or RNF13-HA and transfected with DsiRNAs against RNF13 or RNF167, respectively. In concordance with the previous results (Fig. 5.8I-K), RNF167 colocalization with Lamp1 was decreased by RNF13 knockdown while the MOC of RNF13 over Lamp1 was increased when RNF167 was repressed (Fig. 5.9C-F). This suggests that RNF13 is preferentially targeted to lysosomes compared to RNF167, and that the heterodimer influences their position in the endolysosomal pathway. Then, in HEK293T/17 cells expressing IDS-V5, knockdown of RNF13 and RNF167 increased the 90 kDa form, independently of the other ligase expression (Fig. 5.9G-

J). Exogenous expression of RNF167, combined with RNF13 knockdown, increased the underglycosylated form compared to RNF167 alone, although not significantly, and a slight increase in the band MW could be observed (Fig. 5.9G, K). In contrast, knockdown of RNF167 resulted in a slight decrease in MW that did not affect IDS abundance (Fig. 5.9H, L). Interestingly, this form was also detected with longer exposure time for IDS alone with siRNF167, but not siCTL or siRNF13 (Fig. 5.9G-H). SD2 fragments were also detected at higher levels in siRNF167 conditions compared to RNF13 overexpression, whereas they were undetectable in IDS alone (Fig. 5.9H). Notably, the precursor form was unaffected by RNF167 overexpression or RNF13 repression (Fig. 5.9G, M). In contrast, RNF167 knockdown or RNF13 overexpression both increased the abundance of this form (Fig. 5.9H, N). Overall, these results suggest that both RNF13 and RNF167 modify IDS glycosylation and maturation.

5.5.8 RNF13 E3 ligase activity is required for a proper interaction with IDS and to increase the underglycosylated form

Generally, in RING finger protein heterodimers, one of the monomers lacks catalytic activity and stabilizes the active E2-binding RING domain of the other ligase (Metzger *et al.*, 2012). To test if the E3 activity ligase of both RNF13 and RNF167 is needed to modulate IDS, dominant negative (DN) mutants of Ub ligase were expressed in HEK293T/17 cells with IDS-V5 and either WT or DN of the other ligase. Both RNF13 and RNF167 DN, alone or together, increased the 90 kDa form of IDS (red arrow; Fig. 5.10A). However, at least one of the two WT ligase protein was sufficient to restore the level of this form to baseline (red arrow; Fig. 5.10A). RNF167 E3 ligase activity was needed to separate the precursor form into multiple bands, independently of RNF13, although RNF13 WT was needed to cause a MW shift (purple arrow; Fig. 5.10A). Combined RNF13 and RNF167 increased IDS underglycosylated form compared to RNF13 alone, while this form is barely detectable with RNF167 alone (blue arrow; Fig. 5.10A). Expression of RNF13 DN with WT RNF167 results in IDS level similar to what was obtained with RNF167 alone (blue arrow; Fig 5.10A). In contrast, RNF167 DN and WT RNF13 increased IDS underglycosylated form as much as the combination of both WT ligases (blue arrow; Fig. 5.10A). These results suggest that the E3 ligase activity of RNF13, but not of RNF167, is needed to increase IDS underglycosylated form.

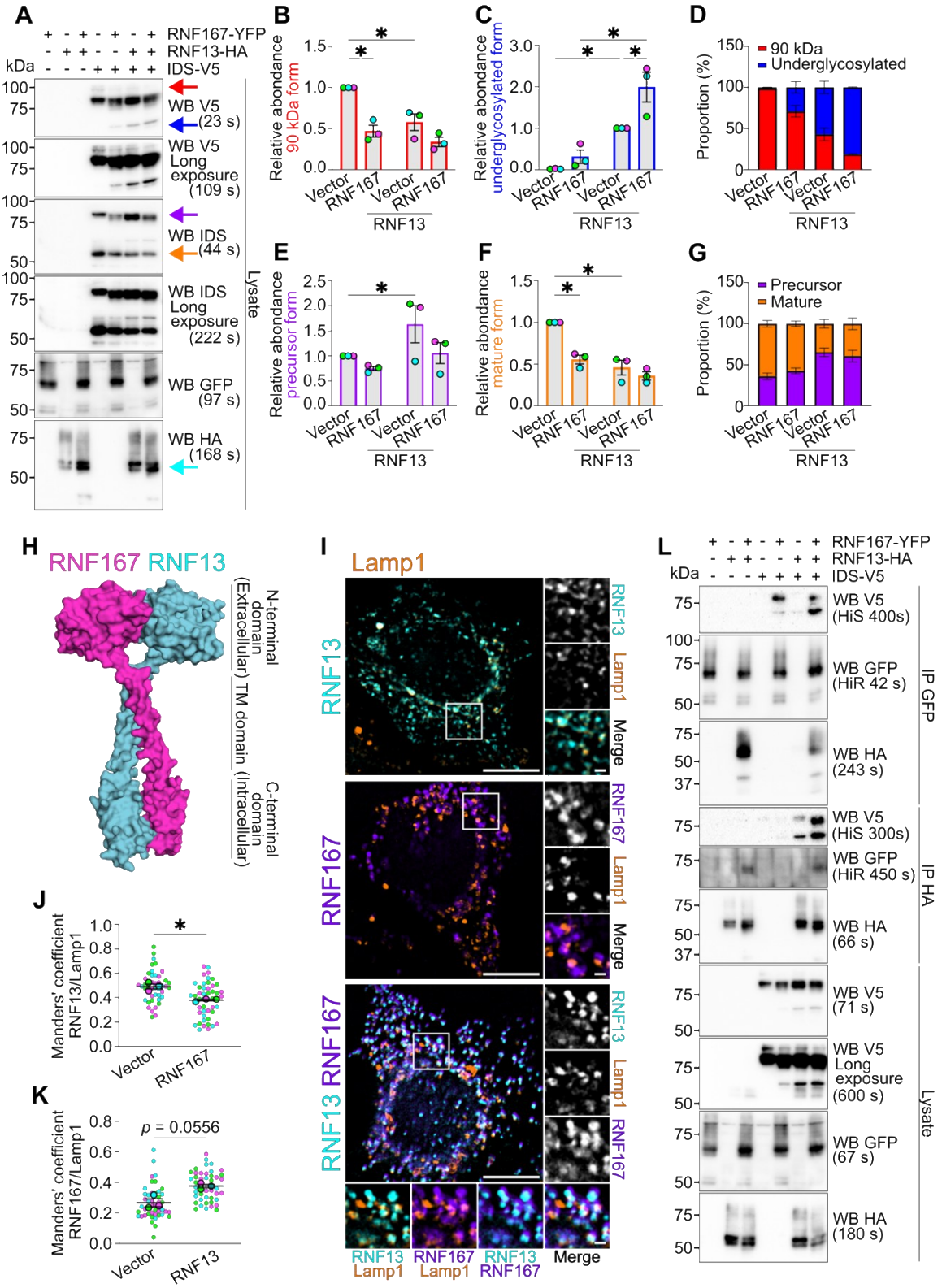


Figure 5.8: RNF13/RNF167 heterodimer modifies the interaction with IDS, increasing the abundance of the underglycosylated form.

(**A**) Representative (N=3) immunoblots show IDS-V5, RNF167-YFP and RNF13-AH detection from transfected HEK293T/17 cell lysates. The arrows represent the 90 kDa (red), underglycosylated (blue), precursor (purple) and mature (orange) form of IDS and RNF13 (cyan). (**B-C, E-F**) The strip plots represent relative protein levels of IDS (**B**) 90 kDa, (**C**) underglycosylated, (**E**) precursor and (**F**) mature forms. (**D, G**) The summary bar plots represent the proportion of (**D**) 90 kDa/underglycosylated and (**G**) precursor/mature form. (**H**) AlphaFold 3 predicted an interaction between RNF13 (cyan) and RNF167 (purple). The model is represented without the signal peptide (RNF13: a.a. 1-34; RNF167: a.a. 1-24) and the disordered C-terminal region (RNF13: a.a. 285-381; RNF167: a.a. 271-350). These regions do not affect the predicted model. (**I**) Representative immunofluorescence images show endogenous detection of Lamp1 (orange) in HeLa cells expressing RNF13 (cyan) and RNF167 (purple). Scale bars indicate 10 μm for whole cell image and 2 μm for higher magnification. (**J-K**) The jittered individual value plots represent MOC of (**J**) RNF13 or (**K**) RNF167 over Lamp1. Each color represents an independent experiment (N=3). Smaller points represent individual cells analyzed (n=45). Larger points represent the mean of an independent experiment. (**L**) Representative (N=3) immunoblots show IDS-V5, RNF167-YFP and RNF13-HA detection in immunopurified complexes with anti-HA or anti-GFP beads from transfected HEK293T/17 cell lysates. Exposure times are indicated. Detections were performed using the Chemi protocol unless the Chemi Hi Resolution (HiR) or Chemi Hi Sensitivity (HiS) are specified. All results are mean ± SEM from N=3. * $p < 0.05$ ((**B-C, E-F**) two-way RM-ANOVA with multiple comparisons or (**J-K**) two-tailed paired t-test).

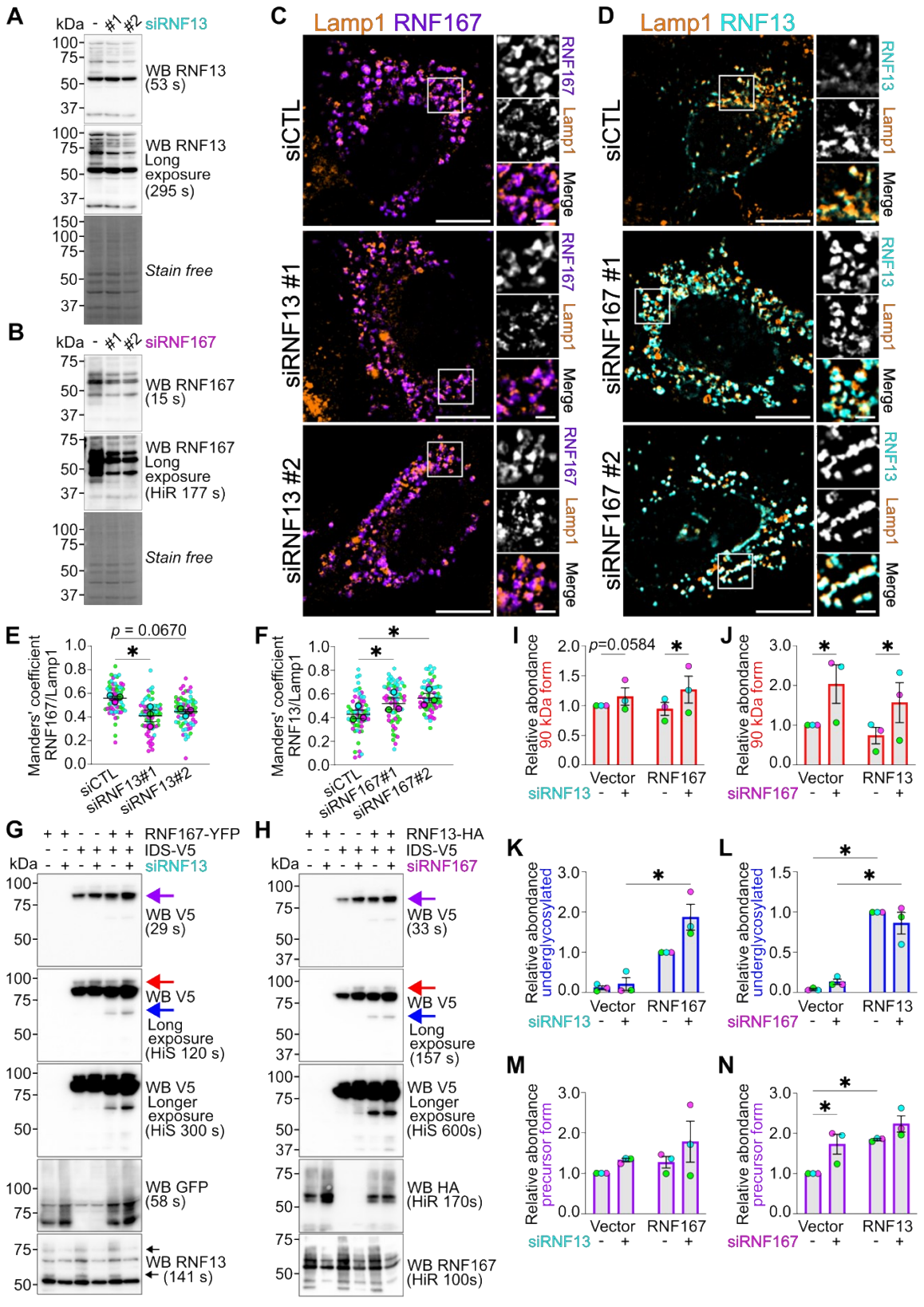


Figure 5.9: Knockdown of endogenous RNF13 or RNF167 modifies how the other E3 ligase affects IDS.

(**A-B**) Representative (N=3) immunoblots show (**A**) RNF13 and (**B**) RNF167 detection from the lysate of HeLa cells transfected with (**A**) siRNF13 and (**B**) siRNF167. (**C-D**) Representative immunofluorescence images show endogenous detection of Lamp1 (orange) in HeLa cells expressing (**C**) RNF167 (purple) and siRNF13 or (**D**) RNF13 (cyan) and siRNF167. Scale bars indicate 10 µm for whole cell image and 2 µm for higher magnification. (**E-F**) The jittered individual value plots represent MOC of (**E**) RNF167 or (**F**) RNF13 over Lamp1. Each color represents an independent experiment (N=3). Smaller points represent individual cells analyzed (n=63). Bigger points represent the mean of an independent experiment. (**G-H**) Representative (N=3) immunoblots show IDS-V5 and (**G**) RNF167-YFP or RNF13-HA detection from transfected HEK293T/17 cell lysates with (**G**) siRNF13 or (**H**) siRNF167. (**G**) Black arrows show specific RNF13 bands. (**I-N**) The strip plots represent relative protein levels of IDS (**I-J**) 90 kDa (red arrow), (**K-L**) underglycosylated (blue arrow), (**M-N**) precursor (purple arrow) from. Exposure times are indicated. Detections were performed using the Chemi protocol unless the Chemi Hi Resolution (HiR) or Chemi Hi Sensitivity (HiS) protocols are specified. All results are mean ± SEM from N=3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ ((**B, E-F**) one-way or (**I-N**) two-way RM-ANOVA with multiple comparisons).

RNF13 RING domain is localized in the cytosol, while RNF13's PA domain and IDS are localized in the lumen (Cabana et Lussier, 2022) and predicted to associate together (Fig. 5.2A). However, RNF13 DN display a different glycosylation pattern than RNF13 WT (Fig. 5.10A). Because the mutations in the RING domain are on the cytosolic side, we wondered if IDS/RNF13 interaction could be affected. To test this, anti-HA co-immunoprecipitations were performed from HEK293T/17 cell lysates expressing either WT or DN RNF13-HA with IDS-V5 proteins. RNF13 DN increased IDS 90 kDa when compared to RNF13 WT (red arrow; Fig. 5.10B-C). Additionally, RNF13 DN increased significantly the precursor form, slightly more than RNF13 WT (purple arrow; Fig. 5.10B, D). As obtained previously, the IDS underglycosylated form was not detectable with RNF13 DN in the lysate; however, a small quantity was detected in the immunopurified complex (blue arrow; Fig. 5.10B, E). To account for the fact that the underglycosylated form was barely detectable in the lysate but that RNF13 DN expression is higher, we normalized the amount of V5-tagged protein detected in the immunoprecipitated complex relative to the total lysate and the amount of RNF13 immunoprecipitated (Fig. 5.10B, F). As a result, RNF13 DN immunoprecipitated approximately half the amount of IDS compared to WT RNF13, suggesting that the RING domain activity modulates the interaction, but is not absolutely required (Fig. 5.10B, F). To ensure that the interaction of DN RNF13 with IDS is not an artifact of a prolonged ER retention caused by trafficking defects, immunofluorescence assays were performed in HeLa cells expressing RNF13 WT or DN. The results show that both proteins colocalize with Lamp1-positive lysosomes, and that the MOC of RNF13 DN/Lamp1 is not significantly different than the WT (Fig. 5.10G-H). Overall, these results suggest that the E3 ligase activity of RNF13 is required to induce the underglycosylated form of IDS, but not for the mutual interaction between IDS and RNF13.

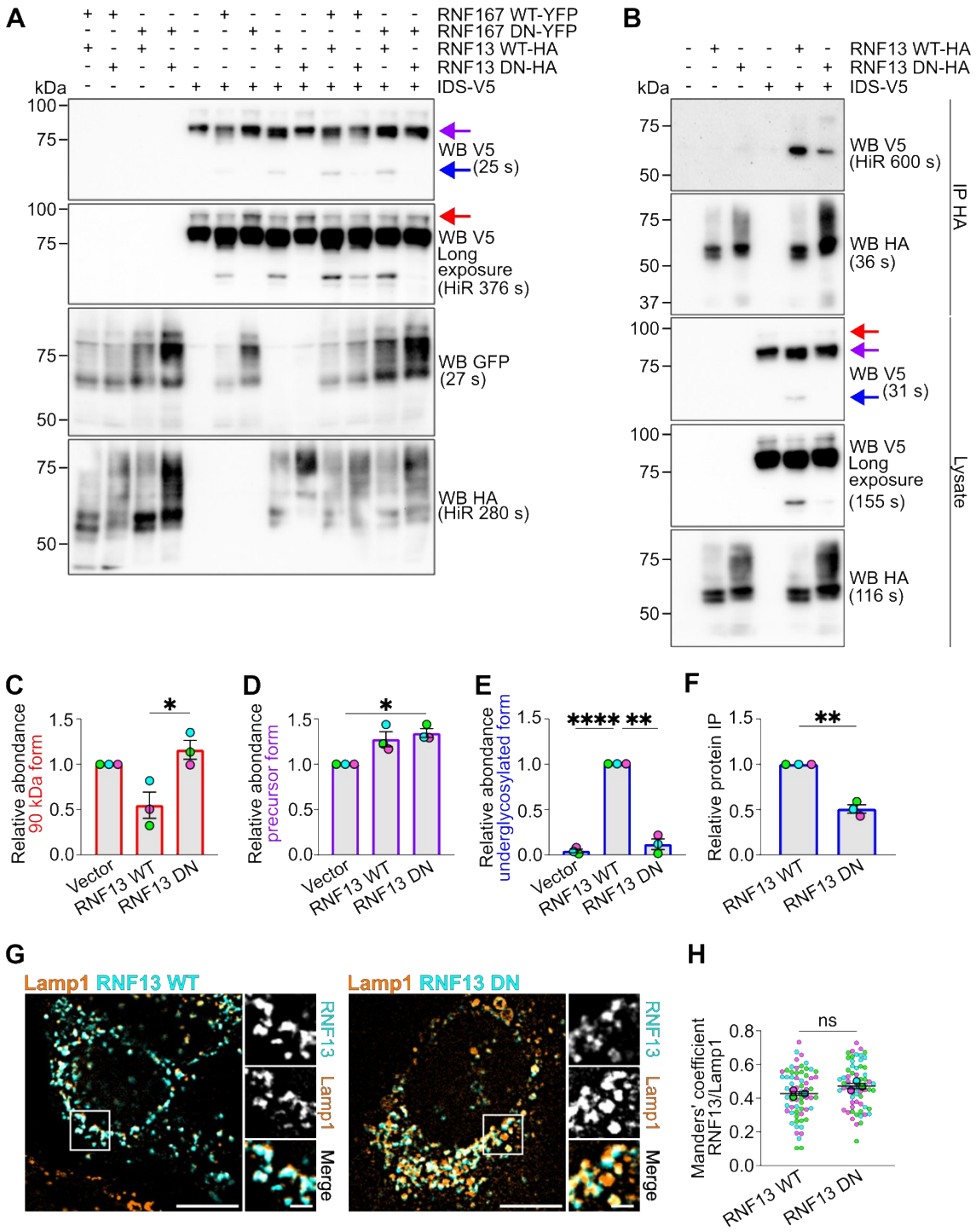


Figure 5.10: RNF13 E3 ligase activity is required to increase the underglycosylated form, but not RNF167, and mutation in the RING domain of RNF13 alters the interaction with IDS.

(**A**) Representative immunoblots show V5-tagged IDS WT, YFP-tagged RNF167 WT or DN and HA-tagged RNF13 WT or DN detection from transfected HEK293T/17 cell lysates (N=2). (**B**) Representative (N=3) immunoblots show IDS-V5 and RNF13 WT or DN-HA detection in HA-immunoprecipitated

complexes from transfected HEK293T/17 cell lysates. Exposure times are indicated. Detections were performed using the Chemi protocol unless the Chemi Hi Resolution (HiR) is specified. (**C-E**) The strip plots represent relative protein levels of IDS (**C**) 90 kDa (red arrow), (**D**) precursor (purple arrow) and (**E**) underglycosylated (blue arrow) forms. (**F**) The strip plot represents the normalized amount of V5 detected in the immunoprecipitated complex over the amount in the total lysate and over the quantity of RNF13 that was immunoprecipitated. (**G**) Representative (N=3) immunofluorescence images show endogenous detection of Lamp1 (orange) in HeLa cells expressing RNF13-HA (cyan). Scale bars indicate 10 µm for whole cell image and 2 µm for higher magnification. (**H**) The jittered individual value plots represent MOC of RNF13 over Lamp1. Each color represents an independent experiment (N=3). Smaller points represent individual cells analyzed (n=63). Bigger points represent the mean of an independent experiment. All results are mean ± SEM from N=3. ns = not significant, * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ ((**C-E**) one-way RM-ANOVA with multiple comparisons or (**F, H**) two-tailed paired t-test).

5.5.9 RNF13 protects IDS underglycosylated form and its C-terminal fragment from rapid proteasomal degradation

As glycosylation trimming targets glycoproteins for ER-associated degradation (ERAD) (Frigerio et Lord, 2000) and the effect of RNF13 on the underglycosylated form of IDS is dependent on its E3 ligase activity, we wondered if the altered IDS maturation caused by RNF13 is delayed or promotes its degradation. To test this, HEK293T/17 cells expressing RNF13 and IDS were treated with CHX for 30 minutes before either the lysosomal degradation inhibitor chloroquine (CQ) or the proteasome inhibitor MG132 was added for 4 hours. RNF13 abundance increased with both treatments (Bocock *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2023), confirming their efficacy (Fig. 5.11A, H). Both the 90kDa and underglycosylated forms were decreased by CHX independently of RNF13, whereas treatment of CQ increased the abundance of the 90 kDa form (red and blue arrows, respectively; Fig. 5.11B-D). In contrast, CQ treatment decreased IDS mature form, reducing its proportion by 10% (orange arrow; Fig. 5.11F-G). While the CHX was very efficient to decrease the precursor form of IDS alone, this effect was inhibited by RNF13 presence (purple arrow; Fig. 5.11E). Furthermore, the low MW bands detected by anti-V5 but not by anti-IDS, indicating that they correspond to C-terminal SD2 fragments, were decreased by CQ only when RNF13 was present (Fig. 5.11A). Independently of the treatments, RNF13 increased the IDS C-terminal fragments abundance when compared to IDS alone and most bands have different MW, further supporting the glycosylation change (Fig. 5.11A). Overall, these results suggest that the lysosomes do not rapidly degrade IDS.

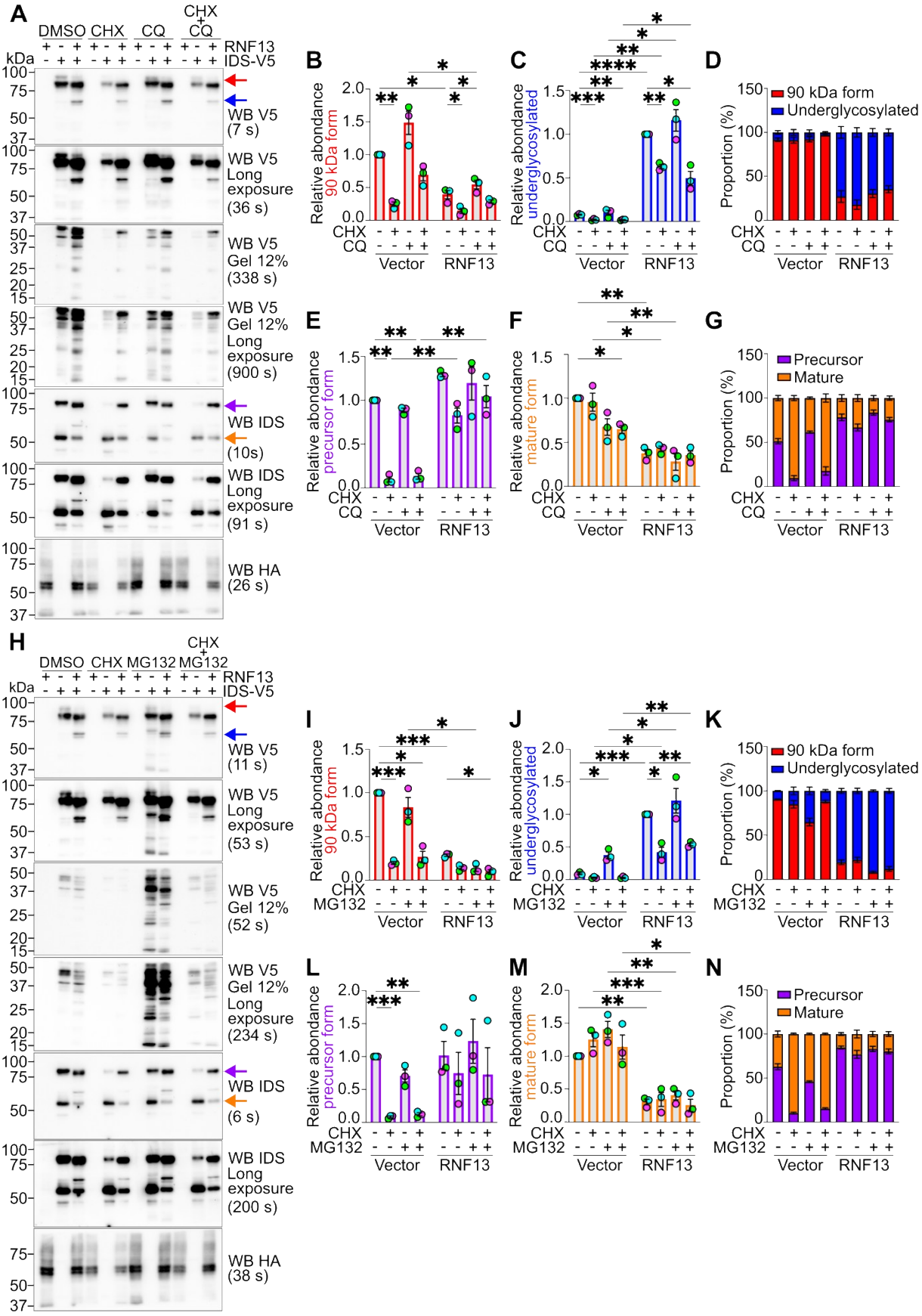

A
DMSO
CHX
CQ
CHX + CQ
RNF13
IDS-V5
kDa
WB V5 (7 s)
WB V5 Long exposure (36 s)
WB V5 Gel 12% (338 s)
WB V5 Gel 12% Long exposure (900 s)
WB IDS (10s)
WB IDS Long exposure (91 s)
WB HA (26 s)
B
Relative abondance 90 kDa form
C
Relative abondance underglycosylated
D
Proportion (%)
90 kDa form
Underglycosylated
E
Relative abondance precursor form
F
Relative abondance mature form
G
Precursor
Mature
CHX
CQ
Vector
RNF13
H
DMSO
CHX
MG132
CHX + MG132
WB V5 (11 s)
WB V5 Long exposure (53 s)
WB V5 Gel 12% (52 s)
WB V5 Gel 12% Long exposure (234 s)
WB IDS (6 s)
WB IDS Long exposure (200 s)
WB HA (38 s)
I
J
K
L
M
N
MG132

Figure 5.11: IDS is not degraded by the lysosomes but by the proteasome while RNF13 protects some forms from degradation.

(**A, H**) Representative (N=3) immunoblots show IDS-V5 and RNF13-HA detection in lysates from transfected HEK293T/17 cells treated with CHX for 30 minutes before adding (**A**) CQ or (**H**) MG132 for 4 hours. Exposure times are indicated. (**B-C, E-F, I-J, L-M**) The strip plots represent relative protein levels of IDS (**B, I**) 90 kDa (red arrow), (**C, J**) underglycosylated (blue arrow), (**E, L**) precursor (purple arrow) and (**F, M**) mature (orange arrow) forms. (**D, G, K, N**) The summary bar plots represent the proportion of (**D, K**) 90 kDa/underglycosylated and (**G, N**) precursor/mature form. Values are mean ± SEM from N=3. * $p <$ 0.05; ** $p <$ 0.001; *** $p <$ 0.001; **** $p <$ 0.0001 (two-way RM-ANOVA with multiple comparisons).

The underglycosylated form of IDS increases with MG132 (blue arrow; Fig. 5.11H, J). Specifically, the levels of IDS alone were now comparable to the levels obtained in the presence of RNF13 treated with CHX with and without MG132 (blue arrow; Fig. 5.11H, J). Furthermore, MG132 increased the mature/precursor ratio for IDS but not when RNF13 was overexpressed (purple and orange arrows; Fig. 5.11L-N). MG132 led to an important accumulation of low MW bands detected by anti-V5 (Fig. 5.11H). Importantly, the band profile differed significantly with RNF13 (Fig. 5.11H), consistent with an effect on IDS C-terminal glycosylation pattern (Fig. 5.6). It suggests that, unlike previously thought, processed IDS fragments may not be degraded by lysosomes but rather by the proteasome. These results suggest that the proteasome rapidly degrades IDS in its underglycosylated form, and that RNF13 delays the proteasomal degradation of IDS underglycosylated precursor and the SD2 fragments.

5.6 Discussion

This work presents a novel interaction between RNF13 and IDS. RNF13 appears to have a dual functional role, reducing IDS maturation while protecting the underglycosylated form and SD2 fragments from proteasomal degradation. While we have not confirmed that RNF13's PA domain is indeed involved in the interaction, an IDS C-terminal fragment and a predominantly underglycosylated form were co-immunoprecipitated with RNF13, concurring with both predicted AlphaFold 3 models (Fig. 5.1). RNF13 may function by either blocking the addition or enhancing the removal or trimming of glycosylation. N-glycan removal is generally performed by PNGase in the cytoplasm, where RNF13's C-terminal and RING domain are also located, after the retrotranslocation of a protein for its proteasomal degradation (Patel *et al.*, 2020). Notably, RNF13 DN interacts with approximately 50% of the IDS bound to WT RNF13, while increasing the underglycosylated form by only 15%, suggesting that the physical interaction is not as important as RNF13's E3 ligase activity for the formation of this species (Fig. 5.10). This is further supported by the observation that only a portion of the underglycosylated IDS is co-immunoprecipitated

with RNF13 (Fig. 5.2K). This study also reveals the existence of an RNF13/RNF167 heterodimer, in which only RNF13 E3 ligase activity, combined with RNF167 expression, increases the level of IDS underglycosylated form (Fig. 5.10). This suggests that RNF167 may help stabilize an RNF13 complex, as seen in other RING protein family heterodimers (Metzger *et al.*, 2012). This could explain the slight decrease in underglycosylated IDS with RNF13 and siRNF167 combined (Fig. 5.9). In this context, ubiquitination might be a plausible explanation for the expression of IDS in an underglycosylated form. Specifically, since K48-linked ubiquitin chains target proteins for proteasomal degradation, RNF13 may attach a different type of chain to IDS after its retrotranslocation, thus preventing degradation. Future studies are needed to determine whether and how RNF13 modifies IDS ubiquitination and the consequences for its trafficking and processing, as it is currently beyond the scope of the present work.

An important limitation of our study is that most experiments were performed using overexpression. In this context, it cannot be totally ruled out that the proteasomal machinery may be saturated and responsible for the increased abundance of the rapidly degraded forms. However, this appears unlikely as the assay combining CHX and MG132 treatments demonstrate that half the underglycosylated form induced by RNF13 is degraded within the first 30 minutes while no difference is seen in the following 4 hours (Fig. 5.11). If the machinery was saturated, the CHX treatment alone should have significantly decrease this form to levels lower than the CHX+MG132 condition. The additional 4 hours should have allowed the proteasome to eliminate the accumulation effectively (Fig. 5.11). Additionally, it is important to note that the CQ treatment was performed for 4 hours, and we cannot exclude the possibility that the forms that reach the lysosomes have a longer half-life. In any case, our results suggest that processed forms of IDS can be degraded by the proteasome before reaching the lysosomes, highlighting the importance of further studying IDS trafficking and processing.

The SD2 fragments were also increased when RNF167 was repressed. Specifically, an increased underglycosylated form of IDS results from the following conditions: (1) comparing RNF13/RNF167 exogenous to RNF13 exogenous suggests a preference for the formation of RNF13/RNF167 heterodimer over RNF13 monomer or homodimer; (2) comparing exogenous RNF167 with siRNF13 to siCTL benefit the formation of exogenous RNF167 monomer or homodimer; and (3) comparing IDS alone with siCTL to siRNF167 led to the formation of endogenous RNF13 monomer or homodimer (Fig. 5.9). Based on our immunofluorescence assays with both overexpression and repression, RNF13-containing dimers exhibit higher colocalization with Lamp1 than the RNF167-containing one (Fig. 5.8; 5.9). Importantly, while it is assumed that there are only three possible states (monomer, homodimer or heterodimer), there might be other members of the PA-TM-RING family that could also heterodimerize with either RNF13 and/or

RNF167 and thus further change the intracellular dynamics of IDS. The involvement of another member, to be identified, could explain why both exogenous RNF167 monomer and homodimer, as well as endogenous RNF13 monomer and homodimer, increase the underglycosylated form. In addition, while the interaction is predicted to occur around Asn246, RNF13 does not seem to affect this glycosylation site. However, the precursor levels of N246Q co-immunoprecipitated with RNF13 were higher than WT IDS, which was barely detectable (Fig. 5.4). Interestingly, when RNF167 was present, the same form was co-immunoprecipitated, whereas RNF13 species differed from the predominant form in the lysate (Fig. 5.8). Although the predicted model suggested that glycosylation of IDS Asn246 could help stabilize the interaction between IDS/RNF13, contrasting with the experimental results (Fig. 5.4), other post-translational modifications, such as RNF13 glycosylation, were not considered and may play important roles in regulating this interaction. Accordingly, endogenous RNF13 detected in IDS-V5 immunoprecipitated complexes also appears to be underglycosylated (Fig. 5.2L). Importantly, the interaction seems to depend on the cellular context, as shown by changes in the IDS form immunoprecipitated by RNF13, RNF167 or both RNF13/RNF167 (Fig. 5.8). Future studies are needed to elucidate the molecular mechanisms underlying IDS glycosylation and maturation.

In the last few years, RNF13 has gained attention, and multiple new functions have been reported for its cytosolic RING domain (Guo *et al.*, 2023; Lin *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2024b; Miyakawa *et al.*, 2022; Trinh *et al.*, 2025; Wang *et al.*, 2024). Although the RNF13 PA domain remains poorly characterized, it has been demonstrated to be crucial for its lysosomal targeting (van Dijk *et al.*, 2014). More recently, a study suggests that RNF13's N-terminal is the primary signal for lysosomal localization (Trinh *et al.*, 2025). However, this contrasts with our previous work that showed that RNF13 proper localization relies on its C-terminal for a crucial interaction with AP-3 (Fig. 2.1; 2.3; 2.6) (Cabana *et al.*, 2021). Here, we show that IDS or RNF167 expression could affect RNF13's trafficking (Fig. 5.3; 5.8; 5.9). As both proteins most likely interact with the PA domain, it is consistent with the N-terminal being just as important as the C-terminal domain for RNF13 proper localization. Interestingly, while some heterodimeric RINGs, such as BRCA1/BARD1 and Mdm2/MdmX, where the BARD1 and MdmX monomers are inactive (Metzger *et al.*, 2014), RNF13 and RNF167 appear to both be active on their own. Accordingly, the results combining both DN suggest that the E3 ligase activity of RNF13 is sufficient for inducing IDS underglycosylated form, therefore suggesting that RNF167 would act as an "inactive" partner (Fig. 5.10). By using *in vitro* assays to eliminate the possibility of RNF167 dimerizing with RNF13, we have previously revealed that RNF167 possesses intrinsic E3 ligase activity (Ghilarducci *et al.*, 2021). Both the *Drosophila melanogaster* protein Godzilla and the *Caenorhabditis elegans* protein RING-type domain-containing protein are orthologs of human RNF13, RNF167 and ZNRF4 (Cabana et Lussier, 2022). An interesting hypothesis is that these proteins

evolved separately to regulate their spatial and temporal activities, which aligns with our immunofluorescence assays on RNF13 and RNF167 (Fig. 5.8; 5.9). While the C-terminal of RNF13 is important for AP-binding (Fig. 3.3) (Cabana *et al.*, 2024), it is possible that interaction with RNF167 through its PA domain determines whether it binds to AP-1 or AP-3, thereby modulating its trafficking pathway. This interaction could enable the cell to regulate the localization of RNF13, which is involved in multiple cellular pathways, as needed (Cabana et Lussier, 2022; Lin *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2024b; Miyakawa *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2024). For example, when IDS was overexpressed, RNF13 trafficking was delayed (Fig. 5.3).

A brain-specific interactome in mice has identified 187 putative partner proteins of IDS (Cardona *et al.*, 2019). This study suggested that IDS might be involved in multiple cellular processes, including cell growth and intracellular traffic. The present study identified RNF13 as a novel interaction partner of IDS, suggesting mutual importance for each other's lysosomal targeting. The dileucine motif in RNF13 has been recently demonstrated to be critical for its lysosomal targeting (Fig. 2.1; 2.3; 3.7) (Cabana *et al.*, 2021; Cabana *et al.*, 2024). A hot spot of genetic variants surrounding the RNF13 dileucine motif (Taylor *et al.*, 2023) has been associated with severe infantile neurodevelopmental disease, for which the symptoms overlap with MPS II and with many other lysosomal storage diseases. Intriguingly, RNF13 is highly expressed in the organs most affected by Hunter syndrome, such as the respiratory system, gastrointestinal tract, spleen, liver, heart, and brain (Siepe *et al.*, 2023). Considering the complexity of the dynamic interaction between IDS and RNF13, it is possible that multiple cellular pathways could be altered by mutations in one or the other protein in specific tissues. Importantly, the Hunter syndrome phenotype may be a lot more complex than just GAG accumulation in the lysosomes, and our findings underscore the need to explore new research avenues.

CHAPITRE 6
DISCUSSION

La DEE73 est une maladie causée par des mutations hétérozygotes dans le gène *RNF13* qui est extrêmement rare avec, à ce jour, seulement dix variants de la protéine rapportés (Taylor *et al.*, 2023). Nos connaissances sur les conséquences au niveau cellulaire et moléculaire de ces variants se limitent à une sensibilité augmentée face au stress du RE dans des fibroblastes et des lymphoblastes d'un patient avec la mutation L311S (Edvardson *et al.*, 2019). Dans le contexte, l'objectif général de cette thèse était d'identifier et de caractériser des mécanismes cellulaires altérés par les variants L311S et L312P contribuant à la pathophysiologie de la DEE73. Il est important de noter qu'au début de ce projet en 2019, seulement les deux variants originaux étaient connus (Edvardson *et al.*, 2019), expliquant pourquoi nous nous sommes concentrés exclusivement sur ceux-ci. De plus, au niveau des fonctions cellulaires de RNF13, on ne connaissait que son interaction avec IRE1α et son substrat SNAPIN (Arshad *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Bien que certains effets observés sur la prolifération et la migration cellulaire et sur des cultures neuronales lui étaient attribués par des expériences de surexpression ou de répression, les mécanismes sous-jacents n'étaient pas décrits. Dans les trois dernières années, un intérêt grandissant pour cette protéine a permis de mettre en lumière cinq nouvelles fonctions cellulaires pour lesquelles RNF13 est impliqué (Lin *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2024b; Miyakawa *et al.*, 2022; Trinh *et al.*, 2025; Wang *et al.*, 2025). Dans le contexte, le projet décrit dans cette thèse a débuté à l'aveugle, n'ayant pas beaucoup d'indices sur les voies pouvant être affectées par les variants. Néanmoins, le travail de cette thèse a non seulement contribué à l'avancement des connaissances sur la protéine RNF13, mais est toujours le seul à décrire des conséquences moléculaires causées par les deux variants L311S et L312P (Fig. 4.7; 6.1). De plus, nous avons identifié deux nouveaux interacteurs de RNF13, soit RNF167 et IDS, permettant d'ouvrir de nouvelles perspectives quant aux mécanismes régulés par RNF13 (Fig. 4.7; 6.1). Pour faciliter la lecture de cette discussion, il est à noter que, comme nous avons généralement comparé et obtenu des résultats similaires pour les variants L311S et L312P et pour un variant avec un motif dileucine altéré (LL/AA), l'appellation des « variants DEE73 » fera référence à L311S et L312P, alors que « variants dileucine » réfèreront à L311S, L312P et LL/AA.

6.1 La DEE73 : une maladie de surcharge lysosomale ?

6.1.1 L'hypothèse initiale revisitée

L'hypothèse initiale pour expliquer les conséquences phénotypiques des variants L311S et L312P était que ceux-ci présentent un gain de fonction (GOF) menant à une activation accrue de la voie IRE1α (Edvardson *et al.*, 2019). Ce GOF est proposé pour être causé par un nouveau site de phosphorylation pour L311S et par

l'augmentation de la probabilité de phosphorylation (passant de p = 0.56 à p = 0.64) sur la thréonine 309 pour L312P (Edvardson *et al.*, 2019). Dans cet article, les fibroblastes et les lymphoblastes d'un patient avec le variant L311S est comparé à un individu témoin. Les auteurs démontrent par immunobuvardage que les fibroblastes L311S augmentent l'abondance de XBP1s et de c-Jun phosphorylée, mais les différences sont à peine perceptibles puisque les abondances sont très faibles. Par ailleurs, le nombre d'expériences répliquées n'est pas indiqué, ni l'écart ou l'erreur type de la moyenne. De plus, les auteurs ont mesuré l'ARNm de XBP1s et le signal d'annexine pour déterminer les niveaux d'apoptose. Ceux-ci augmentent avec L311S, mais les auteurs normalisent la valeur traitée par la valeur non traitée pour l'individu et L311S de façon indépendante où les valeurs de base seront égales à 1 pour les deux conditions. Bien que la différence entre le témoin et L311S en condition non traitée n'est pas significative (p = 0.088 et 0.263, respectivement), il est possible de voir, en supplémentaire, que les valeurs absolues de L311S représentent environ 75% de la valeur du témoin dans les deux cas. Ceci signifie que la valeur normalisée sera plus augmentée pour L311S comparativement à la valeur absolue et c'est cette différence qui est analysée statistiquement. Curieusement, il semble que les normalisations n'ont pas été faites sur les mêmes expériences puisque les auteurs rapportent avoir fait, pour la cytométrie, trois expériences indépendantes pour comparer les niveaux en condition basale alors que quatre expériences ont été effectuées lors des traitements. Dans le contexte, il pourrait être possible que L311S n'augmente pas l'apoptose en condition de stress du RE, mais, plutôt, tend vers une diminution en condition basale. Par ailleurs, l'étude démontrant l'interaction entre RNF13 et IRE1α obtenait une localisation intracellulaire de RNF13 exclusivement au RE, ce qui contraste avec nos résultats et ceux des plus récentes études (Arshad *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2023; Trinh *et al.*, 2025). Étant donné les différentes localisations, nous avons tenté de reproduire les résultats obtenus précédemment (Arshad *et al.*, 2014). Cependant, nous n'avons pas obtenu de différence au niveau de l'abondance de IRE1α dans des cellules HEK293T/17 exprimant RNF13 WT comparativement à un vecteur vide (voir Annexe A; Fig. 5.7A). De plus, bien que l'expérience n'ait été reproduite que deux fois, nous n'avons également pas obtenu de différence significative entre RNF13 WT et les variants DEE73 (voir Annexe A). Nous avons également confirmé que la localisation de RNF13 n'était pas affectée à la suite de traitements induisant le stress du RE (Fig. 2.S4). Dans nos conditions expérimentales, nos résultats ne supportent pas que cette voie soit celle sous-jacente au développement de la DEE73.

6.1.2 L'effet dominant négatif ou gain de fonction

Comme discuté dans la section 4.6, les maladies hétérozygotes dominantes peuvent être causées par une perte de fonction (LOF), un effet dominant négatif (DN) ou un GOF. La LOF est causée par une haploinsuffisance, signifiant que l'expression d'une seule copie du gène n'est pas suffisante pour assurer la fonction de la protéine (Morrill et Amon, 2019). Comme une étude a rapporté que des mutations

homozygotes du gène *RNF13* causent la sclérose latérale amyotrophique avec une progression lente de la maladie, l'absence complète de l'expression de la protéine ne semble pas aussi dommageable que les mutations hétérozygotes causant la DEE73 (Khani *et al.*, 2023). Nous avions alors émis l'hypothèse que la DEE73 est causée par un effet DN plutôt que par un GOF puisque les résultats obtenus pour les variants dileucine étaient généralement semblables à un mutant DN de l'activité ligase (Fig. 4.7). Il peut être difficile de distinguer si les mécanismes qui causent une pathologie sont causés par l'effet DN ou GOF (Gerasimavicius *et al.*, 2022). L'effet GOF peut provenir de divers mécanismes tels qu'une activation constitutive ou accrue, une meilleure stabilité de l'ARNm ou de la protéine ou une nouvelle activité, tandis que l'effet DN est couramment observé pour les protéines impliquées dans des complexes homomériques où le variant interfère avec l'activité de la protéine WT (Gerasimavicius *et al.*, 2022; Veitia, 2023). Structurellement, les mutations DN sont enrichies aux positions d'interface, car elles affectent principalement les interactions protéine-protéine (Gerasimavicius *et al.*, 2022). Il est aussi intéressant de noter qu'elles sont plus souvent présentes dans la région C-terminale (Badonyi et Marsh, 2023). Plusieurs variants de protéines transmembranaires sont décrits pour avoir un effet DN (Kubisch *et al.*, 1999; McEntagart *et al.*, 2016; Yeromin *et al.*, 2006). C'est notamment le cas de RNF167 dont plusieurs variants ont été rapportés pour avoir des effets DN en modifiant le routage de la protéine WT lorsqu'ils étaient co-surexprimés en cellules (van Dijk *et al.*, 2014). Les résultats présentés dans le chapitre 5 viennent donc appuyer notre hypothèse d'effet DN. En effet, comme la surexpression et la répression de RNF13 WT affectaient la localisation lysosomale de RNF167 (Fig. 5.8; 5.9), il est fort probable que les variants dileucine dont la localisation cellulaire est altérée (Fig. 2.1) modifie également la dynamique de RNF167. Bien que nous n'ayons pas démontré expérimentalement l'homodimère de RNF13, nos résultats ainsi que ceux précédemment publiés par un autre groupe suggèrent fortement son existence (van Dijk *et al.*, 2014). Il y a donc une forte probabilité que la présence hétérozygote d'un variant puisse affecter la localisation et la fonction de RNF13 WT s'ils forment un dimère. Notamment, le « *hotspot* » dans le gène proposé pour causer la DEE73 est dans le dernier exon (Taylor *et al.*, 2023). De façon importante, ceci indiquerait que les variants échappent probablement au mécanisme de dégradation de l'ARNm médiée par le non-sens. Spécifiquement, ce mécanisme permet la dégradation des ARNms aberrants portant des codons-stops prématurés, mais le mécanisme ne reconnaît pas les mutations dans le dernier exon (Kurosaki et Maquat, 2016). Supportant cette hypothèse, plusieurs mutations de *RNF13* causant des protéines tronquées plus tôt dans la séquence protéique sont rapportées sur la base de données ClinVar et ne sont pas considérées comme potentiellement pathogéniques. Cependant, nos résultats indiquent également que RNF13 est normalement dégradé dans les lysosomes (Fig. 5.11) et que la perte du motif dileucine ainsi qu'une répression du complexe AP-3 entraînent une augmentation de l'abondance de la protéine (Fig. 2.4; 3.S7), possiblement par une localisation lysosomale aberrante. Dans le contexte, la stabilité accrue de la protéine fait partie des

critères pour un effet GOF. Par ailleurs, bien que nous n'ayons pas étudié l'activité E3 ligase des variants dileucine, il est attendu que celle-ci soit fonctionnelle, puisque les mutations n'affectent pas le domaine RING. Si RNF13 possède une fonction sur les endosomes précoces/tardifs où les variants sont toujours retrouvés, comme le suggèrent entre autres nos résultats suivant l'internalisation de l'EGF (Fig. 2.2), il est possible que les variants augmentent l'activation de cette voie.

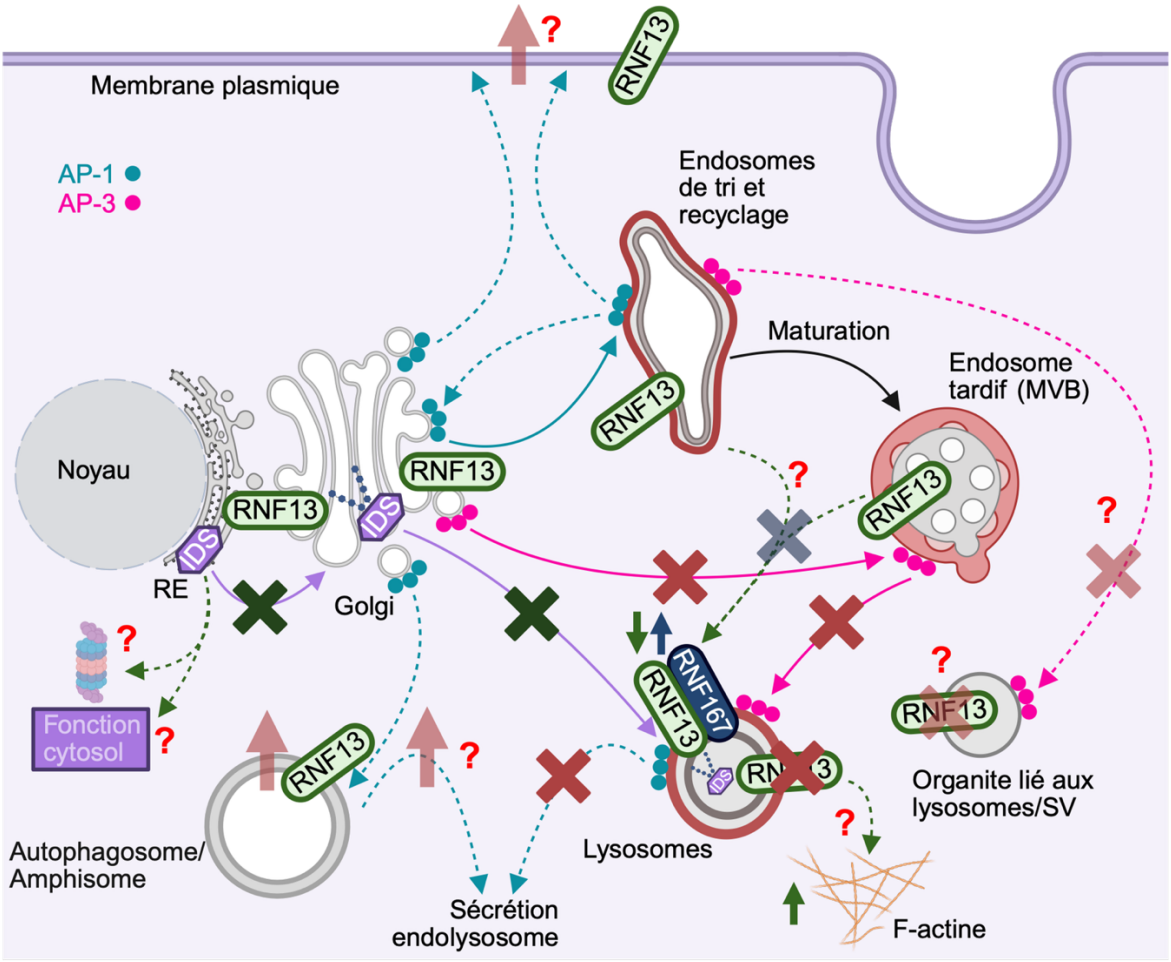


Figure 6.1: Les découvertes et les perspectives ouvertes par les travaux présentés dans cette thèse.

Les flèches pleines représentent les voies caractérisées dans cette thèse et les flèches pointillées sont des voies à confirmer. Les points d'interrogation rouges combinés aux éléments transparents sont des perspectives que notre étude a permis de mettre en évidence et seront discutés dans ce chapitre. Les effets d'une altération du motif dileucine sont représentés en rouge où la taille des vésicules est augmentée et où la présence aux lysosomes est altérée par une perte d'interaction avec AP-3. RNF13 augmente l'actine F dans un mécanisme inconnu, mais pas les variants. Les voies de transport ou le point de départ pour l'hétérodimère entre RNF13 et RNF167 (bleu foncé) ne sont pas connus mais des flèches vertes représentent que RNF13 favorise le ciblage lysosomal, alors que le X bleu représente une diminution par RNF167. IDS (mauve) est synthétisé dans le RE, glycosylé dans le Golgi et transporté vers les lysosomes. RNF13 empêche ce routage et augmente une forme déglycosylée, potentiellement cytosolique. Créée avec BioRender.com.

6.1.3 Les fonctions endolysosomales de RNF13 altérées par les variants

La microcéphalie peut être causée par une augmentation de l'apoptose ou par une diminution du bassin de cellules progénitrices. Nos résultats semblent concorder avec la deuxième option d'un point de vue moléculaire. En effet, nous avons obtenu des résultats semblables pour les expériences en cellules à une précédente étude démontrant que la microcéphalie des souris knock-out de la protéine WDR81 était causée par la différentiation précoce des cellules progénitrices à la suite d'un défaut de routage endosomal (Carpentieri *et al.*, 2022). Spécifiquement, en utilisant des fibroblastes de patients avec des variants de WDR81, ils ont observé des endosomes précoces élargis, en plus d'obtenir une dynamique pour la colocalisation entre l'EGF et EEA1 semblable à ce que nous avons eu dans nos essais (Fig. 2.2) (Carpentieri *et al.*, 2022). WDR81 est important pour réguler la fusion et la maturation des endosomes où une répression favorise la fusion homotypique des endosomes précoces au dépend de la maturation en endosomes tardifs (Liu *et al.*, 2016b). Récemment, l'expression de RNF13 a été liée à l'inhibition de la maturation lysosomale après l'induction de la voie de signalisation des TLRs dans des macrophages en favorisant la dégradation de Lamp1 (Liu *et al.*, 2024b). Plus précisément, l'étude a rapporté une augmentation des niveaux de EEA1 et Rab5, combinée à une diminution de l'abondance de Rab7 et Lamp1, en présence de RNF13 WT (Liu *et al.*, 2024b). Cependant, nous n'avons pas pu reproduire ces résultats dans les cellules HEK293T/17 dans des conditions basales, et nos résultats ont principalement donné des résultats opposés (voir Annexe A). En effet, en présence de RNF13 WT, l'abondance de Rab5 était significativement réduite, alors qu'il y avait seulement une légère diminution de Rab7 et augmentation de Lamp1, toutes les deux non significatives (voir Annexe A). Curieusement, le poids moléculaire de Lamp1 observé dans l'étude précédente était d'environ 75-80 kDa, ce qui diffère de la taille attendue d'environ 90-120 kDa. De façon intéressante, la forme Lamp1 de 75 kDa est la forme prédominante dans les tissus du SNC (Cawley *et al.*, 2020). Spécifiquement, la complexité de la *N*-glycosylation est grandement réduite comparativement à celle trouvée dans les tissus périphériques, ce qui se traduit par un poids moléculaire plus faible (Cawley *et al.*, 2020). Étant donné qu'une glycosylation extensive protège Lamp1 de la dégradation (Kundra et Kornfeld, 1999), il est possible que seule la forme de 75 kDa puisse être ubiquitinée et dégradée par RNF13. Ceci pourrait expliquer pourquoi une réduction de l'expression de Lamp1 n'a pas été observée dans nos résultats (voir Annexe A). De plus, la voie de signalisation rapportée a été étudiée dans des conditions de réponse immunitaire déclenchée par l'activation de TLRs, ce qui pourrait être une condition préalable à l'ubiquitination de Lamp1 par RNF13 (Liu *et al.*, 2024b). La transition des endosomes précoces aux endosomes tardifs est caractérisée par le remplacement de Rab5 par Rab7. La diminution de l'abondance de Rab5 et le léger effet sur Rab7 et Lamp1 observés en présence de RNF13 WT peuvent suggérer une maturation lysosomale favorisée, probablement au stade des endosomes tardifs (voir Annexe A). De façon importante, les variants DEE73 présentent des résultats similaires avec une diminution de Rab7 plus

marquée et significative, compatible avec une fonction aux endosomes tardifs puisqu'ils s'y localisent par la voie AP-1 (voir Annexe A; Fig. 4.1). Cependant, ceci ne tient pas compte de la fonction ou de la population lysosomale. Spécifiquement, RNF13 a récemment été démontré pour favoriser le positionnement périnucléaire des lysosomes en condition d'autophagie par la dégradation de Arl8b, tout comme RNF167 en condition basale (Deshar *et al.*, 2016; Trinh *et al.*, 2025). Comme discuté dans la section 4.6, nos résultats obtenus en neurones peuvent indiquer une altération du transport rétrograde en présence des variants dileucine, basée sur le changement de distribution où la proportion du nombre de points de EEA1 était augmentée alors qu'une diminution totale de Lamp1 était observée dans la section proximale (Fig. 4.3; 4.4). Si les variants n'étant pas aux lysosomes altèrent le transport rétrograde de ceux-ci, le remplacement de Rab5 par Rab7 pourrait être possible dans la section distale uniquement, ce qui concorde avec nos résultats. À l'inverse, RNF13 WT diminuait globalement la quantité de EEA1, mais changeait la proportion de Lamp1 pour augmenter la présence distale, ce qui va à l'encontre du mécanisme proposé ci-haut. Cependant, ce résultat est accompagné d'une augmentation du nombre de points de PSD-95 (Fig. 4.3-4.5). L'activité synaptique module le trafic lysosomal dans les dendrites distales où les lysosomes sont recrutés à la base des épines dendritiques activées et où des parcelles d'actine F sont retrouvées pour créer une barrière physique qui bloque efficacement les lysosomes à proximité des synapses excitatrices (Goo *et al.*, 2017; van Bommel *et al.*, 2019). Comme nous avons démontré que RNF13 augmente l'abondance de l'actine F (Fig. 3.8), il semble plausible que Lamp1 puisse être recruté dans les dendrites distales en raison d'une activité synaptique accrue, appuyée par l'augmentation de PSD-95, dont le transport est ensuite contrôlé par la polymérisation d'actine F. Bien que tous ces mécanismes soient spéculatifs, ils peuvent nous guider vers de possibles altérations cellulaires engendrées par les variants causant la DEE73.

Par ailleurs, les fonctions de RNF13 récemment rapportées peuvent nous donner d'autres pistes à creuser. Par exemple, il est maintenant connu que RNF13 dégrade STING alors que celui-ci active mTORC1 pour restreindre la lipophagie (Lin *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2022a). La signalisation de STING débute au TGN où il est enveloppé dans des CCVs par AP-1 pour être transporté dans le système endolysosomal afin d'être dégradé (Liu *et al.*, 2022b). Comme mentionné dans le paragraphe précédent, il est attendu que les variants dileucine conservent leur fonction avec une activité E3 ligase intacte, en plus d'être transporté par AP-1 (Fig. 3.7; 4.1). Il est possible que la proximité des variants de RNF13 avec TRIM29/STING promeut la dégradation de ce dernier, menant à une diminution de l'activation de mTORC1. De plus, nous savons aussi que RNF13 et RNF167 forment un hétérodimère putatif et, bien que l'on ne connaisse pas les fonctions associées, la distribution des deux protéines individuelles est modifiée (Fig. 5.8; 5.9). Dans le contexte, RNF167 est aussi connu pour moduler l'activité de mTORC1 (Li *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). De façon importante, il est connu que l'activité de mTORC1 est liée aux maladies neurodéveloppementales, si bien

qu'il existe une classe de maladies nommée mTORopathie (Nguyen et Bordey, 2021). Il serait intéressant de déterminer si la présence des variants DEE73 de RNF13 affecte l'activité de mTORC1, ce qui pourrait être une cause sous-jacente de la microcéphalie. Cependant, RNF13 a aussi été rapporté pour induire la xénophagie à l'aide de LGALS9 et p62 (Miyakawa *et al.*, 2022). L'interaction entre RNF13 et LGALS9 avait précédemment été identifiée lors d'analyse de spectrométrie de masse où LGALS1 et LGALS8 ont également été enrichis (Huttlin *et al.*, 2021; Huttlin *et al.*, 2017; Huttlin *et al.*, 2015). De façon intéressante, ces trois galectines sont connus pour enclencher le processus de lysophagie lorsque les lysosomes sont endommagés en se liant à la glycosylation des protéines transmembranaires, ce qui permet de stimuler l'ubiquitination et le recrutement de p62 (Hoyer *et al.*, 2022). Puisque la mécanistique derrière l'induction de la xénophagie par RNF13 est la même où la liaison de LGALS9 induit l'autoubiquitination de RNF13, il est possible d'émettre l'hypothèse que RNF13 pourrait également réguler la lysophagie (Miyakawa *et al.*, 2022). Dans cet article, les auteurs n'ont pas décrit la dynamique impliquant la localisation cellulaire. Sachant que RNF13 nécessite p62 pour recruter les vésicules positives à LC3, il est probable que l'action de RNF13 se fasse à partir des endosomes ou des lysosomes plutôt que sur le phagophore directement. Dans ce contexte, les variants n'étant pas localisés aux lysosomes risquent d'entraver les fonctions liées à l'autophagie. Cependant, STING est également rapporté pour être un inducteur de l'autophagie. De façon intéressante, alors que son interaction avec p62 mène à sa dégradation autophagique pour atténuer sa voie de signalisation (Prabakaran *et al.*, 2018), STING a été démontré pour induire l'autophagie non canonique où p62 est dispensable (Liu *et al.*, 2019a) et est proposé pour être un nouveau récepteur d'autophagie (Zhang *et al.*, 2021b). Dans le contexte, il n'est pas possible d'exclure la localisation de RNF13 sur les autophagosomes directement s'il est impliqué dans une voie non canonique. De plus, comme le complexe AP-1 régule la formation de l'autophagosome du TGN (Guo *et al.*, 2012) et que l'export du TGN des variants dileucine est dépendent de AP-1 (Fig. 3.7; 4.1), il est possible qu'ils s'y accumulent et, à l'inverse de la proposition mentionnée plus haut, puissent en réalité augmenter l'autophagie. Pour tester ces hypothèses, nous avons regardé la colocalisation de RNF13 WT et LL/AA avec le marqueur LC3 dans des cellules HeLa transfectées. De façon intéressante, la colocalisation du variant LL/AA est augmentée en condition basale par rapport au WT (voir Annexe B). Cependant, l'inhibition de la dégradation lysosomale par CQ et BafA1 augmente la colocalisation de la protéine WT, mais pas celle de LL/AA (voir Annexe B). Comme les traitements inhibent la fusion entre les lysosomes et les autophagosomes, il est probable que RNF13 WT soit transporté directement sur les autophagosomes lorsque la fonction lysosomale est altérée. Ceci serait consistent avec la colocalisation plus élevée du variant en condition basale si la voie AP-1 permet ce transport (voir Annexe B). En revanche, il est aussi possible que la présence de LL/AA, ou des variants L311S et L312P, altère la fusion et/ou la dégradation, ce que notre étude n'a pas déterminé.

6.2 Les limites de portée et contraintes expérimentales de l'étude

6.2.1 L'activité E3 ubiquitine ligase des variants et les autres domaines de RNF13

Comme mentionné plus haut, nous n'avons pas évalué l'activité ligase des variants. Une récente étude rapporte que le variant L311S a une activité E3 ligase intacte tout comme un variant semblable à LL/AA où la glutamine en position 307 a également été mutée (ELL/AAA) (Trinh *et al.*, 2025). Curieusement, dans cette étude, le variant L312P se comporte comme un mutant DN (C243S), perdant l'activité ligase. De plus, les auteurs indiquent que les variants ELL/AAA et L311S colocalisent avec Lamp1, bien que ces résultats ne soient pas quantifiés (Trinh *et al.*, 2025). Par ailleurs, la morphologie et l'expression du marqueur semblent très différentes par rapport à une cellule non transfectée dans le même champ d'image, contrairement à RNF13 WT (Trinh *et al.*, 2025). Comme nous avons démontré que les variants dileucine peuvent toujours être localisé dans des compartiments positifs à Rab7, mais qu'il y a une réduction de la colocalisation avec Lamp1 (Fig. 2.1; 2.3), il serait intéressant de comparer les quantifications de ce qu'ils ont obtenu pour confirmer ce qu'ils avancent par rapport à la localisation lysosomale. Pourquoi cette étude a obtenu des résultats différents pour L312P par rapport à nos résultats n'est pas évidente. Dans nos conditions, un effet semblable entre L311S et L312P a été observé sur ce que nous avons quantifié à ce jour. Comme mentionné dans la section 1.2.2.1, une mutation silencieuse peut parfois avoir des conséquences physiologiques. Les séquences utilisées pour créer l'ADNp n'étant pas fournises dans cet article, il n'est pas possible de savoir si nos constructions contiennent une séquence identique. Si l'ADNc du plasmide utilisé contient une optimisation des codons différente, la conformation, l'expression ou même la fonction de la protéine peuvent avoir été modifiées (Mauro et Chappell, 2014; Ronzitti *et al.*, 2016). De plus, dans l'article, les auteurs démontrent également que le mutant C243S est mal localisé, contrairement à nos résultats (Fig. 5.10). Ceci peut s'expliquer par la mutation utilisée qui n'était pas la même (C258AH260A). Dans tous les cas, il est possible d'observer un phénomène étonnant lorsque RNF13 perd son activité ligase. En effet, il se présente différemment par immunobuvardage où on peut distinguer une bande et/ou une traînée de poids moléculaire (MW) plus élevé (~75-80 kDa) et une augmentation de l'abondance par rapport au WT (Fig. 5.10). Surtout, cet effet est consistent puisque le variant L312P sans activité ligase et les mutants DN C243S, C243Y et C243W caractérisés dans diverses études présentent tous ce profil (Arshad *et al.*, 2013; Trinh *et al.*, 2025; van Dijk *et al.*, 2014). Il en est de même pour un variant dont la mutation est située dans le domaine RING (L244A), bien que l'effet sur l'activité ligase ne soit pas connu (Senecal *et al.*, 2025). Curieusement, des constructions retirant les acides aminés 220 à 233 et 205 à 237 de RNF13 WT n'ont pas d'activité ligase et présentent des abondances similaires entre elles, augmentées par rapport à RNF13 WT. En revanche, seulement le retrait de 220-233 permet d'obtenir la bande à ~75-80 kDa (Trinh *et al.*, 2025). Ceci signifie que l'obtention de cette bande n'est pas seulement causée par l'augmentation de l'abondance par une perte d'auto-dégradation. De façon intéressante, ce profil n'est pas obtenu pour les variants dileucine

dans nos conditions, ni pour le L311S et le ELL/AAA de la récente étude qui démontre que leur activité ligase est semblable au WT (Fig. 2.4; 3.4; 4.1) (Trinh *et al.*, 2025). De plus, alors que les variants dileucine présentent une abondance d'environ 1.5 fois celle du WT (Fig. 3.S7; voir Annexe A), possiblement parce qu'ils ne sont pas adéquatement dégradés par les lysosomes, nous devons ajuster la quantité d'ADN transfectée du DN afin de normaliser l'expression. En effet, seulement un quart est utilisé par rapport à la quantité pour le WT. Ceci signifie que le DN s'accumule significativement plus que les variants dileucine où la transfection est effectuée comme le WT. Nous l'avons notamment observé lors de nos premiers essais où la quantité n'était pas encore ajustée. L'activité ligase est donc critique pour la dégradation de RNF13, possiblement dû à son autoubiquitination, bien que nous ne puissions pas nous avancer sur le type de dégradation en cause. Le système UPS se base sur l'ubiquitination, mais l'interaction avec p62 la nécessite également, tout comme le complexe ESCRT pour trier les protéines dans les ILVs, et ces deux mécanismes convergent vers la protéolyse lysosomale. Il serait tentant d'assumer que la protéolyse lysosomale ne soit pas en cause étant donné le profil des variants dileucine et l'hypothèse comme quoi ils ne sont pas bien dégradés par les lysosomes. Cependant, nos résultats ne permettent pas de conclure que les variants ne s'y rendent absolument jamais au cours de leur vie, ils pourraient être seulement retardés en passant par une voie de routage alternative. Par exemple, en passant par la voie AP-1, ils devraient pouvoir se situer aux autophagosomes, comme le suggèrent nos résultats préliminaires du variant LL/AA (voir Annexe B). De plus, si leur activité ligase est intacte, ils devraient tout de même pouvoir effectuer des fonctions dans les compartiments cellulaires où ils se localisent. À l'inverse, le DN est bien localisé aux lysosomes (Fig. 5.10), mais nous ne connaissons pas l'étendue des dommages que sa perte de fonction peut entraîner. Non seulement il pourrait s'accumuler par une aberrance au niveau de sa dégradation, mais s'il contrevient au positionnement, à l'acidification et à la fusion des autophagosomes et des lysosomes (Trinh *et al.*, 2025), l'accumulation de plusieurs autres protéines pourrait altérer les deux systèmes de dégradation. En effet, il a été démontré qu'une insuffisance de l'autophagie compromet le système UPS, car p62 y redirige ses substrats, ce qui sature le protéasome (Liu *et al.*, 2016c). La dégradation du DN pourrait être d'autant plus compromise dans ces conditions. Finalement, bien que ça ne constitue pas une mesure de l'activité, le profil d'expression des variants dileucine en comparaison avec le DN peut suggérer que leur activité ligase est conservée. Les observations restent circonstancielles et se doivent quand même d'être confirmées.

En plus de la bande/traînée supplémentaire à ~75-80 kDa pour le DN, nous observons une très légère augmentation (~2-3 kDa) du MW des deux principales bandes (~58-62 kDa) de RNF13 (Fig. 5.10). En comparaison, une diminution de la même taille est observée pour RNF13 WT lorsque RNF167 est présent (Fig. 5.8). Par nos essais enzymatiques pour digérer la *N*-glycosylation présenté dans les chapitres précédents, il est possible de voir une certaine diminution du MW avec l'enzyme Endo H (Fig. 3.4; 4.1),

qui semble correspondre à la bande la plus basse obtenue avec RNF167 (Fig. 5.8). Ces changements de MW pourraient donc constituer des changements au niveau de la *N*-glycosylation en présence de RNF167 ou pour RNF13 DN. Malheureusement, les essais enzymatiques n'ont pas été performés sur ces conditions pour confirmer les observations. Dans le cas de RNF167, comme l'interaction entre les protéines est prédite pour impliquer le domaine intraluminal *protease-associated* (PA), il ne serait pas étonnant que la glycosylation soit modifiée. Par ailleurs, il est connu qu'une glycosylation extensive est souvent présente sur les protéines lysosomales afin de les protéger contre la dégradation (Sabry *et al.*, 2023). Comme RNF167 diminue la localisation de RNF13 aux lysosomes, il est plausible qu'il y ait une diminution du besoin d'arborer des chaînes plus complexes. Pour le DN, les résultats sont plus intrigants. Comment une mutation dans le C-terminal affecterait la glycosylation d'un site situé de l'autre côté de la membrane ? Comme la bande à ~75-80 kDa est peu présente pour RNF13 WT, il est difficile de la suivre sur lors des essais enzymatiques (Fig. 3.4; 4.1). Cependant, une traînée est toujours visible après la digestion avec la PNGase F, qui devrait digérer tous les types de *N*-glycosylation (Fig. 3.4; 4.1). De façon intéressante, une ancienne étude démontre que la bande à ~80 kDa est sensible à la chondroïtinase, suggérant que RNF13 est en réalité un CSPG (Bocock *et al.*, 2009). Une espèce à ~65 kDa était obtenue à la suite de la digestion, suggérant que les sites de *N*-glycosylation étaient toujours présents (Bocock *et al.*, 2009). Si la bande obtenue pour les variants sans activité ligase (Fig. 5.11) (Arshad *et al.*, 2013; Trinh *et al.*, 2025; van Dijk *et al.*, 2014) est bien causée par des chaînes de CS, ceci pourrait indiquer que l'expression de surface de RNF13 DN est plus grande par rapport au WT. Comme les mutants utilisés dans la littérature sont principalement utilisés pour démontrer la spécificité de l'ubiquitination sur un substrat, peu de caractérisation a été faite sur ceux-ci. Une étude récente caractérise le L244A pour altérer l'interaction avec Arl8b. Spécifiquement, ce variant présente la bande à ~80 kDa et sa localisation est augmentée aux endosomes précoces par rapport au WT, sans changement pour sa localisation aux endosomes tardifs et aux lysosomes (Senecal *et al.*, 2025). Comme sa bande principale, tout comme le DN dans cette thèse (Fig. 5.10), a une intensité similaire à celle du WT, il est possible de conclure que la bande qui apparaît à ~80 kDa s'ajoute à l'abondance de base. En d'autres termes, il devait y avoir la même quantité de RNF13 variant et WT dans les compartiments tardifs de la voie endolysosomale, ce qui est compatible avec les résultats de colocalisation obtenus (Fig. 5.10) (Senecal *et al.*, 2025). De façon importante, alors que nous avions suggéré que l'activité E3 ligase de RNF13 influençait seulement partiellement le mécanisme cellulaire impliqué dans la diminution de l'abondance de Gephyrin (Fig. 4.6), il est possible de discuter de cette hypothèse. En effet, une autophagie déficiente dans les cerveaux de souris cause une réduction de l'expression de surface des récepteurs GABA qui est dépendante de p62 (Hui *et al.*, 2019). Dans le contexte, si le système endolysosomal est compromis par les variants dileucine et/ou la perte de l'activité ligase, il est possible que ce soit la cause de la diminution de l'abondance de Gephyrin (Fig. 4.6). Cependant, l'augmentation de chaînes de CS sur RNF13 DN pourrait

compenser cet effet en contribuant à la formation des PNNs et en stabilisant la MEC autour du soma (Sorg *et al.*, 2016). Cette hypothèse serait compatible avec le fait que sa présence n'entraîne pas de diminution de l'abondance spécifiquement dans les dendrites proximaux où les PNNs sont retrouvés (Fig. 4.6). Comme notre étude a été faite avec des cultures primaires de neurones d'hippocampe, les cellules gliales sont majoritairement absentes alors que, par exemple, la brévicane a été identifié pour provenir de celles-ci (John *et al.*, 2006). De plus, les astrocytes sont la principale source d'acide hyaluronique dans le cerveau et des co-cultures de neurones corticaux et d'astrocytes démontrent que les neurones ne le produisent pas (Fowke *et al.*, 2017). Cependant, une étude a démontré qu'une culture enrichie de neurones corticaux, donc sans cellule gliale, compensent en synthétisant l'acide hyaluronique rapidement dans le développement où plus de 90% des neurones sont positifs rendu à DIV7 (*day in vitro* 7) (Fowke *et al.*, 2017). Une autre étude faite avec des cultures de neurones d'hippocampe démontre que ceux-ci sont sensibles à la hyaluronidase et qu'une digestion de l'acide hyaluronique par cette enzyme augmente les courants excitateurs et l'excitotoxicité (Hayashi *et al.*, 2019). La MEC des cultures neuronales, malgré qu'elle puisse être moins complexe, semble tout de même importante. Dans notre contexte, une addition de chaînes de CS par RNF13 DN pourrait d'autant plus être bénéfique. Bien que cette hypothèse soit grandement spéculative, il serait intrigant d'étudier comment la glycosylation de RNF13 modifie sa dynamique intracellulaire.

RNF13 a été rapporté pour subir une protéolyse, donnant plusieurs fragments différents (Bocock *et al.*, 2009). En effet, nous observons plusieurs bandes même après un traitement de PNGase F, suggérant que la *N*-glycosylation n'est pas responsable de toutes les bandes détectées par immunobuvardage (Fig. 3.4; 4.1). Notamment, nous obtenons le fragment intracellulaire soluble à ~36 kDa précédemment rapporté, ainsi que le fragment membranaire C-terminal de ~39 kDa (Fig. 3.4; 4.1) (Bocock *et al.*, 2009). Le fragment soluble a été démontré pour avoir une activité E3 ligase intacte *in vitro* (Bocock *et al.*, 2009). On pourrait alors penser que la protéolyse permet à RNF13 d'élargir son nombre de substrats puisque celle-ci permet au fragment d'être libéré de la membrane. Il a d'ailleurs été suggéré que cette forme pourrait transloquer dans le noyau, notamment puisque C-RZF, la protéine orthologue du poulet, est localisé au noyau et que RNF13 possède un signal de localisation nucléaire (Bocock *et al.*, 2009). Pour supporter cette hypothèse, quelques facteurs de transcription ont été identifiés comme interacteurs de RNF13, telle que NR2F1 qui est impliquée dans le neurodéveloppement et dont des mutations causent des symptômes similaires à la DEE73 (Bertacchi *et al.*, 2025; Huttlin *et al.*, 2021; Huttlin *et al.*, 2015). Curieusement, les variants dileucine présente une légère élévation du MW des fragments membranaire et soluble (Fig. 3.4; 4.1). De plus, dans les conditions des expériences combinant RNF13, RNF167 et IDS, l'expression de RNF13 est réduite par rapport aux autres expériences puisque la quantité d'ADN est divisée lors des co-transfections. Dans ce contexte, le fragment soluble n'est pas détectable pour RNF13 seul ou avec IDS, alors qu'il apparaît en présence de

RNF167 (Fig. 5.8). Lors des essais de co-immunoprécipitation avec les billes HA pour enrichir RNF13, les deux formes sont détectables dans les conditions avec RNF167 (non montré). Lorsque RNF167 est immunoprécipité, la forme membranaire de ~39 kDa de RNF13 est particulièrement enrichie, en comparaison à son abondance totale (Fig. 5.8). Il y a également une très faible présence de la forme soluble (Fig. 5.8). Ces résultats suggèrent que non seulement le domaine PA ne semble pas obligatoire pour l'interaction, les domaines C-terminaux peuvent aussi interagir, contrairement à ce qu'a prédit AlphaFold (Fig. 5.8). Cependant, il est possible qu'une fois clivé, le fragment soluble puisse se positionner différemment afin de permettre l'interaction. Dans l'article original décrivant la protéolyse de RNF13, les auteurs proposent que le clivage pourrait être similaire à celui de la protéine membranaire Notch (Bocock *et al.*, 2009). La protéolyse de Notch est effectuée par la γ-sécrétase qui libère un fragment cytosolique, qui peut également transloquer dans le noyau, lui permettant d'agir sur de multiples voies de signalisation telles que NF-κB, mTORC, AKT ou Wnt (Zhou *et al.*, 2022). Une étude a démontré que le clivage peut se faire à deux sites près l'un de l'autre, soit entre G1743/V1744 ou L1746/S1747 (séquence murine), où la valine en N-terminal donne un fragment stable alors que la sérine cause une dégradation rapide par le protéasome (Tagami *et al.*, 2008). Un fait particulièrement intrigant est que Notch possède un motif dileucine et nécessite AP-3 pour son transport lysosomal sans lequel il s'accumule sur les endosomes tubulaires (Zheng *et al.*, 2012). Le clivage aux lysosomes permet de produire le fragment stable alors que la localisation endosomale entraîne le fragment rapidement dégradé, ce qui atténue sa voie de signalisation (Zheng *et al.*, 2012). Alors que nous pensions que la surexpression de RNF167 diminue la présence de RNF13 aux lysosomes (Fig. 5.8; 5.9), une hypothèse alternative où la détection diminue parce que RNF167 stimulerait un clivage stable aux lysosomes pourrait être discutée. De façon importante, comme ces fragments ont une légère augmentation de MW pour les variants dileucine et que le transport endosomal est altéré de façon similaire à Notch lorsque le motif dileucine est altéré (Zheng *et al.*, 2012), il serait d'autant plus d'intérêt d'étudier les fonctions cellulaires régulées par ce fragment cytosolique et/ou nucléaire.

6.2.2 Les isoformes de RNF13

Une limitation de cette étude est qu'elle s'est intéressée seulement à une isoforme de RNF13. Dans la base de données de NCBI, on rapporte qu'il y a 25 transcrits d'ARNm donnant quatre protéines différentes (isoforme X1 (RNF13-a), isoforme 3 (RNF13-b), isoforme 4 (RNF13-c) ou isoforme X2 (RNF13-d)). RNF13-a correspond à la protéine pleine longueur (381 acides aminés), alors que pour RNF13-b, les 18 premiers acides aminés sont modifiés, puis ceux de 19 à 137 sont manquants (total 262 acides aminés). RNF13-c fait 250 acides aminés et débute avec la méthionine 132 de la séquence canonique (acides aminés 132 à 381). Finalement, RNF13-d, la plus courte isoforme, possède les acides aminés 203 à 381 de la protéine pleine longueur et 14 acides aminés différents en N-terminal (total 193). Cela dit, aucune étude à

ce jour n'a comparé la fonction, l'expression tissulaire ou la localisation intracellulaire des isoformes. En comparaison, RNF167 a six isoformes (RNF167-a à RNF167-f), dont une a été caractérisée. En effet, une étude a démontré que RNF167-b est localisée dans le cytosol plutôt que dans le système endolysosomal puisque cette isoforme n'a pas les 35 premiers acides aminés de RNF167, qui constitue le signal peptide (Nair *et al.*, 2020). En conséquence, alors que RNF167-a (350 acides aminés) induit le positionnement périnucléaire des lysosomes et inhibe l'exocytose lors de dommage à la MP, RNF167-b (315 acides aminés) permet, à l'inverse, d'augmenter l'exocytose lysosomale (Nair *et al.*, 2020). Curieusement, un immunobuvardage démontre que RNF167-b est glycosylé, indiquant qu'il doit passer par le RE (Nair *et al.*, 2020). De façon intéressante, une étude a démontré que des isoformes perdant le SP peuvent tout de même être transmembranaires et peuvent parfois changer de catégorie (type I -> type II) (Davis *et al.*, 2006). L'outil DeepTMHMM a permis de prédire que RNF167-b est une protéine transmembranaire sans SP en conservant son C-terminal cytosolique, donc de type III (Hallgren *et al.*, 2022). Dans le contexte et comme les auteurs n'ont pas utilisé de marqueur pour comparer la localisation cellulaire de RNF167-b, il serait intéressant de déterminer si l'aspect diffus qu'ils ont considéré comme étant du cytosol ne serait pas en réalité du RE (Nair *et al.*, 2020). Ceci est d'intérêt puisqu'en n'ayant que les 35 premiers acides aminés en moins, il y a des chances qu'il puisse toujours interagir avec RNF13. Sachant que RNF167-a modifie la localisation lysosomale de RNF13 alors que les deux protéines sont généralement retrouvées dans ce compartiment (Fig. 5.8), il serait intéressant de déterminer si RNF167-b maintient RNF13 dans le RE. Pour RNF13, l'outil DeepTMHMM prédit que ces trois isoformes non canoniques sont également des protéines transmembranaires de type III puisqu'elles n'ont plus de SP (Hallgren *et al.*, 2022). Alors que RNF13-a, -b et -c conservent les mêmes résidus pour former l'hélice TM (total 21 acides aminés), RNF13-d modifie sa séquence N-terminal et conserve un seul résidu partagé (I203) avec les autres isoformes (total 15 acides aminés). Curieusement, à l'exception de ce domaine, RNF13-d serait équivalent au fragment membranaire discuté plus haut. Notamment, il n'existe pas de motif de reconnaissance pour la γ-sécrétase, mais une étude récente compile les séquences des 23 substrats dont les sites sont connus pour établir une probabilité des acides aminés aux positions autour du site (Breimann *et al.*, 2025). De façon intéressante, 8 des 10 acides aminés situés à la fin du domaine TM de RNF13-a, -b et -c correspondent et sont bien positionnés par rapport à ceux rapportés (Breimann *et al.*, 2025). Comme la γ-sécrétase nécessite un court domaine en N-terminal, les substrats sont préalablement clivés, ce qui est le cas pour RNF13 (Fig. 3.4; 4.1) (Breimann *et al.*, 2025). Si RNF13 est bien un substrat de la γ-sécrétase, la redondance entre RNF13-d et le fragment membranaire des autres isoformes pourrait permettre d'assurer le maintien d'au moins une forme membranaire C-terminal puisque les acides aminés modifiés dans le domaine TM ne correspondent plus à ceux conservés chez les substrats de l'enzyme (Breimann *et al.*, 2025). De plus, contrairement à RNF167-b, aucune des isoformes de RNF13 ne conserve un domaine PA complet (acides aminés 65 à 160 sur RNF13-a). Comme le domaine

PA est important pour la localisation lysosomale (van Dijk *et al.*, 2014), ces isoformes pourraient être résidentes du RE, bien que cette assomption soit seulement hypothétique. Il se pourrait aussi que la perte complète du domaine (RNF13-d) outrepasse l'effet d'une mutation, n'ayant plus de domaine d'interaction intraluminale. De façon importante, puisque les mutations génétiques causant la DEE73 se retrouvent dans le dernier exon et que les isoformes partagent tous les mêmes C-terminaux, les quatre isoformes devraient être affectées. Ceci est confirmé par les rapports de polymorphisme nucléotide disponible dans la section SNP de la base de données de NCBI où, par exemple, une des mutations rapportées (c.932T>C) (Edvardson *et al.*, 2019) encode les variants L311S (RNF13-a), L192S (RNF13-b), L180S (RNF13-c) et L123S (RNF13-d).

6.2.3 Les modifications post-traductionnelles

Alors que RNF13 est un joueur critique pour l'ubiquitination de protéines, incluant lui-même, comment les autres PTMs le régulent et par quels mécanismes ? Dans la base de données de PhosphoSitePlus, il est possible de voir que dix sites de phosphorylation sont identifiés et retrouvés dans des régions clés, comme le domaine RING, les régions régulatrices et le motif dileucine (Hornbeck *et al.*, 2015). Comment ceux-ci s'intègrent et influencent les fonctions de RNF13 est toujours à déterminer. En plus de ses cinq sites d'ubiquitination dans le domaine RING, deux sont retrouvés dans le domaine PA (Hornbeck *et al.*, 2015). Ceci est particulier, sachant qu'il ne peut pas être ubiquitiné ailleurs que dans le cytosol ou le noyau. Il pourrait certainement l'être dans le cytosol s'il est rétrotransloqué lors du processus ERAD. Cependant, il y a aussi un site de *O*-GlcNAcylation identifié dans le domaine PA (Levine *et al.*, 2018; Vang *et al.*, 2024). Comme discuté dans la section 1.2.4.2.2, ce type de *O*-glycosylation est particulier quant à sa localisation cytoplasmique et nucléaire. Dans le contexte, il serait intéressant de déterminer si RNF13 pourrait être transloqué dans le noyau en tant que récepteur, ce qui avait été suggéré à la suite de sa détection sur la membrane nucléaire interne après un traitement de PMA (Bocock *et al.*, 2010; Bocock *et al.*, 2011). Par exemple, l'EGFR est classiquement utilisé pour étudier la fonction lysosomale puisqu'il est généralement internalisé et dégradé à la suite d'un stimuli (Wang *et al.*, 2010). Cependant, dans certaines situations, il peut également être acheminé vers le Golgi, puis le RE, avant de terminer dans le noyau (Wang *et al.*, 2010). À la membrane nucléaire interne, il interagit avec Sec61 qui le retire de la membrane et le relâche dans le noyau où il forme des complexes de facteurs de transcription qui se lient aux promoteurs de certains gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la réponse inflammatoire (Brand *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2024a). Il peut également agir en tant que kinase dans le noyau pour promouvoir des voies de signalisation telles que la prolifération cellulaire et la réparation de l'ADN (Zhu *et al.*, 2024a). Pour RNF13, Bocock *et al* avait démontré la nécessité de Rab11 pour sa localisation à la membrane nucléaire (Bocock *et al.*, 2010). Bien que Rab11 dirige les vésicules vers la MP, donc dans le sens inverse du transport vers le noyau, il a été

démontré pour être critique, en partenariat avec Rab5, pour l'activation de transcription de gène à la suite de l'endocytose de TrkB induit par BDNF puisqu'il permet le recyclage des récepteurs à la MP (González-Gutiérrez *et al.*, 2020). Notamment, Rab11 est lié au transport en provenance du TGN vers la MP des vésicules recouvertes par AP-1 et une répression du complexe altère la localisation endosomale de Rab11 (Duncan, 2022; Parmar et Duncan, 2016). Comme l'envoi vers le noyau de RNF13 nécessitait également la synthèse de nouvelles protéines et ne provenait pas du bassin endosomal (Bocock *et al.*, 2010), une perspective serait de déterminer si RNF13 est transporté à la MP à la sortie du TGN par AP-1/Rab11 où il pourrait être internalisé puis transporté jusqu'au noyau dans une voie similaire à l'EGFR.

6.2.4 Les diverses voies de routage

Bien que nous ayons décrit comment la perte du motif dileucine altère l'interaction avec le complexe AP-3 et la diminution conséquente de la présence aux lysosomes, une autre limitation de cette thèse est que nous nous sommes concentrés seulement sur le routage vers les endosomes tardifs lorsque nous avons caractérisé le complexe AP-1. Comme discuté dans la section 2.6, il existe des motifs dileucine qui sont spécifiques aux différents complexes AP et la spécificité semble dicter par les résidus entre la première leucine et l'acide aminé acide (Bonifacino et Traub, 2003). Le motif de Ii (DDQRDLI) interagit avec AP-1, mais pas AP-3 (Rodionov *et al.*, 2002). Une étude a substitué les trois résidus « x » (QRD) pour donner plusieurs combinaisons. Entre autres, le remplacement par RRP non seulement gagnait la plus grande interaction avec AP-3, mais perdait 80% de sa capacité à lier AP-1 (Rodionov *et al.*, 2002). À l'inverse, l'incorporation de QRD dans le motif de LIMP-II (DERAPLI) qui lie normalement AP-3, mais pas AP-1 a permis de diminuer et d'augmenter leur interaction, respectivement (Rodionov *et al.*, 2002). Par les différentes combinaisons testées, les auteurs suggèrent que les motifs pouvant interagir avec AP-3 obtiennent un effet additif pour l'affinité lorsqu'il y a : (I) une proline en position -1 par rapport à la première leucine, (II) un résidu positivement chargé en position -3, (III) l'acide glutamique en position -4 et (IV) un résidu négativement chargé en -5, bien que ce dernier ne soit pas obligatoire (Rodionov *et al.*, 2002). Le motif de RNF13 est 306-TEHTPLL-312. Il ne possède pas le résidu attendu en position -5, mais ressemble grandement au motif (TERNPLL) de la protéine QNR-71 (*Quail neuroretina clone 71*) (Storch *et al.*, 2004). RNF13 possède non seulement la proline critique, mais aussi un acide aminé chargé positivement (histidine). Dans le contexte, bien que nous n'ayons pas étudié la conséquence de mutations des différents acides aminés ni l'affinité pour AP-1 ou AP-3, notre hypothèse est que RNF13 interagit préférentiellement avec ce dernier. De plus, RNF167 possède aussi un motif dileucine (305-SERTPLL-311), avec les mêmes caractéristiques que RNF13 pour une forte affinité avec AP-3 (R en -3, P en -1). Concrètement, nous ne savons pas comment les hétéro- et homodimères sont impliqués dans les interactions avec les complexes AP. Puisque la localisation lysosomale de RNF167 et RNF13 est affecté selon la présence ou la répression de l'autre, il est possible que

l'interaction avec les protéines AP soit modifiée. Notamment, nos résultats de GST-pulldown avec AP-1 démontrent que le variant LL/AA perd complètement sa capacité de liaison *in vitro*, alors que 50% de la quantité du WT est immunoprécipité *in cellulo* (Fig. 3.3). Comme discuté dans la section 3.6, la protéine Vpu, par sa liaison avec un motif dileucine, permet d'augmenter la faible affinité du motif tyrosine de BST2 avec AP-1 en modifiant l'ouverture du complexe AP-1 (Jia *et al.*, 2014). De façon importante, les structures disponibles à ce jour de AP-1 sont obtenues par la présence d'un cargo tyrosine et d'un cargo dileucine sur leur site respectif (Begley *et al.*, 2024). Il est possible que la dimérisation permette de fournir le motif dileucine (RNF13 ou RNF167 WT) et le motif VVVQLQ (RNF13 LL/AA) pour l'interaction avec AP-1. Dans le contexte d'une mutation, ceci serait concordant avec un effet DN où la dimérisation avec un variant séquestrerait non seulement la fonction de RNF13 WT, mais possiblement RNF167 également.

Basé sur la possible affinité préférentielle pour AP-3, le second motif pourrait exister pour permettre de changer l'affinité entre les complexes selon le contexte cellulaire. Notamment, le C-terminal de RNF13 est désordonné, signifiant que sa conformation est flexible et change selon le contexte (Holehouse et Kragelund, 2024). Par exemple, une étude démontre que l'élévation du pH intracellulaire entraîne la déprotonation de l'histidine 332 de RNF13, permettant à la protéine ALG-2 (*Ca^{2+}-activated apoptosis-linked gene 2*) d'interagir lorsque les niveaux de calcium sont élevés (Trinh *et al.*, 2025). Ces deux signaux activent RNF13 et permettent l'ubiquitination et la dégradation de Arl8b pour promouvoir le positionnement des lysosomes périnucléaires et favoriser l'autophagie (Trinh *et al.*, 2025). Les auteurs définissent deux régions clés pour ce mécanisme, soit la région régulatrice négative (acides aminés 287 à 305) et positive (319 à 339), qui entourent le motif dileucine (Trinh *et al.*, 2025). Comme AP-1 est impliqué dans la formation de l'autophagosome, il est possible que le changement de conformation modulé par l'induction de l'autophagie modifie l'exposition des motifs dileucine et VVVQLQ, altérant les affinités pour les complexes et permettant de rediriger RNF13. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que l'interaction entre RNF13 et le complexe AP-1 n'est pas dépendante à la BFA, et semble même être légèrement augmentée, bien que ce ne soit pas une différence significative (Fig. 3.S2B). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour SNX18 (*sorting nexin-18*) où la BFA permettait d'augmenter l'association de cette protéine et AP-1 et où la surexpression de SNX18 séquestrait AP-1 sur des endosomes périphériques tubulaires (Håberg *et al.*, 2008). De façon intéressante, dans les années qui ont suivi cette étude, il a été démontré que SNX18 permet de réguler le routage des vésicules ATG9 à partir de ces endosomes et, curieusement, le motif permettant à SNX18 de lier AP-1 est aussi important pour une interaction avec LC3 (Knævelsrud *et al.*, 2013; Søreng *et al.*, 2018). La relation dynamique entre AP-1, SNX18 et l'autophagie n'est pas connue, mais on sait que la BFA permet d'induire l'autophagie (McDonnell *et al.*, 2019). Dans le contexte, l'abondance totale de RNF13 a été quantifiée dans les expériences combinant la surexpression de AP-1 et le traitement de BFA

pour voir si des différences sont observées (Fig. 3.S2B). De façon intrigante, la surexpression de AP1M1 augmente significativement l'abondance de RNF13 et, bien que non significatif, le traitement de BFA induit des changements similaires (voir Annexe B). De plus, la combinaison de la surexpression et du traitement est additive, avec une abondance doublée comparativement à la condition de contrôle (voir Annexe B). Comme la BFA inactive AP-3 et la majorité des complexes AP-1, ces résultats peuvent soutenir l'hypothèse d'un changement de direction dans le ciblage du compartiment par la voie AP-1 où RNF13 ne serait pas dégradé et où la fonction de cette interaction est insensible à la BFA, par exemple la voie SNX18 ou la sécrétion des endolysosomes présentée dans la section 1.4.4.1.

Comme AP-1 permet également le transport des vésicules ATG9, que la surexpression de AP1M1 augmente l'abondance de RNF13 et que la colocalisation de LL/AA sur LC3 est plus grande que le WT, nous avons tenté un essai préliminaire pour mieux comprendre la dynamique entourant un possible lien entre l'interaction RNF13/AP-1 et l'autophagie. Nous avons mesuré le flux autophagique en soumettant des cellules HeLa exprimant RNF13 WT ou LL/AA à un jeûne combiné à un traitement de BafA1. RNF13 LL/AA augmente les abondances de LC3 et de p62 en niveau basal alors que seulement LC3 augmente davantage avec la BafA1 (voir Annexe B). Ces résultats sont ambigus car le profil obtenu avec LC3 suggère un flux autophagique augmenté en condition basale alors que le profil de p62 indique plutôt un défaut de la dégradation lysosomale, bien que les deux mécanismes pourraient être non exclusifs. Il est important de noter que seulement deux expériences ont été effectués où des variations sont obtenues. Celles-ci corrèlent avec l'expression de LL/AA et pourraient être la cause d'une transfection peu efficace (voir Annexe B). Ces données sont à prendre à la légère, bien qu'elles concordent avec l'hypothèse d'une redirection de compartiment si l'interaction de AP-1 est favorisée par rapport à AP-3. Étonnamment, lors de traitements de BafA1, l'abondance de LC3-II est moins augmentée lorsque RNF13 WT est présent comparativement au vecteur, contrastant avec l'abondance de p62 qui augmente significativement plus (voir Annexe B). Cette observation pourrait suggérer qu'il favorise la formation d'autophagosome indépendant à LC3 par la voie p62. Cette voie est toujours peu comprise, mais une récente étude a rapporté que l'absence de la machinerie permettant la conjugaison de LC3-II augmente l'abondance de p62 et favorise la sécrétion de mitochondrie endommagée dans le milieu extracellulaire (Tan *et al.*, 2022). Notamment, cette étude rapporte que l'abondance de RNF13 est augmentée dans ces conditions (Tan *et al.*, 2022). Sachant que les autophagosomes peuvent devenir des amphisomes dont l'exocytose est régulée par Rab27a (Jahangiri *et al.*, 2022) et qu'une des fonctions insensibles à la BFA de AP-1 est la sécrétion des endolysosomes dont le mécanisme nécessite Rab27a (Laulagnier *et al.*, 2011), les évidences obtenues chez la souris knock-out ATG7 (Tan *et al.*, 2022) et nos propres données préliminaires (voir Annexe B) peuvent suggérer que RNF13 est impliquée dans cette voie par une interaction avec AP-1. Dans le contexte, il serait possible que les

variants dileucine augmentent de façon aberrante cette voie, ce qui causerait un effet GOF. De plus, basé sur l'hypothèse présentée plus haut où les variants pourraient altérer le transport rétrograde, ceci indiquerait une diminution des lysosomes périnucléaires et dégradatifs. Dans l'ensemble, une augmentation du flux autophagique, tout comme un défaut de dégradation, sont causes de vésicules élargies, ce que nous avons précédemment observé au niveau des endosomes précoces, tardifs et des lysosomes en présence des variants dileucine ou lorsque le transport lysosomal du WT était altéré par la répression du complexe AP-3 (Fig. 2.1; 2.3; 2.6). Dans l'ensemble, le travail de cette thèse met de l'avant l'implication de RNF13 dans l'homéostasie du système endolysosomal et apporte de nouvelles avenues d'exploration possibles pour mieux comprendre la pathophysiologie de la DEE73.

6.2.5 La portée des résultats obtenus en culture neuronale

Les résultats obtenus dans les cultures neuronales ont une portée limitée et se doivent d'être investigués plus loin avant de pouvoir déterminer la fonctionnalité et l'altération des circuits. Tout d'abord, nous avons vérifié la présence des variants dans les dendrites (Fig. 4.2), puis nous avons quantifié divers marqueurs en utilisant la présence de RNF13 pour délimiter les dendrites étudiés (Fig. 4.3-4.6). Cependant, nous n'avons pas regardé le développement ou si des altérations se produisaient au niveau de l'axone. Notamment, notre hypothèse était qu'une perte du motif dileucine et un routage par AP-1 plutôt que par AP-3 risquaient d'entraîner le tri somatodendritique plutôt qu'axonal pour RNF13 pouvant mener à un gain de fonction dans les dendrites et/ou une perte de fonction dans l'axone. Il est difficile de prédire les conséquences possibles puisque les fonctions de RNF13 au niveau neuronal ne sont pas bien décrites. En revanche, puisqu'il est connu que RNF13 permet l'ubiquitination de SNAPIN pour favoriser l'interaction du complexe SNARE et la neurotransmission synaptique, ceci suggère qu'il est localisé dans les SVs et, donc, dans l'axone (Zhang *et al.*, 2013). Il est possible que les variants altèrent cette fonction, mais, comme nous n'avons pas regardé l'axone, nous ne savons pas si RNF13 s'y localise en condition normale ou si les variants y sont manquants. Par ailleurs, il est possible de voir que RNF13 DN est également grandement exprimé dans les dendrites alors que celui-ci est correctement localisé dans les lysosomes (Fig. 4.3-4.6; 5.10). Dans ces expériences, nous n'avons pas normalisé l'expression en transfectant moins d'ADN, et il est possible de voir que le signal est très élevé en comparaison avec les autres conditions (Fig. 4.3-4.6). Il est probable que la machinerie de transport fût saturée, ce qui a entraîné une mauvaise localisation. En revanche, nous savons que les variants dileucine ont également une expression un peu plus élevée que la protéine WT et il est possible que ceux-ci aient également saturé la machinerie. Dans le contexte, l'hypothèse concernant le transport par AP-1 et AP-3 de RNF13 dans les neurones reste toujours à confirmer. De plus, nous n'avons pas regardé la morphologie des épines dendritiques, ce qui aurait pu nous donner d'importantes informations sur la fonctionnalité des synapses. L'abondance quantifiée pour les protéines PSD-95 et Gephyrin constitue la totalité de ce qui est

exprimé dans le compartiment évalué et ne signifie pas qu'ils sont localisés à des synapses fonctionnelles. Cette étude devrait également être combinée à de l'électrophysiologie afin de confirmer si les courants excitateurs et/ou inhibiteurs sont altérés par la présence des variants. Alors que la majorité des résultats tendent vers un effet DN pour les variants dileucine, nous étions surpris par le fait que la perte du motif menait à un phénotype plus grand au niveau de l'abondance de Gephyrin. Plus précisément, ceci suggère que le motif dileucine est en cause, suggérant une voie AP-3 dépendante altérée. Cependant, nos résultats proviennent de segments postsynaptiques alors que AP-3 est plutôt présynaptique. Bien qu'il soit vrai qu'une altération présynaptique mène également à une réponse postsynaptique, notre taux de transfection est si bas que les chances que deux neurones transfectés puissent communiquer entre eux sont faibles. Il est cependant possible que cet effet soit provoqué par un effet GOF de la voie AP-1, si l'hypothèse du précédent paragraphe s'avère confirmée. En tout, notre caractérisation neuronale permet surtout de mettre en évidence que les variants dileucine causent, tout comme dans les cellules HeLa, une altération du système endolysosomal dans les neurones et soutient des altérations potentielles au niveau de protéines importantes pour la transmission synaptique, bien que plus d'études seront nécessaires pour déterminer des effets fonctionnels et morphologiques des variants causant la DEE73.

6.2.6 Lien entre la DEE73 et la MPS II ?

Le travail de cette thèse a également permis d'identifier et de débuter la caractérisation d'une nouvelle interaction entre RNF13 et l'enzyme causant la MPS II, soit IDS. Cette enzyme est connue pour dégrader les GAGs dans les lysosomes où une déficience de l'enzyme entraîne une accumulation pathologique de ceux-ci. La thérapie de la MPS II consiste à remplacer l'enzyme variante grâce à l'injection d'une enzyme recombinante qui sera délivrée jusqu'aux lysosomes par les récepteurs MPRs situés à la surface des cellules (Zanetti et Tomanin, 2024). Cependant, une étude récente identifie plusieurs partenaires d'interaction de IDS dans le cerveau murin et suggère que l'enzyme pourrait être impliquée dans plusieurs mécanismes cellulaires, incluant le routage intracellulaire (Cardona *et al.*, 2019). Un variant pourrait donc altérer des mécanismes au niveau de la voie biosynthétique et, dans le contexte, le remplacement enzymatique ne pourrait pas contribuer à rétablir ces effets. Notamment, nos résultats suggèrent que la présence de IDS retarde le ciblage lysosomal de RNF13 (Fig. 5.3; 5.5). De plus, des résultats préliminaires démontrent que, dans des cellules HEK293T/17, RNF13 permet d'augmenter l'abondance de l'actine F, en plus d'augmenter le ratio de LC3-II/LC3-I, qui signifie une augmentation de l'autophagie, alors que la présence de IDS empêche ces effets (voir Annexe C). Ceci supporte que IDS modifie la fonction et/ou la dynamique intracellulaire de RNF13. Comme les variants dileucine ont un domaine PA et une glycosylation intacte, il serait attendu qu'ils puissent toujours interagir avec IDS. RNF13 DN n'interagit qu'avec environ 50% de la quantité de IDS par rapport au WT, mais il semble avoir des modifications au niveau de sa glycosylation

(Fig. 5.10). Ceci pourrait altérer l'interaction de façon similaire à la glycosylation de IDS qui semble la diminuer, basé sur le résultat obtenu avec le variant N246Q (Fig. 5.4). Sachant que les variants de RNF13 ont un routage intracellulaire altéré et que l'interaction du deuxième motif n'est pas aussi forte que celle du motif dileucine avec les complexes AP (Fig. 3.3), il est possible que l'interaction avec IDS soit augmentée et maintienne davantage les deux protéines au niveau du RE. Ceci pourrait potentiellement expliquer pourquoi la taille des vésicules des structures endolysosomales était augmentée par la présence des variants dileucine, un phénotype qui réplique une LSD (Fig. 2.1; 2.3). Alors que le travail de cette étude a permis de débuter la caractérisation entre IDS WT et RNF13 WT, il serait d'intérêt de déterminer comment les variants des deux protéines influencent l'autre. Il est possible que des voies moléculaires soient partagées entre la MPS II et la DEE73.

Curieusement, alors que RNF13 DN permet d'immunoprécipiter 50% de la quantité de IDS, il permet l'accumulation de seulement 15% de la forme déglycosylée par rapport à ce qui est obtenu avec RNF13 WT (Fig. 5.10). Plusieurs hypothèses quant au mécanisme sous-jacent l'apparition de cette bande ont été suggérés dans la section 5.6. Notamment, les deux plus probables sont que l'interaction RNF13/IDS maintient ce dernier dans le RE et prolonge son exposition aux enzymes EDEMs ou que RNF13 modifie l'ubiquitination de IDS dans le cytosol et le protège de la dégradation. Nous avons également discuté du mécanisme EGAD puisque les fragments SD2 sont dégradés par le protéasome plutôt que les lysosomes, suggérant que le clivage de IDS doit être fait avant l'export du Golgi. Cependant, nous n'avons pas envisagé un clivage dans le cytosol. Par exemple, les protéines de la famille PDI sont généralement retrouvées dans le RE afin de faciliter la formation de ponts disulfures sur les protéines afin de les replier, mais elles peuvent également être rétro-transloquées dans le cytosol ou être sécrétées dans le milieu extracellulaire où d'autres fonctions leur sont attribuées (Rahman *et al.*, 2022). Notamment, une étude a démontré que les caspases-3 et -7 peuvent cliver PDI cytosolique afin d'inhiber la mort cellulaire après un stimuli apoptotique (Na *et al.*, 2007). Nos résultats démontrent que RNF167 immunoprécipite la forme précurseur glycosylée et RNF13, la forme peu glycosylée, que la présence de RNF167 est suffisante, mais que l'activité ligase de RNF13 est requise pour augmenter la forme peu glycosylée et que la répression ou le DN d'une ou l'autre des protéines permet l'augmentation de la forme à 90 kDa. Dans l'ensemble, un mécanisme où RNF167 permet la reconnaissance dans le RE et/ou Golgi alors que RNF13 promeut la rétrotranslocation peut être proposé. Ensuite, il n'est pas clair si c'est l'étape de la rétrotranslocation ou de l'accumulation dans le cytosol qui nécessite l'activité ligase de RNF13. Spécifiquement, les complexes de rétrotranslocation sont connus pour être dépendant de l'ubiquitination. Cependant, comme la forme peu glycosylée s'accumule mais que ça ne semble pas être causé par une saturation du protéasome, il est possible d'émettre l'hypothèse que IDS a une fonction cytosolique. Il est possible que ceci nécessite l'ubiquitination par RNF13, d'où l'incapacité du DN

à augmenter cette forme. Cette hypothèse concorde avec l'étude du protéome de IDS qui a identifié plusieurs protéines cytosoliques (Cardona *et al.*, 2019). Par ailleurs, il a récemment été rapporté que l'hydrolase lysosomale Arylsulfatase A de la famille des sulfatases, comme IDS, est retrouvée dans le cytosol afin d'agir en tant que chaperonne moléculaire pour l'α-synucléine (Lee *et al.*, 2019). Il est donc possible que IDS joue un rôle inexploré dans le cytosol et comprendre comment RNF13 intervient dans ce mécanisme est crucial pour la compréhension des mécanismes sous-jacents la DEE73 et la MPS II.

6.3 Les limites techniques et méthodologiques de l'étude

6.3.1 La transfection transitoire, la surexpression et le modèle cellulaire

Cette étude a, pour la plupart du temps, utilisé la transfection transitoire et la surexpression. Tout d'abord, la transfection transitoire peut donner des résultats variables. Les cellules HeLa constituent un plus grand défi que les cellules HEK293T/17 et il est possible d'en voir le résultat sur l'abondance obtenue pour le LL/AA présenté en Annexe B. Nous avons utilisé deux agents de transfection, notamment la LipofectAMINE 2000 et le précipité de calcium phosphate. La LipofectAMINE est un lipide cationique qui forme un complexe avec l'ADN ou l'ARN pour faciliter leur entrée dans la cellule. Une étude a démontré que l'incorporation de siRNA avec la LipofectAMINE augmente les autophagosomes alors qu'une seconde démontre que le mécanisme UPR est activé (Li *et al.*, 2019b; Mo *et al.*, 2012). Dans notre protocole, nous utilisons une quantité moindre à celle qui est recommandée par le fabricant, mais il est certainement possible que celle-ci affecte certains mécanismes moléculaires. Au niveau du précipité de calcium phosphate, il forme un complexe insoluble avec l'ADN et se fixe à la surface de la cellule, lui permettant d'entrer par endocytose (Guo *et al.*, 2017). Une étude a démontré que ces complexes endommagent les endosomes puisqu'ils sont positifs à LGALS3 et permet le recrutement de p62 et LC3 (Chen *et al.*, 2014). Dans le contexte, il est possible que les conditions de base fussent déjà en présence de lysophagie, sans prendre en compte l'effet de la protéine surexprimée. C'est pourquoi nous avons également comparé les effets mesurés à un vecteur vide. Cependant, en neurones, comme nous n'avions pas de marqueur de transfection fluorescent, nous ne pouvions pas nous assurer de choisir un neurone exprimant le vecteur vide et nous avons défini les cellules quantifiées comme étant non transfectées (Fig. 4.2-4.6). Les cultures ont tout de même été en contact avec l'agent de transfection.

D'un autre côté, la technique de transfection transitoire offre l'avantage de mesurer un effet engendré rapidement avant que des mécanismes de compensation ne se mettent en place. En utilisant la transfection, l'idéal aurait été de comparer les niveaux d'expression de différentes quantités d'ADNp avec l'expression de la protéine endogène afin de la normaliser. Ici, les protéines sont surexprimées et nous ne savons pas à quelle quantité. Ceci est important à noter puisque plusieurs effets peuvent apparaître alors que ceux-ci

peuvent seulement être des artefacts ou des effets non spécifiques en conséquence d'une trop grande expression. Notamment, une protéine peut avoir diverses propriétés selon l'expression. Comme présenté dans la section 1.2.5.2, le complexe dimérique de IRE1α permet d'activer UPR afin d'augmenter la capacité de repliage des protéines au niveau du RE (Adams *et al.*, 2019b). Cependant, le stress du RE augmente l'accumulation de cette protéine, qui peut également oligomériser et agréger afin d'inhiber UPR et d'enclencher l'apoptose (Adams *et al.*, 2019b; Walter *et al.*, 2018). Il va sans dire qu'une surexpression de cette protéine serait suffisante pour enclencher les mécanismes de stress, pouvant aller jusqu'à l'apoptose. Par ailleurs, l'étude démontrant que RNF13 induit le stress du RE par une interaction avec IRE1α a utilisé, lors des transfections à la LipofectAMINE, 2 μg d'ADNp pour IRE1α et 3 μg pour RNF13 sur 0.1 x 10^6 cellules HEK293T ensemencées 16-18h plus tôt (Arshad *et al.*, 2014; Arshad *et al.*, 2013). En comparaison, nous utilisons 1 ug total, divisé lorsqu'il y a des co-transfections, sur 0.8 x 10^6 cellules ensemencées au moment de la transfection. La quantité d'ADNp utilisée dans l'étude est donc très grande et il se pourrait que la raison de la localisation de RNF13 au RE soit causée par une surcharge dans le compartiment ou d'une saturation des machineries de transport. Il est également possible que l'interaction détectée fût en réalité un artefact. Un autre exemple où la surexpression pourrait avoir teinté nos résultats est la différence observée lors de nos expériences entre RNF13 et IDS en comparaison à lorsque RNF167 a été ajouté. Spécifiquement, il est possible de voir que la présence de RNF13 cause une augmentation de l'abondance de la forme précurseur d'environ 1.2 fois où la transfection a été effectuée avec 0.5 μg d'ADNp pour les vecteurs de RNF13 et IDS (Fig. 5.2, 5.4, 5.10, 5.11). En revanche, lorsque RNF167 a été ajouté, nous avons modifié les quantités pour incorporer 0.4 μg de RNF13 et IDS et 0.2 μg de RNF167, puisque ce dernier s'exprime et s'accumule facilement. Ceci a donné une augmentation de l'abondance de la forme précurseur de plus de 1.6 lorsque seulement RNF13 était présent (IDS + RNF13 + YFP) (Fig. 5.8). Nous pensons que l'effet a été amoindri par une saturation quelconque dans les conditions utilisant une plus grande quantité d'ADNp. Il est frappant de noter que la diminution de seulement 0.1 μg d'ADNp par vecteur puisse avoir mené à une aussi grande différence. Dans l'ensemble, nos résultats peuvent avoir été affectés par des effets indirects liés aux techniques utilisées et il est important d'en tenir compte dans les conclusions finales.

Le modèle cellulaire est également un facteur important qui peut jouer sur les résultats obtenus. Afin d'obtenir des lignées immortalisées, les cellules doivent subir des altérations génétiques, ce qui peut également mener à des modifications au niveau des fonctions et des mécanismes en réponse à des stimuli (Chalak *et al.*, 2024). Par exemple, les cellules HeLa ont maintenant de 70 à 90 chromosomes et sont hyperploïdes (Heng, 2013; Nagy *et al.*, 2013). Une étude a démontré qu'une cellule sur 24 se trivise au lieu de se diviser, démontrant bien que les mécanismes cellulaires ne sont plus régulés normalement (Nagy *et al.*, 2013). En conséquence, les protéomes des diverses lignées cellulaires sont maintenant différents. Une

étude a effectué une analyse du protéome lysosomal de six lignées en appliquant une quantification absolue afin de pouvoir comparer les valeurs obtenues entre les lignées (Akter *et al.*, 2023). En comparant les résultats obtenus dans cette étude pour les HEK293 et les HeLa, il est possible de voir d'énormes différences (Akter *et al.*, 2023). Par exemple, la protéine FYCO1, l'effecteur de Rab7 pour le transport antérograde, est 122 fois plus exprimé dans les HEK293 (valeur 0.4951) que dans les HeLa, qui n'en exprime à peu près pas (valeur 0.0040). Cependant, l'expression de Rab7A démontre un profil inverse avec une expression 1.24 fois plus élevée dans les HeLa. De plus, les expressions de la KIF5B et de Arl8b sont de 2.30 et 1.24 fois plus élevées dans les HeLa que dans les HEK293, respectivement (Akter *et al.*, 2023). Sans son effecteur, Rab7 n'est probablement pas impliqué dans le transport antérograde dans les HeLa et pourrait seulement être impliqué dans le rétrograde, comparativement aux HEK293 qui pourraient potentiellement nécessiter les deux voies. De plus, la quantité de RNF13 mesurée dans les cellules HeLa est presque deux fois celle des HEK293 (Akter *et al.*, 2023). Finalement, parmi les protéines discutées au cours de cette thèse, l'expression dans les HEK293 divisée par celle des HeLa donne des ratios de 1.37, 0.33, 0.04, 0.69 et 3.10 pour mTOR, LC3, p62, IDS et SNAPIN (Akter *et al.*, 2023). Notamment, l'expression très faible de p62 dans les HEK293 modifie certainement les divers mécanismes d'autophagie et pourrait expliquer pourquoi nous obtenons un si grand ratio de LC3-II/LC3-I en présence de RNF13 comparativement au vecteur (voir Annexe C). Pour conclure, les niveaux d'expression différentiels des protéines endogènes peuvent certainement modifier les effets mesurés lors de nos études et cette limitation se doit d'être gardée en tête.

6.3.2 L'expression tissulaire et temporelle

Le concept derrière les protéomes différents selon les lignées cellulaires peut également s'appliquer au niveau des organes. Cette considération est déterminante quant à la pertinence et à la validité translationnelle des résultats obtenus en culture cellulaire vers un système humain plus complexe. Par exemple, reprenons l'hypothèse initiale de la DEE73 où les variants induiraient l'apoptose par un GOF de la voie d'activation de IRE1α pour causer la microcéphalie, entre autres (Edvardson *et al.*, 2019). La base de données *The Human Protein Atlas* (proteinatlas.org) regroupe une multitude d'informations concernant une protéine, incluant de récentes analyses de séquençage d'ARN d'une cellule unique (Karlsson *et al.*, 2021; Siletti *et al.*, 2023; Sjöstedt *et al.*, 2020). Dans le cerveau, RNF13 est bien détecté dans les neurones excitateurs et inhibiteurs, les astrocytes, les cellules microgliales et les cellules précurseurs d'oligodendrocytes, mais est particulièrement enrichi dans les oligodendrocytes où son expression est environ cinq fois plus élevée que tous les autres types de cellule (Karlsson *et al.*, 2021; Siletti *et al.*, 2023; Sjöstedt *et al.*, 2020). En comparaison, IRE1α est à peine détecté dans ces cellules. Cependant, IRE1α et RNF13 sont toutes les deux bien détectées dans les macrophages et les monocytes, tout comme la protéine STING qui n'est en revanche pas dans les cellules neuronales (Karlsson *et al.*, 2021; Siletti *et al.*, 2023; Sjöstedt *et al.*, 2020). Il est

cependant important de noter qu'une faible détection ne signifie pas que la protéine n'a pas de fonction. En effet, RNF167 est faible dans tous ces types de cellule neuronale (Karlsson *et al.*, 2021; Siletti *et al.*, 2023; Sjöstedt *et al.*, 2020), alors qu'il a été démontré pour ubiquitiner GluA2 afin de réguler la neurotransmission synaptique (Lussier *et al.*, 2012). De plus, dans les informations disponibles sur *The Human Protein Atlas,* il est seulement indiqué que les tissus utilisés dans les analyses proviennent d'individus en santé (proteinatlas.org). Il est donc probable que ceux-ci proviennent d'échantillons à l'âge adulte. Une étude avait démontré que RNF13 dans les muscles de poulet était détectable chez les embryons et jusqu'à deux semaines après la naissance, après quoi il n'était plus exprimé (Zhang *et al.*, 2010). Comme la DEE73 est une maladie neurodéveloppementale dont les symptômes sont présents à la naissance, les mécanismes cellulaires sont altérés très tôt dans le développement. Dans le contexte, alors que les données ci-haut pourraient suggérer que la microcéphalie n'est pas sous-jacente des voies de IRE1α ou STING vu l'absence d'expression neuronale, il est possible que l'expression fût manquée si elle est supprimée rapidement. Par exemple, la délétion de STING altère la différenciation neuronale et augmente la prolifération des cellules progénitrices (Zhang *et al.*, 2020a). Un second exemple est celui de la voie de mTOR présenté dans la section 1.1.1.1 où une activation sélective à l'âge embryonnaire entraîne une microcéphalie, comparativement à l'âge adulte où le phénotype réplique la microcéphalie (Kassai *et al.*, 2014). Cet aspect a été pris en compte lors de nos expériences en culture neuronale où la transfection a été effectuée tôt (DIV4) avec une récolte des échantillons plusieurs jours plus tard (DIV10) pour permettre le développement des défauts neuronaux causés par la présence des variants. Cependant, nous n'avons pas optimisé ce choix. Il est possible que des défauts supplémentaires auraient pu être observés si la transfection avait été effectuée encore plus tôt ou, au contraire, il est possible que nous ayons quantifié des effets de compensation causés par l'expression tôt et prolongée. Puisque notre étude est descriptive, il n'est pas possible de discerner si les effets sont directs ou causés par des mécanismes de compensation. Pour contrevenir à cette limitation, une étude longitudinale et temporelle de RNF13 et de ses effecteurs pour déterminer les fenêtres d'expression pourrait nous aider à cibler quels mécanismes cellulaires peuvent être impliqués dans la DEE73.

Il est également intéressant de noter que les analyses de séquençage d'ARN d'une cellule unique démontrent que IDS est particulièrement exprimée dans les neurones excitateurs et inhibiteurs, mais est aussi retrouvée dans les mêmes cellules gliales que RNF13 (Karlsson *et al.*, 2021; Siletti *et al.*, 2023; Sjöstedt *et al.*, 2020). Il est curieux d'observer la corrélation d'expression entre RNF13 et IDS. Notamment, l'interactome de IDS dans un cerveau de souris avait détecté plusieurs protéines impliquées dans la biogenèse de la myéline, dont une avait été confirmée par immunoprécipitation directe (Cardona *et al.*, 2019). De façon intéressante, il est connu que la biogenèse de la myéline dépend grandement du système endolysosomal. En effet, les protéines importantes pour la composition de la myéline sont des glycoprotéines et nécessitent donc d'être

transportées dans des vésicules après leur biosynthèse dans le RE et le Golgi (Margiotta, 2023). Curieusement, Rab27, qui a été discuté plus haut, est particulièrement important pour ce processus où sa répression diminue l'exocytose lysosomale et altère l'expression de surface des protéines et la myélinisation (Margiotta, 2023). De plus, la polymérisation de l'actine permet l'extension des oligodendrocytes et le recouvrement de l'axone alors que la dépolymérisation favorise l'enveloppement de la myéline (Lopez Moreno et Kursula, 2024). Dans le contexte, la dynamique de l'actine F doit être bien régulée. Sachant que RNF13 WT promeut la polymérisation, mais pas les variants dileucine (Fig. 3.8), et sachant que la présence de IDS empêche cet effet (voir Annexe C), il est possible que l'agénésie du corps calleux observé chez les variants DEE73 soit une conséquence d'un défaut de la biogenèse de la myéline, soit par une altération de la dynamique de l'actine ou du système endolysosomal. Cependant, ces mécanismes ne sont probablement pas la cause de la microcéphalie. Spécifiquement, la myélinisation débute près et se poursuit après la naissance, alors que les patients atteints de la DEE73 sont nés avec une microcéphalie déjà présente (Gilmore et Walsh, 2013). Sachant que la présence de IDS permet de complètement rétablir, et même diminuer, le niveau d'actine F induit par RNF13 alors qu'il ne permet qu'un sauvetage partiel du ratio de LC3-II/LC3-I, il est possible que plusieurs mécanismes différents ou interconnectés puissent être en cause de divers symptômes (voir Annexe C). Dans l'ensemble, nos résultats démontrent la nécessité à étudier les mécanismes régulés par l'interaction entre RNF13 et IDS et pourraient s'avérer être une avancée prometteuse dans la compréhension de la pathophysiologie de la DEE73 et de la MPS II.

6.3.3 La microscopie à épifluorescence

Dans cette étude, les analyses d'imagerie ont été réalisées à l'aide d'un microscope à épifluorescence combiné à une déconvolution numérique. Plus spécifiquement, notre laboratoire est équipé d'un microscope inversé Olympus IX83, obtenu grâce à une subvention de la Fondation canadienne pour l'innovation. Dans ce contexte, l'utilisation de ce microscope était particulièrement avantageuse au niveau de la disponibilité et des coûts de l'appareil. Néanmoins, la microscopie à épifluorescence possède d'autres avantages par rapport à la microscopie confocale. Notamment, le fait que l'échantillon soit illuminé en entier et uniformément en une seule fois offre une meilleure sensibilité et rapidité (Prakash *et al.*, 2025). Cependant, le diaphragme, caractéristique du microscope confocal, permet d'acquérir une section précise et de rejeter la détection de la lumière hors foyer (Prakash *et al.*, 2025). Dans ce contexte, l'utilisation de la déconvolution permet d'atténuer le signal hors foyer obtenu avec la microscopie à épifluorescence et d'améliorer la netteté et le contraste des images (Woudberg, 2023). Par contre, la déconvolution peut introduire des artefacts, tels qu'une surestimation du chevauchement dans le plan z, ou une amplification du bruit susceptible de modifier l'information quantitative d'intensité, particulièrement si le signal de base est faible (Ikoma *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2014). Sachant que la sensibilité et la rapidité du microscope à

épifluorescence sont choisies au détriment d'une bonne résolution axiale, les artefacts possibles dans le plan z peuvent devenir particulièrement problématiques (Prakash *et al.*, 2025). De plus, une aberration chromatique entre les canaux d'excitation provenant de longueurs d'onde éloignées (par exemple, 488 nm et 647 nm) crée un décalage spatial entre le signal des deux canaux (Matsuda *et al.*, 2018). Il est possible d'effectuer des corrections d'alignement avec des billes multicolores (TetraSpeck) utilisées pour calibrer, mais ce paramètre n'a pas été appliqué avant les analyses présentées dans les divers chapitres de cette thèse et pourrait avoir contribué à une sous-estimation de la colocalisation réelle.

Dans le chapitre 2, nous avons utilisé deux types de quantification pour évaluer la colocalisation entre deux protéines. Spécifiquement, nous avons utilisé le coefficient de Manders pour la plupart de nos analyses et le coefficient de Pearson pour les essais utilisant le TfR et l'EGFR (Fig. 2.2; 2.S2). Le coefficient de Manders mesure la proportion du signal d'un canal qui chevauche celui de l'autre et dépend fortement du seuil d'intensité utilisé (co-occurrence) (Pike *et al.*, 2017). De son côté, le coefficient de Pearson calcule plutôt la corrélation linéaire entre les intensités des deux canaux et est sensible aux variations globales d'intensité (corrélation) (Pike *et al.*, 2017). Nous avons utilisé ce dernier dans les essais de trafic intracellulaire, puisqu'il permet d'évaluer la synchronisation des variations d'intensité au fil du temps des deux canaux (Dunn *et al.*, 2011). Sur des protéines fixes et stables, nous avons favorisé l'utilisation du coefficient de Manders pour déterminer le chevauchement entre RNF13 et des marqueurs de compartiments intracellulaires. Bien que la déconvolution améliore la résolution des images, la précision des analyses demeure limitée par la résolution optique d'environ 200 nm sur le plan latéral (xy) et d'environ 500 nm sur le plan axial (z) pour un microscope à épifluorescence. Par ailleurs, il est important de souligner que la résolution sur le plan latéral était parfois proche des valeurs obtenues pour le diamètre des vésicules endosomales, ce qui nous a conduit à considérer uniquement les plus grosses vésicules lors des analyses. La limitation de résolution, ainsi que les artefacts pouvant être introduits par la déconvolution et l'aberration chromatique, discutés plus haut, sont trois éléments à prendre en compte dans l'interprétation de nos analyses. En lien avec la possible amplification du bruit de fond causée par la déconvolution, un changement au niveau des seuils d'intensité peut grandement affecter non seulement les quantifications utilisant le coefficient de Manders, mais également celles qui décrivent le nombre de puncta des marqueurs. Afin de valider nos observations et confirmer nos hypothèses, les expériences pourraient être refaites en utilisant des microscopes offrant une résolution supérieure, permettant ainsi d'éviter le recours à la déconvolution.

CONCLUSION

En conclusion, au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à la cause de la maladie DEE73 identifiée en 2019 (Edvardson *et al.*, 2019). Comme les variants altèrent un motif dileucine bien décrit pour être important pour le transport au sein du système endolysosomal de plusieurs protéines transmembranaires, nous suspections un routage intracellulaire altéré. Spécifiquement, ce transport est régulé par les protéines AP qui reconnaissent et lient le motif dileucine. Notamment, les protéines AP ont également des rôles particuliers dans le SNC et d'où notre intérêt pour cette maladie neurodéveloppementale. En utilisant des techniques biochimiques et de biologie cellulaire et moléculaire, nous avons réussi à démontrer que :

1. RNF13 est une protéine cruciale pour le maintien de l'homéostasie du système endolysosomal et les variants l'altèrent;
2. La perte du motif dileucine abroge complètement l'interaction avec le complexe AP-3, ce qui altère la localisation lysosomale, mais une interaction est toujours possible avec le complexe AP-1;
3. Les variants dont le motif dileucine est altéré sont transportés dans une voie AP-1-dépendante, contrairement à la protéine sauvage dont le routage est régulé par AP-1 et AP-3;
4. Plusieurs altérations dans la répartition du système endolysosomal et dans l'abondance de protéines postsynaptiques sont causées par la présence des variants dans des cultures primaires neuronales, et ceux-ci sont comparables à un effet dominant négatif;
5. RNF13 modifie la dynamique intracellulaire de l'enzyme lysosomale IDS en jouant sur sa glycosylation;
6. RNF13 forme un complexe avec RNF167 dont les fonctions et la dynamique semblent différentes que les protéines seules ou formant des homodimères (Fig. 6.1).

Dans notre étude, notre analyse neuronale s'est arrêtée aux compartiments postsynaptiques. Cependant, il a été démontré que l'absence de RNF13 diminue la densité des SVs. De plus, RNF13 favorise la transmission synaptique en augmentant l'interaction entre SNAPIN et SNAP-25 (Zhang *et al.*, 2013). De façon intéressante, SNAPIN est aussi retrouvé dans le complexe BLOC-1 et contribue à la biogenèse de SVs et au transport et recyclage de certaines protéines synaptiques régulé par AP-3 (Salazar *et al.*, 2006). Comme présenté dans la section 1.4.4.3, le complexe AP-3B permet de cibler les protéines synaptiques vers les SVs alors que AP-3A les achemine vers les lysosomes (Newell-Litwa *et al.*, 2009). Au cœur du routage du complexe AP-3B, les protéines AP3B2 et VGAT causent la DEE48 et DEE114, respectivement. Une étude a identifié les acides aminés essentiels à l'interaction entre VGAT et AP-3, à savoir les acides glutamiques 39 et 40 et la phénylalanine 44 (Santos *et al.*, 2013). Pour mieux comprendre si RNF13 pourrait être impliqué

dans la biogenèse des SVs, nous avons prédit le complexe entre VGAT et AP-3A ou AP-3B à l'aide d'AlphaFold. Alors que les résidus identifiés expérimentalement étaient prédits pour interagir avec le complexe AP-3A, ils ne l'étaient pas avec AP-3B. Cependant, l'ajout de RNF13 a permis d'inverser la prédiction. En présence de celui-ci, VGAT était maintenant prédit pour interagir avec AP-3B, alors que l'interaction n'était plus prédite pour AP-3A. Ces prédictions soutiennent que RNF13 pourrait être impliqué dans la régulation de la reconnaissance de cargos par les complexes AP-3A et AP-3B. Puisque ce ne sont que des prédictions, les complexes doivent être validés expérimentalement et cette hypothèse spéculative ouvre une avenue de recherche intéressante pour mieux comprendre le rôle de RNF13 dans le SNC.

Alors que nous avons élargi les connaissances sur le transport régulé par AP-1 et AP-3 vers les endosomes et les lysosomes, plusieurs questions restent quant aux autres voies et aux conséquences fonctionnelles de celles-ci. Des hypothèses ont été émises dans ces dernières pages, notamment en lien avec le transport axonal/dendritique, la biogenèse des SVs, l'exocytose, les autophagosomes et le transport vers la MP, et constituent d'importantes perspectives afin de comprendre comment les variants altèrent la dynamique intracellulaire de RNF13. Notamment, l'hypothèse où AP-1/Rab11 permettrait à RNF13 de se rendre à la MP afin d'être en position pour sa fonction nucléaire nécessite un joueur supplémentaire dans ce mécanisme. En effet, qu'en est-il du complexe AP-2 ? Une limitation de notre étude est que nous n'avons pas inclus ce complexe dans nos expériences pour mieux comprendre la dynamique de RNF13. En plus du motif dileucine, le motif VVVQLQ est prédit pour interagir avec AP-2, de façon similaire au complexe AP-1. Il y a plusieurs motifs dans la littérature qui sont partagés pour AP-1 et AP-2, mais pas AP-3, ce qui est compatible avec leur localisation cellulaire respective (Bonifacino et Traub, 2003). Curieusement, ce complexe n'est pas dans la liste des interacteurs rapportés dans la base de données BioGRID pour RNF13 ou RNF167. Néanmoins, comme ils sont tous les deux connus pour être localisés à la MP, il y a des chances qu'ils doivent interagir avec AP-2 afin d'être internalisés. Il est possible que l'interaction soit trop rapide/transitoire pour être proprement détectée. Lors des expériences de microscopie à temps réel (Fig. 3.2), il a été possible d'observer que RNF13 est souvent localisé à la MP, chose que nous n'avions pas détectée sur des cellules fixées. Il est possible que la perméabilisation durant la technique d'immunofluorescence ait entraîné une perte de signal. Dans le contexte, sachant que les variants empruntent une voie AP-1 plutôt que AP-3, il est possible que ceux-ci soient d'autant plus transportés vers la MP et que ce phénotype ait été manqué dans nos conditions. Une étude de la dynamique de RNF13 au sein du système endolysosomal par les trois complexes AP en utilisant la microscopie à temps réel serait particulièrement intéressante pour mieux comprendre comment se comporte les variants dileucine et pour valider les diverses hypothèses émises.

Dans cette étude, nous avons mis de l'avant le fait que RNF13 pourrait former un hétérodimère avec RNF167, qui semble posséder des propriétés différentes que les protéines individuelles basées sur la modification de la localisation lysosomale et comment le profil des bandes de IDS était modifié selon les conditions. Il est important de noter que nous avons détecté RNF13 dans les complexes immunoprécipités par RNF167, et vice versa, mais sans avoir confirmé l'interaction directe entre les deux. L'hétérodimérisation est donc envisagée, mais reste à confirmer expérimentalement. Les nouvelles découvertes sur les deux protéines démontrent de plus en plus une diaphonie et/ou une convergence des voies de signalisation régulées. Cependant, à ce jour, seul Arl8b a été démontré pour être un substrat partagé par les deux E3 ligases, menant à une réponse cellulaire similaire où la position périnucléaire des lysosomes est favorisée. Curieusement, l'ubiquitination de Arl8b et le positionnement des lysosomes régulé par RNF167 s'effectuent en condition basale alors que RNF13 nécessite que le pH et les niveaux de calcium intracellulaire soient élevés, conditions dans lesquels RNF167 n'a pas d'effet (Trinh *et al.*, 2025). RNF13 et RNF167 partage le même orthologue de la drosophile *Drosophila melanogaster* et du nématode *Caenorhabditis elegans*, avec une troisième E3 ligase, ZNRF4. Par ailleurs, une étude a démontré que, comme Godzilla, la protéine orthologue de la drosophile, Vamp3 est un substrat de RNF167 (Yamazaki *et al.*, 2013). Comme Vamp3 est une SNARE qui permet la fusion des endosomes de recyclage avec la MP, sa fonction est liée à celle de Rab11 (Puri *et al.*, 2013). Notamment, la surexpression de RNF167 entraîne la perte d'endosomes positifs à Rab11 par un mécanisme dépendant de l'ubiquitination de Vamp3 (Yamazaki *et al.*, 2013). Comme présenté plus tôt, Rab11 contrôle la possibilité de RNF13 d'être localisé au noyau après un stimuli (Bocock *et al.*, 2010). Tous ensemble, ces résultats pourraient indiquer que RNF167 régule négativement la localisation nucléaire de RNF13, en plus de la localisation lysosomale observée dans notre étude. Dans le contexte, il est possible de se demander si Vamp3 pourrait également être un substrat de RNF13 dans des conditions spécifiques, comme pour Arl8b. Si oui, pourquoi est-ce que ces protéines se sont-elles séparées lors de l'évolution si elles conservent des fonctions similaires ? De façon plus importante encore, est-ce que ce sont les protéines seules ou les hétérodimères qui agissent dans les divers mécanismes cellulaires rapportés dans la littérature ? Comme nous sommes les premiers à identifier ce complexe, aucune étude n'a discerné la fonction des deux protéines individuellement. Par ailleurs, comme discuté plus haut, les analyses de séquençage d'ARN d'une cellule unique détectent une forte expression de plusieurs types de cellules neuronales pour RNF13, mais pas pour RNF167 (Karlsson *et al.*, 2021; Siletti *et al.*, 2023; Sjöstedt *et al.*, 2020). Dans le contexte, on peut assumer qu'une plus grande proportion d'homodimère de RNF13 sera disponible comparativement à l'hétérodimère. Dans l'ensemble, notre étude ouvre plusieurs perspectives d'étude afin de disséquer les fonctions individuelles et mutuelles de RNF13 et RNF167 ainsi que les mécanismes de régulation entourant la sélectivité des complexes formés.

Dans l'ensemble, nous avons permis de grandes avancées sur les connaissances entourant la protéine RNF13, surtout considérant le peu de littérature à son sujet lors du commencement de ce projet. Malgré ceci, de nombreux questionnements restent quant à ses fonctions cellulaires, les mécanismes qu'ils régulent et qui le régulent ainsi qu'à ses rôles spécifiques dans le SNC. Plusieurs hypothèses ont été proposées dans cette discussion. Les perspectives du projet doivent inclure des expériences afin de les confirmer, bien qu'il soit également possible d'aller plus loin. Par exemple, s'il s'avère vrai que les variants altèrent la dégradation, mais augmentent l'exocytose lysosomale, est-ce que ce deuxième mécanisme permet de compenser l'accumulation de déchet causé par un défaut du premier en les sécrétant dans le milieu extracellulaire ? Comme il a été démontré chez les souris knock-out ATG7 que la sécrétion autophagique des mitochondries augmentée active, chez les cellules avoisinantes, la voie STING et augmente la production de cytokines inflammatoires, est-ce que ceci pourrait être une conséquence observée avec les variants DEE73 ? De plus, dans le premier article publié en 2021 (chapitre 2), nous avions suggéré que les variants causant la DEE73 donnent un phénotype similaire à une LSD (section 2.6). Cette hypothèse est d'autant plus d'actualité basée sur les nouvelles fonctions attribuées à RNF13, incluant son interaction avec IDS, protéine causant la MPS II. La découverte de cette interaction laisse entrevoir une contribution scientifique importante dans le domaine, puisqu'il est probable que des mécanismes moléculaires et cellulaires affectés soient partagés entre la DEE73 et la MPS II. Cela ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude de ces deux maladies rares.

ANNEXE A

EFFET DE RNF13 SUR L'ABONDANCE DE PROTÉINES ENDOGÈNES

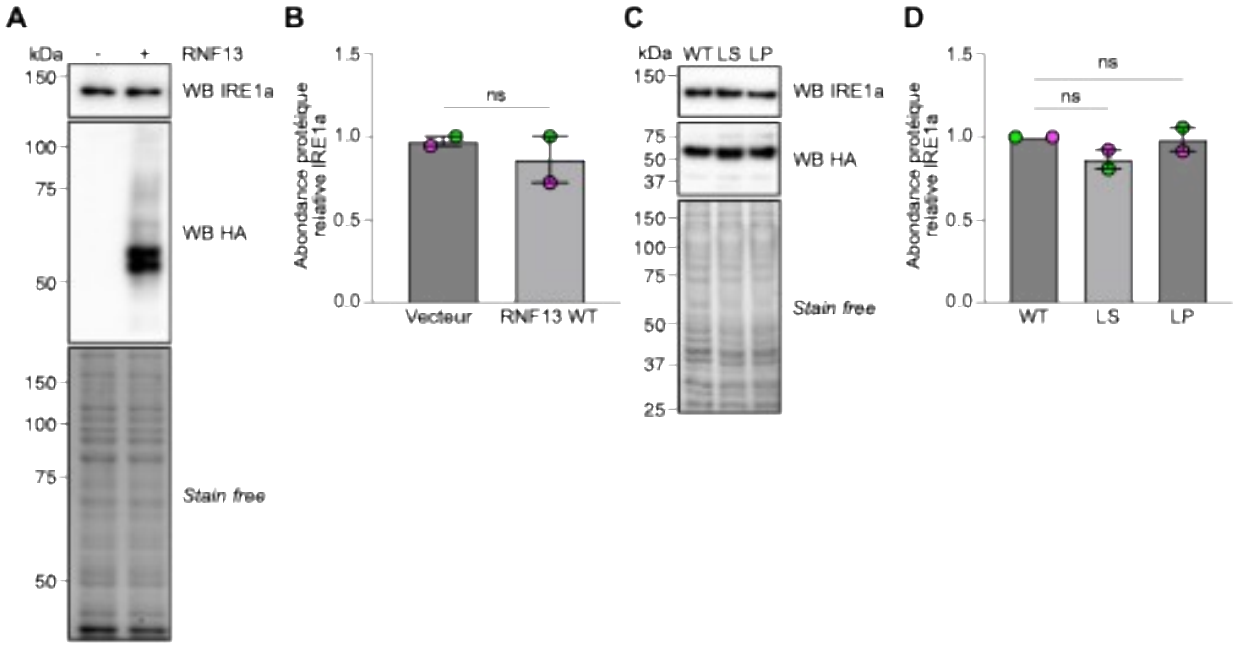


Figure A.1 : L'abondance de la protéine IREα n'est pas modifié par RNF13 WT ou les variants DEE73.

(**A, C**) Des cellules HEK293T/17 ont été transfectées avec des plasmides encodant (**A**) la protéine RNF13-HA WT ou le vecteur vide ou encodant (**C**) les protéines RNF13-HA WT, L311S et L312P. Les cellules ont été lysées après 48 heures d'expression. (**B, D**) L'abondance de IREα a été quantifiée avec ImageLab où le signal de la bande obtenue est normalisé sur le signal de la membrane détectée par *stain free*. Les quantités sont normalisées sur (**B**) le vecteur ou (**D**) RNF13 WT. Les analyses statistiques donnent des résultats non significatifs en utilisant (**B**) un test t apparié bilatéral ou (**D**) une ANOVA à un facteur avec mesures répétées et comparaisons multiples. Les protocoles de transfection (LipofectAMINE), lyse et immunobuvardage standards du laboratoire ont été utilisés et sont détaillés dans les sections 2.4, 3.4, 4.4 et 5.4.

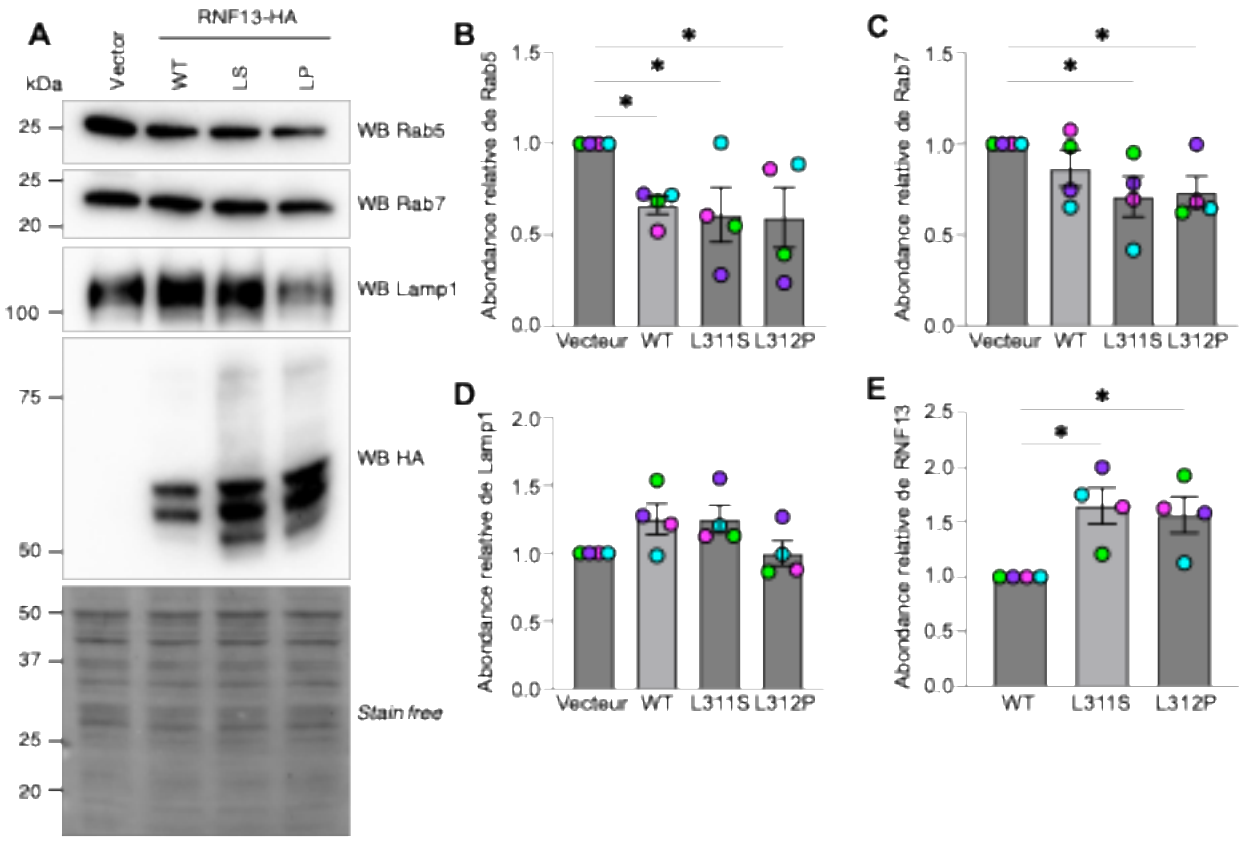


Figure A.2 : RNF13 WT diminue l'abondance de Rab5 alors que les variants DEE73 diminuent également celle de Rab7.

(**A**) Des cellules HEK293T/17 ont été transfectées avec des plasmides encodant les protéines RNF13-HA WT, L311S et L312P ou le vecteur vide. Les cellules ont été lysées après 48 heures d'expression. (**B-E**) Les abondances de (**B**) Rab5, (**C**) Rab7, (**D**) Lamp1 et (**E**) HA (RNF13) ont été quantifiées avec ImageLab où le signal de la bande obtenue est normalisé sur le signal de la membrane détectée par *stain free*. Les quantités sont normalisées sur la valeur obtenue avec le vecteur. Les analyses statistiques donnent des résultats significatifs (* $p < 0.05$) avec une ANOVA à un facteur avec mesures répétées et comparaisons multiples. Les protocoles de transfection (LipofectAMINE), lyse et immunobuvardage standards du laboratoire ont été utilisés et sont détaillés dans les sections 2.4, 3.4, 4.4 et 5.4.

ANNEXE B

POSSIBLE LIEN ENTRE L'AUTOPHAGIE ET LE ROUTAGE PAR AP-1 DE RNF13

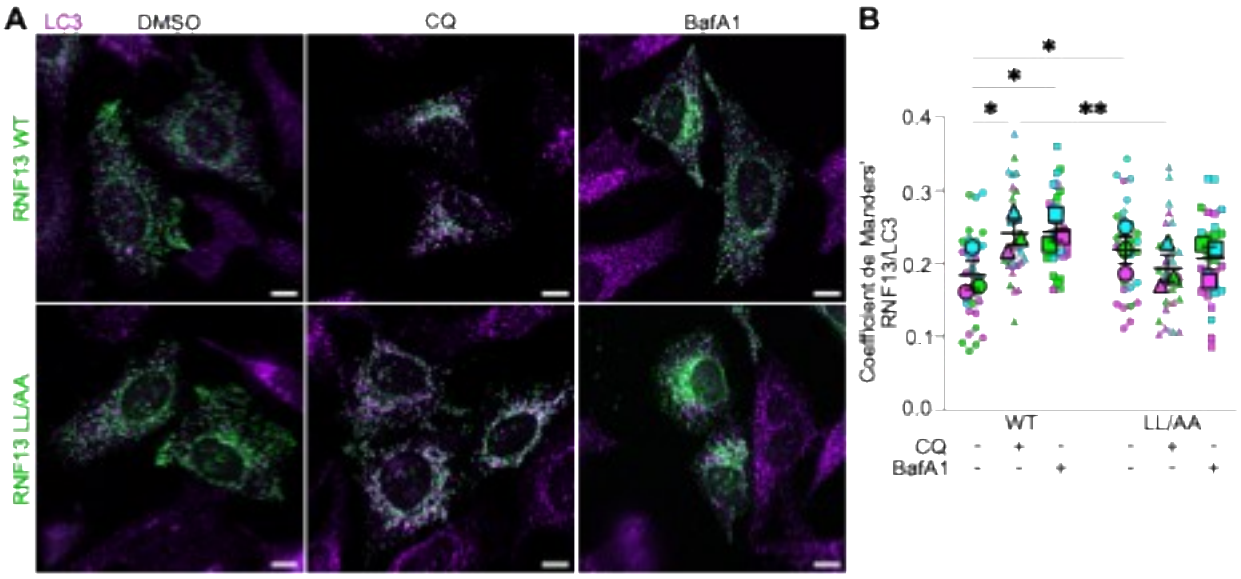


Figure B.1 : RNF13 LL/AA colocalise davantage avec LC3 en condition basale que le WT, mais n'augmente pas lorsque la fonction lysosomale est altérée par des traitements pharmacologiques.

(**A**) Des cellules HeLa ont été transfectées avec des plasmides encodant les protéines RNF13-GFP WT et LL/AA. Après 20 heures d'expression, les cellules ont été traitées pendant 4 heures avec 100 µM de chloroquine (CQ), 100 nM de bafilomycine A1 (BafA1) ou un volume équivalent de véhicule (DMSO). La protéine endogène LC3 (en mauve) a été détectée par immunofluorescence en utilisant la technique de fixation et de perméabilisation au méthanol décrite dans la section 3.4.5. (**B**) La colocalisation a été faite sur une tranche d'image en ajustant le *threshold* pour ne garder que les punctaes. Les analyses statistiques donnent des résultats significatifs (* $p < 0.05$ ou ** $p < 0.01$) avec une ANOVA à deux facteurs avec mesures répétées et comparaisons multiples. Les protocoles de transfection (calcium phosphate) et d'acquisition standards du laboratoire ont été utilisés et sont détaillés dans la section 3.4.

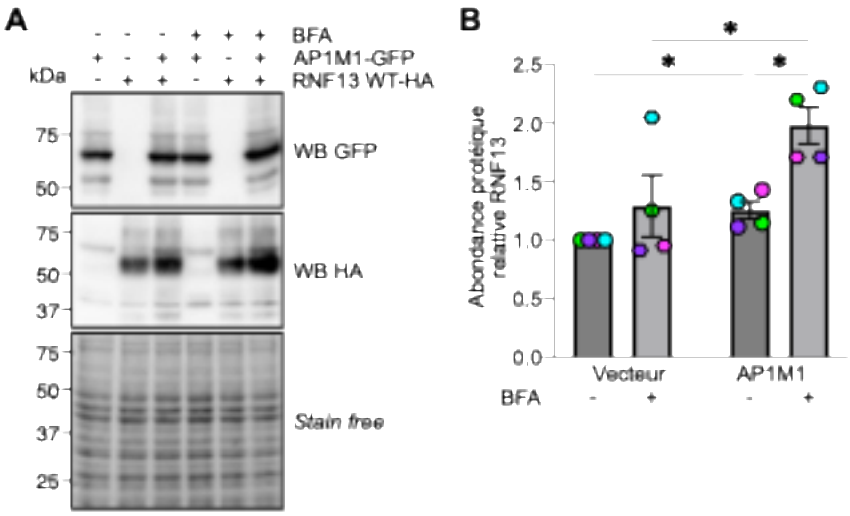


Figure B.2 : L'abondance protéique de RNF13 est augmentée par la présence de AP1M1 ou par un traitement de BFA avec un effet additif lorsque combinés.

(**A**) L'immunobuvardage correspond à celui présenté dans la figure 3.S2 et est présenté pour accompagner la quantification des lysats provenant de cette série d'expériences. (**B**) L'abondance de HA (RNF13) a été quantifiée avec ImageLab où le signal de la bande obtenue est normalisé sur le signal de la membrane détectée par stain free. Les quantités sont normalisées sur la valeur obtenue avec le vecteur. Les analyses statistiques donnent des résultats significatifs (* $p < 0.05$) avec une ANOVA à deux facteurs avec mesures répétées et comparaisons multiples.

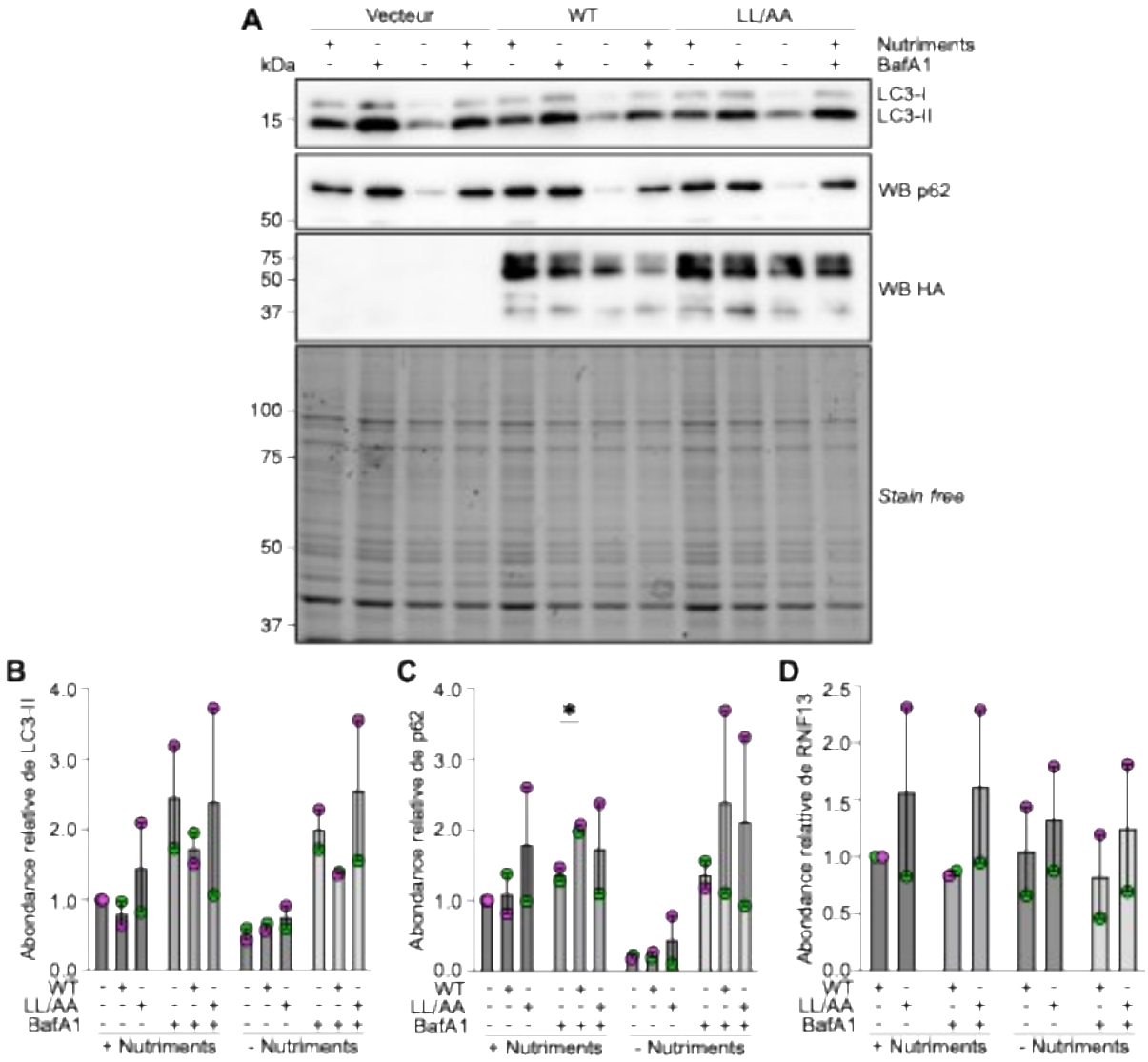


Figure B.3 : RNF13 WT augmente les autophagosomes p62 positifs et LC3-II négatifs alors que RNF13 LL/AA altère la dégradation de p62.

(**A**) Des cellules HeLa ont été transfectées avec des plasmides encodant les protéines RNF13-HA WT et LL/AA. Après 48 heures d'expression, les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec 10 nM de bafilomycine A1 (BafA1) ou un volume équivalent de véhicule (DMSO) dans du milieu supplémenté de 1% ou 10% FBS (identifiés – ou + nutriments, respectivement) avant d'être lysées. Les protéines endogènes LC3 et p62 ont été détectées par immunobuvardage. (**B-D**) Les abondances de (**B**) LC3-II, (**C**) p62 et (**D**) HA (RNF13) ont été quantifiées avec ImageLab où le signal de la bande obtenue est normalisé sur le signal de la membrane détectée par *stain free*. Les quantités sont normalisées sur la valeur obtenue avec le vecteur. Les analyses statistiques donnent des résultats significatifs (* $p < 0.05$) avec une ANOVA à deux facteurs avec mesures répétées et comparaisons multiples. Les protocoles de transfection (calcium phosphate dans plaque de 6-puits), lyse et immunobuvardage standards du laboratoire ont été utilisés et sont détaillés dans la section 3.4.

ANNEXE C

EFFET DE LA PRÉSENCE DE IDS SUR DES FONCTIONS DE RNF13

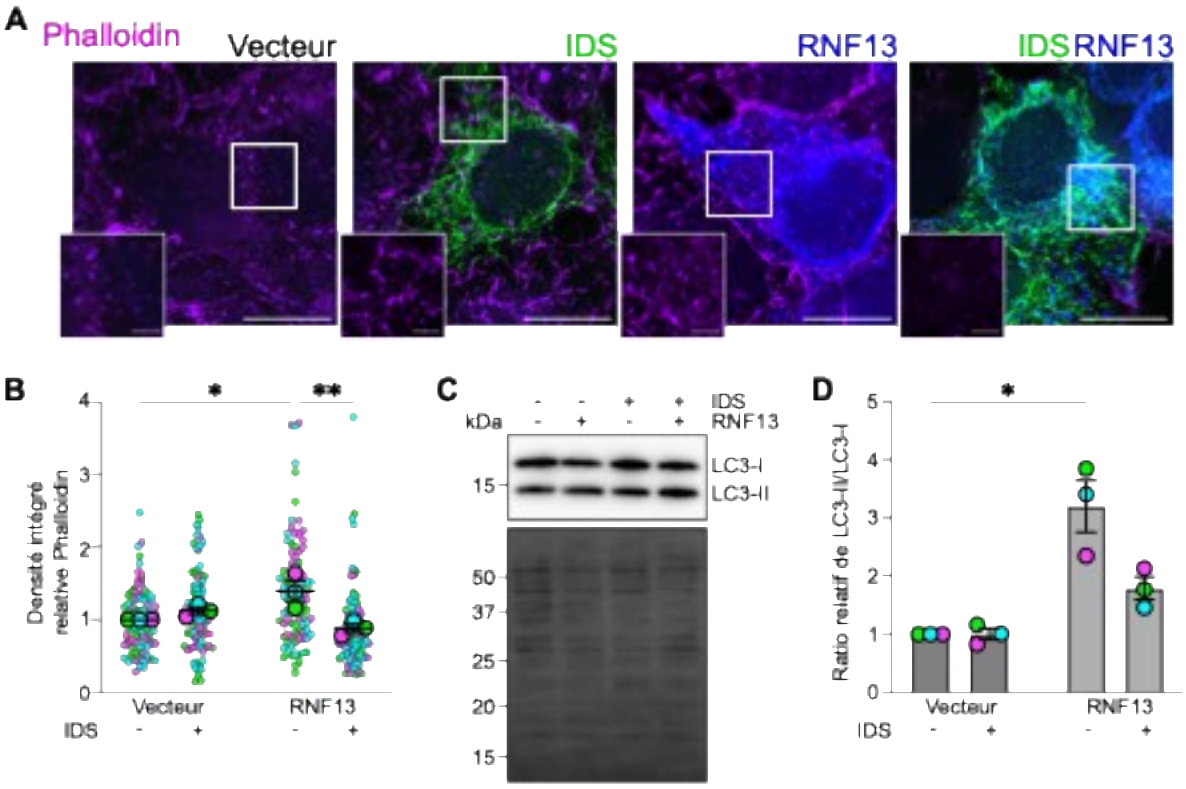


Figure C.1 : La présence de IDS empêche l'augmentation de l'actine F causée par RNF13, mais pas l'induction de l'autophagie.

(**A, C**) Des cellules HEK293T/17 ont été co-transfectées avec des plasmides encodant les protéines IDS-V5 WT et RNF13-HA WT. Après 48 heures d'expression, les cellules (**A**) sont fixées à la PFA ou (**C**) lysées. (**A**) Des anticorps contre les étiquettes HA et V5 sont utilisées pour détecter RNF13 (en bleu) et IDS (en vert), respectivement. L'incubation avec les anticorps secondaires a été effectuée pendant la nuit avec 0.4 unité de phalloïdine (en mauve). (**B**) L'intensité de fluorescence de la phalloïdine est obtenue par la fonction *Measure* dans ImageJ, comme décrit dans la section 3.4.9. (**C**) La protéine LC3 endogène est détectée par immunobuvardage. (**D**) L'abondance de LC3-II est normalisée sur l'abondance de LC3-I et le ratio obtenu est ensuite normalisé sur la valeur obtenue avec les vecteurs seuls. Les analyses statistiques donnent des résultats significatifs (* $p < 0.05$) avec une ANOVA à deux facteurs avec mesures répétées et comparaisons multiples. Les protocoles de transfection (LipofectAMINE), immunofluorescence, acquisition, lyse et immunobuvardage standards du laboratoire ont été utilisés et sont détaillés dans la section 5.4.

APPENDICE A
REVIEW

FROM DROSOPHILA TO HUMAN: BIOLOGICAL FUNCTION OF E3 LIGASE GODZILLA AND ITS ROLE IN DISEASE

Valérie C. Cabana [1,2] and Marc P. Lussier [1,2,*]

[1] Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada.
[2] Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC), Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada.
[*] Corresponding author: Marc P. Lussier, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Faculté des sciences, Case postale 8888, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada. Tel. (514) 987-3000 ext 5591; Fax (514) 987-4054; E-mail: lussier.marc@uqam.ca.

Manuscript published in Cells, 2022, 11(3):380.
DOI: 10.3390/cells11030380.

Contributions des auteurs:

Valérie C. Cabana a conceptualisé et rédigé le manuscrit.

Marc P. Lussier a conceptualisé et révisé le manuscrit.

Tous les auteurs ont lu et approuvé la publication de la verison finale de l'article.

1. Résumé

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle impliquée dans de multiples aspects du contrôle de la qualité cellulaire. Les enzymes d'activation de l'ubiquitine (E1), les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et les ligases d'ubiquitine (E3) assurent la réaction d'ubiquitination. Les ligases E3 contrôlent la spécificité de la protéine cible. Au cours de l'évolution, plusieurs familles de ligases E3 qui partagent une homologie de séquence entre leurs membres ont été identifiées. Dans cette revue de littérature, nous présentons un aperçu des progrès réalisés par la communauté scientifique concernant la fonction biologique de la ligase E3 Godzilla dans la Drosophile et de ses homologues humains, RNF13, RNF167 et ZNRF4. De plus, nous fournissons des informations apparues au cours de la dernière décennie concernant l'association de ces ligases E3 dans de multiples conditions pathologiques telles que le cancer, l'asthme, l'athérosclérose et une maladie infantile neurodégénérative rare.

2. Abstract

Ubiquitination is a post-translational modification involved in multiple aspects of cellular quality control. Ubiquitin-activating enzymes (E1), ubiquitin-conjugating enzymes (E2) and ubiquitin ligases (E3) mediate the ubiquitination reaction. The latter of these controls the specificity of the target protein. Evolutionarily, multiple E3 ligase families that share sequence homology between members have been identified. In this review, we present an overview of the progress made by the scientific community regarding the biological function of the *Drosophila* Godzilla E3 ligase and its human homologues, RNF13, RNF167 and ZNRF4. In addition, we provide information that emerged during the last decade regarding the association of these E3 ligases in multiple pathological conditions such as cancer, asthma, atherosclerotic plaque, and a rare infantile neurodegenerative disorder.

3. Introduction

Protein post-translational modification (PTM) refers to a modification of a polypeptide chain that occurs after its biosynthesis. These protein alterations typically require enzymes that catalyze either reversible or irreversible biochemical modifications and, thus, add another level of complexity and regulation to the proteome. It is clear from a vast array of studies that PTMs play crucial roles in influencing protein activity and consequently regulate cellular functions and signaling pathways (Mann et Jensen, 2003). The array of PTMs includes chemical modifications, such as phosphorylation, modification by complex molecules, such as glycosylation, or peptide modification, such as ubiquitination (Liu *et al.*, 2016a).

Ubiquitination is a reversible PTM that involves the covalent addition of one or more ubiquitin (Ub) molecules, a 76-amino acid protein, on a substrate's internal lysine via the formation of an isopeptide bond. The ultimate conjugation of Ub to a substrate requires an ATP-dependent enzymatic process involving the sequential action of an Ub-activating enzyme (E1), an Ub-conjugating enzyme (E2) and an Ub ligase enzyme (E3) (Hicke et Dunn, 2003; Komander et Rape, 2012). E1 generates a thioester bond between the Cys at their active site and the Ub C-terminal carboxyl group in an ATP-dependent process (Hicke et Dunn, 2003; Ye et Rape, 2009; Zheng *et al.*, 2016). E2s catalyze, through a transesterification reaction, the transfer of Ub from the E1 to the Cys residue in the active site of E2s to form a Ub~E2 conjugate (Hicke et Dunn, 2003; Ye et Rape, 2009; Zheng *et al.*, 2016). Finally, E3s promote the discharge of Ub from the Ub~E2 conjugate to promote the formation of an isopeptide bond between the acceptor lysine of the target protein and the C-terminal glycine of Ub (Hicke et Dunn, 2003; Ye et Rape, 2009; Zheng *et al.*, 2016) (Figure 1A). Ub contains seven lysine residues (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) and one methionine residue (M1), all of which can be targeted for Ub coupling, leading to different possibilities of poly-Ub chains and an expanded "ubiquitin code" (Behrends et Harper, 2011; Komander et Rape, 2012; Noad *et al.*, 2017; Rahighi *et al.*, 2009; Swatek et Komander, 2016; Tracz et Bialek, 2021; van Huizen et Kikkert, 2020; van Wijk *et al.*, 2017; van Wijk *et al.*, 2019) (Figure 1B). For instance, whereas mono-ubiquitination is usually involved in endocytosis, DNA repair and signal transduction, poly-ubiquitination is extremely diverse and used for a variety of signals (Sigismund *et al.*, 2004; Sun et Chen, 2004). For example, K48 chains are involved in proteasomal degradation while K63 chains are implicated in proteasome-independent signaling, such as endocytosis, protein kinase activation and the DNA damage response (Chen, 2005; Kravtsova-Ivantsiv *et al.*, 2013; Swatek et Komander, 2016). Furthermore, K29 chains are involved in lysosomal degradation while K11 chains are used to regulate endoplasmic reticulum-mediated degradation and cell cycle progression (Chastagner *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2010; Suresh *et al.*, 2016; Tracz et Bialek, 2021; van Huizen et Kikkert, 2020). Importantly, Ub chain linkages may need editing and removal from substrate

protein, a process requiring enzymes called deubiquitinases (DUBs) that exhibit specificity toward different Ub chain linkage topologies and structures (Hicke et Dunn, 2003; Zheng *et al.*, 2016).

Deciphering the Ub code and its associated mechanisms is central to understanding the regulation of protein activity, cellular signaling and cell physiology. One of the major lines of investigation that has motivated the Ub research community over the last decade is to uncover how genetically inherited errors can lead to devastating diseases. For instance, important advances have demonstrated genetic links in Angelman syndrome (caused by maternal deficiency of the E6-AP Ub E3 ligase), juvenile recessive Parkinson's disease (caused by mutations in the gene encoding Parkin Ub E3 ligase) and autoimmune polyendocrine syndrome type I (caused by mutations in the gene encoding the AIRE Ub E3 ligase) (Jiang et Beaudet, 2004). E3 ligases are a distinct group of enzymes crucial to the ubiquitination process by controlling the specificity of the reaction towards a targeted protein.

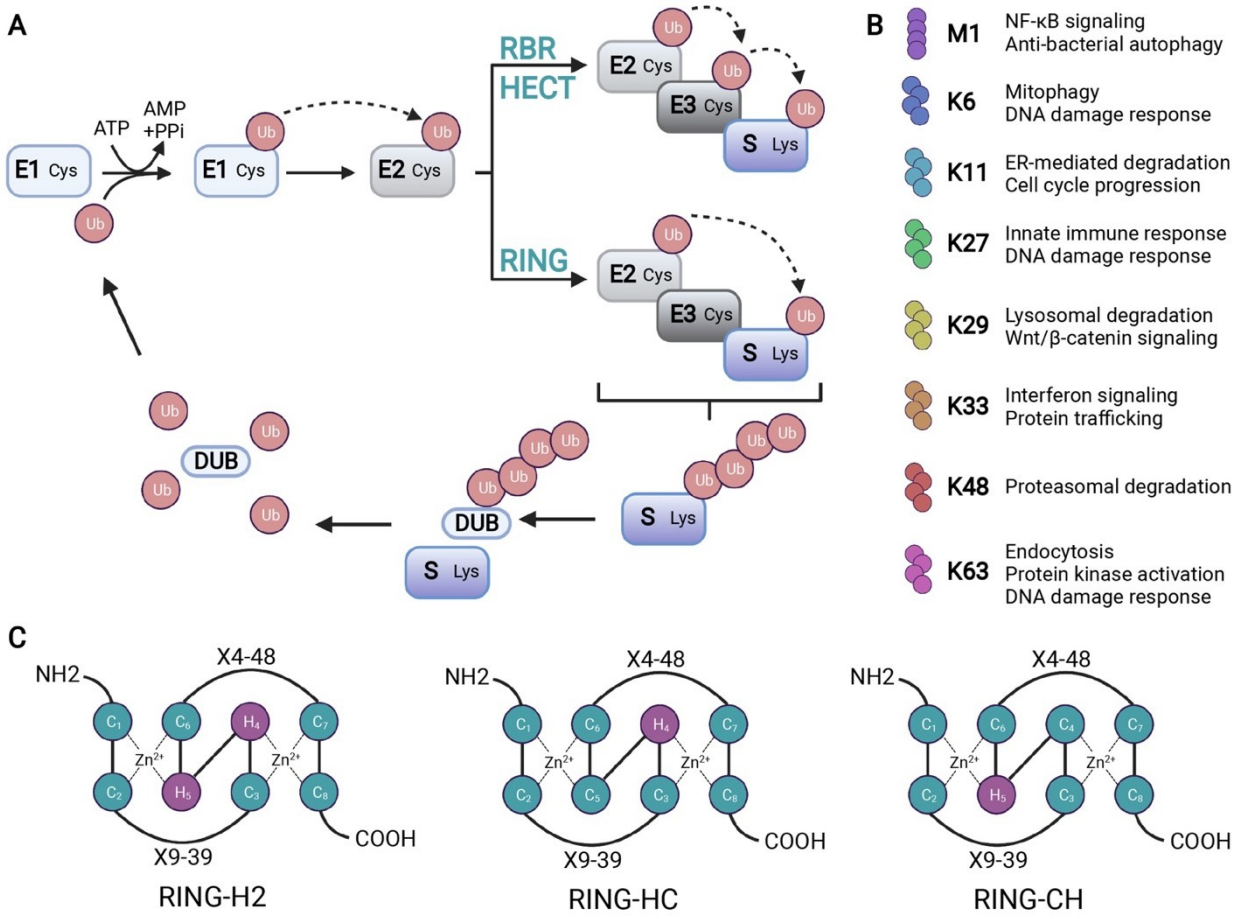
To date, more than 600 genes encoding E3 ligases have been identified in the human genome (Hicke et Dunn, 2003; Komander et Rape, 2012; van Wijk *et al.*, 2019). Based on their catalytic core domain, E3 ligases are architecturally diverse and are categorized according to their functional domain consisting of either a Really Interesting New Gene (RING) domain, a RING in-between RING (RBR) domain or a Homologous to E6-AP C-Terminal (HECT) domain (Zheng *et al.*, 2016) (Figure 1A). Specifically, the HECT-type E3s catalyze Ub transfer from Ub~E2 to a substrate via their active-site cysteine residue (Hicke et Dunn, 2003; Ye et Rape, 2009; Zheng *et al.*, 2016). In contrast, RING-type E3 does not possess an active cysteine in its functional RING domain and thus mediates the transfer of Ub on the substrate protein from the Ub-charged E2. Importantly, this family harbors a zinc-binding domain termed RING or U-box domain as the platform required to associate with Ub~E2s. Finally, RBR-type E3s are considered a hybrid between the HECT and RING domain since these enzymes function by using an E2-binding RING structure and a second RING domain that contains an active cysteine for the formation of an intermediate E3~Ub conjugate before the transfer of Ub to the substrate (Spratt *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2016).

While there are about 30 HECT domain E3 proteins in mammals, there are more than 300 potential RING finger-encoding proteins in the human genome (Li *et al.*, 2008; Metzger *et al.*, 2012). Of those, about 50 are predicted to have hydrophobic regions corresponding to transmembrane (TM) domains (Li *et al.*, 2008; Nakamura, 2011). TM-containing RING finger proteins can be further divided into subfamilies that include the tripartite motif-containing (TRIM), the protease-associated (PA) transmembrane RING (PA-TM-RING), the RBR and the membrane-associated RING-CH (MARCH) proteins. Except for the presence of a RING

finger domain, these four transmembrane RING finger-containing protein families share little sequence homology and have diverse subcellular localizations and functions (Nakamura, 2011).

The presence of an N-terminal putative signal peptide (SP), a PA domain, a single TM domain and a RING-H2 finger domain characterize the PA-TM-RING family (Nakamura, 2011; van Dijk *et al.*, 2014). The signal peptide allows targeting of the protein to the secretory pathway. This region of the protein has yet to be adequately studied for most if not all of the members of this family (Nakai et Imai, 2019). The PA domain is a conserved sequence of about 120 amino acids implicated in protein-protein interactions (Mahon et Bateman, 2000; van Dijk *et al.*, 2014). It was initially identified in non-catalytic regions of plant vacuolar sorting receptors and zinc-containing metalloproteases, but the exact role of this domain in the PA-TM-RING family of Ub ligases remains unclear (Luo et Hofmann, 2001; van Dijk *et al.*, 2014). The single TM domain is composed predominantly of nonpolar amino acid residues and is required for anchoring the protein in the membrane (Wayne Albers, 2012). The RING finger domain is divided into subgroups based on the presence of cysteine and histidine residues in the fourth and fifth positions of the catalytic domain (Nakamura, 2011). The RING-HC domain is composed of a C_3HC_4, the RING-H2 has a $C_3H_2C_3$ sequence and the RING-CH contains a C_4HC_3 (Nakamura, 2011) (Figure 1C). The PA-TM-RING family has a RING-H2 finger domain with two characteristic histidines in the fourth and fifth positions of the conserved Zn^{2+}-coordinating sites (Nakamura, 2011).

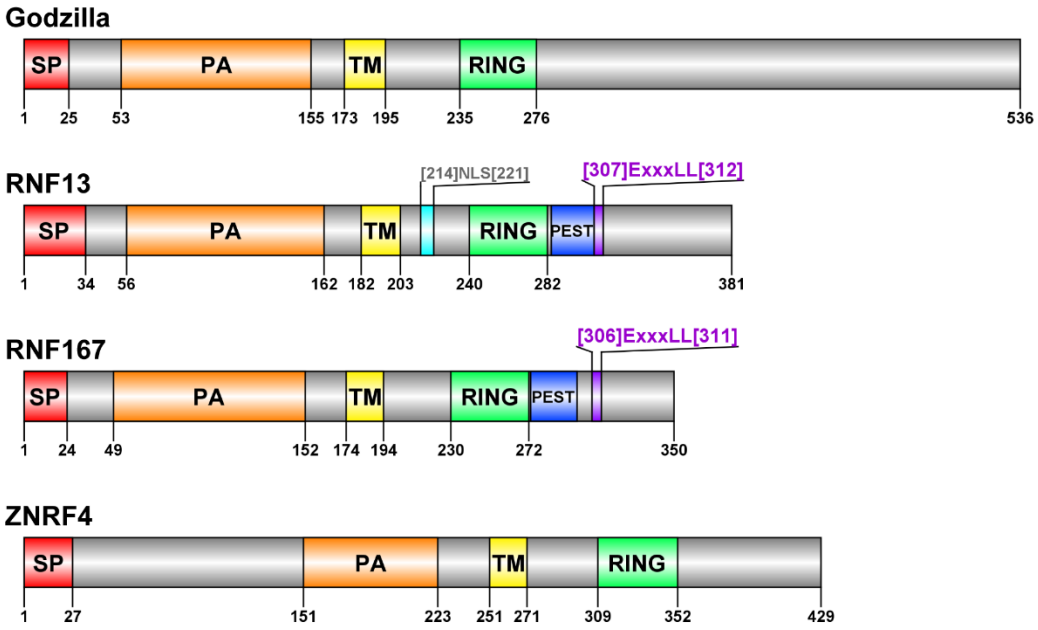
The PA-TM-RING family is present in *Drosophila melanogaster* where it is known as the Goliath Ub Ligase family with only two members, Goliath and Godzilla. While these two are the only representatives of the PA-TM-RING family in *Drosophila melanogaster*, there are nine predicted homologues in humans. RNF133, RNF148, RNF128/GRAIL, RNF130, RNF150 and RNF149 are closely related to Goliath whereas RNF167, RNF13 and ZNRF4 are homologs of Godzilla (Yamazaki *et al.*, 2013) (Figure 2). The *Goliath* gene was first identified in 1987 and was shown to be a transcription factor involved in *Drosophila* embryo mesoderm formation (Bouchard et Côté, 1993; Côté *et al.*, 1987). It was later demonstrated to be enriched after Notch activation and predicted to be active in fusion-competent myoblasts (Artero *et al.*, 2003). Since *Goliath* gene expression is restricted to embryonic muscle, *Drosophila Goliath* null mutants are viable and fertile (Artero *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2013).



Appendice Figure 1: Schematic representation of the ubiquitination process.

(**A**) Ubiquitination starts with an ATP-dependent step where the ubiquitin-activating enzyme (E1) creates a thioester bond between the Cys residue at their active site and ubiquitin (Ub). Ub is then transferred to the Cys residue on the Ub-conjugating enzyme (E2) active site. Finally, Ub ligase (E3) allow transferring Ub to a lysine residue of the substrate (S). There are three types of E3s: RBR, HECT and RING domain. RBR and HECT domain E3 ligase first transfer Ub to a Cys residue of their active site before transferring it to the substrate. The RING domain directly transfers Ub from E2s to the substrate. Deubiquitinases (DUB) can remove, edit the length, or disassemble a Ub chain to be recycled for a new cycle. (**B**) A description of the cellular function for the possible Ub chain formed through methionine (M)1 or lysine (K) 6, 11, 27, 29, 33, 48 or 63. (**C**) Schematic representation of the cross-brace arrangements of the RING-H2, RING-HC and RING-CH finger motifs. C and H represent cysteine and histidine residues numbered with their positions of the conserved zinc (Zn^{2+})-coordinating sites. X represents any amino acid located in the polypeptide between cysteines coordinating Zn^{2+}.

While much is known about human Goliath homologues, such as the role of RNF128 in immune tolerance (Anandasabapathy *et al.*, 2003; Heissmeyer *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2004), this review will exclusively focus on Godzilla and its human homologues. First, we will address Godzilla function in *Drosophila* and then subsequently present the cellular localization, function, and pathological dysfunction for Godzilla's human homologues RNF167, RNF13 and ZNRF4. For instance, hundreds of single-nucleotide variation (SNV) mutations for RNF167, RNF13 and ZNRF4 have been reported in cancers. Finally, we will highlight some remaining questions about these proteins.



Appendice Figure 2: Schematic domain structure of *Drosophila* Godzilla, human RNF13, human RNF167 and human ZNRF4 proteins.

SP, signal peptide (in red); PA, protease-associated domain (in orange); TM, transmembrane domain (in yellow); NLS, nuclear localization signal (in light blue); RING, RING domain (in green); PEST, PEST domain (in deep blue); ExxxLL, dileucine motif (in purple). Graphical representations were generated with DOG 2.0.1: Illustrator of Protein Domain Structures (Ren *et al.*, 2009).

4. Godzilla

The *Godzilla* gene was first discovered in 2000 when Adams *et al.* determined the nucleotide sequence of nearly all of the euchromatic portion of the Drosophila genome (Adams *et al.*, 2000). Godzilla is universally expressed in Drosophila, and alterations to this locus are larval lethal (Yamazaki *et al.*, 2013). The Godzilla protein sequence includes the characteristic domains of the family (Figure 2). When exogenously expressed

in mammalian human embryonic kidney 293 (HEK293T) cells, Godzilla significantly co-localized with the early endosomal marker Early Endosome Antigen 1 (EEA1). This is concordant with the observations of endogenous Godzilla protein overlapping with endosomes in Drosophila tissues (Yamazaki *et al.*, 2013). Furthermore, exogenous expression of Godzilla resulted in enlarged endosomes and a loss of Mannose-6-Phosphate (M6P) receptor staining, suggesting that the Godzilla expression could perturb the endosomal maturation process (Yamazaki *et al.*, 2013). However, the use of the Godzilla Ub ligase-dead mutant (DN for dominant-negative) did not result in enlarged endosomes, implying that Godzilla's impact on endosomal maturation is through RING-dependent substrate ubiquitination (Yamazaki *et al.*, 2013).

4.1. Godzilla's substrate regulates recycling endosomes

The vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP3), a member of the Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor (SNARE) family, is a substrate for Godzilla (Yamazaki *et al.*, 2013). Specifically, the enlarged endosome phenotype observed with Godzilla overexpression in HEK293T cells was blocked both by abrogating the VAMP3 activity via small interfering RNA (siRNA) and by the use of VAMP3 mutants that could not be ubiquitinated in HEK293T cells, implicating VAMP3 ubiquitination by Godzilla in the regulation of SNARE-dependent fusion (Yamazaki *et al.*, 2013). Knowing that VAMP3 is involved in the exocytosis of recycling endosomes (Galli *et al.*, 1994; McMahon *et al.*, 1993), the presence of Rab11-positive recycling vesicles, which normally exhibit a pericentriolar location, was analyzed in Godzilla-transfected cells (Yamazaki *et al.*, 2013). Wild-type (WT) Godzilla-expressing cells showed residual Rab11 staining in the vicinity of the enlarged endosomes, meaning that the Rab11-containing vesicles were unable to properly form in the presence of Godzilla (Yamazaki *et al.*, 2013). Interestingly, the DN Godzilla did not induce the same phenotype, suggesting that the impact on recycling endosomes is through RING-dependent ubiquitination (Yamazaki *et al.*, 2013). Furthermore, transferrin internalization was delayed in the cells expressing the active form of Godzilla, in contrast to the DN Godzilla, further supporting the role of Godzilla in the regulation of recycling endosome trafficking (Yamazaki *et al.*, 2013). Importantly, the knockdown of the *Drosophila* homologue of VAMP3, Synaptobrevin (Syb), in *Drosophila* wing disc led to results similar to those described above, confirming the role of Godzilla *in vivo* (Yamazaki *et al.*, 2013).

4.2. Wingless transcytosis

Usually, to prevent extracellular protein transfer, the apical and basolateral membranes of epithelia are insulated from each other (Tuma et Hubbard, 2003). Transcytosis is the vesicular transport process that allows proteins to cross the cellular barriers (Tuma et Hubbard, 2003). Interestingly, a role for Godzilla was uncovered in Wingless transcytosis where Godzilla promotes signaling in *Drosophila* wing imaginal discs

(Yamazaki *et al.*, 2016). Yamazaki *et al.* have found that Wingless is first produced apically before being transcytosed to the basolateral surface, where it engages in a signaling pathway (Yamazaki *et al.*, 2016). The authors demonstrated that this transcytosis is dependent on Godzilla (Yamazaki *et al.*, 2016). Godzilla knockdown led to the loss of the wing margin, a reduced expression of Senseless, which is a target of Wingless signaling, and the accumulation of intracellular Wingless in the cellular apical region (Yamazaki *et al.*, 2016). In agreement with the preceding demonstration that Godzilla ubiquitinates Syb (Yamazaki *et al.*, 2013), Syb mutants and Syb knockdown led to a similar phenotype as the one observed in the Godzilla knockdown cells (Yamazaki *et al.*, 2016). Overall, these studies suggest that Godzilla has important roles in regulating recycling endosome trafficking and in Wingless transcytosis through the ubiquitination of the Syb protein (Yamazaki *et al.*, 2016; Yamazaki *et al.*, 2013).

5. RNF13

Ring Finger Protein 13 (RNF13) was first identified in 1996 as chicken RING zinc finger (C-RZF) when Tranque *et al.* studied the changes in gene expression following tenascin-C treatment in chicken embryo brains (Tranque *et al.*, 1996). They found that the C-RZF gene expression was upregulated, but the implication of this effect is still unknown (Tranque *et al.*, 1996). The RNF13 sequence includes the characteristic domains of the PA-TM-RING family, in addition to a PEST domain (described below), a nuclear localization signal (NLS), and a canonical [D/E]xxxL[L/I] motif (Figure 2) (Bocock *et al.*, 2009). Until now, the mammalian RNF13 protein mostly has been localized to the endoplasmic reticulum (ER), Golgi, late endosomes, lysosomes, and the plasma membrane (Arshad *et al.*, 2013; Bocock *et al.*, 2009; Bocock *et al.*, 2010; van Dijk *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2009).

5.1. Protein domains

5.1.1. PEST domain

An intriguing region within RNF13 is the PEST domain, which contains a high number of proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T) residues usually, but not always, with clusters of several positively charged amino acids that promote the rapid degradation of short half-life proteins (Rogers *et al.*, 1986). The short half-life of RNF13 was hypothesized to be associated with its PEST domain. Specifically, it was demonstrated that the exogenous expression of RNF13 in Chinese hamster ovary (CHO) cells was barely detectable unless the cells were treated with the proteasomal inhibitor MG132 (Bocock *et al.*, 2009; Bocock *et al.*, 2010). Interestingly, RNF13 abundance was stabilized in the cells treated with the protein kinase C (PKC) agonist phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), increasing RNF13's half-life similar to that of MG132 (Bocock *et al.*, 2010). However, to the best of our knowledge, no study has evaluated the

implication of the PEST domain in RNF13 protein turnover and, specifically, whether MG132 or PMA treatment act through this domain to increase RNF13's half-life.

5.1.2. Nuclear localization signal

RNF13 appears to possess an NLS, but with an undetermined function. The treatment of HeLa cells with PMA caused RNF13 to be targeted to the inner nuclear membrane (INM) (Bocock *et al.*, 2010), suggesting a potential nuclear role for the protein in response to some cellular signals (Bocock *et al.*, 2010). Mechanistically, RNF13 targeting to the INM requires the protein to first traffic through the endosomes (Bocock *et al.*, 2010). RNF13 undergoes extensive proteolysis in order to release both the PA- and the RING-domains from the membrane (Bocock *et al.*, 2009). However, the role of RNF13 in the nucleus, and why it undergoes such proteolytic events, remain to be elucidated.

5.1.3. Di-leucine sorting signal

Another region of interest in the RNF13 protein sequence is the presence of a canonical [D/E]xxxL[L/I]-type di-leucine sorting signal. This region binds to adaptor protein (AP) complexes to allow proper sorting, targeting, and routing of a transmembrane protein, such as RNF13, within the secretory pathway and endolysosomal compartments (Boehm et Bonifacino, 2001; Bonifacino et Traub, 2003). Recent studies using affinity-purification and mass spectrometry analyses (Huttlin *et al.*, 2021; Huttlin *et al.*, 2017; Huttlin *et al.*, 2015) have identified an interaction between RNF13 and AP-1, an AP complex associated with the trans-Golgi network, and with early and recycling endosomes (Park et Guo, 2014; Sanger *et al.*, 2019). It was also found that RNF13 associates with AP-3 (Huttlin *et al.*, 2021; Huttlin *et al.*, 2017; Huttlin *et al.*, 2015), which mediates the transport from the tubular endosomes to the late endosomes and lysosomes and is therefore involved in the biogenesis of lysosome-related organelles (Park et Guo, 2014; Sanger *et al.*, 2019). Accordingly, our own work demonstrates that RNF13 interacts with the AP-3 complex in HEK293T cells (Cabana *et al.*, 2021), an interaction disrupted by an AP- binding defective RNF13 mutant (Fig. 2.4). By replacing the leucines with alanines in the di-leucine motif (i.e., L311A/L312A), the lysosomal localization of RNF13 was altered, suggesting that RNF13's di-leucine sorting signal motif is crucial for the lysosomal targeting of the protein (Fig. 2.3B) (Cabana *et al.*, 2021). Correspondingly, the knockdown of AP-3 altered the lysosomal localization of WT RNF13 and led to an alteration in the endosomal vesicle size (Fig. 2.6) (Cabana *et al.*, 2021). Overall, this suggests that RNF13 might go into the endolysosomal compartments through an AP-3 dependent pathway. Future studies are critical to clarify the mechanism leading to the endolysosomal localization of RNF13 (Cabana *et al.*, 2021).

5.2. Cellular functions

5.2.1. Neurobiological-associated role

Over the years, RNF13 expression has been associated with neurobiological functions. For instance, the ectopic expression of RNF13 allows the spontaneous growth of neurites in PC12 cells, which is similar to the nerve growth factor treatment of these cells (Saito *et al.*, 2005). In addition, RNF13 mRNA expression doubled in the B35 cells when they were treated with dibutyryl-cAMP (Bocock *et al.*, 2009). Together, these studies implicate RNF13 in neurodevelopment. Accordingly, evidence shows that RNF13 gene expression in humans is ubiquitous, but higher in the brain, cerebellum, spinal cord, and testis (Bocock *et al.*, 2009; Kaneko *et al.*, 2016; Saito *et al.*, 2005). Interestingly, a study using RNF13 knockout mice displaying a deficit in learning showed that the synaptic vesicle density decreased while the active zone size increased, suggesting that these observations resulted from the impaired SNARE complex assembly (Zhang *et al.*, 2013). The study also demonstrates that RNF13 ubiquitinates SNARE-associated protein (snapin) to allow its interaction with Synaptosome associated protein 25 (SNAP-25) to strengthen the SNARE complex (Zhang *et al.*, 2013). Co-immunoprecipitation assays demonstrated that RNF13 knockout mice have decreased interaction between snapin/SNAP-25, Vamp-2/SNAP-25, Synaptotagmin/SNAP-25, and Synaptotagmin/Vamp-2, suggesting that RNF13 plays a critical role in synaptic neurotransmission (Zhang *et al.*, 2013). Interestingly, while the authors reported K29-linked polyubiquitination of snapin by RNF13, increasing snapin protein expression was correlated in a linear relationship with higher RNF13 protein expression, suggesting that RNF13 does not promote snapin degradation (Zhang *et al.*, 2013). While K29 polyubiquitination has been reported to regulate some kinase activities, the role for RNF13-mediated snapin K29-linked Ub chains remains to be elucidated (Al-Hakim *et al.*, 2008).

5.2.2. Cell migration and invasiness

In addition to its implication in neurobiology, RNF13 has been associated with tumorigenesis, ER stress, and myogenesis (Arshad *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). In pancreatic cancer, the overexpression of WT, but not DN, RNF13 in MiaPaca-2 cells led to increased matrix metallopeptidase 9 (MMP-9) activity, suggesting that the Ub ligase activity of RNF13 promotes metalloprotease function and cell invasion (Zhang *et al.*, 2009). In contrast, RNF13 knockout mice implanted with a pulmonary metastatic cancer cell model did not have a difference in tumor size when compared to their WT littermates, but the WTs exhibited a larger metastatic area in the lung (Cheng *et al.*, 2015). Interestingly, this study shows that RNF13 knockout mice had a reduced granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) concentration in the lung, suggesting that RNF13 reduces the colonization of metastases through the regulation of GM-CSF concentration (Cheng *et al.*, 2015). Whereas

the molecular mechanism of RNF13 regulation of GM-CSF concentration is not yet understood, it is well known that invasion is the first step to metastasis formation while the host microenvironment is key to establishing the final fate of the tumor cells (Cheng *et al.*, 2015). Thus, it is possible that a higher expression of RNF13 leads to enhanced invasiveness but also reduces the likelihood of metastatic colonization. In order to shed light on the discrepancy of these two studies (Cheng *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2009), future studies will need to dissociate the function of RNF13 at the protein network level (i.e., with various interactors) and the Ub ligase activity.

5.2.3. ER stress

An important implication in cellular apoptosis has been reported for RNF13. Specifically, the ectopic expression of RNF13 increases apoptosis while RNF13 knockdown led to cell resistance to apoptosis, induced by treatment using the PKC inhibitor staurosporine (STS) (Arshad *et al.*, 2013). Specifically, RNF13 ectopic expression in SHSY-5Y cells increased the amount of spliced X-Box Binding Protein 1 (XBP1), a result similar to that of ER stress induction using tunicamycin (Arshad *et al.*, 2013). Conversely, RNF13 knockdown reduced both the amount of spliced XBP1, phosphorylated c-Jun NH_2-terminal kinase (JNK), and phosphorylated c-Jun in cells treated with tunicamycin (Arshad *et al.*, 2013). The authors also demonstrated that RNF13 interacts with inositol-requiring enzyme 1α (IRE1α). The ectopic expression of RNF13 increases the IRE1α phosphorylation, suggesting that RNF13 regulates ER stress-induced apoptosis through the activation of the IRE1α-TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)-JNK signaling pathway (Arshad *et al.*, 2013). Supporting this idea, a cycloheximide chase experiment demonstrated that the RNF13–IRE1α interaction increased the half-life and the stability of IRE1α (Arshad *et al.*, 2014).

5.2.4. Myogenesis and muscle regeneration

The role of RNF13 in myogenesis has only been studied in chickens and mice (Meng *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2010). Specifically, myostatin, a negative regulator that inhibits myoblast proliferation and differentiation, induces C-RZF gene expression in chicken fetal myoblasts (CFM) (Zhang *et al.*, 2010). The analysis of the temporal pattern of the C-RZF protein has revealed that it was highly expressed in embryonic skeletal muscle, but rapidly decreased to almost undetectable levels at one week after hatching (Zhang *et al.*, 2010). Furthermore, ectopic expression of C-RZF in CFM led to a reduced cell number. An important experiment using [^{3}H]-thymidine incorporation suggested that the decreased cell number was not a result of increased cell death, but more likely an inhibitory effect of C-RZF on CFM proliferation (Zhang *et al.*, 2010). Following this idea, the authors looked at the expression of MyoD and Caveolin-3, two myogenic regulatory factors. They found that both MyoD and Caveolin-3 were downregulated in C-RZF-overexpressing CFM, suggesting that C-RZF could act as a negative regulator of muscle cell proliferation.

To our knowledge, whether human RNF13 has a similar function remains to be seen (Zhang *et al.*, 2010). Another study has investigated the function of RNF13 in cardiotoxin (CTX)-induced skeletal muscle regeneration. The results show that after CTX damage, RNF13 knockout mice had more regenerating fibers in their tibialis anterior (TA) muscles than their WT littermates (Meng *et al.*, 2014). Likewise, satellite cell proliferation was also accelerated while cytokines interleukin-4 (IL-4) and interleukin-6 (IL-6) were upregulated after muscle damage in the CTX-treated RNF13 knockout mice (Meng *et al.*, 2014). Although the study did not explain how RNF13 acts on these cytokines, the use of neutralizing antibodies against those two cytokines slowed the regeneration process in the CTX-treated RNF13 knockout mice, suggesting that the effect of RNF13 on cell proliferation involves a tight regulation of IL-4 and IL-6 levels (Meng *et al.*, 2014).

5.3. Pathological dysfunctions associated with RNF13

5.3.1. Cancer

One study investigated some of the RNF13 variants identified in tumor samples (van Dijk *et al.*, 2014). While the overexpression of RNF13 WT proteins induced giant endosomes in HEK293T cells, only the variants located within the PA or RING domain lost the ability to induce this phenotype (van Dijk *et al.*, 2014). Interestingly, the point mutations in the RING domain allowed RNF13 to retain its endosomal localization, while the mutations in the PA domain did not (van Dijk *et al.*, 2014). Furthermore, altered RNF13 expression has been linked to cancer. Indeed, RNF13 expression is downregulated in uveal melanoma (Ness *et al.*, 2020), while RNF13 expression was found to be significantly higher in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) than in normal, healthy pancreatic tissue (Zhang *et al.*, 2009). The upregulated RNF13 expression was shown to be associated with histological grading, and the positive staining of RNF13 was mostly found in well-differentiated tumors (Zhang *et al.*, 2009).

5.3.2. Atherosclerotic plaques

RNF13 altered expression is not only linked to cancer. In fact, recent studies have shown that RNF13 gene expression is upregulated in atherosclerotic plaques (Zhang *et al.*, 2020b) and downregulated in asthma (Bazan-Socha *et al.*, 2021). Also, Huang *et al.* discovered that the microRNA miR-32-3p regulates the expression of RNF13 (Huang *et al.*, 2021). Specifically, the expression of miR-32-3p was downregulated in cells that were treated with oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) and TNF-α to simulate an ER stress model, as observed in atherosclerosis (Huang *et al.*, 2021). Under the same conditions, RNF13 mRNA expression and protein abundance were upregulated (Huang *et al.*, 2021). In addition, ectopic expression of RNF13 in the presence of ox-LDL and TNF-α led to an increase in stress-induced apoptosis (Huang *et al.*, 2021). Interestingly, bioinformatics analysis revealed that miR-32-3p was also downregulated in patients

with acute myocardial infarction (Huang *et al.*, 2021). In an atherosclerotic plaque model in rats, it was found that the inhibition of miR-32-3p led to higher RNF13 expression, an upregulation of ER stress-related proteins, higher arterial plaque instability, a lower survival rate, and increased pathological lesions in the arterial tissue. These results suggest that RNF13 might be involved in atherosclerotic plaques via its role on ER stress-induced cell apoptosis (Huang *et al.*, 2021).

5.3.3. Parkinson's disease

A recent study demonstrated that silencing RNF13 could alleviate the symptoms in a Parkinson's disease mouse model (Ji *et al.*, 2020). Specifically, the injection of a short hairpin RNA specific for RNF13 (shRNF13) with an intraperitoneal injection of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to induce the Parkinson's disease model demonstrated that the group with the silenced RNF13 showed improved motor coordination when compared to an MPTP model only (Ji *et al.*, 2020). Importantly, the apoptosis of neurons in the substantia nigra was reduced in shRNF13 + MPTP when compared to MPTP alone. Interestingly, the authors measured a significant reduction in the protein abundance for the different components of the IRE1α-TRAF2-Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-JNK pathway (Ji *et al.*, 2020). Furthermore, dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta had significantly more immunohistochemical staining of tyrosine hydroxylase-immunoreactive (TH-IR) in the neurons from the MPTP + shRNF13 mice when compared to MPTP alone (Ji *et al.*, 2020). Overall, this study suggests that reducing the activation of the IRE1α-TRAF2-ASK1-JNK pathway by silencing RNF13 might be beneficial to alleviate some of the motor dysfunction and to prevent the dopaminergic neuron damage in a Parkinson's disease mouse model (Ji *et al.*, 2020).

5.3.4. Developmental and epileptic encephalopathy 73

Edvardson *et al.* reported three unrelated individuals with developmental and epileptic encephalopathy 73 (DEE73, OMIM #618379) carrying a de novo heterozygous mutation in the gene encoding RNF13 (c.932T>C [p.L311S] and c.935T>C [p.L312P]) (Edvardson *et al.*, 2019). These individuals had clinical features including, but not limited to, microcephaly, feeding difficulties, failure to thrive, restlessness, refractory epilepsy, cortical visual impairment, bilateral hearing loss, scoliosis, and a profound intellectual disability (Edvardson *et al.*, 2019). In this report, fibroblast and lymphoblast cells derived from an affected individual carrying the RNF13 variant L311S were treated with tunicamycin to induce ER stress (Edvardson *et al.*, 2019). The results showed that both spliced XBP1 and phosphorylated c-Jun were increased in the treated cells from the affected individual compared to an unrelated control, suggesting that the mutated cells had enhanced ER stress-induced apoptosis signaling (Edvardson *et al.*, 2019). Although this seminal study provided important evidence regarding the biological implication of expressing RNF13 variant L311S, it

did not address the fact that the identified variants L311S and L312P completely altered RNF13's [D/E]xxxL[L/I]-type di-leucine sorting signal. In our own study, we demonstrated that both RNF13 L311S and L312P variants disrupted the association with AP-3 (Fig. 2.4) (Cabana *et al.*, 2021). Notably, both variants no longer localized in the lysosomes, although they changed the morphology of the endolysosomal vesicles (Fig. 2.1) (Cabana *et al.*, 2021). While we don't yet know the exact molecular mechanism involved and how it is linked to the increased apoptosis markers described by Edvardson *et al.*, our results suggest that RNF13 L311S and L312P disrupt the endolysosomal pathway due to the loss of interaction with the AP-3 complex (Fig. 2.1; 2.4) (Cabana *et al.*, 2021; Edvardson *et al.*, 2019). Future studies will need to pinpoint the molecular and cellular mechanisms that are altered by the presence of the RNF13 variants and to investigate the possibility that enhanced ER stress-induced apoptosis signaling may reflect an altered endolysosomal function.

6. RNF167

Ring Finger Protein 167 (RNF167), initially named RING105 (Yamada et Gorbsky, 2006), was first isolated in a bacterial two-hybrid screen with hCdc34/UbcH3 as bait (Yamada et Gorbsky, 2006). The RNF167 sequence (Uniprot Accession Q9H6Y7) includes the characteristic domains of the PA-TM-RING family, along with a PEST domain (Figure 2) (Yamada et Gorbsky, 2006). As for RNF13, the presence of the PEST domain in RNF167 could indicate a short half-life of the protein. Accordingly, the ectopically expressed WT RNF167, but not DN RNF167, is rapidly degraded in both HeLa and HEK293T cells in a process sensitive to the proteasome inhibitor MG132, which inhibits the degradation of the protein (Yamada et Gorbsky, 2006). The experiments performed in our laboratory do not support the statement related to MG132, and the reason for this discrepancy is unclear. Similar to RNF13, RNF167 includes a canonical di-leucine motif that has never been studied. Interestingly, affinity-purification and mass spectrometry analyses (Huttlin *et al.*, 2021; Huttlin *et al.*, 2017) demonstrate that RNF167 interacts with AP-3, which supports the previous studies describing RNF167 localization in late endosomes and lysosomes (Deshar *et al.*, 2016; Ghilarducci *et al.*, 2021; Lussier *et al.*, 2012; van Dijk *et al.*, 2014). Future molecular studies will likely define the importance of the di-leucine motif in RNF167 trafficking to endolysosomal compartments.

6.1. Expression

The RNA expression of RNF167 in various tissues has been reported in the literature and, intriguingly, is highly divergent. For instance, using qPCR on Human Total RNA Master Panel II, RNF167 expression was elevated in the brain, fetal brain, cerebellum, and testis but was low in the pancreas (Kaneko *et al.*, 2016). On the other hand, using Human MTC Panel I and II, RNF167 expression was reported to be higher in the liver, pancreas, and testis, while being lower in the brain (Lussier *et al.*, 2012). Although both of these

studies show that RNF167 is ubiquitously expressed, the divergence may be associated with the normalization of the samples (Kaneko *et al.*, 2016; Lussier *et al.*, 2012). Importantly, RNF167 protein abundance in tissue was verified and found to be higher in the kidney and liver of human tissues (Yamada et Gorbsky, 2006). In the rodent brain, the cortex and hippocampus express similar levels of the RNF167 protein (Lussier *et al.*, 2012) in the detergent soluble synaptosome membrane fraction but excluded from the postsynaptic density (Ghilarducci *et al.*, 2021).

6.2. Neurotransmission modulator

In the brain, RNF167 is an important regulator of excitatory neurotransmission (Ghilarducci *et al.*, 2021; Lussier *et al.*, 2012). The expression of either WT or DN RNF167 in neurons (endogenous expression), and in HEK293T (ectopic expression), did not affect the total protein abundance of α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptor (AMPAR) subunits GluA1 or GluA2 (Lussier *et al.*, 2012). However, the surface expression of GluA2, a subunit of the AMPAR that plays a major role in excitatory synaptic transmission, was highly increased in the neurons that were infected with lentiviruses expressing DN RNF167 or shRNAs designed to knockdown endogenous RNF167 (Lussier *et al.*, 2012). The alteration of RNF167 activity led to an increase in evoked excitatory postsynaptic AMPAR currents (AMPAR-EPSCs) at the Schaffer collateral/CA1 synapses (Lussier *et al.*, 2012). This phenotype could be rescued by RNF167 WT overexpression (Lussier *et al.*, 2012). Overall, these results suggest that ubiquitination of GluA2 controls its surface expression and RNF167 regulates the neuronal synaptic strength (Lussier *et al.*, 2012).

To better understand the mechanisms underlying RNF167-mediated AMPAR ubiquitination and how it affects AMPAR synaptic targeting, Ghilarducci *et al.* characterized the interaction between Ub-conjugating E2 enzymes (E2s) and RNF167 (Ghilarducci *et al.*, 2021). Using *in vitro* ubiquitination, it was demonstrated that RNF167 could functionally interact with approximately fifteen E2s (Ghilarducci *et al.*, 2021). Interestingly, UBE2D1-4 and UBE2N interact with RNF167 WT with dissociation constants in the high nanomolar range (Ghilarducci *et al.*, 2021). Immunofluorescence microscopy confirmed that E2s and RNF167 were localized in the same intracellular compartment, and the ability of RNF167 to interact with and ubiquitinate GluA2 was demonstrated using *in vitro* binding and ubiquitination assays (Ghilarducci *et al.*, 2021). Interestingly, using a two-step *in vitro* ubiquitination assay, it was shown that UBE2D1 is first needed for mono-ubiquitination before the complex UBE2N/UBE2V1 can promote poly-ubiquitination of GluA2 in an RNF167-dependent manner (Ghilarducci *et al.*, 2021). Ultimately, the AMPA agonist-induced GluA2 ubiquitination in the hippocampal neurons was reduced in the cells that were pretreated with a UBE2N/UBE2V1 complex inhibitor, suggesting that the UBE2N/UBE2V1 enzymatic complex is involved

in activity-dependent GluA2 ubiquitination (Ghilarducci *et al.*, 2021). Due to the fact that AMPARs are modified with a K63-Ub chain (Widagdo *et al.*, 2015) and that UBE2N is responsible for assembling this chain (Ye et Rape, 2009), it is highly plausible, but remains to be clearly demonstrated, that RNF167 catalyzes the formation of a K63-specific polyubiquitination chain on GluA2.

6.3. Substrates regulate endosomal trafficking and lysosome positioning

In addition to neuronal function, RNF167 also regulates endosomal trafficking and lysosome positioning (Deshar *et al.*, 2016; Nair *et al.*, 2020; Yamazaki *et al.*, 2013). The exogenous expression of RNF167 in HEK293T led to a phenotype similar to the overexpression of Godzilla, which caused enlarged EEA1-positive early endosomes and a loss of Rab11-positive recycling endosomes (Yamazaki *et al.*, 2013). This study was the first to demonstrate the RNF167-dependent ubiquitination of Vamp3, suggesting that RNF167 regulates endosomal recycling in a manner similar to Godzilla (Yamazaki *et al.*, 2013). A few years later, a proximity-dependent biotin labelling approach led to the identification of the ADP-ribosylation factor-like protein 8B (Arl8B) as a new substrate for RNF167 (Deshar *et al.*, 2016). RNF167 targets Arl8B for degradation via the proteasome-dependent pathway in HeLa cells (Deshar *et al.*, 2016). The level of Arl8B protein decreased when the RNF167 protein level increased, and this effect on the Arl8B protein abundance was inhibited by MG132 treatment or by the depletion of RNF167 using RNF167-specific siRNAs (Deshar *et al.*, 2016). Knowing that Arl8B regulates lysosome localization and the knockdown of Arl8B causes the perinuclear clustering of lysosomes, the study showed that lysosomes were clustered in the perinuclear region in the presence of RNF167 WT but not DN (Deshar *et al.*, 2016). Specifically, they demonstrated that RNF167 caused the clustering of the lysosomes in the presence of Arl8B WT, but not with the K141R mutant that could not be ubiquitinated, suggesting a role of RNF167 in lysosome positioning through Arl8B degradation (Deshar *et al.*, 2016). Accordingly, the exogenous expression of RNF167 delays epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation in contrast to siRNF167, which increases the degradation rate (Deshar *et al.*, 2016). Specific siRNAs against Vamp3 and Arl8B also demonstrated that Vamp3 did not influence EGFR degradation while the knockdown of Arl8B recapitulates the RNF167 overexpression phenotype, suggesting that Arl8B degradation by RNF167 inhibits the EGFR trafficking to lysosomes (Deshar *et al.*, 2016).

Another study demonstrated that RNF167 must localize to lysosomes in order to induce perinuclear clustering because a PA-truncated RNF167 protein or a shorter isoform of RNF167 that does not localize to lysosomes did not induce the phenotype (Nair *et al.*, 2020). In another set of experiments, the overexpression of p50-Dynamitin, which disrupts the dynein–dynactin complex, and the inhibition of dynein with ciliobrevin both led to an increase in the peripheral distribution of lysosomes, suggesting that perinuclear

clustering is dynein dependent (Nair *et al.*, 2020). In conditions promoting lysosomal exocytosis, RNF167-transfected cells display a substantial reduction in the surface expression of lysosomal-associated membrane protein 1 (Lamp1) when compared to controls, suggesting that RNF167 regulates lysosomal exocytosis (Nair *et al.*, 2020). In addition, RNF167 overexpression increased the amount of propidium iodide (PI) stained cells, signifying that the plasma membrane was neither intact nor repaired after streptolysin-O (SLO) treatment-induced pore formation in the plasma membrane (Nair *et al.*, 2020).

6.4. Pathological dysfunctions associated with RNF167

6.4.1. Cancer

In addition to the identification of the RNF13 variants in tumor samples, some RNF167 variants were identified and characterized as well (van Dijk *et al.*, 2014). Similar to the results of RNF13, RNF167's variants, located within the PA or RING domain, abrogated the ability to induce giant endosomes in HEK293T cells (van Dijk *et al.*, 2014). Also, the authors demonstrated that RNF167 PA domain variant V98G, when co-expressed with WT RNF167, inhibits the formation of giant endosomes, therefore suggesting that the RNF167 V98G variant acts as a dominant-negative protein (van Dijk *et al.*, 2014). In another study, the K97N mutation in the PA domain was the only variant that did not induce lysosomal perinuclear clustering while increasing the surface expression of Lamp1, supporting the idea that RNF167 K97N increases lysosomal exocytosis (Nair *et al.*, 2020). Furthermore, cells overexpressing RNF167 K97N that were treated with SLO and Ca^{2+} to induce pore formation before allowing membrane resealing had lower PI staining than with WT RNF167, suggesting that the variant enhanced plasma membrane repair (Nair *et al.*, 2020). Overall, these studies suggest that PA domain variants of RNF167 found in tumor samples are mislocalized and might act as dominant negatives.

In an early study, it was reported that RNF167 polyubiquitinates Tumor-Suppressing Subchromosomal Transferable Fragment cDNA (TSSC5), a tumor suppressor, to degrade it via the proteasome pathway (Yamada et Gorbsky, 2006). In this specific study, ectopically expressed RNF167 delays the G1-to-S transition in HeLa cells (Yamada et Gorbsky, 2006). While the exact function of RNF167 in TSSC5 regulation is far from being understood (Yamada et Gorbsky, 2006), another study implicates RNF167 in cancer through the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) (Li *et al.*, 2021). RNF167 polyubiquitinates the protein Cytosolic arginine sensor for mTORC1 subunit 1 (CASTOR1) with a K29-linked Ub chain, which inhibits mTORC1 activation upon arginine deprivation, to promote CASTOR1 proteasomal degradation (Li *et al.*, 2021). Interestingly, phosphorylation of CASTOR1 by the serine/threonine kinase AKT1 enhances the interaction between CASTOR1 and RNF167 (Li *et al.*, 2021). Additionally, cells ectopically expressing RNF167 became insensitive to the arginine-mediated mTORC1

activation due to CASTOR1 degradation (Li *et al.*, 2021). The phosphomimetic variant of CASTOR1, which causes lower CASTOR1 protein abundance, did not inhibit mTORC1 activation, tumor growth, or cell proliferation. The variant also led to a lower survival rate, suggesting that RNF167-mediated degradation leads to enhanced mTORC1 activation, cell proliferation, and tumorigenesis (Li *et al.*, 2021). *In vivo*, high expression of RNF167 in breast tumors correlates with poor survival in human epidermal growth factor receptor 2 positive (HER2+) breast cancer while lower CASTOR1 expression was correlated with poor survival in estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer (Li *et al.*, 2021). Altogether, these important studies provided some mechanistic insight regarding RNF167 dysfunction in cancer cells. However, the same studies highlight the importance of further investigating the function and the Ub ligase activity of tumor-associated RNF167 variants.

7. ZNRF4

Zinc and Ring Finger 4 (ZNRF4, also referred to as Nixin) was first identified in 1999 when Fujii *et al.* isolated genes whose expression was induced in mouse spermatogenic cells (Fujii *et al.*, 1999). At the time, they called the protein spermatic-specific RING zinc finger (sperizin) (Fujii *et al.*, 1999). Using northern blot analysis, mouse sperizin was exclusively found in testis. The human ZNRF4 sequence (Uniprot Accession Q8WWF5) includes the characteristic domains of the family (Figure 2). The sperizin gene expression was detected in pre-pubertal testis beginning at 23 days old, increased at 29 days old, and then declined in adult testis (35 days old), suggesting that it may be involved in mouse spermatogenesis (Fujii *et al.*, 1999). Interestingly, sperizin expression was increased following a retinol treatment in vitamin A-deficient rat testes (Glozak *et al.*, 2003). Vitamin A is known to be critical in maintaining mammalian spermatogenesis and sperizin could be an important downstream protein of this cellular process (Glozak *et al.*, 2003). Furthermore, to our knowledge, no study has specifically investigated the role of the human ZNRF4 protein in spermatogenesis, but it is worth noting that ZNRF4 RNA expression in humans appears to be restricted to the testis as well (Kaneko *et al.*, 2016). However, while single nucleotide variations of ZNFR4 have been discovered in tumors, it should be noted that studies have yet to report the pathological impact of these variants.

7.1. Calnexin

While the overexpression of GFP-tagged sperizin (mouse protein) leads to a cytosolic localization in HeLa cells, the overexpression of ZNRF4-YFP (human protein) displays an ER localization in HeLa and HCT116 cells (Bist *et al.*, 2017; Fujii *et al.*, 1999; Neutzner *et al.*, 2011). Accordingly, ZNRF4 is implicated in the degradation of calnexin, an ER-localized chaperone (Neutzner *et al.*, 2011). Importantly, the ectopic

expression of WT, but not DN ZNRF4, reduces calnexin staining in HeLa cells (Neutzner *et al.*, 2011). The use of the proteasomal inhibitor MG132 demonstrated that ubiquitination of calnexin led to proteasomal degradation, confirming the important role that ZNRF4 plays in calnexin turnover (Neutzner *et al.*, 2011).

7.2. RIP2

A recent human genome-wide RNAi screen was performed to find negative regulators of nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2)-induced nuclear factor-κB (NF-κB) activation in HEK293T cells (Bist *et al.*, 2017). The authors discovered that ZNRF4 knockdown led to an increased response of NOD2-dependent NF-κB activation. Conversely, the ectopic expression of ZNRF4 in HEK293T led to a reduction in NOD2-induced NF-κB activation in a dose-dependent manner (Bist *et al.*, 2017). Using a DN ZNRF4 variant as a negative control, the authors confirmed that the overexpression of WT ZNRF4 led to reduced NOD2-dependent NF-κB activation and identified receptor-interacting protein 2 (RIP2), a major signal integrator for the NOD1 and NOD2 pathways, as the substrate (Bist *et al.*, 2017). The treatment with MG132 rescued RIP2 degradation when ZNRF4 was overexpressed, indicating that ubiquitination of RIP2 by ZNRF4 leads to proteasomal degradation. Importantly, this is consistent with the fact that ZNRF4 promotes K48-linked ubiquitination of RIP2 (Bist *et al.*, 2017). Additionally, the ZNRF4 knockdown in MPD-treated human monocyte-derived macrophages increased the secretion of cytokines, such as interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor α (TNF-α), and interleukin 1β (IL-1β) (Bist *et al.*, 2017). Research also demonstrated a role for ZNRF4 in NOD2-induced tolerance *in vivo* as ZNRF4 knockdown mice lost their ability to induce NOD2 tolerance when compared to WT mice (Bist *et al.*, 2017). Overall, these studies suggest that ZNRF4 has a function in various biological processes, including spermatogenesis, ER homeostasis and NOD2 signaling (Bist *et al.*, 2017; Fujii *et al.*, 1999; Glozak *et al.*, 2003; Neutzner *et al.*, 2011).

8. Conclusion and future perspectives

A lot of work has been done in the last 20 years to better understand the role of the human Godzilla homologues, RNF167, RNF13, and ZNRF4. Table 1 summarizes the biological function and pathological dysfunctions of these E3 ligases, as well as the known substrates and roles of their ubiquitination. However, many unanswered questions remain.

Over the last two decades, the use of high-throughput screening (HTS) has increased dramatically since it can repeatedly test thousands of samples per day (Attene-Ramos *et al.*, 2014). For instance, Huttlin *et al.* expressed hundreds of FLAG-HA-tagged baits in HEK293T cells and combined immunopurification and mass spectrometry to identify interactors of these bait proteins (Huttlin *et al.*, 2015). As shown in Figure 3, multiple interactors for RNF167, RNF13, and ZNRF4 were found using either this method or a similar one.

Interestingly, these Godzilla homologues all have in common interactions with the UBE2D family, UBE2E1, UBE2E3, and UBE2N, which can give information on the type of Ub linkage patterns these E3 ligases can perform (Figure 1) (Ghilarducci *et al.*, 2021; van Wijk *et al.*, 2009; Yamada et Gorbsky, 2006). Although no specific molecular mechanisms can be revealed by using HTS, it can, however, offer a starting point by providing putative interactors. For example, while there is very limited information available for ZNRF4, other than the fact that its expression was linked to spermatogenesis in mice (Fujii *et al.*, 1999), it is still unclear whether this function applies to humans as well. Importantly, the discovery of Frizzled-6 (FZD6) as one of the interactors for ZNRF4 (Huttlin *et al.*, 2021; Huttlin *et al.*, 2017) is quite intriguing since FZD6 knockout mice show a severe reduction in sperm counts (Stuebner *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2006). Therefore, studies are needed in order to determine the validity of a highly speculative mechanism where ZNRF4's role in spermatogenesis may be through interaction or regulation of FZD6.

In contrast to the limited knowledge regarding the interactors of ZNRF4 and its biological function, more information is available for both RNF167 and RNF13. For instance, we now know that RNF167 ubiquitinates TSSC5 leading to its degradation (Yamada et Gorbsky, 2006). How RNF167 regulates and controls the cell cycle, however, or the consequence of a dysfunction in this pathway is unknown. It is possible that RNF167 has substrates in diverse subcellular locations and needs to be trafficked depending on the cellular context. Accordingly, RNF167 substrates Vamp3, Arl8B, and GluA2 have all been characterized to transit within the endolysosomal pathway. This suggests that RNF167 traffics to the endolysosomes via a mechanism that is anticipated to be similar to the reported interaction between the canonical di-leucine motif of RNF13 and AP-3 (Cabana *et al.*, 2021), which is supported by the fact that both RNF13 and RNF167 have AP3S1 as common interactor (Figure 3) (Huttlin *et al.*, 2021; Huttlin *et al.*, 2017). Thus, it is possible that the di-leucine motif is required for the interaction with the AP complexes, while the PA domain might be critical for the interaction with proteins that allow the proper endosomal targeting of both RNF13 and RNF167. An interaction was also identified between ZNRF4 and IRE1α, which was previously demonstrated to interact with RNF13 (Figure 3) (Arshad *et al.*, 2013; Huttlin *et al.*, 2021; Huttlin *et al.*, 2017). Although their respective intracellular localization differs across various experimental settings, it may be of interest to study how these two E3 ligases regulate the same protein, and if some type of redundancy exists between them.

Finally, we cannot overlook the multiple studies that have shown how the specific domains are important for endosomal and lysosomal localization. For example, cancer-associated RNF167 variants K97N and V98G in the PA domain led to mislocalized proteins (Nair *et al.*, 2020; van Dijk *et al.*, 2014). Furthermore, in order to better understand how RNF167 and RNF13 are regulated, we must determine the impact of PTMs,

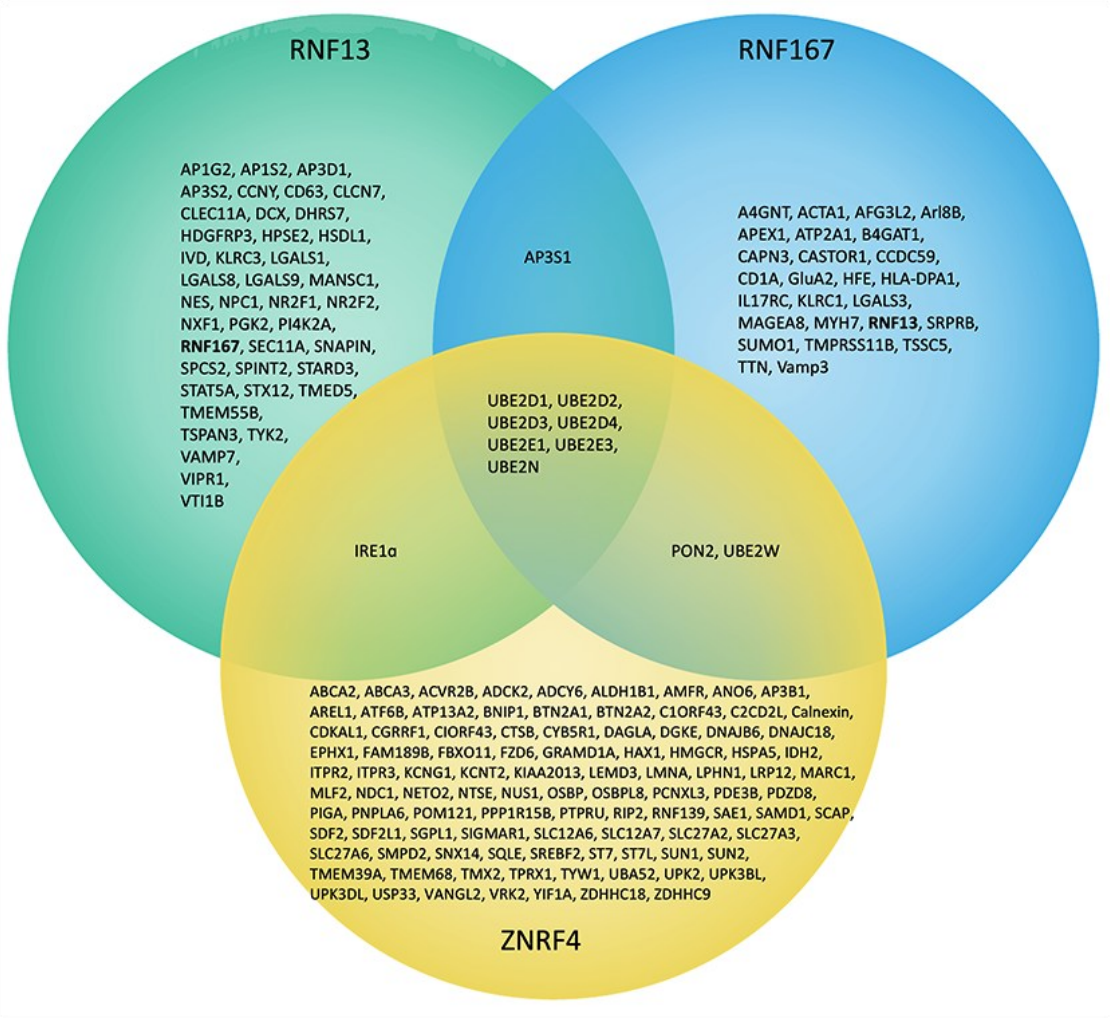
such as ubiquitination and phosphorylation (Table 2). To our knowledge, a comprehensive molecular investigation of PTMs on RNF13 and RNF167 has not been reported, although it is known that RNF13 and RNF167 are glycosylated and that RNF13 is trafficked to the nucleus following PKC activation by PMA treatment (Bocock *et al.*, 2010). Therefore, it would be interesting to evaluate if PKC phosphorylates, either T309, S319, or T380, on RNF13 to induce nuclear localization or if PKC acts through an intermediate effector. Hopefully, future studies will provide clearer mechanisms as to how RNF167 and RNF13 reach the endolysosomal compartment and how their Ub ligase activities regulate the vesicular dynamics and the degradation of the plasma membrane cargo. This is critical since the list of pathologies associated with RNF167 and RNF13 is growing.

Appendice Table 1: Summary of the substrates, the role of their ubiquitination, and their known biological functions and pathological dysfunctions for each E3 ligase discussed in the current review.

E3 ligase	Substrate	Roles of Ubiquitination	Biological function	Pathological dysfunction
Godzilla	Syb (Yamazaki *et al.*, 2016; Yamazaki *et al.*, 2013)	Not determined (N.D.)	Regulation of recycling endosome trafficking (Yamazaki *et al.*, 2013)	N.D.
		N.D.	Wingless transcytosis (Yamazaki *et al.*, 2016)	N.D.
RNF13	N.D.	N.D.	Ectopic expression promotes spontaneous growth of neurites in PC12 cells (Saito *et al.*, 2005) mRNA expression increases with dibuturyl-cAMP treatment in B35 cells (Bocock *et al.*, 2009)	N.D.
	SNAPIN (Zhang *et al.*, 2013)	K29-linked poly-Ub Increased expression (Zhang *et al.*, 2013)	SNARE complex assembly (Zhang *et al.*, 2013)	Mice display deficit in learning (Zhang *et al.*, 2013)
	N.D.	N.D.	Increased MMP-9 activity (Zhang *et al.*, 2009)	Cancer (Cheng *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2009)
	N.D.	N.D.	Regulation of GM-CSF concentration (Cheng *et al.*, 2015)	
	N.D.	N.D.	Altered endolysosomal system (Cabana *et al.*, 2021; van Dijk *et al.*, 2014)	Developmental and epileptic encephalopathy 73 (Cabana *et al.*, 2021) Cancer (van Dijk *et al.*, 2014)
	IRE1α (Interacts but not shown to be a substrate) (Arshad *et al.*, 2013)	N.D.	Regulation of ER stress (Arshad *et al.*, 2013)	Developmental and epileptic encephalopathy 73 (Edvardson *et al.*, 2019) Mice model of Parkinson's disease (Ji *et al.*, 2020) Atherosclerotic plaques (Huang *et al.*, 2021)
	N.D.	N.D.	Regulation of muscle cell proliferation through regulation of IL-4 and IL-6 (Meng *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2010)	N.D.

Appendice Table 1: *Cont.*

E3 ligase	Substrate	Roles of Ubiquitination	Biological function	Pathological dysfunction
RNF167	GluA2 (Ghilarducci *et al.*, 2021; Lussier *et al.*, 2012)	Regulated surface expression (Lussier *et al.*, 2012)	Regulation of neuronal synaptic strength (Lussier *et al.*, 2012)	N.D.
	Vamp3 (Yamazaki *et al.*, 2013)	N.D.	Regulation of recycling endosomes (Yamazaki *et al.*, 2013)	N.D.
	Arl8B (Deshar *et al.*, 2016)	Degradation via the proteasome-dependent pathway (Deshar *et al.*, 2016)	Lysosomal positioning (Deshar *et al.*, 2016)	Cancer
	N.D.	N.D.	Lysosomal exocytosis (Nair *et al.*, 2020)	
	CASTOR1 (Li *et al.*, 2021)	K29-linked polyUb chain Degradation via the proteasome-dependent pathway (Li *et al.*, 2021)	Inhibition of mTORC1 activation (Li *et al.*, 2021)	
	TSSC5 (Yamada et Gorbsky, 2006)	Degradation via the proteasome-dependent pathway (Yamada et Gorbsky, 2006)	Delays G1-to-S transition in HeLa cells (Yamada et Gorbsky, 2006)	
ZNRF4	N.D.	N.D.	Spermatogenesis in mice (Glozak *et al.*, 2003)	N.D.
	Calnexin (Neutzner *et al.*, 2011)	Degradation via the proteasome-dependent pathway (Neutzner *et al.*, 2011)	ER homeostasis (Neutzner *et al.*, 2011)	N.D.
	RIP2 (Bist *et al.*, 2017)	K48-linked polyUb chain Degradation via the proteasome-dependent pathway (Bist *et al.*, 2017)	Negatively regulates NOD2 signaling (Bist *et al.*, 2017)	N.D.



Appendice Figure 3: Venn diagram comparing the interactors between RNF13, RNF167 and ZNRF4.

Interactors of RNF13 (green), RNF167 (blue) and ZNRF4 (yellow) discovered by both low and high throughput assays are displayed (Antoniali *et al.*, 2017; Arshad *et al.*, 2013; Bist *et al.*, 2017; Blandin *et al.*, 2013; Cabana *et al.*, 2021; Castello *et al.*, 2012; Deshar *et al.*, 2016; Ewing *et al.*, 2007; Fenech *et al.*, 2020; Ghilarducci *et al.*, 2021; Hein *et al.*, 2015; Huttlin *et al.*, 2021; Huttlin *et al.*, 2017; Huttlin *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2021; Luck *et al.*, 2020; Lussier *et al.*, 2012; Neutzner *et al.*, 2011; van den Boomen *et al.*, 2020; van Wijk *et al.*, 2009; Yamada et Gorbsky, 2006; Yamazaki *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

Appendice Table 2: Information on gene and post-translational modifications of human homologues of Godzilla.

Gene	Post-Translational Modifications
RNF167 ID 26001 Position 17p13.2	Ubiquitination: K97, K156, K210, K214, K223, K242, K266, K272 (Akimov *et al.*, 2018; Beltrao *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018; Udeshi *et al.*, 2013) Methylation: R277 (Larsen *et al.*, 2016) Phosphorylation: T288, S341, S345 (Mertins *et al.*, 2016) Glycosylation: N33, N79 (Lussier *et al.*, 2012)
RNF13 ID 11342 Position 3q25.1	Ubiquitination: K107, K224, K225, K230, K232, K233, K252, K265, K273, K275, K282 (Akimov *et al.*, 2018; Beltrao *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018; Renaudin *et al.*, 2014; Stukalov *et al.*, 2021; Udeshi *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2021a) Phosphorylation: T309, S319, T380 (Bian *et al.*, 2014; Mertins *et al.*, 2016) Glycosylation: N70, N75, N88 (Deeb *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2009)
ZNRF4 ID 148066 Position 19p13.3	Phosphorylation: T70 (Bordoli *et al.*, 2014) Glycosylation: N107, N152, N229 (Neutzner *et al.*, 2011)

APPENDICE B

CONTRIBUTION SECONDAIRE D'ARTICLE

QUANTITATIVE IMMUNOBLOTTING ANALYSES REVEAL THAT THE ABUNDANCE OF ACTIN, TUBULIN, SYNAPTOPHYSIN AND EEA1 PROTEINS IS ALTERED IN THE BRAINS OF AGED MICE

NEUROSCIENCE

RESEARCH ARTICLE

H. Ve et al. / Neuroscience 442 (2020) 100–113

Quantitative Immunoblotting Analyses Reveal that the Abundance of Actin, Tubulin, Synaptophysin and EEA1 Proteins is Altered in the Brains of Aged Mice

Hou Ve, [a,c] **Valérie C. Cabana,** [a,c] **Gilles Gouspillou** [b,c] **and Marc P. Lussier** [a,c]*

[a] *Département de Chimie, Faculté des sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada*

[b] *Département des Sciences de l'Activité Physique, Groupe de Recherche en Activité Physique Adaptée, Faculté des sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada*

[c] *Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines, Fondation Courtois (CERMO-FC), Faculté des sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada*

Abstract—Optimal synaptic activity is essential for cognitive function, including memory and learning. Evidence indicates that cognitive decline in elderly individuals is associated with altered synaptic function. However, the impact of aging on the expression of neurotransmitter receptors and accessory proteins in brain synapses remains unclear. To fill this knowledge gap, we investigated the effect of aging on the mouse brain by utilizing a subcellular brain tissue fractionation procedure to measure protein abundance using quantitative Western Blotting. Comparing 7-month- (control) and 22-month- (aged) old mouse tissue, no significant differences were identified in the levels of AMPA receptor subunits between the experimental groups. The abundance of GluN2B NMDA receptor subunits decreased in aged mice, whereas the levels of GluN2A did not change. The analysis of cytoskeletal proteins showed an altered level of actin and tubulin in aged mice while PSD-95 protein did not change. Vesicle protein analysis revealed that synaptophysin abundance is decreased in older brains whereas EEA1 was significantly increased. Thus, our results suggest that physiological aging profoundly impacts the abundance of molecules associated with neurotransmitter release and vesicle cycling, proteins implicated in cognitive function. **© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of IBRO. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).**

Key words: aging, brain, cortex, synapse, glutamate receptor, vesicle.

APPENDICE C

CONTRIBUTION SECONDAIRE D'ARTICLE

FUNCTIONAL INTERACTION OF UBIQUITIN LIGASE RNF167 WITH UBE2D1 AND UBE2N PROMOTES UBIQUITINATION OF AMPA RECEPTOR

The FEBS Journal

FEBS PRESS science publishing by scientists

Functional interaction of ubiquitin ligase RNF167 with UBE2D1 and UBE2N promotes ubiquitination of AMPA receptor

Kim Ghilarducci[1,2], Valérie C. Cabana[1,2], Camille Desroches[1,2], Kahina Chabi[1,2], Steve Bourgault[1,2], Laurent Cappadocia[1,2] and Marc P. Lussier[1,2]

1 Department of chemistry, Université du Québec à Montréal, Canada
2 Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC), Faculté des sciences, Université du Québec à Montréal, Canada

Keywords
AMPA receptor; GluA2; glutamate receptor; RING domain; RNF167; ubiquitin; ubiquitin ligase

Correspondence
M. P. Lussier, Department of chemistry, Université du Québec à Montréal, Faculté des sciences, Case postale 8888, Succ. Centre-ville, Montreal (Québec) H3C 3P8, Canada
Tel: +514 987 3000; ext 5591
E-mail: lussier.marc@uqam.ca

(Received 8 September 2020, revised 28 January 2021, accepted 26 February 2021)

doi:10.1111/febs.15796

Protein ubiquitination has been historically associated with protein degradation, but recent studies have demonstrated other cellular functions associated with substrate ubiquitination. Among the RING-type ubiquitin E3 ligase enzymes present in the human genome, RNF167 is a transmembrane protein located in endosomes and lysosomes and is implicated in controlling the endolysosomal pathway. Substrates of RNF167 have been identified, but the ubiquitin-conjugating E2 enzymes involved in the mechanism remain unknown. In this study, we describe the interaction between RNF167 and conjugating E2 enzymes. By means of in vitro autoubiquitination and binding assays, we show that RNF167 functionally interacts with many conjugating E2s, while fluorescence microscopy illustrates that these interactions occur in endosomes and lysosomes. Kinetic analyses of the interaction between RNF167 and selected conjugating E2 enzymes reveal submicromolar dissociation constants. The computed model of interaction between the RING domain of RNF167 and conjugating enzymes gives us insights on how RNF167 could interact with conjugating E2 enzymes. Furthermore, the results reveal that in vitro polyubiquitination of the AMPA-type glutamate receptor subunit GluA2, one of the RNF167's known substrates, is possible by the conjugating E2 enzyme UBE2N only after GluA2 has been primed by ubiquitin subsequent to the action of an initiating conjugating E2 enzyme functionally binding RNF167. Pharmacological inhibition of UBE2N in cultured hippocampal neurons diminishes AMPA-induced GluA2 ubiquitination. This study characterizes interacting partners of RNF167 and constitutes an initial step toward the identification of functional pairs assembled from RNF167 and ubiquitin-conjugating E2 enzymes involved in the ubiquitination of RNF167's substrate.

APPENDICE D

CONTRIBUTION SECONDAIRE D'ARTICLE

MEMBRANE TARGETING AND GTPASE ACTIVITY OF RAB7 ARE REQUIRED FOR ITS UBIQUITINATION BY RNF167

International Journal of *Molecular Sciences*

MDPI

Article

Membrane Targeting and GTPase Activity of Rab7 Are Required for Its Ubiquitination by RNF167

Kim Ghilarducci [1,2], Valérie C. Cabana [1,2], Ali Harake [1,2], Laurent Cappadocia [1,2] and Marc P. Lussier [1,2,*]

[1] Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC H2X 2J6, Canada; ghilarducci.kim@courrier.uqam.ca (K.G.); cabana.valerie@courrier.uqam.ca (V.C.C.); harake.ali@courrier.uqam.ca (A.H.); cappadocia.laurent@uqam.ca (L.C.)

[2] Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines-Fondation Courtois (CERMO-FC), Université du Québec à Montréal, Montréal, QC H2X 3Y7, Canada

* Correspondence: lussier.marc@uqam.ca; Tel.: +1-514-987-3000 (ext. 5591); Fax: +1-514-987-4054

Abstract: Rab7 is a GTPase that controls late endosome and lysosome trafficking. Recent studies have demonstrated that Rab7 is ubiquitinated, a post-translational modification mediated by an enzymatic cascade. To date, only one ubiquitin E3 ligase and one deubiquitinase have been identified in regulating Rab7 ubiquitination. Here, we report that RNF167, a transmembrane endolysosomal ubiquitin ligase, can ubiquitinate Rab7. Using immunoprecipitation and in vitro ubiquitination assays, we demonstrate that Rab7 is a direct substrate of RNF167. Subcellular fractionation indicates that RNF167 activity maintains Rab7′s membrane localization. Epifluorescence microscopy in HeLa cells shows that Rab7-positive vesicles are larger under conditions enabling Rab7 ubiquitination by RNF167. Characterization of its ubiquitination reveals that Rab7 must be in its GTP-bound active form for membrane anchoring and, thus, accessible for RNF167-mediated ubiquitin attachment. Cellular distribution analyses of lysosome marker Lamp1 show that vesicle positioning is independent of Rab7 and RNF167 expression and that Rab7 endosomal localization is not affected by RNF167 knockdown. However, both Rab7 and RNF167 depletion affect each other's lysosomal localization. Finally, this study demonstrates that the RNF167-mediated ubiquitination of Rab7 GTPase is impaired by variants of Charcot–Marie–Tooth Type 2B disease. This study identified RNF167 as a new ubiquitin ligase for Rab7 while expanding our knowledge of the mechanisms underlying the ubiquitination of Rab7.

Keywords: RNF167; Rab7; ubiquitination; endosome; Charcot–Marie–Tooth Type 2B Rab7 variant

check for updates

Citation: Ghilarducci, K.; Cabana, V.C.; Harake, A.; Cappadocia, L.; Lussier, M.P. Membrane Targeting and GTPase Activity of Rab7 Are Required for Its Ubiquitination by RNF167. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7847. https://doi.org/10.3390/ijms23147847

APPENDICE E
CONTRIBUTION SECONDAIRE D'ARTICLE

RNF13 REGULATES THE ENDOLYSOSOMAL PATHWAY THROUGH INTERACTION WITH THE SMALL GTPASE ARL8B

bioRxiv
THE PREPRINT SERVER FOR BIOLOGY

NEW RESULTS
CELL BIOLOGY

RNF13 Regulates the Endolysosomal Pathway Through Interaction with th

Audrey M. Sénécal [1,2], Valérie C. Cabana [1,2], Antoine Y. Bouchard [1,2], Laurent Cappadocia [1,2,3] and Marc P. Lussier [1,2,3*]

[1]*Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, H2X 2J6, Canada*

[2]*Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines - Fondation Courtois (CERMO-FC), Faculté des Sciences, Université du Québec à Montréal, Montr*

[3]*Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), Montréal, QC, H3C 3P8, Canada*

[*]Corresponding author: Marc P. Lussier, Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, Faculté des sciences, Case postale 8888, Succ. C
Canada. Tel. (514) 987-3000 ext 5591; Fax (514) 987-4054; E-mail: lussier.marc(at)uqam.ca

bioRxiv preprint DOI: https://doi.org/10.1101/2025.07.31.667977
Posted: July 31, 2025, Version 1

Copyright: The copyright holder for this pre-print is the author. All rights reserved. The material may not be redistributed, re-used or adapted witho

ABSTRACT

The endolysosomal system is a dynamic intracellular network essential for cargo degradation, recycling and spatial compartmenta endosome maturation and positioning is critical for maintaining lysosomal function and regulating receptor fate. This study uncove ligase RNF13 in controlling endolysosomal dynamics through its interaction with the small GTPase Arl8B. Using predictive structu immunoprecipitation assays, the results demonstrate that RNF13 binds to Arl8B, implicating residues Glu22 and Phe55 of Arl8B w interaction influences lysosomal positioning and the trafficking of endocytic cargo. Notably, loss of RNF13-Arl8B binding alters Arl peripheral redistribution of lysosomes, while not affecting the abundance of endolysosomal markers. However, it does impair the i growth factor receptor (EGFR). These findings suggest that the RNF13-Arl8B interaction plays a crucial role in modulating vesicle overexpression of the Arl8B effector PLEKHM1 enhances RNF13-Arl8B complex formation, indicating a possible cooperative asse lysosome– endosome fusion. Together, the results identify RNF13 as a spatial regulator of lysosomal organization and cargo proc enzymatic scaffolding mechanism. This reveals an additional layer of regulation in endolysosomal trafficking, supporting a role for progression through degradative pathways. Altogether, the results of this work expand the understanding of the molecular coordin dynamics and underscore the importance of selective effector interactions in coordinating endolysosomal trafficking.

APPENDICE F

CONTRIBUTION SECONDAIRE D'ARTICLE

A SHORT SUMOYLATION TAG MODULATES TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVITY

Journal Pre-proof

A short SUMOylation tag modulates transcription factor activity

Antoine Y. Bouchard, Anaïs J.I. Vivet, Valérie C. Cabana, Chongyang Li, Pierre Thibault, Marc P. Lussier, Sylvie Mader, Laurent Cappadocia

PII: S0021-9258(25)02659-6

DOI: https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.110807

Reference: JBC 110807

To appear in: *Journal of Biological Chemistry*

Received Date: 17 May 2025

Revised Date: 6 September 2025

RÉFÉRENCES

Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, Ronneberger O, Willmore L, Ballard AJ, Bambrick J, et al. (2024) Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature 630*: 493-500.

Adams BM, Oster ME et Hebert DN (2019a) Protein quality control in the endoplasmic reticulum. *The Protein Journal 38*: 317-329.

Adams CJ, Kopp MC, Larburu N, Nowak PR et Ali MMU (2019b) Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1. *Frontiers in Molecular Biosciences Volume 6 - 2019*: 11.

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, et al. (2000) The genome sequence of Drosophila melanogaster. *Science 287*: 2185-2195.

Agirre J (2017) Strategies for carbohydrate model building, refinement and validation. *Acta Crystallographia Section D: Structural Biology 73*: 171-186.

Akimov V, Barrio-Hernandez I, Hansen SVF, Hallenborg P, Pedersen AK, Bekker-Jensen DB, Puglia M, Christensen SDK, Vanselow JT, Nielsen MM, et al. (2018) UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. *Nature Structural & Molecular Biology 25*: 631-640.

Akter F, Bonini S, Ponnaiyan S, Kögler-Mohrbacher B, Bleibaum F, Damme M, Renard BY et Winter D (2023) Multi-cell line analysis of lysosomal proteomes reveals unique features and novel lysosomal proteins. *Molecular & Cellular Proteomics 22*: 100509.

Al-Hakim AK, Zagorska A, Chapman L, Deak M, Peggie M et Alessi DR (2008) Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. *Biochemical Journal 411*: 249-260.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Robert K et Watson J (2002) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.

Alekhina O, Burstein E et Billadeau DD (2017) Cellular functions of WASP family proteins at a glance. *Journal of Cell Science 130*: 2235-2241.

Allen DE, Donohue KC, Cadwell CR, Shin D, Keefe MG, Sohal VS et Nowakowski TJ (2022) Fate mapping of neural stem cell niches reveals distinct origins of human cortical astrocytes. *Science 376*: 1441-1446.

Anandasabapathy N, Ford GS, Bloom D, Holness C, Paragas V, Seroogy C, Skrenta H, Hollenhorst M, Fathman CG et Soares L (2003) GRAIL: an E3 ubiquitin ligase that inhibits cytokine gene transcription is expressed in anergic CD4+ T cells. *Immunity 18*: 535-547.

Andrews MG, Subramanian L et Kriegstein AR (2020) mTOR signaling regulates the morphology and migration of outer radial glia in developing human cortex. *eLife 9*: e58737.

Angevine JB (2002) Nervous System, Organization of. Dans *Encyclopedia of the Human Brain*. Ramachandran VS, ed. Academic Press. New York.

Antoniali G, Serra F, Lirussi L, Tanaka M, D'Ambrosio C, Zhang S, Radovic S, Dalla E, Ciani Y, Scaloni A, et al. (2017) Mammalian APE1 controls miRNA processing and its interactome is linked to cancer RNA metabolism. *Nature Communications 8*: 797.

Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G et Lo Muzio L (2017) The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy *International Journal of Molecular Medicine 40*: 271-280.

Ardley HC et Robinson PA (2005) E3 ubiquitin ligases. *Essays in Biochemistry 41*: 15-30.

Arnold DB et Gallo G (2014) Structure meets function: actin filaments and myosin motors in the axon. *Journal of Neurochemistry 129*: 213-220.

Arshad A, Gu X et Arshad M (2014) RNF13 protein regulates endoplasmic reticulum stress induced apoptosis in dopaminergic SH-SY5Y cells by enhancing IRE1α stability. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research 34*: 119-124.

Arshad M, Ye Z, Gu X, Wong CK, Liu Y, Li D, Zhou L, Zhang Y, Bay WP, Yu VC, et al. (2013) RNF13, a RING finger protein, mediates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through the inositol-requiring enzyme (IRE1α)/c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry 288*: 8726-8736.

Arslan OE (2016) Chapter 3 - Computational Basis of Neural Elements. Dans *Artificial Neural Network for Drug Design, Delivery and Disposition*. Puri M, Pathak Y, Sutariya VK, Tipparaju S et Moreno W, eds. Academic Press. Boston.

Artero R, Furlong EE, Beckett K, Scott MP et Baylies M (2003) Notch and Ras signaling pathway effector genes expressed in fusion competent and founder cells during Drosophila myogenesis. *Development 130*: 6257-6272.

Ashkenazy H, Abadi S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T et Ben-Tal N (2016) ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research 44*: W344-350.

Asmerian H, Alberts J, Sanetra AM, Diaz AJ et Silm K (2024) Role of adaptor protein complexes in generating functionally distinct synaptic vesicle pools. *The Journal of Physiology* 1-13.

Assoum M, Philippe C, Isidor B, Perrin L, Makrythanasis P, Sondheimer N, Paris C, Douglas J, Lesca G, Antonarakis S, et al. (2016) Autosomal recessive mutations in *AP3B2,* adaptor-related protein complex 3 beta 2 subunit, cause an early-onset epileptic encephalopathy with optic atrophy. *The American Journal of Human Genetics 99*: 1368-1376.

Attene-Ramos MS, Austin CP et Xia M (2014) High throughput screening. Dans *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Wexler P, ed. Academic Press. Oxford.

Azimi FC, Dean TT, Minari K, Basso LGM, Vance TDR et Serrão VHB (2023) A frame-by-frame glance at membrane fusion mechanisms: From viral infections to fertilization. *Biomolecules 13*: 1130.

B.R R, Shah N, Joshi P, Madhusudan MS et Balasubramanian N (2023) Kinetics of Arf1 inactivation regulates Golgi organisation and function in non-adherent fibroblasts. *Biology Open 12*: bio059669.

Back SH, Lee K, Vink E et Kaufman RJ (2006) Cytoplasmic IRE1α-mediated *XBP1* mRNA splicing in the absence of nuclear processing and endoplasmic reticulum stress *Journal of Biological Chemistry 281*: 18691-18706.

Badonyi M et Marsh JA (2023) Buffering of genetic dominance by allele-specific protein complex assembly. *Science Advances 9*: eadf9845.

Baker RW, Jeffrey PD, Zick M, Phillips BP, Wickner WT et Hughson FM (2015) A direct role for the Sec1/Munc18-family protein Vps33 as a template for SNARE assembly. *Science 349*: 1111-1114.

Ball CL, Hunt SP et Robinson MS (1995) Expression and localization of α-adaptin isoforms. *Journal of Cell Science 108*: 2865-2875.

Ballabio A et Bonifacino JS (2020) Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 21*: 101-118.

Banerjee S et Kane PM (2020) Regulation of V-ATPase activity and organelle pH by phosphatidylinositol phosphate lipids. *Frontiers in Cell and Developmental Biology Volume 8 - 2020*: 510.

Barnes AP et Polleux F (2009) Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annual Reviews of Neuroscience 32*: 347-381.

Barr F et Lambright DG (2010) Rab GEFs and GAPs. *Current Opinion in Cell Biology 22*: 461-470.

Barros CS, Franco SJ et Müller U (2011) Extracellular matrix: Functions in the nervous system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3*: a005108.

Barton C, Li XS, Li SP, Flaherty B, Sison L, Lu Q, Yeung B et Wu S-L (2020) Impact of glycosylation on the comparability of the higher-order structures in idursulfase by hydrogen–deuterium exchange mass spectrometry. *Analytical Chemistry 92*: 8306-8314.

Basel-Vanagaite L, Dallapiccola B, Ramirez-Solis R, Segref A, Thiele H, Edwards A, Arends MJ, Miró X, White JK, Désir J, et al. (2012) Deficiency for the ubiquitin ligase UBE3B in a blepharophimosis-ptosis-intellectual-disability syndrome. *The American Journal of Human Genetics 91*: 998-1010.

Bassani S, Folci A, Zapata J et Passafaro M (2013) AMPAR trafficking in synapse maturation and plasticity. *Cellular and Molecular Life Sciences 70*: 4411-4430.

Bazan-Socha S, Buregwa-Czuma S, Jakiela B, Zareba L, Zawlik I, Myszka A, Soja J, Okon K, Zarychta J, Kozlik P, et al. (2021) Reticular basement membrane thickness is associated with growth- and fibrosis-promoting airway transcriptome profile-study in asthma patients. *International Journal of Molecular Sciences 22*: 998.

Begley M, Aragon M et Baker RW (2024) A structure-based mechanism for initiation of AP-3 coated vesicle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences 121*: e2411974121.

Behrends C et Harper JW (2011) Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains. *Nature Structural & Molecular Biology 18*: 520-528.

Belaya K, Finlayson S, Cossins J, Liu WW, Maxwell S, Palace J et Beeson D (2012) Identification of DPAGT1 as a new gene in which mutations cause a congenital myasthenic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences 1275*: 29-35.

Beltrao P, Albanèse V, Kenner LR, Swaney DL, Burlingame A, Villén J, Lim WA, Fraser JS, Frydman J et Krogan NJ (2012) Systematic functional prioritization of protein posttranslational modifications. *Cell 150*: 413-425.

Beltrao P, Bork P, Krogan NJ et van Noort V (2013) Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications. *Molecular Systems Biology 9*: 714.

Belyy V, Zuazo-Gaztelu I, Alamban A, Ashkenazi A et Walter P (2022) Endoplasmic reticulum stress activates human IRE1α through reversible assembly of inactive dimers into small oligomers. *eLife 11*: e74342.

Benito-Arenas R, Zárate SG, Revuelta J et Bastida A (2019) Chondroitin sulfate-degrading enzymes as tools for the development of new pharmaceuticals. *Catalysts 9*: 322.

Berger AC, Salazar G, Styers ML, Newell-Litwa KA, Werner E, Maue RA, Corbett AH et Faundez V (2007) The subcellular localization of the Niemann-Pick Type C proteins depends on the adaptor complex AP-3. *Journal of Cell Science 120*: 3640-3652.

Bertacchi M, Theiß S, Ahmed A, Eibl M, Loubat A, Maharaux G, Phromkrasae W, Chakrabandhu K, Camgöz A, Antonaci M, et al. (2025) Unravelling the conundrum of nucleolar NR2F1 localization using antibody-based approaches in vitro and in vivo. *Communications Biology 8*: 594.

Betegon M et Brodsky JL (2020) Unlocking the door for ERAD. *Nature Cell Biology 22*: 263-265.

Betts MJ et Russell RB (2007) Amino-acid properties and consequences of substitutions. Dans *Bioinformatics for Geneticists*. (Ed.). MRB, ed. Wiley. Online Library.

Bian Y, Song C, Cheng K, Dong M, Wang F, Huang J, Sun D, Wang L, Ye M et Zou H (2014) An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *Journal of Proteomics 96*: 253-262.

Bilbrough T, Piemontese E et Seitz O (2022) Dissecting the role of protein phosphorylation: a chemical biology toolbox. *Chemical Society Reviews 51*: 5691-5730.

Binotti B, Jahn R et Chua JJE (2016) Functions of Rab proteins at presynaptic sites. *Cells 5*: 7.

Bist P, Cheong WS, Ng A, Dikshit N, Kim B-H, Pulloor NK, Khameneh HJ, Hedl M, Shenoy AR, Balamuralidhar V, et al. (2017) E3 Ubiquitin ligase ZNRF4 negatively regulates NOD2 signalling and induces tolerance to MDP. *Nature Communications 8*: 15865.

Biwi J, Biot C, Guerardel Y, Vercoutter-Edouart A-S et Lefebvre T (2018) The many ways by which O-GlcNAcylation may orchestrate the diversity of complex glycosylations. *Molecules 23*: 2858.

Blandin G, Marchand S, Charton K, Danièle N, Gicquel E, Boucheteil J-B, Bentaib A, Barrault L, Stockholm D, Bartoli M, et al. (2013) A human skeletal muscle interactome centered on proteins involved in muscular dystrophies: LGMD interactome. *Skeletal Muscle 3*: 3.

Bobalova J, Strouhalova D et Bobal P (2023) Common Post-translational Modifications (PTMs) of Proteins: Analysis by Up-to-Date Analytical Techniques with an Emphasis on Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 71*: 14825-14837.

Bocock JP, Carmicle S, Chhotani S, Ruffolo MR, Chu H et Erickson AH (2009) The PA-TM-RING protein RING finger protein 13 is an endosomal integral membrane E3 ubiquitin ligase whose RING finger domain is released to the cytoplasm by proteolysis. *The FEBS Journal 276*: 1860-1877.

Bocock JP, Carmicle S, Madamba E et Erickson AH (2010) Nuclear targeting of an endosomal E3 ubiquitin ligase. *Traffic 11*: 756-766.

Bocock JP, Carmicle S, Sircar M et Erickson AH (2011) Trafficking and proteolytic processing of RNF13, a model PA-TM-RING family endosomal membrane ubiquitin ligase. *The FEBS Journal 278*: 69-77.

Boehm M et Bonifacino JS (2001) Adaptins: the final recount. *Molecular Biology of the Cell 12*: 2907-2920.

Bohnsack RN, Song X, Olson LJ, Kudo M, Gotschall RR, Canfield WM, Cummings RD, Smith DF et Dahms NM (2009) Cation-independent mannose 6-phosphate receptor: a composite of distinct phosphomannosyl binding sites. *Journal of Biological Chemistry 284*: 35215-35226.

Bonifacino JS (2014) Adaptor proteins involved in polarized sorting. *Journal of Cell Biology 204*: 7-17.

Bonifacino JS et Neefjes J (2017) Moving and positioning the endolysosomal system. *Current Opinion in Cell Biology 47*: 1-8.

Bonifacino JS et Traub LM (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual Review of Biochemistry 72*: 395-447.

Bonilla-Quintana M et Wörgötter F (2021) Exploring new roles for actin upon LTP induction in dendritic spines. *Scientific Reports 11*: 7072.

Bordoli MR, Yum J, Breitkopf SB, Thon JN, Italiano JE, Jr., Xiao J, Worby C, Wong SK, Lin G, Edenius M, et al. (2014) A secreted tyrosine kinase acts in the extracellular environment. *Cell 158*: 1033-1044.

Bouchard ML et Côté S (1993) The Drosophila melanogaster developmental gene g1 encodes a variant zinc-finger-motif protein. *Gene 125*: 205-209.

Boura E, Różycki B, Chung HS, Herrick DZ, Canagarajah B, Cafiso DS, Eaton WA, Hummer G et Hurley JH (2012) Solution structure of the ESCRT-I and -II supercomplex: implications for membrane budding and scission. *Structure 20*: 874-886.

Bradley D (2022) The evolution of post-translational modifications. *Current Opinion in Genetics & Development 76*: 101956.

Brand TM, Iida M, Li C et Wheeler DL (2011) The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discovery Medicine 12*: 419-432.

Brandsma ME, Jevnikar AM et Ma S (2011) Recombinant human transferrin: Beyond iron binding and transport. *Biotechnology Advances 29*: 230-238.

Braulke T, Carette JE et Palm W (2024) Lysosomal enzyme trafficking: from molecular mechanisms to human diseases. *Trends in Cell Biology 34*: 198-210.

Braun V, Deschamps C, Raposo G, Benaroch P, Benmerah A, Chavrier P et Niedergang F (2007) AP-1 and ARF1 control endosomal dynamics at sites of FcR mediated phagocytosis. *Molecular Biology of the Cell 18*: 4921-4931.

Breimann S, Kamp F, Basset G, Abou-Ajram C, Güner G, Yanagida K, Okochi M, Müller SA, Lichtenthaler SF, Langosch D, et al. (2025) Charting γ-secretase substrates by explainable AI. *Nature Communications 16*: 5428.

Brett CL, Plemel RL, Lobingier BT, Vignali M, Fields S et Merz AJ (2008) Efficient termination of vacuolar Rab GTPase signaling requires coordinated action by a GAP and a protein kinase. *Journal of Cell Biology 182*: 1141-1151.

Bröcker C, Kuhlee A, Gatsogiannis C, Balderhaar HJ, Hönscher C, Engelbrecht-Vandré S, Ungermann C et Raunser S (2012) Molecular architecture of the multisubunit homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) tethering complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences 109*: 1991-1996.

Brown TC, Correia SS, Petrok CN et Esteban JA (2007) Functional compartmentalization of endosomal trafficking for the synaptic delivery of AMPA receptors during long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience 27*: 13311-13315.

Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B et Zerial M (1992) The small GTPase Rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell 70*: 715-728.

Buchberger A, Bukau B et Sommer T (2010) Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: Brothers in arms. *Molecular Cell 40*: 238-252.

Bucher M, Fanutza T et Mikhaylova M (2020) Cytoskeletal makeup of the synapse: Shaft versus spine. *Cytoskeleton 77*: 55-64.

Budday S, Steinmann P et Kuhl E (2015) Physical biology of human brain development. *Frontiers in Cellular Neuroscience Volume 9 - 2015*: 257.

Butler-Hallissey C et Leterrier C (2024) Super-resolution imaging of the neuronal cytoskeleton. *npj Imaging 2*: 50.

Cabana VC, Bouchard AY, Sénécal AM, Ghilarducci K, Kourrich S, Cappadocia L et Lussier MP (2021) RNF13 dileucine motif variants L311S and L312P interfere with endosomal localization and AP-3 complex association. *Cells 10*: 3063.

Cabana VC et Lussier MP (2022) From Drosophila to human: biological function of E3 ligase Godzilla and its role in disease. *Cells 11*: 380.

Cabana VC et Lussier MP (2025) RNF13 variants L311S and L312P associated with developmental epileptic encephalopathy alter dendritic organization in hippocampal neurons. *IBRO Neuroscience Reports 18*: 559-573.

Cabana VC, Sénécal AM, Bouchard AY, Kourrich S, Cappadocia L et Lussier MP (2024) AP-1 contributes to endosomal targeting of the ubiquitin ligase RNF13 via a secondary and novel non-canonical binding motif. *Journal of Cell Science 137*: jcs262035.

Cabukusta B et Neefjes J (2018) Mechanisms of lysosomal positioning and movement. *Traffic 19*: 761-769.

Cai J, Culley MK, Zhao Y et Zhao J (2018) The role of ubiquitination and deubiquitination in the regulation of cell junctions. *Protein & Cell 9*: 754-769.

Cai Q, Lu L, Tian J-H, Zhu Y-B, Qiao H et Sheng Z-H (2010) Snapin-regulated late endosomal transport is critical for efficient autophagy-lysosomal function in neurons. *Neuron 68*: 73-86.

Canagarajah BJ, Ren X, Bonifacino JS et Hurley JH (2013) The clathrin adaptor complexes as a paradigm for membrane-associated allostery. *Protein Science 22*: 517-529.

Candiello E, Kratzke M, Wenzel D, Cassel D et Schu P (2016) AP-1/σ1A and AP-1/σ1B adaptor-proteins differentially regulate neuronal early endosome maturation via the Rab5/Vps34-pathway. *Scientific Reports 6*: 29950.

Cao J, Zhong MB, Toro CA, Zhang L et Cai D (2019) Endo-lysosomal pathway and ubiquitin-proteasome system dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neuroscience letters 703*: 68-78.

Cardona C, Benincore E, Pimentel N, Reyes LH, Patarroyo C, Rodríguez-López A, Martin-Rufian M, Barrera LA et Alméciga-Díaz CJ (2019) Identification of the iduronate-2-sulfatase proteome in wild-type mouse brain. *Heliyon 5*: e01667.

Carpentieri JA, Di Cicco A, Lampic M, Andreau D, Del Maestro L, El Marjou F, Coquand L, Bahi-Buisson N, Brault J-B et Baffet AD (2022) Endosomal trafficking defects alter neural progenitor proliferation and cause microcephaly. *Nature Communications 13*: 16.

Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, Horos R, Beckmann BM, Strein C, Davey NE, Humphreys DT, Preiss T, Steinmetz LM, et al. (2012) Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell 149*: 1393-1406.

Čaval T, Zhu J, Tian W, Remmelzwaal S, Yang Z, Clausen H et Heck AJR (2019) Targeted analysis of lysosomal directed proteins and their Sites of mannose-6-phosphate modification. *Molecular & Cellular Proteomics 18*: 16-27.

Cavalcanti ARO et Landweber LF (2004) Genetic code. *Current Biology 14*: R147.

Cawley NX, Sojka C, Cougnoux A, Lyons AT, Nicoli ER, Wassif CA et Porter FD (2020) Abnormal LAMP1 glycosylation may play a role in Niemann-Pick disease, type C pathology. *PLoS One 15*: e0227829.

Ceresa BP et Peterson JL (2014) Cell and molecular biology of epidermal growth factor receptor. *International Review of Cell and Molecular Biology 313*: 145-178.

Chaaban S et Carter AP (2022) Structure of dynein–dynactin on microtubules shows tandem adaptor binding. *Nature 610*: 212-216.

Chakrabarti R, Lee M et Higgs HN (2021) Multiple roles for actin in secretory and endocytic pathways. *Current Biology 31*: R603-r618.

Chalak M, Hesaraki M, Mirbahari SN, Yeganeh M, Abdi S, Rajabi S et Hemmatzadeh F (2024) Cell immortality: In vitro effective techniques to achieve and investigate its applications and challenges. *Life 14*: 417.

Chao Y-K, Chang S-Y et Grimm C (2023) Endo-lysosomal cation channels and infectious diseases. Dans *Organelles in Disease*. Pedersen SHF et Barber DL, eds. Springer International Publishing. Cham.

Chapuy B, Tikkanen R, Mühlhausen C, Wenzel D, Von Figura K et Höning S (2008) AP-1 and AP-3 mediate sorting of melanosomal and lysosomal membrane proteins into distinct post-golgi trafficking pathways. *Traffic 9*: 1157-1172.

Chastagner P, Israël A et Brou C (2006) Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Reports 7*: 1147-1153.

Chen B, Retzlaff M, Roos T et Frydman J (2011) Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3*: a004374.

Chen F, Kang R, Liu J et Tang D (2022a) The V-ATPases in cancer and cell death. *Cancer Gene Therapy 29*: 1529-1541.

Chen H, Zhang S, Zhang X et Liu H (2022b) QR code model: a new possibility for GPCR phosphorylation recognition. *Cell Communication and Signaling 20*: 23.

Chen X, Khambu B, Zhang H, Gao W, Li M, Chen X, Yoshimori T et Yin XM (2014) Autophagy induced by calcium phosphate precipitates targets damaged endosomes. *Journal of Biological Chemistry 289*: 11162-11174.

Chen X, Randles L, Shi K, Tarasov SG, Aihara H et Walters KJ (2016) Structures of Rpn1 T1:Rad23 and hRpn13:hPLIC2 reveal distinct binding mechanisms between substrate receptors and shuttle factors of the proteasome. *Structure 24*: 1257-1270.

Chen Y et Brandizzi F (2013) IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends in Cell Biology 23*: 547-555.

Chen ZJ (2005) Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nature Cell Biology 7*: 758-765.

Cheng H, Wang A, Meng J, Zhang Y et Zhu D (2015) Enhanced metastasis in RNF13 knockout mice is mediated by a reduction in GM-CSF levels. *Protein & Cell 6*: 746-756.

Cheung G et Cousin MA (2012) Adaptor protein complexes 1 and 3 are essential for generation of synaptic vesicles from activity-dependent bulk endosomes. *The Journal of Neuroscience 32*: 6014-6023.

Choii G et Ko J (2015) Gephyrin: a central GABAergic synapse organizer. *Experimental & Molecular Medicine 47*: e158-e158.

Choo KH, Tan TW et Ranganathan S (2005) SPdb – a signal peptide database. *BMC Bioinformatics 6*: 249.

Christianson JC et Carvalho P (2022) Order through destruction: how ER-associated protein degradation contributes to organelle homeostasis. *The EMBO Journal 41*: e109845.

Christianson JC, Jarosch E et Sommer T (2023) Mechanisms of substrate processing during ER-associated protein degradation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 24*: 777-796.

Chu P, Abraham R, Budhu K, Khan U, De Marco Garcia N et Brumberg JC (2018) The impact of perineuronal net digestion using chondroitinase ABC on the intrinsic physiology of cortical neurons. *Neuroscience 388*: 23-35.

Ciechanover A et Iwai K (2004) The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life 56*: 193-201.

Citri A et Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology 33*: 18-41.

Cocucci E, Aguet F, Boulant S et Kirchhausen T (2012) The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell 150*: 495-507.

Coelho DS et Domingos PM (2014) Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Frontiers in Genetics Volume 5 - 2014*: 76.

Cole L et Kramer PR (2016) Chapter 1.1 - The Cell. Dans *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*. Cole L et Kramer PR, eds. Academic Press. Boston.

Côté S, Preiss A, Haller J, Schuh R, Kienlin A, Seifert E et Jäckle H (1987) The gooseberry-zipper region of Drosophila: five genes encode different spatially restricted transcripts in the embryo. *The EMBO Journal 6*: 2793-2801.

Cover KK et Mathur BN (2021) Axo-axonic synapses: Diversity in neural circuit function. *Journal of Comparative Neurology 529*: 2391-2401.

Craige B, Salazar G et Faundez V (2008) Phosphatidylinositol-4-kinase type II alpha contains an AP-3-sorting motif and a kinase domain that are both required for endosome traffic. *Molecular Biology of the Cell 19*: 1415-1426.

Crooks GE, Hon G, Chandonia JM et Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research 14*: 1188-1190.

D'Avanzo F, Rigon L, Zanetti A et Tomanin R (2020) Mucopolysaccharidosis type II: One hundred years of research, diagnosis, and treatment. *International Journal of Molecular Sciences 21*: 1258.

Dahms NM, Olson LJ et Kim JJ (2008) Strategies for carbohydrate recognition by the mannose 6-phosphate receptors. *Glycobiology 18*: 664-678.

Davis MJ, Hanson KA, Clark F, Fink JL, Zhang F, Kasukawa T, Kai C, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, et al. (2006) Differential use of signal peptides and membrane domains is a common occurrence in the protein output of transcriptional units. *PLoS Genetics 2*: e46.

Day KJ, Staehelin LA et Glick BS (2013) A three-stage model of Golgi structure and function. *Histochemistry and Cell Biology 140*: 239-249.

de Araujo MEG, Liebscher G, Hess MW et Huber LA (2020) Lysosomal size matters. *Traffic 21*: 60-75.

De Marcos Lousa C, Gershlick DC et Denecke J (2012) Mechanisms and concepts paving the way towards a complete transport cycle of plant vacuolar sorting receptors. *Plant Cell 24*: 1714-1732.

De Tito S, Almacellas E, Dai Yu D, Millard E, Zhang W, de Heus C, Queval C, Hervás JH, Pellegrino E, Panagi I, et al. (2025) ATG9A and ARFIP2 cooperate to control PI4P levels for lysosomal repair. *Developmental Cell 60*: 1-17.

De Tito S, Hervás JH, van Vliet AR et Tooze SA (2020) The Golgi as an assembly line to the autophagosome. *Trends in Biochemical Sciences 45*: 484-496.

Deeb SJ, Cox J, Schmidt-Supprian M et Mann M (2014) N-linked glycosylation enrichment for in-depth cell surface proteomics of diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Molecular & Cellular Proteomics 13*: 240-251.

Dell'Angelica EC et Bonifacino JS (2019) Coatopathies: genetic disorders of protein coats. *Annual Review of Cell and Developmental Biology 35*: 131-168.

Dell'Angelica EC, Mullins C et Bonifacino JS (1999) AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *Journal of Biological Chemistry 274*: 7278-7285.

Demydchuk M, Hill CH, Zhou A, Bunkóczi G, Stein PE, Marchesan D, Deane JE et Read RJ (2017) Insights into Hunter syndrome from the structure of iduronate-2-sulfatase. *Nature Communications 8*: 15786.

Desai-Chowdhry P, Brummer AB et Savage VM (2022) How axon and dendrite branching are guided by time, energy, and spatial constraints. *Scientific Reports 12*: 20810.

Deshaies RJ et Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual Review of Biochemistry 78*: 399-434.

Deshar R, Moon S, Yoo W, Cho EB, Yoon SK et Yoon JB (2016) RNF167 targets Arl8B for degradation to regulate lysosome positioning and endocytic trafficking. *The FEBS Journal 283*: 4583-4599.

Di Paolo G et De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature 443*: 651-657.

Di Pietro SM, Falcón-Pérez JM, Tenza D, Setty SR, Marks MS, Raposo G et Dell'Angelica EC (2006) BLOC-1 interacts with BLOC-2 and the AP-3 complex to facilitate protein trafficking on endosomes. *Molecular Biology of the Cell 17*: 4027-4038.

Dibdiakova K, Saksonova S, Pilchova I, Klacanova K, Tatarkova Z et Racay P (2019) Both thapsigargin- and tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress increases expression of Hrd1 in IRE1-dependent fashion. *Neurological Research 41*: 177-188.

Ding X, Jiang X, Tian R, Zhao P, Li L, Wang X, Chen S, Zhu Y, Mei M, Bao S, et al. (2019) RAB2 regulates the formation of autophagosome and autolysosome in mammalian cells. *Autophagy 15*: 1774-1786.

Dingerdissen HM, Torcivia-Rodriguez J, Hu Y, Chang T-C, Mazumder R et Kahsay R (2018) BioMuta and BioXpress: mutation and expression knowledgebases for cancer biomarker discovery. *Nucleic Acids Research 46*: D1128-D1136.

Dinter A et Berger EG (1998) Golgi-disturbing agents. *Histochemistry and Cell Biology 109*: 571-590.

Diril MK, Schmidt S, Krauss M, Gawlik V, Joost HG, Schürmann A, Haucke V et Augustin R (2009) Lysosomal localization of GLUT8 in the testis--the EXXXLL motif of GLUT8 is sufficient for its intracellular sorting via AP1- and AP2-mediated interaction. *The FEBS Journal 276*: 3729-3743.

Donaldson JG et Jackson CL (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 12*: 362-375.

Donato A, Kagias K, Zhang Y et Hilliard MA (2019) Neuronal sub-compartmentalization: a strategy to optimize neuronal function. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 94*: 1023-1037.

Dong YY, Wang H, Pike ACW, Cochrane SA, Hamedzadeh S, Wyszyński FJ, Bushell SR, Royer SF, Widdick DA, Sajid A, et al. (2018) Structures of DPAGT1 explain glycosylation disease mechanisms and advance TB antibiotic design. *Cell 175*: 1045-1058.e1016.

Du J, Babik S, Li Y, Deol KK, Eyles SJ, Fejzo J, Tonelli M et Strieter E (2022) A cryptic K48 ubiquitin chain binding site on UCH37 is required for its role in proteasomal degradation. *eLife 11*: e76100.

Duan M, Gao G, Lin A, Mackey EJ, Banfield DK et Merz AJ (2024) SM protein Sly1 and a SNARE Habc domain promote membrane fusion through multiple mechanisms. *Journal of Cell Biology 223*: e202001034.

Dubnikov T, Ben-Gedalya T et Cohen E (2017) Protein quality control in health and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 9*: a023523.

Duden R, Griffiths G, Frank R, Argos P et Kreis TE (1991) β-COP, a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the golgi complex, shows homology to β-adaptin. *Cell 64*: 649-665.

Duncan MC (2022) New directions for the clathrin adaptor AP-1 in cell biology and human disease. *Current Opinion in Cell Biology 76*: 102079.

Dunn KW, Kamocka MM et McDonald JH (2011) A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology Cell Physiology 300*: C723-742.

Dupas T, Betus C, Blangy-Letheule A, Pelé T, Persello A, Denis M et Lauzier B (2022) An overview of tools to decipher O-GlcNAcylation from historical approaches to new insights. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 151*: 106289.

Dzyubenko E, Fleischer M, Manrique-Castano D, Borbor M, Kleinschnitz C, Faissner A et Hermann DM (2021) Inhibitory control in neuronal networks relies on the extracellular matrix integrity. *Cellular and Molecular Life Sciences 78*: 5647-5663.

Ebner M, Koch PA et Haucke V (2019) Phosphoinositides in the control of lysosome function and homeostasis. *Biochemical Society Transactions 47*: 1173-1185.

Edvardson S, Nicolae CM, Noh GJ, Burton JE, Punzi G, Shaag A, Bischetsrieder J, De Grassi A, Pierri CL, Elpeleg O, et al. (2019) Heterozygous RNF13 gain-of-function variants are associated with congenital microcephaly, epileptic encephalopathy, blindness, and failure to thrive. *The American Journal of Human Genetics 104*: 179-185.

Eising S, Esch B, Wälte M, Vargas Duarte P, Walter S, Ungermann C, Bohnert M et Fröhlich F (2022) A lysosomal biogenesis map reveals the cargo spectrum of yeast vacuolar protein targeting pathways. *Journal of Cell Biology 221*: e202107148.

Elkin SR, Lakoduk AM et Schmid SL (2016) Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. *Wien Med Wochenschr 166*: 196-204.

Elshenawy MM, Canty JT, Oster L, Ferro LS, Zhou Z, Blanchard SC et Yildiz A (2019) Cargo adaptors regulate stepping and force generation of mammalian dynein-dynactin. *Nature Chemical Biology 15*: 1093-1101.

Esmail S et Manolson MF (2021) Advances in understanding N-glycosylation structure, function, and regulation in health and disease. *European Journal of Cell Biology 100*: 151186.

Ewing RM, Chu P, Elisma F, Li H, Taylor P, Climie S, McBroom-Cerajewski L, Robinson MD, O'Connor L, Li M, et al. (2007) Large-scale mapping of human protein–protein interactions by mass spectrometry. *Molecular Systems Biology 3*: 89.

Fagioli C et Sitia R (2001) Glycoprotein quality control in the Endoplasmic Reticulum: Mannose trimming by Endoplasmic Reticulum Mannosidase I times the proteasomal degradation of unassembled immunoglobulin subunits. *Journal of Biological Chemistry 276*: 12885-12892.

Farías GG, Cuitino L, Guo X, Ren X, Jarnik M, Mattera R et Bonifacino JS (2012) Signal-mediated, AP-1/clathrin-dependent sorting of transmembrane receptors to the somatodendritic domain of hippocampal neurons. *Neuron 75*: 810-823.

Farías GG, Guardia CM, De Pace R, Britt DJ et Bonifacino JS (2017) BORC/kinesin-1 ensemble drives polarized transport of lysosomes into the axon. *Proceedings of the National Academy of Sciences 114*: E2955-e2964.

Fawcett JW, Fyhn M, Jendelova P, Kwok JCF, Ruzicka J et Sorg BA (2022) The extracellular matrix and perineuronal nets in memory. *Molecular Psychiatry 27*: 3192-3203.

Fedele Anthony O et Proud Christopher G (2020) Chloroquine and bafilomycin A mimic lysosomal storage disorders and impair mTORC1 signalling. *Bioscience Reports 40*: BSR20200905.

Fenech EJ, Lari F, Charles PD, Fischer R, Laétitia-Thézénas M, Bagola K, Paton AW, Paton JC, Gyrd-Hansen M, Kessler BM, et al. (2020) Interaction mapping of endoplasmic reticulum ubiquitin ligases identifies modulators of innate immune signalling. *eLife 9*: e57306.

Feng Y, He D, Yao Z et Klionsky DJ (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Research 24*: 24-41.

Feng Y, Press B et Wandinger-Ness A (1995) Rab7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *Journal of Cell Biology 131*: 1435-1452.

Ferri KF et Kroemer G (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology 3*: E255-E263.

Fonseca D et Carvalho P (2019) EGAD! There is an ERAD doppelganger in the Golgi. *The EMBO Journal 38*: e102679.

Fowke TM, Karunasinghe RN, Bai J-Z, Jordan S, Gunn AJ et Dean JM (2017) Hyaluronan synthesis by developing cortical neurons in vitro. *Scientific Reports 7*: 44135.

Fraser J, Simpson J, Fontana R, Kishi-Itakura C, Ktistakis NT et Gammoh N (2019) Targeting of early endosomes by autophagy facilitates EGFR recycling and signalling. *EMBO reports 20*: e47734.

Fratantoni JC, Hall CW et Neufeld EF (1968) The defect in Hurler's and Hunter's syndromes: faulty degradation of mucopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences 60*: 699-706.

Freeman SA, Grinstein S et Orlowski J (2023) Determinants, maintenance, and function of organellar pH. *Physiological Reviews 103*: 515-606.

Freeze HH et Kranz C (2010) Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans. *Current Protocols in Molecular Biology Chapter 17*: Unit 17.13A.

Frigerio L et Lord JM (2000) Glycoprotein degradation: Do sugars hold the key? *Current Biology 10*: R674-R677.

Frisbie CP, Lushnikov AY, Krasnoslobodtsev AV, Riethoven J-JM, Clarke JL, Stepchenkova EI et Petrosyan A (2019) Post-ER stress biogenesis of Golgi is governed by Giantin. *Cells 8*: 1631.

Fritzler MJ et Chan EKL (2007) 35 - Golgi complex and endosome antibodies. Dans *Autoantibodies (Second Edition)*. Shoenfeld Y, Gershwin ME et Meroni PL, eds. Elsevier. Burlington.

Froissart R, Millat G, Mathieu M, Bozon D et Maire I (1995) Processing of iduronate 2-sulphatase in human fibroblasts. *Biochemical Journal 309 (Pt 2)*: 425-430.

Fujii T, Tamura K, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Yomogida K, Tanaka H, Nishimune Y, Nojima H et Abiko Y (1999) Sperizin is a murine RING zinc-finger protein specifically expressed in Haploid germ cells. *Genomics 57*: 94-101.

Fujita N, Huang W, Lin T-h, Groulx J-F, Jean S, Nguyen J, Kuchitsu Y, Koyama-Honda I, Mizushima N, Fukuda M, et al. (2017) Genetic screen in Drosophila muscle identifies autophagy-mediated T-tubule remodeling and a Rab2 role in autophagy. *eLife 6*: e23367.

Futerman AH et van Meer G (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 5*: 554-565.

Galhardo RS, Hastings PJ et Rosenberg SM (2007) Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 42*: 399-435.

Galli T, Chilcote T, Mundigl O, Binz T, Niemann H et De Camilli P (1994) Tetanus toxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs exocytosis of transferrin receptor-containing vesicles in CHO cells. *Journal of Cell Biology 125*: 1015-1024.

Gammella E, Lomoriello IS, Conte A, Freddi S, Alberghini A, Poli M, Sigismund S, Cairo G et Recalcati S (2020) Unconventional endocytosis and trafficking of transferrin receptor induced by iron. *Molecular Biology of the Cell 32*: 98-108.

Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM et Walter P (2013) Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 5*: a013169.

Gautreau A, Oguievetskaia K et Ungermann C (2014) Function and regulation of the endosomal fusion and fission machineries. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6*: a016832.

Gavrish M, Kustova A, Celis Suescún JC, Bessa P, Mitina N et Tarabykin V (2023) Molecular mechanisms of corpus callosum development: a four-step journey. *Frontiers in Neuroanatomy 17*: 1276325.

Gerasimavicius L, Livesey BJ et Marsh JA (2022) Loss-of-function, gain-of-function and dominant-negative mutations have profoundly different effects on protein structure. *Nature Communications 13*: 3895.

Gerbi SA (2018) Bundling up DNA. *eLife 7*: e37234.

Gerlach JQ, Sharma S, Leister KJ et Joshi L (2012) A tight-knit group: Protein glycosylation, endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. Dans *Endoplasmic reticulum stress in health and disease*. Agostinis P et Afshin S, eds. Springer Netherlands. Dordrecht.

Gerrow K, Romorini S, Nabi SM, Colicos MA, Sala C et El-Husseini A (2006) A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. *Neuron 49*: 547-562.

Ghilarducci K, Cabana VC, Desroches C, Chabi K, Bourgault S, Cappadocia L et Lussier MP (2021) Functional interaction of ubiquitin ligase RNF167 with UBE2D1 and UBE2N promotes ubiquitination of AMPA receptor. *The FEBS Journal 288*: 4849-4868.

Ghilarducci K, Cabana VC, Harake A, Cappadocia L et Lussier MP (2022) Membrane targeting and GTPase activity of Rab7 are required for its ubiquitination by RNF167. *International Journal of Molecular Sciences 23*: 7847.

Gicking AM, Ma T-C, Feng Q, Jiang R, Badieyan S, Cianfrocco MA et Hancock WO (2022) Kinesin-1, -2, and -3 motors use family-specific mechanochemical strategies to effectively compete with dynein during bidirectional transport. *eLife 11*: e82228.

Gillingham AK, Sinka R, Torres IL, Lilley KS et Munro S (2014) Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases. *Developmental Cell 31*: 358-373.

Gilmore EC et Walsh CA (2013) Genetic causes of microcephaly and lessons for neuronal development. *Wiley Interdisciplinary Reviews Developmental Biology 2*: 461-478.

Girard E, Chmiest D, Fournier N, Johannes L, Paul JL, Vedie B et Lamaze C (2014) Rab7 is functionally required for selective cargo sorting at the early endosome. *Traffic 15*: 309-326.

Giugliani R, Federhen A, Rojas MV, Vieira T, Artigalás O, Pinto LL, Azevedo AC, Acosta A, Bonfim C, Lourenço CM, et al. (2010) Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genetics and Molecular Biology 33*: 589-604.

Glozak MA, Li Y, Reuille R, Kim KH, Vo M-N et Rogers MB (2003) Trapping and characterization of novel retinoid response elements. *Molecular Endocrinology 17*: 27-41.

Glyvuk N, Tsytsyura Y, Geumann C, D'Hooge R, Hüve J, Kratzke M, Baltes J, Böning D, Klingauf J et Schu P (2010) AP-1/σ1B-adaptin mediates endosomal synaptic vesicle recycling, learning and memory. *The EMBO Journal 29*: 1318-1330-1330.

González-Gutiérrez A, Lazo OM et Bronfman FC (2020) The Rab5–Rab11 endosomal pathway is required for BDNF-induced CREB transcriptional regulation in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience 40*: 8042.

Gonzalo S, Greentree WK et Linder ME (1999) SNAP-25 is targeted to the plasma membrane through a novel membrane-binding domain. *Journal of Biological Chemistry 274*: 21313-21318.

Goo MS, Sancho L, Slepak N, Boassa D, Deerinck TJ, Ellisman MH, Bloodgood BL et Patrick GN (2017) Activity-dependent trafficking of lysosomes in dendrites and dendritic spines. *Journal of Cell Biology 216*: 2499-2513.

Goode BL et Eck MJ (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annual Review of Biochemistry 76*: 593-627.

Gopaldass N, Chen K-E, Collins B et Mayer A (2024) Assembly and fission of tubular carriers mediating protein sorting in endosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 25*: 765-783.

Gorelik A, Illes K, Bui KH et Nagar B (2022) Structures of the mannose-6-phosphate pathway enzyme, GlcNAc-1-phosphotransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences 119*: e2203518119.

Grant BD et Donaldson JG (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 10*: 597-608.

Grochowska KM, Andres-Alonso M, Karpova A et Kreutz MR (2022) The needs of a synapse—How local organelles serve synaptic proteostasis. *The EMBO Journal 41*: e110057.

Groothuis TAM, Dantuma NP, Neefjes J et Salomons FA (2006) Ubiquitin crosstalk connecting cellular processes. *Cell Division 1*: 21.

Gross SP, Vershinin M et Shubeita George T (2007) Cargo transport: Two motors are sometimes better than one. *Current Biology 17*: R478-R486.

Grosshans BL, Ortiz D et Novick P (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103*: 11821-11827.

Gruenberg J (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2*: 721-730.

Gu B, Carstens KE, Judson MC, Dalton KA, Rougié M, Clark EP, Dudek SM et Philpot BD (2019) Ube3a reinstatement mitigates epileptogenesis in Angelman syndrome model mice. *Journal of Clinical Investigation 129*: 163-168.

Guardia CM, De Pace R, Mattera R et Bonifacino JS (2018) Neuronal functions of adaptor complexes involved in protein sorting. *Current opinion in neurobiology 51*: 103-110.

Gubas A et Dikic I (2022) A guide to the regulation of selective autophagy receptors. *The FEBS Journal 289*: 75-89.

Guerrini R et Conti V (2024) Epileptic encephalopathies and progressive neurodegeneration. *Revue Neurologique 180*: 363-367.

Guerrini R, Conti V, Mantegazza M, Balestrini S, Galanopoulou AS et Benfenati F (2023) Developmental and epileptic encephalopathies: from genetic heterogeneity to phenotypic continuum. *Physiological Reviews 103*: 433-513.

Guo L, Wang L, Yang R, Feng R, Li Z, Zhou X, Dong Z, Ghartey-Kwansah G, Xu M, Nishi M, et al. (2017) Optimizing conditions for calcium phosphate mediated transient transfection. *Saudi Journal of Biological Sciences 24*: 622-629.

Guo P et Wang X (2010) Rab GTPases act in sequential steps to regulate phagolysosome formation. *Small GTPases 1*: 170-173.

Guo S, Zhang BB, Gao L, Yu XY, Shen JH, Yang F, Zhang WC, Jin YG, Li G, Wang YG, et al. (2023) RNF13 protects against pathological cardiac hypertrophy through p62-NRF2 pathway. *Free Radical Biology and Medicine 209*: 252-264.

Guo X, Mattera R, Ren X, Chen Y, Retamal C, González A et Bonifacino JS (2013) The adaptor protein-1 μ1B subunit expands the repertoire of basolateral sorting signal recognition in epithelial cells. *Developmental Cell 27*: 353-366.

Guo Y, Chang C, Huang R, Liu B, Bao L et Liu W (2012) AP1 is essential for generation of autophagosomes from the trans-Golgi network. *Journal of Cell Science 125*: 1706-1715.

Guo Z, Wu YW, Das D, Delon C, Cramer J, Yu S, Thuns S, Lupilova N, Waldmann H, Brunsveld L, et al. (2008) Structures of RabGGTase–substrate/product complexes provide insights into the evolution of protein prenylation. *The EMBO Journal 27*: 2444-2456-2456.

Håberg K, Lundmark R et Carlsson SR (2008) SNX18 is an SNX9 paralog that acts as a membrane tubulator in AP-1-positive endosomal trafficking. *Journal of Cell Science 121*: 1495-1505.

Hagemann C, Moreno Gonzalez C, Guetta L, Tyzack G, Chiappini C, Legati A, Patani R et Serio A (2022) Axonal length determines distinct homeostatic phenotypes in human iPSC derived motor neurons on a bioengineered platform. *Advanced Healthcare Materials 11*: 2101817.

Haglund K et Dikic I (2012) The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *Journal of Cell Science 125*: 265-275.

Hallgren J, Tsirigos KD, Pedersen MD, Almagro Armenteros JJ, Marcatili P, Nielsen H, Krogh A et Winther O (2022) DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *bioRxiv* 2022.2004.2008.487609.

Hamdan FF, Myers CT, Cossette P, Lemay P, Spiegelman D, Laporte AD, Nassif C, Diallo O, Monlong J, Cadieux-Dion M, et al. (2017) High rate of recurrent de novo mutations in developmental and epileptic encephalopathies. *The American Journal of Human Genetics 101*: 664-685.

Hammond C (2015) Chapter 1 - Neurons. Dans *Cellular and Molecular Neurophysiology (Fourth Edition)*. Hammond C, ed. Academic Press. Boston.

Han Y, Hacker D, Donders BC, Parperis C, Thuenauer R, Leterrier C, Grünewald K et Mikhaylova M (2024) Unveiling the cell biology of hippocampal neurons with dendritic axon origin. *Journal of Cell Biology 224*: e202403141.

Hanover JA, Krause MW et Love DC (2012) linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 13*: 312-321.

Hansen G, Berg T, Riise Stensland HM, Heikinheimo P, Klenow H, Evjen G, Nilssen Ø et Tollersrud OK (2004) Intracellular transport of human lysosomal alpha-mannosidase and alpha-mannosidosis-related mutants. *Biochemical Journal 381*: 537-546.

Hardman G, Perkins S, Brownridge PJ, Clarke CJ, Byrne DP, Campbell AE, Kalyuzhnyy A, Myall A, Eyers PA, Jones AR, et al. (2019) Strong anion exchange-mediated phosphoproteomics reveals extensive human non-canonical phosphorylation. *The EMBO Journal 38*: e100847.

Hardwick LJ et Philpott A (2014) Nervous decision-making: to divide or differentiate. *Trends in Genetics 30*: 254-261.

Hashizume R, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, Ogata H et Ohta T (2001) The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *Journal of Biological Chemistry 276*: 14537-14540.

Hassink G, Slotman J, Oorschot V, Van Der Reijden BA, Monteferrario D, Noordermeer SM, Van Kerkhof P, Klumperman J et Strous GJ (2012) Identification of the ubiquitin ligase Triad1 as a regulator of endosomal transport. *Biology Open 1*: 607-614.

Hatanaka Y et Hirata T (2020) How do cortical excitatory neurons terminate their migration at the right place? Critical roles of environmental elements. *Frontiers in Cell and Developmental Biology Volume 8 - 2020*: 596708.

Hausser A et Schlett K (2019) Coordination of AMPA receptor trafficking by Rab GTPases. *Small GTPases 10*: 419-432.

Hayashi MK, Nishioka T, Shimizu H, Takahashi K, Kakegawa W, Mikami T, Hirayama Y, Koizumi S, Yoshida S, Yuzaki M, et al. (2019) Hyaluronan synthesis supports glutamate transporter activity. *Journal of Neurochemistry 150*: 249-263.

Hayashida K, Aquino RS et Park PW (2022) Coreceptor functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *American Journal of Physiology-Cell Physiology 322*: C896-c912.

He M, Yang Z, Xie L, Chen J, Liu S, Lu L, Li Z, Zheng B, Ye Y, Lin Y, et al. (2025) RNF167 mediates atypical ubiquitylation and degradation of RLRs via two distinct proteolytic pathways. *Nature Communications 16*: 1920.

He M, Zhou X et Wang X (2024) Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy 9*: 194.

Hein Marco Y, Hubner Nina C, Poser I, Cox J, Nagaraj N, Toyoda Y, Gak Igor A, Weisswange I, Mansfeld J, Buchholz F, et al. (2015) A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell 163*: 712-723.

Heissmeyer V, Macián F, Im SH, Varma R, Feske S, Venuprasad K, Gu H, Liu YC, Dustin ML et Rao A (2004) Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nature Immunology 5*: 255-265.

Heng HH (2013) HeLa genome versus donor's genome. *Nature 501*: 167-167.

Hetz C, Zhang K et Kaufman RJ (2020) Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 21*: 421-438.

Hicke L et Dunn R (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology 19*: 141-172.

Hidalgo J, Garcia-Navarro R, Gracia-Navarro F, Perez-Vilar J et Velasco A (1992) Presence of Golgi remnant membranes in the cytoplasm of brefeldin A-treated cells. *European Journal of Cell Biology 58*: 214-227.

Higuchi-Sanabria R, Shen K, Kelet N, Frankino PA, Durieux J, Bar-Ziv R, Sing CN, Garcia EJ, Homentcovschi S, Sanchez M, et al. (2020) Lysosomal recycling of amino acids affects ER quality control. *Science Advances 6*: eaaz9805.

Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y et Niwa S (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 10*: 682-696.

Hirst J, Barlow LD, Francisco GC, Sahlender DA, Seaman MN, Dacks JB et Robinson MS (2011) The fifth adaptor protein complex. *PLOS Biology 9*: e1001170.

Hofer S et Frahm J (2006) Topography of the human corpus callosum revisited—Comprehensive fiber tractography using diffusion tensor magnetic resonance imaging. *NeuroImage 32*: 989-994.

Hofman J, Hutny M, Sztuba K et Paprocka J (2020) Corpus callosum agenesis: An insight into the etiology and spectrum of symptoms. *Brain Sciences 10*: 625.

Hofmann MW, Höning S, Rodionov D, Dobberstein B, von Figura K et Bakke O (1999) The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *Journal of Biological Chemistry 274*: 36153-36158.

Holehouse AS et Kragelund BB (2024) The molecular basis for cellular function of intrinsically disordered protein regions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 25*: 187-211.

Holland P, Torgersen ML, Sandvig K et Simonsen A (2014) LYST affects lysosome size and quantity, but not trafficking or degradation through autophagy or endocytosis. *Traffic 15*: 1390-1405.

Holzer E, Martens S et Tulli S (2024) The role of ATG9 vesicles in autophagosome biogenesis. *Journal of Molecular Biology 436*: 168489.

Hong L, Huang HC et Jiang ZF (2014) Relationship between amyloid-beta and the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Neurological Research 36*: 276-282.

Höning S, Sandoval IV 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. *The EMBO Journal 17*: 1304-1314.

Hooy RM, Iwamoto Y, Tudorica DA, Ren X et Hurley JH (2022) Self-assembly and structure of a clathrin-independent AP-1:Arf1 tubular membrane coat. *Science Advances 8*: eadd3914.

Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V et Skrzypek E (2015) PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Research 43*: D512-520.

Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S-i, Natsume T, Takehana K, Yamada N, et al. (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell 20*: 1981-1991.

Hoyer MJ, Swarup S et Wade Harper J (2022) Mechanisms controlling selective elimination of damaged lysosomes. *Current Opinion in Physiology 29*: 100590.

Hu YB, Dammer EB, Ren RJ et Wang G (2015) The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Translational Neurodegeneration 4*: 18.

Huang CY et Rasband MN (2018) Axon initial segments: structure, function, and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences 1420*: 46-61.

Huang D, Liu Y, Gao L, Wei X, Xu Y, Cai R et Su Q (2021) MiR-32-3p regulates myocardial injury induced by microembolism and microvascular obstruction by targeting RNF13 to regulate the stability of atherosclerotic plaques. *Journal of Cardiovascular Translational Research 15*: 143-166.

Huang Y, Ma T, Lau PK, Wang J, Zhao T, Du S, Loy MMT et Guo Y (2019) Visualization of protein sorting at the trans-golgi network and endosomes through super-resolution imaging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology 7*: 181.

Huang Y, Mao X, van Jaarsveld RH, Shu L, Terhal PA, Jia Z, Xi H, Peng Y, Yan H, Yuan S, et al. (2020) Variants in CAPZA2, a member of an F-actin capping complex, cause intellectual disability and developmental delay. *Human Molecular Genetics 29*: 1537-1546.

Hui KK, Takashima N, Watanabe A, Chater TE, Matsukawa H, Nekooki-Machida Y, Nilsson P, Endo R, Goda Y, Saido TC, et al. (2019) GABARAPs dysfunction by autophagy deficiency in adolescent brain impairs GABAA receptor trafficking and social behavior. *Science Advances 5*: eaau8237.

Hung MC et Link W (2011) Protein localization in disease and therapy. *Journal of Cell Science 124*: 3381-3392.

Hunter C (1917) A rare disease in two brothers. *Proceedings of the Royal Society of Medicine 10*: 104-116.

Huotari J et Helenius A (2011) Endosome maturation. *The EMBO Journal 30*: 3481-3500.

Huttlin EL, Bruckner RJ, Navarrete-Perea J, Cannon JR, Baltier K, Gebreab F, Gygi MP, Thornock A, Zarraga G, Tam S, et al. (2021) Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. *Cell 184*: 3022-3040.e3028.

Huttlin EL, Bruckner RJ, Paulo JA, Cannon JR, Ting L, Baltier K, Colby G, Gebreab F, Gygi MP, Parzen H, et al. (2017) Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature 545*: 505-509.

Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, Gebreab F, Gygi MP, Szpyt J, Tam S, Zarraga G, Colby G, Baltier K, et al. (2015) The BioPlex Network: a systematic exploration of the human interactome. *Cell 162*: 425-440.

Hwang I (2008) Sorting and anterograde trafficking at the Golgi apparatus. *Plant Physiology 148*: 673-683.

Ihrke G, Kyttälä A, Russell MRG, Rous BA et Luzio JP (2004) Differential use of two AP-3-mediated pathways by lysosomal membrane proteins. *Traffic 5*: 946-962.

Ikoma H, Broxton M, Kudo T et Wetzstein G (2018) A convex 3D deconvolution algorithm for low photon count fluorescence imaging. *Scientific Reports 8*: 11489.

Ilardi JM, Mochida S et Sheng Z-H (1999) Snapin: a SNARE–associated protein implicated in synaptic transmission. *Nature Neuroscience 2*: 119-124.

Ito Y, Uemura T, Shoda K, Fujimoto M, Ueda T et Nakano A (2012) cis-Golgi proteins accumulate near the ER exit sites and act as the scaffold for Golgi regeneration after brefeldin A treatment in tobacco BY-2 cells. *Molecular Biology of the Cell 23*: 3203-3214.

Jahangiri B, Saei AK, Obi PO, Asghari N, Lorzadeh S, Hekmatirad S, Rahmati M, Velayatipour F, Asghari MH, Saleem A, et al. (2022) Exosomes, autophagy and ER stress pathways in human diseases: Cross-regulation and therapeutic approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1868*: 166484.

Jahn R, Lang T et Südhof TC (2003) Membrane Fusion. *Cell 112*: 519-533.

James DJ et Martin TF (2013) CAPS and Munc13: CATCHRs that SNARE Vesicles. *Frontiers in Endocrinology Volume 4 - 2013*: 187.

Jana NR (2012) Protein homeostasis and aging: role of ubiquitin protein ligases. *Neurochemistry International 60*: 443-447.

Jayaraj GG, Hipp MS et Hartl FU (2020) Functional modules of the proteostasis network. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 12*: a033951.

Jean G, Carton J, Haq K et Musto AE (2023) The role of dendritic spines in epileptogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience 17*: 1173694.

Jerabkova-Roda K, Marwaha R, Das T et Goetz JG (2024) Organelle morphology and positioning orchestrate physiological and disease-associated processes. *Current Opinion in Cell Biology 86*: 102293.

Ji M, Niu S, Guo J, Mi H et Jiang P (2020) Silencing RNF13 alleviates parkinson's disease-like problems in mouse models by regulating the endoplasmic reticulum stress-mediated IRE1α-TRAF2-ASK1-JNK pathway. *Journal of Molecular Neuroscience 70*: 1977-1986.

Jia X, Weber E, Tokarev A, Lewinski M, Rizk M, Suarez M, Guatelli J et Xiong Y (2014) Structural basis of HIV-1 Vpu-mediated BST2 antagonism via hijacking of the clathrin adaptor protein complex 1. *eLife 3*: e02362.

Jiang YH et Beaudet AL (2004) Human disorders of ubiquitination and proteasomal degradation. *Current Opinion in Pediatrics 16*: 419-426.

Jiao J, He M, Port SA, Baker RW, Xu Y, Qu H, Xiong Y, Wang Y, Jin H, Eisemann TJ, et al. (2018) Munc18-1 catalyzes neuronal SNARE assembly by templating SNARE association. *eLife 7*: e41771.

Jin X, Cheng H, Chen J et Zhu D (2011) RNF13: an emerging RING finger ubiquitin ligase important in cell proliferation. *The FEBS Journal 278*: 78-84.

John N, Krügel H, Frischknecht R, Smalla KH, Schultz C, Kreutz MR, Gundelfinger ED et Seidenbecher CI (2006) Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Molecular and Cellular Neuroscience 31*: 774-784.

Johnson DE, Ostrowski P, Jaumouillé V et Grinstein S (2016) The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH. *Journal of Cell Biology 212*: 677-692.

Jones SL et Svitkina TM (2016) Axon initial segment cytoskeleton: Architecture, development, and role in neuron polarity. *Neural Plasticity 2016*: 6808293.

Jongsma MLM, Bakker J, Cabukusta B, Liv N, van Elsland D, Fermie J, Akkermans JLL, Kuijl C, van der Zanden SY, Janssen L, et al. (2020) SKIP-HOPS recruits TBC1D15 for a Rab7-to-Arl8b identity switch to control late endosome transport. *The EMBO Journal 39*: e102301.

Jongsma MLM, Bakker N et Neefjes J (2022) Choreographing the motor-driven endosomal dance. *Journal of Cell Science 136*: jcs259689.

Jovic M, Sharma M, Rahajeng J et Caplan S (2010) The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histology and Histopathology 25*: 99-112.

Judith D, Jefferies HBJ, Boeing S, Frith D, Snijders AP et Tooze SA (2019) ATG9A shapes the forming autophagosome through Arfaptin 2 and phosphatidylinositol 4-kinase IIIβ. *Journal of Cell Biology 218*: 1634-1652.

Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature 596*: 583-589.

Junjappa RP, Patil P, Bhattarai KR, Kim H-R et Chae H-J (2018) IRE1α implications in endoplasmic reticulum stress-mediated development and pathogenesis of autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology Volume 9 - 2018*: 1289.

Kadlecova Z, Spielman SJ, Loerke D, Mohanakrishnan A, Reed DK et Schmid SL (2017) Regulation of clathrin-mediated endocytosis by hierarchical allosteric activation of AP2. *Journal of Cell Biology 216*: 167-179.

Kaeser PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J et Südhof TC (2011) RIM proteins tether Ca2+ Channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell 144*: 282-295.

Kälin S, Hirschmann DT, Buser DP et Spiess M (2015) Rabaptin5 is recruited to endosomes by Rab4 and Rabex5 to regulate endosome maturation. *Journal of Cell Science 128*: 4126-4137.

Kalyana Sundaram RV, Jin H, Li F, Shu T, Coleman J, Yang J, Pincet F, Zhang Y, Rothman JE et Krishnakumar SS (2021) Munc13 binds and recruits SNAP25 to chaperone SNARE complex assembly. *FEBS Letters 595*: 297-309.

Kaneko M, Iwase I, Yamasaki Y, Takai T, Wu Y, Kanemoto S, Matsuhisa K, Asada R, Okuma Y, Watanabe T, et al. (2016) Genome-wide identification and gene expression profiling of ubiquitin ligases for endoplasmic reticulum protein degradation. *Scientific Reports 6*: 30955.

Kang S, Liang L, Parker CD et Collawn JF (1998) Structural requirements for major histocompatibility complex class II invariant chain endocytosis and lysosomal targeting. *Journal of Biological Chemistry 273*: 20644-20652.

Kapitein Lukas C, van Bergeijk P, Lipka J, Keijzer N, Wulf Phebe S, Katrukha Eugene A, Akhmanova A et Hoogenraad Casper C (2013) Myosin-V opposes microtubule-based cargo transport and drives directional motility on cortical actin. *Current Biology 23*: 828-834.

Karlsson M, Zhang C, Méar L, Zhong W, Digre A, Katona B, Sjöstedt E, Butler L, Odeberg J, Dusart P, et al. (2021) A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Science Advances 7*: eabh2169.

Kassai H, Sugaya Y, Noda S, Nakao K, Maeda T, Kano M et Aiba A (2014) Selective activation of mTORC1 signaling recapitulates microcephaly, tuberous sclerosis, and neurodegenerative diseases. *Cell Reports 7*: 1626-1639.

Keenan EK, Zachman DK et Hirschey MD (2021) Discovering the landscape of protein modifications. *Molecular Cell 81*: 1868-1878.

Kemal S, Richardson HS, Dyne ED et Fu M-m (2022) ER and Golgi trafficking in axons, dendrites, and glial processes. *Current Opinion in Cell Biology 78*: 102119.

Kendrick AA et Christensen JR (2022) Bidirectional lysosome transport: a balancing act between ARL8 effectors. *Nature Communications 13*: 5261.

Keren-Kaplan T et Bonifacino JS (2021) ARL8 relieves SKIP autoinhibition to enable coupling of lysosomes to Kinesin-1. *Current Biology 31*: 540-554.e545.

Keren-Kaplan T, Sarić A, Ghosh S, Williamson CD, Jia R, Li Y et Bonifacino JS (2022) RUFY3 and RUFY4 are ARL8 effectors that promote coupling of endolysosomes to dynein-dynactin. *Nature Communications 13*: 1506.

Kevenaar JT et Hoogenraad CC (2015) The axonal cytoskeleton: from organization to function. *Frontiers in Molecular Neuroscience 8*: 44.

Khan I et Steeg PS (2021) Endocytosis: a pivotal pathway for regulating metastasis. *British Journal of Cancer 124*: 66-75.

Khan SA, Peracha H, Ballhausen D, Wiesbauer A, Rohrbach M, Gautschi M, Mason RW, Giugliani R, Suzuki Y, Orii KE, et al. (2017) Epidemiology of mucopolysaccharidoses. *Molecular Genetics and Metabolism 121*: 227-240.

Khani M, Nafissi S, Shamshiri H, Moazzeni H, Taheri H et Elahi E (2023) Identification of *RNF13* as cause of recessively inherited ALS in a multi-case pedigree. *Journal of Medical Genetics 60*: 301.

Khatter D, Raina VB, Dwivedi D, Sindhwani A, Bahl S et Sharma M (2015) The small GTPase Arl8b regulates assembly of the mammalian HOPS complex on lysosomes. *Journal of Cell Science 128*: 1746-1761.

Kiebler MA et Ninkovic J (2022) RNA biology: Alternative splicing hits synaptic function and behavior. *Current Biology 32*: R1314-R1316.

Kikutake C et Suyama M (2023) Possible involvement of silent mutations in cancer pathogenesis and evolution. *Scientific Reports 13*: 7593.

Kim J-JP et Dahms NM (2001) The Cation-Dependent Mannose 6-Phosphate Receptor. Dans *Mammalian Carbohydrate Recognition Systems*. Crocker PR, ed. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg.

Kim JJ, Olson LJ et Dahms NM (2009) Carbohydrate recognition by the mannose-6-phosphate receptors. *Current Opinion in Structural Biology 19*: 534-542.

Kimple ME, Brill AL et Pasker RL (2013) Overview of affinity tags for protein purification. *Current Protocols in Protein Science 73*: 9 9 1-9 9 23.

Kiss L, James LC et Schulman BA (2025) UbiREAD deciphers proteasomal degradation code of homotypic and branched K48 and K63 ubiquitin chains. *Molecular Cell 85*: 1467-1476.e1466.

Klionsky DJ et Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science 290*: 1717-1721.

Klumperman J et Raposo G (2014) The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6*: a016857.

Knævelsrud H, Søreng K, Raiborg C, Håberg K, Rasmuson F, Brech A, Liestøl K, Rusten TE, Stenmark H, Neufeld TP, et al. (2013) Membrane remodeling by the PX-BAR protein SNX18 promotes autophagosome formation. *Journal of Cell Biology 202*: 331-349.

Komander D (2009) The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions 37*: 937-953.

Komander D et Rape M (2012) The ubiquitin code. *Annual Review of Biochemistry 81*: 203-229.

Kononenko NL, Claßen GA, Kuijpers M, Puchkov D, Maritzen T, Tempes A, Malik AR, Skalecka A, Bera S, Jaworski J, et al. (2017) Retrograde transport of TrkB-containing autophagosomes via the adaptor AP-2 mediates neuronal complexity and prevents neurodegeneration. *Nature Communications 8*: 14819.

Koonin EV et Novozhilov AS (2017) Origin and evolution of the universal genetic code. *Annual Review of Genetics 51*: 45-62.

Koppers M et Farías GG (2021) Organelle distribution in neurons: Logistics behind polarized transport. *Current Opinion in Cell Biology 71*: 46-54.

Korolchuk VI, Saiki S, Lichtenberg M, Siddiqi FH, Roberts EA, Imarisio S, Jahreiss L, Sarkar S, Futter M, Menzies FM, et al. (2011) Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nature Cell Biology 13*: 453-460.

Kovtun O, Dickson VK, Kelly BT, Owen DJ et Briggs JAG (2020) Architecture of the AP2/clathrin coat on the membranes of clathrin-coated vesicles. *Science Advances 6*: eaba8381.

Krauss M, Kinuta M, Wenk MR, De Camilli P, Takei K et Haucke V (2003) ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *Journal of Cell Biology 162*: 113-124.

Kravtsova-Ivantsiv Y, Sommer T et Ciechanover A (2013) The lysine48-based polyubiquitin chain proteasomal signal: not a single child anymore. *Angewandte Chemie International Edition 52*: 192-198.

Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lütjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C et Jentsch TJ (1999) KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell 96*: 437-446.

Kumar G, Chawla P, Dhiman N, Chadha S, Sharma S, Sethi K, Sharma M et Tuli A (2022) RUFY3 links Arl8b and JIP4-Dynein complex to regulate lysosome size and positioning. *Nature Communications 13*: 1540.

Kumar V, Singh D, Singh BK, Singh S, Mittra N, Jha RR, Patel DK et Singh C (2018) Alpha-synuclein aggregation, Ubiquitin proteasome system impairment, and L-Dopa response in zinc-induced Parkinsonism: resemblance to sporadic Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Biochemistry 444*: 149-160.

Kumari S et Brewster AL (2024) Exploring dendritic and spine structural profiles in epilepsy: Insights from human studies and experimental animal models. *Epilepsy Currents 24*: 40-46.

Kümmel D et Ungermann C (2014) Principles of membrane tethering and fusion in endosome and lysosome biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology 29*: 61-66.

Kundra R et Kornfeld S (1999) Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *Journal of Biological Chemistry 274*: 31039-31046.

Kurosaki T et Maquat LE (2016) Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *Journal of Cell Science 129*: 461-467.

Kutateladze TG (2010) Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nature Chemical Biology 6*: 507-513.

Kyung JW, Cho IH, Lee S, Song WK, Ryan TA, Hoppa MB et Kim SH (2017) Adaptor Protein 2 (AP-2) complex is essential for functional axogenesis in hippocampal neurons. *Scientific Reports 7*: 41620.

Lafourcade C, Sobo K, Kieffer-Jaquinod S, Garin J et van der Goot FG (2008) Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS One 3*: e2758.

Langemeyer L, Borchers AC, Herrmann E, Füllbrunn N, Han Y, Perz A, Auffarth K, Kümmel D et Ungermann C (2020) A conserved and regulated mechanism drives endosomal Rab transition. *eLife 9*: e56090.

Lanzetti L (2007) Actin in membrane trafficking. *Current Opinion in Cell Biology 19*: 453-458.

Larsen SC, Sylvestersen KB, Mund A, Lyon D, Mullari M, Madsen MV, Daniel JA, Jensen LJ et Nielsen ML (2016) Proteome-wide analysis of arginine monomethylation reveals widespread occurrence in human cells. *Science Signaling 9*: rs9.

Laulagnier K, Schieber NL, Maritzen T, Haucke V, Parton RG et Gruenberg J (2011) Role of AP1 and Gadkin in the traffic of secretory endo-lysosomes. *Molecular Biology of the Cell 22*: 2068-2082.

Laurila K et Vihinen M (2009) Prediction of disease-related mutations affecting protein localization. *BMC Genomics 10*: 122.

Le Gall S, Buseyne F, Trocha A, Walker BD, Heard JM et Schwartz O (2000) Distinct trafficking pathways mediate Nef-induced and clathrin-dependent major histocompatibility complex class I down-regulation. *Journal of virology 74*: 9256-9266.

Le QG et Kimata Y (2021) Multiple ways for stress sensing and regulation of the endoplasmic reticulum-stress sensors. *Cell Structure and Function 46*: 37-49.

Lee BE, Suh P-G et Kim J-I (2021) O-GlcNAcylation in health and neurodegenerative diseases. *Experimental & Molecular Medicine 53*: 1674-1682.

Lee JS, Kanai K, Suzuki M, Kim WS, Yoo HS, Fu Y, Kim D-K, Jung BC, Choi M, Oh KW, et al. (2019) Arylsulfatase A, a genetic modifier of Parkinson's disease, is an α-synuclein chaperone. *Brain 142*: 2845-2859.

Lee JS, Wee TL et Brown CM (2014) Calibration of wide-field deconvolution microscopy for quantitative fluorescence imaging. *Journal of Biomolecular Techniques 25*: 31-40.

Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao YS, Pandey UB, Kaushik S, Tresse E, Lu J, et al. (2010) HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *The EMBO Journal 29*: 969-980.

Lee YH, Suh BK, Lee U, Ryu SH, Shin SR, Chang S, Park SK et Chung KC (2022) DYRK3 phosphorylates SNAPIN to regulate axonal retrograde transport and neurotransmitter release. *Cell Death Discovery 8*: 503.

Leih M, Plemel RL, West M, Angers CG, Merz AJ et Odorizzi G (2024) Disordered hinge regions of the AP-3 adaptor complex promote vesicle budding from the late Golgi in yeast. *Journal of Cell Science 137*: jcs262234.

Lensjø KK, Lepperød ME, Dick G, Hafting T et Fyhn M (2017) Removal of perineuronal nets unlocks juvenile plasticity through network mechanisms of decreased inhibition and increased gamma activity. *The Journal of Neuroscience 37*: 1269-1283.

Leterrier C (2018) The axon initial segment: An updated viewpoint. *The Journal of Neuroscience 38*: 2135-2145.

Leutert M, Entwisle SW et Villén J (2021) Decoding post-translational modification crosstalk with proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics 20*: 100129.

Levine ZG, Fan C, Melicher MS, Orman M, Benjamin T et Walker S (2018) O-GlcNAc transferase recognizes protein substrates using an asparagine ladder in the tetratricopeptide repeat (TPR) superhelix. *Journal of the American Chemical Society 140*: 3510-3513.

Li C, Wang Y, Chen S, Rong S, Huang B, Liu L et Lou H (2024) [Clinical and genetic characteristics of a child with Developmental and epileptic encephalopathy 104 due to variant of ATP6V0A1 gene]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 41*: 345-350.

Li J, Ahat E et Wang Y (2019a) Golgi structure and function in health, stress, and diseases. *Results and Problems in Cell Differentiation 67*: 441-485.

Li L, Gervasi N et Girault J-A (2015) Dendritic geometry shapes neuronal cAMP signalling to the nucleus. *Nature Communications 6*: 6319.

Li P, Merrill SA, Jorgensen EM et Shen K (2016) Two clathrin adaptor protein complexes instruct axon-dendrite polarity. *Neuron 90*: 564-580.

Li T, Wang X, Ju E, da Silva SR, Chen L, Zhang X, Wei S et Gao SJ (2021) RNF167 activates mTORC1 and promotes tumorigenesis by targeting CASTOR1 for ubiquitination and degradation. *Nature Communications 12*: 1055.

Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, Chanda SK, Batalov S et Joazeiro CAP (2008) Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLOS One 3*: e1487-e1487.

Li W, Wang H, Yang Y, Zhao T, Zhang Z, Tian Y, Shi Z, Peng X, Li F, Feng Y, et al. (2018) Integrative analysis of proteome and ubiquitylome reveals unique features of lysosomal and endocytic pathways in Gefitinib-Resistant non-small cell lung cancer cells. *Proteomics 18*: e1700388.

Li Z, Zhang C, Wang Z, Shen J, Xiang P, Chen X, Nan J et Lin Y (2019b) Lipofectamine 2000/siRNA complexes cause endoplasmic reticulum unfolded protein response in human endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology 234*: 21166-21181.

Lin Z, Yang P, Hu Y, Xu H, Duan J, He F, Dou K et Wang L (2023) RING finger protein 13 protects against nonalcoholic steatohepatitis by targeting STING-relayed signaling pathways. *Nature Communications 14*: 6635.

Lindquist BE, Timbie C, Voskobiynyk Y et Paz JT (2023) Thalamocortical circuits in generalized epilepsy: Pathophysiologic mechanisms and therapeutic targets. *Neurobiology of Disease 181*: 106094.

Liu C, Liu W, Ye Y et Li W (2017) Ufd2p synthesizes branched ubiquitin chains to promote the degradation of substrates modified with atypical chains. *Nature Communications 8*: 14274.

Liu D, Wu H, Wang C, Li Y, Tian H, Siraj S, Sehgal SA, Wang X, Wang J, Shang Y, et al. (2019a) STING directly activates autophagy to tune the innate immune response. *Cell Death & Differentiation 26*: 1735-1749.

Liu GY, Jouandin P, Bahng RE, Perrimon N et Sabatini DM (2024a) An evolutionary mechanism to assimilate new nutrient sensors into the mTORC1 pathway. *Nature Communications 15*: 2517.

Liu J, Qian C et Cao X (2016a) Post-translational modification control of innate immunity. *Immunity 45*: 15-30.

Liu K, Jian Y, Sun X, Yang C, Gao Z, Zhang Z, Liu X, Li Y, Xu J, Jing Y, et al. (2016b) Negative regulation of phosphatidylinositol 3-phosphate levels in early-to-late endosome conversion. *Journal of Cell Biology 212*: 181-198.

Liu K, Qiu D, Liang X, Huang Y, Wang Y, Jia X, Li K, Zhao J, Du C, Qiu X, et al. (2022a) Lipotoxicity-induced STING1 activation stimulates MTORC1 and restricts hepatic lipophagy. *Autophagy 18*: 860-876.

Liu W, Wang Y, Liu S, Zhang X, Cao X et Jiang M (2024b) E3 ubiquitin ligase RNF13 suppresses TLR lysosomal degradation by promoting LAMP-1 proteasomal degradation. *Advanced Science* e2309560.

Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, Yang C et Liu HF (2016c) p62 links the autophagy pathway and the ubiqutin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cellular & Molecular Biology Letters 21*: 29.

Liu Y, Xu P, Rivara S, Liu C, Ricci J, Ren X, Hurley JH et Ablasser A (2022b) Clathrin-associated AP-1 controls termination of STING signalling. *Nature 610*: 761-767.

Liu Z, Dong X, Yi H-W, Yang J, Gong Z, Wang Y, Liu K, Zhang W-P et Tang C (2019b) Structural basis for the recognition of K48-linked Ub chain by proteasomal receptor Rpn13. *Cell Discovery 5*: 19.

Lobingier BT et Merz AJ (2012) Sec1/Munc18 protein Vps33 binds to SNARE domains and the quaternary SNARE complex. *Molecular Biology of the Cell 23*: 4611-4622.

Lombardi D, Soldati T, Riederer MA, Goda Y, Zerial M et Pfeffer SR (1993) Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *The EMBO Journal 12*: 677-682.

Long KR et Huttner WB (2022) The role of the extracellular matrix in neural progenitor cell proliferation and cortical folding during human neocortex development. *Frontiers in Cellular Neuroscience Volume 15 - 2021*: 804649.

Lopez Moreno AJ et Kursula P (2024) In vitro interaction of myelin proteins P0, P2, and MBP with F-actin. *Biophysical Journal 123*: 46a.

Lord JM et Roberts LM (1998) Retrograde transport: Going against the flow. *Current Biology 8*: R56-R58.

Lőrincz P et Juhász G (2020) Autophagosome-lysosome fusion. *Journal of Molecular Biology 432*: 2462-2482.

Lőrincz P, Tóth S, Benkő P, Lakatos Z, Boda A, Glatz G, Zobel M, Bisi S, Hegedűs K, Takáts S, et al. (2017) Rab2 promotes autophagic and endocytic lysosomal degradation. *Journal of Cell Biology 216*: 1937-1947.

Lu X, Ebelle DL, Matsuo H et Walters KJ (2020) An extended conformation for K48 ubiquitin chains revealed by the hRpn2:Rpn13:K48-Diubiquitin structure. *Structure 28*: 495-506.e493.

Luck K, Kim D-K, Lambourne L, Spirohn K, Begg BE, Bian W, Brignall R, Cafarelli T, Campos-Laborie FJ, Charloteaux B, et al. (2020) A reference map of the human binary protein interactome. *Nature 580*: 402-408.

Luders E, Thompson PM et Toga AW (2010) The development of the corpus callosum in the healthy human brain. *The Journal of Neuroscience 30*: 10985-10990.

Lund VK, Madsen KL et Kjaerulff O (2018) Drosophila Rab2 controls endosome-lysosome fusion and LAMP delivery to late endosomes. *Autophagy 14*: 1520-1542.

Luo F, Fong YH, Zeng Y, Shen J, Jiang L et Wong KB (2014) How vacuolar sorting receptor proteins interact with their cargo proteins: crystal structures of apo and cargo-bound forms of the protease-associated domain from an Arabidopsis vacuolar sorting receptor. *Plant Cell 26*: 3693-3708.

Luo H, Jiao Q, Shen C, Shao C, Xie J, Chen Y, Feng X et Zhang X (2023) Unraveling the roles of endoplasmic reticulum-associated degradation in metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology Volume 14 - 2023*: 1123769.

Luo X et Hofmann K (2001) The protease-associated domain: a homology domain associated with multiple classes of proteases. *Trends in Biochemical Sciences 26*: 147-148.

Lussier MP, Cayouette S, Lepage PK, Bernier CL, Francoeur N, St-Hilaire M, Pinard M et Boulay G (2005) MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the ankyrin-like repeat domain of TRPC. *Journal of Biological Chemistry 280*: 19393-19400.

Lussier MP, Herring BE, Nasu-Nishimura Y, Neutzner A, Karbowski M, Youle RJ, Nicoll RA et Roche KW (2012) Ubiquitin ligase RNF167 regulates AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *The Proceedings of the National Academy of Sciences 109*: 19426-19431.

Ma L, Ouyang Q, Werthmann GC, Thompson HM et Morrow EM (2017) Live-cell microscopy and fluorescence-based measurement of luminal pH in intracellular organelles. *Frontiers in Cell and Developmental Biology Volume 5 - 2017*: 71.

Ma Z, Islam MN, Xu T et Song E (2021) AP-3 adaptor complex-mediated vesicle trafficking. *Biophysical Reports 7*: 91-100.

Mahon P et Bateman A (2000) The PA domain: a protease-associated domain. *Protein Science 9*: 1930-1934.

Mann M et Jensen ON (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology 21*: 255-261.

Marat AL et Haucke V (2016) Phosphatidylinositol 3-phosphates—at the interface between cell signalling and membrane traffic. *The EMBO Journal 35*: 561-579-579.

Marazza A, Galli C, Fasana E, Sgrignani J, Burda P, Fassi EMA, Baumgartner M, Cavalli A et Molinari M (2020) Endoplasmic reticulum and lysosomal quality control of four nonsense mutants of iduronate 2-sulfatase linked to Hunter's syndrome. *DNA and Cell Biology 39*: 226-234.

Margeta MA, Wang GJ et Shen K (2009) Clathrin adaptor AP-1 complex excludes multiple postsynaptic receptors from axons in C. elegans. *Proceedings of the National Academy of Sciences 106*: 1632-1637.

Margiotta A (2023) Role of SNAREs and Rabs in Myelin Regulation. *International Journal of Molecular Sciences 24*: 9772.

Marshansky V et Futai M (2008) The V-type H+-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol 20*: 415-426.

Martens S et McMahon HT (2008) Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 9*: 543-556.

Martinez-Fonts K, Davis C, Tomita T, Elsasser S, Nager AR, Shi Y, Finley D et Matouschek A (2020) The proteasome 19S cap and its ubiquitin receptors provide a versatile recognition platform for substrates. *Nature Communications 11*: 477.

Marwaha R, Arya SB, Jagga D, Kaur H, Tuli A et Sharma M (2017) The Rab7 effector PLEKHM1 binds Arl8b to promote cargo traffic to lysosomes. *Journal of Cell Biology 216*: 1051-1070.

Mast SW et Moremen KW (2006) Family 47 alpha-mannosidases in N-glycan processing. *Methods in Enzymology 415*: 31-46.

Matheny-Rabun C, Mokashi SS, Radenkovic S, Wiggins K, Dukes-Rimsky L, Angel P, Ghesquiere B, Kozicz T, Steet R, Morava E, et al. (2024) O-GlcNAcylation modulates expression and abundance of N-glycosylation machinery in an inherited glycosylation disorder. *Cell Reports 43*: 114976.

Matsuda A, Schermelleh L, Hirano Y, Haraguchi T et Hiraoka Y (2018) Accurate and fiducial-marker-free correction for three-dimensional chromatic shift in biological fluorescence microscopy. *Scientific Reports 8*: 7583.

Matsumoto ML, Wickliffe KE, Dong KC, Yu C, Bosanac I, Bustos D, Phu L, Kirkpatrick DS, Hymowitz SG, Rape M, et al. (2010) K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Molecular Cell 39*: 477-484.

Matsumoto N, Sekiya M, Tohyama K, Ishiyama-Matsuura E, Sun-Wada G-H, Wada Y, Futai M et Nakanishi-Matsui M (2018) Essential role of the a3 isoform of V-ATPase in secretory lysosome trafficking via Rab7 recruitment. *Scientific Reports 8*: 6701.

Mattera R, Boehm M, Chaudhuri R, Prabhu Y et Bonifacino JS (2011) Conservation and diversification of dileucine signal recognition by adaptor protein (AP) complex variants. *Journal of Biological Chemistry 286*: 2022-2030.

Mattera R et Bonifacino JS (2008) Ubiquitin binding and conjugation regulate the recruitment of Rabex-5 to early endosomes. *The EMBO Journal 27*: 2484-2494-2494.

Mauro VP et Chappell SA (2014) A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *Trends in Molecular Medicine 20*: 604-613.

Mayle KM, Le AM et Kamei DT (2012) The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta 1820*: 264-281.

McDonnell SJ, Spiller DG, White MRH, Prior IA et Paraoan L (2019) ER stress-linked autophagy stabilizes apoptosis effector PERP and triggers its co-localization with SERCA2b at ER–plasma membrane junctions. *Cell Death Discovery 5*: 132.

McEntagart M, Williamson KA, Rainger JK, Wheeler A, Seawright A, De Baere E, Verdin H, Bergendahl LT, Quigley A, Rainger J, et al. (2016) A restricted repertoire of de novo mutations in ITPR1 cause gillespie syndrome with evidence for dominant-negative effect. *The American Journal of Human Genetics 98*: 981-992.

McGuire C, Cotter K, Stransky L et Forgac M (2016) Regulation of V-ATPase assembly and function of V-ATPases in tumor cell invasiveness. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1857*: 1213-1218.

McMahon HT et Mills IG (2004) COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Current Opinion in Cell Biology 16*: 379-391.

McMahon HT, Ushkaryov YA, Edelmann L, Link E, Binz T, Niemann H, Jahn R et Südhof TC (1993) Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. *Nature 364*: 346-349.

Melia TJ, Lystad AH et Simonsen A (2020) Autophagosome biogenesis: From membrane growth to closure. *Journal of Cell Biology 219*: e202002085.

Meng J, Zou X, Wu R, Zhong R, Zhu D et Zhang Y (2014) Accelerated regeneration of the skeletal muscle in RNF13-knockout mice is mediated by macrophage-secreted IL-4/IL-6. *Protein & Cell 5*: 235-247.

Meraş İ, Maes J et Lefrancois S (2022) Mechanisms regulating the sorting of soluble lysosomal proteins. *Bioscience Reports 42*: BSR20211856.

Mertins P, Mani DR, Ruggles KV, Gillette MA, Clauser KR, Wang P, Wang X, Qiao JW, Cao S, Petralia F, et al. (2016) Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature 534*: 55-62.

Mettlen M, Loerke D, Yarar D, Danuser G et Schmid SL (2010) Cargo- and adaptor-specific mechanisms regulate clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Cell Biology 188*: 919-933.

Metzger MB, Hristova VA et Weissman AM (2012) HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of Cell Science 125*: 531-537.

Metzger MB, Pruneda JN, Klevit RE et Weissman AM (2014) RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochimica et Biophysica Acta 1843*: 47-60.

Meyer DM, Crottet P, Maco B, Degtyar E, Cassel D et Spiess M (2005) Oligomerization and dissociation of AP-1 adaptors are regulated by cargo signals and by ArfGAP1-induced GTP hydrolysis. *Molecular Biology of the Cell 16*: 4745-4754.

Meyer HJ et Rape M (2014) Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell 157*: 910-921.

Michalski J-C et Klein A (1999) Glycoprotein lysosomal storage disorders: α- and β-mannosidosis, fucosidosis and α-N-acetylgalactosaminidase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1455*: 69-84.

Mihailoff GA et Haines DE (2018) Chapter 2 - The Cell Biology of Neurons and Glia. Dans *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications (Fifth Edition)*. Haines DE et Mihailoff GA, eds. Elsevier. eBook.

Miki H, Setou M, Kaneshiro K et Hirokawa N (2001) All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences 98*: 7004-7011.

Millard E et Tooze SA (2025) ATG9 not just an autophagy related protein. *Journal of Molecular Biology 437*: 169288.

Mindell JA (2012) Lysosomal acidification mechanisms. *Annual Review of Physiology 74*: 69-86.

Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S et Steinegger M (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods 19*: 679-682.

Mitra C, Winkley S et Kane PM (2023) Human V-ATPase a-subunit isoforms bind specifically to distinct phosphoinositide phospholipids. *Journal of Biological Chemistry 299*: 105473.

Mitsunari T, Nakatsu F, Shioda N, Love PE, Grinberg A, Bonifacino JS et Ohno H (2005) Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development. *Molecular and Cellular Biology 25*: 9318-9323.

Mittelstaedt T, Alvaréz-Baron E et Schoch S (2010) RIM proteins and their role in synapse function. *Biological Chemistry 391*: 599-606.

Miyakawa K, Nishi M, Ogawa M, Matsunaga S, Sugiyama M, Nishitsuji H, Kimura H, Ohnishi M, Watashi K, Shimotohno K, et al. (2022) Galectin-9 restricts hepatitis B virus replication via p62/SQSTM1-mediated selective autophagy of viral core proteins. *Nature Communications 13*: 531-531.

Mizushima N (2020) The ATG conjugation systems in autophagy. *Current Opinion in Cell Biology 63*: 1-10.

Mo RH, Zaro JL, Ou JH et Shen WC (2012) Effects of Lipofectamine 2000/siRNA complexes on autophagy in hepatoma cells. *Molecular Biotechnology 51*: 1-8.

Mochida S (2022) Mechanisms of synaptic vesicle exo- and endocytosis. *Biomedicines 10*: 1593.

Moffat JJ, Ka M, Jung E-M et Kim W-Y (2015) Genes and brain malformations associated with abnormal neuron positioning. *Molecular Brain 8*: 72.

Moini J, LoGalbo A et Ahangari R (2024) Chapter 3 - Neural tissue. Dans *Foundations of the Mind, Brain, and Behavioral Relationships*. Moini J, LoGalbo A et Ahangari R, eds. Academic Press. eBook.

Moini J et Piran P (2020) Chapter 1 - Histophysiology. Dans *Functional and Clinical Neuroanatomy*. Moini J et Piran P, eds. Academic Press. eBook.

Montagnac G, de Forges H, Smythe E, Gueudry C, Romao M, Salamero J et Chavrier P (2011) Decoupling of activation and effector binding underlies ARF6 priming of fast endocytic recycling. *Current Biology 21*: 574-579.

Moremen KW et Nairn AV (2014) Mannosidase, Alpha, Class 1 (MAN1A1 (Golgi Alpha-Mannnosidase IA), Man1A2 (Golgi Alpha-Mannosidase IB), MAN1B1(ER Alpha-Mannosidase I), MAN1C1 (Golgi Alpha-Mannosidase IC)). Dans *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*. Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y et Angata T, eds. Springer Japan. Tokyo.

Morita S-y et Ikeda Y (2022) Regulation of membrane phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochemical Pharmacology 206*: 115296.

Morrill SA et Amon A (2019) Why haploinsufficiency persists. *Proceedings of the National Academy of Sciences 116*: 11866-11871.

Morris KL, Buffalo CZ, Stürzel CM, Heusinger E, Kirchhoff F, Ren X et Hurley JH (2018) HIV-1 Nefs are cargo-sensitive AP-1 trimerization switches in tetherin downregulation. *Cell 174*: 659-671.e614.

Mukhopadhyay D et Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science 315*: 201-205.

Mullins RD (2010) Cytoskeletal mechanisms for breaking cellular symmetry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2*: a003392.

Na KS, Park BC, Jang M, Cho S, Lee DH, Kang S, Lee C-K, Bae K-H et Park SG (2007) Protein disulfide isomerase Is cleaved by caspase-3 and -7 during apoptosis. *Molecules and Cells 24*: 261-267.

Nagpal S, Swaminathan K, Beaudet D, Verdier M, Wang S, Berger CL, Berger F et Hendricks AG (2024) Optogenetic control of kinesin-1, -2, -3 and dynein reveals their specific roles in vesicular transport. *Cell Reports 43*: 114649.

Nagy G, Kiraly G, Turani M et Banfalvi G (2013) Cell trivision of hyperploid cells. *DNA and Cell Biology 32*: 676-684.

Nähse V, Stenmark H et Schink KO (2024) Omegasomes control formation, expansion, and closure of autophagosomes. *BioEssays 46*: 2400038.

Nair SV, Narendradev ND, Nambiar RP, Kumar R et Srinivasula SM (2020) Naturally occurring and tumor-associated variants of RNF167 promote lysosomal exocytosis and plasma membrane resealing. *Journal of Cell Science 133*: jcs239335.

Nakagawa T, Setou M, Seog D-H, Ogasawara K, Dohmae N, Takio K et Hirokawa N (2000) A novel motor, KIF13A, transports Mannose-6-Phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell 103*: 569-581.

Nakai K et Imai K (2019) Prediction of protein localization. Dans *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. Ranganathan S, Gribskov M, Nakai K et Schönbach C, eds. Academic Press. Oxford.

Nakamura N (2011) The role of the transmembrane RING finger proteins in cellular and organelle function. *Membranes 1*: 354-393.

Nakano M, Mishra SK, Tokoro Y, Sato K, Nakajima K, Yamaguchi Y, Taniguchi N et Kizuka Y (2019) Bisecting GlcNAc is a general suppressor of terminal modification of N-glycan. *Molecular and Cellular Proteomics 18*: 2044-2057.

Nakatsu F, Okada M, Mori F, Kumazawa N, Iwasa H, Zhu G, Kasagi Y, Kamiya H, Harada A, Nishimura K, et al. (2004) Defective function of GABA-containing synaptic vesicles in mice lacking the AP-3B clathrin adaptor. *Journal of Cell Biology 167*: 293-302.

Naslavsky N et Caplan S (2018) The enigmatic endosome - sorting the ins and outs of endocytic trafficking. *Journal of Cell Science 131*: jcs216499.

Navarro Negredo P, Edgar JR, Wrobel AG, Zaccai NR, Antrobus R, Owen DJ et Robinson MS (2017) Contribution of the clathrin adaptor AP-1 subunit μ1 to acidic cluster protein sorting. *Journal of Cell Biology 216*: 2927-2943.

Nelson AD et Bender KJ (2021) Dendritic integration dysfunction in neurodevelopmental disorders. *Developmental Neuroscience 43*: 201-221.

Ness C, Katta K, Garred Ø, Kumar T, Olstad OK, Petrovski G, Moe MC et Noer A (2020) Integrated differential DNA methylation and gene expression of formalin-fixed paraffin-embedded uveal melanoma specimens identifies genes associated with early metastasis and poor prognosis. *Experimental Eye Research 203*: 108426.

Neubrand VE, Will RD, Möbius W, Poustka A, Wiemann S, Schu P, Dotti CG, Pepperkok R et Simpson JC (2005) Gamma-BAR, a novel AP-1-interacting protein involved in post-Golgi trafficking. *The EMBO Journal 24*: 1122-1133.

Neutzner A, Neutzner M, Benischke AS, Ryu SW, Frank S, Youle RJ et Karbowski M (2011) A systematic search for endoplasmic reticulum (ER) membrane-associated RING finger proteins identifies Nixin/ZNRF4 as a regulator of calnexin stability and ER homeostasis. *Journal of Biological Chemistry 286*: 8633-8643.

Newell-Litwa K, Chintala S, Jenkins S, Pare JF, McGaha L, Smith Y et Faundez V (2010) Hermansky-Pudlak protein complexes, AP-3 and BLOC-1, differentially regulate presynaptic composition in the striatum and hippocampus. *The Journal of Neuroscience 30*: 820-831.

Newell-Litwa K, Salazar G, Smith Y et Faundez V (2009) Roles of BLOC-1 and adaptor protein-3 complexes in cargo sorting to synaptic vesicles. *Molecular Biology of the Cell 20*: 1441-1453.

Nguyen LH et Bordey A (2021) Convergent and divergent mechanisms of epileptogenesis in mTORopathies. *Frontiers in Neuroanatomy Volume 15 - 2021*: 664695.

Ninagawa S, Matsuo M, Ying D, Oshita S, Aso S, Matsushita K, Taniguchi M, Fueki A, Yamashiro M, Sugasawa K, et al. (2024) UGGT1-mediated reglucosylation of N-glycan competes with ER-associated degradation of unstable and misfolded glycoproteins. *12*: RP93117.

Nirschl JJ, Ghiretti AE et Holzbaur ELF (2017) The impact of cytoskeletal organization on the local regulation of neuronal transport. *Nature Reviews Neuroscience 18*: 585-597.

Nishimura N, Plutner H, Hahn K et Balch WE (2002) The δ subunit of AP-3 is required for efficient transport of VSV-G from the trans-Golgi network to the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences 99*: 6755-6760.

Nishimura T et Tooze SA (2020) Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. *Cell Discovery 6*: 32.

Nishiyama J (2019) Plasticity of dendritic spines: Molecular function and dysfunction in neurodevelopmental disorders. *Psychiatry and Clinical Neurosciences 73*: 541-550.

Noad J, von der Malsburg A, Pathe C, Michel MA, Komander D et Randow F (2017) LUBAC-synthesized linear ubiquitin chains restrict cytosol-invading bacteria by activating autophagy and NF-κB. *Nature Microbiology 2*: 17063.

Nofal S, Becherer U, Hof D, Matti U et Rettig J (2007) Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *The Journal of Neuroscience 27*: 1386-1395.

Norell PN, Campisi D, Mohan J et Wollert T (2024) Biogenesis of omegasomes and autophagosomes in mammalian autophagy. *Biochemical Society Transactions 52*: 2145-2155.

Nozawa K, Fujihara Y, Devlin DJ, Deras RE, Kent K, Larina IV, Umezu K, Yu Z, Sutton CM, Ye Q, et al. (2022) The testis-specific E3 ubiquitin ligase RNF133 is required for fecundity in mice. *BMC Biology 20*: 161.

O'Brien J, Hayder H, Zayed Y et Peng C (2018) Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology 9*: 402.

Occhialini A, Gouzerh G, Di Sansebastiano GP et Neuhaus JM (2016) Dimerization of the vacuolar receptors AtRMR1 and -2 from Arabidopsis thaliana contributes to their localization in the trans-Golgi network. *International Journal of Molecular Sciences 17*: 1661.

Ohno H, Aguilar RC, Yeh D, Taura D, Saito T et Bonifacino JS (1998) The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *Journal of Biological Chemistry 273*: 25915-25921.

Ohtake F, Tsuchiya H, Saeki Y et Tanaka K (2018) K63 ubiquitylation triggers proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences 115*: E1401-E1408.

Olanow CW et McNaught KS (2006) Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. *Movement Disorders 21*: 1806-1823.

Olson LJ, Hindsgaul O, Dahms NM et Kim JJ (2008) Structural insights into the mechanism of pH-dependent ligand binding and release by the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *Journal of Biological Chemistry 283*: 10124-10134.

Oot RA, Couoh-Cardel S, Sharma S, Stam NJ et Wilkens S (2017) Breaking up and making up: The secret life of the vacuolar H+-ATPase. *Protein Science 26*: 896-909.

Orsi A, van Anken E, Vitale M, Zamai M, Caiolfa VR, Sitia R et Bakunts A (2024) Congress of multiple dimers is needed for cross-phosphorylation of IRE1α and its RNase activity. *Life Science Alliance 7*: e202302562.

Osaki Y, Saito A, Kanemoto S, Kaneko M, Matsuhisa K, Asada R, Masaki T, Orii K, Fukao T, Tomatsu S, et al. (2018) Shutdown of ER-associated degradation pathway rescues functions of mutant iduronate 2-sulfatase linked to mucopolysaccharidosis type II. *Cell Death & Disease 9*: 808.

Ossola C et Kalebic N (2022) Roots of the malformations of cortical development in the cell biology of neural progenitor cells. *Frontiers in Neuroscience Volume 15 - 2021*: 817218.

Ostalé CM, Esteban N, López-Varea A et de Celis JF (2021) Functional requirements of protein kinases and phosphatases in the development of the Drosophila melanogaster wing. *G3 (Bethesda) 11*: jkab348.

Ott DP, Desai S, Solinger JA, Kaech A et Spang A (2025) Coordination between ESCRT function and Rab conversion during endosome maturation. *The EMBO Journal 44*: 1574-1607.

Oughtred R, Rust J, Chang C, Breitkreutz BJ, Stark C, Willems A, Boucher L, Leung G, Kolas N, Zhang F, et al. (2021) The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Science 30*: 187-200.

Öztürk Z, O'Kane CJ et Pérez-Moreno JJ (2020) Axonal endoplasmic reticulum dynamics and its roles in neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience Volume 14 - 2020*: 48.

Panwar V, Singh A, Bhatt M, Tonk RK, Azizov S, Raza AS, Sengupta S, Kumar D et Garg M (2023) Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy 8*: 375.

Papadopoulos C, Kravic B et Meyer H (2020) Repair or lysophagy: Dealing with damaged lysosomes. *Journal of Molecular Biology 432*: 231-239.

Parihar K, Nukpezah J, Iwamoto DV, Janmey PA et Radhakrishnan R (2022) Data driven and biophysical insights into the regulation of trafficking vesicles by extracellular matrix stiffness. *iScience 25*: 104721.

Parini R et Deodato F (2020) Intravenous enzyme replacement therapy in Mucopolysaccharidoses: Clinical effectiveness and limitations. *International Journal of Molecular Sciences 21*: 2975.

Park M, Lee D, Lee GJ et Hwang I (2005) AtRMR1 functions as a cargo receptor for protein trafficking to the protein storage vacuole. *Journal of Cell Biology 170*: 757-767.

Park SY et Guo X (2014) Adaptor protein complexes and intracellular transport. *Bioscience Reports 34*: e00123.

Parkinson-Lawrence E, Turner C, Hopwood J et Brooks D (2005) Analysis of normal and mutant iduronate-2-sulphatase conformation. *Biochemical Journal 386*: 395-400.

Parmar HB et Duncan R (2016) A novel tribasic Golgi export signal directs cargo protein interaction with activated Rab11 and AP-1–dependent Golgi–plasma membrane trafficking. *Molecular Biology of the Cell 27*: 1320-1331.

Partlow EA, Cannon KS, Hollopeter G et Baker RW (2022) Structural basis of an endocytic checkpoint that primes the AP2 clathrin adaptor for cargo internalization. *Nature Structural & Molecular Biology 29*: 339-347.

Parzych KR et Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & Redox Signaling 20*: 460-473.

Patel C, Saad H, Shenkman M et Lederkremer GZ (2020) Oxidoreductases in glycoprotein glycosylation, folding, and ERAD. *Cells 9*: 2138.

Paul S (2008) Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches. *Bioessays 30*: 1172-1184.

Pavlos NJ et Jahn R (2011) Distinct yet overlapping roles of Rab GTPases on synaptic vesicles. *Small GTPases 2*: 77-81.

Pchitskaya E et Bezprozvanny I (2020) Dendritic spines shape analysis—classification or clusterization? Perspective. *Frontiers in Synaptic Neuroscience Volume 12 - 2020*: 31.

Pearse BM et Robinson MS (1984) Purification and properties of 100-kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin. *The EMBO Journal 3*: 1951-1957.

Pearse BMF (1975) Coated vesicles from pig brain: Purification and biochemical characterization. *Journal of Molecular Biology 97*: 93-98.

Peden AA, Oorschot V, Hesser BA, Austin CD, Scheller RH 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*: 1065-1076.

Pellarin I, Dall'Acqua A, Favero A, Segatto I, Rossi V, Crestan N, Karimbayli J, Belletti B et Baldassarre G (2025) Cyclin-dependent protein kinases and cell cycle regulation in biology and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy 10*: 11.

Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen J-E et Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience 14*: 285-293.

Perez-Alvarez A, Yin S, Schulze C, Hammer JA, Wagner W et Oertner TG (2020) Endoplasmic reticulum visits highly active spines and prevents runaway potentiation of synapses. *Nature Communications 11*: 5083.

Pike JA, Styles IB, Rappoport JZ et Heath JK (2017) Quantifying receptor trafficking and colocalization with confocal microscopy. *Methods 115*: 42-54.

Pinilla-Macua I et Sorkin A (2015) Methods to study endocytic trafficking of the EGF receptor. *Methods in Cell Biology 130*: 347-367.

Pirozzi F, Nelson B et Mirzaa G (2018) From microcephaly to megalencephaly: determinants of brain size. *Dialogues in Clinical Neuroscience 20*: 267-282.

Platt FM, Boland B et van der Spoel AC (2012) The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *Journal of Cell Biology 199*: 723-734.

Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF et Tifft CJ (2018) Lysosomal storage diseases. *Nature Reviews Disease Primers 4*: 27.

Platzer K, Sticht H, Bupp C, Ganapathi M, Pereira EM, Le Guyader G, Bilan F, Henderson LB, Lemke JR, Taschenberger H, et al. (2022) De novo missense variants in cause a developmental and epileptic encephalopathy due to impaired GABAergic neurotransmission. *Annals of Neurology 92*: 958-973.

Poli A, Zaurito AE, Abdul-Hamid S, Fiume R, Faenza I et Divecha N (2019) Phosphatidylinositol 5 Phosphate (PI5P): From behind the scenes to the front (Nuclear) stage. *International Journal of Molecular Sciences 20*: 2080.

Posor Y, Jang W et Haucke V (2022) Phosphoinositides as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 23*: 797-816.

Potapova NA (2022) Nonsense Mutations in Eukaryotes. *Biochemistry (Moscow) 87*: 400-412.

Poteryaev D, Datta S, Ackema K, Zerial M et Spang A (2010) Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell 141*: 497-508.

Powell CM (2006) Gene targeting of presynaptic proteins in synaptic plasticity and memory: Across the great divide. *Neurobiology of Learning and Memory 85*: 2-15.

Prabakaran T, Bodda C, Krapp C, Zhang Bc, Christensen MH, Sun C, Reinert L, Cai Y, Jensen SB, Skouboe MK, et al. (2018) Attenuation of cGAS-STING signaling is mediated by a p62/SQSTM1-dependent autophagy pathway activated by TBK1. *The EMBO Journal 37*: e97858.

Prakash K, Baddeley D, Eggeling C, Fiolka R, Heintzmann R, Manley S, Radenovic A, Shroff H, Smith C et Schermelleh L (2025) Resolution in super-resolution microscopy - facts, artifacts, technological advancements and biological applications. *Journal of Cell Science 138*: jcs263567.

Pu J, Guardia CM, Keren-Kaplan T et Bonifacino JS (2016) Mechanisms and functions of lysosome positioning. *Journal of Cell Science 129*: 4329-4339.

Pu J, Schindler C, Jia R, Jarnik M, Backlund P et Bonifacino JS (2015) BORC, a multisubunit complex that regulates lysosome positioning. *Developmental Cell 33*: 176-188.

Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K et Rubinsztein DC (2013) Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell 154*: 1285-1299.

Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, Akutsu M, Suzuki N, Kato R, Kensche T, Uejima T, Bloor S, Komander D, et al. (2009) Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell 136*: 1098-1109.

Rahman NSA, Zahari S, Syafruddin SE, Firdaus-Raih M, Low TY et Mohtar MA (2022) Functions and mechanisms of protein disulfide isomerase family in cancer emergence. *Cell & Bioscience 12*: 129.

Rameh LE et Blind RD (2023) 25 Years of PI5P. *Frontiers in Cell and Developmental Biology Volume 11 - 2023*: 1272911.

Rampérez A, Sánchez-Prieto J et Torres M (2017) Brefeldin A sensitive mechanisms contribute to endocytotic membrane retrieval and vesicle recycling in cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry 141*: 662-675.

Read A et Schröder M (2021) The unfolded protein response: an overview. *Biology 10*: 384.

Rebiai R, Givogri MI, Gowrishankar S, Cologna SM, Alford ST et Bongarzone ER (2021) Synaptic function and dysfunction in lysosomal storage diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience 15*: 619777.

Rechsteiner M et Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences 21*: 267-271.

Reddy A, Caler EV et Andrews NW (2001) Plasma membrane repair is mediated by Ca2+-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell 106*: 157-169.

Reece JB, Urry L, Cain M, Wasserman S, Minorsky P et Jackson R (2011) *Campbell Biology*. Benjamin Cummings / Pearson, San Francisco.

Reggiori F, Gabius H-J, Aureli M, Römer W, Sonnino S et Eskelinen E-L (2021) Glycans in autophagy, endocytosis and lysosomal functions. *Glycoconjugate Journal 38*: 625-647.

Reid DW et Nicchitta CV (2015) Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 16*: 221-231.

Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB et Novak J (2019) Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology 15*: 346-366.

Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y et Yao X (2009) DOG 1.0: illustrator of protein domain structures. *Cell Research 19*: 271-273.

Ren X, Farías GG, Canagarajah BJ, Bonifacino JS et Hurley JH (2013) Structural basis for recruitment and activation of the AP-1 clathrin adaptor complex by Arf1. *Cell 152*: 755-767.

Renaudin X, Guervilly JH, Aoufouchi S et Rosselli F (2014) Proteomic analysis reveals a FANCA-modulated neddylation pathway involved in CXCR5 membrane targeting and cell mobility. *Journal of Cell Science 127*: 3546-3554.

Rennick JJ, Johnston APR et Parton RG (2021) Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. *Nature Nanotechnology 16*: 266-276.

Ricard-Blum S, Vivès RR, Schaefer L, Götte M, Merline R, Passi A, Heldin P, Magalhães A, Reis CA, Skandalis SS, et al. (2024) A biological guide to glycosaminoglycans: current perspectives and pending questions. *The FEBS Journal 291*: 3331-3366.

Richards DM et Endres RG (2016) Target shape dependence in a simple model of receptor-mediated endocytosis and phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences 113*: 6113-6118.

Robinson MS (2015) Forty years of Clathrin-coated vesicles. *Traffic 16*: 1210-1238.

Robinson MS, Antrobus R, Sanger A, Davies AK et Gershlick DC (2024) The role of the AP-1 adaptor complex in outgoing and incoming membrane traffic. *Journal of Cell Biology 223*: e202310071.

Rodionov DG, Höning S, Silye A, Kongsvik TL, von Figura K et Bakke O (2002) Structural requirements for interactions between leucine-sorting signals and clathrin-associated adaptor protein complex AP3. *Journal of Biological Chemistry 277*: 47436-47443.

Roeth JF, Williams M, Kasper MR, Filzen TM et Collins KL (2004) HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *Journal of Cell Biology 167*: 903-913.

Rogers S, Wells R et Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science 234*: 364-368.

Roney JC, Cheng XT et Sheng ZH (2022) Neuronal endolysosomal transport and lysosomal functionality in maintaining axonostasis. *Journal of Cell Biology 221*: e202111077.

Ronzitti G, Bortolussi G, van Dijk R, Collaud F, Charles S, Leborgne C, Vidal P, Martin S, Gjata B, Sola MS, et al. (2016) A translationally optimized AAV-UGT1A1 vector drives safe and long-lasting correction of Crigler-Najjar syndrome. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development 3*: 16049.

Rosenfeld JL, Moore RH, Zimmer KP, Alpizar-Foster E, Dai W, Zarka MN et Knoll BJ (2001) Lysosome proteins are redistributed during expression of a GTP-hydrolysis-defective rab5a. *Journal of Cell Science 114*: 4499.

Rous BA, Reaves BJ, Ihrke G, Briggs JA, Gray SR, Stephens DJ, Banting G et Luzio JP (2002) Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Molecular Biology of the Cell 13*: 1071-1082.

Roush DL, Gottardi CJ, Naim HY, Roth MG et Caplan MJ (1998) Tyrosine-based membrane protein sorting signals are differentially interpreted by polarized Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry 273*: 26862-26869.

Rubinsztein David C, Shpilka T et Elazar Z (2012) Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Current Biology 22*: R29-R34.

Rubio-Teves M, Díez-Hermano S, Porrero C, Sánchez-Jiménez A, Prensa L, Clascá F, García-Amado M et Villacorta-Atienza JA (2021) Benchmarking of tools for axon length measurement in individually-labeled projection neurons. *PLoS Computational Biology 17*: e1009051.

Rusilowicz-Jones EV, Brazel AJ, Frigenti F, Urbé S et Clague MJ (2022) Membrane compartmentalisation of the ubiquitin system. *Seminars in Cell & Developmental Biology 132*: 171-184.

Sabry S, Eissa NR et Zaki MS (2023) Abnormal expression of lysosomal glycoproteins in patients with congenital disorders of glycosylation. *BMC Research Notes 16*: 53.

Saftig P et Klumperman J (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 10*: 623-635.

Saito A et Cavalli V (2016) Signaling over distances. *Molecular & Cellular Proteomics 15*: 382-393.

Saito S, Honma K, Kita-Matsuo H, Ochiya T et Kato K (2005) Gene expression profiling of cerebellar development with high-throughput functional analysis. *Physiological Genomics 22*: 8-13.

Salazar G, Craige B, Styers ML, Newell-Litwa KA, Doucette MM, Wainer BH, Falcon-Perez JM, Dell'Angelica EC, Peden AA, Werner E, et al. (2006) BLOC-1 complex deficiency alters the targeting of adaptor protein complex-3 cargoes. *Molecular Biology of the Cell 17*: 4014-4026.

Saleban M, Harris EL et Poulter JA (2023) D-Type cyclins in development and disease. *Genes 14*: 1445.

Samarasinghe KTG, Jaime-Figueroa S, Burgess M, Nalawansha DA, Dai K, Hu Z, Bebenek A, Holley SA et Crews CM (2021) Targeted degradation of transcription factors by TRAFTACs: TRAnscription Factor TArgeting Chimeras. *Cell Chemical Biology 28*: 648-661.e645.

Sanger A, Hirst J, Davies AK et Robinson MS (2019) Adaptor protein complexes and disease at a glance. *Journal of Cell Science 132*: jcs222992.

Santos MS, Park CK, Foss SM, Li H et Voglmaier SM (2013) Sorting of the vesicular GABA transporter to functional vesicle pools by an atypical dileucine-like motif. *The Journal of Neuroscience 33*: 10634-10646.

Sapmaz A, Berlin I, Bos E, Wijdeven RH, Janssen H, Konietzny R, Akkermans JJ, Erson-Bensan AE, Koning RI, Kessler BM, et al. (2019) USP32 regulates late endosomal transport and recycling through deubiquitylation of Rab7. *Nature Communications 10*: 1454.

Sauvageau E, McCormick PJ et Lefrancois S (2017) In vivo monitoring of the recruitment and activation of AP-1 by Arf1. *Scientific Reports 7*: 7148.

Schaub BE, Berger B, Berger EG et Rohrer J (2006) Transition of galactosyltransferase 1 from trans-Golgi cisterna to the trans-Golgi network is signal mediated. *Molecular Biology of the Cell 17*: 5153-5162.

Scheffer IE et Liao J (2020) Deciphering the concepts behind “Epileptic encephalopathy” and “Developmental and epileptic encephalopathy”. *European Journal of Paediatric Neurology 24*: 11-14.

Scheffer IE, Zuberi S, Mefford HC, Guerrini R et McTague A (2024) Developmental and epileptic encephalopathies. *Nature Reviews Disease Primers 10*: 61.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD et Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell 75*: 495-505.

Schiefer MA et Tyler DJ (2015) Chapter 62 - Computer Models of Peripheral Nerves. Dans *Nerves and Nerve Injuries*. Tubbs RS, Rizk E, Shoja MM, Loukas M, Barbaro N et Spinner RJ, eds. Academic Press. San Diego.

Schleinitz A, Pöttgen L-A, Keren-Kaplan T, Pu J, Saftig P, Bonifacino JS, Haas A et Jeschke A (2023) Consecutive functions of small GTPases guide HOPS-mediated tethering of late endosomes and lysosomes. *Cell Reports 42*: 111969.

Schmid M, Fischer P, Engl M, Widder J, Kerschbaum-Gruber S et Slade D (2024) The interplay between autophagy and cGAS-STING signaling and its implications for cancer. *Frontiers in Immunology Volume 15 - 2024*: 1356369.

Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A et von Figura K (1995) A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell 82*: 271-278.

Schmidt MR, Maritzen T, Kukhtina V, Higman VA, Doglio L, Barak NN, Strauss H, Oschkinat H, Dotti CG et Haucke V (2009) Regulation of endosomal membrane traffic by a Gadkin/AP-1/kinesin KIF5 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences 106*: 15344-15349.

Schmidt O, Weyer Y, Baumann V, Widerin MA, Eising S, Angelova M, Schleiffer A, Kremser L, Lindner H, Peter M, et al. (2019) Endosome and Golgi associated degradation (EGAD) of membrane proteins regulates sphingolipid metabolism. *The EMBO Journal 38*: e101433.

Schmidt U, Briese S, Leicht K, Schürmann A, Joost H-G et Al-Hasani H (2006) Endocytosis of the glucose transporter GLUT8 is mediated by interaction of a dileucine motif with the β2-adaptin subunit of the AP-2 adaptor complex. *Journal of Cell Science 119*: 2321-2331.

Schoberer J, Runions J, Steinkellner H, Strasser R, Hawes C et Osterrieder A (2010) Sequential depletion and acquisition of proteins during Golgi stack disassembly and reformation. *Traffic 11*: 1429-1444.

Schoppe J, Schubert E, Apelbaum A, Yavavli E, Birkholz O, Stephanowitz H, Han Y, Perz A, Hofnagel O, Liu F, et al. (2021) Flexible open conformation of the AP-3 complex explains its role in cargo recruitment at the Golgi. *Journal of Biological Chemistry 297*: 101334.

Schrag JD, Bergeron JJM, Li Y, Borisova S, Hahn M, Thomas DY et Cygler M (2001) The structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Molecular Cell 8*: 633-644.

Scorilas A, Levesque MA, Ashworth LK et Diamandis EP (2002) Cloning, physical mapping and structural characterization of the human αA-adaptin gene. *Gene 289*: 191-199.

Scott C, Higgins ME, Davies JP et Ioannou YA (2004) Targeting of NPC1 to late endosomes involves multiple signals, including one residing within the putative Sterol-sensing domain *Journal of Biological Chemistry 279*: 48214-48223.

Seabra MC et Wasmeier C (2004) Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Current Opinion in Cell Biology 16*: 451-457.

Senecal AM, Cabana V, Bouchard AY, Cappadocia L et Lussier M (2025) RNF13 regulates the endolysosomal pathway through interaction with the small GTPase Arl8B. *bioRxiv* 2025.2007.2031.667977.

Senft D et Ronai ZA (2015) UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends in Biochemical Sciences 40*: 141-148.

Seo J et Oh DB (2022) Mannose-6-phosphate glycan for lysosomal targeting: various applications from enzyme replacement therapy to lysosome-targeting chimeras. *Animal Cells and Systems 26*: 84-91.

Settembre C, Fraldi A, Medina DL et Ballabio A (2013) Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 14*: 283-296.

Settembre C, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin S, Erdin S, Huynh T, Ferron M, Karsenty G, Vellard MC, et al. (2012) A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO Journal 31*: 1095-1108.

Shariff S, Nouh HA, Inshutiyimana S, Kachouh C, Abdelwahab MM, Nazir A, Wojtara M et Uwishema O (2024) Advances in understanding the pathogenesis of epilepsy: Unraveling the molecular mechanisms: A cross-sectional study. *Health Science Reports 7*: e1896.

She ZY, Pan MY, Tan FQ et Yang WX (2017) Minus end-directed kinesin-14 KIFC1 regulates the positioning and architecture of the Golgi apparatus. *Oncotarget 8*: 36469-36483.

Shen C-H (2019) Chapter 1 - Nucleic Acids: DNA and RNA. Dans *Diagnostic Molecular Biology*. Shen C-H, ed. Academic Press. eBook.

Shen G, Gao M, Cao Q et Li W (2022) The molecular basis of FIX Deficiency in Hemophilia B. *International Journal of Molecular Sciences 23*: 2762.

Shen Q-T, Ren X, Zhang R, Lee I-H et Hurley JH (2015) HIV-1 Nef hijacks clathrin coats by stabilizing AP-1:Arf1 polygons. *Science 350*: aac5137.

Sheng M et Kim E (2011) The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3*: a005678.

Shenkman M et Lederkremer GZ (2019) Compartmentalization and selective tagging for disposal of misfolded glycoproteins. *Trends in Biochemical Sciences 44*: 827-836.

Shepherd GM (2004) Introduction to synaptic circuits. Dans *The Synaptic Organization of the Brain*. Shepherd GM, ed. Oxford University Press. Online Edition.

Shim G et Youn YS (2024) Precise subcellular targeting approaches for organelle-related disorders. *Advanced Drug Delivery Reviews 212*: 115411.

Shrimal S, Cherepanova NA et Gilmore R (2015) Cotranslational and posttranslocational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. *Seminars in Cell & Developmental Biology 41*: 71-78.

Shvarev D, König C, Susan N, Langemeyer L, Walter S, Perz A, Fröhlich F, Ungermann C et Moeller A (2024) Structure of the endosomal CORVET tethering complex. *Nature Communications 15*: 5227.

Siepe DH, Picton LK et Garcia KC (2023) Receptor elimination by E3 ubiquitin ligase recruitment (REULR): A targeted protein degradation toolbox. *ACS Synthetic Biology 12*: 1081-1093.

Sigismund S, Lanzetti L, Scita G et Di Fiore PP (2021) Endocytosis in the context-dependent regulation of individual and collective cell properties. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 22*: 625-643.

Sigismund S, Polo S et Di Fiore PP (2004) Signaling through monoubiquitination. *Current Topics in Microbiology and Immunology 286*: 149-185.

Siletti K, Hodge R, Mossi Albiach A, Lee KW, Ding SL, Hu L, Lönnerberg P, Bakken T, Casper T, Clark M, et al. (2023) Transcriptomic diversity of cell types across the adult human brain. *Science 382*: eadd7046.

Simpson F, Peden AA, Christopoulou L et Robinson MS (1997) Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *Journal of Cell Biology 137*: 835-845.

Siwecka N, Rozpędek-Kamińska W, Wawrzynkiewicz A, Pytel D, Diehl JA et Majsterek I (2021) The structure, activation and signaling of IRE1 and its role in determining cell fate. *Biomedicines 9*: 156.

Sjöstedt E, Zhong W, Fagerberg L, Karlsson M, Mitsios N, Adori C, Oksvold P, Edfors F, Limiszewska A, Hikmet F, et al. (2020) An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science 367*: eaay5947.

Smith AN, Lovering RC, Futai M, Takeda J, Brown D et Karet FE (2003) Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H+-ATPase subunit genes. *Molecular Cell 12*: 801-803.

Soares L, Seroogy C, Skrenta H, Anandasabapathy N, Lovelace P, Chung CD, Engleman E et Fathman CG (2004) Two isoforms of otubain 1 regulate T cell anergy via GRAIL. *Nature Immunology 5*: 45-54.

Soles A, Selimovic A, Sbrocco K, Ghannoum F, Hamel K, Moncada EL, Gilliat S et Cvetanovic M (2023) Extracellular matrix regulation in physiology and in brain disease. *International Journal of Molecular Sciences 24*: 7049.

Søreng K, Munson MJ, Lamb CA, Bjørndal GT, Pankiv S, Carlsson SR, Tooze SA et Simonsen A (2018) SNX18 regulates ATG9A trafficking from recycling endosomes by recruiting Dynamin-2. *EMBO reports 19*: e44837.

Sorg BA, Berretta S, Blacktop JM, Fawcett JW, Kitagawa H, Kwok JC et Miquel M (2016) Casting a wide net: Role of perineuronal nets in neural plasticity. *The Journal of Neuroscience 36*: 11459-11468.

Spang A (2016) Membrane tethering complexes in the endosomal system. *Frontiers in Cell and Developmental Biology Volume 4 - 2016*: 35.

Specchio N et Curatolo P (2021) Developmental and epileptic encephalopathies: what we do and do not know. *Brain 144*: 32-43.

Specchio N, Wirrell EC, Scheffer IE, Nabbout R, Riney K, Samia P, Guerreiro M, Gwer S, Zuberi SM, Wilmshurst JM, et al. (2022) International league against epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset in childhood: Position paper by the ILAE task force on nosology and definitions. *Epilepsia 63*: 1398-1442.

Spratt Donald E, Walden H et Shaw Gary S (2014) RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *Biochemical Journal 458*: 421-437.

Stahlschmidt W, Robertson MJ, Robinson PJ, McCluskey A et Haucke V (2014) Clathrin terminal domain-ligand interactions regulate sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by AP-1 and GGA adaptors. *Journal of Biological Chemistry 289*: 4906-4918.

Stenmark H (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 10*: 513-525.

Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lütcke A, Gruenberg J et Zerial M (1994) Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *The EMBO Journal 13*: 1287-1296.

Storch S, Pohl S et Braulke 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*: 53625-53634.

Stuebner S, Faus-Kessler T, Fischer T, Wurst W et Prakash N (2010) Fzd3 and Fzd6 deficiency results in a severe midbrain morphogenesis defect. *Developmental Dynamics 239*: 246-260.

Stukalov A, Girault V, Grass V, Karayel O, Bergant V, Urban C, Haas DA, Huang Y, Oubraham L, Wang A, et al. (2021) Multilevel proteomics reveals host perturbations by SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Nature 594*: 246-252.

Subramanian L, Calcagnotto ME et Paredes MF (2020) Cortical malformations: Lessons in human brain development. *Frontiers in Cellular Neuroscience Volume 13 - 2019*: 576.

Südhof TC (2013) A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nature Medicine 19*: 1227-1231.

Suminaite D, Lyons DA et Livesey MR (2019) Myelinated axon physiology and regulation of neural circuit function. *Glia 67*: 2050-2062.

Sun L et Chen ZJ (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. *Current Opinion in Cell Biology 16*: 119-126.

Sun Z et Brodsky JL (2019) Protein quality control in the secretory pathway. *Journal of Cell Biology 218*: 3171-3187.

Suresh B, Lee J, Kim H et Ramakrishna S (2016) Regulation of pluripotency and differentiation by deubiquitinating enzymes. *Cell Death & Differentiation 23*: 1257-1264.

Swatek KN et Komander D (2016) Ubiquitin modifications. *Cell Research 26*: 399-422.

Sweeney HL et Holzbaur ELF (2018) Motor proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 10*: a021931.

Szul T et Sztul E (2011) COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology 26*: 348-364.

Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Ikuta A, Fukumori A, Matsumoto N, Ishizuka-Katsura Y, Nakayama T, Itoh N, Jiang J, et al. (2008) Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. *Molecular and Cellular Biology 28*: 165-176.

Tan HWS, Lu G, Dong H, Cho Y-L, Natalia A, Wang L, Chan C, Kappei D, Taneja R, Ling S-C, et al. (2022) A degradative to secretory autophagy switch mediates mitochondria clearance in the absence of the mATG8-conjugation machinery. *Nature Communications 13*: 3720.

Tanabe K, Torii T, Natsume W, Braesch-Andersen S, Watanabe T et Satake M (2005) A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis. *Molecular Biology of the Cell 16*: 1617-1628.

Tang T, Yang Z-y, Wang D, Yang X-y, Wang J, Li L, Wen Q, Gao L, Bian X-w et Yu S-c (2020) The role of lysosomes in cancer development and progression. *Cell & Bioscience 10*: 131.

Tauriello G, Waterhouse AM, Haas J, Behringer D, Bienert S, Garello T et Schwede T (2025) ModelArchive: A Deposition Database for Computational Macromolecular Structural Models. *Journal of Molecular Biology 437*: 168996.

Tavares LA, de Carvalho JV, Costa CS, Silveira RM, de Carvalho AN, Donadi EA et daSilva LLP (2020) Two functional variants of AP-1 complexes composed of either γ2 or γ1 subunits are independently required for major histocompatibility complex class I downregulation by HIV-1 Nef. *Journal of virology 94*: e02039-02019.

Tavares LA, Rodrigues RL, Santos da Costa C, Nascimento JA, Vargas de Carvalho J, Nogueira de Carvalho A, Mardones GA et daSilva LLP (2024) AP-1y2 is an adaptor protein 1 variant required for endosome-to-Golgi trafficking of the mannose-6-P receptor (CI-MPR) and ATP7B copper transporter. *Journal of Biological Chemistry 300*: 105700.

Taylor A, Kashyape PS, Jain R, El Naofal M et Tayoun AA (2023) Heterozygous gain of function variants in a critical region of RNF13 cause congenital microcephaly, epileptic encephalopathy, blindness, and failure to thrive. *American Journal of Medical Genetics Part A 191*: 2723-2727.

Teliska LH et Rasband MN (2021) Spectrins. *Current Biology 31*: R504-R506.

Testa D, Prochiantz A et Di Nardo AA (2019) Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology 89*: 125-135.

Thakur P, Stevens DR, Sheng Z-H et Rettig J (2004) Effects of PKA-mediated phosphorylation of snapin on synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience 24*: 6476-6481.

Theos AC, Tenza D, Martina JA, Hurbain I, Peden AA, Sviderskaya EV, Stewart A, Robinson MS, Bennett DC, Cutler DF, et al. (2005) Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Molecular Biology of the Cell 16*: 5356-5372.

Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M et Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal 19*: 94-102.

Tian M, Li X, Yu L, Qian J, Bai X, Yang J, Deng R, Lu C, Zhao H et Liu Y (2025) Glycosylation as an intricate post-translational modification process takes part in glycoproteins related immunity. *Cell Communication and Signaling 23*: 214.

Tian Y, Chang JC, Fan EY, Flajolet M et Greengard P (2013) Adaptor complex AP2/PICALM, through interaction with LC3, targets Alzheimer's APP-CTF for terminal degradation via autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences 110*: 17071-17076.

Tracz M et Bialek W (2021) Beyond K48 and K63: non-canonical protein ubiquitination. *Cellular & Molecular Biology Letters 26*: 1.

Tranque P, Crossin KL, Cirelli C, Edelman GM et Mauro VP (1996) Identification and characterization of a RING zinc finger gene (C-RZF) expressed in chicken embryo cells. *The Proceedings of the National Academy of Sciences 93*: 3105-3109.

Traub LM et Bonifacino JS (2013) Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 5*: a016790.

Tremel S, Ohashi Y, Morado DR, Bertram J, Perisic O, Brandt LTL, von Wrisberg M-K, Chen ZA, Maslen SL, Kovtun O, et al. (2021) Structural basis for VPS34 kinase activation by Rab1 and Rab5 on membranes. *Nature Communications 12*: 1564.

Trinh LT, Van Vu A, Shin S, Lee C, Park S-H, Cho E-B, Heo Y, Kim HJ, Kim S et Yoon J-B (2025) RNF13 mediates pH- and Ca2+-dependent regulation of lysosomal positioning. *Cell Reports 44*: 116053.

Tsao HE, Lui SN, Lo AH, Chen S, Wong HY, Wong CK, Jiang L et Wong KB (2022) Structural insights into how vacuolar sorting receptors recognize the sorting determinants of seed storage proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences 119*: e2111281119.

Tuma PL et Hubbard AL (2003) Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiological Reviews 83*: 871-932.

Udeshi ND, Svinkina T, Mertins P, Kuhn E, Mani DR, Qiao JW et Carr SA (2013) Refined preparation and use of anti-diglycine remnant (K-ε-GG) antibody enables routine quantification of 10,000s of ubiquitination sites in single proteomics experiments. *Molecular & Cellular Proteomics 12*: 825-831.

Ulferts S, Prajapati B, Grosse R et Vartiainen MK (2021) Emerging properties and functions of actin and actin filaments inside the nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 13*: a040121.

Ungermann C et Moeller A (2025) Structuring of the endolysosomal system by HOPS and CORVET tethering complexes. *Current Opinion in Cell Biology 94*: 102504.

Ünligil UM, Zhou S, Yuwaraj S, Sarkar M, Schachter H et Rini JM (2000) X-ray crystal structure of rabbit *N*-acetylglucosaminyltransferase I: catalytic mechanism and a new protein superfamily. *The EMBO Journal 19*: 5269-5280-5280.

Urata S, Kenyon E, Nayak D, Cubitt B, Kurosaki Y, Yasuda J, de la Torre JC et McGavern DB (2018) BST-2 controls T cell proliferation and exhaustion by shaping the early distribution of a persistent viral infection. *PLOS Pathogens 14*: e1007172.

Uzquiano A, Gladwyn-Ng I, Nguyen L, Reiner O, Götz M, Matsuzaki F et Francis F (2018) Cortical progenitor biology: key features mediating proliferation versus differentiation. *Journal of Neurochemistry 146*: 500-525.

Valdivia RH, Baggott D, Chuang JS et Schekman RW (2002) The yeast clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Developmental Cell 2*: 283-294.

van Bommel B, Konietzny A, Kobler O, Bär J et Mikhaylova M (2019) F-actin patches associated with glutamatergic synapses control positioning of dendritic lysosomes. *The EMBO Journal 38*: e101183.

van den Boomen DJH, Sienkiewicz A, Berlin I, Jongsma MLM, van Elsland DM, Luzio JP, Neefjes JJC et Lehner PJ (2020) A trimeric Rab7 GEF controls NPC1-dependent lysosomal cholesterol export. *Nature Communications 11*: 5559.

van der Goot AT, Pearce MMP, Leto DE, Shaler TA et Kopito RR (2018) Redundant and antagonistic roles of XTP3B and OS9 in decoding glycan and non-glycan degrons in ER-Associated Degradation. *Molecular Cell 70*: 516-530.e516.

van Dijk JR, Yamazaki Y et Palmer RH (2014) Tumour-associated mutations of PA-TM-RING ubiquitin ligases RNF167/RNF13 identify the PA domain as a determinant for endosomal localization. *Biochemical Journal 459*: 27-36.

van Huizen M et Kikkert M (2020) The role of atypical ubiquitin chains in the regulation of the antiviral innate immune response. *Frontiers in Cell and Developmental Biology 7*: 392.

van Wijk SJL, de Vries SJ, Kemmeren P, Huang A, Boelens R, Bonvin AMJJ et Timmers HTM (2009) A comprehensive framework of E2–RING E3 interactions of the human ubiquitin–proteasome system. *Molecular Systems Biology 5*: 295.

van Wijk SJL, Fricke F, Herhaus L, Gupta J, Hötte K, Pampaloni F, Grumati P, Kaulich M, Sou YS, Komatsu M, et al. (2017) Linear ubiquitination of cytosolic Salmonella Typhimurium activates NF-κB and restricts bacterial proliferation. *Nature Microbiology 2*: 17066.

van Wijk SJL, Fulda S, Dikic I et Heilemann M (2019) Visualizing ubiquitination in mammalian cells. *EMBO reports 20*: e46520.

Vang S, Helton ES, Guo Y, Burpee B, Rose E, Easter M, Bollenbecker S, Hirsch MJ, Matthews EL, Jones LI, et al. (2024) O-GlcNAc transferase regulates collagen deposition and fibrosis resolution in idiopathic pulmonary fibrosis. *Frontiers in Immunology 15*: 1387197.

Vardalaki D, Yaeger CE et Harnett MT (2025) Silent synapses in the adult brain. *Annual Review of Neuroscience 48*: 169-189.

Varki A (2009) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Online Edition.

Vasconcelos-dos-Santos A, Oliveira IA, Lucena MC, Mantuano NR, Whelan SA, Dias WB et Todeschini AR (2015) Biosynthetic machinery involved in aberrant glycosylation: Promising targets for developing of drugs against cancer. *Frontiers in Oncology 5*: 138.

Veitia RA (2023) Dominant negative variants and cotranslational assembly of macromolecular complexes. *Bioessays 45*: e2300105.

Verma S, Pantoom S, Petters J, Pandey AK, Hermann A et Lukas J (2021) A molecular genetics view on Mucopolysaccharidosis Type II. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research 788*: 108392.

Vines JH, Maib H, Buckley CM, Gueho A, Zhu Z, Soldati T, Murray DH et King JS (2023) A PI(3,5)P2 reporter reveals PIKfyve activity and dynamics on macropinosomes and phagosomes. *Journal of Cell Biology 222*: e202209077.

Vitner EB, Platt FM et Futerman AH (2010) Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *Journal of Biological Chemistry 285*: 20423-20427.

Voeltz GK, Sawyer EM, Hajnóczky G et Prinz WA (2024) Making the connection: How membrane contact sites have changed our view of organelle biology. *Cell 187*: 257-270.

Vorländer MK, Pacheco-Fiallos B et Plaschka C (2022) Structural basis of mRNA maturation: Time to put it together. *Current Opinion in Structural Biology 75*: 102431.

Waguri S, Dewitte F, Le Borgne R, Rouillé Y, Uchiyama Y, Dubremetz JF et Hoflack B (2003) Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. *Molecular Biology of the Cell 14*: 142-155.

Walter F, O'Brien A, Concannon CG, Düssmann H et Prehn JHM (2018) ER stress signaling has an activating transcription factor 6α (ATF6)-dependent "off-switch". *Journal of Biological Chemistry 293*: 18270-18284.

Wandinger-Ness A et Zerial M (2014) Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6*: a022616.

Wang D, Xu C, Yang W, Chen J, Ou Y, Guan Y, Guan J et Liu Y (2022) E3 ligase RNF167 and deubiquitinase STAMBPL1 modulate mTOR and cancer progression. *Molecular Cell 82*: 770-784.e779.

Wang D, Ye Z, Wei W, Yu J, Huang L, Zhang H et Yue J (2021) Capping protein regulates endosomal trafficking by controlling F-actin density around endocytic vesicles and recruiting RAB5 effectors. *eLife 10*: e65910.

Wang F, Song W, Brancati G et Segatori L (2011a) Inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation rescues native folding in loss of function protein misfolding diseases. *Journal of Biological Chemistry 286*: 43454-43464.

Wang H, Rogers JC et Jiang L (2011b) Plant RMR proteins: unique vacuolar sorting receptors that couple ligand sorting with membrane internalization. *The FEBS Journal 278*: 59-68.

Wang Q, Geng Y, Li X, Hao Y et Huang S (2025) The progress of cognitive dysfunction impairment caused by temporal lobe epilepsy. *Journal of Molecular Neuroscience 75*: 81.

Wang Q, Li S, Wu W, Zhou W, Yan K, Liu Z, Yan L, Zheng B, Zhang F, Jiang X, et al. (2024) RNF13 protects neurons against ischemia-reperfusion injury via stabilizing p62-mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Cell Communication and Signaling 22*: 535.

Wang S et Ma C (2022) Neuronal SNARE complex assembly guided by Munc18-1 and Munc13-1. *FEBS Open Bio 12*: 1939-1957.

Wang Y, Guo N et Nathans J (2006) The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *Journal of Neuroscience 26*: 2147-2156.

Wang Y et Seemann J (2011) Golgi biogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3*: a005330.

Wang YN, Yamaguchi H, Hsu JM et Hung MC (2010) Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene 29*: 3997-4006.

Warren RA, Green FA, Stenberg PE et Enns CA (1998) Distinct saturable pathways for the endocytosis of different tyrosine motifs. *Journal of Biological Chemistry 273*: 17056-17063.

Wayne Albers RRW (2012) Chapter 2 - cell membrane structures and functions. Dans *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*. Brady ST, Siegel GJ, Albers RW et Price DL, eds. Academic Press. New York.

Wei H, Kim SJ, Zhang Z, Tsai PC, Wisniewski KE et Mukherjee AB (2008) ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. *Human Molecular Genetics 17*: 469-477.

Wells DG (2012) mRNA translation: regulating an out of soma experience. *Curr Opin Cell Biol 24*: 554-557.

Wickner W et Schekman R (2008) Membrane fusion. *Nature Structural & Molecular Biology 15*: 658-664.

Widagdo J, Chai YJ, Ridder MC, Chau YQ, Johnson RC, Sah P, Huganir RL et Anggono V (2015) Activity-dependent ubiquitination of GluA1 and GluA2 regulates AMPA receptor intracellular sorting and degradation. *Cell reports 10*: 783-795.

Widmaier E et Strang K (2013) *Vander's Human Physiology: 13th Edition*. McGraw-Hill, Columbus, Ohio.

Wilmes S et Kümmel D (2023) Insights into the role of the membranes in Rab GTPase regulation. *Current Opinion in Cell Biology 83*: 102177.

Winckler B, Faundez V, Maday S, Cai Q, Guimas Almeida C et Zhang H (2018) The endolysosomal system and proteostasis: from development to degeneration. *The Journal of Neuroscience 38*: 9364-9374.

Witkowska A, Heinz LP, Grubmüller H et Jahn R (2021) Tight docking of membranes before fusion represents a metastable state with unique properties. *Nature Communications 12*: 3606.

Woo AM, Fleischel EJ, Patel DC et Sontheimer H (2025) Contribution of perineuronal nets to hyperexcitability in pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsia 00*: 1-16.

Woudberg R (2023) Confocal Microscopy Applications with Integrative Techniques in Cell Mechanics and Tissue Engineering. Dans *Bioimaging in tissue engineering and regeneration: Advanced microscopy and preclinical imaging*. Walter A, Slezak P, Mueller R, Kerckhofs G et Bajoghli B, eds. Springer Nature Switzerland. Cham.

Wright MH, Heal WP, Mann DJ et Tate EW (2010) Protein myristoylation in health and disease. *Journal of Chemical Biology 3*: 19-35.

Wu G et Yan S (2002) Determination of amino acid pairs sensitive to variants in human low-density lipoprotein receptor precursor by means of a random approach. *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics 6*: 401-406.

Wu S, Fan J, Tang F, Chen L, Zhang X, Xiao D et Li X (2023) The role of RIM in neurotransmitter release: promotion of synaptic vesicle docking, priming, and fusion. *Frontiers in Neuroscience Volume 17 - 2023*: 1123561.

Wu Y, Gu Y, Morphew MK, Yao J, Yeh FL, Dong M et Chapman ER (2012) All three components of the neuronal SNARE complex contribute to secretory vesicle docking. *Journal of Cell Biology 198*: 323-330.

Xu H et Zhang J (2021) On the origin of frameshift-robustness of the standard genetic code. *Molecular Biology and Evolution 38*: 4301-4309.

Xu M, Ji J, Jin D, Wu Y, Wu T, Lin R, Zhu S, Jiang F, Ji Y, Bao B, et al. (2023) The biogenesis and secretion of exosomes and multivesicular bodies (MVBs): Intercellular shuttles and implications in human diseases. *Genes & Diseases 10*: 1894-1907.

Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, Robert J, Rush J, Hochstrasser M, Finley D et Peng J (2009) Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell 137*: 133-145.

Xun J et Tan JX (2025) Lysosomal repair in health and disease. *Journal of Cellular Physiology 240*: e70044.

Yadav D, Hacisuleyman A, Dergai M, Khalifeh D, Abriata LA, Peraro MD et Fasshauer D (2024) A look beyond the QR code of SNARE proteins. *Protein Science 33*: e5158.

Yamada HY et Gorbsky GJ (2006) Tumor suppressor candidate TSSC5 is regulated by UbcH6 and a novel ubiquitin ligase RING105. *Oncogene 25*: 1330-1339.

Yamazaki Y, Palmer L, Alexandre C, Kakugawa S, Beckett K, Gaugue I, Palmer RH et Vincent JP (2016) Godzilla-dependent transcytosis promotes Wingless signalling in Drosophila wing imaginal discs. *Nature Cell Biology 18*: 451-457.

Yamazaki Y, Schönherr C, Varshney GK, Dogru M, Hallberg B et Palmer RH (2013) Goliath family E3 ligases regulate the recycling endosome pathway via VAMP3 ubiquitylation. *The EMBO journal 32*: 524-537.

Yan J, Seibenhener ML, Calderilla-Barbosa L, Diaz-Meco MT, Moscat J, Jiang J, Wooten MW et Wooten MC (2013) SQSTM1/p62 interacts with HDAC6 and regulates deacetylase activity. *PLOS One 8*: e76016.

Yan Z, Dai J, Wang J, Feng Q, Wang Y, Han T et Wu C (2023) RNF167-mediated ubiquitination of Tollip inhibits TNF-α-triggered NF-κB and MAPK activation. *The FASEB Journal 37*: e23089.

Yang L, Li Z, Liu G, Li X et Yang Z (2022a) Developmental origins of human cortical oligodendrocytes and astrocytes. *Neuroscience Bulletin 38*: 47-68.

Yang S, Park D, Manning L, Hill SE, Cao M, Xuan Z, Gonzalez I, Dong Y, Clark B, Shao L, et al. (2022b) Presynaptic autophagy is coupled to the synaptic vesicle cycle via ATG-9. *Neuron 110*: 824-840.e810.

Yang Z et Klionsky DJ (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Cell Biology 12*: 814-822.

Yap CC, Digilio L, McMahon LP, Wang T et Winckler B (2022) Dynein is required for Rab7-dependent endosome maturation, retrograde dendritic transport, and degradation. *The Journal of Neuroscience 42*: 4415.

Yap CC et Winckler B (2022) Spatial regulation of endosomes in growing dendrites. *Developmental Biology 486*: 5-14.

Yasa S, Modica G, Sauvageau E, Kaleem A, Hermey G et Lefrancois S (2020) CLN3 regulates endosomal function by modulating Rab7A-effector interactions. *Journal of Cell Science 133*: jcs234047.

Ye Y et Rape M (2009) Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 10*: 755-764.

Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O et Cahalan MD (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature 443*: 226-229.

Yoo K-S, Lee K, Oh J-Y, Lee H, Park H, Park YS et Kim HK (2019) Postsynaptic density protein 95 (PSD-95) is transported by KIF5 to dendritic regions. *Molecular Brain 12*: 97.

Yoshida T, Kawano H, Omi J, Hori T, Kobayashi Y, Saitoh N, Aoki J et Takamori S (2025) Synaptic vesicle fusion promotes phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis for efficient synaptic transmission. *Cell Reports 44*: 115634.

Yoshii SR et Mizushima N (2017) Monitoring and measuring autophagy. *International Journal of Molecular Sciences 18*: 1865.

Yuan Y, Wang W, Li H, Yu Y, Tao J, Huang S et Zeng Z (2015) Nonsense and missense mutation of mitochondrial ND6 gene promotes cell migration and invasion in human lung adenocarcinoma. *BMC Cancer 15*: 346.

Yun HJ, Park J, Ho DH, Kim H, Kim C-H, Oh H, Ga I, Seo H, Chang S, Son I, et al. (2013) LRRK2 phosphorylates Snapin and inhibits interaction of Snapin with SNAP-25. *Experimental & Molecular Medicine 45*: e36-e36.

Zaitsev AV, Amakhin DV, Dyomina AV, Zakharova MV, Ergina JL, Postnikova TY, Diespirov GP et Magazanik LG (2021) Synaptic dysfunction in epilepsy. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 57*: 542-563.

Zanetti A et Tomanin R (2024) Targeting neurological aspects of Mucopolysaccharidosis type II: Enzyme replacement therapy and beyond. *BioDrugs 38*: 639-655.

Zarzor MS, Ma Q, Almurey M, Kainz B et Budday S (2024) Exploring the role of different cell types on cortical folding in the developing human brain through computational modeling. *Scientific Reports 14*: 26103.

Zeng J, Shirihai OS et Grinstaff MW (2020) Modulating lysosomal pH: a molecular and nanoscale materials design perspective. *Journal of Life Sciences 2*: 25-37.

Zhang A, He X, Zhang L, Yang L, Woodman P et Li W (2014) Biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 subunit 1 (BLOS1) interacts with sorting nexin 2 and the endosomal sorting complex required for transport-I (ESCRT-I) component TSG101 to mediate the sorting of epidermal growth factor receptor into endosomal compartments. *Journal of Biological Chemistry 289*: 29180-29194.

Zhang D, Liu C, Li H et Jiao J (2020a) Deficiency of STING signaling in embryonic cerebral cortex leads to neurogenic abnormalities and autistic-like behaviors. *Advanced Science (Weinh) 7*: 2002117.

Zhang H, Zheng H, Zhu J, Dong Q, Wang J, Fan H, Chen Y, Zhang X, Han X, Li Q, et al. (2021a) Ubiquitin-modified proteome of SARS-CoV-2-infected host cells reveals insights into virus-host interaction and pathogenesis. *Journal of Proteome Research 20*: 2224-2239.

Zhang J, Cheng Y et Xing Q (2024) Adaptor proteins in neuronal development and neurological disorders: a comprehensive review of their roles and importance. *Journal of Bio-X Research 7*: 0003.

Zhang J, Jiang Z et Shi A (2022) Rab GTPases: The principal players in crafting the regulatory landscape of endosomal trafficking. *Computational and Structural Biotechnology Journal 20*: 4464-4472.

Zhang K, Qin X, Zhou X, Zhou J, Wen P, Chen S, Wu M, Wu Y et Zhuang J (2020b) Analysis of genes and underlying mechanisms involved in foam cells formation and atherosclerosis development. *PeerJ 8*: e10336.

Zhang K, Wang S, Gou H, Zhang J et Li C (2021b) Crosstalk between autophagy and the cGAS–STING signaling pathway in Type I Interferon production. *Frontiers in Cell and Developmental Biology Volume 9 - 2021*: 748485.

Zhang Q, Li Y, Zhang L, Yang N, Meng J, Zuo P, Zhang Y, Chen J, Wang L, Gao X, et al. (2013) E3 ubiquitin ligase RNF13 involves spatial learning and assembly of the SNARE complex. *Cellular and Molecular Life Sciences 70*: 153-165.

Zhang Q, Meng Y, Zhang L, Chen J et Zhu D (2009) RNF13: a novel RING-type ubiquitin ligase over-expressed in pancreatic cancer. *Cell Research 19*: 348-357.

Zhang Q, Wang K, Zhang Y, Meng J, Yu F, Chen Y et Zhu D (2010) The myostatin-induced E3 ubiquitin ligase RNF13 negatively regulates the proliferation of chicken myoblasts. *The FEBS Journal 277*: 466-476.

Zhang S, Hama Y et Mizushima N (2021c) The evolution of autophagy proteins – diversification in eukaryotes and potential ancestors in prokaryotes. *Journal of Cell Science 134*: jcs233742.

Zhen Y et Stenmark H (2015) Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science 128*: 3171-3176.

Zhen Y et Stenmark H (2023) Autophagosome biogenesis. *Cells 12*: 668.

Zheng L, Saunders CA, Sorensen EB, Waxmonsky NC et Conner SD (2012) Notch signaling from the endosome requires a conserved dileucine motif. *Molecular Biology of the Cell 24*: 297-307.

Zheng Q, Huang T, Zhang L, Zhou Y, Luo H, Xu H et Wang X (2016) Dysregulation of ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience 8*: 303.

Zhong Q, Xiao X, Qiu Y, Xu Z, Chen C, Chong B, Zhao X, Hai S, Li S, An Z, et al. (2023) Protein posttranslational modifications in health and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. *MedComm 4*: e261.

Zhou B, Lin W, Long Y, Yang Y, Zhang H, Wu K et Chu Q (2022) Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy 7*: 95.

Zhou J, Lin J, Leung WT et Wang L (2020) A basic understanding of mucopolysaccharidosis: Incidence, clinical features, diagnosis, and management. *Intractable & Rare Disease Research 9*: 1-9.

Zhou Y, Song H et Ming G-l (2024) Genetics of human brain development. *Nature Reviews Genetics 25*: 26-45.

Zhu J, Wu Z, Shan G, Huang Y, Liang J et Zhan C (2024a) Nuclear epidermal growth factor receptor (nEGFR) in clinical treatment. *Heliyon 10*: e40150.

Zhu M, Xu H, Jin Y, Kong X, Xu B, Liu Y et Yu H (2024b) Synaptotagmin-1 undergoes phase separation to regulate its calcium-sensitive oligomerization. *Journal of Cell Biology 223*: e202311191.

Zimmer C (2011) 100 Trillion Connections. *Scientific American 304*: 58-61.

Zizioli D, Geumann C, Kratzke M, Mishra R, Borsani G, Finazzi D, Candiello E et Schu P (2017) γ2 and γ1AP-1 complexes: Different essential functions and regulatory mechanisms in clathrin-dependent protein sorting. *European Journal of Cell Biology 96*: 356-368.