



HAL
open science

Identification et caractérisation de la protéine MOSPD2, un bâtisseur de sites de contact membranaire impliquant le réticulum endoplasmique

Thomas Di Mattia

► **To cite this version:**

Thomas Di Mattia. Identification et caractérisation de la protéine MOSPD2, un bâtisseur de sites de contact membranaire impliquant le réticulum endoplasmique. Biologie cellulaire. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ043 . tel-03920268

HAL Id: tel-03920268

<https://theses.hal.science/tel-03920268v1>

Submitted on 3 Jan 2023

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

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

Université de Strasbourg
École Doctorale Des Sciences de la Vie et de la Santé (ED414)

*Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) - Illkirch
CNRS UMR 7104 - Inserm U 1258 - Université de Strasbourg*

THÈSE

Présentée par

Thomas DI MATTIA

Soutenue publiquement le 4 septembre 2019

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Strasbourg
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé - Aspects moléculaires

*Identification et caractérisation de la protéine MOSPD2,
un bâtisseur de sites de contact membranaire
impliquant le réticulum endoplasmique*

Thèse dirigée par : Dr. Fabien ALPY (IGBMC, Illkirch)

Rapporteurs externes : Dr. Carine ROSSE (Institut Curie, Paris)
Dr. Benoit KORNMAN (Université d'Oxford, Oxford)

Examineurs : Dr. Nicolas VITALE (INCI, Strasbourg)
Dr. Sylvie FRIANT (GMGM, Strasbourg)
Dr. Daniel LEVY (Institut Curie, Paris)

À Anna & Gaetano

Remerciements

Mes trois premières années de thèse ont été financées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et ma quatrième année a bénéficié du soutien de la Fondation pour la Recherche Médicale.

Je remercie en premier lieu l'ensemble des membres de mon jury, mesdames Carine ROSSE et Sylvie FRIANT ainsi que messieurs Benoit KORNMANN, Nicolas VITALE et Daniel LEVY, d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse présentés dans ce manuscrit.

J'ai réalisé mes stages de deuxième année de master ainsi que ma thèse dans le laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire des cancers du sein, dirigé par Catherine-Laure TOMASETTO. Je vous remercie sincèrement, Catherine, de m'avoir accueilli pendant cinq années dans votre équipe ; merci de m'avoir fait confiance. Vous avez toujours été disponible et ouverte à la discussion, en dehors et pendant nos réunions d'équipe. Votre aide et tous vos conseils avisés nous servent à tous à avancer pendant ces rudes années de thèse et nous serviront encore à l'avenir. Vous rendez le travail dans votre équipe plus qu'agréable.

Fabien, tu m'as tout appris. Tu as été un guide expérimenté, attentif et sage ; je considère que c'est une grande chance d'avoir eu accès à tes enseignements et d'avoir pu avancer à tes côtés pendant ma thèse. Tu as toujours été incroyablement calme et souriant, même quand nous avons perdu pas mal de temps sur les routes espagnoles, par ma faute (ou celle du GPS ?!)... Je te remercie pour tout le temps que tu m'as consacré, tu ne m'as jamais laissé tomber et je t'en suis réellement reconnaissant. Je ressors grandi de cette aventure mouvementée qu'est la thèse, et suis impatient d'en entamer une nouvelle... Je dois tout de même dire que nos longues discussions me manqueront. Après mon départ du laboratoire, j'espère sincèrement que nos chemins se recroiseront.

Je n'oublie pas que c'est en grande partie grâce à Catherine, Fabien mais aussi Léa (ancienne étudiante brillante du laboratoire) que j'ai obtenu la bourse ministérielle et que j'en suis là aujourd'hui. Vous avez été présents et m'avez énormément aidé durant des heures d'entraînement. Un grand MERCI pour ça.

Je remercie chaleureusement tous les membres, anciens et actuels, de la team TOMASETTO qui ont accompagné ces années de thèse.

Corinne, alias CoCo, tu as toujours été fabuleusement serviable, toujours prête à nous aider. Tes conseils techniques précieux m'ont aidé à avancer plus rapidement dans mes expériences. Mais attention, tu n'es pas seulement une excellente ingénieure... Tu enseignes également très bien l'Alsacien, il faut le souligner. Et comme j'ai bien tout retenu de tes cours, je vais te remercier en alsa... Ah mais non, ça ne s'écrit pas, mince, c'est dommage...

Laetitia Voilquin, alias Voilquin, tennistgirl aguerrie... Tu es arrivée au laboratoire au même moment que moi. Toujours avec le sourire, j'ai sincèrement apprécié de t'avoir comme voisine de box... Mais je n'oublierai jamais qu'un jour tu as eu des propos déplacés sur MOSPD2... Jamais !

Amélie, alias... Amélie, un PETIT boute-en-train qui apprécie parler et jeter des papiers sur les autres. Non, sincèrement, j'ai été ravi de travailler avec toi. Toujours souriante, tu sais faire régner une atmosphère chaleureuse autour de toi. (T'as vu je ne t'ai pas oubliée).

Arthur, alias Tuture, ancien escla... mon voisin du box 3063, toujours de bonne humeur. On s'est soutenu pour pouvoir les supporter (si tu vois ce que je veux dire...).

Thien-Nga, Léa, Massimo, Bing, Nassim et tous les autres...

J'adresse également mes remerciements à nos collaborateurs, ainsi qu'aux nombreuses personnes des services communs de l'IGBMC, qui ont contribué à l'avancement de ce travail : Guillaume Drin, Yannick Schwab, Pierre, Alastair, Yves, Elvire, Erwan, Maité...

Merci aux anciens membres de la team SPB, en particulier Seb, Jérémy et Elise. Nous avons passé des soirées incroyables ensemble et j'espère que ça continuera.

Je remercie mes ami(e)s, Camille Noll (alias camillenoll tout attaché sans majuscules), madame Asselin, monsieur Dahlet, monsieur Husson (alias bubuche), messer Schmitt (seul), Maxime, Kleiby, Creugny, Téo, Loïc et Jean-Seb d'avoir partagé mon quotidien pendant ces années. Vous avez toujours été là... J'ai de la chance de vous compter parmi mes proches.

Un immense merci à mes parents, Isabelle et Gian Paolo, pour tous vos encouragements et votre soutien extrêmement précieux. Vous avez toujours cru en moi et j'ai toujours pu compter sur vous. Je ne vous remercierai jamais assez pour ça.

Merci à ma belle-famille, Véro, Stéph, Laet, Thierry, Jérémy et Guigui, de m'avoir si bien accueilli auprès de vous. Thierry, Véro, je vous remercie sincèrement de m'avoir reçu chez vous lors de TRES nombreux week-ends.

Enfin, merci à toi Charline de m'avoir épaulé pendant ces années. Malgré la distance qui nous sépare, et ce, depuis le début, tu as été patiente et tu m'as fait confiance. Plus que quelques mois et nous serons réunis pour enfin avancer à deux. Ta présence m'a été, m'est et me sera indispensable.

Abréviations principales	3
Liste des illustrations	6
Liste des publications et communications	7
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	8
Section I : Définition et caractéristiques des sites de contact membranaire	9
1. Diversité et morphologie des SCM	9
1.1 Les contacts homotypiques	10
1.2 Les contacts hétérotypiques	10
1.3 Caractéristiques de l'architecture des SCM impliquant le RE	11
2. Composition protéique des SCM	13
2.1 Les protéines d'ancrage	14
2.1.1 Identification, conservation et structure des protéines VAPs	15
2.1.2 Partenaires protéiques des protéines VAPs	17
2.1.3 Les protéines VAPs lient le RE aux autres organites	20
2.1.4 Autres fonctions cellulaires des protéines VAPs et implication dans les maladies neurodégénératives	21
2.2 Les protéines effectrices	23
2.3 Les protéines régulatrices	24
3. Les SCM sont des structures mobiles dans le cytoplasme	25
Section II : Les sites de contact membranaire impliquant le réticulum endoplasmique, aspect fonctionnel	27
1. Morphologie et fonction du RE	27
2. Les contacts entre le RE et les endosomes, Revue : Faraway, so close! Functions of Endoplasmic reticulum – Endosome contacts	29
3. Les contacts entre le RE et les mitochondries, des régions associées à de multiples fonctions	30
3.1 Métabolisme lipidique	30
3.2 Signalisation calcique	34
3.3 Fusion et fission mitochondriale	36
4. Les contacts entre le RE et l'appareil de Golgi, des lieux d'échange de lipides	39
5. Les contacts entre le RE et les GL, un moyen de réguler la biogenèse des GL	44
RESULTATS	48
Section I : MOSPD2, une protéine du réticulum endoplasmique apparentée aux protéines VAPs	49
1. Introduction	49
2. Article : Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites	50

3. Addenda de l'article	53
Section II : Etude du rôle de MOSPD2 a l'interface entre le réticulum endoplasmique et les gouttelettes lipidiques	59
1. Introduction	59
2. MOSPD2 possède une double localisation intracellulaire	59
3. MOSPD2 est localisée dans des contacts entre le RE et les GL	61
4. MOSPD2 est recrutée au niveau des contacts RE-GL de manière indépendante de sa capacité à interagir avec les motifs FFAT	66
5. Le recrutement de MOSPD2 au niveau des contacts RE-GL dépend à la fois de la présence de l'hélice amphiphile du domaine CRAL-TRIO et de l'ancrage de la protéine dans la membrane du RE	68
6. MOSPD2 est associée aux GL précoces et matures	73
DISCUSSION & PERSPECTIVES	76
Section I : MOSPD2 construit des ponts entre organites en s'associant avec les protéines à motif FFAT	77
1. MOSPD2 est une protéine énigmatique	78
2. MOSPD2 ou VAP, qui choisir ?	79
3. Quelles sont les fonctions associées à la formation des SCM impliquant MOSPD2 et les protéines à motif FFAT?	80
4. Comment MOSPD2 module-t-elle l'architecture intracellulaire ?	82
Section II : MOSPD2, une nouvelle protéine des gouttelettes lipidiques	85
1. Pourquoi MOSPD2 présente-t-elle une hétérogénéité en termes de localisation dans les cellules ?	85
2. MOSPD2, une protéine d'une nouvelle classe ?	86
3. Quelles fonctions MOSPD2 remplit-elle aux contacts RE-GL ?	87
Complément d'information sur le matériel et la méthode	90
1. Clonage et constructions	90
2. Induction de la formation des GL	91
3. Marquage des GL <i>in cellulo</i>	91
4. Imagerie sur cellules vivantes	92
5. Expériences de CLEM et STED	92
6. Proximity Ligation Assay	93
7. Expériences de « pull-down » MOSPD2 et VAP-A	93
8. Western Blot	93
9. Analyse <i>in silico</i>	94
Références bibliographiques	95

Abréviations principales

µm :	micromètre
µM :	micromolaire
6-His :	6-Histidine
ACAT :	acyl-CoA cholesterol acyltransferase
ACBD :	acyl-coenzyme A-binding domain
ACSL :	long-chain acyl-CoA synthetase
ADP :	adenosine diphosphate
ARF1 :	adp-ribosylation factor 1
ATP :	adenosine triphosphate
CAML :	calcium-modulating cyclophilin ligand
CC :	coiled-coil
CERT :	ceramide transfer protein
CLEM :	correlative light-electron microscopy
COP :	coat protein complex
C-terminal :	carboxy-terminal
DGAT :	diglyceride acyltransferase
Drp1 :	dynamain-related protein 1
Dyn :	dynamain
EGFP :	enhanced green fluorescent protein
EGFR :	epidermal growth factor receptor
EP :	endosome précoce
ERMES :	endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structures
ET :	endosome tardif
FAPP1 :	phosphatidylinositol-four-phosphate adapter protein-1
FFAT :	two phenylalanines in acidic tract
FIP200 :	FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
Fis1 :	mitochondrial fission protein 1
FRAP :	fluorescence recovery after photobleaching
FT :	facteur de transcription
FYVE :	named after Fab 1, YOTB, Vac1, and EEA1
GFP :	green fluorescent protein
GL :	gouttelette lipidique
GRP75 :	chaperone glucose-regulated protein 75
GTP :	guanosine triphosphate
HOPS :	homotypic fusion and protein sorting
IFN2 :	inverted formin 2
IP3 :	inositol trisphosphate
IP3R :	IP3 receptor
Ist2 :	increased sodium tolerance protein 2

LC3 :	microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LTP :	protéine de transport de lipides
Kda :	kilodalton
MAM :	mitochondria-associated membrane
MCU :	mitochondrial calcium uniporter
MET :	microscopie électronique à transmission
MFF :	mitochondrial fission factor
MFN :	mitofusin
mM :	millimolaire
MOSPD2 :	motile sperm domain-containing protein 2
MSP :	major sperm protein
Nir :	Pyk2 N-terminal domain-interacting receptor
nm :	nanomètre
NRZ :	NAG (neuroblastoma-amplified sequence) RINT1 (RAD50-interacting protein 1) ZW10 (centromere/kinetochore protein zw10 homolog)
NS5 :	non structural
N-terminal :	amino-terminal
OPA-1 :	optic atrophy 1
ORD :	OSBP-related ligand-binding domain
ORP :	OSBP-related protein
OSBP :	oxysterol binding protein
PC :	phosphatidylcholine
PDZD8 :	PDZ domain-containing protein 8
PE :	phosphatidyléthanolamine
PEMT :	PE-N-methyltransferase
PH :	pleckstin homology domain
PI :	phosphatidylinositol
PI(4)P :	PI-4-phosphate
PLA :	proximity ligation assay
PPAR γ :	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PSS :	PS synthase
PSD :	PS décarboxylase
PS :	phosphatidylsérine
PTP1B :	protein tyrosine phosphatase 1B
PTPIP51 :	protein tyrosine phosphatase-interacting protein 51
Rab :	Ras related protein
RE :	réticulum endoplasmique
SCM :	site de contact membranaire
Scs :	supressor of calcium sensitivity
SIF-MEB :	sonde ionique focalisée couplée à la microscopie électronique à balayage
SLA :	sclérose latérale amyotrophique

SNARE : soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
Snx : sorting nexin
SREBP : sterol regulatory element-binding protein
STARD : StAR related lipid transfer protein
STARD3NL : STARD3 N-terminal like
START : steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer
STED : stimulation emission depletion
Tcb : tricalbin
TDP-43 : TAR DNA binding protein-43
TE : tomographie électronique
TIP47 : tail-interacting protein of 47 kD
TM : transmembranaire
TRC40 : transmembrane domain recognition complex 40 kDa ATPase subunit
ULK1 : Unc-51 like autophagy activating kinase 1
VAMP : vesicle-associated membrane protein
VAP : VAMP-associated protein
VDAC : voltage-dependent anion-selective channel protein
VPS13 : vacuolar protein sorting-associated protein 13
VPS39 : vacuolar protein sorting 39
WRB : tryptophan-rich basic protein
ZFYVE : Zinc finger FYVE domain-containing protein 1

Liste des illustrations

- Figure I1 : Le RE établit des contacts avec les autres organites cellulaires
- Figure I2 : SCM observés en microscopie électronique à transmission
- Figure I3 : Paysage moléculaire des SCM
- Figure I4 : Organisation des protéines VAPs
- Figure I5 : Les protéines à motif FFAT, des partenaires protéiques majeurs des protéines VAPs
- Figure I6 : Les protéines VAPs et à motif FFAT sont impliquées dans plusieurs SCM RE-Organites
- Figure I7 : Morphologie du RE
- Figure I8 : Trafic intracellulaire des lipides : transport vésiculaire et non vésiculaire
- Figure I9 : Echange de lipides au niveau des contacts RE-Mitochondrie
- Figure I10 : Echanges calciques au niveau des contacts RE-Mitochondrie
- Figure I11 : La fission mitochondriale implique le RE
- Figure I12 : SCM entre le RE et l'appareil de Golgi
- Figure I13 : Transport de céramide au niveau des contacts RE-Golgi
- Figure I14 : Contre-échange de PI(4)P et de cholestérol au niveau des contacts RE-Golgi
- Figure I15 : SAC1 agit en *trans* pour réguler la quantité de PI(4)P dans la membrane de l'appareil de Golgi au niveau des contacts RE-Golgi.
- Figure I16 : SCM entre le RE et les GL
- Figure I17 : Biogenèse et maturation des GL impliquant la protéine Snx14.
- Figure R1 : Les domaines MSP de MOSPD2 et VAP-A interagissent avec la protéine ORP1L endogène
- Figure R2 : MOSPD2 et STARD3 forment des complexes au niveau des SCM
- Figure R3 : MOSPD2 affiche une double localisation subcellulaire
- Figure R4 : MOSPD2 colocalise partiellement avec les endosomes, les mitochondries et l'appareil de Golgi
- Figure R5 : MOSPD2 est spécifiquement enrichie autour des GL
- Figure R6 : MOSPD2 est une protéine dynamique
- Figure R7 : MOSPD2 est présente au niveau des SCM RE-GL
- Figure R8 : MOSPD2 est spécifiquement enrichie autour des GL indépendamment de sa capacité à interagir avec les motifs FFAT
- Figure R9 : L'hélice amphiphile du domaine CRAL-TRIO et l'ancrage dans la membrane du RE sont nécessaires au recrutement de MOSPD2 aux contacts RE-GL
- Figure R10 : L'ancrage de la protéine MOSPD2 dans le RE est nécessaire pour permettre son recrutement aux contacts RE-GL.
- Figure R11 : MOSPD2 est associée aux GL précoces et matures
- Figure D1 : MOSPD2 bâtit des SCM entre le RE et d'autres organites en s'associant avec les protéines à motif FFAT
- Figure D2 : MOSPD2 est une nouvelle protéine des GL

Liste des publications et communications

Publications :

Di Mattia, T., Wilhelm, L.P., Ikhlef, S., Wendling, C., Spehner, D., Nominé, Y., Giordano, F., Mathelin, C., Drin, G., Tomasetto, C., et al. (2018a). Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO Reports* e45453.

Di Mattia, T., Tomasetto, C., and Alpy, F. (2018b). A Third Musketeer on the ER: MOSPD2 is a Novel VAP-related Receptor for FFAT Motifs. *Contact* 1, 251525641880973.

Di Mattia, T., Tomasetto, C., and Alpy, F. (2019a). Faraway, so close! Functions of Endoplasmic reticulum–Endosome contacts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* (in press).

Di Mattia, T., Tomasetto, C., and Alpy, F. (2019b). MOSPD2, un connecteur inter-organites. *Med Sci (Paris)* 35, 23–25.

Voilquin, L., Lodi, M., Di Mattia, T., Chenard, M.-P., Mathelin, C., Alpy, F., and Tomasetto, C. (2019). STARD3: A Swiss Army Knife for Intracellular Cholesterol Transport. *Contact* 2, 2515256419856730.

Communication orale :

- MOSPD2, a new scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites.

Club Exo-Endo, Barcelone 2018 (prix de la meilleure présentation).

Communications par poster :

- MOSPD2, a new "VAP protein", builds sites of membrane contact between the endoplasmic reticulum and several organelles

Club Exo-Endo, Mandelieu-la-Napoule 2019.

- Identification and characterization of MOSPD2, a new ER tether

19^{ème} Journée Scientifique Régionale de la Ligue Contre le Cancer, Illkirch 2018.

- MOSPD2, a novel tether involved in the formation of ER-Organelle contacts

18^{ème} Journée Scientifique Régionale de la Ligue Contre le Cancer, Illkirch 2017.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Section I : Définition et caractéristiques des sites de contact membranaire

Les cellules eucaryotes sont compartimentées en plusieurs territoires fonctionnels appelés organites. Ces derniers sont généralement séparés de manière physique du cytoplasme par des membranes biologiques qui déterminent leur identité et intégrité. A l'intérieur de la cellule, chaque organite possède une fonction spécifique. Dans les années 1950, les premiers exemples d'interactions physiques directes entre deux organites [à savoir le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie] observés en microscopie électronique ont été publiés (Bernhard, 1956; Copeland, 1959). A cette époque, il était imaginé que ces zones de rapprochement inter-organites résultaient de « l'encombrement » du cytoplasme et étaient simplement le résultat du hasard, n'ayant aucune conséquence fonctionnelle. Ce n'est que plus tard, dans les années 1990, que l'étude des rapprochements entre organites a commencé à prendre de l'ampleur avec la mise en lumière de fonctions directement associées à ces structures. Depuis, l'idée que les organites ne flottent pas de manière indépendante dans le cytoplasme mais forment plutôt un réseau interdépendant fait de connections physiques directes associées à des fonctions spécialisées, est devenue acceptée dans le domaine de la biologie cellulaire. Ces connexions physiques sont communément appelées sites de contact membranaire ou SCM. Je décrirai au sein de cette première section les caractéristiques morphologiques et moléculaires des SCM.

1. Diversité et morphologie des SCM

Les contacts membranaires sont des structures retrouvées dans des organismes eucaryotes très divergents, à savoir les animaux, les mycètes ou encore les plantes (Levine, 2004; Pérez-Sancho et al., 2016; Phillips and Voeltz, 2015). La conservation de ces structures est un argument soutenant leur importance. Les SCM sont classiquement définis comme des structures sous-cellulaires présentes dans les cellules eucaryotes, où les membranes de deux organites sont physiquement connectées sans fusionner. A cette interface, les membranes sont séparées d'une distance le plus souvent inférieure à 30 nanomètres (nm) (Holthuis and Levine,

2005; Levine and Loewen, 2006). Un aspect essentiel des contacts membranaires est la création d'une interface unique excluant les organites n'étant pas directement engagés.

1.1 Les contacts homotypiques

Les contacts membranaires homotypiques sont définis par le rapprochement entre les membranes de deux organites de même nature. Par exemple, les lysosomes peuvent s'associer sans fusionner dans les cellules de mammifères (Caplan et al., 2001). Chez la levure, des contacts homotypiques impliquant les gouttelettes lipidiques (GL) ont été rapportés (Eisenberg-Bord et al., 2018). A ce jour, ce type de contact reste mal caractérisé. Il n'est pas exclu que tous les organites cellulaires soient capables de se connecter à leurs homologues dans le but de favoriser des échanges d'information.

1.2 Les contacts hétérotypiques

Des études réalisées chez la levure et dans des cellules de mammifères ont montré que les contacts membranaires existent entre chaque paire d'organites distincts (Gatta and Levine, 2017; Kakimoto et al., 2018; Shai et al., 2018; Valm et al., 2017). Par exemple, les peroxysomes sont capables de s'associer avec le RE, les mitochondries, la membrane plasmique, l'appareil de Golgi, les GL, les vacuoles (dans le cas des levures) ou encore avec les lysosomes (dans le cas des cellules de mammifères) (Kakimoto et al., 2018; Shai et al., 2018; Valm et al., 2017). Ces données ont permis de mettre en lumière l'existence d'une grande diversité de contacts hétérotypiques, c'est-à-dire impliquant deux organites de natures différentes.

De manière intéressante, il existe au sein de la cellule des compartiments fonctionnels non délimités par une membrane biologique, comme les corps d'inclusion (encore appelé « stress foci » ou « Q bodies »), où s'accumulent certaines protéines mal repliées (Kopito, 2000). Chez la levure, de récentes études ont rapporté la présence de contacts entre les GL (organite possédant une membrane) et les corps d'inclusions (Moldavski et al., 2015). D'après la définition classique, les SCM impliquent le rapprochement de la membrane de deux organites. Les corps d'inclusion en revanche ne possèdent pas de membrane. La proximité entre une GL et un corps d'inclusions et d'une manière générale, entre un organite possédant une membrane et un autre n'en possédant pas, ne peut être défini comme un contact membranaire au sens strict du terme. Il est probable que ces structures soient physiologiquement différentes des SCM à proprement parler.

De façon importante, bien qu'existant virtuellement entre chaque paire d'organites, les contacts hétérotypiques les mieux décrits et les plus présents impliquent le RE. Le RE est composé de tubes et de feuillettes et se distingue par sa morphologie ramifiée couvrant l'intégralité du cytoplasme. Il constitue une plateforme centrale capable de connecter tous les autres organites cellulaires, à savoir la membrane plasmique, les mitochondries, les peroxysomes, les GL, le système endosomal, l'appareil de Golgi ou encore des structures autophagiques (**Figure I1**) (Phillips and Voeltz, 2015; Valm et al., 2017; Wu et al., 2018). Etant donné la place centrale du RE, je me focaliserai spécifiquement sur la caractérisation morphologique de ses contacts membranaires avec les autres organites.

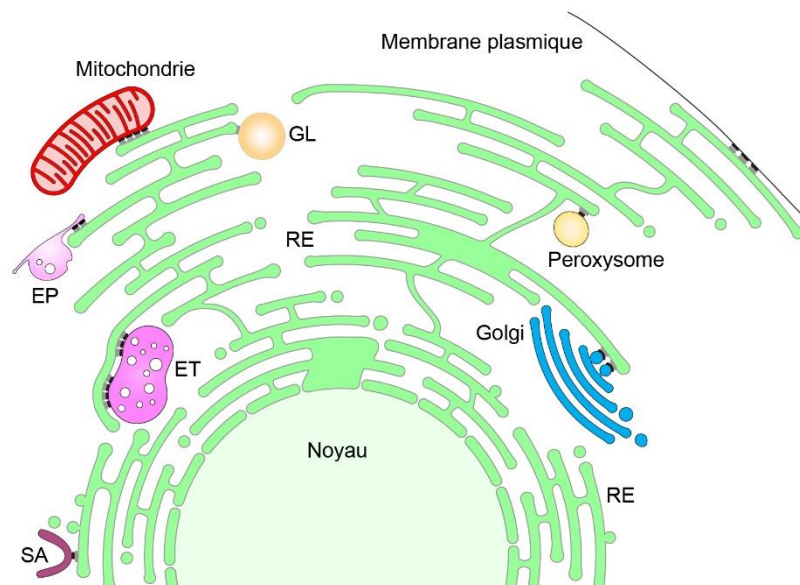


Figure I1 : Le RE établit des contacts avec les autres organites cellulaires

Le réticulum endoplasmique (RE) couvre l'intégralité du cytoplasme. Il est capable de connecter, à travers l'établissement de contacts membranaires, les autres organites cellulaires, à savoir la membrane plasmique, les mitochondries, les peroxysomes, les gouttelettes lipidiques (GL), les endosomes précoces (EP), les endosomes tardifs (ET)/lysosomes, l'appareil de Golgi et également des structures autophagiques (SA). Adaptée de Raiborg et al., 2015 (Raiborg et al., 2015).

1.3 Caractéristiques de l'architecture des SCM impliquant le RE

La microscopie électronique avec ses développements (**Encadré 1**), a permis d'identifier et de révéler les caractéristiques morphologiques des contacts membranaires.

Au sein de la cellule, la traduction des protéines peut se faire soit dans le cytoplasme ou au niveau du RE. Ainsi, morphologiquement, il existe deux types de RE : le RE lisse, sans ribosomes, et rugueux, possédant des ribosomes à sa surface. L'hétérogénéité morphologique qu'affiche le RE suppose l'existence de différents types de contacts membranaires impliquant le RE. En effet, des contacts excluant les ribosomes de la membrane du RE jouxtant la membrane de l'organite partenaire sont présents dans la cellule (Figure I2) (Alpy et al., 2013; Csordás et al., 2006; Friedman et al., 2013), de même que des contacts impliquant le RE rugueux, ces derniers n'ayant été observés qu'avec les mitochondries (Csordás et al., 2006; Giacomello and Pellegrini, 2016).

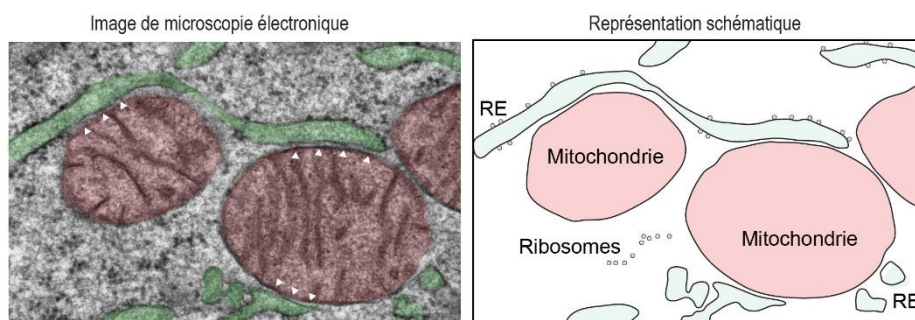


Figure I2 : SCM observés en microscopie électronique à transmission

Image de microscopie électronique montrant des SCM (localisés par les têtes de flèches) entre des tubules de réticulum endoplasmique (RE) et des mitochondries. Des fausses couleurs ont été attribuées au RE (vert) et aux mitochondries (rouge). Une représentation schématique de l'image de microscopie électronique est présentée. Sur celle-ci certains ribosomes (magenta) libres et associés au RE sont illustrés. Les ribosomes sont ici exclus de l'interface des contacts membranaires RE-Mitochondrie.

La microscopie électronique et tomographique ont permis de révéler l'étendue des SCM impliquant le RE. A titre d'exemple, dans les cellules de mammifères, le RE couvre 3 à 5% de la surface des endosomes et 5 à 15% de la surface des mitochondries (Alpy et al., 2013; Phillips and Voeltz, 2015; Stoica et al., 2014). De plus, ces techniques ont été utilisées pour calculer précisément les distances entre la membrane du RE et celle de l'organite partenaire. Des distances situées entre 3 et 15 nm ont été mesurées pour les contacts RE-Endosomes ; données sensiblement similaires pour les contacts RE-Golgi (Alpy et al., 2013; Venditti et al., 2019a). Dans le cas des contacts RE-Mitochondrie, les écarts sont variables en fonction de la présence ou non de ribosomes à l'interface du contact. La membrane du RE lisse et celle des

mitochondries peuvent être espacées de 10 à 50 nm, alors que des écarts allant jusqu'à 80 nm ont été rapportées avec le RE rugueux (Giacomello and Pellegrini, 2016; Sood et al., 2014).

Encadré 1 : Systèmes de microscopie électronique utilisés pour identifier et caractériser l'ultrastructure des SCM.

Microscopie électronique à transmission (MET) - Cette technique de microscopie est basée sur la transmission d'un faisceau d'électrons à travers un échantillon mince. Ce système de microscopie permet d'apporter des informations morphologiques avec une très haute résolution, de l'ordre du nm. La MET est considérée comme le système majeur permettant d'analyser l'architecture des contacts membranaires.

Tomographie électronique (TE) - Cette technique de microscopie est un dérivé de la MET. Elle permet de reconstruire le volume de structures cellulaires à partir d'une série d'images obtenues sous plusieurs angles. Ainsi, ce système apporte des informations à haute résolution et en trois dimensions (3D) sur l'ultrastructure des SCM. Cependant, la reconstitution complète d'un organite globulaire tel que l'endosome [d'une taille d'environ 1 micromètre (μm)] par exemple, est impossible. Ceci est dû au fait que l'épaisseur de l'échantillon est limitée à des tailles d'environ 300 nm. Ainsi, les informations 3D sur les SCM ne sont récoltées que sur un volume limité. Une alternative est de réaliser de la TE sur des coupes sériées et de reconstruire une image à partir des différentes informations issues de chacune des coupes.

Sonde ionique focalisée couplée à la microscopie électronique à balayage (SIF-MEB) - Cette technique repose sur l'utilisation d'un faisceau d'ions focalisé, généralement du galium, permettant de « décaper » la surface d'un échantillon ; la surface exposée peut être ensuite analysée par MEB. Ce cycle peut être répété plusieurs fois sur toute l'épaisseur d'une cellule par exemple, et une image en 3D peut être reconstruite. Ainsi, la technique de SIF-MEB permet d'obtenir des informations à haute résolution sur l'ultrastructure des SCM, et ce, sur le volume d'une cellule entière.

2. [Composition protéique des SCM](#)

L'identité d'un site de contact est définie par sa composition moléculaire, déterminant la fonction biologique du contact. Dans cette partie, je décrirai les différents types de protéines pouvant être retrouvées à l'interface des SCM, à savoir les protéines d'ancrage, impliquées dans la formation et le maintien des SCM, les protéines effectrices ainsi que les protéines

régulatrices (Figure I3). Je me focaliserai en priorité sur la description des protéines présentes au niveau des contacts RE-Organites dont le répertoire est le mieux décrit.

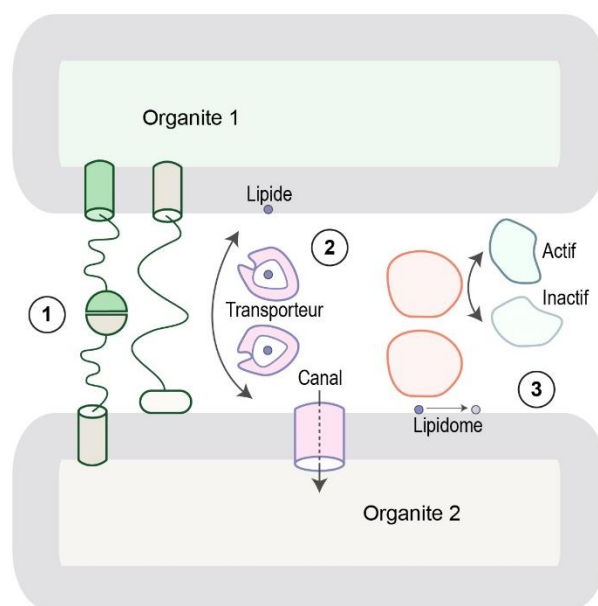


Figure I3 : Paysage moléculaire des SCM

Plusieurs types de protéines peuvent être retrouvés au niveau des SCM entre deux organites.

1. Des protéines d'ancrage capables de ponter les membranes des deux organites engagés dans le contact.
2. Des protéines effectrices, pouvant par exemple être impliquées dans le transport de lipides (transporteur) ou le transfert calcique (canal).
3. Des protéines régulatrices impliquées dans l'activation ou l'inactivation de protéines d'ancrage ou effectrices (en modulant par exemple leur état de phosphorylation), ou encore dans la régulation du lipidome du contact. Les caractéristiques de ces différentes classes de protéines seront détaillées dans la suite de cette partie introductive. Adaptée de Scorrano et al., 2019 (Scorrano et al., 2019).

2.1 Les protéines d'ancrage

La génération et le maintien de contacts entre les membranes de deux organites requiert la présence de protéines spécifiques nommées protéines d'ancrage (Eisenberg-Bord et al., 2016). Ces protéines permettent de ponter les membranes dans le but de les rapprocher tout en préservant leur intégrité. Au niveau mécanistique, les protéines d'ancrage interagissent de manière simultanée avec les deux membranes engagées dans le contact. Le plus souvent, elles sont ancrées via un domaine transmembranaire (TM) dans une des deux membranes et interagissent grâce à un domaine protéique spécifique exposé dans le cytoplasme avec un lipide ou une protéine présente sur la membrane opposée (Figure I3). Dans la grande majorité des cas, les interactions protéiques se font entre deux protéines différentes (interactions

hétérotypiques). Il existe tout de même des exemples d'interactions homotypiques entre le RE et les mitochondries, faisant intervenir par exemple les GTP (guanosine triphosphate)ase mitofusines (de Brito and Scorrano, 2008).

De manière intéressante, il est aujourd'hui admis que le maintien d'un contact donné est assuré par l'ensemble des forces exercées par plusieurs complexes d'ancrage ; c'est-à-dire qu'il existe plusieurs paires de molécules impliquées dans la fabrication et le maintien d'un contact membranaire. Les jonctions entre le RE et la membrane plasmique chez la levure illustrent cette notion. En 2012, Manford et ses collègues ont montré qu'il était nécessaire d'inhiber l'expression de six protéines d'ancrage du RE pour observer une diminution drastique des contacts RE-Membrane plasmique, sans pour autant les abolir totalement (Manford et al., 2012). Ces données suggèrent que ces protéines peuvent rapprocher les membranes du RE et de la membrane plasmique de manière indépendante les unes des autres, en d'autres termes, que la fonction d'ancrage remplie par une protéine peut être compensé par une autre. Quatre des six protéines sont des protéines du RE possédant un domaine cytoplasmique interagissant avec la membrane plasmique : la protéine Ist2 (increased sodium tolerance protein 2) liée à la famille des anoctamines (protéines retrouvées chez les mammifères), et les protéines Tcb1/2/3 (tricalbins), des orthologues des protéines synaptotagmines de mammifères. Les deux autres protéines résidentes du RE sont les protéines Scs2 et Scs22 (supressor of calcium sensitivity) orthologues des protéines VAPs (vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein) retrouvées chez les mammifères.

De manière intéressante, les protéines d'ancrage appartiennent à deux sous-catégories : celles qui sont retrouvées au niveau d'un contact donné, comme les protéines Ist2 et Tcb1/2/3 impliquées exclusivement dans la formation des contacts RE-Membrane plasmique (Giordano et al., 2013; Herdman and Moss, 2016; Manford et al., 2012; Saheki and De Camilli, 2017) et celles qui sont dans plusieurs contacts, à l'instar des protéines VAPs. En fait, une grande partie des ponts moléculaires entre le RE et les autres organites impliquent les VAPs (Murphy and Levine, 2016).

2.1.1 Identification, conservation et structure des protéines VAPs

Les VAPs sont des petites protéines hautement conservées chez les eucaryotes. Historiquement, le premier membre de la famille des VAPs, nommé VAP-33, a été isolé en 1995 comme une protéine de 33kDa associée au VAMP chez le mollusque *Aplysia californica* (Skehel

et al., 1995). Quelques années plus tard, les isoformes VAP-A et VAP-B ont été identifiées chez l'Homme (Nishimura et al., 1999; Weir et al., 1998). Au niveau structural, la caractéristique commune des VAPs est de posséder un domaine MSP (major sperm protein) amino-terminal (N-terminal) capable d'interagir avec d'autres protéines cellulaires. Comme déjà discuté précédemment, il existe deux protéines VAPs chez la levure, Scs2 et son homologue Scs22 (Nikawa et al., 1995). Chez les plantes (*Arabidopsis thaliana*), dix VAPs (VAP27-1 à 10) ont été identifiées (Wang et al., 2016b), la protéine VAP27-1 étant la mieux caractérisée (Pérez-Sancho et al., 2016; Saravanan et al., 2009).

Chez l'Homme, VAP-A et VAP-B sont exprimées de manière ubiquitaires dans différents tissus et organes (Nishimura et al., 1999). En termes de séquence primaire, ces protéines sont hautement similaires (62%). Structurellement, elles sont composées de trois domaines : 1) un domaine d'interaction protéique MSP N-terminal, 2) un domaine coiled-coil central impliqué dans la dimérisation de la protéine et 3) un domaine TM carboxy-terminal (C-terminal) également impliqué dans la dimérisation de la protéine et qui permet son ancrage dans la membrane du RE (Figure I4) (Lev et al., 2008).

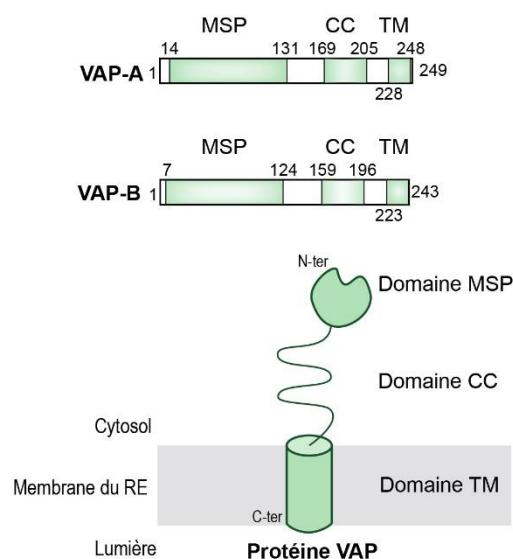


Figure I4 : Organisation des protéines VAPs

Les structures primaires ainsi qu'une représentation schématique des protéines humaines VAP-A et VAP-B sont présentées. Les VAPs comportent 3 domaines fonctionnels : un domaine d'interaction protéique MSP (major sperm protein) N-ter (amino-terminal), un domaine de dimérisation CC (coiled-coil) central ainsi qu'un domaine TM (transmembranaire) C-ter (carboxy-terminal) également impliqué dans la dimérisation de la protéine et permettant l'ancrage des VAPs dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE).

Les VAPs sont des protéines transmembranaires de type « tail-anchored » (TA) (Coy-Vergara et al., 2019). A l'inverse des protéines transmembranaires de type-I ou de type-II par exemple, les protéines VAPs ne possèdent pas de peptide signal permettant leur recrutement à la surface du RE en cours de synthèse. En fait, l'adressage des protéines TA associées au RE est différent. La traduction se fait intégralement dans le cytoplasme, une fois celle-ci achevée, le domaine TM C-terminal libre est reconnu par la protéine ATPase ASNA1 (alias TRC40, transmembrane domain recognition complex 40 kDa ATPase subunit), un composant central du complexe de reconnaissance des protéines transmembranaires ou CRT (Hegde and Keenan, 2011). Puis, le CRT transfère l'ensemble de la protéine TA à la surface du RE au niveau des récepteurs CAML (calcium-modulating cyclophilin ligand) et WRB (tryptophan-rich basic protein), étant capables de médier l'ancrage de la protéine dans la membrane du RE (Baron et al., 2014; Favaloro et al., 2010; Stefanovic and Hegde, 2007; Yamamoto and Sakisaka, 2012). Ainsi, les VAPs représentent des protéines TA résidentes du RE possédant des domaines coiled-coil et MSP faisant face au cytosol.

2.1.2 Partenaires protéiques des protéines VAPs

Chez l'Homme, les protéines VAPs possèdent de nombreux partenaires protéiques regroupés sous le nom de VAPome (Huttlin et al., 2015, 2017; Mikitova and Levine, 2012; Murphy and Levine, 2016). Comme présenté précédemment, les VAPs possèdent un domaine cytoplasmique nommé MSP, impliqué dans l'interaction avec des protéines cellulaires. Plus précisément, ce domaine est capable de reconnaître des petits motifs linéaires non structurés conservés au cours de l'évolution, nommés FFAT (two phenylalanines in acidic tract) (Loewen and Levine, 2005; Loewen et al., 2003). Initialement, ce motif a été décrit dans des protéines de transport de lipides, ainsi que dans OPI1p (overproducer of inositol protein 1), un régulateur transcriptionnel de la synthèse des phospholipides chez la levure (Loewen et al., 2003). Le motif FFAT est composé en son cœur de sept résidus dont la séquence consensus est la suivante : E¹F²F³D⁴A⁵X⁶E⁷ (E = glutamate, F = phénylalanine, D = aspartate, A = alanine, X = n'importe quel acide aminé). Ici, deux résidus aromatiques (FF) sont entourés de résidus acides (E et D). De plus, ces sept résidus sont flanqués par des séquences d'acides aminés enrichies en résidus acides, et pauvres en résidus basiques (Loewen et al., 2003). Chez l'Homme, huit protéines possèdent un motif FFAT consensus *stricto sensu* : OSBP (oxysterol binding protein), ORP3/6/7 appartenant à la famille des protéines ORP (OSBP-related protein), STARD11 (StAR related lipid

transfer protein 11, alias CERT, ceramide transfer protein), appartenant à la famille des protéines à domaine START (steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer), et Nir1/2/3 (alias PITPNM1 : membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 1), des homologues de RdgB (retinal degeneration-B), une protéine de transport des phosphoinositides chez la mouche (Figure I5 A et B) (Alpy et al., 2009; Lev, 2004; Loewen et al., 2003; Olkkonen, 2015). Dans la littérature, à l'exception d'ORP7, toutes ont été rapportées comme interagissant avec les VAPs.

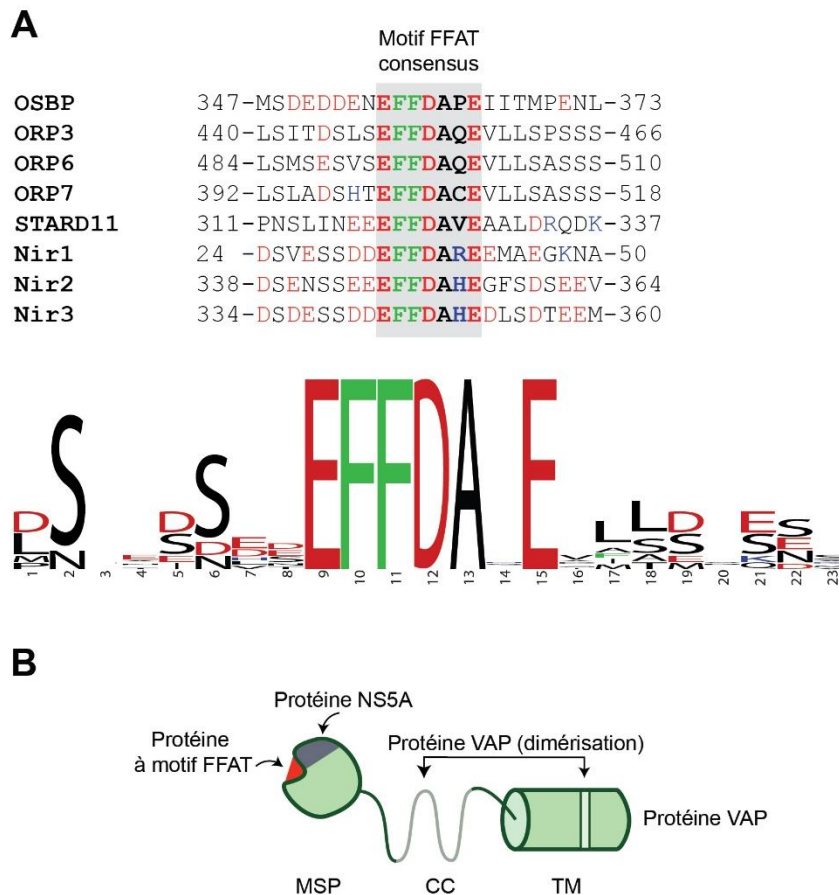


Figure I5 : Les protéines à motif FFAT, des partenaires protéiques majeurs des protéines VAPs

A. Alignement de séquences des régions comportant les motifs FFAT *stricto sensu* des huit protéines humaines à motif FFAT. Une représentation graphique de l'alignement est présentée. Chacune des positions est définie par une pile d'acides aminés. La hauteur totale de la pile indique la conservation de la séquence à cette position. La hauteur des symboles dans la pile indique la fréquence relative de chacun des résidus à cette position. Les résidus acides sont présentés en rouge, les basiques en bleu, et les aromatiques en vert. Les motifs FFAT sont flanqués de séquences riches en résidus acides. L'alignement de séquences a été généré avec ClustalW (Chenna et al., 2003) et la représentation graphique par WebLogo (Crooks et al., 2004).

B. Mise en évidence des différentes régions d'interaction des VAPs avec leurs partenaires protéiques. La région en rouge interagit avec les motifs FFAT, celle en gris avec la protéine NS5A et celles en vert clair, avec les protéines VAP (dimérisation). Les différents domaines des VAPs sont indiqués : MSP (major sperm protein), CC (coiled-coil) et TM (transmembranaire).

De manière intéressante, il a été montré que les acides aminés composant le motif FFAT peuvent être modifiés de manière individuelle et combinée. Ces modulations engendrent la génération d'un motif dégénéré, mais toujours fonctionnel. Ces motifs qui dérivent en termes de séquences des motifs FFAT *stricto sensu* sont nommés FFAT-like dans la littérature (Mikitova and Levine, 2012; Murphy and Levine, 2016). Par exemple, le résidu F² peut être remplacé par une tyrosine (Y), un autre acide aminé aromatique, ce qui est le cas dans la protéine ORP4, une protéine de transport de cholestérol ; les autres positions pouvant subir une gamme plus large de substitutions (Mikitova and Levine, 2012; Murphy and Levine, 2016). Ainsi, le fait de tolérer de telles substitutions augmente considérablement le nombre de protéines à motif FFAT, surtout si elles sont permises au niveau de deux positions ou plus. Dans le VAPome, comportant approximativement 100 protéines, les protéines à motif FFAT et FFAT-like représentent les partenaires protéiques majeurs des VAPs (Huttlin et al., 2015, 2017; Murphy and Levine, 2016).

Des études de cristallographie et de résonance magnétique nucléaire réalisées avec le domaine MSP de VAP-A et le motif FFAT des protéines de transport de cholestérol OSBP ou ORP1L ont permis de révéler les caractéristiques d'interaction MSP-FFAT (Furuita et al., 2010; Kaiser et al., 2005; Mesmin et al., 2013; Zhao and Ridgway, 2017). D'une manière générale, le motif FFAT s'étend sur une face électropositive du domaine globulaire MSP. Par cristallographie, Kaiser et ses collègues ont montré que les résidus K87 et M89 (K = lysine, M = méthionine) du domaine MSP de VAP-A forment en partie une poche hydrophobe autour de la chaîne latérale du résidu F² du motif FFAT de ORP1L (Kaiser et al., 2005). Ces résidus se sont révélés critiques dans la formation de complexes MSP-FFAT. En effet, leur substitution par des acides aspartiques (D), résidus chargés négativement, abolit l'interaction MSP-FFAT (Kaiser et al., 2005).

Bien que les protéines à motif FFAT occupent une place prépondérante dans le VAPome, d'autres protéines dénuées de ce motif peuvent se lier aux VAPs (Figure I5 B). En effet, VAP-A et VAP-B interagissent avec elles-mêmes dans la membrane du RE pour former des homodimères ou hétérodimères. Ceci implique un motif de dimérisation GxxxG (G = glycine) présent dans le domaine TM des VAPs ainsi que le domaine coiled-coil central (Hamamoto et al., 2005; Kaiser et al., 2005; Kim et al., 2010). Aussi, les protéines virales de l'Hépatite C NS (non structural) 5A et NS5B interagissent avec le domaine MSP des VAPs, au niveau de régions différentes de celles impliquées dans l'interaction avec les FFAT; interactions associées à la

réplication du génome viral de l'Hépatite C (Gao et al., 2004; Gupta and Song, 2016; Gupta et al., 2012; Paul et al., 2014).

2.1.3 Les protéines VAPs lient le RE aux autres organites

La formation des SCM est médiée par des interactions protéiques et/ou protéomembranaires (Schrader et al., 2015). De multiples ponts moléculaires entre le RE et les autres organites font intervenir les mêmes récepteurs présents à la surface du RE, les protéines VAPs. Comme nous l'avons vu précédemment, ces protéines possèdent un grand nombre de partenaires protéiques, dont la majorité possède un motif FFAT (Huttlin et al., 2015, 2017; Murphy and Levine, 2016). Ces partenaires sont distribués dans l'ensemble de la cellule et sont présents à la surface de la plupart des organites cellulaires. De nombreux contacts RE-Organites impliquant les VAPs et les protéines à motif FFAT ont été caractérisés chez l'Homme (Figure I6).

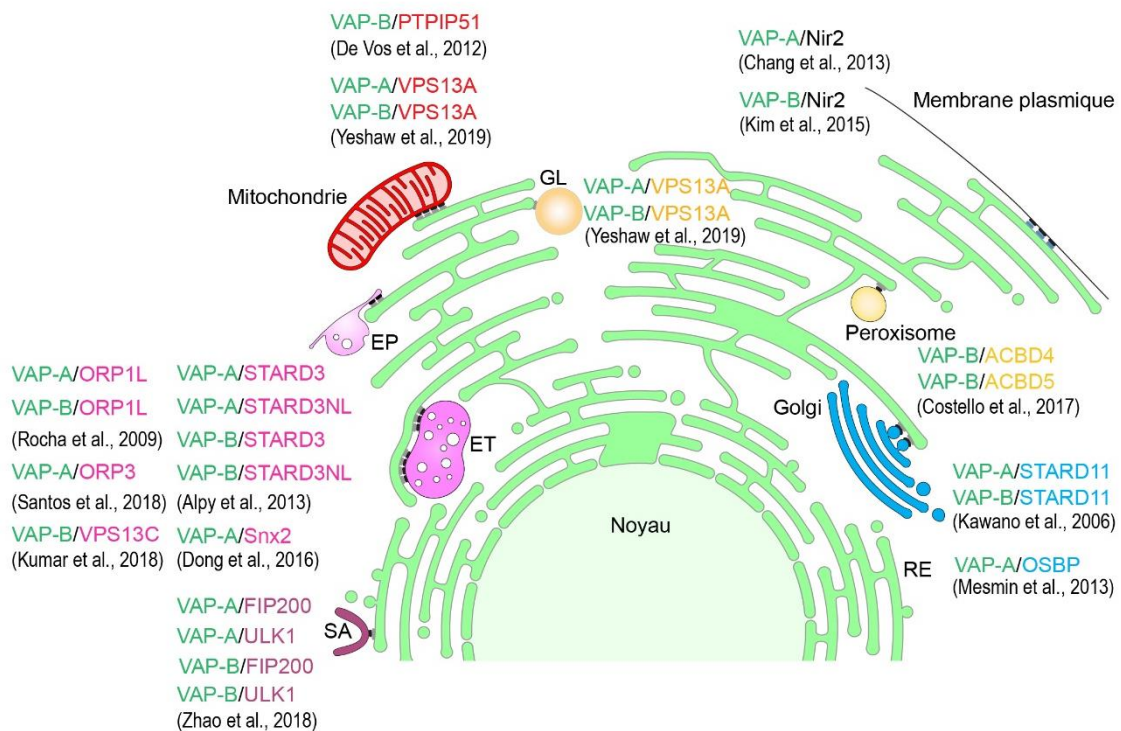


Figure I6 : Les protéines VAPs et à motif FFAT sont impliquées dans plusieurs SCM RE-Organites

VAP : VAMP-associated protein ; FIP200 : FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa ; ULK1 : Unc-51 like autophagy activating kinase 1 ; Snx2 : sorting-nexin 2 ; STARD : StAR-related lipid transfer protein ; ORP : oxysterol binding protein (OSBP)-related protein ; VPS13 : vacuolar protein sorting-associated protein 13 ; PTPIP51 : protein tyrosine phosphatase-interacting protein 51 ; Nir2 : Pyk2 N-terminal domain-interacting receptor 2 ; ACBD : acyl-coenzyme A-binding domain.

L'organisation structurale des protéines partenaires à motif FFAT explique leur habilité à connecter un autre organelle avec le RE. En effet, en plus d'interagir avec les VAPs, elles sont associées à l'autre organelle par un autre motif ou domaine. Par exemple, VAP-B interagit avec PTPIP51 (protein tyrosine phosphatase-interacting protein 51), une protéine ancrée dans la membrane des mitochondries par un domaine TM. De récentes études ont rapporté, qu'en absence de PTPIP51 ou de VAP-B, la proportion de la surface mitochondriale en contact avec le RE dans les motoneurones est diminuée de 30%, révélant l'importance de VAP-B et PTPIP51 dans l'établissement des contacts RE-Mitochondrie dans ces cellules (De Vos et al., 2012; Stoica et al., 2014). Les protéines VAPs représentent ainsi des récepteurs centraux capables d'amarrer à la surface du RE d'autres organelles décorés des protéines à motif FFAT. Des exemples fonctionnels associés à ces contacts seront donnés dans la deuxième section de ce chapitre introductif. De plus, les VAPs possèdent d'autres régions d'interaction avec d'autres protéines sans FFAT. Ainsi, il est possible que les VAPs soient capables de créer des contacts en interagissant avec des protéines dépourvues de motif FFAT. Au vu du large répertoire de protéines présentes dans le VAPome, de nouveaux contacts impliquant les VAPs vont sans aucun doute être caractérisés dans les années à venir.

De manière intrigante, à un niveau basal, les VAPs humaines sont réparties de manière homogène dans la membrane du RE. La question de savoir si ces protéines sont enrichies au niveau d'un contact donné reste toujours en suspens. A mon sens, l'implication des VAPs dans tels ou tels contacts dépend directement du type cellulaire et du contexte dans lequel les cellules se trouvent. Une étude menée par Nascimbeni et ses collègues a révélé que la formation des contacts peut être régulée par des stimuli extérieurs. Les auteurs ont montré que la densité des contacts entre le RE et la membrane plasmique est augmentée dans des cellules ayant été cultivées dans un milieu sans sérum. Bien que ces données n'impliquent pas les protéines VAPs, elles suggèrent que la formation des SCM puisse être régulée de manière dépendante du contexte cellulaire (Nascimbeni et al., 2017).

2.1.4 Autres fonctions cellulaires des protéines VAPs et implication dans les maladies neurodégénératives

Les protéines VAPs sont associées à diverses fonctions cellulaires (Lev et al., 2008). Initialement, les études de Skehel et ses collègues ont montré que l'injection d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine VAP-33 dans des neurones présynaptiques issus d'A.

californica inhibait la transmission synaptique. Ceci suggère l'implication de VAP-33 dans la libération de neurotransmetteurs (Skehel et al., 1995). De plus, des études ont montré que l'utilisation d'anticorps anti-VAP-B permet d'inhiber le transport entre des membranes golgiennes *in vitro* (Soussan et al., 1999). De manière consistante avec un potentiel rôle dans le transport vésiculaire, les VAPs ont été caractérisées comme des partenaires des protéines SNARE (soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor), des acteurs majeurs de la fusion vésiculaire (Weir et al., 1998, 2001). L'homologue de la protéine VAP-A chez la mouche a également été caractérisé, par des études d'interaction *in vitro*, comme interagissant avec les microtubules, des composants majeurs du cytosquelette ayant un rôle crucial dans le maintien et l'organisation des organites cellulaires aussi bien que dans le trafic vésiculaire (Pennetta et al., 2002). Ces résultats ont été corroborés par des études de microscopie électronique, où la protéine VAP-A de souris a été montrée comme étant associée aux microtubules (Skehel et al., 2000). De manière intéressante, plusieurs tubulines, protéines structurelles des microtubules, ont été identifiées dans le VAPome ce qui renforce le fait que les VAPs interagissent avec les microtubules (Huttlin et al., 2017). Cependant, la fonction des VAPs associées au cytosquelette n'est pas bien connue. Les études réalisées chez la mouche suggèreraient qu'elles soient requises pour l'organisation normale des microtubules (Pennetta et al., 2002). De plus, plusieurs études à la fois réalisées chez l'Homme, la levure et la mouche supportent l'implication des protéines VAPs dans le stress associé au RE (Larroquette et al., 2015; Manford et al., 2012; Moustaqim-Barrette et al., 2014).

La sclérose latérale amyotrophique (SLA), aussi connue sous le nom de maladie de Charcot, est une maladie caractérisée par la dégénérescence des motoneurones, amenant à une paralysie progressive des muscles impliqués dans la motricité volontaire. Cette maladie conduit au décès dans les 3 à 5 ans qui suivent le pronostic (en moyenne). L'incidence de la maladie en Europe est estimée à 2-3 cas pour 100 000 personnes par année. La survenue de la SLA est multifactorielle, soumise à l'influence de l'environnement et de la génétique. De nombreux gènes (~30) sont impliqués dans l'apparition et le développement de cette maladie. En termes histopathologiques, la SLA est associée à l'agrégation et l'accumulation de protéines dans des inclusions cytoplasmiques. Dans la plupart des cas, la protéine TDP-43 (TAR DNA binding protein-43) est le constituant principal de ces inclusions (Hardiman et al., 2017). La SLA8 est une forme autosomale dominante de la maladie causée par des mutations ponctuelles (P56S, T46I ; P = proline, S = serine, T = thréonine, I = isoleucine) dans le gène codant pour la

protéine VAP-B (Chen et al., 2010; Nishimura et al., 2004). Des souris knock-in exprimant une forme mutante P56S de VAP-B ont été générés et ont permis d'analyser le phénotype pathologique associé cette mutation (Larroquette et al., 2015). Dans ces souris, la protéine VAP-B mutante s'accumule dans des inclusions cytoplasmiques dans les motoneurones. Aussi, les motoneurones de ces souris affichent un stress associé au RE et une réponse autophagique accrue, et ce, avant l'apparition de signes comportementaux évidents associés à la maladie, suggérant que ces défauts cellulaires contribuent à l'initiation de la maladie (Larroquette et al., 2015). Aussi, des études menées par Stoica et ses collègues ont révélé l'existence d'un lien entre cette maladie et la formation de SCM entre le RE et les mitochondries impliquant VAP-B et PTPIP51. En effet, ils ont montré que la protéine pathologiquement associée à la maladie TDP-43 fragilise l'interaction VAP-B-PTPIP51, effet ayant pour conséquence la diminution des contacts RE-Mitochondries (Stoica et al., 2014).

2.2 Les protéines effectrices

Bien que pendant des années, les SCM étaient considérés comme des structures sans activités, il est aujourd'hui admis que ces micro-domaines sont fonctionnellement actifs. Il semble donc logique que les contacts soit localement enrichis en protéines effectrices. En effet, ces dernières constituent la seconde classe de protéines qui peuple un contact (Figure 13). De telles protéines peuvent participer au transport de lipides, à l'échange de calcium (c'est le cas des canaux et pompes ioniques) mais interviennent également dans la régulation de la signalisation cellulaire et de la dynamique des organites (Helle et al., 2013; Wu et al., 2018). Ces protéines peuvent être subdivisées en deux sous-catégories : 1) les effecteurs ne formant et/ou ne maintenant pas le contact membranaire et 2) les effecteurs également associés à une fonction d'ancrage, possédant donc les caractéristiques des protéines d'ancrage détaillées dans la partie précédente. Dans le premier cas, les protéines peuvent être recrutées au niveau d'un contact déjà établi ou en cours de génération. C'est le cas par exemple de la phosphatase PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B), qui agit dans la régulation de la signalisation de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) au niveau des contacts RE-Endosome (Eden et al., 2016). Dans le second cas, la protéine effectrice possède en plus un pouvoir d'ancrage. Ainsi, pour cette catégorie, la protéine est à la fois capable de connecter deux organites et d'exercer son rôle d'effecteur. Ces capacités sont retrouvées par exemple chez la protéine STARD3. Cette protéine est ancrée dans la membrane des endosomes tardifs par un domaine TM et interagit

avec les protéines VAPs par son motif FFAT. Ces interactions permettent de bâtir des contacts entre le RE et les endosomes tardifs. STARD3 possède un domaine additionnel de transport de cholestérol, qui lui permet d'échanger ce lipide à l'interface des contacts RE-Endosomes tardifs (Alpy et al., 2013; Wilhelm et al., 2016, 2017).

Des exemples fonctionnels reliés aux contacts RE-Organites ainsi que les protéines associées seront présentés dans la deuxième section de ce chapitre introductif.

2.3 Les protéines régulatrices

Jusqu'à présent, l'intérêt dans le domaine des SCM s'est porté largement sur la caractérisation des molécules impliquées dans la formation des contacts ainsi que dans leur fonction. Les mécanismes participant à leur régulation sont bien moins connus. Cependant, au fur et à mesure des années, des protéines régulatrices, représentant la troisième classe de protéines pouvant être retrouvées au niveau des contacts, ont été mise en lumière (Figure 13). Ces dernières peuvent être impliquées dans la formation et déformation des contacts, actions sans doute associées aux besoins de la cellule.

La phosphorylation, mécanisme par lequel une protéine kinase ajoute un groupement phosphate sur les résidus sérine, thréonine ou tyrosine des protéines, a été impliquée dans la régulation de la formation de certains SCM. Une étude menée par Hönscher et ses collègues a montré que la phosphorylation de Vps39 (vacuolar protein sorting 39), une protéine composant le complexe d'ancrage HOPS (homotypic fusion and protein sorting), régule de manière négative la formation des contacts Vacuole-Mitochondrie (Hönscher et al., 2014). Aussi, il a été montré dans les cellules humaines que la phosphorylation de la protéine associée au Golgi STARD11 permet de réguler de manière positive son interaction avec les protéines VAPs, suggérant une régulation en retour de la formation des contacts RE-Golgi (Kumagai et al., 2014). Ces données étayent l'idée que les kinases aussi bien que les phosphatases (protéines enzymatiques impliquées dans la déphosphorylation) font partie intégrante du paysage moléculaire associé à certains SCM.

Chez la levure, il a été montré que la fabrication de contacts membranaires entre le RE et les mitochondries est médiée par le complexe multi-protéique ERMES (ER-mitochondria encounter structure) (Kornmann, 2010; Kornmann et al., 2009). De manière intéressante, une étude menée par Elbaz-Alon et ses collègues en 2015 a mis en évidence Lam6, une protéine associée au complexe ERMES permettant de réguler son organisation dans les cellules (Elbaz-

Alon et al., 2015). La surexpression de Lam6 engendre une augmentation de l'étendue des contacts RE-Mitochondrie. Le mécanisme précis derrière cette régulation reste à être clarifié. Ceci apporte un nouvel exemple de protéine régulatrice associée aux contacts membranaires.

Dans l'ensemble, nous avons vu que l'interface des SCM est peuplée de différents types de protéines, pouvant être subdivisés en plusieurs classes en fonction de leur engagement dans le contact : les protéines d'ancrage, effectrices et régulatrices ; il est important de noter que certaines protéines peuvent être associées à plusieurs classes. Aussi, il a été discuté dans une revue récente de Scorrano et ses collègues, des experts dans le domaine des SCM, que l'absence de fusion entre les membranes au niveau des contacts membranaires suggère la présence de protéines maintenant un espace entre les membranes, et/ou l'absence de protéine de fusion. Bien que la présence de telles protéines au niveau des SCM n'ait pas été caractérisée en détail, ces possibilités élargissent le panel de protéines pouvant coloniser un contact (Scorrano et al., 2019). Dans cet article, les auteurs ont également discuté la présence d'autres types de protéines régulatrices permettant de définir le protéome et le lipidome des contacts. Certaines protéines spécifiquement localisées au niveau d'un SCM pourraient réguler le recrutement d'autres protéines à l'interface du contact. Par exemple, la protéine Rab32, une GTPase enrichie au niveau des contacts membranaires RE-Mitochondrie, régule l'enrichissement d'autres protéines à cette interface (Bui et al., 2010; Raturi and Simmen, 2013). Les mécanismes régulant ce type d'activité restent encore à être clarifiés. De plus, d'autres protéines peuvent entrer en jeu pour définir le lipidome des contacts. Par exemple, des phosphatases ont été rapportées comme étant localisées au niveau de certains contacts membranaires, comme la phosphatase SAC1, capable d'hydrolyser le PI(4)P (phosphatidylinositol-4-phosphate) en PI (Mesmin et al., 2013; Raiborg et al., 2016). Les caractéristiques de la protéine SAC1 seront détaillées dans la seconde section de ce chapitre introductif.

3. Les SCM sont des structures mobiles dans le cytoplasme

Le réseau tubulaire du RE est hautement dynamique dans le cytoplasme. Dans les cellules animales, la mobilité du RE est dépendante des microtubules, qui agissent comme des routes

sur lesquelles le RE se déplace, et font intervenir à la fois les protéines motrices dynéines et kinésines (Goyal and Blackstone, 2013; Woźniak et al., 2009). Les autres organites, tels que les mitochondries, les endosomes, les GL ou encore les peroxysomes sont également très dynamiques dans la cellule. Comme pour le RE, leur mobilité est directement associée aux microtubules.

De manière intéressante, il a été montré que la dépolymérisation des microtubules, induite par un traitement des cellules au nocodazole, diminue les contacts RE-Organite (Valm et al., 2017), suggérant que le cytosquelette de microtubules joue un rôle dans leur établissement et maintien. Plusieurs études d'imagerie ont montré que la stabilité des contacts entre le RE et les mitochondries, ou encore entre le RE et les endosomes, est maintenue lorsque ces organites sont en mouvement le long des microtubules (Friedman et al., 2010; Guo et al., 2018; Valm et al., 2017). Le/les mécanisme(s) permettant aux organites de voyager ensemble le long des microtubules reste(nt) encore élusif(s). Une possibilité serait que les organites utilisent les mêmes protéines motrices. Il serait également envisageable que des protéines soient capables de s'associer à un contact donné et, en parallèle, d'interagir avec les microtubules de manière directe ou indirecte. La protéine Miro, par exemple, est une GTPase enrichie au niveau des contacts RE-Mitochondrie et capable de réguler la dynamique mitochondriale (Kornmann et al., 2011; López-Doménech et al., 2018; Modi et al., 2019; Wang and Schwarz, 2009). En effet, Miro agit comme un régulateur du recrutement des protéines motrices à la surface des mitochondries (López-Doménech et al., 2018). Cette GTPase lie fonctionnellement le mouvement mitochondrial et les contacts RE-Mitochondrie. De plus, il a été montré que la dynamique de certains tubules de RE était couplée à celle des mitochondries, et ce, au niveau d'une sous-population de microtubules modifiés post-traductionnellement par des acétylations. En revanche, les contacts membranaires RE-Endosomes sont spécifiquement enrichis au niveau de microtubules non-acétylés (Friedman et al., 2010). Ces données étayent l'idée que la nature des microtubules est importante pour favoriser la rencontre ainsi que le maintien de contacts RE-Organites donnés.

Section II : Les sites de contact membranaire impliquant le réticulum endoplasmique, aspect fonctionnel

La littérature récente a montré que les organites ne flottent pas indépendamment dans le cytoplasme, mais forment un réseau interdépendant au sein duquel ils collaborent, et ce, à travers l'établissement de SCM. La faible distance entre les membranes des organites engagés dans un contact permet de créer un micro-domaine unique où le transfert d'information se fait de manière hautement efficace et rapidement régulable. La formation des SCM confère un support physique à l'échange de matériel, au positionnement et à la fission d'organites, et à la communication entre organites. Au sein de cette partie, je m'attarderai sur les caractéristiques fonctionnelles associées aux SCM impliquant le RE dans les cellules de mammifères. Plus précisément, je m'attarderai sur les contacts que j'ai étudié lors de ma thèse, à savoir les contacts entre le RE et les endosomes, les mitochondries, l'appareil de Golgi et les GL. Des exemples historiques et emblématiques seront utilisés pour illustrer les fonctions associées à ces contacts.

1. Morphologie et fonction du RE

Le RE est un organite occupant tout l'espace de la cellule. Il est composé d'une membrane et d'une lumière. Dans la cellule, le RE s'étend de l'enveloppe nucléaire à la membrane plasmique par un ensemble de feuillettes et tubules occupant une place prépondérante dans le cytoplasme. L'enveloppe nucléaire est composée de deux bicouches lipidiques, à savoir la membrane nucléaire interne et la membrane nucléaire externe. Ces deux bicouches sont séparées par un espace très restreint d'environ 50 nm et apparaissent comme empilées l'une sur l'autre par microscopie électronique. Tout de même, les membranes nucléaires internes et externes se rejoignent au niveau des pores nucléaires, fournissant une zone propice aux échanges entre les compartiments nucléaires et cytoplasmiques. Fonctionnellement, cette enveloppe entourant le noyau agit comme une barrière contrôlant de manière sélective le transport de molécules vers l'intérieur ou l'extérieur du noyau. Partant de la membrane nucléaire externe, le RE se ramifie pour former un réseau interconnecté composé de feuillettes

aplatis, principalement localisés au niveau périnucléaire et de tubules périphériques (Figure 17) (Goyal and Blackstone, 2013; Schwarz and Blower, 2016).

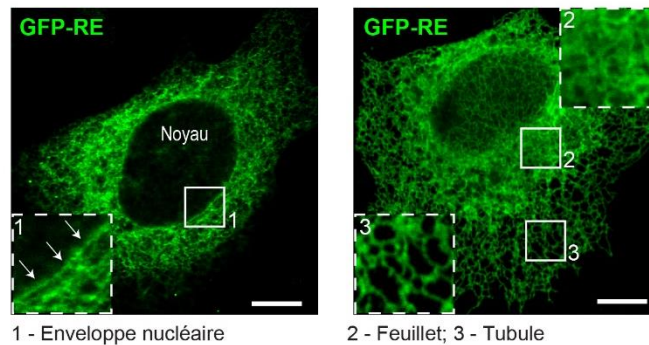


Figure 17 : Morphologie du RE

Image de microscopie confocale de cellule HeLa exprimant des protéines du réticulum endoplasmique (RE) en fusion avec la GFP ; à gauche la protéine GFP-SAC1 (image prise au milieu de la cellule) et à droite la protéine GFP-VAP-B (image prise sur un plan plus proche du substrat). Les carrés blancs (traits pleins) indiquent la position des régions agrandies (2,5 X), délimitées par des carrés blancs en pointillés. Les flèches pointent sur l'enveloppe nucléaire. Le réseau membranaire continu du RE comprend l'enveloppe nucléaire (1), des feuilletts périnucléaires (2) et des tubules périphériques (3). Barre d'échelle : 10 µm.

Les différentes structures du RE font intervenir des protéines spécifiques, incluant les réticulons, les protéines REEP (receptor expression enhancing proteins), et les protéines CLIMP-63 (alias cytoskeleton-associated protein 4) (Shibata et al., 2010; Voeltz et al., 2006). De telles protéines sont capables de générer et de stabiliser des courbures dans la membrane du RE tout en préservant sa continuité. Ces différentes morphologies associées au RE sont conservées chez les eucaryotes. Le diamètre luminal des feuilletts ainsi que des tubules sont sensiblement similaires, variant de 30 à 100 nm en fonction des organismes et des types cellulaires (Goyal and Blackstone, 2013). En plus d'arborer une hétérogénéité en termes de forme, le RE possède de multiples fonctions. Il joue un rôle clé dans la synthèse, le contrôle qualité, la modification et le trafic des protéines membranaires et sécrétées. Aussi, il constitue un lieu de biosynthèse de nombreux lipides (comme le cholestérol, les céramides mais également de multiples phospholipides) et contient la majorité du stock de calcium cellulaire. Le RE joue également un rôle dans les processus de transcription en immobilisant des facteurs de transcription (FT). Le FT SREBP (sterol regulatory element-binding protein), par exemple, est localisée dans la membrane du RE dans des conditions basales. Lorsque la quantité de cholestérol diminue dans la cellule, SREBP est clivée, activée et transloquée dans le noyau où elle favorise la transcription

de gènes exprimant des protéines impliquées dans la synthèse de stérol (Brown and Goldstein, 1997). Le RE établit également des contacts avec les autres organites ce qui a pour conséquence de réguler leur dynamique et leur fonction.

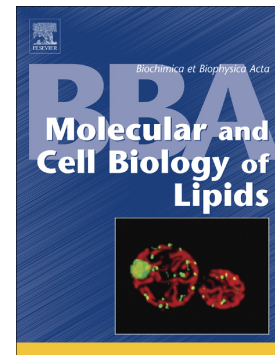
2. Les contacts entre le RE et les endosomes

Cette partie a été traitée au travers d'une revue publiée dans le journal Biochimica et Biophysica Acta (Elsevier), intitulée « Faraway, so close! Functions of Endoplasmic reticulum – Endosome contacts », présentée ci-après (Di Mattia et al., 2019a).

Accepted Manuscript

Faraway, so close! Functions of endoplasmic reticulum – Endosome contacts

Thomas Di Mattia, Catherine Tomasetto, Fabien Alpy



PII: S1388-1981(19)30119-2

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.06.016>

Reference: BBAMCB 58490

To appear in: *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*

Received date: 23 April 2019

Revised date: 18 June 2019

Accepted date: 20 June 2019

Please cite this article as: T. Di Mattia, C. Tomasetto and F. Alpy, Faraway, so close! Functions of endoplasmic reticulum – Endosome contacts, *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.06.016>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Faraway, so close!

Functions of Endoplasmic reticulum – Endosome contacts

Thomas Di Mattia¹²³⁴, Catherine Tomasetto^{1234*} and Fabien Alpy^{1234*}

1 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France

2 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1258, Illkirch, France

3 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR7104, Illkirch, France

4 Université de Strasbourg, Illkirch, France

* : correspondence to Catherine Tomasetto, IGBMC, 1 rue Laurent Fries, 67400 Illkirch, France; Tel: +33 3 88 65 34 24; Fax: +33 3 88 65 32 01; email: Catherine-Laure.Tomasetto@igbmc.fr or Fabien Alpy, IGBMC, 1 rue Laurent Fries, 67400 Illkirch, France; Tel: +33 3 88 65 35 19; Fax: +33 3 88 65 32 01; email: Fabien.Alpy@igbmc.fr

Abstract

Eukaryotic cells are partitioned into functionally distinct organelles. Long considered as independent units in the cytosol, organelles are actually in constant and direct interaction with each other, mostly through the establishment of physical connections named membrane contact sites. Membrane contact sites constitute specific active regions involved in organelle dynamics, inter-organelle exchanges and communications. The endoplasmic reticulum (ER), which spreads throughout the cytosol, forms an extensive network that has many connections with the other organelles of the cell. Ample connections between the ER and endocytic organelles are observed in many cell types, highlighting their prominent physiological roles. Even though morphologically similar - a contact is a contact -, the identity of ER-Endosome contacts is defined by their specific molecular composition, which in turn determines the function of the contact. Here, we review the molecular mechanisms of ER-Endosome contact site formation and their associated cellular functions.

Introduction

The ER and endosomes come close

Components of ER-Endosome contact sites

ER-Endosome contacts regulate endosome dynamics

ER-Endosome contacts in endosome tubulation and fission

ER-Endosome contacts in endosome positioning

Lipid transfer across ER-endosome contacts

Membrane contact sites along membrane receptor endocytic route

Calcium signaling at ER-Endosome contact sites

Endosomes too contact other organelles

Conclusion

Introduction

The cell interior is in constant exchange with the extracellular space. Endocytosis allows the displacement of material from the plasma membrane (PM) and the exterior of the cell to the inside of the cell. Endocytosis uses a complex machinery made of cytosolic proteins and a pleiomorphic membrane system composed of tubes and vesicles [1,2]. After the inward budding of a membrane vesicle from the PM, endosomes gradually mature into intermediate compartments named early endosomes (EE) and late endosomes (LE), and ultimately generate the degradative compartment named lysosome (LY) (Fig. 1). This one-way route was challenged by observations uncovering a number of alternative paths along endocytosis [3]. As such, endosomes are also sorting machines that allow either the recycling of a subset of membrane receptors towards the cell surface, or the targeting of others towards lysosomes for degradation (Fig. 1). Furthermore, endosomes mediate the retrograde transport of proteins to the Golgi, or the release of inner luminal vesicles (ILVs) after fusion with the PM, the so-called exosomes [4–6]. In the last decade, new insights have explained how the variety of events occurring within the endocytic compartment can be integrated with the rest of the cell. Indeed, it was shown that endosomes physically contact other cellular organelles and that these contacts in turn regulate the endocytic machinery [7–9]. As endosomes contact more predominantly the endoplasmic reticulum (ER), in this review, we will discuss the mode of formation and the different functions that were described for ER-Endosome contacts (Fig. 1).

The ER and endosomes come close

The endolysosomal network is made of membrane-bound organelles functionally interconnected. The physical barrier created by membranes around organelles is crucial to create favorable environments allowing specific metabolic activities, and to give each compartment its identity [1,2,10,11]. In accordance with this idea, organelles were for a long time considered as independent entities, being more or less permeable to cytosolic compounds, and/or being linked to the rest of the cell through vesicular trafficking. Interestingly, early observations in yeast showed that two organelles, the nuclear envelope which is composed of ER sheets, and the vacuole, the organelle equivalent to the lysosome, were physically associated [12]. This structure called the nucleus–vacuole junction was later functionally characterized and shown to be generated, at least in part, by the interaction between two proteins from the ER (Nvj1p) and the vacuole (Vac8) [13,14]. In mammalian cells, the identification of contacts between endosomes and the ER is more recent. The first clues that physical contacts occurred between an endocytic compartment and the ER came from time-lapse observations of live cells expressing the Niemann Pick C1 (NPC1) protein fused to a fluorescent protein. These data showed that NPC1-positive LE move in association with ER tubes [15]. Later, electron microscopy observations of a specific form of endocytosis named phagocytosis, during which a specialized cell of the immune system engulfs a large foreign particle such as a pathogen, led to the description of a physical association between this endocytic compartment and the ER [16]. The role of these phagosome-ER contacts was thoroughly discussed in a recent review [17].

Besides these observations, a general definition of inter-organelle contacts was later given. Inter-organelle contacts, or membrane contact sites, are defined as subcellular regions where the membranes of distinct organelles come into close apposition, with the two heterologous membranes being separated by less than 30 nm [18,19]. At the molecular level, the building of contacts requires protein-protein and/or protein-membrane interactions. Electron and fluorescent microscopy studies showed that endosomes and the ER form extended contacts [20–23] along the endocytic pathway (Fig. 2A). Intriguingly, during their maturation from early to LEs/LYs, the association with the ER becomes more and more pronounced, ranging from around 60-80% of EE being associated to the ER,

to around 90% of LEs/LYs in contact with the ER in Cos-7 cells [22,24]. Of note, in resting cells, around 3-5 % of the surface of the endocytic machinery is in direct contact with the ER [20,22,25]. As a matter of comparison, the surface of mitochondria in contact with the ER is slightly higher, ranging from 5 to 15% [25–29]. At the region of contact, the ER and endosome membranes can be separated by less than 10 nm [25], and ribosomes are excluded from the ER membrane touching the endosome membrane, while the other side of the ER can be either covered with ribosomes or naked [22,25]. This suggests that ribosomes are excluded from the contact area because of the tight association of the membranes of the two organelles created by protein complexes functioning in these contacts.

Thus, ER-Endosome contacts appear to be general structures of the cell. However, the extent of the organelle surface involved in contacts, and the very nature of these contacts (i.e. the proteins/lipids present in the contact) most likely vary according to the cell type, and their physiological state.

Components of ER-Endosome contact sites

The establishment and the support of contacts between the membranes of two organelles require the presence of scaffold proteins defined as tethers [30]. A tether can be a protein or a complex made of two or more proteins (tethering complex) bridging two membranes, and enabling contact maintenance. Three major receptors present on the surface of the ER act as molecular hooks by interacting promiscuously with proteins at the surface of other organelles. These proteins named vesicle-associated membrane protein-associated proteins (VAP) A and B, and motile sperm domain-containing protein 2 (MOSPD2), belong to the major sperm protein (MSP) domain-containing family (Table I) [26,31,32]. VAP-A, VAP-B and MOSPD2 are anchored in the ER membrane by a carboxyl-terminal transmembrane domain, and their cytoplasmic MSP domain is able to interact with proteins that possess a small linear motif named two phenylalanines (FF) in an acidic tract (AT) (FFAT) (Table I) [31,33,34]. Through these interactions, VAP-A/B/MOSPD2 and their organelle-bound FFAT-containing partners assemble into tethering complexes allowing the building of contact sites. Actually, a number of distinct proteins having a FFAT motif are at the surface of endosomes and allow the formation of contact sites with the ER (Table I).

Most of the different tethering complexes present in ER-Endosome contacts involve VAP-A, VAP-B and MOSPD2 (Table I and II). The other tethering complexes consist of an ER-associated protein interacting with an endosomal protein or lipid. For instance, the ER-associated S100-A11 protein interacts with its endosomal protein partner Annexin A1 in a calcium-dependent manner (Table II) [35]. Furthermore, lipids and lipid-binding proteins can be part of organelle tethering complexes. For example, Protrudin, an ER-anchored protein, binds to phosphatidylinositol 3-phosphate [PI(3)P] at the surface of endosomes to form an ER-Endosome contact (Table II) [36].

Even if all ER-Endosome contacts look quite similar, each tethering complex has its own mode of formation and function (Table I and II). The current knowledge on the roles and makeup of the different tethering complexes involved in ER-Endosome contacts will be described throughout this review.

ER-Endosome contacts regulate endosome dynamics

Endo/lysosomes are highly motile organelles which traffic between the cell center and periphery. These long range movements are mediated by molecular motors attached to the organelle by specific adaptor proteins, and sliding along microtubules (Fig. 1). Microtubules are polarized polymers of tubulin, and most motors from the kinesin family drive organelle transport towards the microtubule plus-end, while motors from the dynein family drive transport in the opposite direction

[37,38]. Thus, one aspect of the dynamics of endolysosomal structures lies in their regulated movements within the cytosol. Another aspect comes from the mosaic morphology of endolysosomal organelles, ranging from large round vesicles to thin elongated tubules. Intriguingly, endosome positioning and tubulation are both controlled by the ER, and involve ER-Endosome contacts. In this section, we will describe the involvement of the ER in endosome positioning, and then in endosome tubulation and fission.

ER-Endosome contacts in endosome positioning

Endosomes come in multiple shapes from large vesicles to thin extended tubules which both move dynamically inside the cytosol. These movements are regulated by the recruitment of adaptor proteins which link endosomes and microtubule motors. Interestingly, adaptor proteins recruitment onto endosomes was shown to be controlled in part by ER-Endosome contacts.

Cholesterol is the major non-polar lipid of mammalian biological membranes [39]. Cholesterol content and transport in the endosomal system is linked to LEs/LYs trafficking, as illustrated by the NPC disease [40]. NPC is an autosomal recessive neurodegenerative disorder associated with mutations in NPC1 and NPC2 genes. NPC1 and NPC2 mutations result in cholesterol accumulation in LEs/LYs which is linked to the blockage of these organelles at the microtubule minus-end, in the perinuclear region [15,41,42]. One mechanism regulating the recruitment of motor proteins on endosomes relies on the sensing of cholesterol levels at their limiting membrane by the oxysterol binding protein (OSBP)-related protein 1L (ORP1L). This protein belongs to the OSBP family, a family composed of twelve lipid transport protein (LTP) genes in mammals [43]. LTPs are involved in the monomeric transport of lipid molecules between membranes. ORP1L is one of the two major isoforms produced from the OSBPL1A gene, together with ORP1S [44]. ORP1L possesses three amino-terminal ankyrin repeats (AR), a pleckstrin homology (PH) domain, an FFAT motif, and a carboxyl-terminal OSBP-related ligand-binding domain (ORD) (Tables I and II) [45]. This protein organization explains the ability of ORP1L to connect two distinct organelles. Indeed, ORP1L can associate with the ER thanks to its FFAT motif which interacts with VAPs and MOSPD2, and with LEs/LYs by interacting with the active form of the guanosine triphosphate (GTP)ase Rab7, thanks to its AR [23,26,46]. Comparatively, ORP1S is a cytosolic protein lacking the AR and PH domains, as well as the FFAT motif. Thus, unlike ORP1L, ORP1S is not involved in ER-Endosome tethering. In 2005, Olkkonen and collaborators showed that the overexpression of ORP1L induces the perinuclear clustering of LEs/LYs [46]. A model based on cholesterol-dependent protein conformational changes was later proposed to explain the molecular mechanism of endosome positioning controlled by ORP1L. ORP1L possesses two alternative conformations [23]: i) under high endosomal cholesterol levels, ORP1L harbors a closed conformation compatible with the recruitment of the molecular motor dynein onto endosomes, thereby favoring minus end microtubule transport; this recruitment involves a complex composed of the small GTPase Rab7, the Rab-interacting lysosomal protein (RILP), and dynactin; ii) alternatively, under low endosomal cholesterol levels, ORP1L is in an open conformation freeing its FFAT motif, and thus allowing its interaction with VAP-A. ORP1L-VAP-A interaction promotes ER-Endosome contact formation, and impedes minus end transport [23]. Along the same line, ORP1L has been shown to localize to late autophagosomes, controlling their transport and fusion with the endocytic pathway [47]. Accordingly, in ORP1L-depleted cells, a lower fraction of structures positive for the autophagic marker microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3) is found at the cell periphery. Moreover, the expression of an ORD-depleted form of ORP1L increases the percentage of scattered autophagosomes. This phenotype is linked to the increased association of this ORP1L mutant with VAP-A, which induces ER-autophagosome contact formation. In this context, ORP1L in contact with the ER prevents both the fusion of autophagosomes with LEs, and their minus end transport [47].

The transport of LEs/LYs towards the periphery of the cells is also controlled by ER-Endosome contacts. Protrudin is a transmembrane protein localized in the ER membrane. Structurally, this protein is composed of several regions including a FFAT motif, a low complexity region (LCR) and a FYVE [named after Fab 1, YOTB, Vac1, and EEA1] domain. The LCR and FYVE domains are able to bind the endosomal protein Rab7 and the endosomal lipid PI(3)P, respectively (Table II) [36,48]. As a result, since Protrudin is at the same time anchored to the ER membrane and able to interact with endosomes, this protein allows the building of ER-Endosome contacts [36]. Surprisingly, Protrudin expression also causes LE accumulation at the periphery of the cell in a FYVE and coiled-coil domain containing 1 (FYCO1)-dependent manner. FYCO1 is another Rab7/PI(3)P-interacting protein found in the same complex as Protrudin. Furthermore, FYCO1 and Protrudin are both kinesin interacting proteins. Hence, it has been proposed that, at the site of Protrudin-mediated ER-Endosome contacts, Protrudin promotes the loading of the motor protein kinesin on FYCO1, which in turn mediates LE plus end transport. At the end of their journey, LEs fuse with the PM in a synaptotagmin-7 (SYT7)-dependent manner and promote outgrowth of protrusions and neurites [36]. Intriguingly, Protrudin also contains an FFAT motif that allows its interaction with VAP-A inside the membrane of the ER [34,49]. Functionally, this interaction is required to promote Protrudin-mediated neurite extension [49]. However, the role played by Protrudin/VAP-A association in LE translocation towards the PM remains elusive. Furthermore, in a more general context, the meaning of the interaction of VAP proteins with other ER proteins via an FFAT motif remains to be characterized. It is tempting to speculate that such interactions could be involved in ER-ER contacts, and therefore in ER dynamics.

The positioning of LEs/LYs is influenced by nutrient availability. Starvation induces the relocation of LEs/LYs in the perinuclear region, while nutrient abundance causes LEs/LYs dispersion [50]. This regulated positioning of LEs/LYs coordinates the cellular nutrient response, and in particular the activation of the major metabolism regulator mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1 (mTORC1). In response to serum and amino acid starvation, mTORC1 signaling is turned off and the retrograde transport of LEs/LYs mediated by the dynein-dynactin motor and microtubules is activated, which leads to the perinuclear accumulation of LEs/LYs [51]. Conversely, when nutrients and growth factors are present, anterograde transport of LEs/LYs is promoted and mTORC1 activated. In this later condition, ER-Endosome contacts involving Protrudin favor the plus end transport of mTORC1 bearing endosomal vesicles towards the cell periphery [52]. Amino acids activate PI(3)P production on LEs/LYs, which is mediated by the class III phosphatidylinositol 3-kinase VPS34/PIK3C3, and thus allow the recruitment of Protrudin and the formation of contact sites with the ER. Similarly to the mechanism described above, Protrudin then promotes the loading of Kinesin on FYCO1, which in turn mediates LE plus end transport [52]. This transport of mTORC1-positive LEs/LYs to the cell periphery is crucial for mTORC1 activation. Indeed, in cells silenced for Protrudin or FYCO1, mTORC1 activation is reduced, which suggests that mTORC1 needs to be brought in the vicinity of the PM to be properly activated by the growth factor signaling cascades. Conversely, in starved condition, the inactivation of mTORC1 signaling is accompanied by the induction of autophagy, which fuels the cellular metabolism [50]. LEs/LYs are both transported towards the center of the cell, and actively retained in this area of the cell.

Endosome motility varies according to their position in the cell: perinuclear endosomes are mostly static, while peripheral endosomes are highly mobile [53–55]. A recent study has demonstrated that the ubiquitin ligase RING finger protein 26 (RNF26; Table II) controls the spatiotemporal organization of endosomes by trapping them onto the perinuclear ER [54]. Accordingly, in cells devoid of RNF26, both early endosomes and LEs/LYs become more peripherally localized. RNF26 is an ER-anchored protein localized predominantly in the perinuclear ER where it interacts and ubiquitinates its substrate the sequestosome 1 (SQSTM1) protein, also known as ubiquitin-binding protein p62 (Table II) [54]. In turn, ubiquitinated SQSTM1 recruits several ubiquitin-binding domain (UBD)-containing

proteins associated with endocytic organelles, such as the EE protein epidermal growth factor receptor substrate 15 (EPS15; Table II), and the LE protein Toll interacting protein (TOLLIP; Table II). These molecular assemblies, by bridging the ER and endosomes, restrain endosomes in the perinuclear region. The release of endosomes from the ER, which favors their anterograde transport, is mediated by the de-ubiquitination of SQSTM1 by the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15 (USP15).

ER-Endosome contacts in endosome tubulation and fission

A startling function of ER-organelle contacts was discovered by Voeltz and collaborators in the mitochondria. They showed that ER tubules come in contact with mitochondria and mark the site where organelle fission occurs afterwards [56]. The same laboratory later showed that endosome fission also occurs at sites of ER contact [57].

During its journey, the endocytosed cargo is sorted along the endocytic compartment. Cargo segregation depends on its destination, the PM, the Golgi, or LYs which correspond to recycling, retrograde, and degradation routes, respectively. Besides, this mechanism is accompanied by the segregation of Rab GTPases into distinct domains in the endosomes [5,11,58]. The recycling and retrograde transport routes involve endosomal tubulation, a mechanism which requires the actin and microtubule cytoskeletons, and their regulatory components, i.e microtubule motor proteins, Wiskott-Aldrich syndrome protein and scar homolog (WASH)-mediated branched actin network, retromer and sorting nexins (SNXs) [58,59] (Fig. 1 and 3).

Intriguingly, the ER is directly involved in these endosomal membrane dynamics (Fig. 3). Indeed, ER tubules are recruited to tubulating early and late endosomes, and fission takes place at the site of contact marked by the retromer-associated protein FAM21 [57]. A direct physical link between the ER and the retromer complex ensues from the interaction between the ER resident VAP proteins and the retromer complex component SNX2 (Table I) [60]. Retromer is a multiprotein complex which controls cargo sorting and mediates endosome tubulation; this complex was primarily involved in endosome to Golgi transport of cargos such as the cation-independent mannose-6-phosphate receptor (CI-MPR), a protein which shuttles from the Golgi to endosomes to transport acid hydrolases [61].

In order to better visualize the relationship between ER tubes and endosome fission, Rowland et al. generated elongated endosomes by inhibiting the fission machinery, either by treating the cells with the dynamin inhibitor dynasore, or by depleting Dynamin-2 (Dyn2). They observed that more than 80% and 100% of EE and LE fission sites were crossed by ER tubules, respectively. Thus, the authors proposed a model in which endosomal fission is regulated in time and space by ER contact sites [57]. More recently, proteins acting as tethers at ER-mediated endosome fission sites were identified [62]. By using a proximity-based labelling strategy, the authors uncovered the presence of the ER-resident protein Transmembrane and Coiled-Coil domains protein 1 (TMCC1) (Table II) at the level of FAM21-positive endosome fission sites. TMCC1 specifically drives the ER to the budding region where the endosomal protein Coronin 1C (CORO1C) is present (Fig. 3; Table II). Depletion of CORO1C or TMCC1 prevents the recruitment of the ER to the endosome bud, and consequently decreases bud fission. This loss of function strategy showed that TMCC1-CORO1C association mediates the formation of ER-Endosome contacts involved in endosomes fission [62]. Interestingly, depletion of TMCC1 or CORO1C does not completely suppress endosome tube fission, suggesting that other unidentified complexes involved in this process exist. Furthermore, because budding/fission events are associated with membrane elongation and curvature, which need lipids to build up the membrane, it is tempting to speculate that LTPs could be recruited at ER-Endosome tube contacts, to provide membrane lipids to the endosome in order to favor membrane expansion in the growing tube.

At the point of contact with the ER, endosome tubules are constricted, and then they undergo fission [57,62]. In mitochondria, ER-associated constriction sites are marked by mitochondrial fission factors mediating the recruitment of the fission machinery, namely the dynamin-related protein 1 GTPase (Drp-1), and later in the process Dyn2 [56,63,64]. At the level of endosomes, the fission machinery is not completely identified. One promising complex candidate, localized at ER-Endosome contacts, is composed of Spastin (a microtubule-severing ATPase), and IST1 (an endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)-III-associated protein) (Table II) [65]. At the subcellular level, Spastin associates with the ER by interacting with several ER-shaping proteins from the receptor expression-enhancing protein (REEP), reticulon, and atlastin families [66]. In cells lacking Spastin, the life-time of endosome tubules is increased concomitantly with the number of ER-Endosome contacts, showing that Spastin is needed to promote endosome tube fission, but not for the formation of ER-Endosome contacts [65,67]. The same phenotype is observed in mouse embryonic fibroblasts expressing an ATPase-defective Spastin, supporting the idea that Spastin-mediated endosomal fission requires a functional ATPase activity. Furthermore, depletion of the Spastin-binding partner IST1 is also associated with an increased tubulation life-time, from less than 10 seconds (s) in control cells to around 15 s in IST1-depleted cells. Moreover, the re-expression in IST1-depleted cells of a mutant IST1 protein unable to interact with Spastin failed to rescue the normal life-time of endosome tubules, indicating that Spastin-IST1 interaction is necessary for efficient endosomal fission at ER contacts [65]. Whether the Spastin-IST1 complex works in synergy with the TMCC1-CORO1C tethering complex at ER-Endosome contacts remains an open question.

Interestingly, Spastin (also known as spastic gait 4 - SPG4) is mutated in hereditary spastic paraplegia (HSP) disease, a condition characterized by axon degeneration [68]. Fibroblasts from Spastin-HSP patients display lysosomal abnormalities, namely an increased proportion of enlarged lysosomes with altered morphology. These phenotypes are also observed in cells lacking other HSP-associated proteins, strumpellin and REEP1 [65]. These data directly link defects of ER-dependent endosomal fission and axonopathy [65].

Lipid transfer across ER-Endosome contacts

In eukaryotic cells, lipids are unevenly distributed between organelles [39]. For instance, cholesterol is highly present in the PM, intermediately in endosomes, and is only scarce in the ER. This characteristic distribution of lipids is caused by selective and directional lipid movements. Since lipids are highly insoluble in water, their transport in between organelles occurs by vesicular or non-vesicular pathways. Non-vesicular transport usually involves LTPs [69–71]. Structural and biochemical analyses have shown that most LTPs contain a hydrophobic lipid-binding tunnel which accommodates one lipid molecule. The mode of action of LTPs requires the protein to take one lipid molecule from the outer leaflet of a donor membrane, to travel across the hydrophilic environment in between the two membranes (for instance the cytosol), and to deliver its cargo to the outer leaflet of an acceptor membrane [18,71]. Thus, LTPs can be considered as devices equilibrating lipid concentration between membranes. Several associated mechanisms explain how such a simple function ensures a selective and directional transport of lipids. For instance, each LTP usually binds one, or a restricted number of lipid species, which accounts for specificity [69]. Directional transport is mostly achieved through lipid trapping, and heterotypic lipid exchange [70]. For instance, lipid trapping in the acceptor compartment can be mediated by the enzymatic conversion of this lipid into another lipid species, preventing its transport in the opposite direction, and thus allowing a unidirectional transport. This mechanism can be exemplified with ceramide transfer from the ER to the trans-Golgi, which is carried out by the LTP StAR related lipid transfer domain-11 (STARD11); indeed, once in the trans-Golgi, ceramide is converted into sphingomyelin [72]. The heterotypic

exchange of lipids consists in the transfer of two different lipid species (lipid A and B) by an LTP; the trapping of lipid A fuels the counterflow transport of lipid B [73]. For instance, the OSBP-related protein Osh4p counter-transport sterol and PI(4)P between the ER and the Golgi; PI(4)P consumption in the ER by the phosphatase Sac1 allows the anterograde transport of sterol against its concentration gradient [73,74].

The main parameters affecting the efficiency of LTP-mediated lipid transport are the energy barrier of lipid desorption from the membrane, and the distance between membranes [18,75]. Hence, some LTPs act specifically in contact sites between organelles [71,76,77]. Contact sites formation spatially restricts the action of LTPs, and facilitates its regulation [75]. To date, cholesterol transport is the most documented lipid transport in ER-Endosome contacts.

Cells can acquire cholesterol by two means, biosynthesis which occurs in the ER, and endocytosis of lipoproteins [78]. Thus, ER-Endosome contacts are at the crossroad of cholesterol homeostasis. Two LTPs, STARD3 belonging to the Steroidogenic Acute Regulatory protein related lipid transfer (START) family, and ORP1L belonging to the OSBP family, were shown to mediate cholesterol transport in ER-Endosome contacts (Fig. 4A; Table I).

STARD3 (START domain-3) is a transmembrane protein localized in LEs (Fig. 2) [79]. This protein is composed by two distinct domains, an amino-terminal MENTAL transmembrane domain which anchors the protein in the membrane of LEs, and a cytosolic carboxyl-terminal START domain (Table I) [80]. STARD3 is one of the 15 human START proteins, and it belongs to the START protein sub-family involved in cholesterol transport [81,82]. At the boundary between the MENTAL and the START domain of STARD3 lies an FFAT-like motif allowing its interaction with VAPs and MOSPD2 [25,26]. Ultrastructural observations of STARD3 expressing cells showed that LEs positive for STARD3 are wrapped by ER membranes [25]. Indeed, the interaction between STARD3, anchored onto the endosome, and VAP-A, VAP-B or MOSPD2, anchored onto the ER, induces the formation of ER-Endosome contacts (Fig. 2 B-D).

The presence of STARD3 at the interface between endosomes and the ER suggested that it could exchange cholesterol between these two organelles. Cholesterol labeling using fluorescent probes indeed showed that STARD3 expression mediates cholesterol transport towards endosomes [77,79,83]. Moreover, structure-function studies demonstrated that both a functional START domain binding cholesterol, and the ability of the protein to mediate ER-Endosome contact formation were required for cholesterol transport [77] (Fig. 4A). In agreement with these data, *in vitro* reconstitution of ER-Endosome contact sites using liposomes harboring STARD3 (Endosome-like liposome) and VAP-A (ER-like liposome) showed that the STARD3-VAP-A tethering complex is a highly efficient machine to build a contact and transfer cholesterol between membranes [77]. The importance of STARD3 in cholesterol transport is supported by a genome-wide association study which linked the STARD3 gene and high density lipoprotein (HDL) cholesterol concentration [84]. However, STARD3-deficient mice showed only modest cholesterol alterations, suggesting that intracellular cholesterol transport pathways are highly redundant [85].

Intriguingly, another human protein possesses a MENTAL domain. This protein, named STARD3NL (STARD3 N-terminal like) is not a LTP, as it does not possess a lipid-binding domain, but similarly to STARD3, it is anchored in LE membranes, and it harbors an FFAT-like motif (Table I) [25,86]. Indeed, STARD3NL interacts with VAPs and MOSPD2 to mediate the formation of ER-endosome contacts [25,26]. However, the function of this protein within ER-Endosome contacts remains elusive. It was shown that STARD3NL interacts with STARD3 as well as cholesterol, and therefore we can hypothesize that STARD3NL regulates the function of STARD3 [80,87].

As described above, ORP1L is involved in ER-Endosome contact formation under low cholesterol conditions [23]. The ability of ORP1L to tether two organelles, and to transport cholesterol with its ORD domain, suggested that this protein could mediate cholesterol transport within ER-Endosome

contacts [23,88,89] (Fig. 4A). Besides, the involvement of ORP1L in cholesterol transport is further supported by the identification of an ORP1L heterozygous truncating mutation associated with low circulating HDL levels in human [90].

In *Caenorhabditis elegans*, inactivation of ORP genes induced defects in the formation and function of multivesicular endosomes, associated with a reduced cholesterol content in LEs/LYs [91]. Moreover, this function is conserved in human since ORP1L knockdown resulted in a similar phenotype with the formation of enlarged endosomes containing less ILVs. Besides, this role of ORP1L was recently linked with the ability of the protein to fuel cholesterol from the ER into endosomes, in low cholesterol conditions, to favor membrane, and specifically ILV formation [35]. Accordingly, depletion of ORP1L or VAPs reduces both ILV formation and cholesterol content in Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-endosomes. Interestingly, the LTP STARD3 is possibly regulating ILV formation by transporting cholesterol within ER-Endosome contacts [77]. Indeed, cells expressing STARD3 exhibited endosomes with more internal membranes. Structure/function studies revealed that this phenotype required the ability of STARD3 to scaffold ER-endosome contacts, and the START domain of STARD3 [77]. Thus ORP1L and STARD3 are involved in the transport of ER-derived cholesterol to provide building blocks for membrane formation in endosomes. However, VAP/ORP1L and VAP/STARD3 do not operate in the same endosome population, VAP/ORP1L and VAP-STARD3 being associated with EGFR and non-EGFR endosomes, respectively [35,77].

Interestingly, ORP1L-mediated cholesterol transport is not unidirectional as ORP1L-deficient cells display endosome-to-ER cholesterol transfer defects [92]. Actually, ORP1L-knock-out cells display the features of defective endosome-to-ER LDL cholesterol export. When cultivated in LDL containing medium, these cells exhibited Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT)-mediated esterification defects, this enzyme being an ER-resident enzyme which esterifies the excess of cholesterol when it reaches the ER. In a similar way, sterol-regulated genes were increased, which was accompanied with an increase in sterol synthesis, and finally cholesterol accumulated in endosomes. Structure/function studies showed that the ability of ORP1L to interact with VAPs, and to bind cholesterol and PIPs in its ORD domain were both required for endosome cholesterol egress, further supporting the ability of the protein to promote cholesterol transport in ER-Endosome contacts [92].

Recent *in vitro* analysis showed that PIPs, and more specifically PI(4,5)P₂ and PI(3,4)P₂, enhance cholesterol transport by an allosteric mechanism facilitating ORP1 membrane targeting and cholesterol extraction [93]. This role of phosphoinositides is different from what was shown for other OSBP-related proteins for which PIPs, and in particular PI(4)P, is counter-transported by the protein. Indeed, Drin and collaborators have shown that the transport of lipids, such as cholesterol or phosphatidylserine, from the ER to their target compartment (Golgi, PM) is coupled to the backward transport of PI(4)P [73,94]. PI(4)P synthesis in the target organelle, and its degradation by the phosphatase Sac1 in the ER, fuels energy in the lipid transport cycle, and permits the creation of a lipid gradient [74,95].

OSBP is the founding member of the OSBP protein family (Table I). This protein counter-exchanges cholesterol and PI(4)P in ER-Golgi contacts [76]. In addition to being present at the level of ER-Golgi contacts, OSBP is also found in ER-Endosome contacts built by the interaction between VAP proteins and SNX2 [60]. Indeed, OSBP is implicated in endosome-to-Golgi traffic by regulating actin nucleation and retromer function through PI(4)P transport in ER-Endosome contacts mediated by VAP/SNX2 interaction. In the absence of OSBP, PI(4)P accumulates on endosomes and induces WASH recruitment, and actin nucleation. Given that OSBP counter-exchanges cholesterol and PI(4)P between the ER and Golgi, it most probably regulates PI(4)P levels in the endosome by counter-transporting cholesterol from the ER. The role of this presumed cholesterol flux during endosome-to-Golgi traffic remains to be determined (Fig. 4B).

Cholesterol transport at ER-endosome contacts is not a unique one-way process. Several protein complexes are involved, and cholesterol transport can be bi-directional. This supports the idea that different pools of endosomal cholesterol exist and that its transport must be adapted to the

biological context thanks to specialized endosome populations and the presence of discrete functional domains.

Membrane contact sites along membrane receptor endocytic route

Endosomes play a crucial role in the spatio-temporal regulation of receptor tyrosine kinase (RTK) activity [96,97]. EGFR represents the archetype of endocytosed RTK destined for degradation (Table II) [97]. Upon ligand binding, EGFR dimerizes and dimers cross-phosphorylate their cytoplasmic tail; the phosphorylated tyrosines act as docking sites for the recruitment and activation of downstream signaling targets. After its activation, EGFR is rapidly endocytosed, which is the first step of signal termination. Although signaling from EGFR takes place predominantly at the PM, the receptor is still active within the endosomal system where it is able to recruit and activate its cytoplasmic substrates [98]. Finally, the receptor is dephosphorylated by specific phosphatases, and is subjected to internalization into ILVs, which suppress EGFR signaling. In the end, EGFR reaches the lysosome where it is degraded [99]. Thus, activation and inactivation of EGFR occur at different subcellular areas. Contacts between EGFR-endosomes and the ER were shown to be involved in signal termination. Indeed, EGFR interacts with the ER-anchored protein tyrosine phosphatase PTP1B within ER-Endosome contacts, which allows its dephosphorylation [20,100] (Fig. 5A; Table II). Moreover, ER-Endosome contacts are involved in the formation of ILVs and the sequestration of EGFR in these structures [20,35,101].

To identify the tethering complex involved in the formation of ER-Endosome contacts allowing EGFR dephosphorylation by PTP1B, Eden and collaborators analyzed ER-Endosome contacts in cells treated with EGF in the absence of selected candidate genes [35]. Despite the notion that most ER-Endosome contacts involve VAP proteins, the number of contacts between EGFR-containing endosomes and the ER is not perturbed in VAP-depleted cells stimulated with EGF. Rather, depletion of Annexin A1 (Table II), an endosome-localized EGFR substrate, specifically decreases ER/EGFR-Endosome contacts which is accompanied by a prolonged EGFR phosphorylation [35,102]. Furthermore, electron microscopy observations revealed that Annexin A1, EGFR and PTP1B co-localize in ER-Endosome contacts, reinforcing the idea that PTP1B-mediated EGFR dephosphorylation occurs in contacts built by Annexin A1. The quest for a tethering partner revealed that to build contacts, Annexin A1 needs to interact with the ER-localized Protein S100-A11 in a calcium-dependent manner (Fig. 5B; Table II) [35,103]. Thus, Annexin A1 and S100-A11 build ER-Endosome contacts that are specifically populated by EGFR and PTP1B in the endosome and ER membrane, respectively, and constitute a dephosphorylation compartment for EGFR en route for degradation in the lysosome (Fig. 5B).

Importantly, Annexin A1/S100-A11-regulated ER-Endosome contacts are not only involved in EGFR dephosphorylation, but also in the formation of ILVs. Indeed, the absence of either Annexin A1 or S100-A11 disrupts ILV formation, in addition to decreasing contacts [35]. The formation of ILVs is mediated by the ESCRT machinery, which is made up of cytosolic protein complexes named ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III [104]. Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) and signal-transducing adaptor molecule (STAM) are ESCRT-0 components which are phosphorylated in response to growth factor stimulation, such as EGF. Interestingly, besides acting on EGFR, PTP1B also dephosphorylates HRS and STAM, likely at ER-Endosome contacts made by Annexin A1/S100-A11 [20,35,105]. Although the role of HRS and STAM phosphorylation in regulating ESCRT-0 activity is unclear, PTP1B-mediated dephosphorylation of HRS and STAM seems to be required for ILV formation [20,105]. Accordingly, the disruption of ILV formation associated with the loss of Annexin A1 or S100-A11 is likely due, at least in part, to the absence of dephosphorylation by PTP1B of the ESCRT-0 components HRS and STAM. Interestingly, although EGFR sorting onto ILVs

actively depends on the ESCRT machinery, ILV assembly is also supported by cholesterol transport by the LTP ORP1L and VAP from the ER towards the endosome, when low density lipoprotein (LDL)-derived cholesterol is low (Fig. 5B) [35,106].

Thus, along the endocytic route, ER-Endosome contacts control EGFR signal termination. These specialized ER-Endosome contacts are built by the Annexin A1 / S100-A11 complex, and recruit several proteins, allowing a division of labor: PTP1B is involved in the dephosphorylation of EGFR, and ORP1L/VAP in the transport of cholesterol towards the endosome to build ILVs. Besides EGFR, other RTKs such as the platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR) and the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSFR) are also subjected to PTP1B-dependent dephosphorylation in ER-endosome contacts, thus providing an example of specialized contacts implicated in RTK signal attenuation along the endocytic route [100,107].

Calcium signaling at ER-Endosome contact sites

Besides lipids, calcium is also exchanged at the interface between the ER and endosomes. Calcium ion (Ca^{2+}) is an ubiquitous second messenger involved in a large variety of physiological events such as apoptosis, neurotransmitter release, muscle contraction, fertilization... [108]. Therefore, intracellular Ca^{2+} concentration is tightly regulated. When it is required, localized increase in Ca^{2+} concentration is mediated by Ca^{2+} influx from the extracellular space through Ca^{2+} channels present at the PM, but also by Ca^{2+} efflux from storage organelles such as the ER [108]. The release of Ca^{2+} from ER stores is triggered by the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) synthesized by phospholipase C (PLC) at the PM. On the ER surface, IP3 binds to calcium channels named IP3 receptors (IP3Rs; Table II), and Ca^{2+} is released in the cytosol [109]. Although the ER represents the main Ca^{2+} storage organelle, endo/lysosomes also sequester Ca^{2+} , with a similar concentration of around 500 μM [110]. Furthermore, endo/lysosomes express several channels allowing Ca^{2+} release, including two-pore channels (TPC1 and TPC2), which can be stimulated by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP), a powerful activator of Ca^{2+} release [111–117]. Thus, besides the ER, endo/lysosomes are key Ca^{2+} storage organelles which can be mobilized for localized Ca^{2+} delivery.

Consistent with the idea that ER-endosomes contacts are regulated by Ca^{2+} , the TPC1 channel was localized in ER-Endosome contact sites (Table II) [118]. Upon TPC1 depletion, the frequency of ER-endosome contact is decreased. A similar phenotype is observed by a pharmacological inhibition of the TPC channels through an NAADP antagonist. These results indicate that some ER-Endosome contacts might be regulated by local Ca^{2+} ions derived from endosomes. Because TPC1 does not interact directly with the ER, it is tempting to speculate that TPC1-dependent ER-Endosome contacts are linked to the tethering complex Annexin A1/S100-A11, which depends on Ca^{2+} for interaction [103]. Furthermore, in line with the notion that ER-endosomes contacts functions in signal attenuation, inhibition of TPC1 in EGF-stimulated cells enhances and prolongs EGFR tyrosine phosphorylation which in turn, perturbs downstream signaling by Mitogen-activated protein (MAP) kinase and phospholipase C [118]. Thus, some ER-Endosome contacts appear to be Ca^{2+} dependent signaling platform.

More recently, another study reported that ER and endo/lysosome Ca^{2+} stores are functionally linked. Indeed, lysosomes are able to selectively sequester Ca^{2+} released from the ER [119,120]. This Ca^{2+} exchange was shown to occur at sites of contact between the ER and lysosomes, marked by the presence of IP3Rs [121]. Thus, lysosomes selectively sequester Ca^{2+} released by IP3Rs in ER/Lys contacts [121]. Furthermore, the close association of the ER and LYs is partially disrupted in cells treated with pharmacological components inhibiting the vacuolar H^+ -ATPase (V-ATPase), a pump responsible for the acidification of lysosomes. These data suggest that a low lysosome pH is required

to maintain ER-IP3R/Lysosome connection [121]. Importantly, IP3Rs are not required for ER-LE/LY contact formation, since the association between these organelles was unchanged in cells devoid of IP3Rs. The tethering machinery implicated in IP3R-mediated Ca^{2+} delivering from the ER to LEs/LYs remains to be identified.

Nucleoplasmic reticulum-Endosome contacts

The ER, which is the largest organelle in eukaryotic cells, extends throughout the cytosol and forms a continuum with the nuclear envelope (NE). The nuclear envelope makes invaginations going deep inside the nucleoplasm, which are named nucleoplasmic reticulum (NR). NRs are divided into two classes: type I NR, involving inner nuclear membrane invaginations into the nucleoplasm (INM), and type II NR, corresponding to the invagination of both the INM and the outer nuclear membrane (ONM) [122]. Consequently, type II NR, which enclose a portion of cytoplasm, can contain cytoplasmic organelles. Electron and light microscopy revealed the presence of Rab7-positive LE into NE invaginations [123,124]. The ER protein VAP-A is present in type II NRs. Interestingly, less endosomes are present in NE invaginations in VAP-A-depleted cells (but not in VAP-B-depleted cells), which revealed a requirement for VAP-A in the recruitment of endosomes into these structures. Moreover, ORP3, a protein belonging to the OSBP family (Table II), and a VAP-A partner, was also present in endosomes enclosed into the NR [124,125]. Indeed, VAP-A, ORP3 and Rab7 were present in a tripartite complex specifically in NE invaginations, but not in the cytoplasm [124]. These data indicate that the entry and/or the maintenance of LE in NE invaginations is mediated by the formation of a VAP-A/ORP3/Rab7 complex, which is likely present in contacts between these LE and the nuclear envelope. How this Rab7/ORP3 endosomal subpopulation is targeted to the NE remains poorly understood. An intact microtubule network seems to be required (Table II) [124], but the mechanism regulating the association with microtubules, and the identity of the motor proteins involved is still unknown. Also, the biological function of endosomes present in NE invaginations is elusive. One tempting hypothesis is that these structures could be involved in the transport of endocytosed exosomes en route to the nucleus to deliver their content, i.e. proteins and nucleic acids [124].

Endosomes also contact other organelles

Membrane contacts exist between virtually every pair of organelles in eukaryotic cells [126–128]. Hence, besides the ER, endocytic vesicles were shown to physically associate with peroxisomes, mitochondria, lipid droplets, the Golgi, and the PM [24,129]. Up to now, the function of these contacts remains ill-defined.

LY–Peroxisome contacts were shown to be involved in cholesterol egress from the endocytic pathway [130]. Indeed, peroxisomes transiently and dynamically contact lysosomes. Most of these contacts are tethered by Synaptotagmin-7, which is on lysosomes, and interacts with PI(4,5)P2 on the peroxisome surface with its two C2 domains. In accordance with this result, the reduction of PI(4,5)P2 levels at the surface of peroxisomes, induced by the silencing of phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 α (PIP4K2A) which generates this lipid from PI(5)P, reduces LY–Peroxisome contacts [131]. This in turn induces an accumulation of cholesterol in lysosomes. Most importantly, the pathological relevance of cholesterol transport in lysosome–peroxisome contacts was shown in fibroblasts of patients with a peroxisomal disorder. Indeed, fibroblasts of adrenoleukodystrophy, Infantile Refsum disease and Zellweger syndrome patients were shown to accumulate cholesterol, further supporting a role for peroxisomes, and in particular LY–peroxisome contacts, in intracellular cholesterol transport [130].

Besides contacting peroxisomes, lysosomes also connect mitochondria to regulate mitochondrial fission, a crucial process to maintain a proper cellular distribution of mitochondria [132–134]. By using live imaging, authors showed that contact formation and duration are increased in cells expressing a constitutively active form of the RAB7 protein. This suggests that formation and stabilization of Lysosome-Mitochondria contacts are promoted by GTP-bound RAB7. In fact, mitochondrial fission events are observed at sites of contact with lysosomes. Remarkably, the expression of the RAB7 active form severely decreases the rate of mitochondrial fission. On the mitochondrial side, the fission factor FIS1 is able to recruit the Rab7/ GTPase-activating protein (GAP) TBC1 domain family member 15 (TBC1D15) [135]. As a result, the expression of the TBC1D15 GAP mutant - unable to hydrolyze RAB7 - markedly increases mitochondria-lysosome contact duration concomitantly to a decrease of mitochondrial fission events. Together, these results indicate that mitochondrial fission can be regulated at the level of contacts with lysosomes, through TBC1D15-mediated RAB7 hydrolysis [133].

As discussed above, nutrient availability influences the positioning of LEs/LYs. Interestingly, this process does not only involve ER-dependent contacts. Indeed, in response to serum and amino acid starvation, the formation of LY-Golgi contacts is promoted [136]. These contacts actively retain LYs in the center of the cell. The machinery involved is composed of the renal tumor suppressor folliculin (FLCN) and Rab34. FLCN is recruited onto LYs and promotes the association of Rab-34 with its effector, the dynactin protein complex-interacting protein RILP [136,137]. The association of FLCN on LYs, and Rab34 primarily associated with Golgi membranes, drives the formation of contact sites which restrain LYs in the perinuclear area [136].

A specialized endocytic network, composed of membrane-bound structures named lysosome-related organelles (LROs), is present in specific cell types, such as melanosomes in pigment cells [138,139]. Electron microscopy analyses revealed the presence of Melanosome-Mitochondria contacts in melanocyte cell lines and human melanoma cells [140]. The dynamin-like GTPase mitofusin 2 (Mfn2) is localized to, and required for Melanosome-Mitochondria contacts, since Mfn2 depletion reduces connections between these organelles. Functionally, Mfn2-mediated contacts seem to be involved in melanosome biogenesis [140].

Interestingly, endosomes are also able to contact other endosomes. For instance, we recently showed that the depletion of the ER-tether protein MOSPD2 significantly increases Endosome-Endosome contacts, suggesting that MOSPD2 plays a role in the regulation of the endosomal system dynamics [26]. Endosome-endosome contact formation seems to be linked to the clustering of these organelles in the perinuclear region, and most likely involves specific tether complexes [141,142].

Conclusion

To conclude, endosomes and the ER have a parallel life with many direct encounters - mediated through the establishment of physical contacts - that regulate endosome compartment dynamics and function. These physical contacts are mediated by the building of tethering complexes at the organelles' interface. A number of ER-Endosome tethering complexes have been identified and, most probably, many more will be discovered in the near future. While all these complexes build morphologically similar ER-Endosome contact sites – a contact is a contact –, they are associated with a variety of distinct functions such as lipid or Ca^{2+} transport, signaling, molecular motor recruitment... VAP-A, VAP-B and MOSPD2 proteins play a central role in the formation of contacts between the ER and other organelles, and more particularly endosomes. How the cell orchestrates the formation and function of these tethering complexes remains an open question. Noteworthy, recent observations showed that the fission of ER tubules can occur at sites of contact with LE [143].

Although the molecular identity of these contacts is not known, these data highlight the possibility of a bidirectional functional regulation between the ER and endosomes.

ACCEPTED MANUSCRIPT

References:

- [1] C.C. Scott, F. Vacca, J. Gruenberg, Endosome maturation, transport and functions, *Semin. Cell Dev. Biol.* 31 (2014) 2–10. doi:10.1016/j.semcdb.2014.03.034.
- [2] F. Vacca, C. Scott, J. Gruenberg, The Late Endosome, in: R.A. Bradshaw, P.D. Stahl (Eds.), *Encycl. Cell Biol.*, Academic Press, Waltham, 2016: pp. 201–210. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123944474200175>.
- [3] A. Benmerah, C. Lamaze, Clathrin-Coated Pits: Vive La Différence?, *Traffic.* 8 (2007) 970–982. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00585.x.
- [4] P.J. Cullen, F. Steinberg, To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19 (2018) 679. doi:10.1038/s41580-018-0053-7.
- [5] F.R. Maxfield, T.E. McGraw, Endocytic recycling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 121–132. doi:10.1038/nrm1315.
- [6] G. Raposo, W. Stoorvogel, Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends, *J Cell Biol.* 200 (2013) 373–383. doi:10.1083/jcb.201211138.
- [7] E.R. Eden, The formation and function of ER-endosome membrane contact sites, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1861 (2016) 874–879. doi:10.1016/j.bbalip.2016.01.020.
- [8] C. Raiborg, E.M. Wenzel, H. Stenmark, ER–endosome contact sites: molecular compositions and functions, *EMBO J.* 34 (2015) 1848–1858. doi:10.15252/embj.201591481.
- [9] H. Wu, P. Carvalho, G.K. Voeltz, Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites, *CELL Biol.* (2018) 11.
- [10] J. Gruenberg, The endocytic pathway: a mosaic of domains, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 721–730. doi:10.1038/35096054.
- [11] J. Huotari, A. Helenius, Endosome maturation, *EMBO J.* 30 (2011) 3481–3500. doi:10.1038/emboj.2011.286.
- [12] N.J. Severs, E.G. Jordan, D.H. Williamson, Nuclear pore absence from areas of close association between nucleus and vacuole in synchronous yeast cultures, *J. Ultrastruct. Res.* 54 (1976) 374–387. doi:10.1016/S0022-5320(76)80023-8.
- [13] P.C. Malia, C. Ungermann, Vacuole membrane contact sites and domains: emerging hubs to coordinate organelle function with cellular metabolism, *Biochem. Soc. Trans.* 44 (2016) 528–533. doi:10.1042/BST20150277.
- [14] X. Pan, P. Roberts, Y. Chen, E. Kvam, N. Shulga, K. Huang, S. Lemmon, D.S. Goldfarb, Nucleus–Vacuole Junctions in *Saccharomyces cerevisiae* Are Formed Through the Direct Interaction of Vac8p with Nvj1p, *Mol. Biol. Cell.* 11 (2000) 2445–2457. doi:10.1091/mbc.11.7.2445.
- [15] D.C. Ko, M.D. Gordon, J.Y. Jin, M.P. Scott, Dynamic Movements of Organelles Containing Niemann-Pick C1 Protein: NPC1 Involvement in Late Endocytic Events, *Mol. Biol. Cell.* 12 (2001) 601–614.
- [16] E. Gagnon, S. Duclos, C. Rondeau, E. Chevet, P.H. Cameron, O. Steele-Mortimer, J. Paiement, J.J.M. Bergeron, M. Desjardins, Endoplasmic Reticulum-Mediated Phagocytosis Is a Mechanism of Entry into Macrophages, *Cell.* 110 (2002) 119–131. doi:10.1016/S0092-8674(02)00797-3.
- [17] P. Nunes-Hasler, N. Demarex, The ER phagosome connection in the era of membrane contact sites, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1864 (2017) 1513–1524. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.04.007.
- [18] J.C.M. Holthuis, T.P. Levine, Lipid traffic: floppy drives and a superhighway, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 209–220. doi:10.1038/nrm1591.
- [19] T. Levine, C. Loewen, Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly, *Curr Opin Cell Biol.* 18 (2006) 371–8.
- [20] E.R. Eden, I.J. White, A. Tsapara, C.E. Futter, Membrane contacts between endosomes and ER provide sites for PTP1B–epidermal growth factor receptor interaction, *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 267–272.

- [21] J.R. Friedman, B.M. Webster, D.N. Mastrorarde, K.J. Verhey, G.K. Voeltz, ER sliding dynamics and ER–mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules, *J. Cell Biol.* 190 (2010) 363–375.
- [22] J.R. Friedman, J.R. DiBenedetto, M. West, A.A. Rowland, G.K. Voeltz, Endoplasmic reticulum–endosome contact increases as endosomes traffic and mature, *Mol. Biol. Cell.* 24 (2013) 1030–1040. doi:10.1091/mbc.E12-10-0733.
- [23] N. Rocha, C. Kuijl, R. van der Kant, L. Janssen, D. Houben, H. Janssen, W. Zwart, J. Neefjes, Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning, *J Cell Biol.* 185 (2009) 1209–25.
- [24] A.M. Valm, S. Cohen, W.R. Legant, J. Melunis, U. Hershberg, E. Wait, A.R. Cohen, M.W. Davidson, E. Betzig, J. Lippincott-Schwartz, Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome, *Nature.* 546 (2017) 162–167. doi:10.1038/nature22369.
- [25] F. Alpy, A. Rousseau, Y. Schwab, F. Legueux, I. Stoll, C. Wendling, C. Spiegelhalter, P. Kessler, C. Mathelin, M.-C. Rio, T.P. Levine, C. Tomasetto, STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 5500–5512. doi:10.1242/jcs.139295.
- [26] T. Di Mattia, L.P. Wilhelm, S. Ikhlef, C. Wendling, D. Spehner, Y. Nominé, F. Giordano, C. Mathelin, G. Drin, C. Tomasetto, F. Alpy, Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites, *EMBO Rep.* 19 (2018) e45453. doi:10.15252/embr.201745453.
- [27] R. Rizzuto, P. Pinton, W. Carrington, F.S. Fay, K.E. Fogarty, L.M. Lifshitz, R.A. Tuft, T. Pozzan, Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses, *Science.* 280 (1998) 1763–1766. doi:10.1126/science.280.5370.1763.
- [28] A. Sood, D.V. Jeyaraju, J. Prudent, A. Caron, P. Lemieux, H.M. McBride, M. Laplante, K. Tóth, L. Pellegrini, A Mitofusin-2–dependent inactivating cleavage of Opa1 links changes in mitochondria cristae and ER contacts in the postprandial liver, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 16017–16022. doi:10.1073/pnas.1408061111.
- [29] R. Stoica, K.J.D. Vos, S. Paillusson, S. Mueller, R.M. Sancho, K.-F. Lau, G. Vizcay-Barrena, W.-L. Lin, Y.-F. Xu, J. Lewis, D.W. Dickson, L. Petrucelli, J.C. Mitchell, C.E. Shaw, C.C.J. Miller, ER–mitochondria associations are regulated by the VAPB–PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43, *Nat. Commun.* 5 (2014) ncomms4996. doi:10.1038/ncomms4996.
- [30] M. Eisenberg-Bord, N. Shai, M. Schuldiner, M. Bohnert, A Tether Is a Tether Is a Tether: Tethering at Membrane Contact Sites, *Dev. Cell.* 39 (2016) 395–409. doi:10.1016/j.devcel.2016.10.022.
- [31] C.J. Loewen, A. Roy, T.P. Levine, A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP, *EMBO J.* 22 (2003) 2025–2035.
- [32] S.E. Murphy, T.P. Levine, VAP, a Versatile Access Point for the Endoplasmic Reticulum: Review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1861 (2016) 952–961. doi:10.1016/j.bbalip.2016.02.009.
- [33] C.J.R. Loewen, T.P. Levine, A Highly Conserved Binding Site in Vesicle-associated Membrane Protein-associated Protein (VAP) for the FFAT Motif of Lipid-binding Proteins, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 14097–14104. doi:10.1074/jbc.M500147200.
- [34] V. Mikitova, T.P. Levine, Analysis of the Key Elements of FFAT-Like Motifs Identifies New Proteins That Potentially Bind VAP on the ER, Including Two AKAPs and FAPP2, *PLoS ONE.* 7 (2012) e30455. doi:10.1371/journal.pone.0030455.
- [35] E.R. Eden, E. Sanchez-Heras, A. Tsapara, A. Sobota, T.P. Levine, C.E. Futter, Annexin A1 Tethers Membrane Contact Sites that Mediate ER to Endosome Cholesterol Transport, *Dev. Cell.* 37 (2016) 473–483. doi:10.1016/j.devcel.2016.05.005.
- [36] C. Raiborg, E.M. Wenzel, N.M. Pedersen, H. Olsvik, K.O. Schink, S.W. Schultz, M. Vietri, V. Nisi, C. Bucci, A. Brech, T. Johansen, H. Stenmark, Repeated ER–endosome contacts promote

- endosome translocation and neurite outgrowth, *Nature*. 520 (2015) 234–238. doi:10.1038/nature14359.
- [37] E. Granger, G. McNee, V. Allan, P. Woodman, The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics, *Semin. Cell Dev. Biol.* 31 (2014) 20–29. doi:10.1016/j.semcdb.2014.04.011.
- [38] S. Loubéry, C. Wilhelm, I. Hurbain, S. Neveu, D. Louvard, E. Coudrier, Different Microtubule Motors Move Early and Late Endocytic Compartments, *Traffic*. 9 (2008) 492–509. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00704.x.
- [39] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9 (2008) 112–24.
- [40] M.T. Vanier, Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C, *J. Inherit. Metab. Dis.* 38 (2015) 187–199. doi:10.1007/s10545-014-9794-4.
- [41] C. Lebrand, M. Corti, H. Goodson, P. Cosson, V. Cavalli, N. Mayran, J. Fauré, J. Gruenberg, Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7, *EMBO J.* 21 (2002) 1289–1300. doi:10.1093/emboj/21.6.1289.
- [42] M. Zhang, N.K. Dwyer, D.C. Love, A. Cooney, M. Comly, E. Neufeld, P.G. Pentchev, E.J. Blanchette-Mackie, J.A. Hanover, Cessation of rapid late endosomal tubulovesicular trafficking in Niemann–Pick type C1 disease, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001) 4466–4471. doi:10.1073/pnas.081070898.
- [43] V.M. Olkkonen, OSBP-Related Protein Family in Lipid Transport Over Membrane Contact Sites, *Lipid Insights*. 8 (2015) 1–9. doi:10.4137/LPI.S31726.
- [44] M. Johansson, V. Bocher, M. Lehto, G. Chinetti, E. Kuismanen, C. Ehnholm, B. Staels, V.M. Olkkonen, The Two Variants of Oxysterol Binding Protein-related Protein-1 Display Different Tissue Expression Patterns, Have Different Intracellular Localization, and Are Functionally Distinct, *Mol. Biol. Cell.* 14 (2002) 903–915. doi:10.1091/mbc.e02-08-0459.
- [45] H. Kentala, M. Weber-Boyvät, V.M. Olkkonen, Chapter Seven - OSBP-Related Protein Family: Mediators of Lipid Transport and Signaling at Membrane Contact Sites, in: K.W. Jeon (Ed.), *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, Academic Press, 2016: pp. 299–340. doi:10.1016/bs.ircmb.2015.09.006.
- [46] M. Johansson, M. Lehto, K. Tanhuanpää, T.L. Cover, V.M. Olkkonen, The Oxysterol-binding Protein Homologue ORP1L Interacts with Rab7 and Alters Functional Properties of Late Endocytic Compartments, *Mol. Biol. Cell.* 16 (2005) 5480–5492. doi:10.1091/mbc.E05-03-0189.
- [47] R.H. Wijdeven, H. Janssen, L. Nahidiazar, L. Janssen, K. Jalink, I. Berlin, J. Neefjes, Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway, *Nat. Commun.* 7 (2016) 11808. doi:10.1038/ncomms11808.
- [48] D.J. Goolooly, A. Simonsen, H. Stenmark, Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins, (2001) 10.
- [49] S. Saita, M. Shirane, T. Natume, S. Iemura, K.I. Nakayama, Promotion of Neurite Extension by Protrudin Requires Its Interaction with Vesicle-associated Membrane Protein-associated Protein, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 13766–13777. doi:10.1074/jbc.M807938200.
- [50] V.I. Korolchuk, S. Saiki, M. Lichtenberg, F.H. Siddiqi, E.A. Roberts, S. Imarisio, L. Jahreiss, S. Sarkar, M. Futter, F.M. Menzies, C.J. O’Kane, V. Deretic, D.C. Rubinsztein, Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses, *Nat. Cell Biol.* 13 (2011) 453–460. doi:10.1038/ncb2204.
- [51] C. Raiborg, How Nutrients Orchestrate Lysosome Positioning, *Contact*. 1 (2018) 2515256418756111. doi:10.1177/2515256418756111.
- [52] Z. Hong, N.M. Pedersen, L. Wang, M.L. Torgersen, H. Stenmark, C. Raiborg, PtdIns3P controls mTORC1 signaling through lysosomal positioning, *J Cell Biol.* 216 (2017) 4217–4233. doi:10.1083/jcb.201611073.
- [53] J.S. Bonifacino, J. Neefjes, Moving and positioning the endolysosomal system, *Curr. Opin. Cell Biol.* 47 (2017) 1–8. doi:10.1016/j.ceb.2017.01.008.

- [54] M.L.M. Jongsma, I. Berlin, R.H.M. Wijdeven, L. Janssen, G.M.C. Janssen, M.A. Garstka, H. Janssen, M. Mensink, P.A. van Veelen, R.M. Spaapen, J. Neefjes, An ER-Associated Pathway Defines Endosomal Architecture for Controlled Cargo Transport, *Cell*. 166 (2016) 152–166. doi:10.1016/j.cell.2016.05.078.
- [55] J. Neefjes, M.M.L. Jongsma, I. Berlin, Stop or Go? Endosome Positioning in the Establishment of Compartment Architecture, Dynamics, and Function, *Trends Cell Biol*. 27 (2017) 580–594. doi:10.1016/j.tcb.2017.03.002.
- [56] J.R. Friedman, L.L. Lackner, M. West, J.R. DiBenedetto, J. Nunnari, G.K. Voeltz, ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division, *Science*. 334 (2011) 358–362. doi:10.1126/science.1207385.
- [57] A.A. Rowland, P.J. Chitwood, M.J. Phillips, G.K. Voeltz, ER Contact Sites Define the Position and Timing of Endosome Fission, *Cell*. 159 (2014) 1027–1041. doi:10.1016/j.cell.2014.10.023.
- [58] A. Gautreau, K. Oguievetskaia, C. Ungermann, Function and Regulation of the Endosomal Fusion and Fission Machineries, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 6 (2014) a016832–a016832. doi:10.1101/cshperspect.a016832.
- [59] C. Delevoeye, S. Miserey-Lenkei, G. Montagnac, F. Gilles-Marsens, P. Paul-Gilloteaux, F. Giordano, F. Waharte, M.S. Marks, B. Goud, G. Raposo, Recycling Endosome Tubule Morphogenesis from Sorting Endosomes Requires the Kinesin Motor KIF13A, *Cell Rep*. 6 (2014) 445–454. doi:10.1016/j.celrep.2014.01.002.
- [60] R. Dong, Y. Saheki, S. Swarup, L. Lucast, J.W. Harper, P. De Camilli, Endosome-ER Contacts Control Actin Nucleation and Retromer Function through VAP-Dependent Regulation of PI4P, *Cell*. 166 (2016) 408–423. doi:10.1016/j.cell.2016.06.037.
- [61] M.N.J. Seaman, The retromer complex – endosomal protein recycling and beyond, *J Cell Sci*. 125 (2012) 4693–4702. doi:10.1242/jcs.103440.
- [62] M.J. Hoyer, P.J. Chitwood, C.C. Ebmeier, J.F. Striepen, R.Z. Qi, W.M. Old, G.K. Voeltz, A Novel Class of ER Membrane Proteins Regulates ER-Associated Endosome Fission, *Cell*. 175 (2018) 254–265.e14. doi:10.1016/j.cell.2018.08.030.
- [63] O.C. Losón, Z. Song, H. Chen, D.C. Chan, Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission, *Mol. Biol. Cell*. 24 (2013) 659–667. doi:10.1091/mbc.e12-10-0721.
- [64] J.A. Mears, L.L. Lackner, S. Fang, E. Ingerman, J. Nunnari, J.E. Hinshaw, Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission, *Nat. Struct. Mol. Biol*. 18 (2011) 20–26. doi:10.1038/nsmb.1949.
- [65] R. Allison, J.R. Edgar, G. Pearson, T. Rizo, T. Newton, S. Günther, F. Berner, J. Hague, J.W. Connell, J. Winkler, J. Lippincott-Schwartz, C. Beetz, B. Winner, E. Reid, Defects in ER–endosome contacts impact lysosome function in hereditary spastic paraplegia, *J. Cell Biol*. 216 (2017) 1337–1355. doi:10.1083/jcb.201609033.
- [66] J.H. Lumb, J.W. Connell, R. Allison, E. Reid, The AAA ATPase spastin links microtubule severing to membrane modelling, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res*. 1823 (2012) 192–197. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.08.010.
- [67] R. Allison, J.H. Lumb, C. Fassier, J.W. Connell, D.T. Martin, M.N.J. Seaman, J. Hazan, E. Reid, An ESCRT–spastin interaction promotes fission of recycling tubules from the endosome, *J Cell Biol*. 202 (2013) 527–543. doi:10.1083/jcb.201211045.
- [68] J. Hazan, N. Fonknechten, D. Mavel, C. Paternotte, D. Samson, F. Artiguenave, C.-S. Davoine, C. Cruaud, A. Dürr, P. Wincker, P. Brottier, L. Cattolico, V. Barbe, J.-M. Burgunder, J.-F. Prud'homme, A. Brice, B. Fontaine, R. Heilig, J. Weissenbach, Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia, *Nat. Genet*. 23 (1999) 296–303. doi:10.1038/15472.
- [69] A. Chiapparino, K. Maeda, D. Turei, J. Saez-Rodriguez, A.-C. Gavin, The orchestra of lipid-transfer proteins at the crossroads between metabolism and signaling, *Prog. Lipid Res*. 61 (2016) 30–39. doi:10.1016/j.plipres.2015.10.004.

- [70] J.C.M. Holthuis, A.K. Menon, Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis, *Nature*. 510 (2014) 48–57. doi:10.1038/nature13474.
- [71] S. Lev, Nonvesicular Lipid Transfer from the Endoplasmic Reticulum, Cold Spring Harb. *Perspect. Biol.* 4 (2012) a013300. doi:10.1101/cshperspect.a013300.
- [72] K. Hanada, K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa, M. Nishijima, Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide, *Nature*. 426 (2003) 803–9.
- [73] M. de Saint-Jean, V. Delfosse, D. Douguet, G. Chicanne, B. Payrastre, W. Bourguet, B. Antonny, G. Drin, Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers, *J Cell Biol.* 195 (2011) 965–978. doi:10.1083/jcb.201104062.
- [74] J. Moser von Filseck, S. Vanni, B. Mesmin, B. Antonny, G. Drin, A phosphatidylinositol-4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes, *Nat. Commun.* 6 (2015) 6671. doi:10.1038/ncomms7671.
- [75] J.S. Dittman, A.K. Menon, Speed Limits for Nonvesicular Intracellular Sterol Transport, *Trends Biochem. Sci.* 42 (2017) 90–97. doi:10.1016/j.tibs.2016.11.004.
- [76] B. Mesmin, J. Bigay, J. Moser von Filseck, S. Lacas-Gervais, G. Drin, B. Antonny, A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP, *Cell*. 155 (2013) 830–843. doi:10.1016/j.cell.2013.09.056.
- [77] L.P. Wilhelm, C. Wendling, B. Védie, T. Kobayashi, M.-P. Chenard, C. Tomasetto, G. Drin, F. Alpy, STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites, *EMBO J.* 36 (2017) 1412–1433. doi:10.15252/embj.201695917.
- [78] E. Ikonen, Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9 (2008) 125–38.
- [79] F. Alpy, M.E. Stoeckel, A. Dierich, J.M. Escola, C. Wendling, M.P. Chenard, M.T. Vanier, J. Gruenberg, C. Tomasetto, M.C. Rio, The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 4261–4269. doi:10.1074/jbc.M006279200.
- [80] F. Alpy, V.K. Latchumanan, V. Kedinger, A. Janoshazi, C. Thiele, C. Wendling, M.-C. Rio, C. Tomasetto, Functional characterization of the MENTAL domain, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 17945–17952. doi:10.1074/jbc.M500723200.
- [81] F. Alpy, C. Tomasetto, Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 2791–2801. doi:10.1242/jcs.02485.
- [82] F. Alpy, C. Tomasetto, START ships lipids across interorganelle space, *Biochimie.* 96 (2014) 85–95. doi:10.1016/j.biochi.2013.09.015.
- [83] M. Holtta-Vuori, F. Alpy, K. Tanhuanpaa, E. Jokitalo, A.L. Mutka, E. Ikonen, MLN64 is involved in actin-mediated dynamics of late endocytic organelles, *Mol Biol Cell.* 16 (2005) 3873–86.
- [84] T.M. Teslovich, K. Musunuru, A.V. Smith, A.C. Edmondson, I.M. Stylianou, M. Koseki, J.P. Pirruccello, S. Ripatti, D.I. Chasman, C.J. Willer, C.T. Johansen, S.W. Fouchier, A. Isaacs, G.M. Peloso, M. Barbalic, S.L. Ricketts, J.C. Bis, Y.S. Aulchenko, G. Thorleifsson, M.F. Feitosa, J. Chambers, M. Orho-Melander, O. Melander, T. Johnson, X. Li, X. Guo, M. Li, Y. Shin Cho, M. Jin Go, Y. Jin Kim, J.-Y. Lee, T. Park, K. Kim, X. Sim, R. Twee-Hee Ong, D.C. Croteau-Chonka, L.A. Lange, J.D. Smith, K. Song, J. Hua Zhao, X. Yuan, J. Luan, C. Lamina, A. Ziegler, W. Zhang, R.Y.L. Zee, A.F. Wright, J.C.M. Witterman, J.F. Wilson, G. Willemsen, H.-E. Wichmann, J.B. Whitfield, D.M. Waterworth, N.J. Wareham, G. Waeber, P. Vollenweider, B.F. Voight, V. Vitart, A.G. Uitterlinden, M. Uda, J. Tuomilehto, J.R. Thompson, T. Tanaka, I. Surakka, H.M. Stringham, T.D. Spector, N. Soranzo, J.H. Smit, J. Sinisalo, K. Silander, E.J.G. Sijbrands, A. Scuteri, J. Scott, D. Schlessinger, S. Sanna, V. Salomaa, J. Saharinen, C. Sabatti, A. Ruokonen, I. Rudan, L.M. Rose, R. Roberts, M. Rieder, B.M. Psaty, P.P. Pramstaller, I. Pichler, M. Perola, B.W.J.H. Penninx, N.L. Pedersen, C. Pattaro, A.N. Parker, G. Pare, B.A. Oostra, C.J. O'Donnell, M.S. Nieminen, D.A. Nickerson, G.W. Montgomery, T. Meitinger, R. McPherson, M.I. McCarthy, W. McArdle, D. Masson, N.G. Martin, F. Marroni, M. Mangino, P.K.E. Magnusson, G. Lucas, R. Luben, R.J.F. Loos, M.-L. Lokki, G. Lettre, C. Langenberg, L.J. Launer, E.G. Lakatta, R. Laaksonen, K.O. Kyvik, F. Kronenberg, I.R. König, K.-T. Khaw, J. Kaprio, L.M. Kaplan, Å. Johansson, M.-R.

- Jarvelin, A. Cecile J. W. Janssens, E. Ingelsson, W. Igl, G. Kees Hovingh, J.-J. Hottenga, A. Hofman, A.A. Hicks, C. Hengstenberg, I.M. Heid, C. Hayward, A.S. Havulinna, N.D. Hastie, T.B. Harris, T. Haritunians, A.S. Hall, U. Gyllensten, C. Guiducci, L.C. Groop, E. Gonzalez, C. Gieger, N.B. Freimer, L. Ferrucci, J. Erdmann, P. Elliott, K.G. Ejebe, A. Döring, A.F. Dominiczak, S. Demissie, P. Deloukas, E.J.C. de Geus, U. de Faire, G. Crawford, F.S. Collins, Y.I. Chen, M.J. Caulfield, H. Campbell, N.P. Burt, L.L. Bonnycastle, D.I. Boomsma, S.M. Boekholdt, R.N. Bergman, I. Barroso, S. Bandinelli, C.M. Ballantyne, T.L. Assimes, T. Quertermous, D. Altshuler, M. Seielstad, T.Y. Wong, E.-S. Tai, A.B. Feranil, C.W. Kuzawa, L.S. Adair, H.A. Taylor Jr, I.B. Borecki, S.B. Gabriel, J.G. Wilson, H. Holm, U. Thorsteinsdottir, V. Gudnason, R.M. Krauss, K.L. Mohlke, J.M. Ordovas, P.B. Munroe, J.S. Kooner, A.R. Tall, R.A. Hegele, J.J.P. Kastelein, E.E. Schadt, J.I. Rotter, E. Boerwinkle, D.P. Strachan, V. Mooser, K. Stefansson, M.P. Reilly, N.J. Samani, H. Schunkert, L.A. Cupples, M.S. Sandhu, P.M. Ridker, D.J. Rader, C.M. van Duijn, L. Peltonen, G.R. Abecasis, M. Boehnke, S. Kathiresan, Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids, *Nature*. 466 (2010) 707–713. doi:10.1038/nature09270.
- [85] T. Kishida, I. Kostetskii, Z. Zhang, F. Martinez, P. Liu, S.U. Walkley, N.K. Dwyer, E.J. Blanchette-Mackie, G.L. Radice, J.F. Strauss, Targeted Mutation of the MLN64 START Domain Causes Only Modest Alterations in Cellular Sterol Metabolism, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 19276–19285. doi:10.1074/jbc.M400717200.
- [86] F. Alpy, C. Wendling, M.-C. Rio, C. Tomasetto, MENTHO, a MLN64 homologue devoid of the START domain, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 50780–50787. doi:10.1074/jbc.M208290200.
- [87] J.J. Hulce, A.B. Cognetta, M.J. Niphakis, S.E. Tully, B.F. Cravatt, Proteome-wide mapping of cholesterol-interacting proteins in mammalian cells, *Nat. Methods*. 10 (2013) 259–264. doi:10.1038/nmeth.2368.
- [88] M. Suchanek, R. Hynynen, G. Wohlfahrt, M. Lehto, M. Johansson, H. Saarinen, A. Radzikowska, C. Thiele, V.M. Olkkonen, The mammalian oxysterol-binding protein-related proteins (ORPs) bind 25-hydroxycholesterol in an evolutionarily conserved pocket, *Biochem. J.* 405 (2007) 473–480. doi:10.1042/BJ20070176.
- [89] T. Vihervaara, R.-L. Uronen, G. Wohlfahrt, I. Björkhem, E. Ikonen, V.M. Olkkonen, Sterol binding by OSBP-related protein 1L regulates late endosome motility and function, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 537–551. doi:10.1007/s00018-010-0470-z.
- [90] M.M. Motazacker, J. Pirhonen, J.C. van Capelleveen, M. Weber-Boyvat, J.A. Kuivenhoven, S. Shah, G.K. Hovingh, J. Metso, S. Li, E. Ikonen, M. Jauhiainen, G.M. Dallinga-Thie, V.M. Olkkonen, A loss-of-function variant in OSBPL1A predisposes to low plasma HDL cholesterol levels and impaired cholesterol efflux capacity, *Atherosclerosis*. 249 (2016) 140–147. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.04.005.
- [91] H. Kobuna, T. Inoue, M. Shibata, K. Gengyo-Ando, A. Yamamoto, S. Mitani, H. Arai, Multivesicular Body Formation Requires OSBP-Related Proteins and Cholesterol, *PLOS Genet.* 6 (2010) e1001055. doi:10.1371/journal.pgen.1001055.
- [92] K. Zhao, N.D. Ridgway, Oxysterol-Binding Protein-Related Protein 1L Regulates Cholesterol Egress from the Endo-Lysosomal System, *Cell Rep.* 19 (2017) 1807–1818. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.028.
- [93] J. Dong, X. Du, H. Wang, J. Wang, C. Lu, X. Chen, Z. Zhu, Z. Luo, L. Yu, A.J. Brown, H. Yang, J.-W. Wu, Allosteric enhancement of ORP1-mediated cholesterol transport by PI(4,5)P₂/PI(3,4)P₂, *Nat. Commun.* 10 (2019) 829. doi:10.1038/s41467-019-08791-0.
- [94] G. Drin, J.M. von Filseck, A. Čopič, New molecular mechanisms of inter-organelle lipid transport, *Biochem. Soc. Trans.* 44 (2016) 486–492. doi:10.1042/BST20150265.
- [95] J. Moser von Filseck, A. Čopič, V. Delfosse, S. Vanni, C.L. Jackson, W. Bourguet, G. Drin, Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate, *Science*. 349 (2015) 432–436. doi:10.1126/science.aab1346.
- [96] A. Citri, Y. Yarden, EGF–ERBB signalling: towards the systems level, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 505–516. doi:10.1038/nrm1962.

- [97] M.D. Marmor, Y. Yarden, Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases, *Oncogene*. 23 (2004) 2057–2070. doi:10.1038/sj.onc.1207390.
- [98] L.P. Sousa, I. Lax, H. Shen, S.M. Ferguson, P.D. Camilli, J. Schlessinger, Suppression of EGFR endocytosis by dynamin depletion reveals that EGFR signaling occurs primarily at the plasma membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012) 4419–4424. doi:10.1073/pnas.1200164109.
- [99] C.E. Futter, A. Pearse, L.J. Hewlett, C.R. Hopkins, Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes., *J. Cell Biol.* 132 (1996) 1011–1023. doi:10.1083/jcb.132.6.1011.
- [100] F.G. Haj, Imaging Sites of Receptor Dephosphorylation by PTP1B on the Surface of the Endoplasmic Reticulum, *Science*. 295 (2002) 1708–1711. doi:10.1126/science.1067566.
- [101] L.H. Wong, E.R. Eden, C.E. Futter, Roles for ER:endosome membrane contact sites in ligand-stimulated intraluminal vesicle formation, *Biochem. Soc. Trans.* 46 (2018) 1055–1062. doi:10.1042/BST20170432.
- [102] C.E. Futter, Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor, *J. Cell Biol.* 120 (1993) 77–83. doi:10.1083/jcb.120.1.77.
- [103] S. Réty, D. Osterloh, J.-P. Arié, S. Tabaries, J. Seeman, F. Russo-Marie, V. Gerke, A. Lewit-Bentley, Structural basis of the Ca²⁺-dependent association between S100C (S100A11) and its target, the N-terminal part of annexin I, *Structure*. 8 (2000) 175–184. doi:10.1016/S0969-2126(00)00093-9.
- [104] A.T. Gatta, J.G. Carlton, The ESCRT-machinery: closing holes and expanding roles, *Curr. Opin. Cell Biol.* 59 (2019) 121–132. doi:10.1016/j.ceb.2019.04.005.
- [105] M. Stuible, J.V. Abella, M. Feldhammer, M. Nossöv, V. Sangwan, B. Blagoev, M. Park, M.L. Tremblay, PTP1B Targets the Endosomal Sorting Machinery DEPHOSPHORYLATION OF REGULATORY SITES ON THE ENDOSOMAL SORTING COMPLEX REQUIRED FOR TRANSPORT COMPONENT STAM2, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 23899–23907. doi:10.1074/jbc.M110.115295.
- [106] M. Razi, C.E. Futter, Distinct Roles for Tsg101 and Hrs in Multivesicular Body Formation and Inward Vesiculation, *Mol. Biol. Cell*. 17 (2006) 3469–3483. doi:10.1091/mbc.e05-11-1054.
- [107] K. Palande, O. Roovers, J. Gits, C. Verwijmeren, Y. Iuchi, J. Fujii, B.G. Neel, R. Karisch, J. Tavernier, I.P. Touw, Peroxiredoxin-controlled G-CSF signalling at the endoplasmic reticulum–early endosome interface, *J Cell Sci*. 124 (2011) 3695–3705. doi:10.1242/jcs.089656.
- [108] M.J. Berridge, M.D. Bootman, H.L. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 517–529. doi:10.1038/nrm1155.
- [109] J.K. Foskett, C. White, K.-H. Cheung, D.-O.D. Mak, Inositol Trisphosphate Receptor Ca²⁺ Release Channels, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 593–658. doi:10.1152/physrev.00035.2006.
- [110] E. Lloyd-Evans, A.J. Morgan, X. He, D.A. Smith, E. Elliot-Smith, D.J. Silience, G.C. Churchill, E.H. Schuchman, A. Galione, F.M. Platt, Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium, *Nat. Med.* 14 (2008) 1247–1255. doi:10.1038/nm.1876.
- [111] A. Galione, A primer of NAADP-mediated Ca²⁺ signalling: From sea urchin eggs to mammalian cells, *Cell Calcium*. 58 (2015) 27–47. doi:10.1016/j.ceca.2014.09.010.
- [112] A. Galione, S. Patel, G.C. Churchill, NAADP-induced calcium release in sea urchin eggs, *Biol. Cell*. 92 (2000) 197–204. doi:10.1016/S0248-4900(00)01070-4.
- [113] A.J. Morgan, F.M. Platt, E. Lloyd-Evans, A. Galione, Molecular mechanisms of endolysosomal Ca²⁺ signalling in health and disease, *Biochem. J.* 439 (2011) 349–378. doi:10.1042/BJ20110949.
- [114] S. Patel, S. Muallem, Acidic Ca²⁺ stores come to the fore, *Cell Calcium*. 50 (2011) 109–112. doi:10.1016/j.ceca.2011.03.009.
- [115] P.J. Calcraft, M. Ruas, Z. Pan, X. Cheng, A. Arredouani, X. Hao, J. Tang, K. Rietdorf, L. Teboul, K.-T. Chuang, P. Lin, R. Xiao, C. Wang, Y. Zhu, Y. Lin, C.N. Wyatt, J. Parrington, J. Ma, A.M. Evans, A. Galione, M.X. Zhu, NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels, *Nature*. 459 (2009) 596–600. doi:10.1038/nature08030.

- [116] E. Brailoiu, D. Churamani, X. Cai, M.G. Schrlau, G.C. Brailoiu, X. Gao, R. Hooper, M.J. Boulware, N.J. Dun, J.S. Marchant, S. Patel, Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling, *J. Cell Biol.* 186 (2009) 201–209. doi:10.1083/jcb.200904073.
- [117] S. Patel, Function and dysfunction of two-pore channels, *Sci. Signal.* 8 (2015) re7–re7. doi:10.1126/scisignal.aab3314.
- [118] B.S. Kilpatrick, E.R. Eden, L.N. Hockey, E. Yates, C.E. Futter, S. Patel, An Endosomal NAADP-Sensitive Two-Pore Ca²⁺ Channel Regulates ER-Endosome Membrane Contact Sites to Control Growth Factor Signaling, *Cell Rep.* 18 (2017) 1636–1645. doi:10.1016/j.celrep.2017.01.052.
- [119] C.I. López Sanjurjo, S.C. Tovey, C.W. Taylor, Rapid Recycling of Ca²⁺ between IP₃-Sensitive Stores and Lysosomes, *PLoS ONE.* 9 (2014) e111275. doi:10.1371/journal.pone.0111275.
- [120] C.I. López-Sanjurjo, S.C. Tovey, D.L. Prole, C.W. Taylor, Lysosomes shape Ins(1,4,5) P₃-evoked Ca²⁺ signals by selectively sequestering Ca²⁺ released from the endoplasmic reticulum, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 289–300. doi:10.1242/jcs.116103.
- [121] P. Atakpa, N.B. Thillaiappan, S. Mataragka, D.L. Prole, C.W. Taylor, IP₃ Receptors Preferentially Associate with ER-Lysosome Contact Sites and Selectively Deliver Ca²⁺ to Lysosomes, *Cell Rep.* 25 (2018) 3180–3193.e7. doi:10.1016/j.celrep.2018.11.064.
- [122] A. Malhas, C. Goulbourne, D.J. Vaux, The nucleoplasmic reticulum: form and function, *Trends Cell Biol.* 21 (2011) 362–373. doi:10.1016/j.tcb.2011.03.008.
- [123] G. Rappa, M.F. Santos, T.M. Green, J. Karbanová, J. Hassler, Y. Bai, S.H. Barsky, D. Corbeil, A. Lorico, Nuclear transport of cancer extracellular vesicle-derived biomaterials through nuclear envelope invagination-associated late endosomes, *Oncotarget.* 8 (2017). doi:10.18632/oncotarget.14804.
- [124] M.F. Santos, G. Rappa, J. Karbanova, T. Kurth, D. Corbeil, A. Lorico, VAMP-associated protein-A and oxysterol-binding protein-related protein 3 promote the entry of late endosomes into the nucleoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* (2018) jbc.RA118.003725. doi:10.1074/jbc.RA118.003725.
- [125] M. Lehto, R. Hynynen, K. Karjalainen, E. Kuismanen, K. Hyvärinen, V.M. Olkkonen, Targeting of OSBP-related protein 3 (ORP3) to endoplasmic reticulum and plasma membrane is controlled by multiple determinants, *Exp. Cell Res.* 310 (2005) 445–462. doi:10.1016/j.yexcr.2005.08.003.
- [126] A.T. Gatta, T.P. Levine, Piecing Together the Patchwork of Contact Sites, *Trends Cell Biol.* 27 (2017) 214–229. doi:10.1016/j.tcb.2016.08.010.
- [127] Y. Kakimoto, S. Tashiro, R. Kojima, Y. Morozumi, T. Endo, Y. Tamura, Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system, *Sci. Rep.* 8 (2018). doi:10.1038/s41598-018-24466-0.
- [128] N. Shai, E. Yifrach, C.W.T. van Roermund, N. Cohen, C. Bibi, L. IJlst, L. Cavellini, J. Meurisse, R. Schuster, L. Zada, M.C. Mari, F.M. Reggiori, A.L. Hughes, M. Escobar-Henriques, M.M. Cohen, H.R. Waterham, R.J.A. Wanders, M. Schuldiner, E. Zalckvar, Systematic mapping of contact sites reveals tethers and a function for the peroxisome-mitochondria contact, *Nat. Commun.* 9 (2018). doi:10.1038/s41467-018-03957-8.
- [129] J.M. Goodman, The Gregarious Lipid Droplet, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 28005–28009. doi:10.1074/jbc.R800042200.
- [130] B.-B. Chu, Y.-C. Liao, W. Qi, C. Xie, X. Du, J. Wang, H. Yang, H.-H. Miao, B.-L. Li, B.-L. Song, Cholesterol Transport through Lysosome-Peroxisome Membrane Contacts, *Cell.* 161 (2015) 291–306. doi:10.1016/j.cell.2015.02.019.
- [131] A. Hu, X.-T. Zhao, H. Tu, T. Xiao, T. Fu, Y. Wang, Y. Liu, X.-J. Shi, J. Luo, B.-L. Song, PIP4K2A regulates intracellular cholesterol transport through modulating PI(4,5)P₂ homeostasis, *J. Lipid Res.* 59 (2018) 507–514. doi:10.1194/jlr.M082149.
- [132] L.L. Lackner, J.M. Nunnari, The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1792 (2009) 1138–1144. doi:10.1016/j.bbadis.2008.11.011.
- [133] Y.C. Wong, D. Ysselstein, D. Krainc, Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis, *Nature.* 554 (2018) 382–386. doi:10.1038/nature25486.

- [134] Y. Han, M. Li, F. Qiu, M. Zhang, Y.-H. Zhang, Cell-permeable organic fluorescent probes for live-cell long-term super-resolution imaging reveal lysosome-mitochondrion interactions, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1307. doi:10.1038/s41467-017-01503-6.
- [135] K. Onoue, A. Jofuku, R. Ban-Ishihara, T. Ishihara, M. Maeda, T. Koshiba, T. Itoh, M. Fukuda, H. Otera, T. Oka, H. Takano, N. Mizushima, K. Mihara, N. Ishihara, Fis1 acts as a mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that is involved in regulation of mitochondrial morphology, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 176–185. doi:10.1242/jcs.111211.
- [136] G.P. Starling, Y.Y. Yip, A. Sanger, P.E. Morton, E.R. Eden, M.P. Dodding, Folliculin directs the formation of a Rab34–RILP complex to control the nutrient-dependent dynamic distribution of lysosomes, *EMBO Rep.* 17 (2016) 823–841. doi:10.15252/embr.201541382.
- [137] M. Johansson, N. Rocha, W. Zwart, I. Jordens, L. Janssen, C. Kuijl, V.M. Olkkonen, J. Neefjes, Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7–RILP–p150^{Glued}, ORP1L, and the receptor β III spectrin, *J. Cell Biol.* 176 (2007) 459–471. doi:10.1083/jcb.200606077.
- [138] T. Daniele, M.V. Schiaffino, Lipid transfer and metabolism across the endolysosomal–mitochondrial boundary, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1861 (2016) 880–894. doi:10.1016/j.bbalip.2016.02.001.
- [139] G. Raposo, D. Tenza, D.M. Murphy, J.F. Berson, M.S. Marks, Distinct Protein Sorting and Localization to Premelanosomes, Melanosomes, and Lysosomes in Pigmented Melanocytic Cells[Ⓢ], *J. Cell Biol.* 152 (2001) 809–824. doi:10.1083/jcb.152.4.809.
- [140] T. Daniele, I. Hurbain, R. Vago, G. Casari, G. Raposo, C. Tacchetti, M.V. Schiaffino, Mitochondria and Melanosomes Establish Physical Contacts Modulated by Mfn2 and Involved in Organelle Biogenesis, *Curr. Biol.* 24 (2014) 393–403. doi:10.1016/j.cub.2014.01.007.
- [141] S. Caplan, L.M. Hartnell, R.C. Aguilar, N. Naslavsky, J.S. Bonifacino, Human Vam6p promotes lysosome clustering and fusion in vivo, *J. Cell Biol.* 154 (2001) 109–122. doi:10.1083/jcb.200102142.
- [142] V. Poupon, A. Stewart, S.R. Gray, R.C. Piper, J.P. Luzio, The Role of mVps18p in Clustering, Fusion, and Intracellular Localization of Late Endocytic Organelles, *Mol. Biol. Cell.* 14 (2003) 4015–4027. doi:10.1091/mbc.e03-01-0040.
- [143] Y. Guo, D. Li, S. Zhang, Y. Yang, J.-J. Liu, X. Wang, C. Liu, D.E. Milkie, R.P. Moore, U.S. Tulu, D.P. Kiehart, J. Hu, J. Lippincott-Schwartz, E. Betzig, D. Li, Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales, *Cell.* 175 (2018) 1430-1442.e17. doi:10.1016/j.cell.2018.09.057.
- [144] K. Saito, L. Tautz, T. Mustelin, The lipid-binding SEC14 domain, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1771 (2007) 719–726. doi:10.1016/j.bbalip.2007.02.010.
- [145] UniProt: a worldwide hub of protein knowledge, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) D506–D515. doi:10.1093/nar/gky1049.
- [146] N. Kumar, M. Leonzino, W. Hancock-Cerutti, F.A. Horenkamp, P. Li, J.A. Lees, H. Wheeler, K.M. Reinisch, P. De Camilli, VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites, *J. Cell Biol.* 217 (2018) 3625–3639. doi:10.1083/jcb.201807019.
- [147] C. Dimaano, C.B. Jones, A. Hanono, M. Curtiss, M. Babst, Ist1 Regulates Vps4 Localization and Assembly, *Mol. Biol. Cell.* 19 (2008) 465–474. doi:10.1091/mbc.e07-08-0747.

Figure legends

Figure 1: The endocytic organelles are physically connected to the ER network

Schematic representation of the different step of clathrin-mediated endocytosis, from the uptake of exogenous biological material to lysosomal degradation. Clathrin coated pits are formed by inward budding of the plasma membrane. The newly formed clathrin vesicles containing endocytosed cargoes gradually mature into early endosomes, late endosomes and lysosomes. Endocytosed cargoes can be recycled by recycling endosomes. Endosomal positioning and tubulation need an active microtubule network. All along their life, endocytic organelles contact ER tubules (highlighted by purple circles). These ER-endosome membrane contacts regulate the dynamics of the endocytic compartment.

Figure 2: ER-Endosome contacts observed by light and electron microscopy

A. Example of an extended ER-endosome contact visualized by electron microscopy (EM). Detailed view of STARD3-expressing HeLa cells showing a contact between an ER sheet and an endosome. False colors were assigned to the ER (green), endosome (magenta), mitochondria (yellow), and nucleus (blue). An interpretation scheme of the EM image is shown on the right.

B-D. VAP-A (B), VAP-B (C) and MOSPD2 (D) labelled in green have a typical ER localization when they are expressed alone (left panels). Note the reticulated localization extending throughout the cytoplasm with a perinuclear enrichment. When co-expressed with STARD3 (right panels), VAP-A, VAP-B and MOSPD2 are enriched in ER subregions around STARD3 positive endosomes corresponding to membrane contacts. The subpanels on the right display higher magnification images (3.5X) of regions boxed in white. The Overlay panel shows merged green and magenta images. The Coloc. panel shows a colocalization mask highlighting pixels which overlap between the green and magenta channels in white. Scale bar: 10 μ m.

Figure 3: Model of ER-mediated endosome fission

A. Schematic representation of an ER-Endosome contact not involved in endosome fission.

B-C. ER mediated endosome fission. **B.** Rab7-positive endosomes contain EGFR. At the budding region of the endosome, several proteins accumulate such as FAM21 and CORO1C, while the neighboring ER tube becomes enriched in TMCC1.

C. The ER-resident TMCC1 protein drives the ER to the endosome bud, through its interaction with CORO1C. This ER-Endosome contact is built before fission occurs.

D. Rapidly after the contact (<10 s), the endosome tubule is severed from the vesicle; the contact is maintained between the ER and the endosome tubule.

Figure 4: Lipid transport at ER-Endosome contacts

A. STARD3 and ORP1L are two endosome tethers. STARD3 is an integral protein, whereas ORP1L is associated to LEs by binding with PI(4)P (via its pleckstrin homology (PH) domain) and Rab7 (via its ankyrin repeat (AR) domain). These 2 proteins have an FFAT motif enabling the interaction with the MSP domain of the ER protein VAP. At the contact, the START domain of STARD3 transports cholesterol from the ER to the LE. ORP1L transports cholesterol between the ER and LEs in both directions.

B. SNX2 and OSBP are found in early endosomes (EE). Their association with EE is mediated by phosphoinositides; SNX2 interacts with PI(3)P through its PX domain, and OSBP interacts with PI(4)P with its PH domain. SNX2 and OSBP both bind VAPs. At the interface of the ER-EE contact, the ORD domain of OSBP transports PI(4)P from the EE to the ER, making PI(4)P accessible to the phosphatase Sac1. This mechanism regulates the PI(4)P cycle on endosomes.

Figure 5: Regulation of EGFR sorting at Annexin A1-mediated ER-Endosome contacts

This model illustrates EGFR endocytosis after EGF-binding, and in the absence of low density lipoprotein (LDL)-derived cholesterol.

A. EGFR binds its ligand, which results in dimerization, autophosphorylation, and receptor activation. The activated receptor is then endocytosed. In multi-vesicular bodies (MVB), EGFR mediates Annexin A1 phosphorylation. EGFR-MVB/ER contact is formed by Annexin A1-S100-A11 interaction. This allows the phosphatase PTP1B sitting on the ER to interact with EGFR, and the formation of a protein complex composed of VAP and ORP1L. At the interface of the contact, EGFR is dephosphorylated by PTP1B, and internalized in intra luminal vesicles (ILVs) formed by the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) machinery. Within the contact, cholesterol is transferred to the endosome by ORP1L.

B. Close-up of the EGFR-MVB/ER contact. Through its amino-terminal part, Annexin A1 interacts with S100-A11 in a calcium-dependent manner. PTP1B interacts with EGFR and the ESCRT-0 component HRS, and mediates their dephosphorylation. The ubiquitinated EGFR is recognized by HRS via its ubiquitin-interacting motif. The VAP-ORP1L complex is formed by the interaction of the MSP domain of VAP with the FFAT motif of ORP1L.

Table I: Molecular architecture and associated functions of ER-Endosome contacts involving proteins from the MSP-domain family

The proteins in rows are partners. On the left are shown the ER-receptors VAP-A, VAP-B and MOSPD2 belonging to the MSP family, and on the middle their endosomal partners, all having a FFAT motif. On the right, functions associated with each tethering complex are indicated.

Abbreviations: Proteins: **STARD3**: StAR related lipid transfer protein 3; **STARD3NL**: STARD3 N-terminal like; **ORPs**: oxysterol binding protein (OSBP)-related proteins; **SNX2**: sorting nexin 2. Protein regions: **TM**: transmembrane domain; **CC**: coiled-coil domain; **MSP**: major sperm protein domain; **CRAL-TRIO**: cellular retinaldehyde-binding protein and triple functional domain protein domain [144]; **MENTAL**: Metastatic Lymph Node 64 (MLN64/STARD3) N-terminal domain; **START**: steroidogenic Acute Regulatory protein related lipid transfer domain; **AR**: ankyrin repeat; **PH**: pleckstrin homology domain; **ORD**: oxysterol binding protein (OSBP)-related ligand-binding domain; **PX**: phox domain; **BAR**: bin-Amphiphysin-Rvs domain. Main source: Uniprot [145].

Table II: Molecular architecture of ER-Endosome contacts excluding the MSP-containing family, and associated functions

The proteins in rows are partners. The ER tether is on the right, the endosome partner on the middle and the associated function on the right. Note that Vacuolar protein sorting-associated protein 13-C (VPS13-C) protein builds ER-Endosome contacts; the molecular mechanism of formation of this contact is not known [146]. Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor (IP3R) acts at ER-Endosome contacts built by another yet unidentified machinery. Protein regions mediating the interaction within the complex are labeled with an asterisk.

Abbreviations: Proteins: **TMCC1**: transmembrane and coiled-coil domains protein 1; **RNF26**: Ring finger protein 26; **PTP1B**: protein tyrosine phosphatase 1B; **CORO1C**: coronin 1C; **SQSTM1**: sequestosome 1; **TOLLIP**: toll-interacting protein; **EPS15**: Epidermal growth factor receptor substrate 15; **HRS**: hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate; **TPC1**: two-pore channel 1; **EGFR**: epidermal growth factor (EGF) receptor. Protein regions: **TM**: transmembrane domain; **CC**: coiled-coil domain; **HD**: hydrophobic domain; **MIT**: microtubule interacting and trafficking domain; **Microtubule-BD**: Microtubule-binding domain [65]; **Rab11-BD**: Rab11-binding domain; **LCR**: low complexity region; **KIF5-BD**: kinesin family member 5B-binding domain; **FYVE**: domain named after

Fab 1, YOTB, Vac1, and EEA1 [36,49]; **TPP** : tyrosine protein phosphatase domain; **WD40**: WD40 repeats; **DH-like**: Dbl homology-like domain; **PH**; pleckstrin homology domain; **IP3-BD**: inositol 1,4,5-trisphosphate-binding region; **MIR** : motif named after Mannosyltransferase, IP3R and Ryanodine receptor (RyR); **ELYC** domain [147]; **PI(3)P**: phosphatidylinositol 3-phosphate; **RING**: really interesting new gene domain; **PB1**: Phox and Bem1 domain; **ZZ**: zinc finger ZZ-type domain; **LIR**: LC3-interacting region; **UBA**: ubiquitin-associated domain; **TBD**: Tbk1/Ikki binding domain; **CUE**: coupling of ubiquitin conjugation to endoplasmic reticulum (ER) degradation domain; **EH**: Eps15 homology domain; **UIM**: ubiquitin-interacting motif; **S100-A11-BR**: S100-A11-binding region [103]; **PK**: protein kinase domain; **Ligand-BD**: ligand-binding region; **VHS**: domain derived from its occurrence in VPS-27, Hrs and STAM. Main source: Uniprot [145].

ACCEPTED MANUSCRIPT

Acknowledgments:

We thank Alastair McEwen for his critical reading of the manuscript. TDM received an allocation from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM; <https://www.frm.org/>). This work was supported by grants from the Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est; <https://www.ligue-cancer.net>) and the Institut National Du Cancer (INCA_9269; www.e-cancer.fr). The authors also acknowledge funds from the Institut National de Santé et de Recherche Médicale (<http://www.inserm.fr/>), the Centre National de la Recherche Scientifique (<http://www.cnrs.fr/>), the Université de Strasbourg (<http://www.unistra.fr>), and the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

ACCEPTED MANUSCRIPT

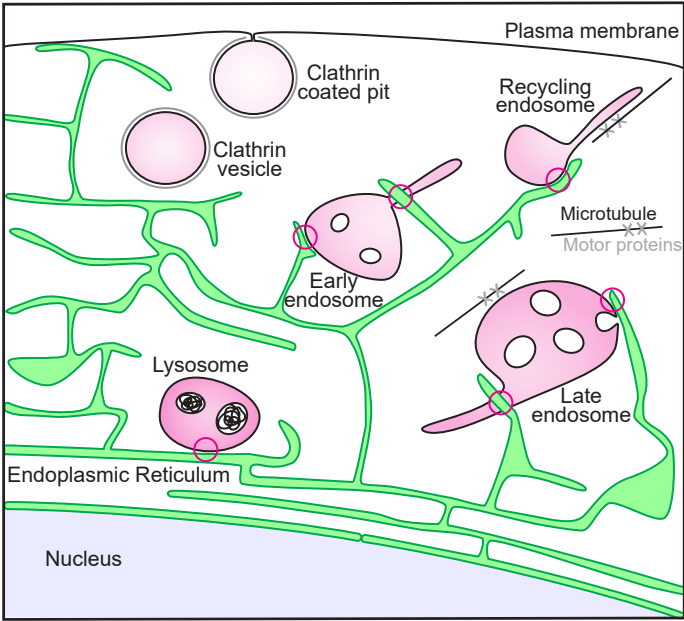


Figure 1

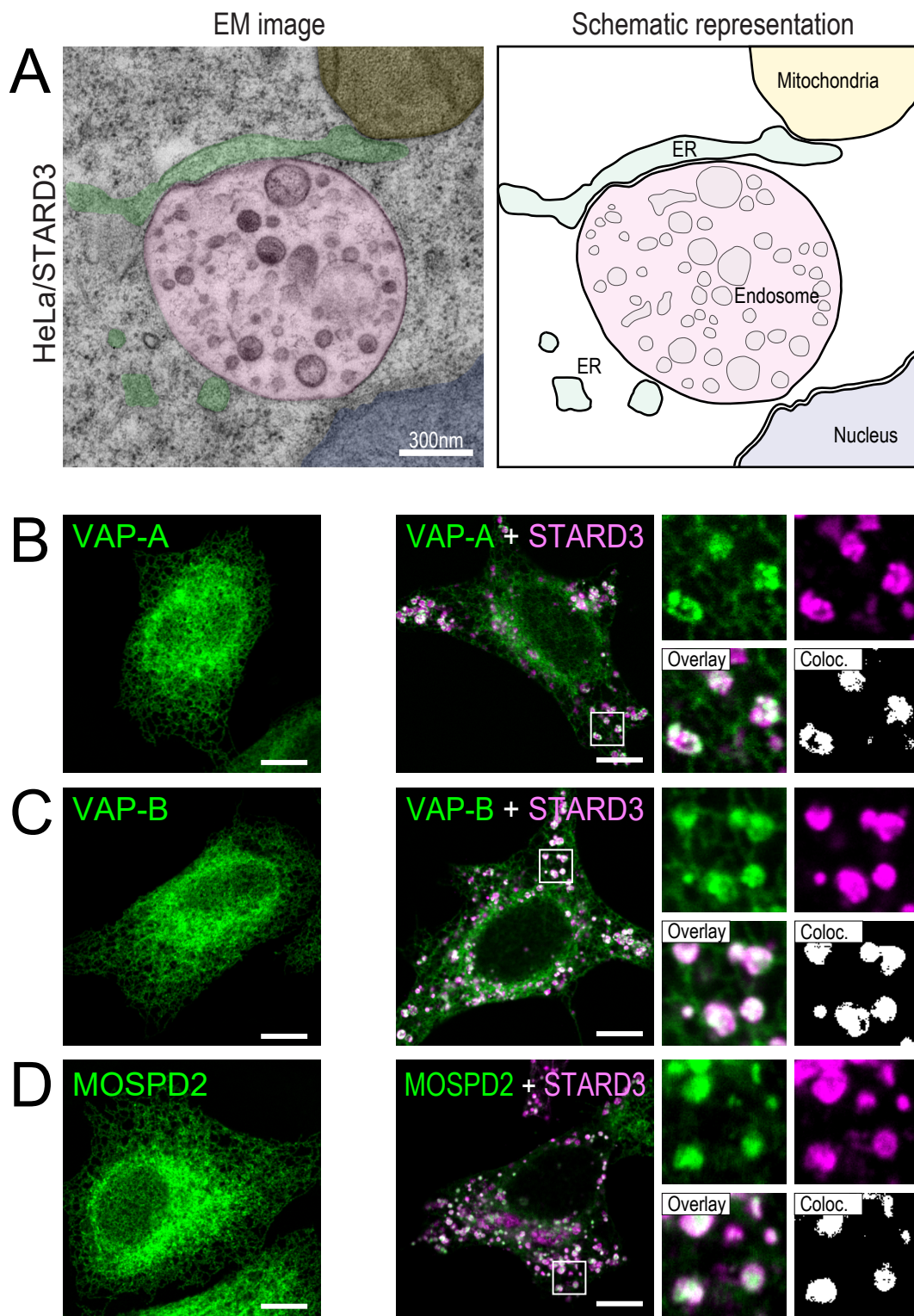


Figure 2

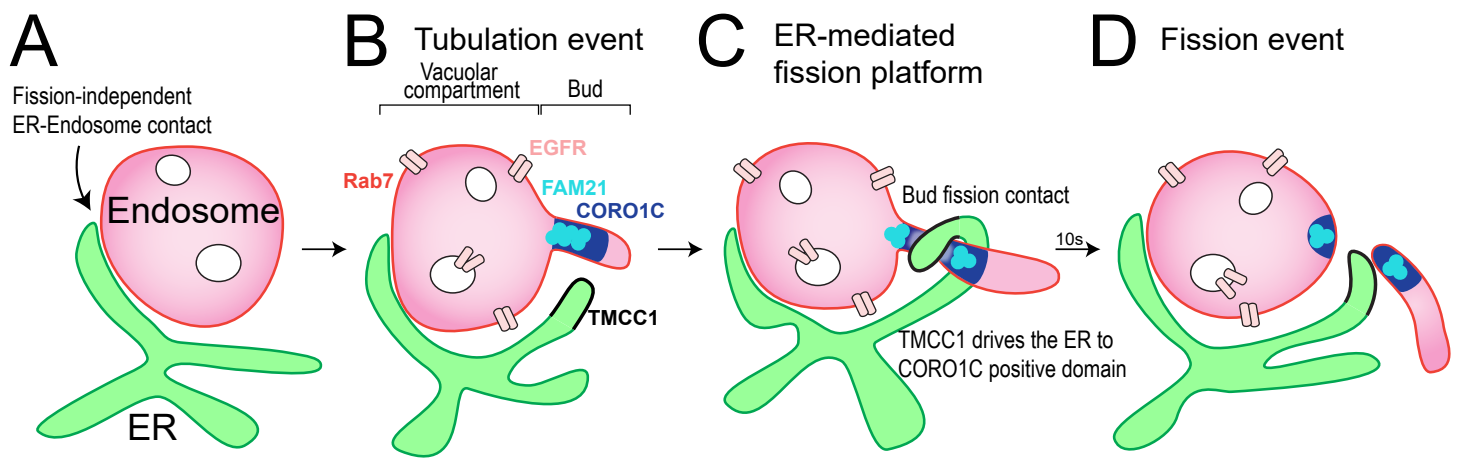


Figure 3

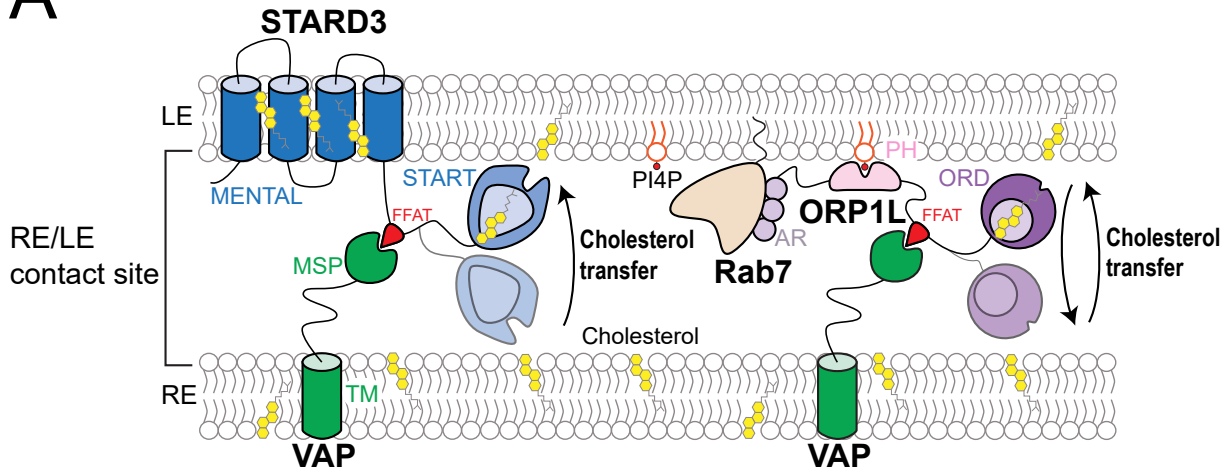
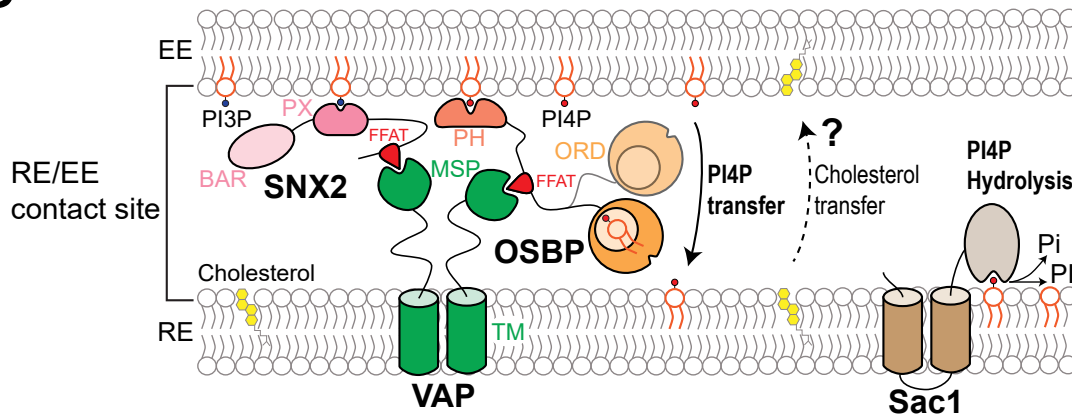
A**B**

Figure 4

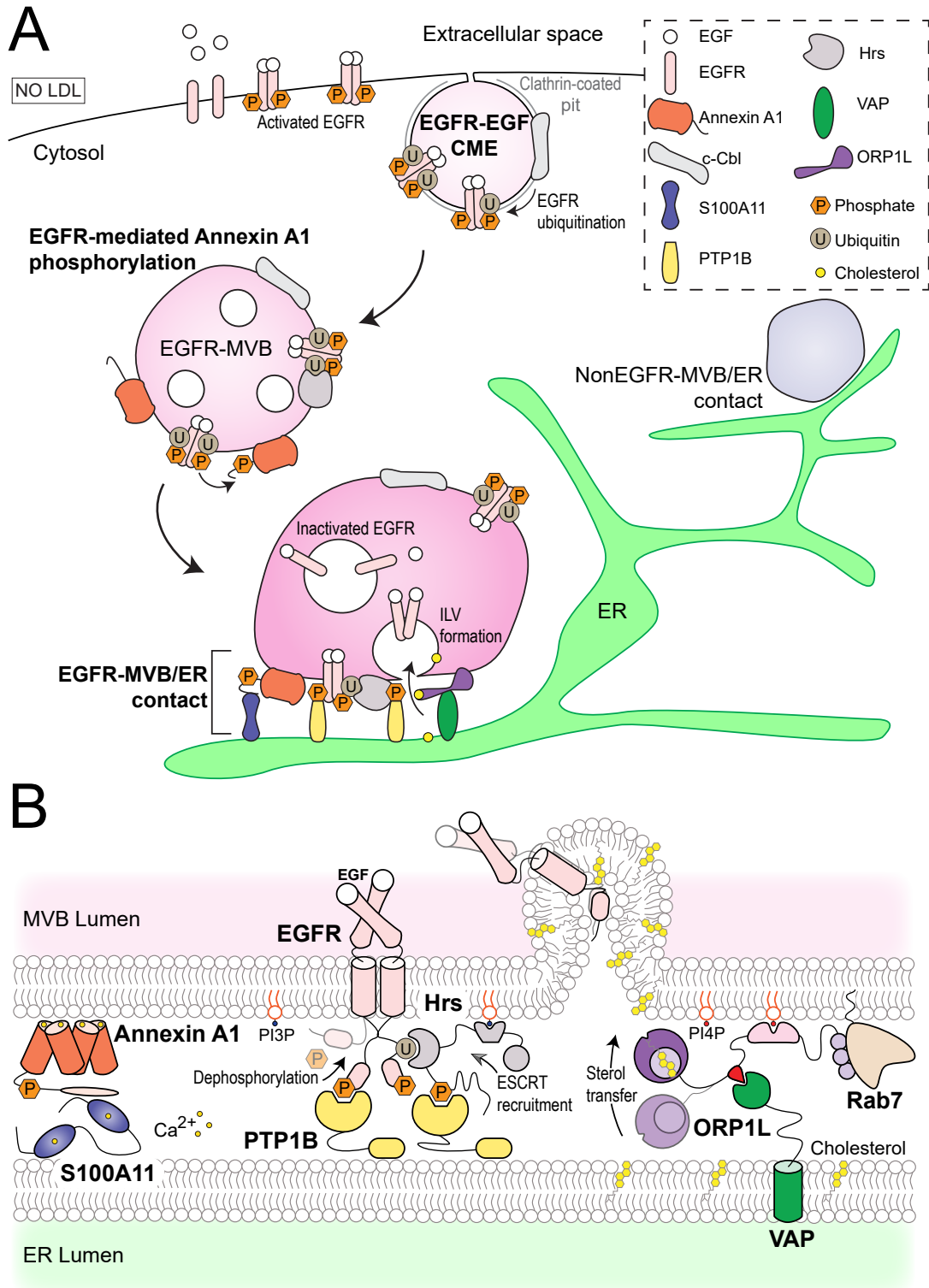


Figure 5

Protein complexes

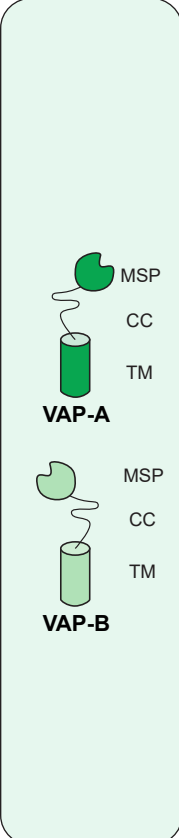
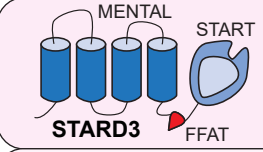
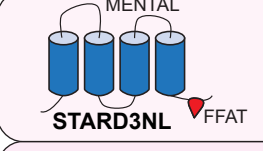
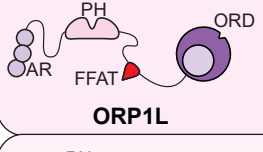
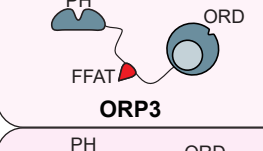
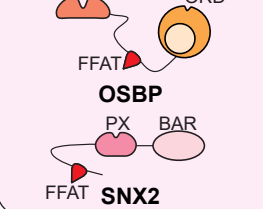
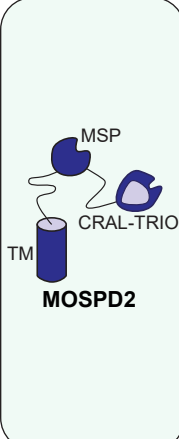
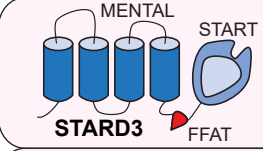
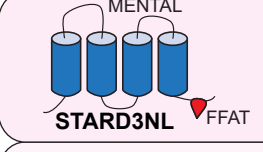
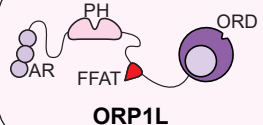
ER-protein (with an MSP domain)	Endosomal protein (with an FFAT motif)	Associated function
 <p>VAP-A</p> <p>VAP-B</p>	 <p>STARD3</p>	<p>Cholesterol transport from the ER to late endosomes mediated by the START domain of STARD3 (see Fig. 4A).</p> <p>Alpy et al., 2013; Wilhelm et al., 2017</p>
	 <p>STARD3NL</p>	<p>Control of endosomal vesicle-to-tubule transitions.</p> <p>Alpy et al., 2013</p>
	 <p>ORP1L</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Regulation of endosome positioning. - Cholesterol transport between late endosomes and the ER, mediated by the ORD domain of ORP1L (see Fig. 4A). <p>Rocha et al., 2009; Eden et al., 2016; Zhao and Ridgway 2017</p>
	 <p>ORP3</p>	<p>Mediates late endosomes and nucleoplasmic reticulum contact formation.</p> <p>Santos et al., 2018</p>
	 <p>OSBP</p> <p>SNX2</p>	<p>PI4P transport from endosomes to the ER mediated by the ORD domain of OSBP (see Fig. 4B). This VAP-dependent regulation of PI4P level affects actin nucleation and retromer function.</p> <p>Dong et al., 2016</p>
	 <p>MOSPD2</p>	 <p>STARD3</p>
 <p>STARD3NL</p>		<p>Mediates ER-Endosome tethering.</p> <p>Di Mattia et al., 2018</p>
 <p>ORP1L</p>		<p>Mediates ER-Endosome tethering.</p> <p>Di Mattia et al., 2018</p>

Table I

Protein complexes

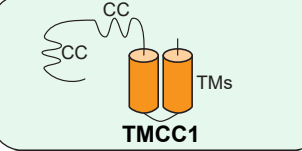
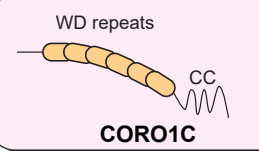
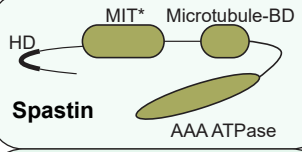
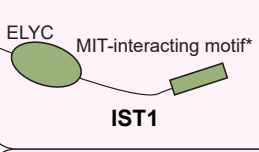
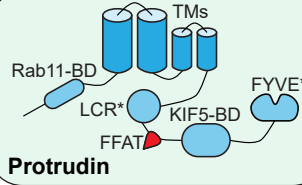
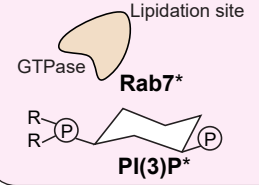
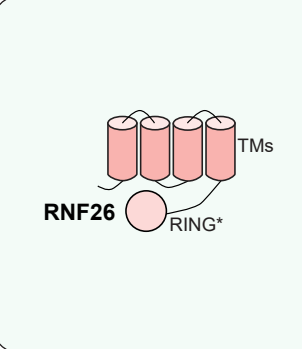
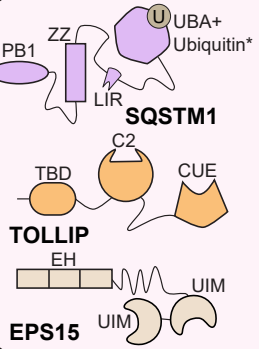
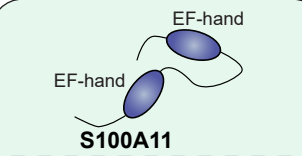
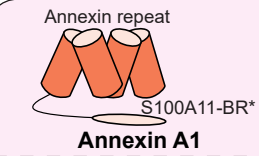
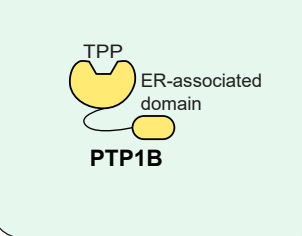
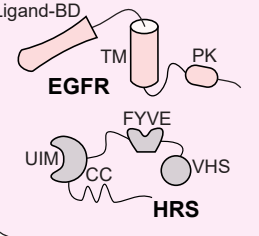
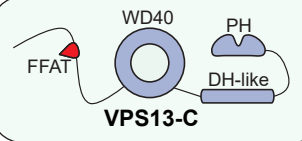
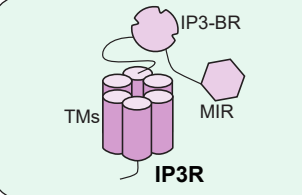
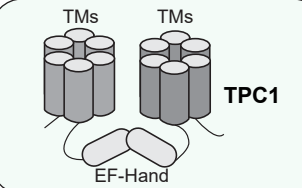
ER-protein	Endosomal protein/lipid	Associated function
 <p>TMCC1</p>	 <p>CORO1C</p>	<p>TMCC1 drives the ER to the endosomal CORO1C positive domains which regulates endosomal fission (see Fig. 3).</p> <p>Rowland et al., 2014; Hoyer et al., 2018</p>
 <p>Spastin</p>	 <p>IST1</p>	<p>Regulation of endosomal fission, depending on a functional ATPase activity.</p> <p>Allison et al., 2017</p>
 <p>Protrudin</p>	 <p>Rab7* PI(3)P*</p>	<p>Regulation of endosome translocation and neurite outgrowth.</p> <p>Raiborg et al., 2015</p>
 <p>RNF26</p>	 <p>SQSTM1 TOLLIP EPS15</p>	<p>Regulation of the dynamics and positioning of endosomal vesicles.</p> <p>Jongsma et al., 2016</p>
 <p>S100A11</p>	 <p>Annexin A1</p>	<p>Dephosphorylation of endocytosed EGFR by the phosphatase PTP1B in Annexin A1-dependent contact sites. PTP1B also dephosphorylates the ESCRT0 components HRS and STAM (not represented here). Furthermore, in the contact, ORP1L transports cholesterol from the ER to the EGFR/MVB; this transport of cholesterol supports the formation of intra luminal vesicles (see Fig. 5).</p>
 <p>PTP1B</p>	 <p>EGFR HRS</p>	<p>Haj et al., 2002; Stuible et al., 2010; Eden et al., 2016</p>
 <p>VPS13-C</p>		<p>Glycerolipid transport between ER-Endosome membranes mediated by the amino-terminal part of the VPS13 protein.</p> <p>Kumar et al., 2018</p>
 <p>IP3R</p>		<p>Calcium delivery from the ER to lysosomes.</p> <p>Atakpa et al., 2018</p>
 <p>TPC1</p>		<p>Regulation of EGFR signaling.</p> <p>Kilpatrick et al., 2017</p>

Table II

3. [Les contacts entre le RE et les mitochondries, des régions associées à de multiples fonctions](#)

Les mitochondries sont des organites semi-autonomes (c'est-à-dire qu'elles possèdent leur propre matériel génétique) possédant une origine bactérienne. En effet, elles sont nées de l'incorporation d'une protéobactérie par un précurseur de la cellule eucaryote moderne. Morphologiquement, les mitochondries possèdent une double membrane : une membrane externe, séparée par l'espace inter-membranaire mitochondrial d'une membrane interne, structurée en crêtes filiformes dirigées vers l'intérieur de la matrice mitochondriale. Cet organite est associé à de nombreux processus biologiques incluant la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate), la production d'hormones stéroïdes ou encore l'apoptose (Friedman and Nunnari, 2014).

Les premières preuves de l'existence de zones de rapprochement entre le RE et les mitochondries ont été révélées dans les années 1950, par microscopie électronique à transmission (Bernhard, 1956; Copeland, 1959; Ruby et al., 1969). Ces découvertes constituent par ailleurs les premiers exemples de contacts membranaires impliquant le RE. Par la suite, en 1990, les travaux menés par Jean Vance ont permis de mettre en lumière biochimiquement l'existence de sous-compartiments du RE spécifiquement associés aux mitochondries, nommés MAM (mitochondria-associated membrane ; Vance, 1990). Dans les années qui ont suivies cette découverte inédite, la compréhension fonctionnelle des MAM a pris de l'ampleur révélant que ces sous-domaines du RE communiquent activement avec les mitochondries et sont impliqués dans de nombreux processus biologiques incluant principalement le métabolisme lipidique, les échanges calciques et la régulation de la dynamique mitochondriale (de Brito and Scorrano, 2008; De Vos et al., 2012; Friedman et al., 2011; Guo et al., 2018; Stone and Vance, 2000; Szabadkai et al., 2006; Vance, 2014).

3.1 Métabolisme lipidique

Les lipides constituent une large variété de molécules essentielles à la vie, ayant comme caractéristique commune d'être non ou faiblement solubles dans l'eau. Ils sont généralement constitués d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe. Le caractère hydrophobe des lipides fait de ces molécules des composants structuraux essentiels des membranes. Ainsi, au niveau cellulaire, les lipides déterminent l'intégrité et l'identité des compartiments

intracellulaires. La plupart des organites possèdent une membrane dont la composition lipidique est unique et adaptée à leurs fonctions. La régulation du transport lipidique entre les membranes cellulaires est essentielle pour maintenir un équilibre vital. Le trafic des lipides à l'intérieur de la cellule nécessite des machineries cellulaires spécifiques permettant le transport de molécules hydrophobes à travers un environnement hydrophile. Il existe des transports vésiculaires et non-vésiculaires des lipides (**Figure I8**) (Holthuis and Levine, 2005).

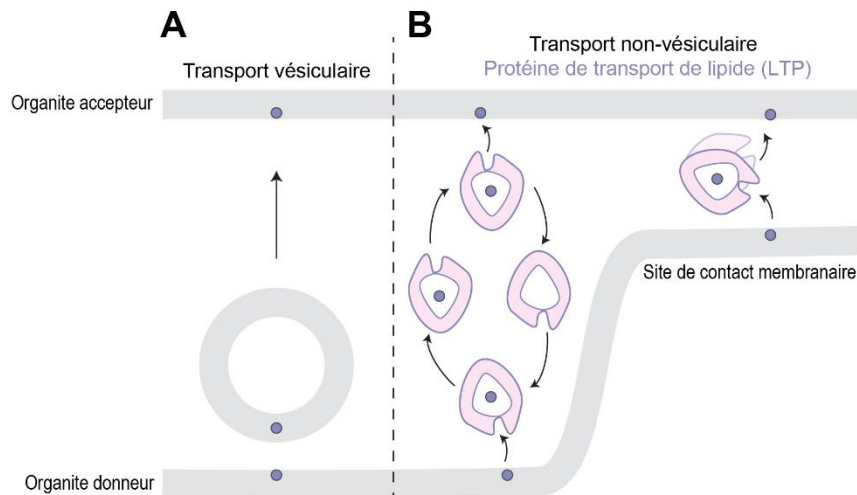


Figure I8 : Trafic intracellulaire des lipides : transport vésiculaire et non vésiculaire

Deux mécanismes distincts assurent le transport des lipides dans la cellule :

A. Le transport vésiculaire : une vésicule contenant un lipide (bleu) se forme au niveau de la membrane d'un organite donneur. Cette vésicule traverse le cytoplasme hydrophile pour fusionner avec la membrane d'un organite receveur où le lipide sera délivré.

B. Le transport non-vésiculaire : une protéine spécialisée appelée LTP (rose) charge un lipide d'une membrane d'un organite donneur et le transfère à une membrane d'un organite receveur. Ce système de navette est plus efficace au niveau des SCM. L'espace entre les membranes des deux compartiments cellulaires est le plus souvent inférieur à 30 nm.

Lors d'un transport vésiculaire les molécules lipidiques sont localisées dans une vésicule issue du bourgeonnement d'une membrane donneuse. Cette vésicule va ensuite voyager à travers le cytoplasme hydrophile et fusionner avec un compartiment membranaire receveur (van Meer et al., 2008). Le transport non-vésiculaire, quant à lui, fait intervenir des protéines spécialisées appelées protéines de transport de lipides ou LTP. Le mode d'action des LTP comprend plusieurs étapes qui doivent être coordonnées; d'abord l'extraction d'une molécule de lipide de la membrane d'un compartiment donneur, puis le transfert de cette molécule à travers l'environnement cytoplasmique hydrophile et finalement le relargage du cargo à la

membrane d'un compartiment accepteur (Lev, 2010). Selon le modèle proposé par Levine et Loewen, modèle ayant été par la suite appuyé et validé, les LTP peuvent agir spécifiquement au niveau des SCM (Kawano et al., 2006; Levine and Loewen, 2006; Wilhelm et al., 2017). Ceci permettrait d'optimiser le transport inter-membranaire de molécules lipidiques et d'éviter aux LTP de traverser une longue distance (supérieure à l'espace entre les membranes engagées dans un SCM) dans un environnement aqueux tel que le cytoplasme.

Historiquement, contribuer au métabolisme lipidique a été la première fonction attribuée aux complexes RE-Mitochondrie (Vance, 1990). En 1990, Jean Vance a révélé l'existence d'un sous ensemble d'enzymes présentes au niveau des MAM, capables de synthétiser *in vitro* différents types de phospholipides présents au niveau des membranes mitochondriales (Vance, 1990). La phosphatidylsérine (PS), par exemple, est un phospholipide synthétisé dans la membrane du RE. La PS peut être envoyée dans la membrane des mitochondries pour y subir une conversion en phosphatidyléthanolamine (PE) par l'intermédiaire de l'enzyme PS decarboxylase (Schuiki and Daum, 2009). La PE peut ensuite retourner dans la membrane du RE et être convertie en phosphatidylcholine (PC), ou être redistribuée dans d'autres membranes de la cellule (Figure I9). La mitochondrie constitue ainsi une source importante de PE cellulaire.

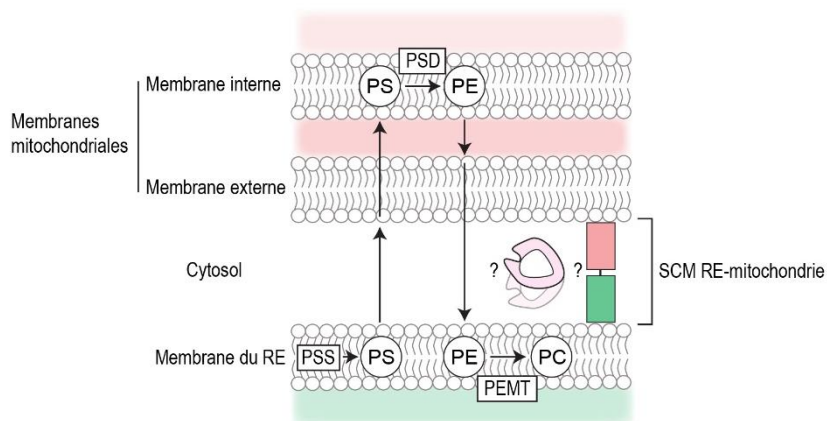


Figure I9 : Echange de lipides au niveau des contacts RE-Mitochondrie

La phosphatidylsérine (PS) est synthétisée dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) par des enzymes PS synthase (PSS). Elle est transportée vers la membrane interne des mitochondries où elle est convertie en phosphatidyléthanolamine (PE) par la PS décarboxylase (PSD). La PE ainsi synthétisée peut soit retourner dans la membrane du RE pour être convertie en PC par l'enzyme PE-N-méthyltransférase (PEMT) soit être redistribuée dans d'autres membranes cellulaires. Le(s) complexe(s) d'ancrage et la machinerie de transport de lipides agissant au niveau de ces contacts ne sont pas bien caractérisés. La mitofusine 2 (non représentée) favoriserait le transport de PS du RE vers les mitochondries.

De façon remarquable, l'inhibition de l'activité enzymatique de la PS decarboxylase cause une accumulation de PS au niveau des MAM (Shiao et al., 1995). Aussi, les enzymes PS synthase 1 et 2, servant à la biosynthèse de PS, sont spécifiquement enrichies dans les MAM (Stone and Vance, 2000). Ces données soutiennent le fait que la PS nouvellement synthétisée est transférée vers les mitochondries au niveau des zones de contacts membranaires RE-Mitochondrie. Un autre exemple concerne la synthèse de la cardiolipine, un lipide spécifiquement retrouvé dans la membrane interne des mitochondries, dont le précurseur, l'acide phosphatidique, est localisé à la membrane du RE. Il semble donc logique qu'un rapprochement étroit entre la membrane du RE et des mitochondries représente une stratégie de choix pour faciliter le transfert de lipide à travers le cytoplasme aqueux. Il existe ainsi une régulation du métabolisme lipidique au niveau des contacts RE-Mitochondrie issue des activités combinées d'enzymes présentes dans les membranes de ces deux organites.

La nature des protéines d'ancrage ainsi que de la machinerie de transport de lipides au niveau des SCM RE-Mitochondrie ne sont pas bien caractérisées. Toutefois, il a récemment été montré par Hernández-Alvararez et ses collègues que la protéine mitofusine 2 (MFN2, une protéine d'ancrage localisée au niveau des SCM RE-Mitochondrie) est capable de s'associer spécifiquement à la PS et d'extraire ce lipide des membranes *in vitro*. A travers ces capacités, MFN2 favoriserait le transport de PS du RE vers les mitochondries et ainsi la synthèse de PE dans les mitochondries. Aussi, les auteurs ont montré que l'inhibition de l'expression de MFN2 dans des tissus hépatiques engendre une diminution de la quantité de PE mitochondriale dans ce tissu (de Brito and Scorrano, 2008; Hernández-Alvarez et al., 2019). Ces données renforcent l'implication de MFN2 dans le métabolisme lipidique associé aux mitochondries. La protéine MFN2 constituerait en partie la machinerie de transport de lipides au niveau des SCM RE-Mitochondrie. Les protéines ORP5 et ORP8 de la famille des protéines ORP représentent également des candidats intéressants. En effet, elles sont capables de ponter les membranes du RE et de la membrane plasmique et de transporter des phospholipides tels que le PS du RE vers la membrane plasmique (Chung et al., 2015). Ces protéines sont aussi localisées au niveau des contacts entre le RE et les mitochondries. Ces données suggèrent que ORP5 et ORP8 peuvent transporter la PS également à cette interface (Galmes et al., 2016).

3.2 Signalisation calcique

Le RE représente le lieu où la majorité du calcium intracellulaire est stockée. A la suite de stimuli extérieurs et en fonction des besoins de la cellule, le calcium contenu dans le RE peut être libéré dans le cytoplasme via des canaux calciques, tels que les IP3R (inositol trisphosphate receptor) présents à la surface du RE. Plusieurs fonctions sont associées à la signalisation calcique intracellulaire comme la contraction musculaire, la transduction du signal ou encore la libération de neurotransmetteurs (Berridge et al., 2003). Dans une moindre mesure, les mitochondries représentent également des organites capables d'emmagasiner du calcium ; à un niveau basal, la concentration calcique mitochondriale est d'environ 100 nM contre environ 500 μ M dans le RE. Au niveau de la mitochondrie, les signaux calciques peuvent réguler la production d'énergie et la mort cellulaire en modulant l'activité de certaines enzymes mitochondriales, et également la dynamique mitochondriale (Takeuchi et al., 2015; Vance, 2014). L'assimilation du calcium par les mitochondries fait intervenir des canaux calciques, incluant VDAC (voltage-dependent anion-selective channel protein) et MCU (mitochondrial calcium uniporter), localisés respectivement sur les membranes externes et internes des mitochondries.

Les premières preuves de l'existence de transfert calcique au niveau des SCM entre le RE et les mitochondries remontent aux années 1990. Dans ces premières études les auteurs ont démontrés qu'à l'interface RE-Mitochondrie, l'augmentation du flux calcique à travers le récepteur à l'IP3 (IP3R) engendre une augmentation du niveau de calcium à la surface des mitochondries et augmente l'assimilation du calcium par les mitochondries (Rizzuto et al., 1993, 1998). Par la suite, de nombreuses études ont confirmé l'importance des contacts RE-Mitochondrie dans la régulation du transfert calcique entre ces deux compartiments. A titre d'exemple, en 2010, une étude publiée par des pionniers du domaine a montré qu'un système d'ancrage artificiel inductible entre le RE et les mitochondries pouvait être utilisé pour modifier les échanges de calcium (Csordás et al., 2010). Plus précisément, les auteurs ont généré des protéines de fusion associées soit à la membrane des mitochondries soit à celle du RE, capables de former un lien covalent après addition de rapamycine dans le système. L'ancrage artificiel induit par la rapamycine engendre une augmentation du transfert calcique du RE vers les mitochondries. Plus intéressant encore, ils ont montré que la variation de la distance entre les deux membranes (RE et mitochondriale) mène à des altérations de l'efficacité du transfert

calcique. Cette effet serait dû au fait que lorsque les membranes des deux organites sont trop proches, l'espace inter-membranaire est trop faible pour pouvoir accueillir le récepteur à l'IP3 (Csordás et al., 2010), et donc, permettre un transport efficace du calcium. Ces données soutiennent le fait que la fabrication de contacts RE-Mitochondrie ainsi que leur organisation régule la capacité du calcium à être transféré entre ces deux compartiments.

D'un point de vu mécanistique, le transfert calcique entre le RE et les mitochondries fait intervenir plusieurs molécules mentionnées précédemment. Le calcium est libéré de la lumière du RE vers le milieu extérieur à travers le récepteur à l'IP3. Ensuite, le calcium passe à travers la membrane externe de la mitochondrie par l'intermédiaire du canal VDAC (Csordás et al., 2018; Rapizzi et al., 2002; Rizzuto et al., 1998). Une fois dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, il peut utiliser la protéine MCU pour être importer dans la matrice mitochondriale (De Stefani et al., 2011). Les protéines VDAC et IP3R sont physiquement liées par la protéine cytoplasmique chaperone Grp75 (chaperone glucose-regulated protein 75). Cette chaperone promeut la formation du complexe VDAC-IP3R et, de ce fait, régule l'entrée du calcium dans les mitochondries (Figure I10) (Szabadkai et al., 2006). Bien que le complexe VDAC-Grp75-IP3R ait une fonction évidente dans la régulation du transfert calcique au niveau des contacts RE-Mitochondrie, son implication dans la formation et maintien de ces derniers reste à être clarifiée.

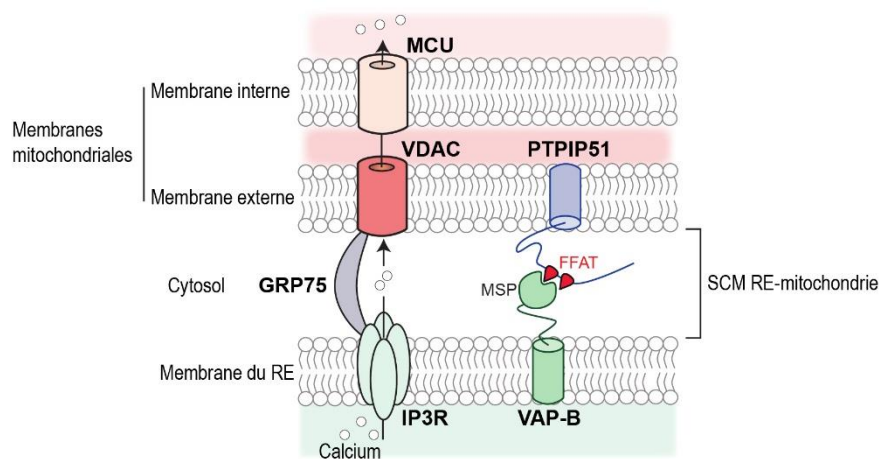


Figure I10 : Echanges calciques au niveau des contacts RE-Mitochondrie

Le réticulum endoplasmique (RE) est le lieu de stockage de calcium principal de la cellule. En fonction des besoins de la cellule, le calcium quitte le RE par le récepteur à l'IP3 (IP3R) et entre dans la mitochondrie par les canaux VDAC et MCU. La protéine GRP75 interagit avec le IP3R et VDAC. A cette interface, l'interaction entre VAP-B et PTPIP51 serait impliquée dans l'établissement du contact. PTPIP51 possède un domaine TM permettant son ancrage dans la membrane externe des mitochondries et interagit via ses motifs FFAT avec le domaine MSP de VAP-B.

D'autres complexes protéiques sont capables de former des contacts RE-Mitochondrie et de moduler les échanges de calcium entre ces deux compartiments. Comme il a été mentionné dans la section 1 de ce chapitre introductif, le complexe composé des protéines VAP-B et PTPIP51 est capable de fabriquer des contacts membranaires entre le RE et les mitochondries (Stoica et al., 2014). En fait, ce complexe est également impliqué dans la régulation de l'homéostasie calcique. L'augmentation de l'expression des protéines VAP-B ou PTPIP51 dans les cellules induit une augmentation de l'interaction entre les protéines IP3R et VDAC et, de manière concomitante, une augmentation de l'assimilation de calcium par les mitochondries (**Figure I10**). Ce phénotype est associé à une régulation négative de l'autophagie (Gomez-Suaga et al., 2017). Un autre exemple récent concerne la protéine du RE PDZD8 (PDZ domain-containing protein 8). Similairement à VAP-B et PTPIP51, PDZD8 est une protéine d'ancrage capable de médier le rapprochement des membranes du RE et des mitochondries. Aussi, cette protéine régule la dynamique calcique entre le RE et les mitochondries dans les cellules neuronales. Le mécanisme à travers lequel PDZD8 fabrique les contacts et comment cette protéine module le transfert de calcium reste encore à être élucidé (Hirabayashi et al., 2017).

3.3 Fusion et fission mitochondriale

Les mitochondries sont des organites dynamiques dont la morphologie et la taille sont régulées par des événements de fission et de fusion. En fonction du type cellulaire, les mitochondries adoptent différentes formes allant de petites vésicules à des tubules allongés. Dans les cellules de mammifères par exemple, ces organites forment un réseau tubulaire le long du cytosquelette. De nombreuses pathologies humaines sont associées à des défauts morphologiques des mitochondries, rendant importante la compréhension des mécanismes impliqués dans les événements de fission et de fusion mitochondriale (Suárez-Rivero et al., 2016).

Fission et fusion sont régulées par des machineries protéiques différentes. La fission mitochondriale fait intervenir la protéine GTPase cytoplasmique Drp1 (dynamain 1-like protein) (Smirnova et al., 2001). Cette protéine est capable de s'oligomériser autour des mitochondries en forme de spirale. Les changements conformationnels de cette protéine, induits par l'hydrolyse du GTP, provoquent la constriction des mitochondries. Drp1 est recrutée à la surface des mitochondries à travers son interaction avec ses partenaires protéiques présents à leur surface, comme par exemple MFF (mitochondrial fission factor) ou Fis1 (mitochondrial

fission protein 1) (Losón et al., 2013). Les processus de fusion font intervenir les protéines GTPase mitofusines 1 et 2 et la GTPase (dynamine-like) OPA-1 (optic atrophy 1). Les mitofusines permettent l'accolement puis la fusion entre les membranes externes mitochondriales de manière dépendante du GTP. OPA-1 quant à elle régule la fusion des membranes internes mitochondriales (Filadi et al., 2018; Ishihara et al., 2006; Santel and Fuller, 2001).

De manière intéressante, Friedman et ses collègues ont rapporté en 2011, que les événements de fission mitochondriale s'établissent au niveau de sites où le RE est en contact avec les mitochondries (**Figure I11 A**) (Friedman et al., 2011). Dans ce processus, plusieurs machineries fonctionnent de manière séquentielle selon le modèle qui suit. D'abord, la protéine du RE IFN2 (inverted formin 2) est recrutée à la surface des mitochondries par son interaction avec la protéine mitochondriale Spire 1C (Korobova et al., 2013; Manor et al., 2015). Ensemble, ces protéines promeuvent la polymérisation d'actine autour des mitochondries, ce qui engendre une diminution du diamètre mitochondriale (Korobova et al., 2013; Manor et al., 2015). Ensuite, la protéine Drp1 est recrutée au niveau des sites de constriction marqués par le RE et permet de contracter d'avantage les mitochondries (**Figure I11 B**) (Friedman et al., 2011). De façon remarquable, plus de 80% de la protéine Drp1 se localise au niveau des contacts entre le RE et les mitochondries (Friedman et al., 2011). Selon le modèle proposé par l'équipe de Gia Voeltz publié en 2016, la protéine Drp1 ne serait pas suffisante pour médier la fission complète des mitochondries. Une autre protéine GTPase nommée Dyn2 (dynamine 2) agirait en aval de Drp1 pour finaliser cette fission. Ainsi, cette protéine constituerait un composant essentiel de la machinerie de division des mitochondries (Lee et al., 2016). Ce modèle a tout récemment été réfuté par Fonseca et ses collègues. Ils ont montré que des cellules knock-out pour les protéines Dyn1, 2 et 3, aussi bien que des cellules déficientes pour la Dyn2 seulement, n'affichent aucun défaut de fission mitochondriale ; des défauts de fission ont en revanche été observés dans les cellules déficientes pour Drp1. Ces travaux montrent que la protéine Dyn2 n'est pas requise pour la division des mitochondries (Fonseca et al., 2019). D'autres études sont requises pour clarifier l'implication de la protéine Dyn2 dans les processus de fission mitochondriale. Cette implication pourrait être contexte-dépendant.

En plus de leur implication dans des processus de fission mitochondriale, les contacts RE-Mitochondrie semblent également réguler la fusion des mitochondries. En effet, une récente étude dirigée par Betzig et Li a montré, à travers des expériences d'imagerie à haute résolution, que les contacts RE-Mitochondrie sont impliqués dans 60% des événements de fusion

mitochondriale (Guo et al., 2018). Cependant, aucune machinerie protéique n'a pour le moment été caractérisée. Sachant que les mitofusines sont impliquées à la fois dans la fusion mitochondriale et dans l'établissement de SCM entre le RE et les mitochondries, ces protéines représentent des candidats particulièrement intéressants pour lier ces deux processus (de Brito and Scorrano, 2008; Santel and Fuller, 2001).

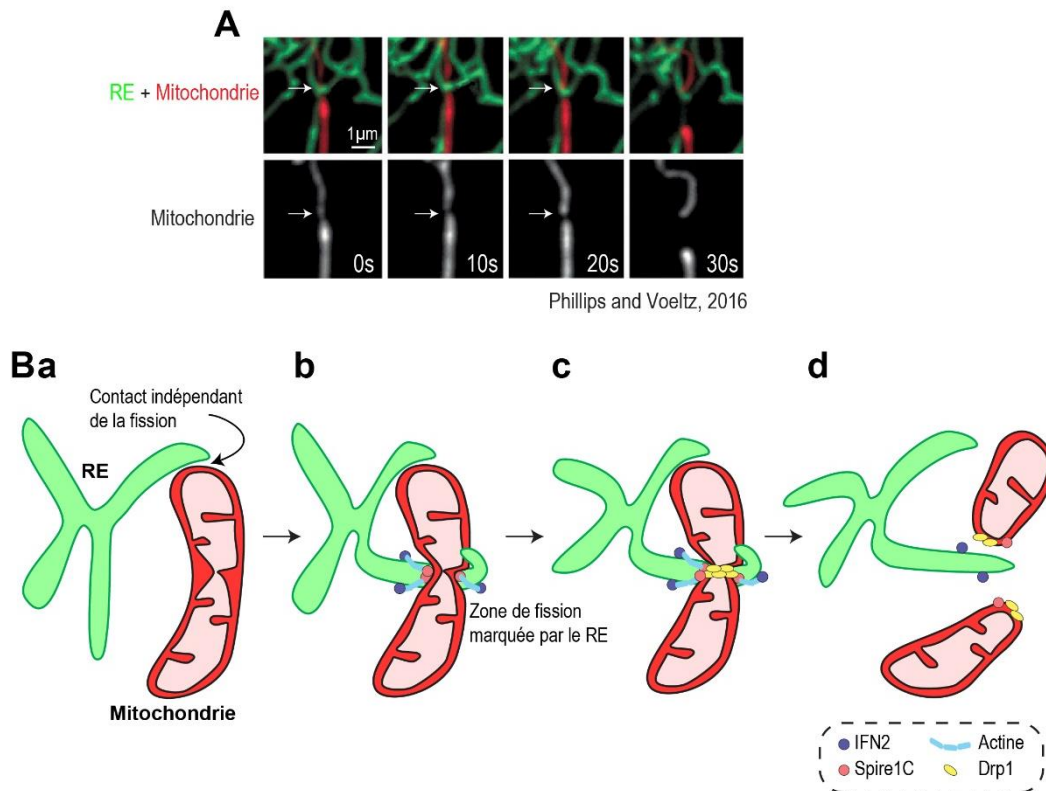


Figure I11 : La fission mitochondriale implique le RE

A. Série d'images de microscopie confocale en temps réel montrant une fission mitochondriale. Des cellules Cos-7 (cellules rénales de singe immortalisées) ont été co-transfectées avec des vecteurs permettant de marquer les mitochondries (mito-dsRed; rouge) et le réticulum endoplasmique (RE, GFP-SEC61; vert). Le RE définit le site de constriction et de fission mitochondriale (flèches blanches). Cette série d'images provient de la revue de Phillips et Voeltz, publiée en 2016 (Phillips and Voeltz, 2016).

B. Illustration des différentes étapes menant à la fission mitochondriale. **a** - Représentation schématique d'un contact RE-Mitochondrie n'étant pas impliqué dans la fission mitochondriale. **b à d** - Fission médiée par le RE. La constriction de la membrane interne mitochondriale se fait avant celle de la membrane externe (Cho et al., 2017). Je me concentrerai uniquement sur les mécanismes impliqués dans la constriction de la membrane externe mitochondriale. **b** - La fission mitochondriale s'établit au niveau d'un site où le RE est en contact avec la mitochondrie. La protéine du RE INF2 et celle des mitochondries Spire1C interagissent et promeuvent la polymérisation d'actine autour des mitochondries. Ceci engendre une diminution du diamètre mitochondriale. **c** - Dans un second temps, la protéine Drp1 est recrutée à la surface des mitochondries en interagissant avec ses partenaires protéiques mitochondriaux (non représentés). Drp1 contracte davantage la mitochondrie et finaliserait la division (**d**).

4. Les contacts entre le RE et l'appareil de Golgi, des lieux d'échange de lipides

L'appareil de Golgi est composé d'empilements de saccules aplatis interconnectés (généralement 5 à 8) appelés dictyosomes ; leur nombre peut varier en fonction du type cellulaire. Ces dictyosomes sont organisés en 3 sous-régions : 1) une face *cis* (réseau *cis* golgien) faisant face au noyau, 2) une région *medial*, ainsi que 3) une face *trans* (réseau *trans* golgien) faisant face à la membrane plasmique. L'ensemble de ces sous-régions communique activement au travers d'échanges vésiculaires. Fonctionnellement, l'appareil de Golgi représente une plateforme centrale pour le trafic des protéines et lipides en route pour des destinations cellulaires ou extracellulaires. Il est aussi associé à des processus de biosynthèse de lipides et de modifications post-traductionnelles de protéines issues du RE. L'activité ainsi que l'organisation structurale de l'appareil de Golgi dépendent largement de l'apport de membrane via des vésicules de transport en provenance du RE. En fait, de part ces échanges vésiculaires, le RE participe à la biogenèse de l'appareil de Golgi. Les vésicules issues de bourgeonnement à la surface du RE, nommées vésicules COPII (coat protein complex II) (Barlowe et al., 1994), vont cibler le côté *cis* de l'appareil de Golgi et fusionner avec les saccules le composant. Ce gain de membrane est compensé par une perte du côté *trans* sous forme de vésicules sécrétrices. Un flux continu s'installe alors entre les différentes sous-régions du dictyosome, permettant aux protéines et lipides de transiter de la face *cis* vers la face *trans*. En plus des transports vésiculaires antérogrades, du RE vers l'appareil de Golgi, il existe des transports vésiculaires rétrograde, c'est-à-dire de l'appareil de Golgi vers le RE, faisant intervenir des vésicules de type COPI (Orci et al., 1986). Bien qu'un trafic vésiculaire bidirectionnel intense existe, il ne représente pas le seul moyen de communication entre ces deux organites. En effet, ils communiquent également à travers l'établissement de contacts membranaires (Figure I12).

Les premières preuves de l'existence de SCM entre le RE et l'appareil de Golgi ont été révélées par microscopie électronique à transmission dans les années 1970 (Novikoff, 1971; Rambourg et al., 1979). Les auteurs ont révélé que les tubules de RE sont spécifiquement associés aux saccules de la face *trans* de l'appareil de Golgi. Plusieurs travaux ont montré qu'à cette interface, des transports lipidiques s'établissent. La formation des SCM RE-*trans* Golgi peut être vue comme un moyen plus rapide, un raccourci, pour permettre aux lipides d'atteindre la face *trans* de l'appareil de Golgi et éviter de transiter entre les saccules en *cis* et

medial. Les lipides échangés à cette interface pourront être directement exportés ou subir une conversion métabolique.

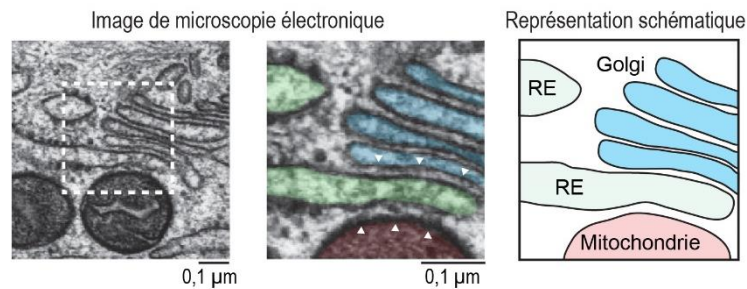


Figure I12 : SCM entre le RE et l'appareil de Golgi

Image de microscopie électronique réalisée sur une cellule épithéliale de rat présentant des contacts membranaires (localisés par des têtes de flèche) entre un tubule de réticulum endoplasmique (RE) et un saccule de l'appareil de Golgi et une mitochondrie. La région délimitée par un carré blanc sur la première image (à gauche), correspond à l'image centrale. Sur celle-ci des fausses couleurs ont été attribuées au RE (vert) au Golgi (bleu) et à une mitochondrie (rouge). Une représentation schématique (à droite) est également illustrée. Les images de microscopie électronique proviennent de la revue de Wu et al., publiée en 2018 (Wu et al., 2018).

En 2003, Hanada et ses collègues ont identifié la protéine STARD11, une protéine de la famille des protéines à domaine START, comme étant impliquée dans le transport non-vésiculaire de céramide de son lieu de synthèse, le RE, vers l'appareil de Golgi. Dans cet organe la céramide est convertie en sphingomyéline par exemple, par l'enzyme sphingomyéline synthase 1. La sphingomyéline peut transiter vers la membrane plasmique, lieu où elle est spécifiquement enrichie. Dans la membrane plasmique, la sphingomyéline est conjointement enrichie avec le cholestérol au niveau de micro-domaines nommés radeaux lipidiques, qui constituent des plateformes de signalisation (Sezgin et al., 2017). La protéine STARD11 est composée de plusieurs régions fonctionnelles : un domaine N-terminal PH (pleckstrin homology) permettant à la protéine d'interagir avec le PI(4)P (Hanada et al., 2003; Levine and Munro, 1998), un motif FFAT central impliqué dans l'interaction avec les protéines VAPs (Kawano et al., 2006) et un domaine START C-terminal de transport de céramide (Hanada et al., 2003; Kumagai et al., 2005). L'adressage de la protéine au Golgi dépend de sa capacité d'interaction avec le PI(4)P, un lipide particulièrement abondant dans cet organe, en particulier au niveau du réseau *trans* golgien (Weixel et al., 2005). D'un autre côté, STARD11 s'associe avec le RE par son interaction avec les protéines VAPs. A travers cette double capacité

d'interaction, STARD11 ponte les membranes du RE et de l'appareil de Golgi et transporte des céramides à cette interface (Figure I13).

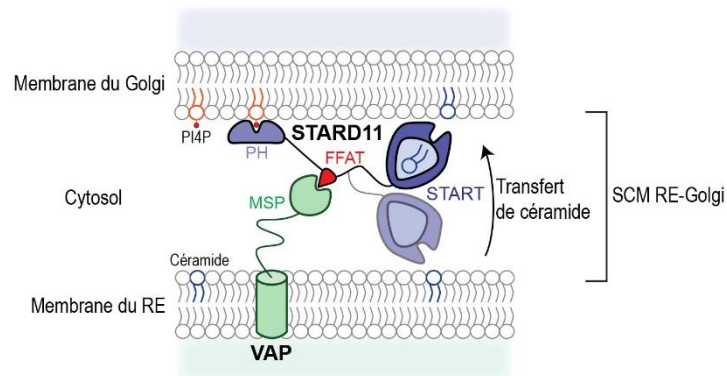


Figure I13 : Transport de céramide au niveau des contacts RE-Golgi

La protéine STARD11 est associée à la membrane de l'appareil de Golgi en interagissant avec le PI(4)P [par son domaine PH (pleckstrin homology)]. STARD11 interagit avec le domaine MSP (major sperm protein) des protéines VAP par l'intermédiaire de son motif FFAT. A l'interface du contact, STARD11 transporte de la céramide du réticulum endoplasmique (RE) vers l'appareil de Golgi grâce à son domaine C-terminal START (steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer).

Une autre LTP à avoir été caractérisée comme étant capable de transporter des lipides entre le RE et l'appareil de Golgi est la protéine OSBP, appartenant à la famille des protéines ORP. Comme STARD11, elle a un domaine PH et un motif FFAT, respectivement capables de reconnaître le PI(4)P et d'interagir avec les protéines VAPs. Aussi, son domaine PH interagit avec la protéine GTPase Arf1 (ADP-ribosylation factor 1) (Godi et al., 2004). Le domaine de transfert de lipides d'OSBP possède un domaine ORD (OSBP-related ligand-binding domain) C-terminal. D'après sa structure, OSBP est capable de ponter les membranes du RE et de l'appareil de Golgi et de transporter des lipides entre elles. Ceci a été confirmé au travers de travaux dirigés par Guillaume Drin et Bruno Antony en 2013 (Mesmin et al., 2013). Dans cette étude, des membranes artificielles, appelées liposomes, ont été utilisées pour reconstituer *in vitro* des contacts membranaires. Plus précisément, deux populations de liposomes ont été utilisées : une population décorée par les protéines VAPs (mimant la membrane du RE) et l'autre décorée par les protéines OSBP (mimant la membrane de l'appareil de Golgi). L'interaction entre VAP et OSBP conduit au rapprochement des liposomes. Dans ce contexte de membranes rapprochées, le domaine ORD d'OSBP transporte du cholestérol du RE vers l'appareil de Golgi contre du PI(4)P de l'appareil de Golgi vers le RE. Une fois le PI(4)P dans la membrane du RE, ce dernier est hydrolysé en PI par l'action en *cis* de la protéine phosphatase SAC1, ancrée dans la

membrane du RE. Ceci permet de maintenir un gradient de concentration de PI(4)P entre les deux organelles. Finalement, ce gradient fournit l'énergie nécessaire au transfert de cholestérol (Filseck et al., 2015; von Filseck et al., 2015; Mesmin et al., 2013) (Figure I14).

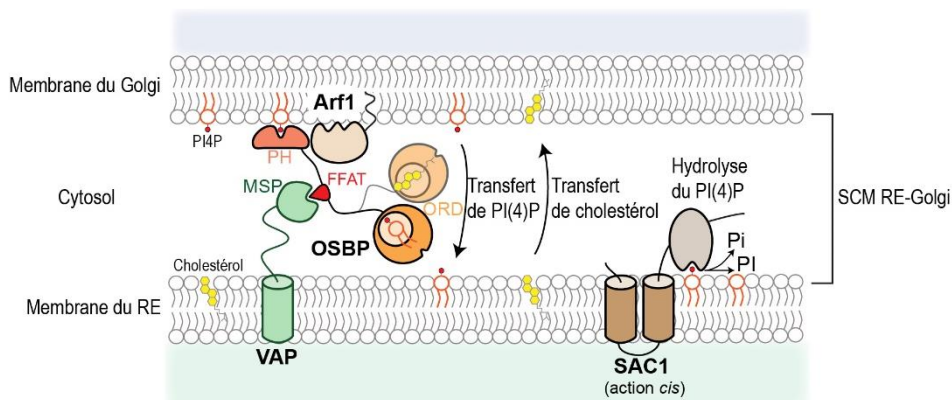


Figure I14 : Contre-échange de PI(4)P et de cholestérol au niveau des contacts RE-Golgi

La protéine OSBP est associée à la membrane de l'appareil de Golgi en interagissant avec le PI(4)P et la protéine ARF1 [par son domaine PH (pleckstrin homology)]. OSBP interagit avec le domaine MSP (major sperm protein) des protéines VAP par l'intermédiaire de son motif FFAT. A l'interface du contact, OSBP transporte du PI(4)P de la membrane de l'appareil de Golgi vers la membrane du réticulum endoplasmique (RE) par son domaine ORD (OSBP-related ligand-binding domain). Le PI(4)P est hydrolysé par la phosphatase du RE SAC1 (action *cis*). Ceci permet de maintenir un gradient de concentration de PI(4)P entre les deux organites, ce qui fournit l'énergie nécessaire au transport de cholestérol du RE vers l'appareil de Golgi. Ce transport se fait grâce au domaine ORD de OSBP.

La formation de PI(4)P dans la membrane de l'appareil de Golgi est médiée par des enzymes du type kinases (phosphatidylinositol 4-kinase) à partir de PI. De manière intéressante, la protéine à motif FFAT Nir2 transporte du PI du RE vers l'appareil de Golgi et a été rapportée comme régulant l'adressage des protéines STARD11 et OSBP (Amarilio et al., 2005; Kim et al., 2013; Litvak et al., 2005; Peretti et al., 2008). Récemment, l'équipe du Dr. Antonietta De Matteis (pionnière dans le domaine des contacts RE-Golgi) a proposé que la protéine phosphatase SAC1 peut également réguler la composition en PI(4)P de la membrane de l'appareil de Golgi, de manière dépendante d'autres facteurs. Dans leur étude, les auteurs ont montré que la protéine FAPP1 [phosphatidylinositol-four-phosphate adapter protein-1 ; une protéine de l'appareil de Golgi interagissant avec le PI(4)P et ARF1 (Godi et al., 2004)] est capable de former un complexe tripartite avec les protéines du RE VAPs et SAC1. De manière intéressante, une augmentation de la quantité de PI(4)P au niveau de l'appareil de Golgi est observée dans des cellules knock-down ou knock-out pour la protéine FAPP1. D'un point de vue mécanistique, selon leur modèle, dans des conditions où la quantité de PI(4)P au niveau de l'appareil de Golgi est élevée, FAPP1

permettrait de positionner SAC1 au niveau des contacts membranaires RE-Golgi et de promouvoir ainsi l'hydrolyse en *trans* du PI(4)P, directement dans la membrane du Golgi (Venditti et al., 2019b) (Figure I15). SAC1 posséderait ainsi une activité en *cis* et en *trans* pour participer à la régulation de la quantité de PI(4)P dans le réseau *trans* golgien, au niveau des SCM RE-*trans* Golgi (Filseck et al., 2015; Mesmin et al., 2013; Venditti et al., 2019b). Ainsi, l'ensemble de ces différents complexes protéiques travaillent de manière coordonnée pour contrôler la composition lipidique du réseau *trans* golgien au niveau des contacts avec le RE.

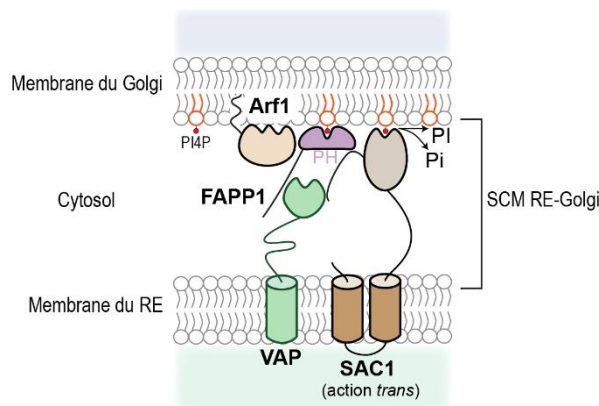


Figure I15 : SAC1 agit en *trans* pour réguler la quantité de PI(4)P dans la membrane de l'appareil de Golgi au niveau des contacts RE-Golgi.

FAPP1 est associée à la membrane de l'appareil de Golgi en interagissant avec le PI(4)P et la protéine ARF1 [par son domaine PH (pleckstrin homology)]. Les protéines FAPP1, VAP et SAC1 forment un complexe. FAPP1 permettrait de positionner SAC1 au niveau des contacts membranaires réticulum endoplasmique (RE)-Golgi et de promouvoir l'hydrolyse du PI(4)P dans la membrane de l'appareil de Golgi (action *trans* de la protéine SAC1). Adaptée de Venditti et al., 2019 (Venditti et al., 2019b).

En accord avec le fait que les protéines VAPs occupent une place primordiale dans les complexes d'ancrage impliquant le RE, l'inhibition de l'expression de ces protéines engendre une diminution de la quantité des contacts entre le RE et le *trans* Golgi (Venditti et al., 2019a). *A contrario*, de façon étonnante, l'inhibition de l'expression des partenaires de VAPs, STARD11, OSBP ou FAPP1 dans les cellules n'affecte pas la quantité des contacts RE-*trans* Golgi (Venditti et al., 2019a). Ceci suggère que l'effet induit par l'inhibition d'un partenaire protéique des VAPs sur l'établissement de contacts RE-*trans* Golgi peut être compensé par les autres partenaires restants au niveau de ces contacts. En accord avec cette idée, il a été rapporté que l'inhibition combinée des protéines OSBP et ORP9 [une autre protéine de la famille des ORP, localisée au niveau de l'appareil de Golgi et capable d'interagir avec VAPs par son motif FFAT (Mikitova and Levine, 2012; Ngo and Ridgway, 2009)] engendre une diminution de la quantité des contacts

RE-*trans* Golgi, suggérant une activité d'ancrage redondante entre ces protéines. L'inhibition combinée avec STARD11 ou FAPP1 n'a pas été testée dans l'étude. De manière intéressante, en plus des VAPs, la protéine ORP10 [appartenant à la famille des ORP et associée à l'appareil de Golgi (Nissilä et al., 2012)] semble être impliquée dans la formation et le maintien des contacts RE-*trans* Golgi. En effet, son inhibition dans les cellules engendre une diminution des contacts entre ces organites, similairement aux VAPs. ORP10 ne possède pas de motif FFAT. Les auteurs ont montré que sa capacité à établir des contacts dépendait de son aptitude à transférer la PS du RE vers le *trans* Golgi (Venditti et al., 2019a). Cette protéine apparaît comme une nouvelle protéine d'ancrage, permettant de réguler la formation et le maintien de contacts membranaires RE-*trans* Golgi de manière dépendante de la quantité de PS au niveau du *trans* Golgi ; le mécanisme d'action précis reste à être clarifié.

5. [Les contacts entre le RE et les GL, un moyen de réguler la biogenèse des GL](#)

Les GL ont longtemps été considérées comme de simples structures intracellulaires inertes stockant des lipides. Il est devenu clair que les GL constituent des organites dynamiques à part entière de la cellule. Tout comme les autres organites, elles possèdent un lipidome et un protéome unique (Bersuker et al., 2018; Tauchi-Sato et al., 2002), et leur vie comporte plusieurs étapes : biogenèse, maturation, fusion et potentiellement de fission (Gong et al., 2011; Wu et al., 2014) ainsi que collaboration avec d'autres organites (Olzmann and Carvalho, 2019). Les GL possèdent une architecture unique, elles sont des organites sphériques composés d'une hémimembrane de phospholipides (principalement de la PE et de la PC) entourant un cœur hydrophobe de lipides neutres (des triglycérides et des esters de cholestérol). Cette composition rend compte de leur fonction. Par le fait, les lipides stockés dans ces organites peuvent servir de substrat à la synthèse membranaire et constituent une source d'énergie pour la cellule. Les GL peuvent tamponner des excès de lipides cellulaires potentiellement toxiques. Aussi, à travers leur protéome membranaire, elles possèdent un rôle clé dans la synthèse de divers lipides composant les membranes cellulaires, par exemple, les phospholipides. La GL constitue une plateforme métabolique centrale de la cellule (Cohen, 2018). En plus d'être associées à des protéines impliquées dans la synthèse et le métabolisme lipidique, les GL contiennent des protéines impliquées dans le stress associé au RE, le trafic membranaire ou

encore la régulation de l'apoptose (Bersuker et al., 2018), suggérant leur implication dans divers processus biologiques.

Les GL possèdent un lien privilégié avec le RE. En effet, le RE constitue leur lieu de biogenèse. Elles peuvent se former en réponse à de multiples stimuli incluant par exemple un excès de lipides (Rohwedder et al., 2014). Les premières étapes de la biogenèse des GL impliquent la fabrication de lipides neutres dans la membrane du RE. Les esters de cholestérol sont fabriqués par des enzymes du type acyl-CoA cholestérol acyltransferase (ACAT1 et ACAT2), alors que la biosynthèse des triglycérides implique les enzymes du type diglyceride acyltransferase (DGAT1 et DGAT2). Un substrat commun de ces enzymes est le *fatty Acyl-CoA* produit par les long-chain acyl-CoA synthetase (ACSL) (Yen et al., 2008). Plus précisément, il a été rapporté que l'enzyme ACSL3 est spécifiquement localisée au niveau des sites de nucléation des GL, et ce, avant même la présence de DGAT2. ACSL3 régule la biogenèse des GL et le stockage de lipides dans ces organites (Kassan et al., 2013). L'accumulation localisée de lipides neutres dans la membrane du RE amène à la formation d'une structure appelée lentille, d'une taille d'environ 20 nm (Kassan et al., 2013). L'apport continu de lipides fait croître cette structure qui bourgeonne vers le cytoplasme. La direction vers laquelle le bourgeon émerge (le cytoplasme) implique un déséquilibre en terme de tension entre les deux héli-membranes (Chorlay et al., 2019). Finalement, les GL peuvent se dissocier du RE et devenir indépendantes, selon un mécanisme qui reste à être élucidé. La taille des GL ainsi formées dépend du type cellulaire. Dans les cellules adipocytaires (cellules du tissu adipeux blanc possédant une GL unique), la taille des GL matures peut aller jusqu'à 100 µm, contre 800 nm dans les cellules HeLa (cellules cancéreuses du col de l'utérus) par exemple (Guo et al., 2009; Soni et al., 2009).

Les SCM entre le RE et les GL peuvent présenter une morphologie soit classique soit s'écartant de ce modèle canonique (Figure 116). Cette dernière implique la formation de ponts lipidiques, où la membrane de la GL est en continuité directe avec l'héli-membrane cytoplasmique du RE. A travers ces ponts membranaires, les enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides neutres telles que ACSL3 peuvent passer de la membrane du RE à la membrane des GL et ainsi exercer leur fonction à la surface des GL (Kassan et al., 2013; Schuldiner and Bohnert, 2017). A mon sens, bien que ces zones d'apposition présentent une fusion membranaire, elles peuvent être considérées comme des SCM à part entière car elles

sont associées à des fonctions particulières et possèdent un paysage moléculaire unique. Les deux types de contacts membranaires entre le RE et les GL peuvent cohabiter dans la cellule.

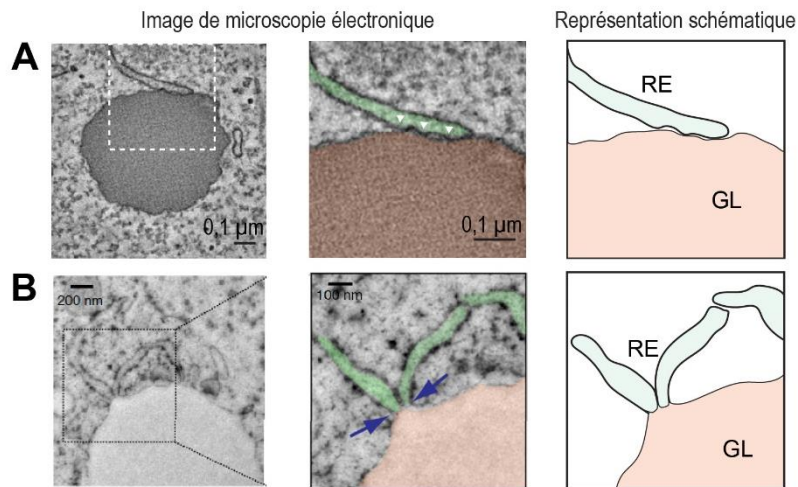


Figure I16 : SCM entre le RE et les GL

Image de microscopie électronique réalisée sur une cellule A431 (cellule cancéreuse de la peau ; **A**) ou S2 de *Drosophile* (**B**). Ces images illustrent un SCM classique (**A**; localisé par des têtes de flèches) ou présentant une continuité membranaire (**B**; localisé par les flèches bleues) entre un tubule de réticulum endoplasmique (RE) et une gouttelette lipidique (GL). La région délimitée par un carré (blanc en **A** et noir en **B**) sur la première image (à gauche), correspond à l'image centrale. Sur celle-ci des fausses couleurs ont été attribuées au RE (vert) et à la GL (orange). Une représentation schématique (à droite) est également illustrée. Les images de microscopie électronique en **A** et **B** proviennent respectivement de l'article de Salo et al., 2016 et de Wilfling et al., 2013 (Wilfling et al., 2013; Salo et al., 2016).

Ces dernières années, de nombreuses protéines d'ancrage et effectrices ont été caractérisées comme étant enrichies à l'interface des contacts RE-GL. Ces zones peuvent être peuplées par la protéine du RE seipin/BSCL2 (Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2), une protéine mutée dans un syndrome lipodystrophique (Magré et al., 2001). Seipin joue un rôle dans la biogenèse des GL. En particulier, elle détermine le site de formation des GL dans le RE et facilite le transfert de triglycérides au niveau des contacts RE-GL. Aussi, cette protéine permet de réguler la relocalisation de la protéine ACSL3 de la membrane du RE vers la membrane des GL (Salo et al., 2016, 2019; Wang et al., 2016a). Récemment, une étude a montré que seipin permet de réguler l'activité d'ancrage du complexe impliquant la GTPase Rab18 (Li et al., 2019). Rab18 a été identifiée comme un régulateur clé de la synthèse des GL. Les cellules adipocytaires déficientes pour Rab18 affichent un défaut de la croissance et de la maturation des GL. Cette protéine est associée aux GL lorsqu'elle est sous forme active (associée au GTP) et interagit avec la protéine ZFYVE1 (zinc finger FYVE domain-containing

protein 1, alias DFCP1) ainsi qu'avec des protéines du complexe NRZ (NAG, RINT1, ZW10) et SNARE associées au RE. Ces jeux d'interactions ont pour conséquence des contacts membranaires entre le RE et les GL et facilitent ainsi l'incorporation de lipides neutres, la croissance et la maturation des GL (Li et al., 2019; Xu et al., 2018). D'autres protéines d'ancrage régulant la synthèse des GL telle que la protéine Snx14 (sorting nexin 14) ont été caractérisées (Datta et al., 2019). Snx14 est ancrée dans la membrane du RE par deux domaines TM et interagit en *trans* avec la membrane des GL par l'intermédiaire d'une hélice amphiphile ; cette organisation lui permet de ponter les membranes de ces deux organites (Figure I17). Les hélices amphiphiles sont des structures secondaires retrouvées dans de nombreuses protéines. Elles sont caractérisées par une ségrégation organisée des acides aminés polaires et hydrophobes selon deux faces (hydrophile et hydrophobe). Cette structuration leur permet d'interagir avec les membranes, dont celles des GL (Giménez-Andrés et al., 2018). La protéine Snx14 est recrutée lors de phases précoces de la naissance des GL dans des microdomaines du RE positifs pour la protéine ACSL3. Fonctionnellement, elle promeut la biogenèse des GL et favorise leur maturation en améliorant l'incorporation de triglycérides (Datta et al., 2019).

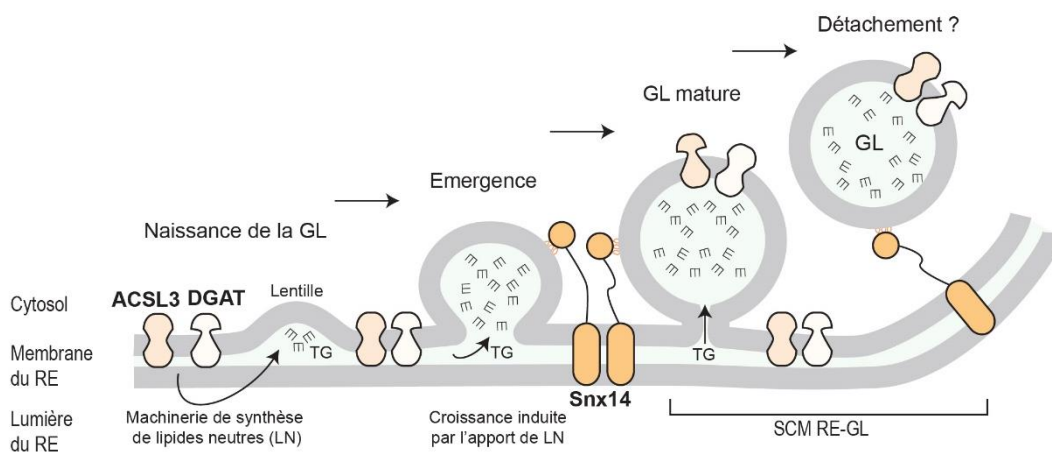


Figure I17 : Biogenèse et maturation des GL impliquant la protéine Snx14.

La naissance des gouttelettes lipidiques (GL) s'établit dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Des enzymes comme ACSL3 et DGAT permettent la synthèse de triglycérides (TG, des lipides neutres ; d'autres enzymes agissent pour la synthèse d'ester de cholestérol) entre les hémimembranes du RE. Cette accumulation localisée de lipides neutres amène à la formation d'une lentille, c'est la naissance de la GL. L'apport continu de lipides fait croître cette lentille et la fait bourgeonner vers le cytoplasme. La protéine Snx14 est ancrée dans la membrane du RE et interagit avec la membrane de la GL en formation, par l'intermédiaire d'une hélice amphiphile. Cette double capacité d'interaction lui permet de ponter la membrane des deux organites et de stabiliser les contacts RE-GL. C'est ainsi que la protéine Snx14 régule la maturation des GL. La question de savoir si les GL se détachent par la suite du RE et si Snx14 reste associée aux GL reste encore en suspens. Adaptée de Datta et al., 2019 (Datta et al., 2019).

RESULTATS

Section I : MOSPD2, une protéine du réticulum endoplasmique apparentée aux protéines VAPs

1. Introduction

Une des thématiques principales du laboratoire concerne la caractérisation fonctionnelle de la protéine STARD3. STARD3 appartient à la famille des protéines à domaine START composée de 15 membres chez l'Homme dont la caractéristique commune est de posséder un domaine C-terminal de liaison aux lipides nommé START (Alpy et al., 2009). Au niveau structural, STARD3 est composée de deux domaines fonctionnels : 1) un domaine MENTAL N-terminal responsable de l'ancrage de la protéine à la membrane des endosomes tardifs, de son oligomérisation, de la fixation du cholestérol et 2) un domaine START capable de fixer et d'échanger du cholestérol (Alpy et al., 2005, 2009; Watari et al., 1997; Wilhelm et al., 2017). En 2013, les études menées au laboratoire ont montré que STARD3 est capable d'établir des SCM entre le RE et les endosomes tardifs (Alpy et al., 2013). Plus particulièrement, au niveau moléculaire, la formation de ces contacts est médiée par l'interaction de STARD3 avec les protéines VAP-A et VAP-B présentes à la surface du RE. Ces données furent parmi les premières à mettre en évidence un complexe d'ancrage capable de rapprocher les membranes du RE et des endosomes tardifs. L'équipe a par la suite décidé de s'intéresser en profondeur à la biologie des SCM en caractérisant de nouvelles protéines associées à ces structures ; mon projet de thèse s'est inscrit dans ce contexte.

Comme précédemment décrit dans la partie introductive, les VAPs sont des protéines majeures de la formation des ponts moléculaires entre le RE et les autres organites portant des protéines à motif FFAT (Murphy and Levine, 2016) ; les protéines VAPs possèdent un domaine fonctionnel MSP capable d'interagir de manière directe avec ces motifs protéiques. De façon intrigante, les complexes impliquant les protéines VAPs ne peuvent rendre compte de tous les SCM impliquant le RE. En effet, malgré un rôle bien caractérisé des VAPs dans les interactions membranaires, dans les cellules déficientes pour les protéines VAPs, des contacts persistent entre le RE et les autres organites. (Costello et al., 2017; Dong et al., 2016; Eden et al., 2016; Stoica et al., 2014; Venditti et al., 2019a). Par exemple, la diminution d'expression de VAP-B n'affecte pas les contacts entre le RE et les peroxysomes (Costello et al., 2017). Ces données suggéraient fortement que l'absence des protéines VAPs dans la cellule pouvait être

compensée, probablement par une autre protéine cellulaire ayant elle aussi la capacité d'interagir avec les motifs FFAT. Ainsi, l'hypothèse qu'il existait une autre protéine capable de suppléer l'action des VAPs a été fondatrice de mon projet de thèse. Cette hypothèse a été validée à travers l'identification de MOSPD2 (motile sperm domain-containing protein 2), une protéine du RE qui, comme les VAPs, est capable d'interagir avec les protéines à motif FFAT et de bâtir des sites de contact. Cette étude a donné lieu à la publication d'un article dans le journal EMBO Reports présenté ci-après (Di Mattia et al., 2018a).

2. [Article : Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites](#)

Résumé de l'article :

La première étape de cette étude a été d'identifier l'ensemble des protéines capables d'interagir avec les motifs FFAT, dans le but de mettre en évidence de nouveaux acteurs protéiques capables de se substituer aux protéines VAPs. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de purification en utilisant comme appât un peptide comportant un motif FFAT, celui de la protéine ORP1L (Rocha et al., 2009). L'identité de l'ensemble des protéines retenues spécifiquement par cet appât a ensuite été révélée par spectrométrie de masse en tandem. Par cette approche protéomique non biaisée, nous avons identifié, avec un grand score de confiance, les protéines VAPs ainsi que la protéine MOSPD2. Cette protéine a retenu notre attention car c'est une protéine très peu caractérisée qui possède, à l'instar des protéines VAPs, un domaine MSP. Une analyse *in silico* a permis de montrer que, malgré une faible homologie en termes de séquence primaire, les domaines MSP de MOSPD2 et des VAPs possèdent une structure tridimensionnelle conservée, ce qui est compatible avec un mode de reconnaissance similaire des motifs FFAT. Des expériences structure-fonction *in vitro* ont renforcé cette idée. En effet, j'ai pu montrer que le domaine MSP de MOSPD2 est capable d'interagir directement avec les motifs FFAT et qu'il possède une affinité pour ces motifs de l'ordre du micromolaire, similaire à celle des domaines MSP des protéines VAPs. De plus, des expériences de reconstitution *in vitro* de SCM (basées sur l'utilisation de membranes artificielles appelées liposomes) ont démontré que les interactions MSP-FFAT sont suffisantes pour rattacher deux membranes. Ces travaux ont été réalisés par l'équipe du Dr. Guillaume Drin à Nice. En

conclusion de cette partie *in vitro*, nous avons montré que le domaine MSP de MOSPD2 et le motif FFAT de ORP1L interagissent et permettent le rapprochement de membranes.

L'étude a ensuite été étendue à l'échelle de la cellule. Dans ce contexte, j'ai montré par des expériences d'immunoprécipitation que la protéine MOSPD2 est capable d'interagir par l'intermédiaire de son domaine MSP avec des protéines à motif FFAT. Les protéines que nous avons étudiées sont des partenaires protéiques connus des VAPs, à savoir STARD3, STARD3NL (STARD3 N-terminal like) et ORP1L, toutes trois associées aux endosomes tardifs, la protéine mitochondriale PTPIP51 et STARD11, une protéine associée à l'appareil de Golgi. Comme la fonction d'une protéine est directement associée à sa localisation subcellulaire, j'ai ensuite caractérisé le périmètre d'activité de MOSPD2 au sein de la cellule. Des expériences d'imagerie ont montré que MOSPD2 est présente au niveau du RE, auquel elle s'ancre grâce à un domaine TM situé à son extrémité C-terminale, le reste de la protéine faisant face au cytosol. Ensemble, les données moléculaires et cellulaires sur MOSPD2 suggéraient que, tout comme les VAPs, cette protéine crée des rapprochements entre la membrane du RE et celle des organites, en interagissant avec des partenaires à motif FFAT. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai réalisé des expériences de co-localisation par immunofluorescence et montré que l'expression de STARD3, STARD3NL, ORP1L, PTPIP51 et STARD11 permet de recruter la protéine MOSPD2 dans des sous-domaines du RE respectivement en contact avec les endosomes tardifs, les mitochondries et l'appareil de Golgi. Ce recrutement est dépendant des motifs FFAT. Ainsi, ces données ont permis de valider le fait que MOSPD2 est impliquée dans la formation de contacts membranaires impliquant le RE, et ce, à travers un mécanisme similaire à celui retrouvé pour les protéines VAPs.

Cette étude a montré que le RE possède trois protéines homologues, VAP-A, VAP-B et MOSPD2, impliquées dans la formation de SCM avec d'autres organites. MOSPD2 partage des caractéristiques structurelles et fonctionnelles avec les VAPs. Ces protéines possèdent un domaine TM C-terminal responsable de leur ancrage dans la membrane du RE et un domaine MSP capable de reconnaître des motifs FFAT et de lier des protéines contenant des motifs FFAT. A travers ces jeux d'interaction, les VAPs et MOSPD2 construisent des SCM faisant intervenir le RE.

Enfin, dans une dernière série d'expériences, une approche de perte de fonction a été utilisée afin de déterminer la fonction physiologique de MOSPD2 sur la formation de contacts inter-organites, comparativement aux protéines VAPs. De manière intéressante, nous avons

observé une réduction significative des contacts RE-Endosome dans des cellules déficientes pour MOSPD2, et une augmentation concomitante des contacts Endosome-Endosome ; phénotype n'étant pas observé dans les cellules déficientes pour les protéines VAPs. Ces résultats suggèrent que la fonction physiologique de MOSPD2 sur les contacts inter-organites est unique.

EMBO *reports*

Volume 19 Issue 7 | 4 July 2018

**MOSPD2 scaffolds
ER-organelle contact sites**

 **EMBO**press






Caption: The endoplasmic reticulum (ER) makes physical contacts with most cellular organelles. Di Mattia et al identified and characterized a novel tethering protein named MOtile SPerm Domain-containing protein 2 (MOSPD2). MOSPD2 interacts with a variety of organelle (endosomes, mitochondria or Golgi)-bound proteins and thereby builds membrane contact sites. MOSPD2 (green) is an ER-resident protein (top). MOSPD2 and PTPIP51 (magenta; middle) create ER – mitochondria membrane contact sites; MOSPD2 and STARD3NL (magenta; bottom) build ER – endosome membrane contact sites. Membrane contact sites, where both protein partners co-localize, appear in white (middle and bottom images).

By Thomas Di Mattia, Catherine Tomasetto, Fabien Alpy and colleagues: Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites.

Scientific image by Thomas Di Mattia, IGBMC, INSERM, CNRS, University of Strasbourg.

SOURCE
DATATRANSPARENT
PROCESSOPEN
ACCESS

Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites

Thomas Di Mattia^{1,2,3,4} , Léa P Wilhelm^{1,2,3,4} , Souade Ikhlef⁵, Corinne Wendling^{1,2,3,4}, Danièle Spehner^{1,2,3,4}, Yves Nomine^{1,2,3,4}, Francesca Giordano⁶ , Carole Mathelin^{1,2,3,4,7}, Guillaume Drin⁵, Catherine Tomasetto^{1,2,3,4,*}  & Fabien Alpy^{1,2,3,4,**} 

Abstract

Membrane contact sites are cellular structures that mediate interorganelle exchange and communication. The two major tether proteins of the endoplasmic reticulum (ER), VAP-A and VAP-B, interact with proteins from other organelles that possess a small VAP-interacting motif, named FFAT [two phenylalanines (FF) in an acidic track (AT)]. In this study, using an unbiased proteomic approach, we identify a novel ER tether named motile sperm domain-containing protein 2 (MOSPD2). We show that MOSPD2 possesses a Major Sperm Protein (MSP) domain which binds FFAT motifs and consequently allows membrane tethering *in vitro*. MOSPD2 is an ER-anchored protein, and it interacts with several FFAT-containing tether proteins from endosomes, mitochondria, or Golgi. Consequently, MOSPD2 and these organelle-bound proteins mediate the formation of contact sites between the ER and endosomes, mitochondria, or Golgi. Thus, we characterized here MOSPD2, a novel tethering component related to VAP proteins, bridging the ER with a variety of distinct organelles.

Keywords endoplasmic reticulum; ER–organelle contact; FFAT motif; membrane contact site; VAP proteins

Subject Category Membrane & Intracellular Transport

DOI 10.15252/embr.201745453 | Received 8 November 2017 | Revised 27 April 2018 | Accepted 7 May 2018

EMBO Reports (2018) e45453

Introduction

Eukaryotic cells are partitioned in discrete organelles which provide the cell with functionally specialized subregions. Organelles are interdependent units which are each delimited by membranes that constitute a barrier to the diffusion of soluble signaling molecules or

metabolites. The formation of membrane contact sites (MCSs), where organelle membranes are in close apposition, supports their ability to communicate and exchange material. A variety of MCSs, in which the membranes of two distinct organelles are bridged, have been observed in cells. Although contacts were shown to exist between almost every type of organelle, the endoplasmic reticulum (ER) appears to be central for this kind of interorganelle communication [1,2]. Indeed, the ER is a network of tubes and sheets which extends throughout the cytoplasm and makes extensive contacts with most organelles [3].

The formation of MCSs primarily requires protein–lipid and/or protein–protein complexes to allow the tethering of organelles [4–6]. Noteworthy, multiple molecular bridges between the ER and other organelles involve the same receptors on the ER, named VAPs (VAMP-associated proteins) [7,8]. In human, there are two VAPs, VAP-A and VAP-B, which are anchored in the ER membrane by a C-terminal transmembrane domain, and which interact with small motifs named FFAT (two phenylalanine in an acidic tract) using an N-terminal and cytosolic MSP (major sperm protein) domain [9]. FFAT motifs are found in a wide variety of proteins localized in MCSs between the ER and other organelles such as the Golgi, endosomes, mitochondria, peroxisomes, or the plasma membrane [8]. VAP proteins build MCSs either by directly interacting with other membrane-anchored proteins such as STARD3 and STARD3NL [10], or by interacting with soluble proteins that can also bind a second organelle, such as STARD11, PTPIP51, OSBP, ORP1L, and ORP3 [11–17]. MCSs scaffolded by VAPs and their interacting partners are involved in diverse biological functions, such as lipid transport, calcium homeostasis, signaling regulation, autophagy, and endosome dynamics [10–12,14,18–23].

Despite the prominent role of VAPs in tethering membranes, and transferring lipids and other metabolites, VAP-deficient cells are viable and contacts between the ER and other organelles persist [16,19,24]. These findings suggest that other tethering systems

1 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France

2 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1258, Illkirch, France

3 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR7104, Illkirch, France

4 Université de Strasbourg, Illkirch, France

5 CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université Côte d'Azur, Valbonne, France

6 Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, CEA, CNRS, Paris-Sud University, Paris-Saclay University, Gif-sur-Yvette Cedex 91198, France

7 Senology Unit, Strasbourg University Hospital (CHRU), Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France

*Corresponding author. Tel: +33 3 88 65 34 24; Fax: +33 3 88 65 32 01; E-mail: catherine-laure.tomasetto@igbmc.fr

**Corresponding author. Tel: +33 3 88 65 35 19; Fax: +33 3 88 65 32 01; E-mail: fabien.alpy@igbmc.fr

may compensate for the absence of VAP proteins to anchor FFAT-containing proteins onto the ER and create MCSs; however, potential surrogates for VAPs have not yet been identified. In this study, using an unbiased proteomic approach in mammalian cells, we isolated a novel ER-resident FFAT-binding protein named MOSPD2.

Results

Identification of a novel FFAT motif-interacting protein

Consistent with the notion that VAP-independent tethering mechanisms exist, VAP silencing has only a moderate effect on contacts involving the ER. For instance, loss of VAP-B only reduces ER–mitochondria contacts by 30% [16] and has no effect on ER–peroxisome contacts [25]. The combined loss of VAP-A and VAP-B only decreases by half contacts with the ER in a subpopulation of endosomes and in lysosomes [24]. This raises the possibility that the absence of VAP-A and VAP-B is compensated by (an)other protein(s) with similar functionalities and, notably, the ability to recruit FFAT-containing proteins. To identify candidates, a pull-down assay was performed using a synthetic and biotinylated peptide encompassing the FFAT motif of oxysterol-binding protein-related protein 1 (OSBPL1A aka ORP1) as a bait (Fig 1A). Its sequence fits to the consensus FFAT motif [9,26]. A non-binding peptide with a random sequence was used as control (Fig 1A). These peptides were attached to streptavidin beads and further incubated with HeLa cell protein extracts. Bound proteins were eluted and analyzed by SDS–PAGE followed by silver nitrate staining (Fig 1B). Two major bands, with apparent molecular weights of ~30 and ~60 kDa, were visualized (Fig 1B). To identify the corresponding proteins, the whole elutions were analyzed by tandem mass spectrometry (MS/MS; Fig 1C). Identified proteins were ranked based on their enrichment in the FFAT peptide sample over the control peptide sample, and on their MS/MS score (Fig 1C). Consistent with the current knowledge, the first two hits identified were VAP-A and VAP-B. The third one corresponded to a poorly characterized protein named motile sperm domain-containing protein 2 (MOSPD2). MOSPD2 is a 518 residue protein composed of three structural domains (Fig 1D): an amino-terminal CRAL/TRIO domain, named after cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) and triple functional domain protein (TRIO), which is potentially involved in small lipophilic molecule binding; a major sperm protein (MSP) domain, also present in VAP-A and VAP-B; and a potential carboxyl-terminal transmembrane domain (Figs 1D and EV1A). To confirm that MOSPD2 interacted specifically with the FFAT-containing peptide, we repeated the binding experiment and analyzed the different fractions by Western blot using specific antibodies (Fig 1E). Consistently, VAP-A and VAP-B were specifically depleted from the cell extract by the resin-bound FFAT peptide and were highly enriched in the corresponding elution. Likewise, MOSPD2 was retained by the FFAT peptide, and not by the control peptide, and the protein was highly enriched in the FFAT peptide elution.

Together, using an unbiased proteomic approach, we identified MOSPD2 as a new FFAT motif-interacting protein.

The MSP domain of MOSPD2 binds the FFAT motif

The presence of an MSP domain in MOSPD2 suggested that this part of the protein is responsible for binding the FFAT motif. Given that the tridimensional structure of the mouse MOSPD2 MSP domain was available (PDB ID: 1WIC), we compared it with that of rat VAP-A in complex with an FFAT peptide (PDB ID: 1Z9O) [27]. The 3D alignment of these two structures (Fig 2A) showed a conserved fold for both domains. In particular, two critical residues in VAP proteins (K94 and M96 in VAP-A), which are essential for FFAT-binding [27,28], align with two MOSPD2 residues having similar physico-chemical properties, a basic residue (R404) and a polar residue with a similar volume (L406), respectively (Fig 2B). These data were corroborated by primary sequence alignment of the MSP domains of MOSPD2, VAP-A, and VAP-B. Despite a relatively low percentage of identity (MOSPD2/VAP-A: 28% identity; MOSPD2/VAP-B: 30% identity; compared to VAP-A/VAP-B: 82% identity), FFAT-binding residues in VAP-A are present in regions conserved in MOSPD2 (Fig 2C). More specifically, K94 and M96 in VAP-A and K87 and M89 in VAP-B align with R404 and L406 in MOSPD2. These conservative changes suggest that the residues R404 and L406 in the MSP domain sequence of MOSPD2 are involved in FFAT-binding in a similar way as the lysine (K94 or K87) and methionine (M96 or M89) in VAP-A and VAP-B proteins (Fig 2D). Together, this conserved structure supports the notion that MOSPD2 interacts with FFAT motifs as VAP proteins do.

To gain more insight into how the MSP domain of MOSPD2 binds an FFAT motif, we used recombinant protein and tested its capacity to directly interact with a consensus FFAT motif-containing synthetic peptide. We produced, in *Escherichia coli*, and purified the MSP domain of MOSPD2 and, as positive and negative controls, the wild-type and mutated MSP domains of both VAP-A and VAP-B, respectively (Fig 2E). These K94D/M96D and K87D/M89D double mutants (hereafter both referred to as KD/MD mutants) of VAP-A and VAP-B, respectively, are unable to bind the FFAT motif [10,27]. Based on our structure comparison, we designed and purified the cognate MOSPD2 mutant R404D/L406D (hereafter referred to as RD/LD mutant; Fig 2E). Recombinant proteins corresponding to the wild-type and RD/LD mutant of the MSP domain of MOSPD2 together with controls were incubated with streptavidin beads coupled to FFAT or control peptides, as described above. Retained proteins were eluted and analyzed by SDS–PAGE followed by Coomassie blue staining (Fig 2F). We found that the MSP domain of MOSPD2 did specifically bind the FFAT peptide, similar to the MSP domains of VAP-A and VAP-B. Consistent with our predictions, the mutated MSP domain of MOSPD2 did not bind the FFAT peptide, like the mutated form of VAP-A and B.

In order to compare the binding properties of the MSP domains of MOSPD2, VAP-A and VAP-B to the FFAT peptide, we used an optical biosensing method, surface plasmon resonance (SPR; Fig 3). To do so, the FFAT peptide was immobilized onto a chip and increasing concentrations of recombinant MSP domain were injected. A dose-dependent signal increase showed that the MSP domains of either MOSPD2 (Fig 3A), VAP-A (Fig 3B), or VAP-B (Fig 3C) interacted with the FFAT peptide. In contrast, the RD/LD mutant MSP domain of MOSPD2 did not show any binding onto the FFAT peptide (Fig 3G) nor did the MSP domain of MOSPD2 onto the control peptide (Fig 3H). Although the sensorgrams displayed

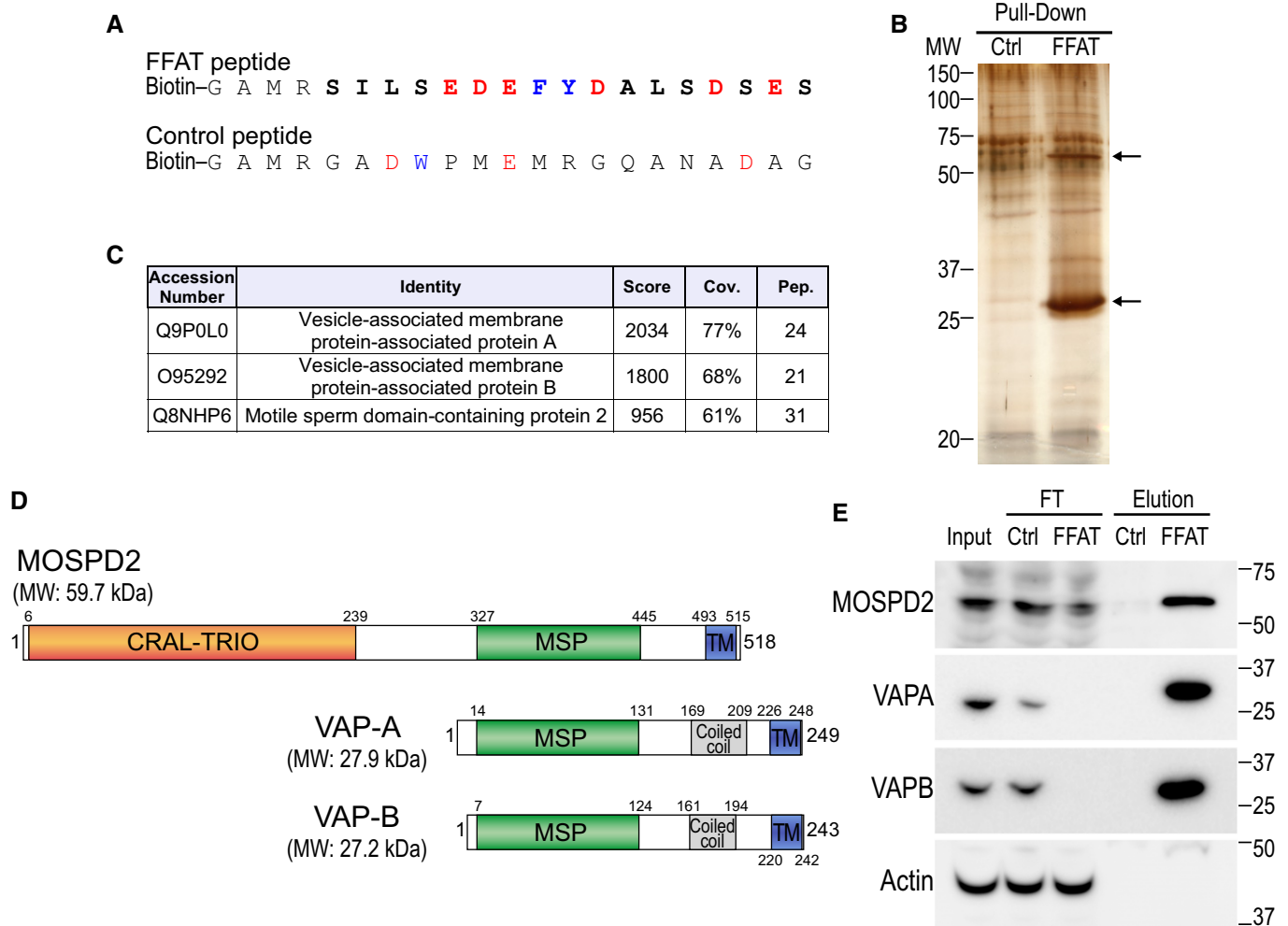


Figure 1. Identification of MOSPD2, a new FFAT motif-binding protein.

- A Sequence of the two peptides used for the pull-down assay. The peptides are composed of an amino-terminal biotin, a linker sequence and the FFAT sequence of ORP1 (FFAT peptide) or a random sequence (control peptide). The FFAT sequence of ORP1 is in bold and corresponds to residues 469–483 (Accession Number Q9BXW6-1). Aromatic and acidic residues are in blue and red, respectively.
- B Silver nitrate staining of proteins pulled down using the control peptide (left) or the FFAT peptide (right), after SDS-PAGE. The two major differential bands are highlighted by arrows.
- C Tandem mass spectrometry result table showing the three top-scored proteins identified in the FFAT peptide-bound fraction. Score: protein score based on the sum of the ion scores of all peptides identified; Cov.: percentage of the protein sequence covered by identified peptides; Pep.: number of unique peptide sequences identified.
- D Schematic representation of MOSPD2, VAP-A, and VAP-B. Numbers correspond to the predicted positions of the beginning and the end of each domain. Calculated molecular weights (MW) of the proteins are shown.
- E Western blot analysis of proteins pulled down using the control (Ctrl) peptide (left), or the FFAT (FFAT) peptide (right). The input, FT (flow through), and elution fractions correspond to HeLa cell total protein extract, unbound proteins, and bound proteins, respectively. Representative illustration of at least two independent experiments.

Source data are available online for this figure.

very steep association and dissociation behaviors (Fig 3A–C) impeding the determination of kinetic rates, they reached a steady-state response (R_{eq}) during the association phase. Therefore, affinities could be evaluated by fitting the variations of R_{eq} as a function of the MSP domain concentration, assuming a 1:1 model. Prior to determine affinities, we controlled the quaternary structure of the proteins. Indeed, VAP proteins dimerize through a coiled-coil domain [27,29–31]. Consistently, gel filtration analysis showed that

our VAP-A and VAP-B recombinant proteins, which included both the MSP and the coiled-coil domains, were dimeric (Appendix Fig S1A and B). Unlike VAPs, the MSP domain of MOSPD2 was monomeric as shown by size exclusion chromatography equipped with multi-angle light scattering analysis (SEC-MALS; Appendix Fig S1C). Eventually, the concentrations used to calculate affinities correspond to a monomeric form for MOSPD2 and to a dimeric form for VAP-A and VAP-B proteins, with the assumption that the

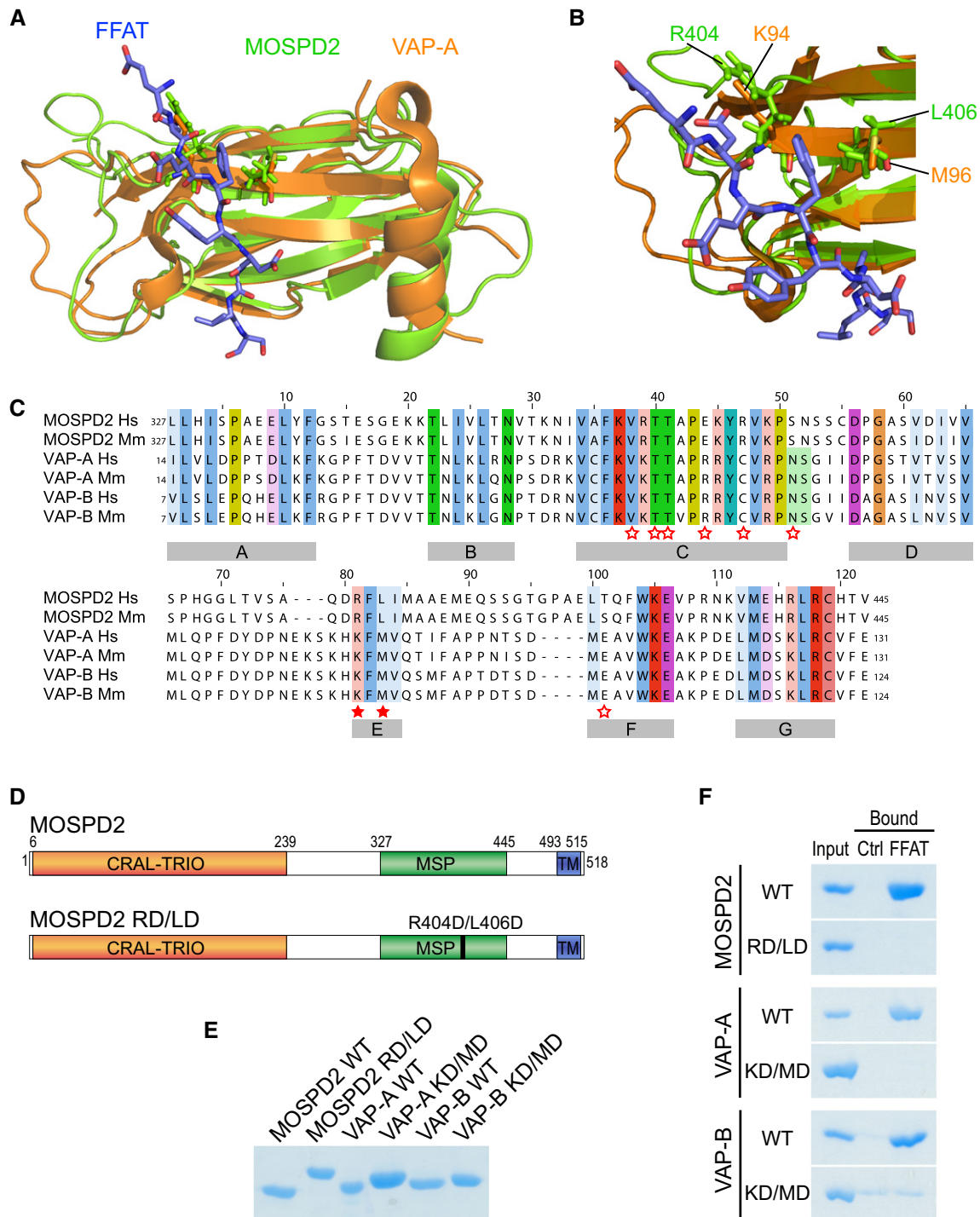


Figure 2. The MSP domain of MOSPD2 binds the FFAT motif.

A, B (A) Structural alignment of the MSP domains of MOSPD2 (PDB ID: 1W1C; green) and VAP-A in complex with the FFAT motif of ORP1 (PDB ID: 1Z9O; orange). The FFAT peptide is in blue. (B) FFAT-MSP binding interface: the critical residues K94, M96 in VAP-A, and R404, L406 in MOSPD2 are shown as sticks.

C Sequence alignment of the MSP domains of MOSPD2, VAP-A, and VAP-B from human (Hs) and mouse (Mm). Numbers refer to amino acid positions. Red stars indicate the position of residues interacting with the FFAT motif in VAP-A [27]. Filled stars indicate the position of the two critical residues in VAP proteins (K94 and M96 in VAP-A; K87 and M89 in VAP-B) for FFAT interaction. Subregions with high homology between the three proteins are indicated with gray boxes (A–G).

D Schematic representation of MOSPD2 showing the position of the RD/LD mutation of the MSP domain.

E Coomassie blue staining of recombinant wild-type and mutant MSP domains of MOSPD2, VAP-A, and VAP-B on SDS-PAGE. Note that the mutant MSP domains of MOSPD2, VAP-A, and VAP-B displayed a slowed migration, likely resulting from the negative charges introduced by the mutations.

F Coomassie blue staining of proteins pulled down with the control or the FFAT peptide. Representative illustration of at least two independent experiments.

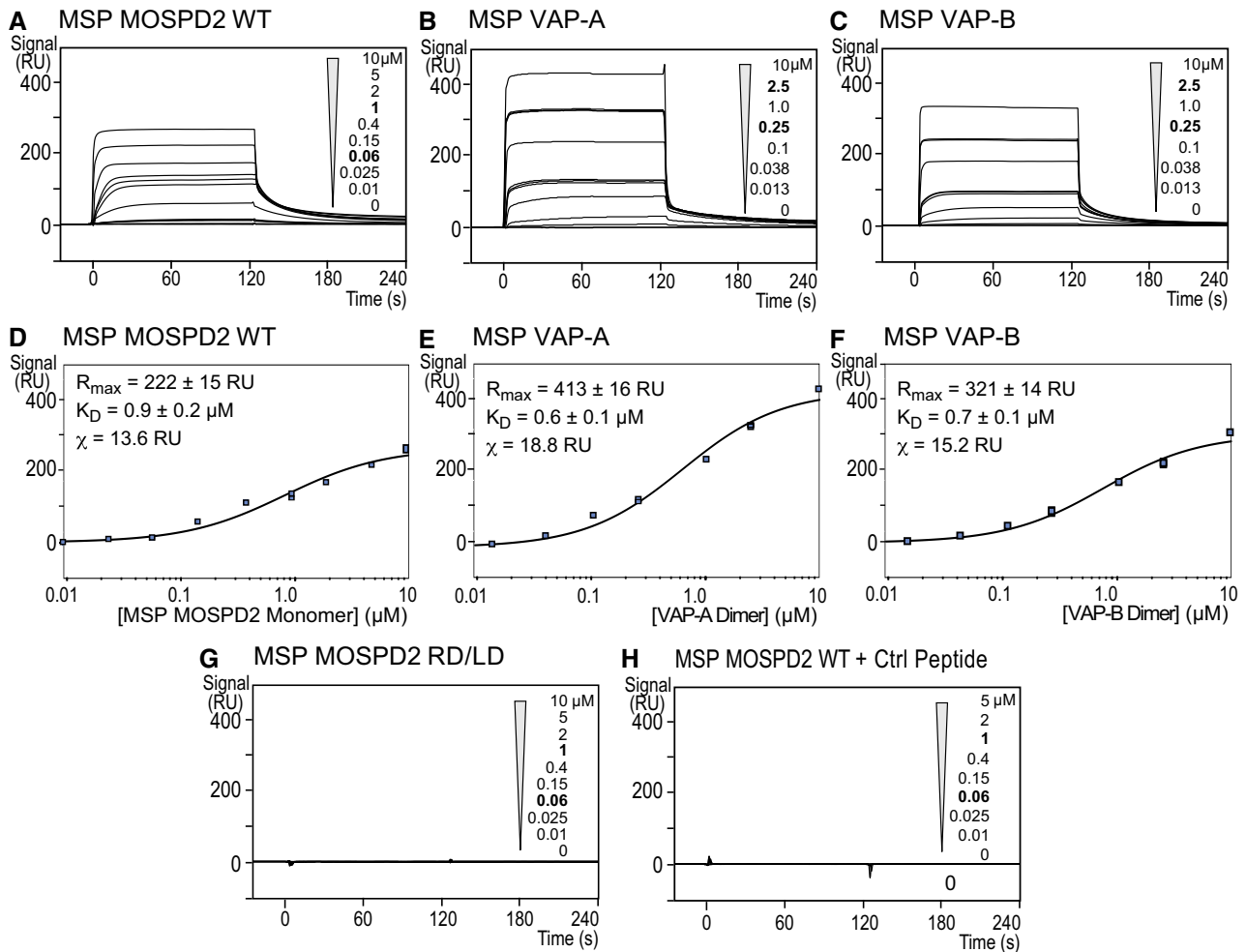


Figure 3. The MSP domain of MOSPD2 binds the FFAT motif with an affinity in the micromolar range.

A–H Surface plasmon resonance analysis of the MSP domain of MOSPD2, VAP-A, or VAP-B binding onto immobilized FFAT peptide. Representative sensorgrams resulting from the interaction between the MSP domain of MOSPD2 (A), VAP-A (B), or VAP-B (C) injected at different concentrations, and the FFAT peptide. No binding was detected when the RD/LD mutant MSP domain of MOSPD2 was injected onto the FFAT peptide (G), or when the wild-type MSP domain of MOSPD2 was injected onto the immobilized control peptide (H). Binding curves display the SPR signal (RU) as a function of time. Concentrations printed in bold indicate samples measured three times. Samples with no protein (0 μ M concentration) were measured two times. (D) Steady-state analysis of the FFAT peptide/MSP domain of MOSPD2 interaction: Equilibrium responses (R_{eq}) extracted from panel (A) were plotted as a function of the MSP domain of MOSPD2 concentration, and fitted with a 1:1 binding model. (E, F) Steady-state analysis of the FFAT peptide/MSP domain of VAP-A (E) or VAP-B (F) interaction: equilibrium responses (R_{eq}) extracted from panel (A) were plotted as a function of dimeric VAP concentration and fitted with a 1:1 binding model.

monomer–dimer equilibrium is negligible. A K_D of 0.9 ± 0.2 μ M was determined by fitting the binding isotherm obtained for the MSP domain of MOSPD2/FFAT peptide interaction (Fig 3D). Comparable dissociation constant (K_D) values were obtained for VAP-A (0.6 ± 0.1 μ M) and VAP-B (0.7 ± 0.1 μ M) MSP domains/FFAT peptide interaction (Fig 3E and F). These experiments showed that the MSP domains of MOSPD2, VAP-A, and VAP-B have similar micromolar affinities for the FFAT motif. Protein–protein interactions are governed by an ensemble of parameters, including affinity, co-localization, and concentration. We reasoned that despite having similar affinities, MOSPD2 and VAPs might differ by their abundance in cells. To measure absolute VAP-A, VAP-B, and MOSPD2 protein amounts, we performed quantitative immunoblots and used recombinant proteins to build standard curves (Appendix Fig S1D–G).

We also controlled the immunoblot specificity by running in parallel whole cell protein extracts from wild-type and silenced cells. Next, absolute protein levels were expressed as a function of total protein mass. Of interest, we noted that the level of VAP-A, VAP-B, and MOSPD2 differed by several order of magnitude in HeLa cells (Appendix Fig S1G). VAP-A is the most abundant protein, and VAP-B and MOSPD2 are thirty and two hundred times less abundant, respectively. Altogether, these results indicate that the level of MSP-containing protein is diverse, and one can speculate that despite using a similar mode of interaction, their relative concentration might regulate the dynamics of the formation of MCS.

Together, *in vitro* structure–function analysis shows that the MSP domain of MOSPD2 is a *bona fide* FFAT motif-interacting domain.

MOSPD2 is an ER-resident protein

Analysis of the primary sequence of MOSPD2 points to the existence of a potential C-terminal transmembrane domain (Figs 1D and EV1A), suggesting that the protein is anchored in a membrane. To know to which cellular membrane MOSPD2 is bound, we sought for its subcellular localization. To do so, we generated a HeLa cell line expressing a GFP-MOSPD2 construct and observed the GFP signal (Fig 4A). GFP-MOSPD2 exhibited a reticular pattern extending throughout the cytoplasm with a perinuclear enrichment, suggesting that the protein was present in the ER. Next, we labeled GFP-MOSPD2 expressing cells with two ER markers, Calnexin and VAP-A (Fig 4A). GFP-MOSPD2 co-localized extensively with Calnexin and VAP-A. Accordingly, MOSPD2 signal was highly correlated to Calnexin signal (Fig 4B). These data show that MOSPD2 is an ER-resident protein. In order to verify that MOSPD2 was anchored in the ER membrane by its TM, we expressed an MOSPD2 mutant lacking the TM. The GFP-MOSPD2 Δ TM protein exhibited an even distribution in the cytoplasm (Fig EV1B). Together, these data show that MOSPD2 is a tail-anchored ER-resident protein.

To evaluate whether the FFAT-binding ability of MOSPD2 contributes to the steady-state localization of the protein, the localization of a mutant of the MSP domain unable to bind FFAT motifs, the GFP-MOSPD2 RD/LD mutant (Fig 2D) was studied (Fig 4C). Of interest, the localization of MOSPD2 at steady state was not affected by the inactivation of the MSP domain, the protein being distributed in reticular ER (Fig 4C and data not shown). To be certain that we did not miss a subtle change in localization, we also co-expressed wild-type and RD/LD MOSPD2 proteins fused to mCherry and GFP, respectively, and compared their localizations. The mCherry and GFP signal were highly similar (Fig 4C). In addition, co-labeling with the ER protein Calnexin showed that MOSPD2 and MOSPD2 RD/LD signals were similarly correlated with Calnexin signal (Fig 4B). Thus, inactivating binding to FFAT does not modify MOSPD2 localization, supporting the idea that the C-terminal membrane anchor is attaching MOSPD2 to the ER.

Collectively, these data showed that MOSPD2 is an ER-resident protein. Moreover, MOSPD2 localization is not dependent on the presence of a functional MSP domain; therefore, we can reason that at steady state and in HeLa cells, MOSPD2 does not have a favored FFAT motif-interacting protein partner localized at a discrete subcellular region.

The MSP domain of MOSPD2 allows membrane tethering

As a number of FFAT-containing proteins are also physically associated with membranes of various organelles [8], it is likely that the interaction between the MSP domain of MOSPD2 and the FFAT motif drives a membrane tethering mechanism between the ER and (an)other organelle(s). To show that, we did *in vitro* tethering assays with the recombinant MSP domain of MOSPD2 and liposomes (Fig 4D and E). Using dynamic light scattering (DLS), we monitored tethering by recording the size of particles formed in the presence of two liposomes populations, one bearing an FFAT-containing peptide (L_A liposomes) and the other covered by the MSP domain of MOSPD2 (L_B liposomes). The peptide was attached to L_A liposomes via a covalent link with thiol-reactive MPB-PE lipids (3 mol%). The MSP domain of MOSPD2 was bound to L_B liposomes thanks to a C-terminal 6His-tag attached to DOGS-NTA-Ni²⁺ lipids (2 mol%, Fig 4D). L_A liposomes bearing the FFAT peptide were then mixed with L_B liposomes together with the MSP domain of MOSPD2. A rapid increase in the initial mean radius (80 nm on average) up to 600 nm was observed upon MSP addition (Fig 4E). Size distribution analysis at the end of the kinetics was indicative of the formation of liposome aggregates with high polydispersity (479 ± 87 nm) at the expense of free liposomes (97 ± 15 nm). The same experiment was performed using the RD/LD MSP mutant unable to bind FFAT, and no aggregation was observed in the presence of this mutant.

These results show that the MSP domain of MOSPD2 and the FFAT motif trigger the formation of membrane contacts between synthetic vesicles.

MOSPD2 interacts with FFAT and FFAT-like motif-containing proteins

The ability of the MSP domain of MOSPD2 to bind FFAT motifs supports the notion that, like VAP proteins, MOSPD2 might interact with a variety of FFAT-containing proteins. To test this hypothesis, we performed immunoprecipitation experiments using GFP-MOSPD2 and GFP-MOSPD2 RD/LD as baits and analyzed their interacting partners by mass spectrometry. GFP-MOSPD2 RD/LD was used as a negative control to filter proteins according to their ability to interact with MOSPD2 in an FFAT-dependent manner. Among the 109 proteins identified (Appendix Table S1), five were established VAP partners containing a FFAT motif (Fig 5A), and nine additional

Figure 4. MOSPD2 is an ER-resident protein able to tether synthetic vesicles by binding the FFAT motif.

- HeLa/GFP-MOSPD2 cells were labeled with anti-Calnexin antibodies (top; magenta) or with anti-VAP-A antibodies (bottom; magenta).
- Pearson correlation coefficients between GFP-MOSPD2 and Calnexin (left) or GFP-MOSPD2 RD/LD and Calnexin (right) staining are shown. Each dot represents a single cell (20 cells from three independent experiments). Means and error bars (SD) are shown. Mann–Whitney test.
- HeLa cells co-expressing GFP-MOSPD2 RD/LD (green) and mCherry-MOSPD2 (magenta).
- Description of the liposome aggregation assay experimental strategy. L_A liposomes are decorated with an FFAT peptide owing to covalent links with MPB-PE lipids, and mixed with L_B liposomes covered by 6His-tagged MOSPD2 MSP domain attached to DOGS-NTA-Ni²⁺.
- Aggregation assays in real time. L_A liposomes (50 μ M total lipids) decorated with conventional FFAT peptide (380 nM) were mixed with L_B liposomes (50 μ M total lipids) covered with the wild-type (top; 760 nM) or the RD/LD mutant (bottom; 760 nM) MSP domain of MOSPD2. Aggregation was followed by dynamic light scattering (DLS). Left panels: mean radius (black dots) and polydispersity (shaded area) over time. Right panels: size distribution before (gray bars) and after (black bars) the reaction. Representative illustration of at least three independent experiments.

Data information: In (A and C), the subpanels on the right are higher magnification (3.5 \times) images of the area outlined in white. The Overlay panel shows merged green and magenta images. The Coloc panel displays a colocalization mask on which pixels where the green and the magenta channels co-localize are shown in white. Right: Linescan analyses with fluorescence intensities of the green and magenta channels along the white arrow shown on the subpanel Overlay. Scale bars: 10 μ m.

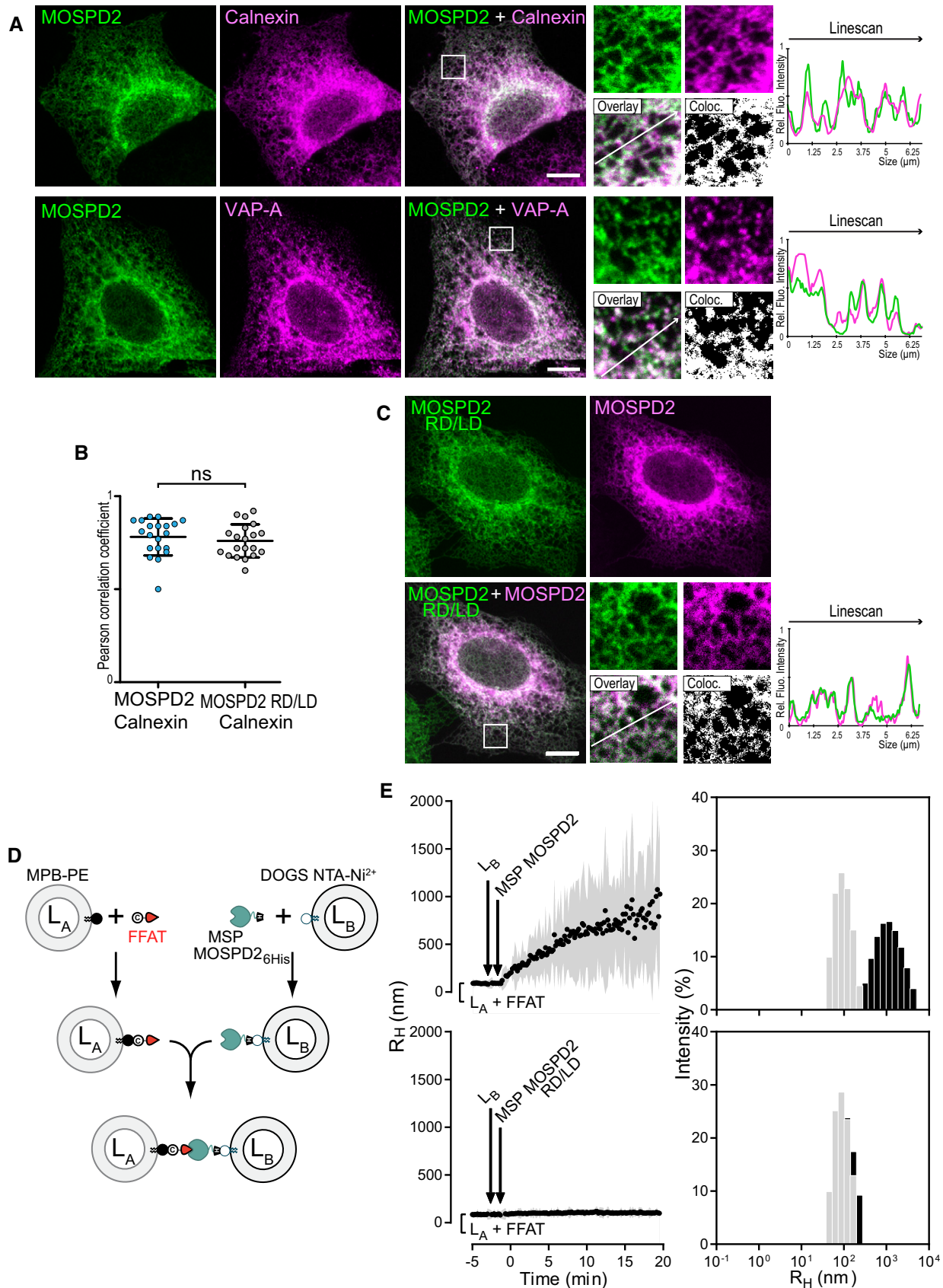


Figure 4.

proteins were already identified as VAP partners in interaction databases [32].

To test the robustness of the proteomic analysis of the MOSPD2 interactome, we performed co-immunoprecipitation assays between MOSPD2 and several FFAT-containing proteins, namely STARD3 (StAR-related lipid transfer domain protein 3, also known as metastatic lymph node 64, MLN64), STARD3NL (STARD3 N-terminal-like protein, also known as MLN64 N-terminal homologue, MENTHO), ORP1L (oxysterol-binding protein-related protein 1L), and PTPIP51 (protein tyrosine phosphatase-interacting protein-51, also known as regulator of microtubule dynamics protein 3, RMD3), which were all identified in our proteomic analysis. We also included STARD11 (StAR-related lipid transfer domain protein 11, also known as CERT), another established VAP partner [11]. All these proteins, by binding VAP proteins, are known to build contact sites between the ER and endosomes (STARD3, STARD3NL, ORP1L), mitochondria (PTPIP51), and Golgi (STARD11) [10,11,14,18,27]. Interestingly, these proteins harbor either a consensus FFAT motif as originally defined (ORP1L, STARD11) or slightly divergent sequences, so-called FFAT-like motifs (STARD3, STARD3NL, and PTPIP51) [8]. GFP-tagged MOSPD2 was co-expressed in HeLa cells with wild-type and with FFAT-mutant forms of all these proteins namely STARD3 and STARD3 FA/YA (Fig 5B), STARD3NL and STARD3NL Δ FFAT (Fig 5C), ORP1L and ORP1L FA/YA (Fig 5D), STARD11 and STARD11 D324A (Fig 5E), and PTPIP51 and PTPIP51 Δ FFAT (Fig 5F) and subjected to immunoprecipitation. As a result, wild-type STARD3, STARD3NL, ORP1L, STARD11, and PTPIP51 were co-immunoprecipitated with MOSPD2. Of note, the FFAT-defective mutants of STARD3, STARD3NL, ORP1L, and STARD11 were not co-immunoprecipitated. The FFAT mutant of PTPIP51 was poorly co-immunoprecipitated by MOSPD2. Thus, the interaction between MOSPD2 and these proteins requires an FFAT motif. Reciprocally, we performed co-immunoprecipitation experiments between the RD/LD mutant form of MOSPD2 and wild-type STARD3, STARD3NL, ORP1L, STARD11, and PTPIP51 (Fig 5B–F). Consistently, the MOSPD2 RD/LD mutant did not interact with any of the proteins above mentioned which indicated the necessity for the MSP domain of MOSPD2 to bind these proteins (STARD3, STARD3NL, ORP1L, STARD11, and PTPIP51) in a FFAT-dependent manner.

To determine whether endogenous MOSPD2 interacts with FFAT-containing proteins, we performed co-immunoprecipitation assays. Wild-type and FFAT-mutant Flag-STARD3NL (Fig 5G) or STARD3 (Fig EV2A) were expressed in HeLa cells and immunoprecipitated using anti-Flag and anti-STARD3 antibodies, respectively.

Endogenous MOSPD2 was co-immunoprecipitated with Flag-STARD3NL (Fig 5G) and STARD3 (Fig EV2A) and not with the FFAT-mutant Flag-STARD3NL Δ FFAT and STARD3 FA/YA. Thus, endogenous MOSPD2 interacts with FFAT-containing proteins.

To examine whether the binding process solely relies on the MSP domain, we performed pull-down experiments using 6His-tagged recombinant wild-type and RD/LD MSP domains of MOSPD2 (Fig 2E). Each recombinant protein was immobilized onto a NTA-Ni²⁺ resin, and beads were then incubated with protein extracts from HeLa cells stably expressing STARD3 (HeLa/STARD3) or the defective FFAT mutant (HeLa/STARD3 FA/YA; Fig EV2B) [23]. Bound proteins were analyzed by Western blot. The wild-type MSP domain of MOSPD2 interacted specifically with STARD3, but not with the STARD3 FA/YA mutant (Fig EV2B). Likewise, the mutant RD/LD MSP domain did not interact with STARD3. Similar results were obtained with STARD3NL (Fig EV2C). These experiments showed that the MSP domain of MOSPD2 is sufficient to interact with FFAT-containing proteins.

Collectively, these results showed that MOSPD2 interacts through its MSP domain with a variety of proteins containing consensus FFAT or FFAT-like motifs.

MOSPD2 is enriched in membrane contact sites by FFAT motif-containing proteins

It is known that VAP proteins bind a variety of FFAT-containing proteins [9,26]. As a result, VAPs are enriched in ER subdomains contacting the organelle bearing their protein partners [10,12,14,33]. We wondered whether MOSPD2 too could be relocalized in ER subregions engaged in specific interorganelle contacts. To test this assumption, we co-expressed MOSPD2 with STARD3, STARD3NL, ORP1L, STARD11, and PTPIP51 [10,11,14,18] (Fig 6). MOSPD2 expressed alone was evenly present in the ER (Fig 4A) with little association with endosomes (Fig 6A), Golgi, and mitochondria (data not shown). In contrast, in the presence of each of the FFAT-bearing proteins, MOSPD2 was predominantly recruited toward the organelles harboring this partner, either on endosomes when STARD3, STARD3NL, and ORP1L were expressed (Fig 6B–D), on the Golgi with STARD11 (Fig 6E), or on mitochondria with PTPIP51 (Fig 6F). To test whether this recruitment was solely dependent on the interaction between the MSP domain of MOSPD2 and the FFAT motif, localization experiments were repeated between STARD3NL- and MOSPD2-bearing mutations in the FFAT motif and the MSP domain, respectively. When expressed together, MOSPD2 was recruited toward STARD3NL/Lamp1-positive

Figure 5. MOSPD2 interacts with FFAT-containing proteins.

- A List of the five top-scored proteins interacting with MOSPD2 and known to contain a FFAT motif (see Appendix Table S1 for the full list). Proteins co-precipitated with GFP-MOSPD2 and GFP-MOSPD2 RD/LD proteins were identified by mass spectrometry; proteins were filtered for their ability to bind MOSPD2 and not the RD/LD mutant. The subcellular localization of the proteins is indicated [53,65–69].
- B–F Immunoprecipitation (GFP-Trap) experiments between GFP-MOSPD2 (WT and RD/LD mutant) and Flag-tagged STARD3 (B), STARD3NL (C), ORP1L (D), STARD11 (E), and HA-tagged PTPIP51 (F) (WT and FFAT-deficient). Approximately 5 μ g of total protein extracts was analyzed by Western blot using anti-Flag (B, C, E), anti-ORP1 (D), anti-HA (F), anti-GFP (B–F), and anti-actin (B–F) antibodies. Immunoprecipitated material was analyzed using anti-Flag (B, D–F) or anti-ORP1 (C), and anti-GFP (B–F) antibodies.
- G Immunoprecipitation (anti-Flag) experiment between Flag-tagged STARD3NL (WT and FFAT-deficient) and endogenous MOSPD2. Proteins extracts and immunoprecipitated material were analyzed by Western blot using anti-MOSPD2, anti-STARD3NL, and anti-actin antibodies.

Source data are available online for this figure.

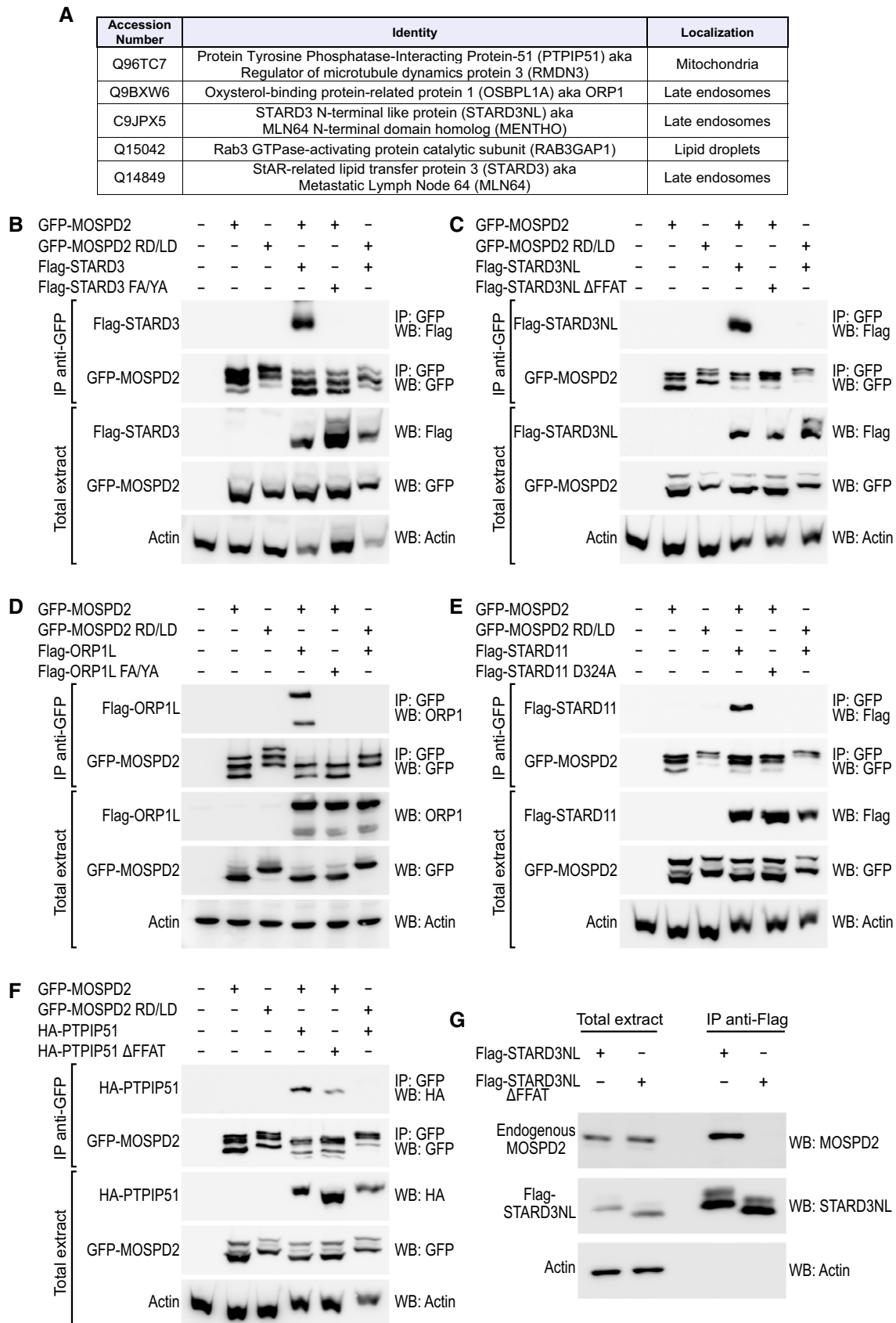


Figure 5.

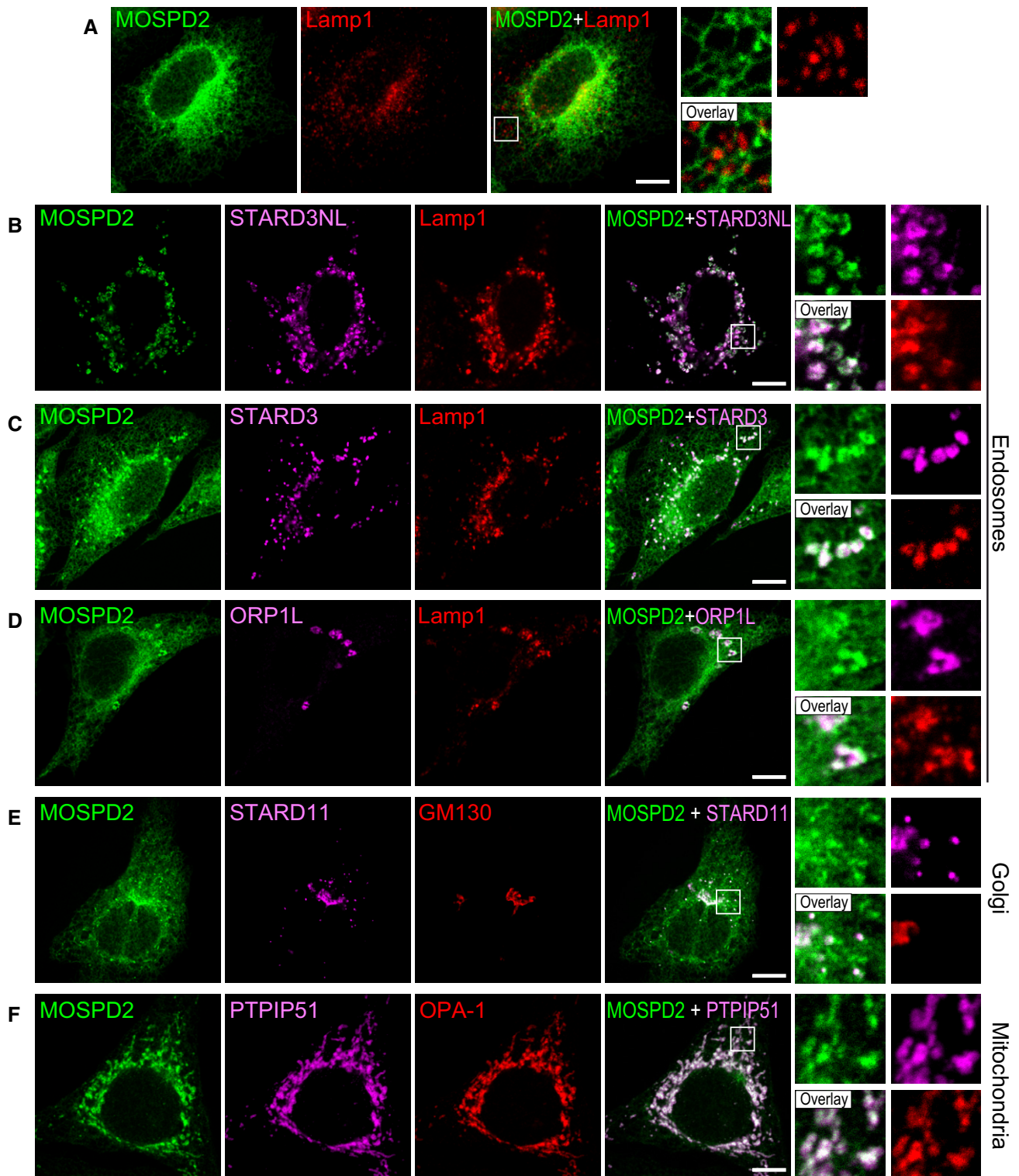


Figure 6. FFAT-containing proteins recruit the ER-resident MOSPD2 protein to interorganelle contact sites.

A GFP-MOSPD2 (green)-expressing cells were stained with an anti-Lamp1 antibody (red) to label late endosomes/lysosomes.

B–F GFP-MOSPD2 (green)-expressing cells were transfected with Flag-STARD3NL (B), Flag-STARD3 (C), Flag-ORP1L (D), Flag-STARD11 (E), or HA-PTPIP51 (F), and labeled using anti-Flag (B–E; magenta), anti-HA (F; magenta), and anti-Lamp1 (B–D; red), GM130 (E; red), or OPA-1 (F; red) as markers of late endosomes/lysosomes, Golgi, and mitochondria, respectively.

Data information: The subpanels on the right are higher magnification (3.5×) images of the area outlined in white. The Overlay panel shows merged green and magenta images. Scale bars: 10 μm.

endosomes (Fig 7A) and both signals were correlated (Fig 7D). Consistent with the notion that MSP-FFAT interaction is the driving force for the recruitment of MOSPD2 on organelles bearing a partner, no specific recruitment was observed on endosomes when the

MSP domain of MOSPD2 (RD/LD) or the FFAT motif of STARD3NL (Δ FFAT) was mutated (Fig 7B and C). In addition, under these conditions, MOSPD2 and STARD3NL signals were not correlated (Fig 7D). Likewise, MOSPD2 RD/LD was not recruited by STARD3

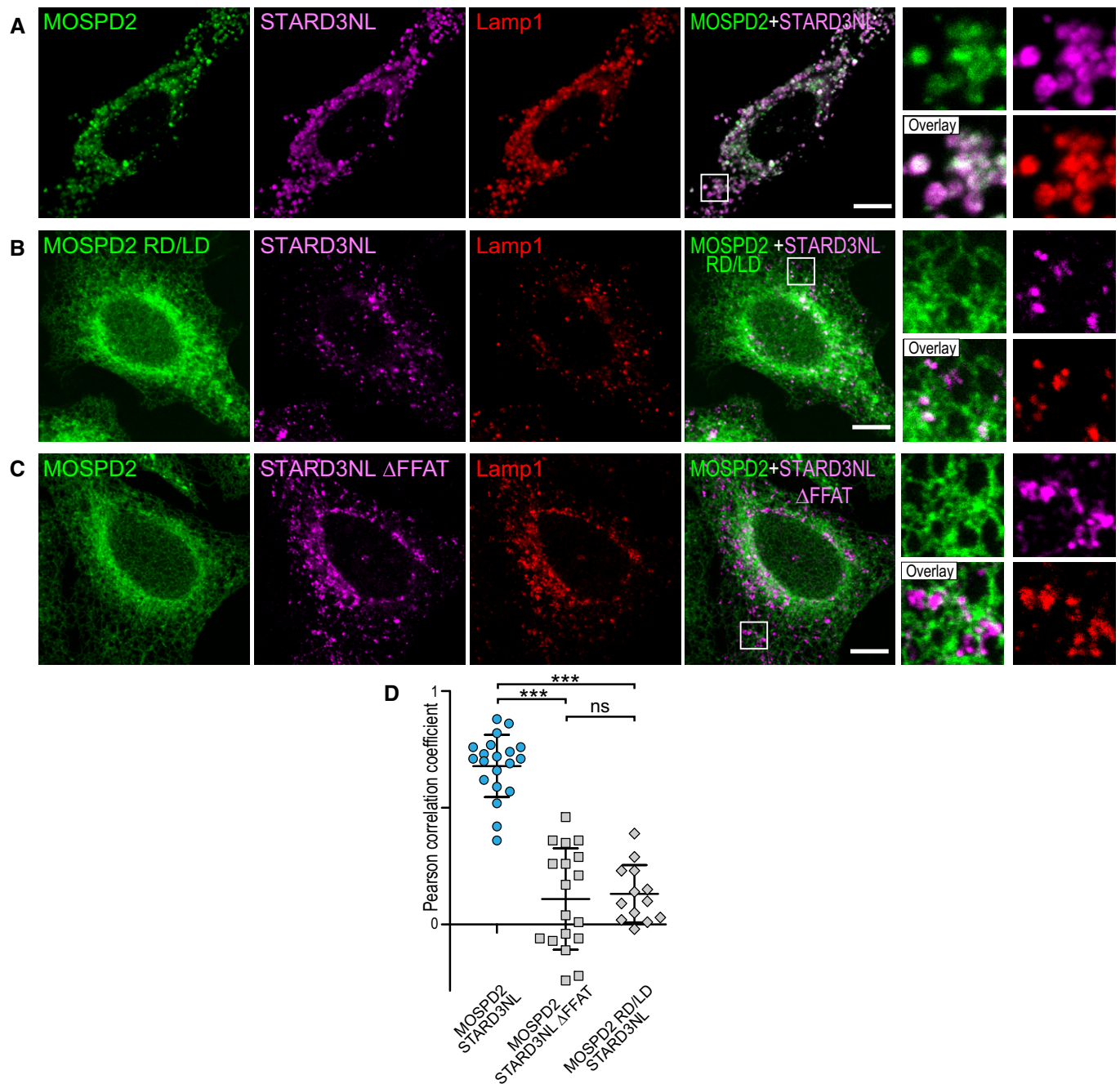


Figure 7. FFAT motif-dependent recruitment of MOSPD2 in ER-endosome contacts by STARD3NL.

A–C GFP-MOSPD2- (A and C) and GFP-MOSPD2 RD/LD-expressing cells (B) were transfected with Flag-STARD3NL (A and B), or Flag-STARD3NL Δ FFAT (C), and labeled using anti-Flag (magenta) and anti-Lamp1 (late endosomes/lysosomes marker; red) antibodies. The subpanels on the right are higher magnification (3.5 \times) images of the area outlined in white. The Overlay panel shows merged green and magenta images. Scale bars: 10 μ m.

D Pearson's correlation coefficients between MOSPD2 (WT or RD/LD mutant) and STARD3NL (WT or Δ FFAT) staining are shown. Each dot represents a single cell (number of cells: MOSPD2–STARD3NL: 20; MOSPD2–STARD3NL Δ FFAT: 18; MOSPD2 RD/LD–STARD3NL: 13, from three independent experiments). Means and error bars (SD) are shown. Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparison test (***) $p < 0.001$.

(Fig EV3A and E) and ORP1L (Fig EV3B and E) around endosomes. It was not recruited either by STARD11 around the Golgi (Fig EV3C and E) or by PTPIP51 around mitochondria (Fig EV3D and E). Moreover, mutant forms of STARD3, ORP1L, STARD11, and PTPIP51 lacking a functional FFAT motif were also unable to recruit MOSPD2 (data not shown and Fig EV3E). Interestingly, consistent with the fact that the recruitment operates in a MSP-FFAT-dependent manner, the GFP-MOSPD2 Δ TM which exhibited an even distribution in the cytosol when expressed alone (Fig EV1B) was also recruited onto STARD3-positive endosomes (Fig EV1C) and onto PTPIP51-positive mitochondria (Fig EV1D), in STARD3- and PTPIP51-expressing cells, respectively.

Of note, MOSPD2 and VAP-A have been identified as partners in a high-throughput interaction screening [34]. It is unclear how both proteins could interact, however, to rule out the possibility that VAP proteins were involved in the recruitment of MOSPD2 in contact sites, we looked at MOSPD2 subcellular localization in VAP-A- and VAP-B-silenced HeLa cells (Appendix Fig S2). Compared to control cells, small hairpin RNAs (shRNA) targeting VAP-A and VAP-B reduced their levels by ~ 98 and $\sim 99\%$, respectively (Appendix Fig S2B). Consistent with the notion that MOSPD2 is a *bona fide* partner of FFAT-containing proteins, in the absence of VAP proteins, MOSPD2 was still enriched around STARD3-positive endosomes and PTPIP51-positive mitochondria (Appendix Fig S2C and D).

To further substantiate these observations, we looked at endogenous MOSPD2 protein (Fig 8). First, we verified that the antibody we used was specifically detecting MOSPD2 by immunofluorescence in cells overexpressing GFP-MOSPD2 (Fig 8A). Then, we silenced MOSPD2 in HeLa cells using two different shRNAs (Fig 8B and C). Compared to non-silenced cells (HeLa and HeLa/shCtrl), MOSPD2 level was reduced by ~ 96 and $\sim 97\%$ with the α or β shRNA, respectively (Fig 8B). Endogenous MOSPD2 labeled in HeLa and HeLa/shCtrl cells displayed a reticular localization reminiscent of the ER (Fig 8C). Accordingly, endogenous MOSPD2 co-localized with an ER marker tagged with GFP (GFP-ER; Fig 8D). In marked contrast, MOSPD2 labeling in silenced cells resulted in the absence of signal over background (Fig 8C). Subsequently, we labeled endogenous MOSPD2 in cells expressing STARD3NL or the defective mutant STARD3NL Δ FFAT (Fig 8E and F). In the presence of STARD3NL,

MOSPD2 accumulated around STARD3NL-positive endosomes, while it remained evenly distributed in the ER in STARD3NL Δ FFAT-expressing cells. Accordingly, STARD3NL and endogenous MOSPD2 signals were highly correlated, while STARD3NL Δ FFAT and endogenous MOSPD2 signals were not (Fig 8G). Likewise, endogenous MOSPD2 was recruited around endosomes, Golgi, and mitochondria in STARD3- (Fig EV4A), ORP1L- (Fig EV4C), STARD11- (Fig EV4E), and PTPIP51-expressing cells (Fig EV4G). In contrast, in cells expressing FFAT-deficient STARD3 (Fig EV4B), ORP1L (Fig EV4D), STARD11 (Fig EV4F), or PTPIP51 (Fig EV4H), endogenous MOSPD2 retained an even distribution within the ER. Thus, endogenous MOSPD2 is recruited in ER subregions surrounding organelles harboring its interaction partners.

To assess whether VAP proteins were recruited in the same contact sites as MOSPD2, we co-labeled endogenous VAP-A and MOSPD2 in STARD3NL-expressing cells. Interestingly, endogenous VAP-A was recruited together with endogenous MOSPD2 around STARD3NL-positive endosomes (Fig EV5B). In control cells or in cells expressing the mutant protein STARD3NL Δ FFAT, both VAP-A and MOSPD2 were evenly distributed in the ER (Fig EV5A and C). Thus, using light microscopy, MOSPD2 and VAP are observed in the same contact sites.

Together, these data show that the localization of MOSPD2 in contact sites involving the ER and several organelles is triggered by the presence and abundance of a protein partner and occurs through an interaction with FFAT motifs.

MOSPD2 modulates interorganelle contacts

To substantiate the physiological relevance of these results, we investigated the effect of MOSPD2 knockdown on interorganelle contacts. Moreover, to understand the relative contribution of MOSPD2 and VAP proteins in this process, we performed single (MOSPD2), double (VAP-A and VAP-B), and triple (MOSPD2, VAP-A and VAP-B) knockdowns using siRNA pools (Fig 9A). MOSPD2, VAP-A, and VAP-B levels were efficiently reduced, by ~ 90 , ~ 99 , and 84% , respectively. Cells were processed for transmission electron microscopy (TEM) to visualize contacts between the ER and either mitochondria or endosomes. Contacts were either focal or extended up to almost $1\ \mu\text{m}$. To evaluate the amount of

Figure 8. Endogenous MOSPD2 is recruited to interorganelle contact sites by FFAT-containing proteins.

- A GFP-tagged MOSPD2 (green)-expressing cells were labeled with an anti-MOSPD2 antibody (magenta). The superposition of the green and magenta signals indicates that the anti-MOSPD2 antibody recognized efficiently MOSPD2 by immunofluorescence.
- B Western blot analysis of MOSPD2 and VAP proteins in control HeLa cells (WT) and in HeLa cells expressing a control shRNA (shCtrl) and two individual shRNAs targeting MOSPD2 (shMOSPD2- α or shMOSPD2- β). Quantification of MOSPD2 protein level is shown below. Means and error bars (SD) are shown. *n*: Three independent experiments.
- C Endogenous MOSPD2 (green) was labeled in control HeLa cells (WT), in cells expressing a control shRNA (shCtrl), and in cells expressing two individual shRNAs targeting MOSPD2 (shMOSPD2- α or shMOSPD2- β). Scale bar: $10\ \mu\text{m}$.
- D Endogenous MOSPD2 (green) staining in HeLa cells expressing the ER marker GFP-ER (magenta).
- E, F Endogenous MOSPD2 (green) staining in HeLa cells expressing Flag-STARD3NL (E) or Flag-STARD3NL Δ FFAT (F) (anti-Flag; magenta).
- G Pearson's correlation coefficients between endogenous MOSPD2 and Flag-STARD3NL (WT or Δ FFAT) staining are shown. Each dot represents a single cell (number of cells: MOSPD2–Flag-STARD3NL: 27; MOSPD2–Flag-STARD3NL Δ FFAT: 26; from three independent experiments). Means and error bars (SD) are shown. Mann–Whitney test (two-tailed *P*-value; *****P* < 0.0001).

Data information: (A, D–F): The subpanels on the right are higher magnification ($3.5\times$) images of the area outlined in white. The Overlay panel shows merged green and magenta images. The Coloc panel displays a colocalization mask on which pixels where the green and the magenta channels co-localize are shown in white. Right: Linescan analyses with fluorescence intensities of the green and magenta channels along the white arrow shown on the subpanel Overlay. Black rectangles indicate the positions of late endosomes (E). Scale bars: $10\ \mu\text{m}$. Source data are available online for this figure.

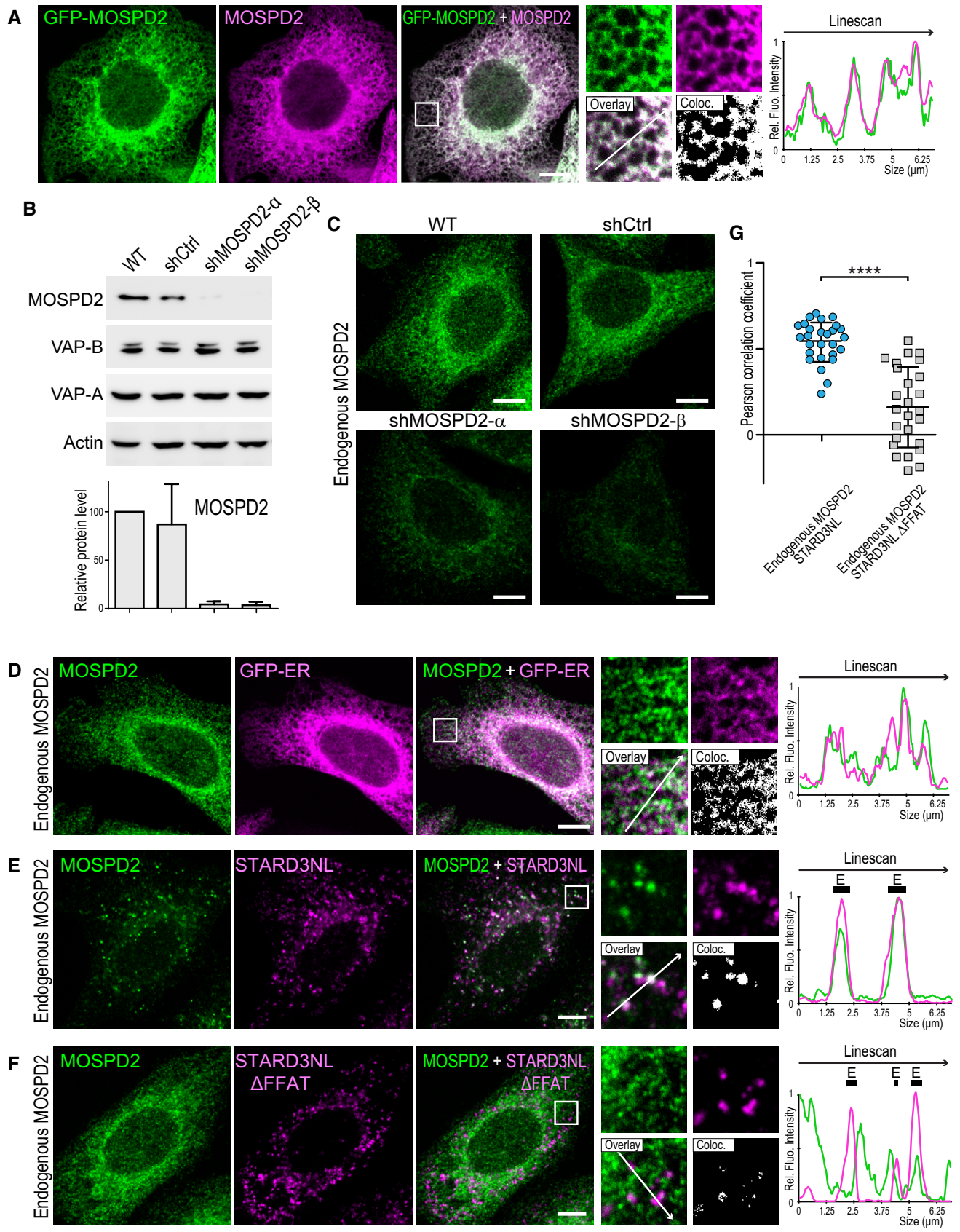


Figure 8.

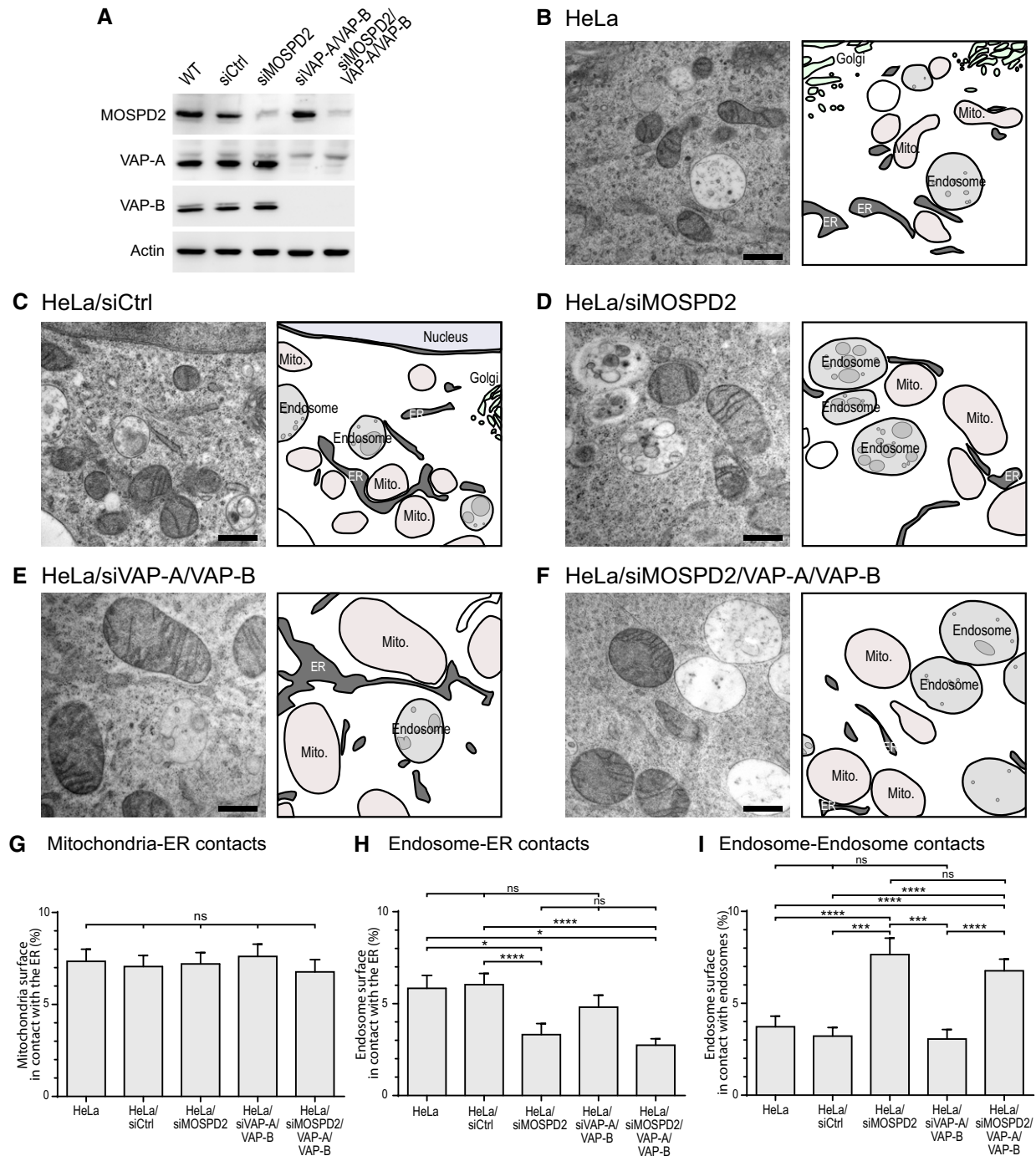


Figure 9. MOSPD2 silencing affects interorganelle contact sites organization.

A Western blot analysis of MOSPD2, VAP-A, and VAP-B proteins in control HeLa cells (WT) and in HeLa cells transfected with a control siRNA (siCtrl), and with siRNA targeting MOSPD2 (siMOSPD2), VAP-A, and VAP-B (siVAP-A/VAP-B), and MOSPD2, VAP-A, and VAP-B (siMOSPD2/VAP-A/VAP-B).

B–F TEM images of control HeLa cells (**B**: HeLa; **C**: HeLa/siCtrl) and MOSPD2 (**D**: siMOSPD2), VAP-A, and VAP-B (**E**: siVAP-A/VAP-B), and MOSPD2-, VAP-A-, and VAP-B (**F**: siMOSPD2/VAP-A/VAP-B)-silenced HeLa cells. An interpretation scheme representing contacts between organelles is shown on the right; the ER, endosomes, and ILV are in dark, light, and medium gray, respectively. Mitochondria and Golgi are in pink and light green, respectively. Scale bars: 500 nm.

G–I Quantification by stereology of ER–mitochondria (**G**), ER–endosome (**H**), and endosome–endosome (**I**) contacts. The percentages of mitochondria perimeter in contact with the ER (**G**), endosome perimeter in contact with the ER (**H**), and endosome perimeter in contact with an endosome (**I**) are shown as means and error bars (SEM). (**G**) 200 (HeLa), 208 (siCtrl), 199 (siMOSPD2), 202 (siVAP-A/VAP-B), 199 (siMOSPD2/VAP-A/VAP-B) mitochondria from 8, 10, 8, 12, and 12 cells, respectively, were analyzed. (**H**, **I**) 202 (HeLa), 189 (siCtrl), 148 (siMOSPD2), 141 (siVAP-A/VAP-B), 221 (siMOSPD2/VAP-A/VAP-B) endosomes from 9, 19, 10, 14, and 12 cells, respectively, were analyzed. Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparison test (* P -values < 0.05; **** P < 0.001; ***** P < 0.0001).

Source data are available online for this figure.

interorganelle contacts, the percentage of the organelle perimeter in contact with the ER was quantified by stereology on random sections, as in [10] (Fig 9). Compared with control cells, HeLa (Fig 9B), and HeLa transfected with a control siRNA (Fig 9C), contacts between the ER and mitochondria were unchanged (Fig 9G) in HeLa cells silenced for MOSPD2 (Fig 9D), VAP-A, and VAP-B (Fig 9E), and MOSPD2, VAP-A, and VAP-B (Fig 9F). Though, ER–endosome contacts were affected by MOSPD2 silencing. Indeed, the surface of contact between the ER and endosomes was reduced upon MOSPD2, or MOSPD2/VAP-A/VAP-B silencing (Fig 9H). Using this methodology, the silencing of VAP-A and VAP-B proteins alone did not result in a significant reduction in contacts. We reasoned that the decrease in ER–endosome contacts might result in changes in other interorganelle contacts involving endosomes, such as endosome–endosome contacts. Indeed, we observed that contacts between endosomes and endosomes were more frequent in MOSPD2-silenced cells (Fig 9D and F), a phenotype that we quantified (Fig 9I). To substantiate these results, we repeated the experiments using a different silencing method and analyzed the ultrastructure of HeLa cells silenced with an shRNA strategy for MOSPD2. The silencing of MOSPD2 with two different shRNAs, shMOSPD2- α and shMOSPD2- β , resulted in a phenotype similar to the one reported above (Appendix Fig S3).

These data show that MOSPD2 loss affects interorganelle contacts, more specifically ER–endosome and endosome–endosome contacts.

Discussion

The formation of membrane contact sites is now recognized as an important mode of communication between organelles [5]. In this context, the ER has a predominant place: firstly, the ER is a large organelle constituted of a network of sheets and tubules extending throughout the cytoplasm; secondly, the ER network makes extensive contacts with the other organelles of the cell which are essential for intracellular exchanges and proper organelle positioning and maturation [3]. The ER-resident proteins named VAP-A and VAP-B are able to tether organelles by interacting with linear motifs, called FFAT, present in over a hundred proteins [8,9]. The ability of VAP proteins to be partners of so many proteins is startling. Intriguingly, when VAP proteins are downregulated, ER–organelle contacts persist [16,24]. Therefore, it was tempting to speculate that other proteins might have a similar tethering activity. By using a proteomic approach, we identified a new protein of the VAP family named MOSPD2 which resides on the ER and acts as a receptor for FFAT-bearing proteins to mediate the formation of MCSs (Fig 10).

The primary sequence of MOSPD2 shows the presence of an MSP domain which classifies this protein in the same family as VAP proteins. Six human proteins possess an MSP domain, namely VAP-A, VAP-B, MOSPD1, MOSPD2, MOSPD3, and CFAP65 (cilia- and flagella-associated protein 65) [35]. While CFAP65 expression appears restricted to reproductive organs [36], the other five MSP-containing proteins are broadly expressed [37]. Notably, by looking at open gene expression databases [38], we found that they are expressed in HeLa cells, the model cell line we used here to screen for FFAT-interacting proteins. However, in our screen designed to

isolate FFAT-binding proteins, we specifically identified VAP-A, VAP-B, and MOSPD2; neither MOSPD1 nor MOSPD3 were significantly enriched. Since MOSPD1 and MOSPD3 are expressed at similar levels than MOSPD2 in HeLa cells, we can posit that either they do not bind the FFAT motif or they do but with a lower affinity than VAPs and MOSPD2. Along the same line, by mining high-throughput interactome studies [34], we found that among the MOSPD proteins, only MOSPD2 was interacting with proteins such as protrudin or STARD3NL which were previously reported to contain an FFAT motif [10,39]. Therefore, we can consider that at least three proteins, VAP-A, VAP-B, and MOSPD2, can be receptors for FFAT-containing proteins.

Besides binding FFAT motifs, VAP proteins have been shown to form homo- and hetero-oligomers which are mainly mediated by their coiled-coil and transmembrane domains [30,40]. Of note, MOSPD2 was reported to interact with VAP-A by an unknown mechanism [41]. In this report, we showed that in MCS built by the endosomal protein STARD3NL, both MOSPD2 and VAP were present. Although light microscopy does not resolve single tethering complexes, we can speculate that the three proteins VAP-A, VAP-B, and MOSPD2 may form clusters at the surface of the ER; by exposing their MSP domains in the cytosol, these clusters would be binding platforms for proteins harboring an FFAT motif enabling the formation of contact sites.

Approximately 100 proteins, grouped under the name VAPome (VAP interactome), have been shown to interact with VAPs [8,34]. The majority of these interactions are mediated by the ability of the MSP domain of VAPs to interact with FFAT motifs. Intriguingly, FFAT motif sequences are quite diverse; besides the consensus FFAT sequence originally defined (EFFDaxE), many related sequences, so-called FFAT-like motifs, also bind VAPs [8,9]. Interestingly, we showed that MOSPD2 binds both FFAT and FFAT-like sequences. MOSPD2 and VAP proteins share similarly folded MSP domains. Moreover, the affinities for consensus FFAT motifs are similar for the MSP domains of VAP proteins and MOSPD2. In this study, by looking at this MOSPome (MOSPD2 interactome) in HeLa cell, we found an overlap with the VAPome. Along the same line, we show here that MOSPD2 is mediating the formation of membrane contact sites with established VAP partners from distinct organelles. How the balance between contact sites mediated by VAPs and MOSPD2 is modulated remains unclear. The abundance of the respective proteins is probably a regulator for the dynamics of ER-born MCS. For instance, in our study, we showed that VAP-A is more abundant than VAP-B (30-fold) and MOSPD2 (200-fold). It is then plausible that the concentration of a given tether may regulate the molecular landscape of MCS in a cell type- and context-specific manner. Furthermore, besides tethering complexes involving VAPs and FFAT-containing proteins, several complexes which do not involve VAPs have been described; for instance, extended synaptotagmins (E-Syts) which mediate ER–plasma membrane (PM) contacts in a Ca^{2+} and phosphoinositide-dependent manner, and ORP5/ORP8 which are anchored in the ER and mediate both ER–PM and ER–mitochondria contact formation [42–45]. Most probably, other complexes are yet to be identified. Membrane contact sites are morphologically defined by electron microscopy techniques as regions where two distinct organelle membranes are separated by a short spacing [1]. The spacing between membranes most probably restricts the recruitment of

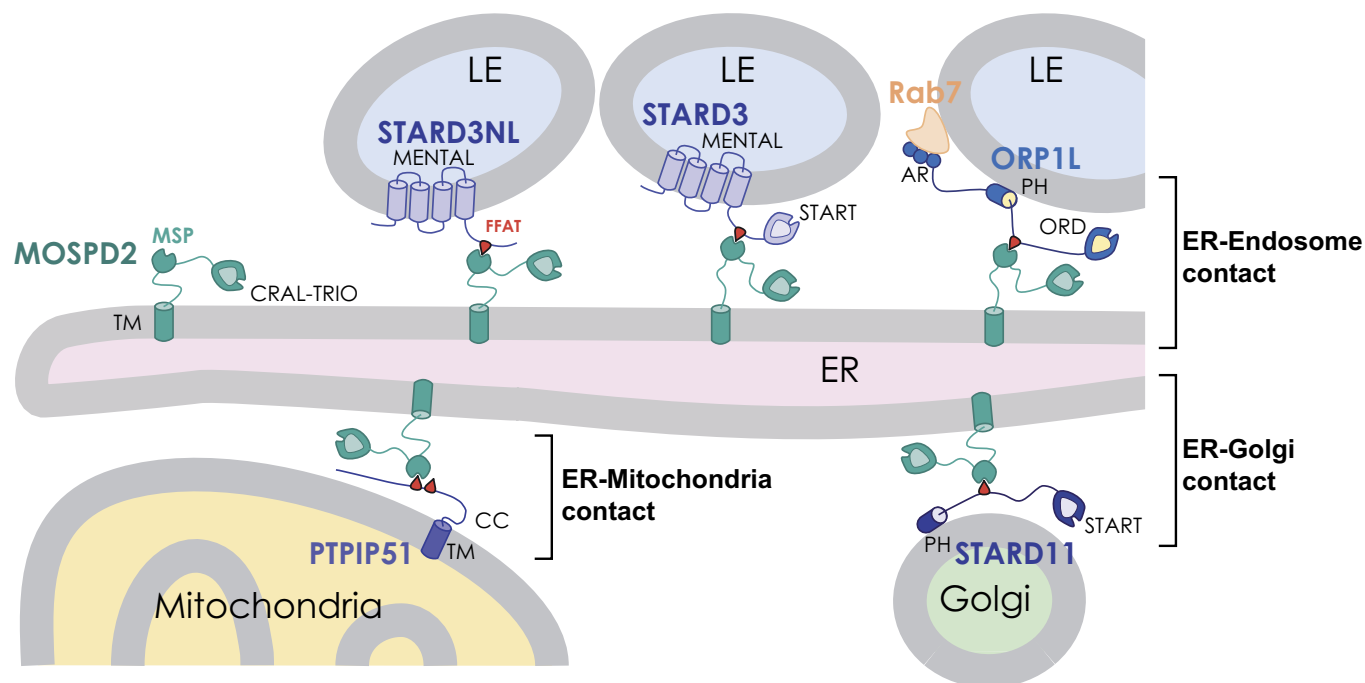


Figure 10. MOSPD2 tethers the ER to organelles bearing FFAT-containing proteins.

Schematic representation of ER–endosome, ER–mitochondria, and ER–Golgi contacts involving MOSPD2 and a number of its interacting partners: STARD3NL, STARD3, ORP1L, PTPIP51, and STARD11. LE, late endosome; ER, endoplasmic reticulum; TM, transmembrane domain; MSP, Major Sperm Protein domain; FFAT, Two phenylalanines in an acidic tract motif [9,26]; CRAL-TRIO, cellular retinaldehyde-binding protein and triple functional domain protein domain [48]; MENTAL, metastatic lymph node 64 N-terminal domain, anchoring STARD3 and STARD3NL to the LE membrane [53,65]; START, steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid Transfer domain; in STARD11 (CERT), the START domain is mediating ceramide transfer from the ER to the Golgi [70], and in STARD3, the START domain is involved in cholesterol transfer from the ER to LE (STARD3) [23]; PH, pleckstrin homology domain; this domain mediates the association of STARD11 with the Golgi membrane by interacting with PI(4)P; in ORP1L, it might also be involved in phosphoinositide binding-mediated membrane interaction [51,71]; ORD, oxysterol-binding protein (OSBP)-related domain [72]; AR, ankyrin repeat domain involved in the interaction with Rab7 at the LE membrane [51]; CC, coiled-coil.

specific tethering complexes in a given contact; indeed, this spacing must be compatible with the size of the protein complex mediating membrane attachment. Still, the great diversity of tether proteins described so far suggests that many different types of bridging complexes are present within a zone of apposition, and therefore that the formation of these structures relies on highly redundant mechanisms. The identification of MOSPD2 as a new FFAT-binding protein further supports this idea.

Using EM which provides a direct visualization of MCS and allows their quantification, we examined MCS between the ER and mitochondria and endosomes in cells lacking either MOSPD2 or VAPs or both MOSPD2 and VAPs. In our experiments, VAP loss was not associated with a significant decrease of ER–mitochondria or ER–endosome contacts. However, other studies that have looked at specific contacts, such as those occurring during EGF signaling, found that ER/EGFR-endosome contacts were unaffected by the loss of VAPs, while the ER/non-EGFR-endosome contacts were impaired by 50% [24]. In addition, in highly specialized cells such as motoneurons, Stoica *et al* [16] showed a decrease in ER–mitochondria contacts after VAP-B silencing. These findings and our results probably reveal a cell type- and context-dependent requirement of VAP proteins in MCS formation. Here, we showed that MOSPD2 does not participate to the steady-state level of ER–mitochondria MCS. In contrast, MOSPD2 contributes to the formation of ER–endosome contacts, and this function appears independent from

the presence of VAP protein. Concomitantly with the reduction in ER–endosome MCS, we showed that endosome–endosome contacts were specifically increased in the absence of MOSPD2, revealing a further alteration in endosomes. How MOSPD2 precisely alters endosome dynamics is unclear. Previously, Rowland *et al* [46] showed that contact sites between endosomes and the ER define the position and timing for endosome fission. Thus, we can speculate that the decrease in ER–endosome contacts upon MOSPD2 depletion impairs endosome positioning and maturation.

The different roles of VAPs and MOSPD2 on ER–endosome contacts reported here support the idea that the function of MCS formed by MOSPD2 is unique. It is important to mention that MOSPD2 distinguishes itself from VAP proteins by the presence of an amino-terminal CRAL-TRIO domain. The CRAL-TRIO domain forms a hydrophobic pocket and has been implicated in lipid transport in several proteins. For instance, the *Saccharomyces cerevisiae* Sec14p protein counterexchanges phosphatidylinositol (PI) and phosphatidylcholine (PC) between membranes [47–49]. Among the 28 human proteins possessing this domain, some were shown to bind small lipids among which are PC, PI, squalene, tocopherols, and retinaldehyde [50]. Thus, MOSPD2 possesses a domain potentially able to transport a lipidic ligand. The presence in the same protein of a MSP domain able to recruit several lipid transfer proteins (LTPs) bearing FFAT motifs, and a domain potentially able to transport lipids is unique. This protein organization

suggests that the CRAL-TRIO serves as a regulatory or a lipid transfer domain. Indeed, the CRAL/TRIO domain might regulate the binding of FFAT-containing proteins by MOSPD2 in a lipid-dependent manner and therefore provide binding specificity in a defined lipid context. Alternatively, the complex formed by MOSPD2 and an FFAT-bearing LTP could provide a mean to counterexchange lipids between membranes, one lipid species being transported by the LTP-binding domain and the other one by the CRAL-TRIO domain.

By tethering the ER and other organelles, MOSPD2 functions most probably in intracellular exchanges and communication. Further work is needed to understand the functional specificities of MOSPD2 compared to VAPs and the physiological role of contacts involving MOSPD2.

Materials and Methods

Cloning and constructs

MOSPD2 cDNA was obtained from the Dana-Farber/Harvard Cancer Center Plasmid Repository (Plasmid ID: HsCD00076319). MOSPD2 R404D/L406D (referred to as RD/LD) and MOSPD2 Δ TM mutants were constructed by site-directed mutagenesis (RD/LD primers: 5'-TCTGC CCAAG ACGAT TTTGA CATAA TGGCT GCAGA AATGG AA-3' and 5'-TGCAG CCATT ATGTC AAAAT CGTCT TGGGC AGAGA CTGTT AA-3'; Δ TM primers: 5'-CAG CGT TGT ATC TGA ATT CCA GCA GCT GCT GCT TTC C-3' and 5'-CAG CTG CTG GAA TTC AGA TAC AAC GCT GAA CTT GGT C). WT, RD/LD, and Δ TM MOSPD2 cDNAs were subcloned into the pEGFP-C1 and the pmCherry-C1 vectors, to generate GFP- and mCherry-tagged expressing constructs, respectively. The GFP-MOSPD2 (WT, RD/LD, and Δ TM mutants) encoding cDNAs were then subcloned in the pQCXIP retroviral vector.

The following constructs were kind gifts: pcDNA3.1 Flag-STAR11 and pcDNA3.1 Flag-STAR11 D324A from K. Hanada (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) [11]; pCINeo-HA-PTPIP51 from C. Miller (King's College London, UK) [18,44]; ORP1L-GFP from J. Neefjes (Leiden University Medical Center, Netherlands) [51,52]. pCINeo-HA-PTPIP51 Δ FFAT-like (aa157-172) was constructed by site-directed mutagenesis (primers: 5'-GAC TCC ACT GGC TCC AGC TCT GAA GGG GGT TAC ACA ACA GCC-3' and 5'-GGC TGT TGT GTA ACC CCC TTC AGA GCT GGA GCC AGT GGA GTC-3'). ORP1L F476A/Y477A mutant (referred to FA/YA) was constructed by site-directed mutagenesis (primers: 5'-AGCGA GGACG AGGCC GCTGA TGCGG TGTC A GATTC CGAGT CC-3' and 5'-ATCTG ACAGC GCATC AGCGG CCTCG TCCTC GCTAA GGATG CT-3'). ORP1L and ORP1L FA/YA were subcloned in fusion with the Flag tag in the pQCXIP vector. Flag-tagged STAR11, STAR11 FA/YA, STAR11NL, STAR11NL Δ FFAT, and GFP-ER expressing constructs were previously described [10,23,53,54].

The MSP domain of MOSPD2 [282–490]-encoding fragments (WT or RD/LD mutant) were amplified by PCR and subcloned into the pET-15b vector for expression as C-terminal 6His-tag proteins in *E. coli*. The MSP domain and the coiled-coil of VAP-A [8–212] expression vectors (WT and KD/MD mutant) were previously described [23]. The MSP domain and the coiled-coil of VAP-B [1–210] encoding fragments (WT and KD/MD mutant) were

amplified by PCR and subcloned into the pET-15b vector for expression as C-terminal 6His-tag proteins in *E. coli*.

To obtain shRNA expression vectors targeting MOSPD2 (target sequence α : 5'-ATGGA CTTTG TACGC TTTAT C-3' or β : 5'-CCCAG ATGGT TATTG GAAAT T-3'), annealed oligonucleotides were cloned into the pLKO.1 vector (blasticidine resistance cassette) [55].

To silence VAP proteins, we used the previously described shRNA expression vectors targeting VAP-A (target sequence α : 5'-GCGAAATCCATCGGATAGAAA-3' or β : 5'-CACTTAATGATACC GAAACAA-3') or VAP-B (α : 5'-GCAGAGAATGATAAACACAT-3' or β : 5'-CCAGTTCTGTTGACTATGTA-3') [10].

ON-TARGET plus siRNA pool (Thermo Fisher) transfected with Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen) were used to silence MOSPD2 (158747), VAP-A (9218), and VAP-B (9217).

All constructs were verified by DNA sequencing (GATC Biotech).

Sequence and structure analysis

Protein sequences were aligned using ClustalW [56]. The structure of the rat VAP-A MSP domain in complex with an FFAT motif (PDB ID: 1Z9O) [27] and the structure of the human MOSPD2 MSP domain (PDB ID: 1WIC; <https://doi.org/10.2210/pdb1wic/pdb>; Endo, H., Asakura, K., Nemoto, N., Takasugi, K., Izumie, K., Yoshida, M., Hayashi, F., Yokoyama, S., RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative; solution structure of the MSP domain of RIKEN cDNA 6030424E15) were aligned using Pymol [57].

Cell culture, transfections, and infections

HeLa cells (American Type Culture Collection CCL-2) were maintained in DMEM with 5% fetal calf serum (FCS) and 40 μ g/ml gentamycin. 293T (ATCC CRL-3216) cells were maintained in DMEM with 10% fetal calf serum (FCS), penicillin 100 UI/ml, and streptomycin 100 μ g/ml.

Cells were transfected using X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche). To generate retroviral particles, pQCXIP vectors were co-transfected with pCL-Ampho vector (Imgenex) into 293T retroviral packaging cell line. To generate lentiviral particles, pLKO.1 vectors were co-transfected with three packaging plasmids pLP1, pLP2, and pLP/VSVG (Invitrogen) into the 293T cell line. Then, viral particles supplemented with 10 μ g/ml polybrene and 20 mM HEPES were incubated with HeLa cells.

Retroviral infections were used to generate HeLa/Ctrl, HeLa/GFP-MOSPD2, and HeLa/GFP-MOSPD2 RD/LD cell lines. The HeLa/Ctrl cell line was obtained using the empty pQCXIP plasmid.

For lentiviral infection, pLKO.1 vectors were co-transfected with three packaging plasmids pLP1, pLP2, and pLP/VSVG (Invitrogen) into the 293T cell line. Viral particles supplemented with 10 μ g/ml polybrene and 20 mM HEPES were then incubated with HeLa cells.

HeLa selection was performed using 0.5 μ g/ml puromycin or 4 μ g/ml blasticidine.

Antibody production

The recombinant MSP domain of MOSPD2 and the recombinant START domain of STAR11 [23] were used to generate the 1MOS-4E10 and the 1STAR-2G5 mouse monoclonal antibodies, respectively, as described before [58].

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed as previously described [53]. Primary antibodies were rabbit anti-MOSPD2 (1:250; A105239, Sigma), rabbit anti-Flag (1:1,000; F7425, Sigma), rabbit anti-HA (1:1,000; H6908, Sigma), goat anti-VAP-A (1:500; K-15, Santa Cruz Biotechnology, sc-48698), goat anti-Calnexin (1:500; C-20, Santa Cruz Biotechnology, sc-6465), mouse anti-Lamp1 (1:50; H4A3, DSHB), mouse anti-OPA-1 (1:1,000; 1A8, Merck), and rabbit anti-GM130 (1:1,000; 11308-1-AP, Proteintech). To stain both endogenous MOSPD2 and VAP-A proteins, cells were fixed with a glyoxal solution (7.8% glyoxal (Sigma, 128464), 20% ethanol, 0.75% acetic acid, pH 5) for 10 min at room temperature [59]. Slides were mounted in ProLong Gold (Invitrogen). Observations were made with a confocal microscope (Leica TCS SP5 inverted, 63 \times , NA 1.4).

Colocalization analysis

Linescans were drawn using ImageJ software (plot profile function; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Co-localization was visualized using the co-localization highlighter plugin for ImageJ.

Pearson's correlation coefficient was determined using the Coloc2 plugin in Fiji software. The auto-thresholding was performed using the Costes method [60].

SDS–PAGE, Western blot, and Coomassie blue staining

SDS–PAGE and Western blot analysis were performed as previously described [54] using the following antibodies: rabbit anti-GFP (1:5,000; GFP-2A3, Merck), rabbit anti-FLAG (1:1,000; F7425, Sigma), rabbit anti-HA (1:1,000; H6908, Sigma), rabbit anti MOSPD2 (1:1,000; A105239, Sigma), mouse anti-MOSPD2 (1:2; 1MOS-4E10), goat anti-VAP-A (1:1,000; K-15, Santa Cruz Biotechnology, sc-48698), mouse anti-VAP-A (1:1,000; 4C12, Santa Cruz Biotechnology, sc-293278), rabbit anti-VAP-B (kind gift from Dr. L. Dupuis [61]), rabbit anti-STARD3 (1:1,000; pAbMLN64-Ct-605; [58]), rabbit anti-STARD3NL (1:1,000; pAbMENTHO-Ct-1545; [53]), rabbit anti-ORP1 (1:1,000; abcam; ab131165), and mouse anti-actin (1:5,000; ACT-2D7, Euromedex).

Coomassie blue staining was performed with PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Fisher Scientific).

Protein expression and purification

Recombinant proteins were expressed in *E. coli* BL21 DE3 strain at 20°C for 16 h upon induction with 1 mM IPTG (at an optical density (OD) equal to 0.5 at $\lambda = 600$ nm). Purification was performed in lysis buffer [50 mM sodium phosphate pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1 \times Complete protease inhibitor cocktail (Roche)]. Cells were treated during 30 min with lysozyme (L6876, Sigma) at 4°C and then sonicated for 15 min on ice. The lysate was centrifuged twice at 11,000 g for 30 min at 4°C. The supernatant was mixed with NTA-Ni²⁺ agarose beads (HIS-Select® Nickel Affinity Gel, P6611, Sigma). After 1 wash with lysis buffer, proteins were eluted with elution buffer [20 mM sodium phosphate, 250 mM imidazole, pH 7.4]. Proteins were further purified by gel filtration (HiLoad 16/60 Superdex 75; GE Healthcare Life Sciences) in GF Buffer (20 mM Tris–HCl pH 7.5, 150 mM NaCl). Proteins were

concentrated with an Amicon Ultra-15 10 kDa centrifugal filter unit (Merck). Protein concentration was determined by ultraviolet absorption.

Pull-down assays

Peptide pull-down

The affinity resin was prepared by incubating 1.2 nmol of peptide (synthesized in house) with 200 μ l of streptavidin beads (PureProteome Streptavidin magnetic beads, Merck) in a total volume of 10 ml pull-down buffer 1 (PDB1) [50 mM Tris–HCl pH 7.4, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, Complete protease inhibitor cocktail (Roche)] under constant agitation (1 h, room temperature). The beads were then washed twice with 10 ml of PDB1.

1.8 $\times 10^8$ HeLa cells were pelleted by centrifugation, washed with 20 ml of TBS (50 mM Tris–HCl pH 7.4, 150 mM NaCl), and lysed with 10 ml of cold PDB1. After a 20-min incubation on ice, the protein extract was separated from cell debris by centrifugation (10 min; 9,500 g; 4°C). The protein extract was mixed with peptide-coupled streptavidin beads and incubated for 2.5 h at 4°C under constant agitation. The beads were then washed three times with PDB1, and proteins were eluted with Laemmli buffer.

MOSPD2 pull-down

The affinity resin was prepared by incubating 100 mg of recombinant protein with 50 μ l of nickel beads (PureProteome Nickel magnetic beads, Merck) in 1 ml pull-down buffer 2 (PDB2) [50 mM Tris–HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 5 mM imidazole, Complete protease inhibitor cocktail] under constant agitation (1 h, 4°C). The beads were then washed three times with 1 ml of PDB1.

3 $\times 10^8$ HeLa cells were washed with 5 ml of TBS and lysed with 1 ml of PDB2. After a 10-min incubation on ice, the protein extract was purified from cell debris by centrifugation (10 min; 9,500 g; 4°C). The protein extract was mixed with protein-coupled nickel beads and incubated for 2.5 h at 4°C under constant agitation. The beads were then washed three times with PDB2, and proteins were eluted with Laemmli buffer.

GFP-Trap and immunoprecipitation

GFP-Trap beads (GFP-Trap_MA, ChromoTek) were washed three times with 1 ml of cold pull-down buffer 3 (PDB3) [50 mM Tris–HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, Complete protease inhibitor cocktail].

GFP-MOSPD2 or GFP-MOSPD2 RD/LD stably expressing cells were transfected with plasmids expressing WT or FFAT motif mutant STARD3, STARD3NL, STARD11, ORP1L, or PTPIP51. Two days after transfection, adherent cells were washed two times with cold PBS and lysed in PDB3. The protein extract (500 μ g of proteins) was incubated with 20 μ l of beads in a total volume of 1 ml under constant agitation (1 h, 4°C). The beads were washed three times with 1 ml of PDB3, and proteins were eluted at room temperature with Laemmli buffer.

Immunoprecipitations were performed as previously described [54] using Anti-Flag-M2 affinity gel (A2220, Sigma) or mouse anti-STARD3 (1STAR-2G5).

Mass spectrometry analysis

Eluted proteins were precipitated with trichloroacetic acid and digested with Lys-C (Wako) and trypsin (Promega). The peptides were then analyzed using an Ultimate 3000 nano-RSLC (Thermo Scientific) coupled in line with an Orbitrap ELITE (Thermo Scientific).

Surface plasmon resonance

Surface plasmon resonance data were collected on a Biacore T200 instrument (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) at 25°C with autosampler rack base cooled at 15°C as described previously [62]. Briefly, a CM5 sensor surface was first conditioned and extensively washed before attaching streptavidin followed by immobilization of biotinylated peptides. In order to minimize SPR artifact effects, the levels of immobilized peptides (50 RU) were kept low by injecting a highly diluted peptide solution (1 to 10 ng/ml) at a high flow rate (90 μ l/min). The running buffer for kinetic measurements was 50 mM Tris, 75 mM NaCl, pH 7.0 (filtered through a 0.22 μ m membrane), supplemented with 0.005% (v/v) surfactant P20. Binding experiments were performed for three biotinylated peptides. An empty control surface was systematically included on every chip to serve as a control for non-specific binding of the analyte to the matrix and for monitoring changes in solution refractive index. Analytes were simultaneously injected over the four flow cells at 8–10 different monomer concentrations ranging between 0 and 20 μ M. At least two concentrations have been reproduced in non-consecutive cycles. Injection and post-injection times were 120 and 180 s, respectively. The flow rate was 50 μ l/min. Data were processed using the BiaEvaluation 3.2 software (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) using “double referencing” [63] in which sensorgrams were corrected for buffer effects and bulk refractive index changes.

The steady-state binding signal (R_{eq}) was derived by averaging the signals in a five second window at equilibrium. Steady-state analysis was performed by fitting the average signal R_{eq} as a function of total analyte concentration, assuming a simple 1:1 interaction binding isotherm model. The quality of the fit was assessed by two criteria: (i) the match of the fitted maximum capacity of the surface (R_{max}) with the expected maximum capacity (R_{theo}) inferred from the biotinylated peptide level and (ii) the χ^2 parameter which is a statistical measure of how closely the model fits the experimental data. The root square of this parameter should always be below 10% of the globally fitted R_{max} values (BiaEvaluation software user manual, 2005). Data repeatability was investigated by triplicating at least two concentrations over the analyte series. Comparison of equilibrium data obtained for the same analyte displayed a repeatability of around 5%.

Dynamic light scattering measurements of liposomes aggregation

Liposome preparation

DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DOGS-NTA-Ni²⁺ (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl]), and 18:1/18:1 MPB-PE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[4-(p-maleimidophenyl)butyramide]) were

purchased from Avanti Polar Lipids. Lipids, stored in stock solutions in CHCl₃ or methanol, were mixed at the desired molar ratio. The solvent was removed in a rotary evaporator under vacuum. The mix of DOGS-NTA-Ni²⁺ and MPB-PE lipid film were pre-warmed to 33°C for 5 min prior to drying. The films were hydrated in Tris/NaCl (50 mM/120 mM) buffer to obtain a suspension of multilamellar liposomes. The suspensions were extruded through polycarbonate filters of 0.2 μ m pore size using a mini-extruder (Avanti Polar Lipids). Liposomes were stored at 4°C and used within 2 days.

Dynamic light scattering measurements of liposomes aggregation

The experiments were performed at 25°C in a DynaPro apparatus (Protein Solutions). The sample initially contained L_A liposomes (50 μ M total lipids) in Tris/NaCl (50 mM/120 mM) buffer freshly degassed and a conventional FFAT motif (sequence of OSBP FFAT: WCSGKGDMSDEDDENEFFDAPEIITMPENLGH; 380 nM final concentration) mixed in a thermomixer at 850 rpm/5 min/25°C. Then, 18 μ l was put in a small quartz cell (volume 20 μ l) and a first set of about 12 autocorrelation curves was acquired to measure the size distribution of the initial liposome suspension. After, L_B liposomes (50 μ M) and MSP MOSPD2 WT (760 nM) or MSP MOSPD2 (RD/LD; 760 nM) were successively added. The kinetics of aggregation was followed by acquiring one autocorrelation curve every 10 s. At the end of the experiment, a set of 12 autocorrelation functions was acquired. The data were analyzed using two different algorithms provided by the Dynamics v6.1 software (Protein Solutions). During the aggregation process, the autocorrelation functions were fitted assuming that the size distribution is a simple Gaussian function. This mode, referred as the monomodal or cumulant algorithm, gives a mean radius, R, and the width (or polydispersity). The polydispersity is represented in the kinetics measurements by the shaded area and can reach very large values because of the simultaneous presence of free liposomes and of liposomes aggregates of various sizes. Before and after the aggregation process, the autocorrelation functions were fitted using a more refined algorithm, referred as a regularization algorithm. This algorithm is able to resolve several populations of different size, such as free liposomes and liposomes aggregates.

Electron microscopy

Electron microscopy was performed as previously described [10,23]. Cells grown on carbon-coated sapphire disks were cryoprotected with DMEM containing 10% FCS and frozen at high pressure (HPM 10 Abra Fluid AG). Samples were then freeze-substituted and embedded in lowicryl HM20. Thin sections were collected on formvar/carbon-coated nickel slot grids and stained with uranyl acetate and lead citrate. Imaging was performed with a transmission electron microscope (Philips CM12) coupled to an Orius 1000 CCD camera (Gatan). Quantification by stereology was performed as previously described [10,23].

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Kruskal–Wallis or the Mann–Whitney non-parametric tests (Prism, GraphPad). For the

Kruskal–Wallis test, all conditions were compared with the Dunn’s multiple comparison test.

P-values < 0.05, < 0.01, < 0.001, and < 0.0001 are identified with 1, 2, 3, and 4 asterisks, respectively. ns: *P* ≥ 0.05.

Data availability

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [64] partner repository with the dataset identifier PXD009575.

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

We thank Alastair McEwen for his critical reading of the manuscript. We thank the members of the Molecular and Cellular Biology of Breast Cancer (IGBMC) team and Toshihide Kobayashi for helpful advice and discussions. We thank the IGBMC peptide synthesis facility (Pascal Eberling), the Structural biology & genomics platform (Catherine Birck and Florence Granger for the gel filtration analysis, and Pierre Poussin-Courmontagne for the SEC-MALS analysis), the Proteomics platform (Frank Ruffenach, Virginie Chavant, Adeline Page and Luc Negroni), the cell culture facility (Betty Heller), the imaging center (EM: Coralie Spiegelhalter, and light microscopy), the polyclonal antibody facility (Gilles Duval), the monoclonal antibody facility (Mustapha Oulad-Abdelghani), the Genomeast platform (Doulaye Dembélé) for their excellent technical assistance. We are grateful to the EM Core Facility, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg, Germany, especially to Yannick Schwab, Androniki Kolovou, and Paolo Ronchi for their help with EM. We wish to thank Luc Dupuis (INSERM U118, Strasbourg, FR) for providing the anti-VAP-B antibody, Jacques Neefjes (Leiden University Medical Center, NL) the ORP1L cDNA, Kentaro Hanada (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, JP) the STARD11/CERT constructs, Romain Galmes (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, Paris, FR), and Christopher C. Miller (King’s College London, UK) the PTPIP51 constructs.

T.D.M. received an allocation from the Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche (France; <http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/>). This work was supported by grants from the Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est; <https://www.ligue-cancer.net/>), the Institut National Du Cancer INCA (INCA_9269; www.e-cancer.fr). We also acknowledge funds from the Institut National de Santé et de Recherche Médicale (<http://www.inserm.fr/>), the Centre National de la Recherche Scientifique (<http://www.cnrs.fr/>), the Université de Strasbourg (<http://www.unistra.fr/>), the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INBS-05, and the Grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d’Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.

Author contributions

FA and CT designed the project; TDM, CW, and FA performed most of the cell biology and biochemical experiments; YN performed and analyzed the SPR experiments; SI and GD designed, performed, and analyzed the liposome aggregation experiments; FG made the PTPIP51 constructs; DS, TDM, LPW, and FA performed and analyzed the electron microscopy experiments; CM assisted in designing and interpreting experiments; and FA, TDM, and CT wrote the manuscript. All authors commented on the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Gatta AT, Levine TP (2017) Piecing together the patchwork of contact sites. *Trends Cell Biol* 27: 214–229
- Holthuis JCM, Levine TP (2005) Lipid traffic: floppy drives and a super-highway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 209–220
- Phillips MJ, Voeltz GK (2016) Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 69–82
- Eisenberg-Bord M, Shai N, Schuldiner M, Bohnert M (2016) A tether is a tether: tethering at membrane contact sites. *Dev Cell* 39: 395–409
- Helle SCJ, Kanfer G, Kolar K, Lang A, Michel AH, Kornmann B (2013) Organization and function of membrane contact sites. *Biochim Biophys Acta* 1833: 2526–2541
- Raiborg C, Wenzel EM, Stenmark H (2015) ER–endosome contact sites: molecular compositions and functions. *EMBO J* 34: 1848–1858
- Lev S, Ben Halevy D, Peretti D, Dahan N (2008) The VAP protein family: from cellular functions to motor neuron disease. *Trends Cell Biol* 18: 282–290
- Murphy SE, Levine TP (2016) VAP, a versatile access point for the endoplasmic reticulum: review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochim Biophys Acta* 1861: 952–961
- Loewen CJR, Roy A, Levine TP (2003) A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J* 22: 2025–2035
- Alpy F, Rousseau A, Schwab Y, Legueux F, Stoll I, Wendling C, Spiegelhalter C, Kessler P, Mathelin C, Rio M-C et al (2013) STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *J Cell Sci* 126: 5500–5512
- Kawano M, Kumagai K, Nishijima M, Hanada K (2006) Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J Biol Chem* 281: 30279–30288
- Mesmin B, Bigay J, Moser von Filseck J, Lacas-Gervais S, Drin G, Antony B (2013) A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER–Golgi tether OSBP. *Cell* 155: 830–843
- Perry RJ, Ridgway ND (2006) Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein–associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein. *Mol Biol Cell* 17: 2604–2616
- Rocha N, Kuijl C, van der Kant R, Janssen L, Houben D, Janssen H, Zwart W, Neefjes J (2009) Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7–RILP–p150Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol* 185: 1209–1225
- Stefan CJ, Manford AG, Baird D, Yamada-Hanff J, Mao Y, Emr SD (2011) Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER–plasma membrane contact sites. *Cell* 144: 389–401
- Stoica R, Vos KJD, Paillusson S, Mueller S, Sancho RM, Lau K-F, Vizcay-Barrena G, Lin W-L, Xu Y-F, Lewis J et al (2014) ER–mitochondria associations are regulated by the VAPB–PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat Commun* 5: 3996
- Weber-Boyvat M, Kentala H, Lilja J, Vihervaara T, Hanninen R, Zhou Y, Peränen J, Nyman TA, Ivaska J, Olkkonen VM (2015) OSBP-related protein 3 (ORP3) coupling with VAMP-associated protein A regulates R-Ras activity. *Exp Cell Res* 331: 278–291
- De Vos KJ, Morotz GM, Stoica R, Tudor EL, Lau KF, Ackerley S, Warley A, Shaw CE, Miller CC (2012) VAPB interacts with the mitochondrial

- protein PTP1B to regulate calcium homeostasis. *Hum Mol Genet* 21: 1299–1311
19. Dong R, Saheki Y, Swarup S, Lucast L, Harper JW, De Camilli P (2016) Endosome-ER contacts control actin nucleation and retromer function through VAP-dependent regulation of PI4P. *Cell* 166: 408–423
 20. Eden ER, White IJ, Tsapara A, Futter CE (2010) Membrane contacts between endosomes and ER provide sites for PTP1B–epidermal growth factor receptor interaction. *Nat Cell Biol* 12: 267–272
 21. Gomez-Suaga P, Paillusson S, Stoica R, Noble W, Hanger DP, Miller CCJ (2017) The ER-mitochondria tethering complex VAPB-PTPIP51 regulates autophagy. *Curr Biol* 27: 371–385
 22. Paillusson S, Gomez-Suaga P, Stoica R, Little D, Gissen P, Devine MJ, Noble W, Hanger DP, Miller CCJ (2017) α -Synuclein binds to the ER-mitochondria tethering protein VAPB to disrupt Ca^{2+} homeostasis and mitochondrial ATP production. *Acta Neuropathol* 134: 129–149
 23. Wilhelm LP, Wendling C, Védie B, Kobayashi T, Chenard M-P, Tomasetto C, Drin G, Alpy F (2017) STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *EMBO J* 36: 1412–1433
 24. Eden ER, Sanchez-Heras E, Tsapara A, Sobota A, Levine TP, Futter CE (2016) Annexin A1 tethers membrane contact sites that mediate ER to endosome cholesterol transport. *Dev Cell* 37: 473–483
 25. Costello JL, Castro IG, Hacker C, Schrader TA, Metz J, Zeuschner D, Azadi AS, Godinho LF, Costina V, Findeisen P et al (2017) ACBD5 and VAPB mediate membrane associations between peroxisomes and the ER. *J Cell Biol* 216: 331–342
 26. Mikitova V, Levine TP (2012) Analysis of the key elements of FFAT-like motifs identifies new proteins that potentially bind VAP on the ER, including two AKAPs and FAPP2. *PLoS One* 7: e30455
 27. Kaiser SE, Brickner JH, Reilein AR, Fenn TD, Walter P, Brunger AT (2005) Structural basis of FFAT motif-mediated ER targeting. *Structure* 13: 1035–1045
 28. Furuuta K, Jee J, Fukada H, Mishima M, Kojima C (2010) Electrostatic interaction between oxysterol-binding protein and VAMP-associated protein A revealed by NMR and mutagenesis studies. *J Biol Chem* 285: 12961–12970
 29. Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MMC, Miyamura T et al (2005) Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* 79: 13473–13482
 30. Kim S, Leal SS, Halevy DB, Gomes CM, Lev S (2010) Structural requirements for VAP-B oligomerization and their implication in amyotrophic lateral sclerosis-associated VAP-B(P56S) neurotoxicity. *J Biol Chem* 285: 13839–13849
 31. McCune BT, Tang W, Lu J, Eaglesham JB, Thorne L, Mayer AE, Condiff E, Nice TJ, Goodfellow I, Krezel AM et al (2017) Noroviruses co-opt the function of host proteins VAPA and VAPB for replication via a phenylalanine-phenylalanine-acidic-tract-motif mimic in nonstructural viral protein NS1/2. *MBio* 8: e00668–17
 32. Stark C, Breitzkreutz B-J, Reguly T, Boucher L, Breitzkreutz A, Tyers M (2006) BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res* 34: D535–D539
 33. Kumagai K, Kawano-Kawada M, Hanada K (2014) Phosphoregulation of the ceramide transport protein CERT at serine 315 in the interaction with VAMP-associated protein (VAP) for inter-organelle trafficking of ceramide in mammalian cells. *J Biol Chem* 289: 10748–10760
 34. 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
 35. Han SM, Cottee PA, Miller MA (2010) Sperm and oocyte communication mechanisms controlling *C. elegans* fertility. *Dev Dyn* 239: 1265–1281
 36. Tang S, Wang X, Li W, Yang X, Li Z, Liu W, Li C, Zhu Z, Wang L, Wang J et al (2017) Biallelic mutations in CFAP43 and CFAP44 cause male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Am J Hum Genet* 100: 854–864
 37. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjödstedt E, Asplund A et al (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347: 1260419
 38. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehár J, Kryukov GV, Sonkin D et al (2012) The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483: 603–607
 39. Saita S, Shirane M, Natume T, Iemura S, Nakayama KI (2009) Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction with vesicle-associated membrane protein-associated protein. *J Biol Chem* 284: 13766–13777
 40. Nishimura Y, Hayashi M, Inada H, Tanaka T (1999) Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 21–26
 41. 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
 42. Chung J, Torta F, Masai K, Lucast L, Czaplá H, Tanner LB, Narayanaswamy P, Wenk MR, Nakatsu F, Camilli PD (2015) PI4P/phosphatidylinositol countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science* 349: 428–432
 43. Moser von Filseck J, Čopič A, Delfosse V, Vanni S, Jackson CL, Bourguet W, Drin G (2015) Phosphatidylinositol transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science* 349: 432–436
 44. Galmes R, Houcine A, van Vliet AR, Agostinis P, Jackson CL, Giordano F (2016) ORP5/ORP8 localize to endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and are involved in mitochondrial function. *EMBO Rep* 17: 800–810
 45. Giordano F, Saheki Y, Idevall-Hagren O, Colombo SF, Pirruccello M, Milosevic I, Gracheva EO, Bagriantsev SN, Borgese N, De Camilli P (2013) PI(4,5)P(2)-dependent and Ca(2+)-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. *Cell* 153: 1494–1509
 46. Rowland AA, Chitwood PJ, Phillips MJ, Voeltz GK (2014) ER contact sites define the position and timing of endosome fission. *Cell* 159: 1027–1041
 47. Bankaitis VA, Aitken JR, Cleves AE, Dowhan W (1990) An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* 347: 561–562
 48. Saito K, Tautz L, Mustelin T (2007) The lipid-binding SEC14 domain. *Biochim Biophys Acta* 1771: 719–726
 49. Sha B, Phillips SE, Bankaitis VA, Luo M (1998) Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein. *Nature* 391: 506–510
 50. Chiapparino A, Maeda K, Turei D, Saez-Rodriguez J, Gavin A-C (2016) The orchestra of lipid-transfer proteins at the crossroads between metabolism and signaling. *Prog Lipid Res* 61: 30–39
 51. Johansson M, Lehto M, Tanhuanpää K, Cover TL, Olkkonen VM (2005) The oxysterol-binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7

- and alters functional properties of late endocytic compartments. *Mol Biol Cell* 16: 5480–5492
52. Johansson M, Rocha N, Zwart W, Jordens I, Janssen L, Kuijl C, Olkkonen VM, Neefjes J (2007) Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betatubulin spectrin. *J Cell Biol* 176: 459–471
 53. Alpy F, Wendling C, Rio M-C, Tomasetto C (2002) MENTHO, a MLN64 homologue devoid of the START domain. *J Biol Chem* 277: 50780–50787
 54. Alpy F, Latchumanan VK, Kedinger V, Janoshazi A, Thiele C, Wendling C, Rio M-C, Tomasetto C (2005) Functional characterization of the MENTAL domain. *J Biol Chem* 280: 17945–17952
 55. Moffat J, Grueneberg DA, Yang X, Kim SY, Kloepfer AM, Hinkle G, Piqani B, Eisenhaure TM, Luo B, Grenier JK et al (2006) A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* 124: 1283–1298
 56. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R et al (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948
 57. Schrödinger (2015) The PyMOL molecular graphics system, Version 1.8.
 58. Moog-Lutz C, Tomasetto C, Régnier CH, Wendling C, Lutz Y, Muller D, Chenard MP, Basset P, Rio MC (1997) MLN64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) and is over-expressed in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 71: 183–191
 59. Richter KN, Revelo NH, Seitz KJ, Helm MS, Sarkar D, Saleeb RS, D'Este E, Eberle J, Wagner E, Vogl C et al (2018) Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy. *EMBO J* 37: 139–159
 60. Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S (2004) Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J* 86: 3993–4003
 61. Kabashi E, El Oussini H, Bercier V, Gros-Louis F, Valdmanis PN, McDearmid J, Meijer IA, Dion PA, Dupre N, Hollinger D et al (2013) Investigating the contribution of VAPB/ALS8 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 22: 2350–2360
 62. Fournane S, Charbonnier S, Chapelle A, Kieffer B, Orfanoudakis G, Travé G, Masson M, Nominé Y (2011) Surface plasmon resonance analysis of the binding of high-risk mucosal HPV E6 oncoproteins to the PDZ1 domain of the tight junction protein MAGI-1. *J Mol Recognit* 24: 511–523
 63. Myszka DG (1999) Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* 12: 279–284
 64. Vizcaíno JA, Csordas A, del-Toro N, Dianes JA, Griss J, Lavidas I, Mayer G, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Ternent T et al (2016) 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res* 44: D447–D456
 65. Alpy F, Stoeckel M-E, Dierich A, Escola J-M, Wendling C, Chenard M-P, Vanier MT, Gruenberg J, Tomasetto C, Rio M-C (2001) The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *J Biol Chem* 276: 4261–4269
 66. Johansson M, Bocher V, Lehto M, Chinetti G, Kuismanen E, Ehnholm C, Staels B, Olkkonen VM (2003) The two variants of oxysterol binding protein-1 display different tissue expression patterns, have different intracellular localization, and are functionally distinct. *Mol Biol Cell* 14: 903–915
 67. Lv BF, Yu CF, Chen YY, Lu Y, Guo JH, Song QS, Ma DL, Shi TP, Wang L (2006) Protein tyrosine phosphatase interacting protein 51 (PTPIP51) is a novel mitochondria protein with an N-terminal mitochondrial targeting sequence and induces apoptosis. *Apoptosis* 11: 1489–1501
 68. Spang N, Feldmann A, Huesmann H, Bekbulat F, Schmitt V, Hiebel C, Koziollek-Drechsler I, Clement AM, Moosmann B, Jung J et al (2014) RAB3GAP1 and RAB3GAP2 modulate basal and rapamycin-induced autophagy. *Autophagy* 10: 2297
 69. Xu D, Li Y, Wu L, Li Y, Zhao D, Yu J, Huang T, Ferguson C, Parton RG, Yang H et al (2018) Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions. *J Cell Biol* 217: 975–995
 70. Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, Nishijima M (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426: 803–809
 71. Sugiki T, Takeuchi K, Yamaji T, Takano T, Tokunaga Y, Kumagai K, Hanada K, Takahashi H, Shimada I (2012) Structural basis for the golgi association by the pleckstrin homology domain of the ceramide trafficking protein (CERT). *J Biol Chem* 287: 33706–33718
 72. Lehto M, Olkkonen VM (2003) The OSBP-related proteins: a novel protein family involved in vesicle transport, cellular lipid metabolism, and cell signalling. *Biochim Biophys Acta* 1631: 1–11
 73. Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 6: 175–182



License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

Expanded View Figures

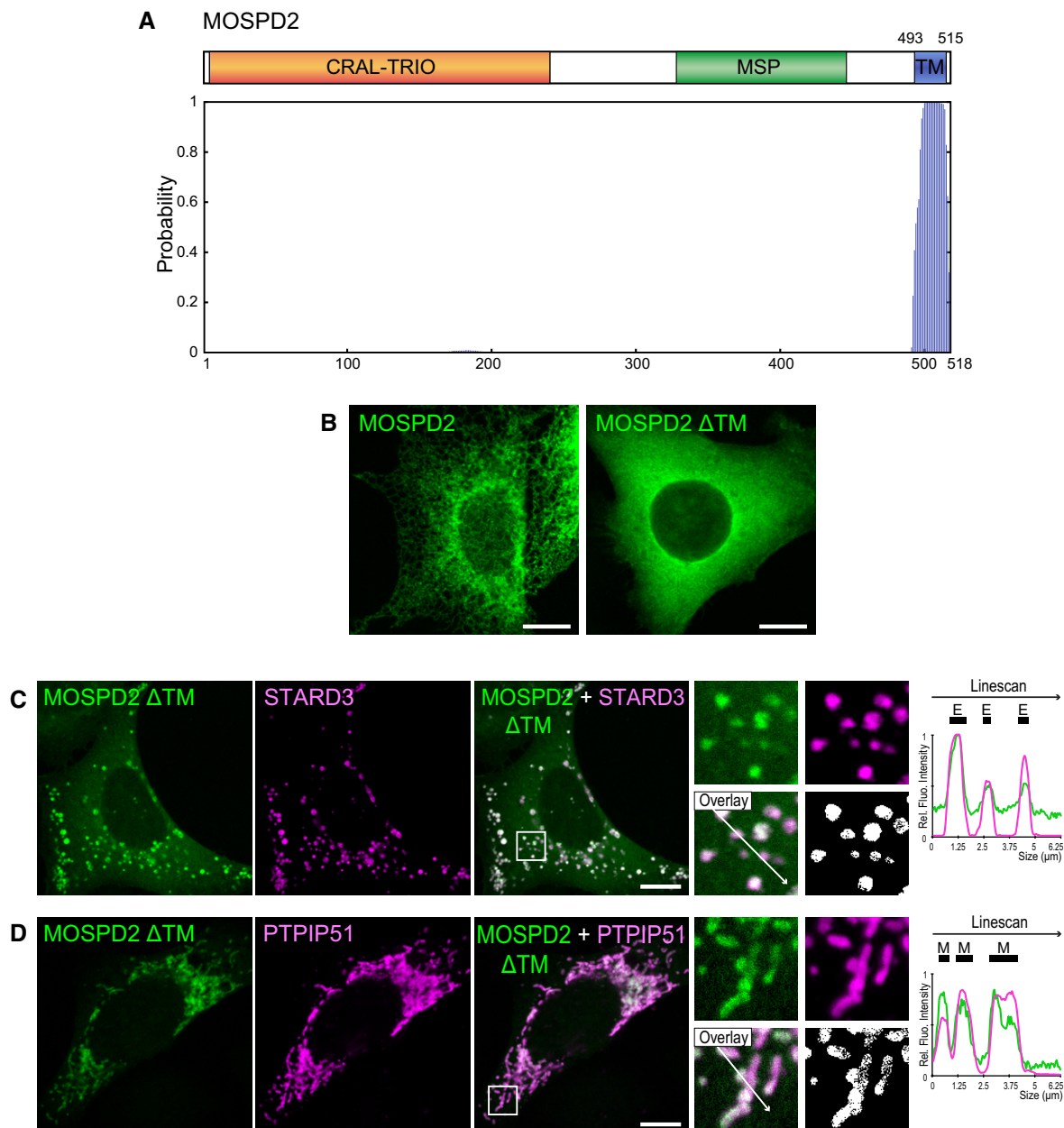


Figure EV1. MOSPD2 is a putative tail-anchored protein.

- A Top: Schematic representation of MOSPD2. Numbers indicate the positions of the first and the last residue of the putative transmembrane domain (blue box). Bottom: Determination of the number and position of transmembrane helices using TMHMM software [73]. Vertical bars of the diagram represent the probability for a given amino acid to be included in a transmembrane helix. MOSPD2 is predicted to possess a single carboxyl-terminus transmembrane helix.
- B Localization of GFP-MOSPD2 (left, green) and GFP-MOSPD2 Δ TM (right, green) expressed in HeLa cells. The GFP-MOSPD2 Δ TM protein is lacking the last 26 amino acids of MOSPD2, which include the transmembrane domain. Scale bars: 10 μ m.
- C, D Localization of GFP-MOSPD2 Δ TM (green) and Flag-STARD3 (C, magenta), or HA-PTPIP51 (D, magenta), expressed in HeLa cells. The subpanels on the right are higher magnification (3.5 \times) images of the area outlined in white. The Overlay panel shows merged green and magenta images. The Coloc panel displays a colocalization mask on which pixels where the green and the magenta channels co-localize are shown in white. Right: Linescan analyses with fluorescence intensities of the green and magenta channels along the white arrow shown on the subpanel Overlay. Black rectangles indicate the positions of late endosomes (E) and mitochondria (M). Scale bars: 10 μ m.

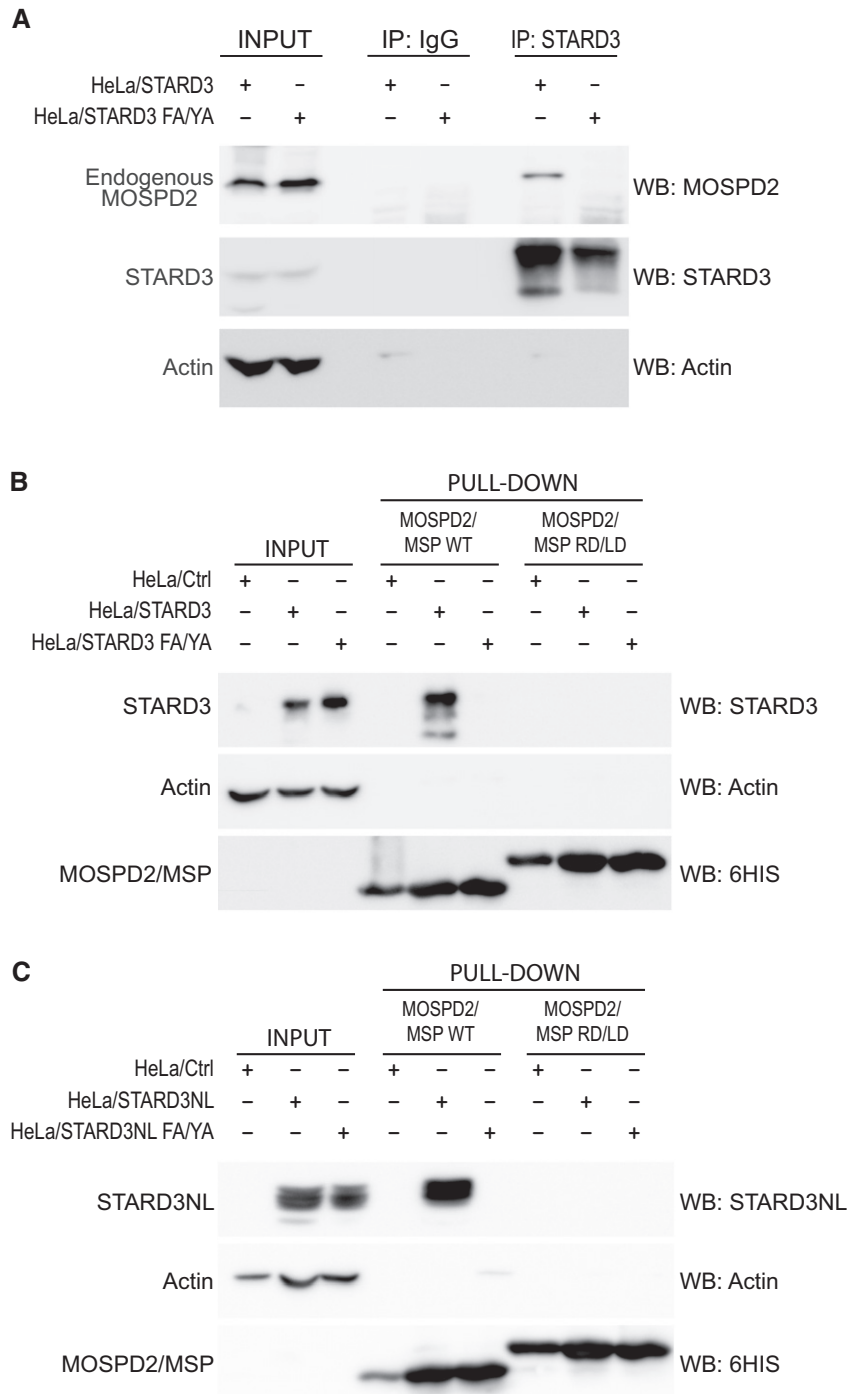


Figure EV2. The MSP domain of MOSPD2 is sufficient to interact with STARD3 and STARD3NL.

A Immunoprecipitation experiment between STARD3 (WT and FFAT-deficient) and endogenous MOSPD2. Proteins were immunoprecipitated using anti-STARD3 antibodies or control IgG. Protein extracts and immunoprecipitates were analyzed by Western blot using anti-MOSPD2, anti-STARD3, and anti-actin antibodies.

B, C Interaction of STARD3 (B), or STARD3NL (C), with the recombinant MSP domain of MOSPD2. The WT and the RD/LD mutant MSP domain of MOSPD2 were bound to a Ni²⁺-NTA resin and used in a pull-down assay with protein extracts of control (HeLa/Ctrl), STARD3, and STARD3 FA/YA FFAT-defective mutant (B), and STARD3NL and STARD3NL FA/YA FFAT-defective mutant (C) expressing cells. Total and bound proteins were analyzed by Western blot using anti-STARD3 (B), anti-STARD3NL (C), anti-HIS tag (B and C), and anti-actin (B and C).

Source data are available online for this figure.

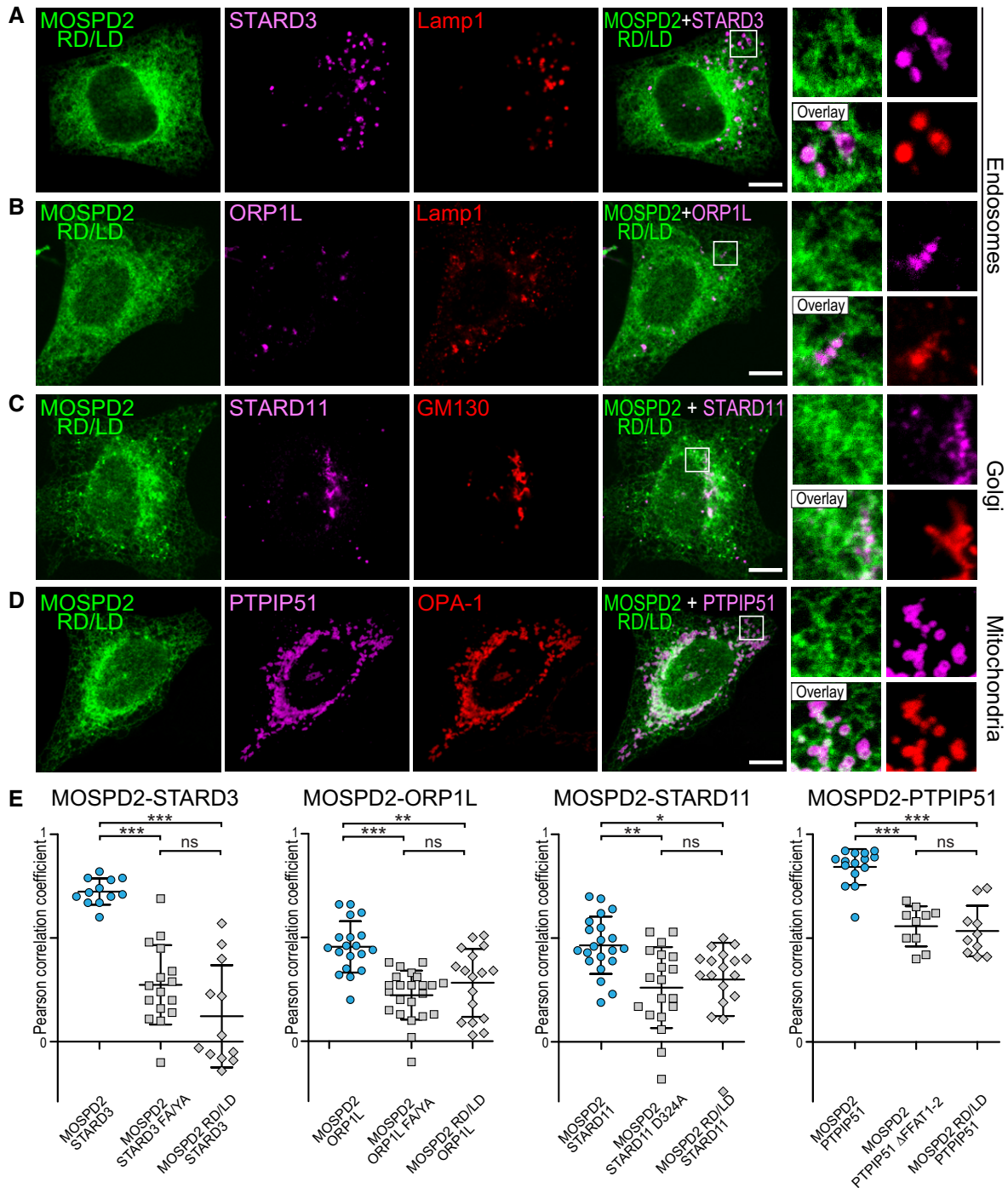


Figure EV3. MOSPD2 recruitment to interorganelle contact sites depends on the interaction between the FFAT motif and the MSP domain.

A–D GFP-MOSPD2 RD/LD (green)-expressing cells were transfected with Flag-STARD3 (A), Flag-ORP1L (B), Flag-STARD11 (C), or HA-PTPIP51 (D), and labeled using anti-Flag (A–C; magenta), anti-HA (D; magenta), and anti-Lamp1 (A and B; red), GM130 (C; red), or OPA-1 (D; red), as markers of late endosomes/lysosomes, Golgi, and mitochondria, respectively. The subpanels on the right are higher magnification (3.5 \times) images of the area outlined in white. The Overlay panel shows merged green and magenta images. Scale bars: 10 μ m.

E Pearson correlation coefficients between MOSPD2 (WT or RD/LD mutant) and STARD3 (WT or FA/YA), ORP1L (WT or FA/YA), STARD11 (WT or D324A), and PTPIP51 (WT or Δ FFAT 1–2) staining are shown. Each dot represents a single cell from three independent experiments (number of cells: MOSPD2–STARD3: 12; MOSPD2–STARD3 FA/YA: 16; MOSPD2 RD/LD–STARD3: 12; MOSPD2–ORP1L: 19; MOSPD2–ORP1L FA/YA: 23; MOSPD2 RD/LD–ORP1L: 17; MOSPD2–STARD11: 21; MOSPD2–STARD11 D324A: 19; MOSPD2 RD/LD–STARD11: 18; MOSPD2–PTPIP51: 15; MOSPD2–PTPIP51 Δ FFAT 1–2: 10; MOSPD2 RD/LD–PTPIP51: 10). Means and error bars (SD) are shown. Kruskal–Wallis with Dunn’s multiple comparison test (* P -values < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

Figure EV4. Endogenous MOSPD2 is recruited to interorganelle contact sites by FFAT-containing proteins.

A–H Endogenous MOSPD2 (green) staining in HeLa cells expressing Flag-STARD3 (A), Flag-STARD3 FA/YA (B), GFP-ORP1L (C), GFP-ORP1L FA/YA (D), Flag-STARD11 (E), Flag-STARD11 D324A (F), HA-PTPIP51 (G), or HA-PTPIP51 Δ FFAT (H) (magenta). Endogenous MOSPD2 was recruited around endosomes, Golgi, and mitochondria by STARD3 and ORP1L, STARD11 and PTPIP51, respectively. FFAT-deficient STARD3, ORP1L, STARD11, and PTPIP51 mutants did not recruit endogenous MOSPD2. Note that in agreement with immunoprecipitation assays (Fig 5F), PTPIP51 Δ FFAT retained a partial ability to recruit MOSPD2. The subpanels on the right are higher magnification (3.5 \times) images of the area outlined in white. The Overlay panel shows merged green and magenta images. The Coloc panel displays a co-localization mask on which pixels where the green and the magenta channels co-localize are shown in white. Right: Linescan analyses with fluorescence intensities of the green and magenta channels along the white arrow shown on the subpanel Overlay. Black rectangles indicate the positions of late endosomes (E), Golgi stacks (G), and mitochondria (M). Scale bars: 10 μ m.

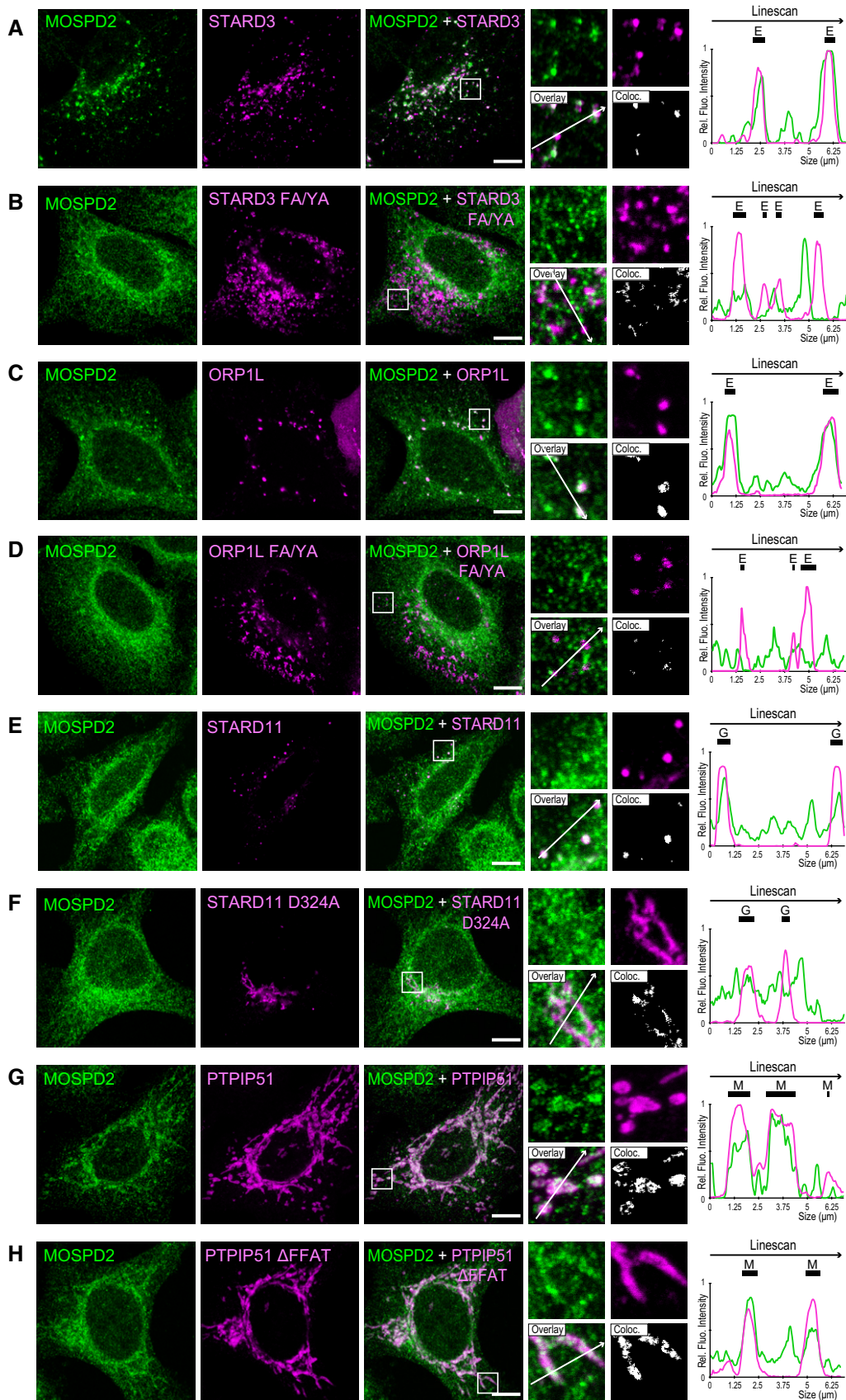


Figure EV4.

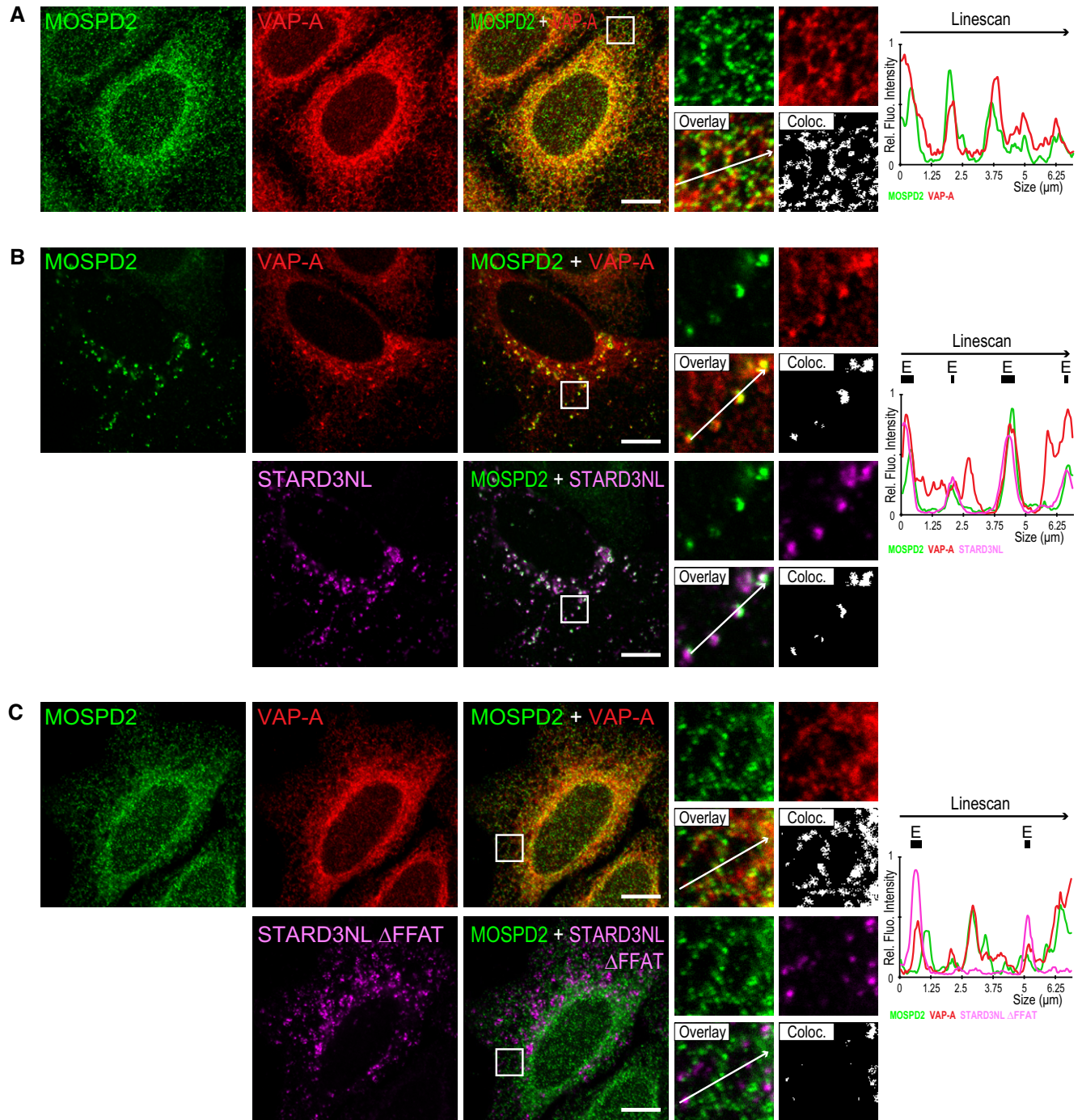


Figure EV5. VAP-A is recruited to interorganelle contact sites together with MOSPD2.

A HeLa cells were labeled with anti-MOSPD2 (green) and anti-VAP-A (red) antibodies.

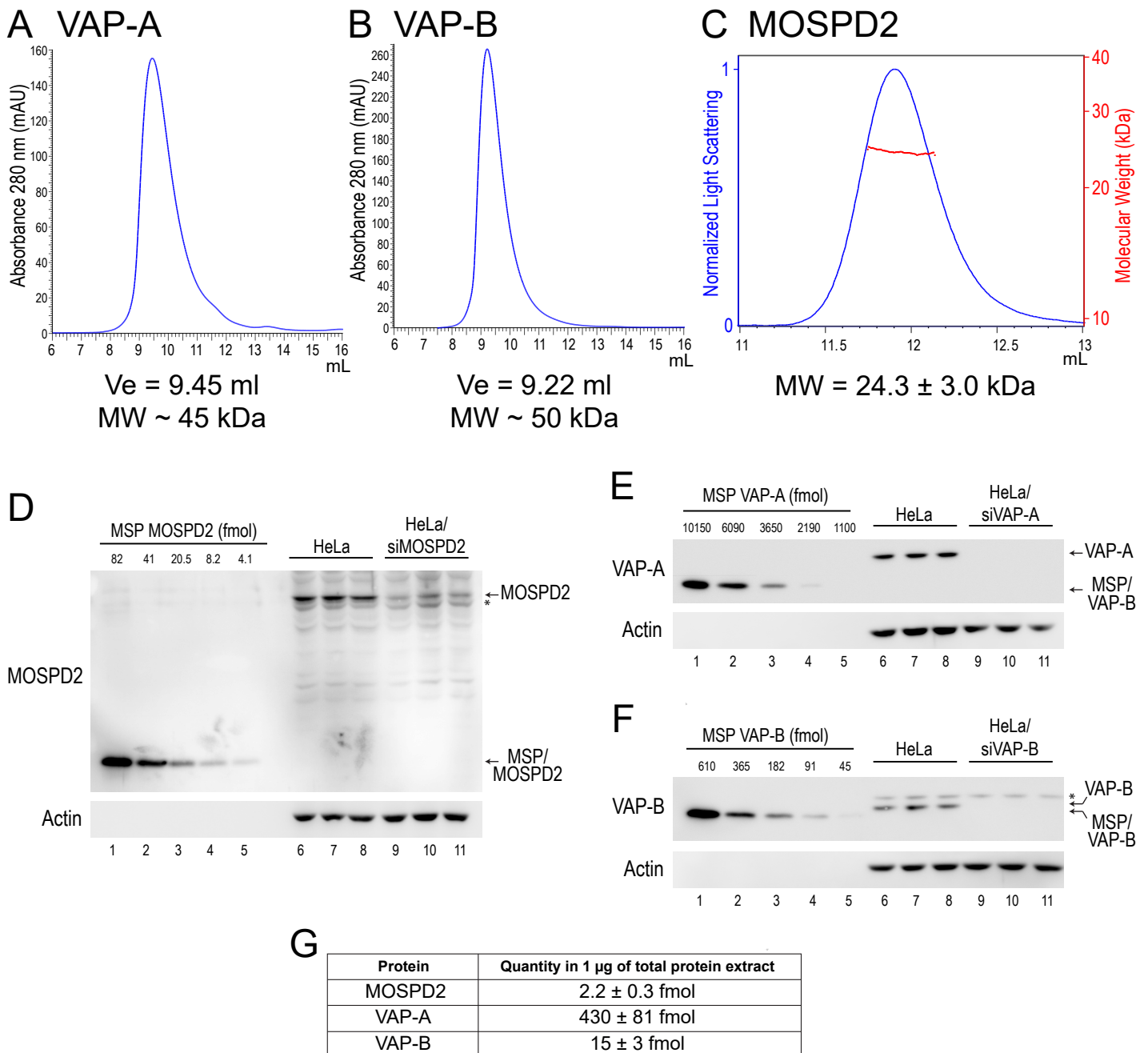
B, C HeLa cells expressing Flag-STARD3NL (**B**) or Flag-STARD3NL ΔFFAT (**C**) were labeled with anti-MOSPD2 (green), anti-VAP-A (red), and anti-Flag (magenta) antibodies.

Data information: The subpanels on the right are higher magnification (3.5 \times) images of the area outlined in white. The Overlay panel shows merged green and magenta images. The Coloc panel displays a colocalization mask on which pixels where green and red (up), or green and magenta (bottom) channels co-localize are shown in white. Right: Linescan analyses with fluorescence intensities of the green, red, and magenta channels along the white arrow shown on the subpanel Overlay. Black rectangles indicate the positions of late endosomes (E). Scale bars: 10 μm .

APPENDIX

Table of contents

Appendix Figure S1: The recombinant MSP domain of MOSPD2 is monomeric, while recombinant VAP-A and VAP-B are dimeric.	2
Appendix Figure S2: MOSPD2 recruitment to inter-organelle contact sites does not require VAP proteins	3
Appendix Figure S3: MOSPD2 modulates inter-organelle contacts	4
Appendix Table S1: Proteins co-precipitated with GFP-MOSPD2 and not with GFP-MOSPD2 RD/LD	5-6

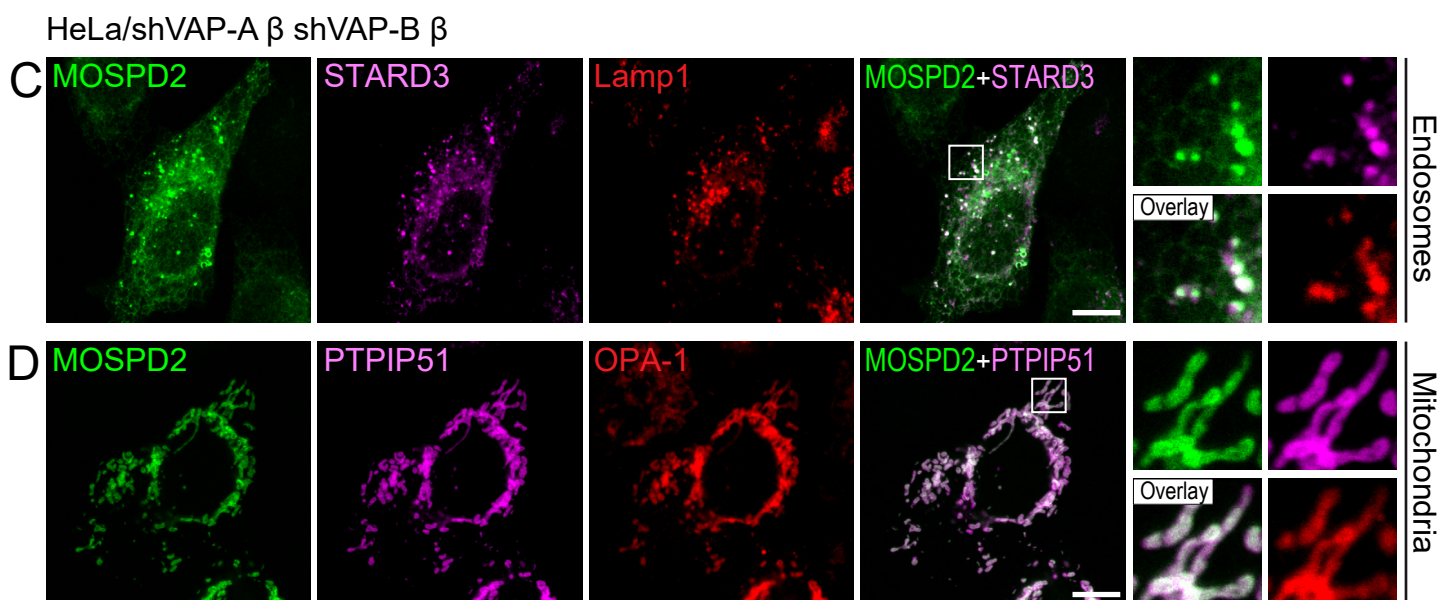
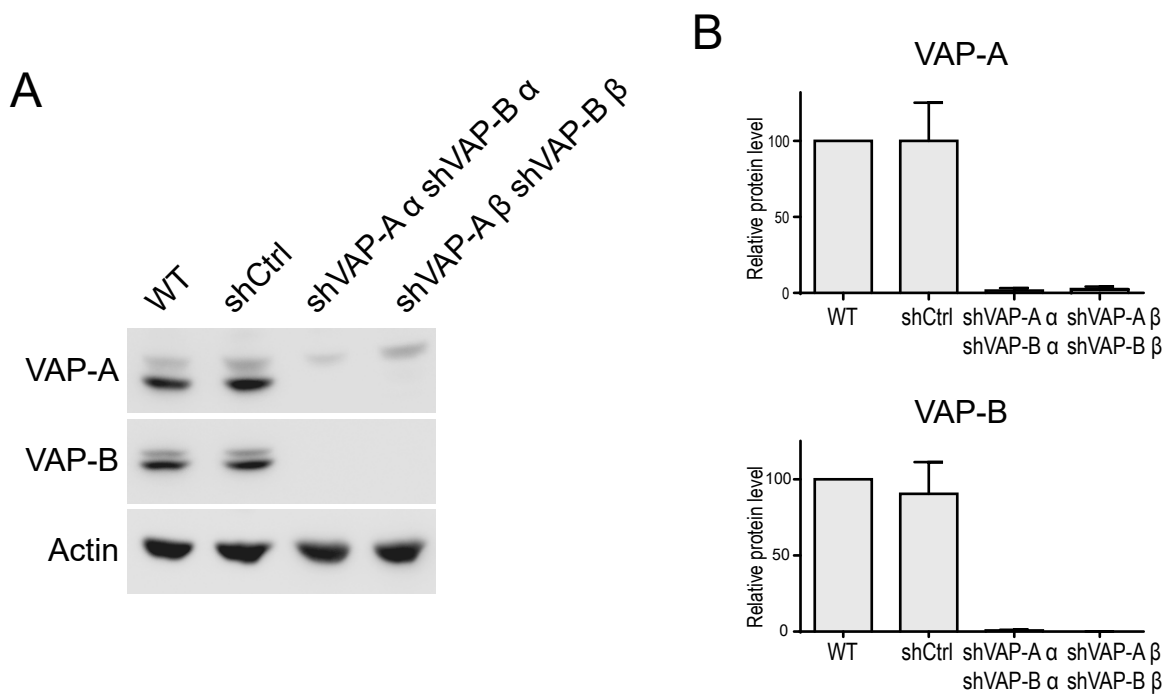


Appendix Figure S1: The recombinant MSP domain of MOSPD2 is monomeric, while recombinant VAP-A and VAP-B are dimeric.

A, B: Gel filtration profiles of recombinant VAP-A (A) and VAP-B (B) proteins. The proteins were loaded on a Superdex 75 10/300 GL column equilibrated with 20 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl. The column was calibrated with a mixture of bovine serum albumin, ovalbumin and ribonuclease (data not shown). The apparent molecular weights of VAP-A (theoretical MW: 24.6 kDa) and VAP-B (theoretical MW: 24.6 kDa) correspond to dimeric forms of the proteins.

C: Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS) analysis of MOSPD2. The protein was loaded on a Superdex 75 10/300 GL column equilibrated with 20 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl, coupled to a MALS system (Wyatt technology). The MW detected corresponds to a monomer of MSP domain of MOSPD2 (theoretical MW: 24.2 kDa).

D-G: Quantification of MOSPD2, VAP-A and VAP-B protein levels in HeLa cells. Dilution series of recombinant MSP domains of MOSPD2 (D, lanes 1-5), VAP-A (E, lanes 1-5), and VAP-B (F, lanes 1-5) were analyzed by Western blot, together with protein extracts from HeLa cells (triplicate; lanes 6-8) and HeLa cells treated with siRNAs targeting MOSPD2 (D; triplicate, lanes 9-11), VAP-A (E; triplicate, lanes 9-11), and VAP-B (F; triplicate, lanes 9-11) as negative controls. Quantity of total protein extracts loaded: D: 13 µg; E: 10 µg and F: 10 µg. Actin detection is shown as loading control. Chemiluminescence signals were quantified; standard curves established with recombinant proteins dilutions allowed the determination of MOSPD2, VAP-A and VAP-B quantities in protein extracts from HeLa cells (G). Experiments performed in triplicate.

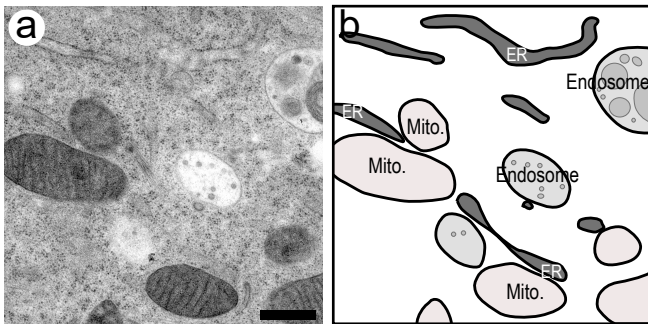
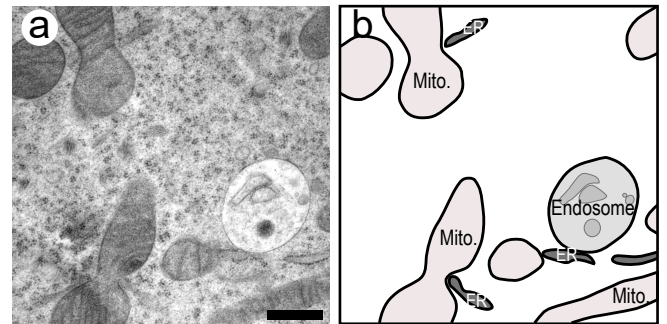
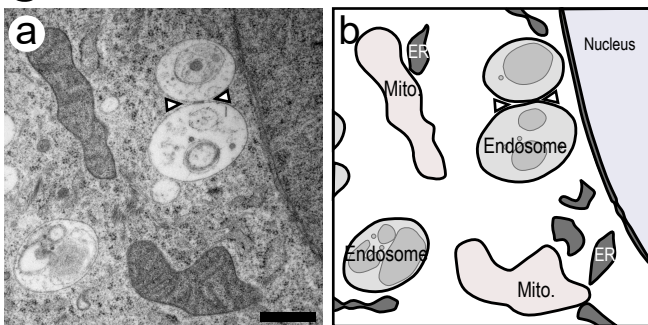
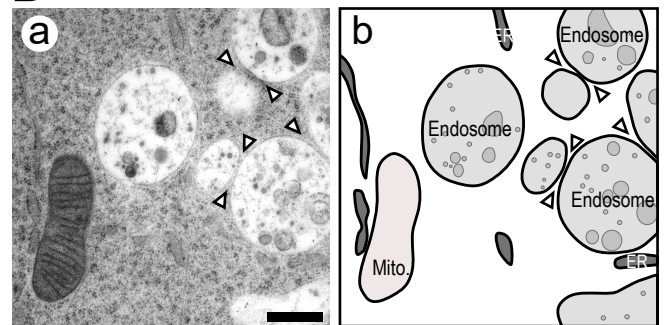


Appendix Figure S2: MOSPD2 recruitment to inter-organelle contact sites does not require VAP proteins

A: Western blot analysis of VAP protein level in control HeLa cells (WT) and in HeLa cells expressing a control shRNA (shCtrl) and two pairs of shRNAs targeting VAP-A and VAP-B (shVAP-A α/shVAP-B α or shVAP-A β/shVAP-B β).

B: Quantification of VAP-A and VAP-B protein levels by Western blot. Means and error bars (SD) are shown. n: three independent experiments.

C,D: GFP-MOSPD2 (green) was co-expressed with Flag-STARD3 and HA-PTPIP51 in HeLa/shVAP-A β shVAP-B β cells, and labelled using anti-Flag (C; magenta), anti-HA (D; magenta), and anti-Lamp1 (C; red) or OPA-1 (D; red) as markers of late endosomes/lysosomes and mitochondria, respectively. The subpanels on the right are higher magnification (3.5x) images of the area outlined in white. The Overlay panel shows merged green and magenta images. Scale bars: 10 μm.

A HeLa**B** HeLa/shCtrl**C** HeLa/shMOSPD2- α **D** HeLa/shMOSPD2- β **Appendix Figure S3: MOSPD2 modulates inter-organelle contacts**

A-D: TEM images of control HeLa cells (A: HeLa; B: HeLa/shCtrl) and MOSPD2-silenced HeLa cells (C: HeLa/shMOSPD2- α ; D: HeLa/shMOSPD2- β) is shown on the left (a). An interpretation scheme representing contacts between organelles is shown on the right (b); the ER, endosomes and ILV are in dark, light and medium gray, respectively. Mitochondria are in pink. Scale bars: 500 μ m.

Appendix Table S1

Accession Number	Identity	Ratio
Q13509	Tubulin beta-3 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB3 PE=1 SV=2 - [TBB3_HUMAN]	206,613333
Q14764	Major vault protein OS=Homo sapiens GN=MVP PE=1 SV=4 - [MVP_HUMAN]	96,1966667
P42166	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha OS=Homo sapiens GN=TMPO PE=1 SV=2 - [LAP2A_HUMAN]	89,8
Q96A33	Coiled-coil domain-containing protein 47 OS=Homo sapiens GN=CCDC47 PE=1 SV=1 - [CCDC47_HUMAN]	70,2766667
Q9JHW5	<u>GPN-loop GTPase 3 OS=Homo sapiens GN=GPN3 PE=1 SV=2 - [GPN3_HUMAN]</u>	35,5766667
Q8TD16	Protein bicaudal D homolog 2 OS=Homo sapiens GN=BICD2 PE=1 SV=1 - [BICD2_HUMAN]	34,0666667
Q96R06	Sperm-associated antigen 5 OS=Homo sapiens GN=SPAG5 PE=1 SV=2 - [SPAG5_HUMAN]	31,4333333
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3 - [HNRNPF_HUMAN]	26,92
P16989	Y-box-binding protein 3 OS=Homo sapiens GN=YBX3 PE=1 SV=4 - [YBOX3_HUMAN]	26,2366667
Q96TC7	Regulator of microtubule dynamics protein 3 OS=Homo sapiens GN=RMDN3 PE=1 SV=2 - [RMD3_HUMAN]	23,7266667
F8WJN3	Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 6 OS=Homo sapiens GN=CPSP6 PE=1 SV=1 - [F8WJN3_HUMAN]	22,4066667
E9PDF6	Unconventional myosin-Ib OS=Homo sapiens GN=MYO1B PE=1 SV=1 - [E9PDF6_HUMAN]	21,7666667
P08670	Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4 - [VIME_HUMAN]	19,84
Q9BXW6	Oxysterol-binding protein-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=OSBPL1A PE=1 SV=2 - [OSBL1_HUMAN]	19,5566667
Q5JR95	40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens GN=RPS8 PE=1 SV=1 - [Q5JR95_HUMAN]	18,26
P27694	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit OS=Homo sapiens GN=RPA1 PE=1 SV=2 - [RFA1_HUMAN]	17,9233333
P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=LRPPRC PE=1 SV=3 - [LRPPRC_HUMAN]	17,5533333
P17706	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2 OS=Homo sapiens GN=PTN2 PE=1 SV=2 - [PTN2_HUMAN]	17,4366667
P40939	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHA PE=1 SV=2 - [ECHA_HUMAN]	16,73
G3V576	<u>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens GN=HNRNPC PE=1 SV=1 - [G3V576_HUMAN]</u>	16,6266667
A0A087WXX9	Collagen alpha-1(V) chain OS=Homo sapiens GN=COL5A1 PE=1 SV=1 - [A0A087WXX9_HUMAN]	16,5733333
P35244	Replication protein A 14 kDa subunit OS=Homo sapiens GN=RPA3 PE=1 SV=1 - [RFA3_HUMAN]	14,7
P42167	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma OS=Homo sapiens GN=TMPO PE=1 SV=2 - [LAP2B_HUMAN]	14,6366667
P20042	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2 OS=Homo sapiens GN=EIF2S2 PE=1 SV=2 - [IF2B_HUMAN]	14,5533333
V9GY01	Chromosome 15 open reading frame 23, isoform CRA_d OS=Homo sapiens GN=KNSTRN PE=1 SV=1 - [V9GY01_HUMAN]	14,3233333
Q15155	BET1 homolog OS=Homo sapiens GN=BET1 PE=1 SV=1 - [BET1_HUMAN]	13,3133333
P50991	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens GN=CCT4 PE=1 SV=4 - [TCPD_HUMAN]	13,1166667
FSRHW4	<u>Erlin-2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ERLIN2 PE=1 SV=1 - [FSRHW4_HUMAN]</u>	12,93
X1WI28	60S ribosomal protein L10 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL10 PE=1 SV=7 - [X1WI28_HUMAN]	12,8133333
Q15545	Transcription initiation factor TFIID subunit 7 OS=Homo sapiens GN=TAF7 PE=1 SV=1 - [TAF7_HUMAN]	11,63
C9JPK5	MLN64 N-terminal domain homolog (Fragment) OS=Homo sapiens GN=STARD3NL PE=1 SV=1 - [C9JPK5_HUMAN]	11,3766667
Q13835	Plakophilin-1 OS=Homo sapiens GN=PKP1 PE=1 SV=2 - [PKP1_HUMAN]	11,1466667
Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Homo sapiens GN=SERBP1 PE=1 SV=2 - [PAIRB_HUMAN]	11,0933333
J3QR09	Ribosomal protein L19 OS=Homo sapiens GN=RPL19 PE=1 SV=1 - [J3QR09_HUMAN]	10,9966667
P54136	Arginine-tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=RARS PE=1 SV=2 - [SYRC_HUMAN]	10,8
M0R0F0	40S ribosomal protein S5 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS5 PE=1 SV=1 - [M0R0F0_HUMAN]	10,57
Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59 OS=Homo sapiens GN=LRRC59 PE=1 SV=1 - [LRC59_HUMAN]	10,5433333
J3QQQ9	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens PE=4 SV=1 - [J3QQQ9_HUMAN]	10,5
A0A087X0U3	Amino acid transporter OS=Homo sapiens GN=SLC1A3 PE=1 SV=1 - [A0A087X0U3_HUMAN]	10,4066667
A0A0J9YYL3	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PUF60 PE=1 SV=1 - [A0A0J9YYL3_HUMAN]	10,1266667
P62750	60S ribosomal protein L23a OS=Homo sapiens GN=RPL23A PE=1 SV=1 - [RL23A_HUMAN]	9,9633333
P62424	60S ribosomal protein L7a OS=Homo sapiens GN=RPL7A PE=1 SV=2 - [RL7A_HUMAN]	9,8366667
Q8WXX5	DnaJ homolog subfamily C member 9 OS=Homo sapiens GN=DNAJC9 PE=1 SV=1 - [DNJC9_HUMAN]	9,6166667
P09923	Intestinal-type alkaline phosphatase OS=Homo sapiens GN=ALPI PE=1 SV=2 - [PPBI_HUMAN]	9,54
A0A0D9SF54	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 OS=Homo sapiens GN=SPTAN1 PE=1 SV=1 - [A0A0D9SF54_HUMAN]	9,5066667
P22695	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRC2 PE=1 SV=3 - [QCR2_HUMAN]	9,28
E7ETK0	40S ribosomal protein S24 OS=Homo sapiens GN=RPS24 PE=1 SV=1 - [E7ETK0_HUMAN]	9,2366667
F8WAE5	Eukaryotic translation initiation factor 2A OS=Homo sapiens GN=EIF2A PE=1 SV=1 - [F8WAE5_HUMAN]	9,1866667
P33993	DNA replication licensing factor MCM7 OS=Homo sapiens GN=MCM7 PE=1 SV=4 - [MCM7_HUMAN]	9,0733333
Q15717	<u>ELAV-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=ELAVL1 PE=1 SV=2 - [ELAV1_HUMAN]</u>	9,0733333
O43752	Syntaxin-6 OS=Homo sapiens GN=STX6 PE=1 SV=1 - [STX6_HUMAN]	9,0466667
P62829	60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens GN=RPL23 PE=1 SV=1 - [RL23_HUMAN]	8,91
Q92841	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens GN=DDX17 PE=1 SV=2 - [DDX17_HUMAN]	8,8466667
H0YEN5	40S ribosomal protein S2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS2 PE=1 SV=1 - [H0YEN5_HUMAN]	8,6533333
P49848	Transcription initiation factor TFIID subunit 6 OS=Homo sapiens GN=TAF6 PE=1 SV=1 - [TAF6_HUMAN]	8,4866667
P15927	Replication protein A 32 kDa subunit OS=Homo sapiens GN=RPA2 PE=1 SV=1 - [RPA2_HUMAN]	8,14
Q15042	Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=RAB3GAP1 PE=1 SV=3 - [RB3GP_HUMAN]	8,1066667
O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Homo sapiens GN=SYNCRIP PE=1 SV=2 - [HNRPO_HUMAN]	8,1058558
B4DUR8	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens GN=CCT3 PE=1 SV=1 - [B4DUR8_HUMAN]	8,0966667
O95573	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 3 OS=Homo sapiens GN=ACSL3 PE=1 SV=3 - [ACSL3_HUMAN]	8,0766667
P36578	60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens GN=RPL4 PE=1 SV=5 - [RL4_HUMAN]	8,07
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-1 OS=Homo sapiens GN=EIF4A1 PE=1 SV=1 - [IF4A1_HUMAN]	8,0233333
A0A0D9SFB3	ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens GN=DDX3X PE=1 SV=1 - [A0A0D9SFB3_HUMAN]	7,8555556
Q9BSD7	Cancer-related nucleoside-triphosphatase OS=Homo sapiens GN=NTPCR PE=1 SV=1 - [NTPCR_HUMAN]	7,8366667
A0A087WXM6	60S ribosomal protein L17 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL17 PE=3 SV=1 - [A0A087WXM6_HUMAN]	7,8033333
H7BY29	Mitochondrial amidoxime-reducing component 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=MARC1 PE=1 SV=1 - [H7BY29_HUMAN]	7,73
G5E9W7	28S ribosomal protein S22, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPS22 PE=1 SV=1 - [G5E9W7_HUMAN]	7,5533333
P02545	Prelamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=1 SV=1 - [LMNA_HUMAN]	7,50962038
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens GN=DHX9 PE=1 SV=4 - [DHX9_HUMAN]	7,3966667
H7BYN3	Transcription factor A, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TFAM PE=1 SV=1 - [H7BYN3_HUMAN]	7,12
P19338	Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCL PE=1 SV=3 - [NUCL_HUMAN]	7,0782347

Q96KK5	Histone H2A type 1-H OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AH PE=1 SV=3 - [H2A1H_HUMAN]	7,0227577
Q96CS3	FAS-associated factor 2 OS=Homo sapiens GN=FAF2 PE=1 SV=2 - [FAF2_HUMAN]	6,92333333
B1AK87	Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, beta, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=CAPZB PE=1 SV=1 - [B1AK87_HUMAN]	6,91333333
F5GY55	DNA damage-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=DDB1 PE=1 SV=1 - [F5GY55_HUMAN]	6,83666667
P61026	Ras-related protein Rab-10 OS=Homo sapiens GN=RAB10 PE=1 SV=1 - [RAB10_HUMAN]	6,78
Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Homo sapiens GN=PSMD2 PE=1 SV=3 - [PSMD2_HUMAN]	6,78
P61353	60S ribosomal protein L27 OS=Homo sapiens GN=RPL27 PE=1 SV=2 - [RL27_HUMAN]	6,58333333
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Homo sapiens GN=PARP1 PE=1 SV=4 - [PARP1_HUMAN]	6,57666667
Q7Z406	Myosin-14 OS=Homo sapiens GN=MYH14 PE=1 SV=2 - [MYH14_HUMAN]	6,45
P05141	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7 - [ADT2_HUMAN]	6,39215686
Q13049	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM32 OS=Homo sapiens GN=TRIM32 PE=1 SV=2 - [TRI32_HUMAN]	6,35
Q8IVT2	Mitotic interactor and substrate of PLK1 OS=Homo sapiens GN=MISP PE=1 SV=1 - [MISP_HUMAN]	6,34333333
A0A0G2JRY5	Transcription initiation factor TFIIID subunit 4 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TAF4 PE=1 SV=1 - [A0A0G2JRY5_HUMAN]	5,84
A0A087WWY3	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=1 - [A0A087WWY3_HUMAN]	5,83666667
J3KTA4	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens GN=DDX5 PE=1 SV=1 - [J3KTA4_HUMAN]	5,71927966
Q9UJ50	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A13 PE=1 SV=2 - [CMC2_HUMAN]	5,69
P51570	Galactokinase OS=Homo sapiens GN=GALK1 PE=1 SV=1 - [GALK1_HUMAN]	5,64666667
Q07666	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=KHDRBS1 PE=1 SV=1 - [KHDR1_HUMAN]	5,54
Q15526	Surfeit locus protein 1 OS=Homo sapiens GN=SURF1 PE=1 SV=1 - [SURF1_HUMAN]	5,47333333
P0CW18	Serine protease 56 OS=Homo sapiens GN=PRSS56 PE=1 SV=1 - [PRSS56_HUMAN]	5,42
Q15637	Splicing factor 1 OS=Homo sapiens GN=SF1 PE=1 SV=4 - [SF01_HUMAN]	5,4
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=G3BP1 PE=1 SV=1 - [G3BP1_HUMAN]	5,35547122
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4 - [TERA_HUMAN]	5,34295416
I3L0K7	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TRAP1 PE=1 SV=1 - [I3L0K7_HUMAN]	5,3
F5GYQ2	Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein OS=Homo sapiens GN=TRMT112 PE=1 SV=1 - [F5GYQ2_HUMAN]	5,12
Q95249	Golgi SNAP receptor complex member 1 OS=Homo sapiens GN=GOSR1 PE=1 SV=1 - [GOSR1_HUMAN]	5,11378978
Q96IR7	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like protein OS=Homo sapiens GN=HPDL PE=1 SV=1 - [HPDL_HUMAN]	5,07
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens GN=RPS4X PE=1 SV=2 - [RS4X_HUMAN]	5,06640927
H9KV75	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens GN=ACTN1 PE=1 SV=1 - [H9KV75_HUMAN]	5,03
Q13885	Tubulin beta-2A chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2A PE=1 SV=1 - [TBB2A_HUMAN]	5,0245483
Q9H2M9	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=RAB3GAP2 PE=1 SV=1 - [RBGPR_HUMAN]	4,97
P06899	Histone H2B type 1-J OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BJ PE=1 SV=3 - [H2B1J_HUMAN]	4,93666667
C9JZ20	Prohibitin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PHB PE=1 SV=1 - [C9JZ20_HUMAN]	4,93666667
Q96I24	Far upstream element-binding protein 3 OS=Homo sapiens GN=FUBP3 PE=1 SV=2 - [FUBP3_HUMAN]	4,89333333
Q15046	Lysine--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=KARS PE=1 SV=3 - [SYK_HUMAN]	4,88666667
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SSBP1 PE=1 SV=1 - [SSBP_HUMAN]	4,87731629
HOYLY7	Calcineurin B homologous protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CHP1 PE=1 SV=1 - [HOYLY7_HUMAN]	4,86333333
Q14849	StAR-related lipid transfer protein 3 OS=Homo sapiens GN=STARD3 PE=1 SV=2 - [STAR3_HUMAN]	4,84

Proteins possessing an FFAT motif and shown to interact with VAP in the literature

Proteins investigated in our study

Proteins identified as MOSPD2 partner in databases (<https://thebiogrid.org/>)

Proteins identified as VAP-A or VAP-B partner in databases

Protein extracts from HeLa cells stably expressing GFP-MOSPD2 or GFP-MOSPD2 RD/LD were immunoprecipitated using a GFP-trap resin. Eluted protein were analyzed by tandem mass spectrometry. For the analysis, mass spectrometry scores were corrected by adding 1 to each score. Proteins were filtered for a ratio (Score Protein X in GFP-MOSPD2 sample)/(Score Protein X in GFP-MOSPD2 RD/LD sample)>4.84.

3. Addenda de l'article

Une expérience supplémentaire a été réalisée afin de compléter les études d'interaction entre MOSPD2 et les protéines à motif FFAT. Celle-ci avait pour but de démontrer l'établissement d'interactions entre le domaine MSP de MOSPD2 et une protéine à motif FFAT endogène. Pour cela, j'ai réalisé une expérience de « pull-down » utilisant les domaines MSP recombinants sauvages et mutés des protéines MOSPD2 et VAP-A en fusion avec une étiquette 6-Histidine (6-His) en position C-terminale. Les mutations RD/LD et KD/MD respectivement associées à MOSPD2 et VAP-A ont été décrites comme empêchant l'interaction du domaine MSP avec les motifs FFAT (Di Mattia et al., 2018a; Furuita et al., 2010; Kaiser et al., 2005). Les protéines recombinantes ont été immobilisées sur une résine de nickel, puis cette dernière a été incubée avec un extrait protéique de cellules HeLa. La présence de la protéine ORP1L a été analysée par Western Blot parmi les protéines retenues sur la résine (FigureR1).

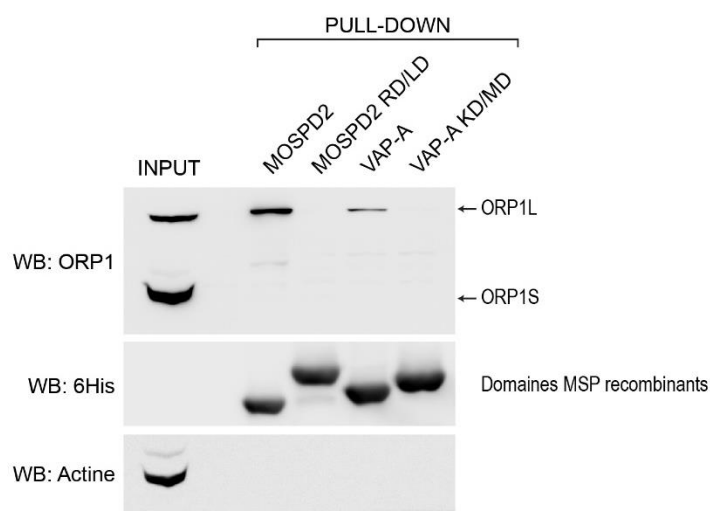


Figure R1 : Les domaines MSP de MOSPD2 et VAP-A interagissent avec la protéine ORP1L endogène

Interaction de la protéine endogène ORP1L avec les domaines MSP recombinants de MOSPD2 et VAP-A. Les domaines MSP sauvages et mutants RD/LD de MOSPD2 ainsi que les domaines MSP sauvages et mutants KD/MD de VAP-A ont été fixés sur une résine de nickel puis mis en contact avec un extrait protéique issu de cellules HeLa. Chacune des protéines recombinantes est en fusion avec une étiquette 6-His C-terminale. L'extrait protéique total (INPUT) et les fractions d'éluion (PULL-DOWN) ont été analysés par Western Blot (WB) avec des anticorps anti-ORP1, anti-6His et anti-Actine. Les domaines MSP sauvages de MOSPD2 et VAP-A précipitent la protéine ORP1L endogène et non ORP1S. Les domaines MSP mutants ne précipitent pas la protéine ORP1L endogène.

L'anticorps anti-ORP1 utilisé détecte deux isoformes majeurs encodés par le gène *OSBPL1A*, à savoir ORP1S et ORP1L. ORP1L est une protéine associée aux endosomes tardifs et possède un motif FFAT, alors qu'ORP1S est une protéine cytoplasmique ne possédant pas de motif FFAT. Les résultats montrent que les domaines MSP de MOSPD2 et VAP-A sont capables de précipiter la protéine ORP1L, mais pas la protéine ORP1S. De plus, les versions mutantes des domaines MSP incapables d'interagir avec les motifs FFAT ne précipitent pas la protéine ORP1L. Ces données démontrent que le domaine MSP de MOSPD2 interagit avec la protéine ORP1L endogène.

Par la suite, j'ai réalisé d'autres expériences dans le but de soutenir l'existence de contacts membranaires impliquant la protéine MOSPD2 et un de ses partenaires protéiques à motif FFAT, au niveau endogène. Pour cela, j'ai utilisé la technique de PLA (proximity ligation assay) entre les protéines MOSPD2 et STARD3. Rappelons ici que STARD3 est une protéine à motif FFAT ancrée dans la membrane des endosomes tardifs (Alpy et al., 2005, 2013). Cette technique permet de mettre en évidence la proximité entre deux protéines à une distance inférieure à ~ 30 nm, ce qui est compatible avec la présence de contacts entre organites différents. En effet, la distance entre les membranes décorées des protéines engagées dans un contact membranaire est le plus souvent inférieure à 30 nm (Holthuis and Levine, 2005; Levine and Loewen, 2006). Expérimentalement, la PLA se base sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt, ici MOSPD2 et STARD3, ainsi que d'anticorps secondaires associés à des oligonucléotides. Dans le cas où les anticorps secondaires sont assez proches ($< \sim 30$ nm), les oligonucléotides s'associent et servent de matrice pour une amplification d'ADN médiée par des enzymes spécifiques. Finalement, une sonde fluorescente capable d'interagir avec l'ADN amplifié est ajoutée. Ainsi, la présence de points fluorescents observables par microscopie confocale rend compte de la proximité entre les deux protéines à l'étude.

J'ai réalisé l'expérience dans trois lignées cellulaires : une lignée de cellules HeLa exprimant un ARN interférent contrôle ne ciblant aucun transcrite de la cellule (lignée contrôle ; shCtrl), une lignée déficiente pour les protéines VAP-A et VAP-B (shVAP-A β / shVAP-B β), et une lignée déficiente pour la protéine MOSPD2 (shMOSPD2 β) (Figure R2, A et B). Pour inhiber l'expression des protéines VAPs ou MOSPD2, j'ai transfecté de manière stable les cellules avec des vecteurs exprimant des ARN interférents dirigés contre les transcrits de VAP-A et VAP-B, ou contre le transcrite de MOSPD2 (Di Mattia et al., 2018a; Moffat et al., 2006).

Des signaux positifs dans la lignée contrôle indiquent la présence d'une proximité entre les protéines MOSPD2 et STARD3 endogènes (**Figure R2, C et D**). Ces données sont en accord avec l'interaction *in vitro* notée pour MOSPD2 et STARD3 (Di Mattia et al., 2018a) et suggèrent qu'elles interagissent au niveau de contacts membranaires.

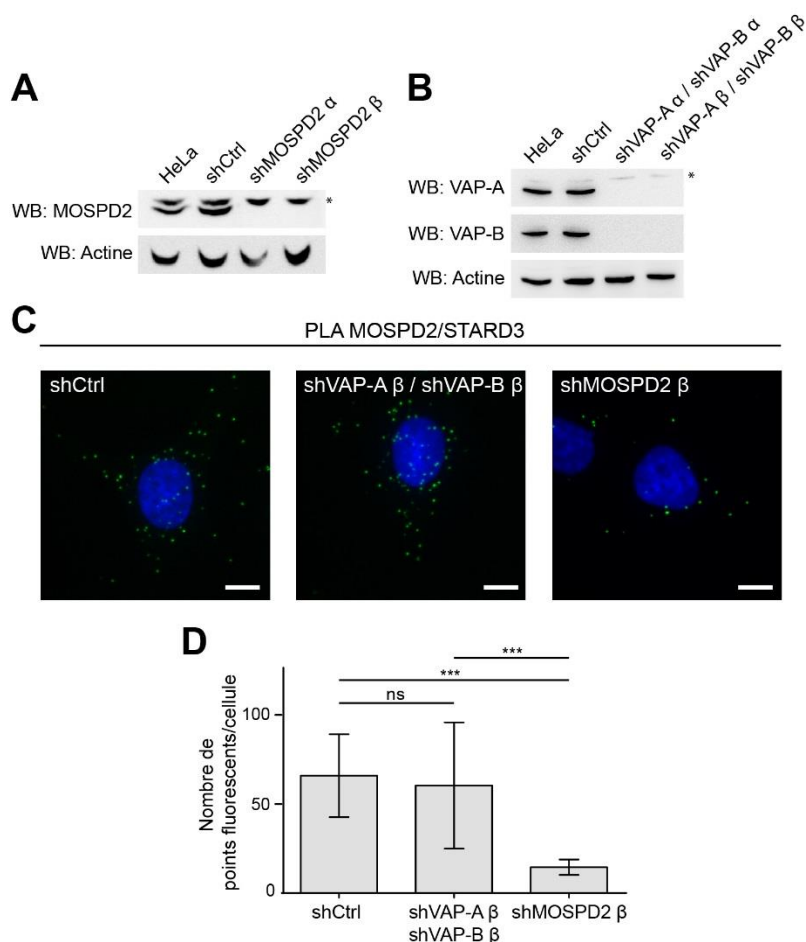


Figure R2 : MOSPD2 et STARD3 forment des complexes au niveau des SCM

A et B. Analyse par Western Blot de l'expression de MOSPD2 (**A**) ou VAP-A et VAP-B (**B**) dans des cellules HeLa (**A et B**), exprimant un ARN interférent contrôle (shCtrl; **A et B**), ou exprimant un ARN interférent dirigé contre le transcrite de MOSPD2 (shMOSPD2 α et shMOSPD2 β ; **A**) ou les transcrits de VAP-A et VAP-B (shVAP-A α / shVAP-B α et shVAP-A β / shVAP-B β ; **B**). * : signal aspécifique.

C. Expériences de PLA (points fluorescents verts) réalisés sur le couple MOSPD2/STARD3 dans les cellules shCtrl, shVAP-A β / shVAP-B β et shMOSPD2 β . Des anticorps contre les protéines endogènes MOSPD2 et STARD3 ont été utilisés. Les signaux PLA rendent compte de la proximité (<~30 nm) entre les protéines MOSPD2 et STARD3 dans les cellules. Barre d'échelle : 10 μ m.

D. Quantification du nombre de points fluorescents par cellule (nombre de cellules, 27, 28 et 29 pour les cellules shCtrl, shVAP-A β / shVAP-B β et shMOSPD2 β respectivement; à partir de deux expériences indépendantes). Test statistique : Kruskal-Wallis avec comparaison multiple de Dunn (***P<0.001).

De manière intéressante, la perte d'expression des protéines VAPs (shVAP-A β / shVAP-B β), n'impacte pas le signal PLA observé pour le couple MOSPD2/STARD3, ce qui étaye l'idée que MOSPD2 bâtit des contacts de manière indépendante des protéines VAPs. Au sein des cellules déficientes pour MOSPD2 (shMOSPD2 β), peu de signaux PLA ont été observés, ce qui confirme la spécificité de l'anticorps utilisé pour cette expérience (Figure R2, C et D). Ainsi, ces données suggèrent fortement que les protéines MOSPD2 et STARD3 endogènes interagissent au niveau des SCM RE-Endosome dans les cellules HeLa.

En perspective de cette étude, il serait intéressant d'étendre les données de PLA pour montrer l'existence de contacts membranaires endogènes entre le RE et d'autres organites arborant des partenaires connus de MOSPD2 tels que PTPIP51 (mitochondrie) et STARD11 (appareil de Golgi) (Di Mattia et al., 2018a). De plus, il a été montré que les protéines VAPs bâtissent des contacts entre le RE et d'autres organites, comme la membrane plasmique ou encore les peroxysomes, que je n'ai pas étudiés dans cet article (Amarilio et al., 2005; Costello et al., 2017, 2017; Kim et al., 2015). Ainsi, il serait intéressant de pousser la comparaison entre les VAPs et MOSPD2 en termes de partenaires et de contacts avec l'ensemble des organites cellulaires.

Section II : Etude du rôle de MOSPD2 a l'interface entre le réticulum endoplasmique et les gouttelettes lipidiques

1. Introduction

Nos travaux ont permis d'identifier une nouvelle protéine d'ancrage apparentée aux protéines VAPs, nommée MOSPD2. Similairement aux VAPs, MOSPD2 est ancrée dans la membrane du RE grâce à un domaine TM et possède un domaine MSP capable d'interagir avec les motifs FFAT de protéines partenaires présentes à la surface d'autres organites. Nous avons montré qu'à travers ses interactions MOSPD2 peut bâtir des contacts membranaires entre le RE et les endosomes, les mitochondries et l'appareil de Golgi (Di Mattia et al., 2018a). De façon remarquable, MOSPD2 se distingue des protéines VAPs par la présence d'un domaine additionnel, localisé à son extrémité N-terminale, nommé CRAL-TRIO (alias domaine SEC14) (Saito et al., 2007). Ce domaine de liaison de lipide est présent dans une dizaine de protéines humaines et est conservé au cours de l'évolution. Sa présence suggère que MOSPD2 possède une/des fonction(s) supplémentaire(s), comparativement aux VAPs. En effet, nous allons voir dans cette partie que MOSPD2 est également retrouvée au niveau des SCM entre le RE et les GL, et que cette localisation implique en partie la présence d'une hélice amphiphile présente à l'extrémité C-terminale du domaine CRAL-TRIO.

2. MOSPD2 possède une double localisation intracellulaire

Nous avons précédemment montré qu'au sein des cellules HeLa, MOSPD2 affiche une localisation subcellulaire réticulée caractéristique du RE, c'est-à-dire, couvrant l'intégralité du cytoplasme et associée à un enrichissement périnuclaire (Di Mattia et al., 2018a). De façon intrigante, ce type de localisation n'est observé que dans la moitié des cellules HeLa exprimant stablement la protéine de fusion GFP-MOSPD2 (HeLa/GFP-MOSPD2 ; **Figure R3, A**). En effet, dans l'autre moitié des cellules, en plus de cette localisation au RE, la protéine présente des enrichissements cytoplasmiques ponctiformes (**Figure R3, A**). Des expériences de co-marquages ont été réalisées avec un marqueur du RE, la protéine calnexine. Nous pouvons observer que la protéine GFP-MOSPD2 colocalise avec la calnexine dans les deux structures,

réticulaire et ponctiforme. Ceci indique que ces structures ponctiformes sont du RE (**Figure R3, B**). Dans les foyers cytoplasmiques, le marquage de la protéine GFP-MOSPD2 est soit sous forme d’anneau, soit sous forme de virgule, autour d’un disque non marqué. Ainsi, ces données suggèrent que MOSPD2 est enrichie dans des sous-domaines du RE en contact avec un autre organelle.

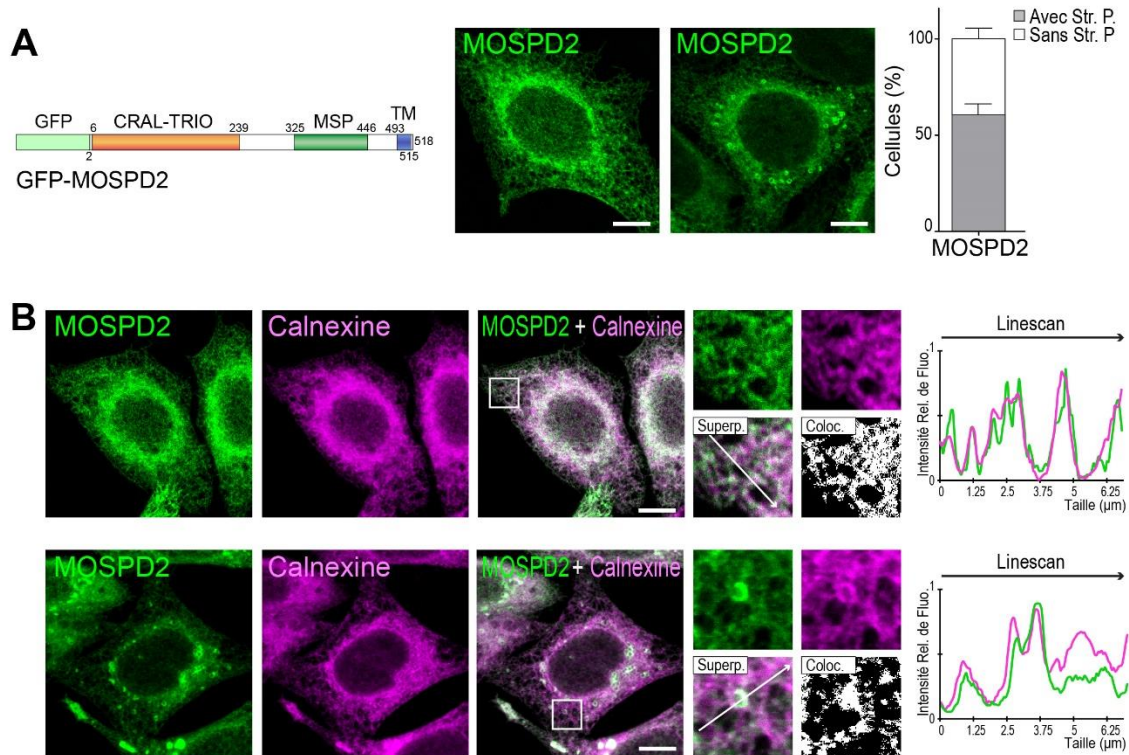


Figure R3 : MOSPD2 affiche une double localisation subcellulaire

A. La protéine GFP-MOSPD2 a une double localisation dans les cellules. Au sein d’une population de cellules HeLa/GFP-MOSPD2, dans la moitié des cas, GFP-MOSPD2 a une localisation réticulaire caractéristique du RE. Dans l’autre moitié, elle possède une localisation réticulaire associée à des enrichissements ponctiformes. La structure primaire de la protéine GFP-MOSPD2 est présentée à gauche de la figure. Str. P : Structure Ponctiforme.

B. Les cellules HeLa/GFP-MOSPD2 (vert) ont été traitées avec un anticorps anti-calnexine afin de marquer le RE (magenta). Les enrichissements ponctiformes positifs pour MOSPD2 colocalisent avec la Calnexine. Ceci montre que MOSPD2 est enrichie dans des sous-domaines du RE, probablement en contact avec un autre organelle cellulaire.

Complément d’information. Sur le graphique (A), moyennes et écarts types sont représentés. Nombre de cellules analysées : 300 (à partir de 3 expériences indépendantes). Les images à droite (B) correspondent à des agrandissements (3,5X) de la région délimitée par un carré blanc. L’image Superp. correspond à la superposition des canaux vert et magenta. L’image Coloc. représente un masque de colocalisation sur lequel les pixels où les canaux vert et magenta colocalisent sont affichés en blanc. Le graphique Linescan (B) correspond à l’analyse des intensités de fluorescence des canaux vert et magenta le long de la flèche blanche représentée sur l’image Superp. Barre d’échelle : 10 µm.

3. MOSPD2 est localisée dans des contacts entre le RE et les GL

Afin de déterminer la nature des structures cerclées par MOSPD2, j'ai réalisé des expériences de co-marquage entre MOSPD2 et des marqueurs de différents organites cellulaires. Des anticorps anti-CD63, anti-EEA1, anti-OPA-1, et anti-GM130 ont été utilisés pour marquer respectivement les endosomes tardifs, les endosomes précoces, les mitochondries ainsi que l'appareil de Golgi dans les cellules HeLa/GFP-MOSPD2 (Figure R4).

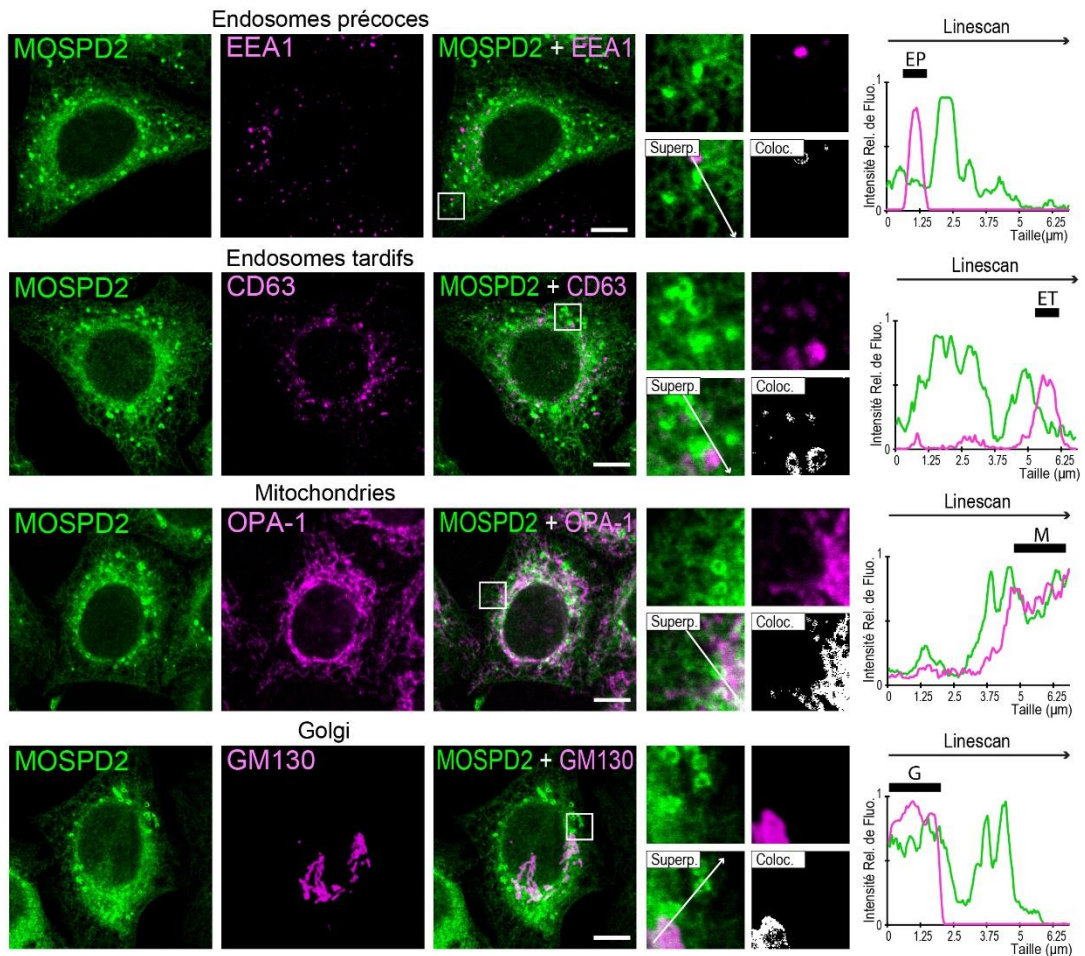


Figure R4 : MOSPD2 colocalise partiellement avec les endosomes, les mitochondries et l'appareil de Golgi

Les cellules HeLa/GFP-MOSPD2 (vert) ont été traitées avec un anticorps anti-EEA1, anti-CD63, anti-OPA-1 ou anti-GM130 afin de marquer respectivement les endosomes précoces (EP; magenta), les endosomes tardifs (ET; magenta), les mitochondries (M; magenta) ou l'appareil de Golgi (G; magenta). MOSPD2 colocalise partiellement avec ces organites cellulaires.

Complément d'information. Les images à droite correspondent à des agrandissements (3,5X) de la région délimitée par un carré blanc. L'image Superp. correspond à la superposition des canaux vert et magenta. L'image Coloc. représente un masque de colocalisation sur lequel les pixels où les canaux vert et magenta colocalisent sont affichés en blanc. Le graphique Linescan correspond à l'analyse des intensités de fluorescence des canaux vert et magenta le long de la flèche blanche représentée sur l'image Superp. Les rectangles noirs sur les graphiques Linescan indiquent la position des organites. Barre d'échelle : 10 µm.

Bien que la protéine GFP-MOSPD2 colocalise partiellement avec ces différents organites dans les cellules, aucun d'entre eux n'est spécifiquement entouré par les structures ponctiformes positives pour GFP-MOSPD2. Ces résultats montrent que l'identité des organites cerclés par MOSPD2 n'est pas endosomale, mitochondriale ou golgienne. Ensuite, j'ai marqué des cellules HeLa exprimant la protéine mCherry-MOSPD2 avec un marqueur des GL, le Bodipy 493/503. Dans ces cellules, les structures sous forme d'anneau ou de virgule positives pour mCherry-MOSPD2 sont associées aux GL (**Figure R5, A**). Ceci suggère que MOSPD2 est spécifiquement enrichie dans des tubules du RE en contact avec les GL. Afin de confirmer ces résultats, la formation des GL a été induite par traitement à l'acide oléique. L'acide oléique est un acide gras monoinsaturé à dix-huit carbones. Lorsque les cellules sont cultivées avec un milieu supplémenté en acide oléique, ce dernier est stocké sous forme de triglycérides dans les GL ; ceci engendre une augmentation de la taille et du nombre de GL. Des cellules HeLa exprimant la protéine mCherry-MOSPD2 ont été traitées avec de l'acide oléique et les GL ont été marquées au Bodipy 493/503. En comparant les cellules non traitées (**Figure R5, A**) et traitées (**Figure R5, B**), une augmentation globale de la taille et du nombre des GL est observée, montrant que le traitement a été efficace. Dans les cellules traitées, le marquage MOSPD2 suit le marquage Bodipy 493/503 ; on note l'accumulation de structures ponctiformes cerclant les GL (**Figure R5, B**). Alors que dans des cellules non traitées, GFP-MOSPD2 est présente dans des structures ponctiformes dans une cellule sur deux, dans les cellules traitées, la protéine affiche une localisation réticulaire associée à des enrichissements ponctiformes dans toutes les cellules. J'ai réalisé des expériences de co-marquage supplémentaires avec un anticorps dirigé contre un marqueur de GL, la périlipine3/TIP-47 (tail-interacting protein of 47 kD). Ces expériences ont été réalisées dans des cellules HeLa/GFP-MOSPD2 traitées à l'acide oléique. La protéine GFP-MOSPD2 est recrutée au niveau des GL positives pour TIP-47 (**Figure R5, C et D**). De façon intéressante, d'après les profils de marquages obtenus en microscopie confocale classique et en microscopie à haute résolution STED (stimulation emission depletion), la protéine GFP-MOSPD2 est enrichie autour des GL au niveau de régions différentes de celles marquées par TIP-47 (**Figure R5, C et D**). En d'autres termes, les parties marquées par GFP-MOSPD2 ne sont pas/peu positives pour TIP-47 et inversement. Ensemble, ces résultats suggèrent que MOSPD2 est recrutée au niveau des contacts RE-GL et que TIP-47 n'est pas/peu présente à l'interface de ces contacts.

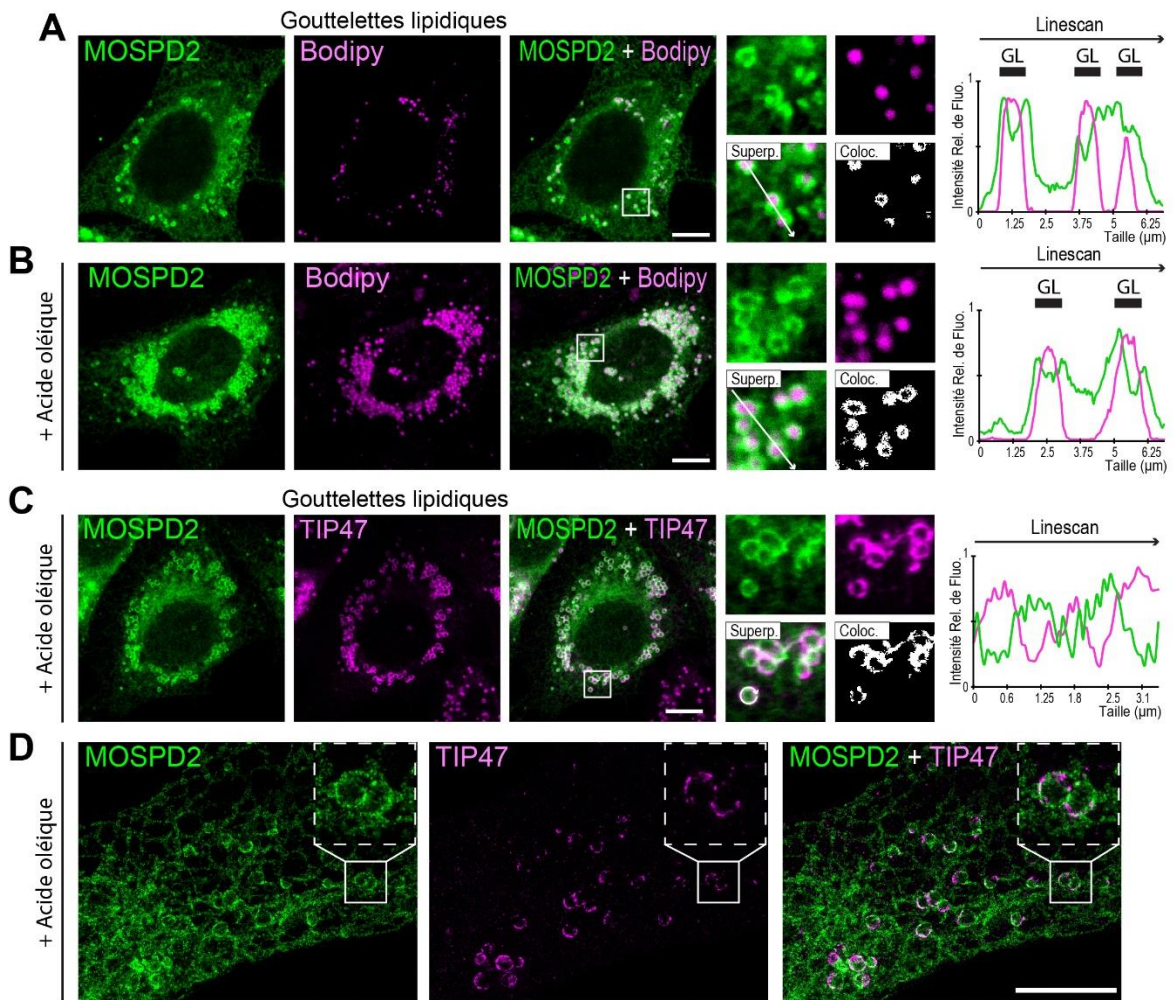


Figure R5 : MOSPD2 est spécifiquement enrichie autour des GL

A et B. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un vecteur exprimant la protéine mCherry-MOSPD2 (vert). Des cellules non traitées (**A**) ou traitées à l'acide oléique (400 μ M) pendant 16 heures (**B**) sont représentées. Le traitement à l'acide oléique permet d'augmenter la taille et le nombre des gouttelettes lipidiques (GL) dans les cellules. Ces dernières ont été marquées avec du Bodipy (magenta). MOSPD2 est enrichie dans des sous-domaines du RE entourant spécifiquement les GL.

C et D. Les cellules HeLa/GFP-MOSPD2 (vert) ont été traitées avec de l'acide oléique (400 μ M) pendant 16 heures et les GL ont été marquées dans ces cellules avec un anticorps anti-TIP47 (magenta). Les cellules ont été observées en microscopie confocale classique (**C**) et en microscopie à haute résolution STED (**D**). La protéine GFP-MOSPD2 est recrutée au niveau des GL positives pour TIP-47. Nous pouvons noter que GFP-MOSPD2 est enrichie autour des GL au niveau de régions différentes de celles marquées par TIP-47.

Complément d'information. Les images à droite (**A-C**) correspondent à des agrandissements (3,5X) de la région délimitée par un carré blanc. L'image Superp. correspond à la superposition des canaux vert et magenta. L'image Coloc. représente un masque de colocalisation sur lequel les pixels où les canaux vert et magenta colocalisent sont affichés en blanc. Le graphique Linescan (**A-C**) correspond à l'analyse des intensités de fluorescence des canaux vert et magenta le long de la flèche blanche représentée sur l'image Superp. Dans la partie C de la figure, la flèche suit le pourtour de la GL située en bas à gauche de l'image Superp. Les rectangles noirs sur les graphiques Linescan indiquent la position des GL. Barre d'échelle : **A-C** : 10 μ m ; **D** : 5 μ m.

Afin d'appréhender la dynamique de localisation de la protéine MOSPD2, nous avons réalisé des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment [ou fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)] dans des cellules HeLa/GFP-MOSPD2. Les cellules ont été traitées à l'acide oléique afin d'induire la formation des GL, et ces dernières ont été marquées avec la sonde LipidTox. Cette technique utilise un flash lumineux intense et bref, obtenu à partir d'un laser, permettant d'éteindre la fluorescence émise par une protéine fluorescente, telle que la GFP, dans une zone restreinte d'un échantillon, et ce, de manière irréversible. Le recouvrement de la fluorescence est dû à la redistribution des molécules éteintes et fluorescentes entre la zone blanchie et le reste de la cellule. Un tel recouvrement traduit l'existence d'une population dynamique de molécules au sein de l'échantillon. Dans notre cas, les zones photoblanchies correspondaient aux enrichissements ponctiformes positifs pour la protéine GFP-MOSPD2 cerclant les GL marqués par le LipidTox (Figure R6). Plus précisément, nous nous sommes concentrés sur des zones relativement immobiles afin d'éviter les inexactitudes de détection résultant des mouvements rapides des GL. Cinq secondes après photoblanchiment, un recouvrement partiel de la fluorescence est observé autour des GL. La fluorescence de GFP-MOSPD2 retourne au niveau initial environ 30 secondes après photoblanchiment (Figure R6). Ces résultats préliminaires montrent que la protéine MOSPD2 est en équilibre entre les régions réticulées du RE et celles entourant les GL. Ainsi, MOSPD2 est mobile dans la membrane du RE et est dynamiquement recrutée au niveau des contacts RE-GL.

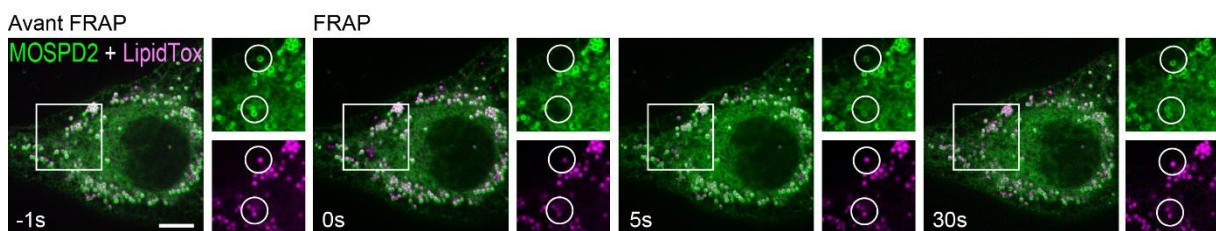


Figure R6 : MOSPD2 est une protéine dynamique

Expérience de FRAP réalisée sur les cellules HeLa/GFP-MOSPD2 (vert). Avant l'expérience, ces cellules ont été traitées à l'acide oléique (400µM) pendant 16 heures. Les GL ont été marquées avec du LipidTox (magenta). Une image prise 1 seconde (s) avant l'expérience de FRAP (Avant FRAP) est présentée. Des images au moment du photoblanchiment (0 s; FRAP), et 5 s et 30 s après photoblanchiment sont présentées. Les agrandissements (1,5X) correspondent à la région encadrée en blanc. Les zones cerclées en blanc sont les régions photoblanchies. MOSPD2 est enrichie dans des sous-domaines du RE cerclant les GL. Ces expériences de FRAP montrent que le recrutement de MOSPD2 autour des GL est dynamique. Barre d'échelle 10 µm.

Par la suite, afin de gagner en résolution pour montrer l'enrichissement de MOSPD2 au niveau de sous-domaines du RE en contact avec les GL, des expériences de microscopie corrélative [ou correlative light-electron microscopy (CLEM)] ont été réalisées. Cette technique permet d'associer des informations de microscopie optique à des informations ultrastructurales à haute résolution (de l'ordre du nm) obtenues par microscopie électronique. Elle apparaît adaptée pour l'étude des contacts membranaires (Alpy et al., 2013). Expérimentalement, des cellules HeLa/GFP-MOSPD2 ont été cultivées sur des saphirs, fixées par congélation à haute pression et substituées à froid dans une résine de type lowicryl. Des fines sections de cellules ont ensuite été préparées (200 nm) pour une observation en imagerie optique puis en tomographie électronique (TE). Finalement, une étape de traitement d'images a permis de corréler les mêmes informations acquises par fluorescence et par TE. Les résultats présentés [Figure R7](#) montrent que les enrichissements sous forme d'anneau ou de virgule positifs pour la protéine GFP-MOSPD2 correspondent à des tubules de RE en contact avec les GL. Ainsi, ces résultats préliminaires de microscopie corrélative renforcent le fait que MOSPD2 est localisée dans la membrane du RE en contact avec les GL.

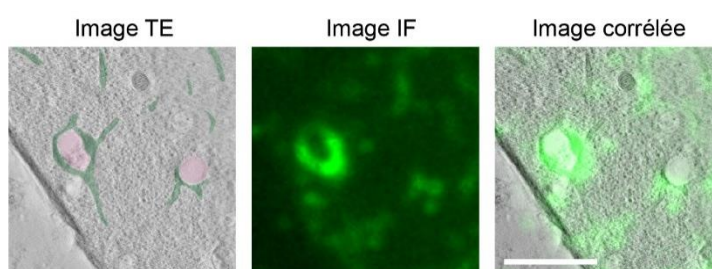


Figure R7 : MOSPD2 est présente au niveau des SCM RE-GL

Des expériences de CLEM ont été réalisées sur les cellules HeLa/GFP-MOSPD2. Sur l'image de tomographie électronique (Image TE) des fausses couleurs ont été attribuées au RE (vert) et aux GL (magenta). Les structures positives pour MOSPD2 en forme d'anneau ou en forme de virgule observables sur l'image d'immunofluorescence (Image IF) correspondent à des parties du RE en contact avec les GL. Barre d'échelle : 2 μm .

En conclusion de cette partie, nous avons pu déterminer la nature des organites cerclés par MOSPD2 au sein du cytoplasme. En effet, nous avons montré que MOSPD2 est recrutée de manière dynamique au niveau des contacts entre le RE et les GL.

4. MOSPD2 est recrutée au niveau des contacts RE-GL de manière indépendante de sa capacité à interagir avec les motifs FFAT

La protéine MOSPD2 possède une fonction d'ancrage aux motifs FFAT d'autres protéines. La question se posait de savoir si l'enrichissement de MOSPD2 au niveau des contacts RE-GL était lié à la présence d'une(de) protéine(s) des GL présentant un motif FFAT. Pour répondre à cela, des cellules HeLa/GFP-MOSPD2 RD/LD ont été générées et la localisation de la protéine GFP-MOSPD2 RD/LD a été analysée grâce à la fluorescence naturelle de la GFP. En effet, nous avons précédemment montré que la substitution des résidus R404 et L404 (situés dans le domaine MSP de la protéine MOSPD2) en résidu D (mutations RD/LD) empêche la liaison aux motifs FFAT (Di Mattia et al., 2018a). De façon intéressante, la protéine mutante se comporte comme la protéine sauvage (Figure R8, A et B). À l'instar de MOSPD2, MOSPD2 RD/LD est retrouvée dans des structures sous formes d'anneau ou de virgule cerclant les GL marquées par la sonde Bodipy 493/503 (Figure R8, C et D). Ces données montrent que la double mutation RD/LD n'empêche pas le recrutement de la protéine dans des tubules de RE autour des GL. Nous pouvons en conclure que MOSPD2 est enrichie au niveau des contacts RE-GL de manière indépendante de sa capacité à interagir avec les protéines à motif FFAT.

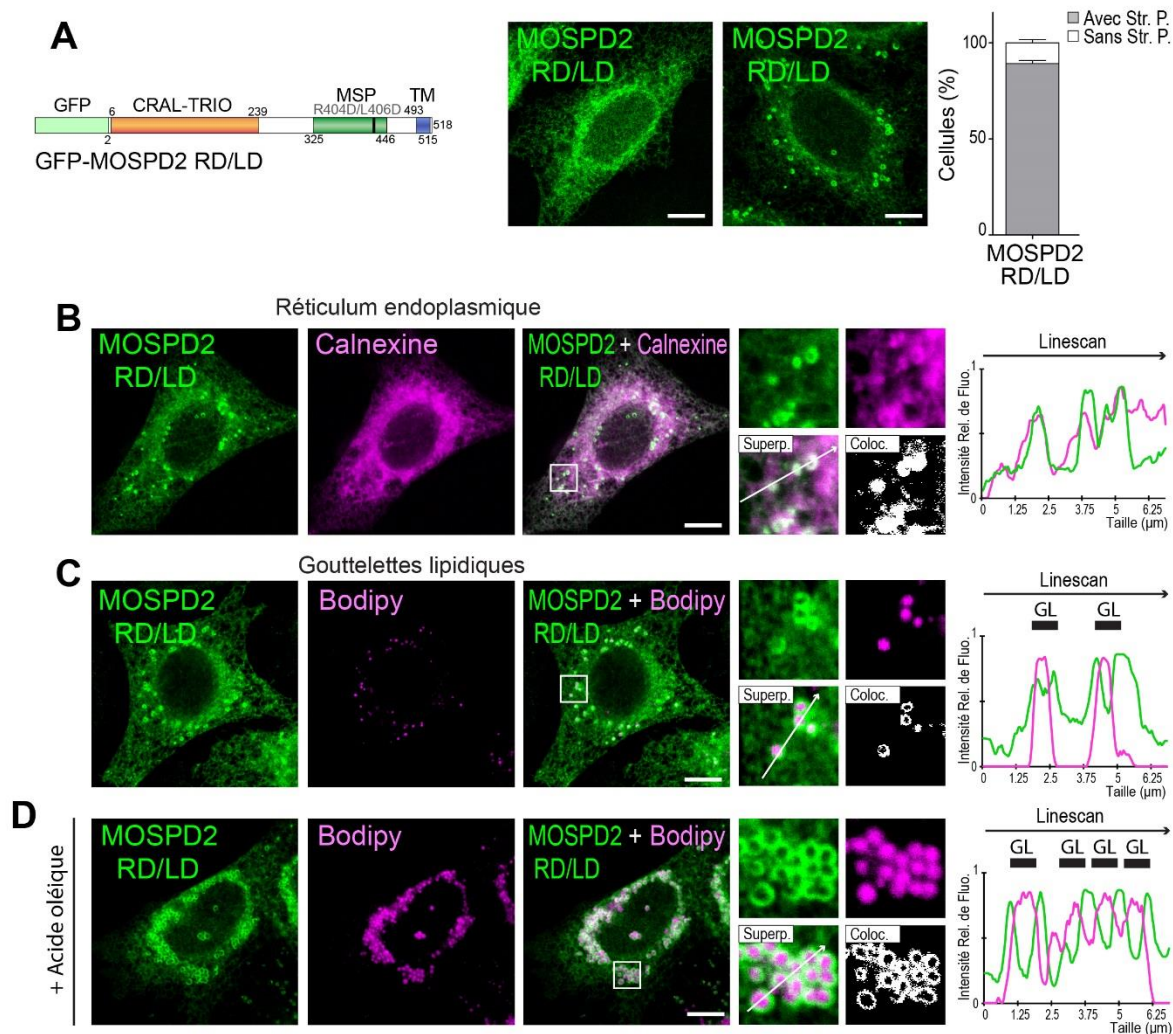


Figure R8 : MOSPD2 est spécifiquement enrichie autour des GL indépendamment de sa capacité à interagir avec les motifs FFAT

A. De manière similaire à la protéine GFP-MOSPD2, la protéine GFP-MOSPD2 RD/LD (vert) a une double localisation dans les cellules. Au sein d'une population de cellules HeLa/GFP-MOSPD2 RD/LD, GFP-MOSPD2 RD/LD affiche dans ~10% des cas une localisation réticulaire caractéristique du RE. Dans les autres cellules, elle possède une localisation réticulaire associée à des enrichissements ponctiformes. La structure primaire de la protéine GFP-MOSPD2 RD/LD est présentée à gauche de la figure. Str. P : Structure Ponctiforme.

B. Les cellules HeLa/GFP-MOSPD2 RD/LD (vert) ont été traitées avec un anticorps anti-calnexine afin de marquer le RE (magenta). Les enrichissements ponctiformes positifs pour MOSPD2 RD/LD colocalisent avec la calnexine. MOSPD2 RD/LD est une protéine du RE.

C et D. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un vecteur exprimant la protéine mCherry-MOSPD2 RD/LD (vert). Des cellules non traitées (**C**) ou traitées à l'acide oléique (400 µM) pendant 16 heures (**D**) sont représentées. Les gouttelettes lipidiques (GL) ont été marquées avec du Bodipy (magenta). Similairement à MOSPD2, MOSPD2 RD/LD est enrichie dans des sous-domaines du RE entourant les GL.

Complément d'information. Sur le graphique (A), moyennes et écarts types sont représentés. Nombre de cellules analysées : 337 (à partir de 3 expériences indépendantes). Les images à droite (B-D) correspondent à des agrandissements (3,5X) de la région délimitée par un carré blanc. L'image Superp. correspond à la superposition des canaux vert et magenta. L'image Coloc. représente un masque de colocalisation sur lequel les pixels où les canaux vert et magenta colocalisent sont affichés en blanc. Le graphique Linescan (B-D) correspond à l'analyse des intensités de fluorescence des canaux vert et magenta le long de la flèche blanche représentée sur l'image Superp. Les rectangles noirs sur les graphiques Linescan indiquent la position des GL. Barre d'échelle : 10 µm.

5. Le recrutement de MOSPD2 au niveau des contacts RE-GL dépend à la fois de la présence de l'hélice amphiphile du domaine CRAL-TRIO et de l'ancrage de la protéine dans la membrane du RE

Notre objectif dans la suite de cette étude a été de comprendre par quel mécanisme MOSPD2 est recrutée au niveau des contacts RE-GL. Rappelons ici que la protéine MOSPD2 est composée de trois domaines : 1) un domaine CRAL-TRIO N-terminal, 2) un domaine MSP central ainsi que 3) un domaine TM C-terminal. La stratégie mise en œuvre a été d'exprimer dans les cellules HeLa des protéines MOSPD2 mutées pour ses différents domaines, ou les domaines isolés de la protéine en fusion avec la GFP, et de caractériser leur localisation subcellulaire. La formation des GL a été induite par traitement à l'acide oléique. Comme précédemment observé, la protéine GFP-MOSPD2 présente des enrichissements cytoplasmiques ponctiformes qui correspondent à des sous-domaines du RE en contact avec les GL ([Figure R9, A et D](#)). La protéine GFP-MOSPD2 dépourvue de son domaine MSP (GFP-MOSPD2 Δ MSP) a la même localisation ([Figure R9, A et D](#)). Cette donnée nous indique que le domaine MSP n'est pas requis pour l'adressage de la protéine MOSPD2 au niveau des contacts RE-GL. Concernant la protéine GFP-MOSPD2 sans son domaine CRAL-TRIO (GFP-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO), elle arbore dans toutes les cellules une localisation réticulaire caractéristique du RE ; cependant, aucun enrichissement autour des GL n'est présent dans les cellules ([Figure R9, A et D](#)). Ce résultat montre que le domaine CRAL-TRIO de MOSPD2 est nécessaire pour le recrutement autour des GL. En revanche, ce domaine n'est pas suffisant pour remplir cette fonction. En effet, le domaine CRAL-TRIO isolé en fusion avec la GFP (GFP-MOSPD2 CRAL-TRIO) adopte une localisation diffuse dans l'ensemble de la cellule ([Figure R9, A et D](#)). Par la suite, j'ai caractérisé la localisation de la protéine GFP-MOSPD2 dépourvue de son domaine TM (GFP-MOSPD2 Δ TM). Cette dernière apparaît diffuse dans le cytosol, ce qui montre que le domaine TM est nécessaire pour ancrer la protéine dans la membrane du RE ; données en accord avec nos résultats publiés (Di Mattia et al., 2018a). En revanche, cette protéine n'est pas recrutée de manière prépondérante autour des GL ([Figure R9, A et D](#)). D'autre part, j'ai montré que le domaine TM est suffisant pour l'ancrage de la protéine MOSPD2 dans le RE, mais ne permet pas à lui seul de la recruter au contact des GL. En effet, la protéine composée du domaine TM de MOSPD2 en fusion avec la GFP (GFP-MOSPD2 TM) possède une localisation réticulaire typique du RE sans la présence d'enrichissements ponctiformes ([Figure R9, A et D](#)).

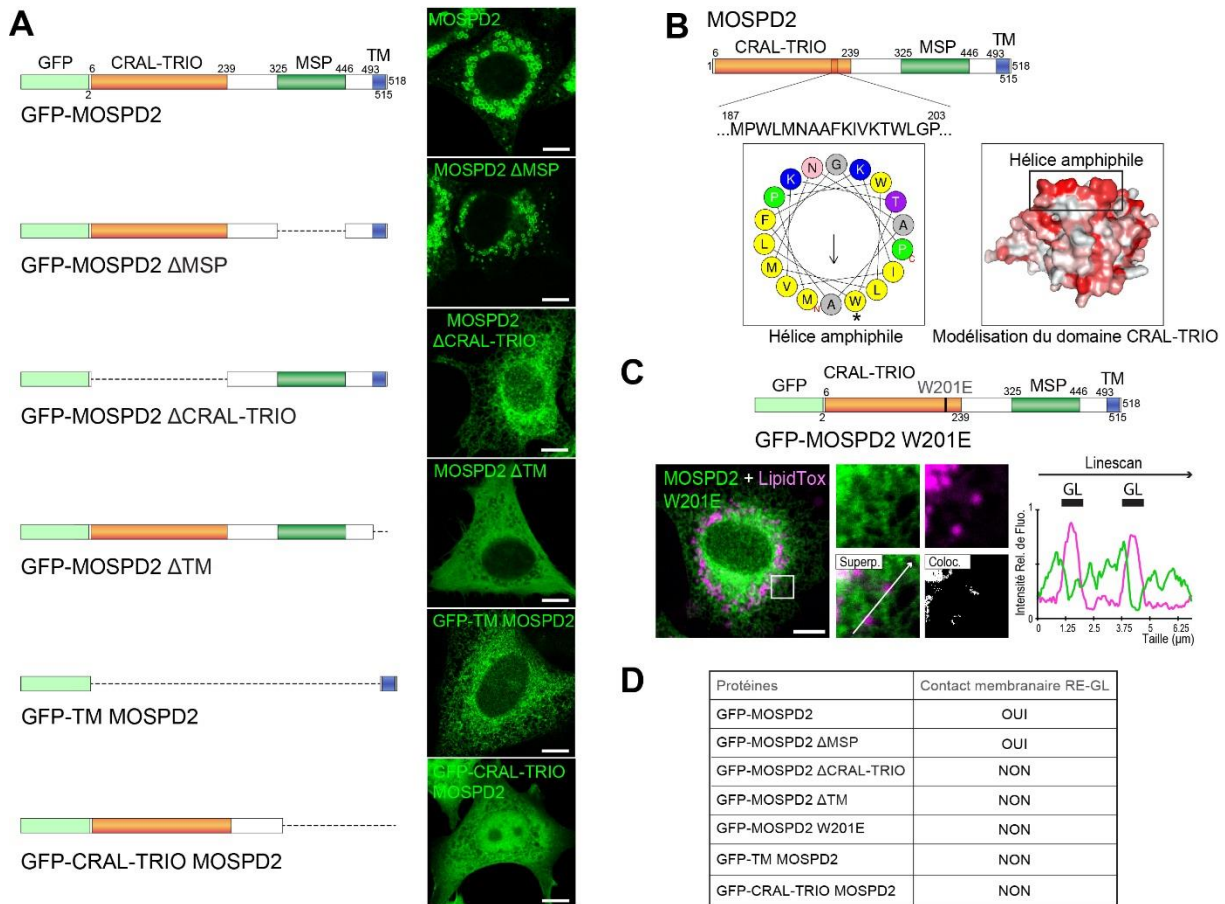


Figure R9 : L'hélice amphiphile du domaine CRAL-TRIO et l'ancrage dans la membrane du RE sont nécessaires au recrutement de MOSPD2 aux contacts RE-GL

A. Des cellules HeLa ont été transfectées avec des vecteurs exprimant les protéines GFP-MOSPD2, GFP-MOSPD2 ΔMSP, ΔCRAL-TRIO, ΔTM, GFP-TM MOSPD2 ou GFP-CRAL-TRIO MOSPD2, puis traitées à l'acide oléique (400 µM) pendant 16 heures. La structure primaire de ces protéines ainsi que leur localisation subcellulaire sont présentées. Seules les protéines GFP-MOSPD2 et GFP-MOSPD2 ΔMSP présentent des enrichissements ponctiformes.

B. MOSPD2 possède une hélice amphiphile à l'extrémité C-terminale du domaine CRAL-TRIO. L'astérisque marque le résidu tryptophane (W) que nous avons muté. La structure du domaine CRAL-TRIO de MOSPD2 a été modélisée grâce au serveur SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018). Une représentation de la surface du domaine est illustrée. Les régions hydrophobes sont présentées en rouge, et la localisation de l'hélice amphiphile est spécifiée.

C. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un vecteur exprimant la protéine GFP-MOSPD2 W201E, portant une mutation ponctuelle W en acide glutamique (E). La structure primaire de cette protéine est présentée. Les cellules ont été traitées à l'acide oléique (400 µM) pendant 16 heures et les gouttelettes lipidiques (GL) ont été marquées grâce au LipidTox. Aucun enrichissement de la protéine n'est observé autour des GL.

D. Tableau récapitulatif des localisations subcellulaires observées pour les différentes protéines.

Complément d'information. Les images à droite (C) correspondent à des agrandissements (3,5X) de la région délimitée par un carré blanc. L'image Superp. correspond à la superposition des canaux vert et magenta. L'image Coloc. représente un masque de colocalisation sur lequel les pixels où les canaux vert et magenta colocalisent sont affichés en blanc. Le graphique Linescan (C) correspond à l'analyse des intensités de fluorescence des canaux vert et magenta le long de la flèche blanche représentée sur l'image Superp. Les rectangles noirs sur le graphique Linescan indique la position des GL. Barre d'échelle : 10 µm.

Ensemble, ces résultats montrent que deux domaines de MOSPD2, le domaine CRAL-TRIO et le domaine TM, sont nécessaires pour que MOSPD2 soit recrutée à la surface des GL. D'un point de vue mécanistique, une hypothèse serait que l'ancrage de la protéine dans la membrane du RE est requis pour permettre au domaine CRAL-TRIO de reconnaître la surface des GL.

Dans un premier temps, nous avons recherché par quel mécanisme le domaine CRAL-TRIO pourrait reconnaître la surface des GL. Etant donné qu'il a été démontré dans des précédents travaux que les hélices amphiphiles permettent le recrutement de protéines à la surface des GL, nous avons analysé le domaine CRAL-TRIO pour la présence d'une telle structure (Datta et al., 2019; Prévost et al., 2018). Pour cela, une étude *in silico* a été menée. Etant donné que la structure cristallographique du domaine CRAL-TRIO de MOSPD2 n'a jamais été résolue, la structure secondaire du domaine a été modélisée informatiquement et la recherche du caractère amphiphile des hélices a été faite grâce au logiciel Heliquet (Gautier et al., 2008). Nous avons pu identifier une hélice amphiphile en position C-terminale du domaine CRAL-TRIO (Figure R9, B). Sur la modélisation de la structure tertiaire du domaine CRAL-TRIO, cette hélice est positionnée en surface du domaine et sa face hydrophobe est exposée vers le milieu extérieur. Un tel positionnement est compatible avec le fait que l'hélice amphiphile soit capable d'interagir avec la membrane des GL (Figure R9, B). Afin de caractériser son implication *in cellulo*, des cellules HeLa ont été transfectées avec un vecteur exprimant la protéine GFP-MOSPD2 W201E et traitées à l'acide oléique. Dans cette protéine, le tryptophane (W) 201 (un résidu non-polaire localisé sur la face hydrophobe de l'hélice), a été muté en acide glutamique (E) (un résidu polaire chargé négativement). Une telle substitution perturbe les propriétés physico-chimiques de l'hélice. Dans toutes les cellules, GFP-MOSPD2 W201E affiche une localisation typique du RE et n'est jamais recrutée autour des GL (Figure R9, C). Ainsi, la substitution du résidu W201 en E empêche la protéine de se lier à la surface des GL. Ces données suggèrent que MOSPD2 est capable de reconnaître la surface des GL de manière dépendante de l'hélice amphiphile du domaine CRAL-TRIO.

Dans un second temps, nous avons vérifié que l'ancrage de MOSPD2 dans le RE est requis pour permettre son recrutement à la surface des GL, mais que la nature du domaine TM de MOSPD2 n'est pas importante ce recrutement. Pour cela, le domaine TM de la protéine a été remplacé soit par, i) le motif de prénylation CAAX (C=cystéine, A=acide aminé aliphatique, X=n'importe quel acide aminé) de la GTPase Ras impliqué dans l'adressage de cette dernière à la membrane plasmique des cellules, et par ii) le domaine TM de la protéine phosphatase SAC1,

constituant un autre domaine TM spécifique du RE. La localisation des protéines chimériques GFP-MOSPD2 CAAX et GFP-MOSPD2 SAC1 a été analysée dans des cellules HeLa dans lesquelles la formation des GL a été induite par traitement à l'acide oléique. La substitution du domaine TM de MOSPD2 par le domaine CAAX de Ras engendre une relocalisation de la protéine au niveau de la membrane plasmique (**Figure R10, A**). Dans cette condition, aucune colocalisation de la protéine avec les GL n'est observée, suggérant que cette dernière n'est pas recrutée au niveau des contacts RE-GL (**Figure R10, A et C**). Ces résultats soutiennent le fait que MOSPD2 n'est pas capable de reconnaître la surface des GL lorsqu'elle est ancrée dans une autre membrane que celle du RE. Ensuite, la localisation de GFP-MOSPD2 SAC1 a été analysée. Dans les cellules, cette protéine possède une localisation semblable à celle observée pour la protéine GFP-MOSPD2 sauvage. En effet, elle arbore une localisation caractéristique du RE, associée à des enrichissements entourant spécifiquement les GL marquées par la sonde Nile Red, suggérant sa présence à l'interface des contacts RE-GL (**Figure R10, B et C**). Ainsi, ces résultats corroborent les données précédentes, à savoir que l'ancrage de la protéine MOSPD2 dans le RE est nécessaire pour permettre son recrutement aux contacts RE-GL.

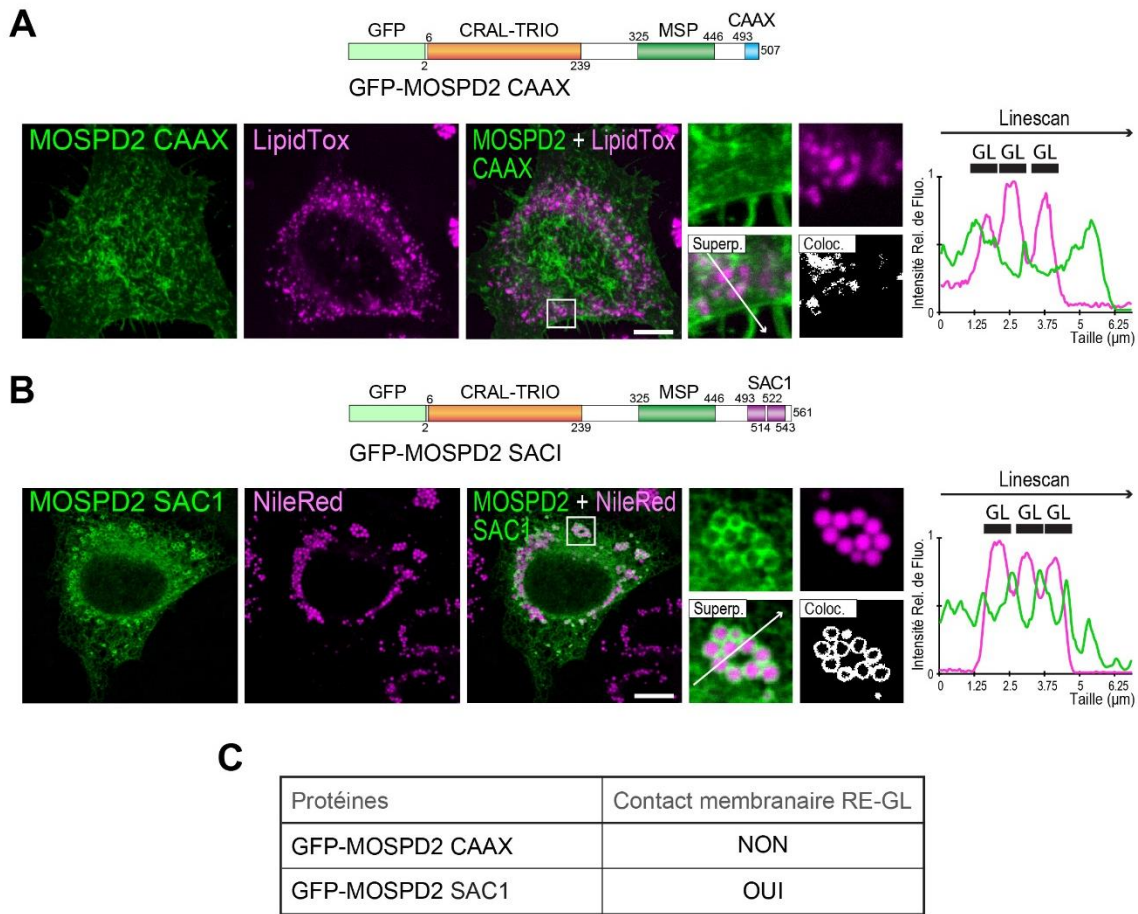


Figure R10 : L'ancrage de la protéine MOSPD2 dans le RE est nécessaire pour permettre son recrutement aux contacts RE-GL.

A et B. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un vecteur exprimant la protéine chimérique GFP-MOSPD2 CAAX (**A**; vert) ou la protéine chimérique GFP-MOSPD2 SAC1 (**B**; vert). Ces cellules ont été traitées à l'acide oléique (400 µM) pendant 16 heures et les gouttelettes lipidiques (GL) ont été marquées avec du LipidTox (**A**; magenta) ou du Nile Red (**B**; magenta). La structure primaire de chacune des protéines est présentée. Le domaine CAAX de la protéine Ras (en bleu clair) permet de recruter la protéine au niveau de la membrane plasmique. La protéine GFP-MOSPD2 CAAX n'est pas enrichie autour des GL (**A**). Le domaine TM de la protéine SAC1 (en violet) est quant à lui spécifique du RE. La protéine GFP-MOSPD2 SAC1 arbore une localisation réticulaire typique du RE associée à des enrichissements autour des GL.

D. Tableau récapitulatif des localisations subcellulaires observées pour les différentes protéines. Seule la protéine GFP-MOSPD2 SAC1 est enrichie dans des sous-domaines du RE en contact avec les GL.

*Complément d'information. Une projection en z est présentée sur une épaisseur de 2 µm (**A**). Les images à droite (**A-B**) correspondent à des agrandissements (3,5X) de la région délimitée par un carré blanc. L'image Superp. correspond à la superposition des canaux vert et magenta. L'image Coloc. représente un masque de colocalisation sur lequel les pixels où les canaux vert et magenta colocalisent sont affichés en blanc. Le graphique Linescan (**A-B**) correspond à l'analyse des intensités de fluorescence des canaux vert et magenta le long de la flèche blanche représentée sur l'image Superp. Les rectangles noirs sur les graphiques Linescan indiquent la position des GL. Barre d'échelle : 10 µm.*

En conclusion de cette partie, j'ai pu montrer que l'hélice amphiphile du domaine CRAL-TRIO et l'ancrage dans la membrane du RE sont nécessaires pour permettre le recrutement de MOSPD2 aux contacts membranaires entre le RE et les GL.

6. MOSPD2 est associée aux GL précoces et matures

Nous nous sommes interrogés sur la fonction de MOSPD2 dans le métabolisme des GL. Pour savoir si l'association entre MOSPD2 et les GL se faisait à une étape particulière du cycle de la vie des GL, j'ai réalisé des expériences d'imagerie sur cellules vivantes. Des cellules ne présentant pas d'accumulations visibles de GFP-MOSPD2 autour des GL positives pour le LipidTox ont été choisies. Au temps 0, ces cellules ont été mises en présence d'acide oléique afin d'induire la formation des GL, et la dynamique de la protéine GFP-MOSPD2 a été suivie pendant 15 heures ; les résultats présentés [Figure R11](#) sont représentatifs de la population de cellules analysées. Après 15 heures de traitement, on observe une relocalisation de la protéine GFP-MOSPD2 autour des GL ([Figure R11, A](#)), montrant que l'induction de la formation des GL par traitement à l'acide oléique corrèle avec le recrutement de la protéine au niveau des contacts membranaires RE-GL.

De manière intéressante, l'analyse de la dynamique de GFP-MOSPD2 au court du temps a révélé que cette protéine s'accumule initialement dans des sous-domaines du RE correspondant aux sites de nucléation des GL ; rappelons que la naissance des GL a lieu dans la membrane du RE (Choudhary et al., 2011; Kassin et al., 2013). Sur les images présentées [Figure R11, B](#), le signal GFP-MOSPD2 entoure deux GL marquées par le LipidTox (indiquées par un cercle jaune) au temps 0 (le temps 0 en [B](#) n'est pas le même qu'en [A](#), il représente simplement un repère initial de temps). Après 1 minute (min) et 30 secondes (s), nous pouvons observer une accumulation de la protéine dans une autre région du RE (indiquée par une flèche jaune). Ce site n'est pas positif pour le LipidTox. Il est à noter ici que lors des étapes précoces de la formation des GL, la masse de lipides neutres qu'elles contiennent est trop faible pour pouvoir être détectée avec des sondes du type LipidTox (mais aussi Bodipy 493/503 ou Nile Red) (Wang et al., 2016a; Xu et al., 2018). Par conséquent, le LipidTox (mais aussi le Bodipy 493/503 ou le Nile Red) est considéré comme un marqueur des GL matures. Le fait que GFP-

MOSPD2 s'enrichisse dans une région du RE non marquée par le LipidTox suggère que cette zone est le siège de la naissance d'une GL. Au fur et à mesure du temps, on observe une augmentation de l'intensité de fluorescence de la protéine GFP-MOSPD2 (dans la région indiquée par une flèche jaune), ce qui montre qu'il existe une augmentation de la quantité de cette dernière. A partir de 16 min et 30 s nous pouvons observer une colocalisation partielle entre l'enrichissement positif pour GFP-MOSPD2 et le LipidTox, ce qui montre que cette zone constitue bien un site de biogenèse de GL ([Figure R11, B](#)). Après 25 min et 30 s, l'intensité du LipidTox continue d'augmenter au fur et à mesure de la maturation de la GL. Ces informations temporelles sont en accord avec celles publiées par Kassan et ses collègues. En effet, en condition d'apport continu en lipide, 15 à 30 min sont nécessaires pour former une GL mature (Kassan et al., 2013). Ainsi, ces données montrent qu'en plus d'être présente au niveau des contacts entre le RE et les GL matures, MOSPD2 est également recrutée lors des étapes précoces de la formation des GL, suggérant qu'elle joue un rôle dans l'assemblage des GL.

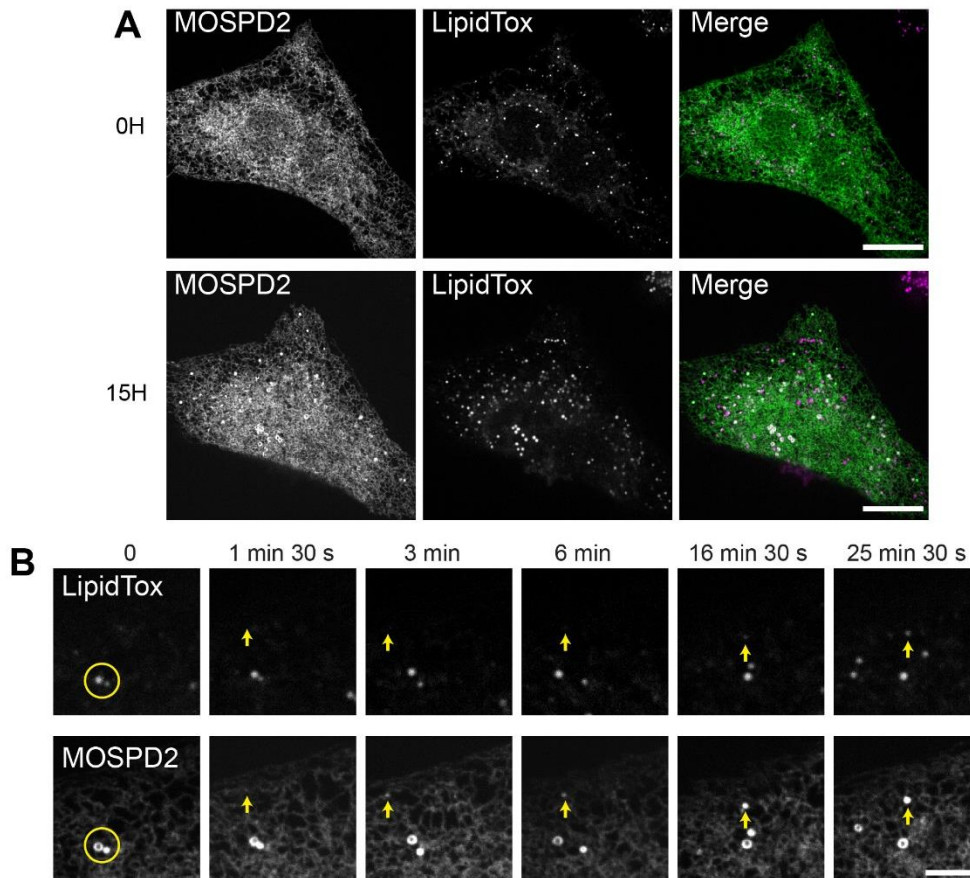


Figure R11 : MOSPD2 est associée aux GL précoces et matures

A. Des expériences d'imagerie en temps réel ont été réalisées sur les cellules HeLa/GFP-MOSPD2. Une image avant [0 heure (H)] et après (15H) traitement à l'acide oléique est représentée. Dans ces cellules les GL ont été marquées grâce au LipidTox. L'induction de la formation des GL par traitement à l'acide oléique stimule le recrutement de MOSPD2 autour des GL.

B. Cette série d'images est issue d'une région de la cellule présentée en A. Les marquages de la protéine GFP-MOSPD2 et des GL sont présentés aux différents temps indiqués. Au temps 0, la zone encerclée en jaune représente une zone de contact entre MOSPD2 et les GL marquées par le LipidTox. Après 1 minute (min) et 30 secondes (s), MOSPD2 s'accumule dans le RE (zone indiquée par une flèche jaune) dans une région différente de celle du temps 0 qui n'est pas positive pour le LipidTox. Après 16 min et 30 s, cette zone d'enrichissement positive pour GFP-MOSPD2 colocalise partiellement avec le LipidTox. Sachant que le LipidTox est un marqueur des GL matures, ceci suggère que MOSPD2 est recrutée lors des étapes précoces de la formation des GL.

Complément d'information. Le temps 0 de la figure A n'est pas le même que le temps 0 de la figure B. En B, le temps 0 a été choisi aléatoirement et représente un repère initial de temps. Barre d'échelle : A, 10 μ m; B, 5 μ m.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Section I : MOSPD2 construit des ponts entre organites en s'associant avec les protéines à motif FFAT

Il est aujourd'hui reconnu que les organites, territoires fonctionnels présents au sein des cellules eucaryotes, communiquent entre eux et échangent métabolites et informations par plusieurs mécanismes : le transport vésiculaire et les SCM. Dans la cellule, le RE occupe une place centrale dans la communication inter-organites médiée par les SCM (Wu et al., 2018). Au niveau moléculaire, la formation des SCM nécessite des interactions protéiques et/ou protéomembranaires à l'interface entre les deux organites concernés. Pour comprendre la fonction de ces structures, un des enjeux actuels est d'identifier les composants cellulaires impliqués dans la formation des SCM. De manière remarquable, deux protéines très homologues, VAP-A et VAP-B, interviennent largement comme récepteurs ancrés au RE pour former les nombreux ponts moléculaires qui lient le RE aux autres organites. Ces protéines projettent dans le cytoplasme un domaine MSP capable d'interagir avec des motifs FFAT retrouvés dans plus d'une centaine de protéines (Mikitova and Levine, 2012; Murphy and Levine, 2016). Plusieurs complexes protéiques impliquant les VAPs et les protéines à motif FFAT sont responsables de la formation de SCM entre le RE et d'autres organites incluant les endosomes, les mitochondries ou encore l'appareil de Golgi. Des études fonctionnelles ont montré que ces complexes sont impliqués dans divers processus biologiques essentiels comme le transport de lipides, la dynamique des endosomes et des mitochondries, l'échange de calcium etc... Cependant, malgré tous les rôles qui ont été attribués aux complexes impliquant les VAPs dans les interactions membranaires et les transferts de métabolites et d'informations inter-organites, l'abolition de l'expression des VAPs n'entrave pas la viabilité cellulaire et n'engendre qu'un effet modéré sur les contacts impliquant le RE avec les autres organites cellulaires (Costello et al., 2017; Dong et al., 2016; Stoica et al., 2014). Ces données suggèrent l'existence d'un mécanisme capable de compenser la perte des VAPs. Ainsi, mon projet de thèse a été d'examiner la possibilité d'une redondance fonctionnelle d'une nouvelle protéine pouvant se substituer aux VAPs. Le but était de préciser l'anatomie moléculaire des contacts membranaires en identifiant de nouveaux complexes d'ancrage impliquant le RE. Par une approche protéomique non biaisée, une nouvelle protéine d'ancrage du RE, la protéine MOSPD2, a été isolée et caractérisée. A l'instar des protéines VAPs, MOSPD2 est une protéine de type « tail-anchored » ancrée dans la membrane du RE par un domaine TM C-terminal, qui possède un

domaine MSP central capable d'interagir avec les motifs FFAT d'autres protéines localisées au niveau d'autres organites comme les endosomes, les mitochondries ou l'appareil de Golgi. Des expériences *in vitro* et *in cellulo* ont permis de montrer qu'à travers ces interactions, MOSPD2 pontre les membranes du RE avec celles des autres organites cellulaires (Figure D1) (Di Mattia et al., 2018b, 2018a, 2019b).

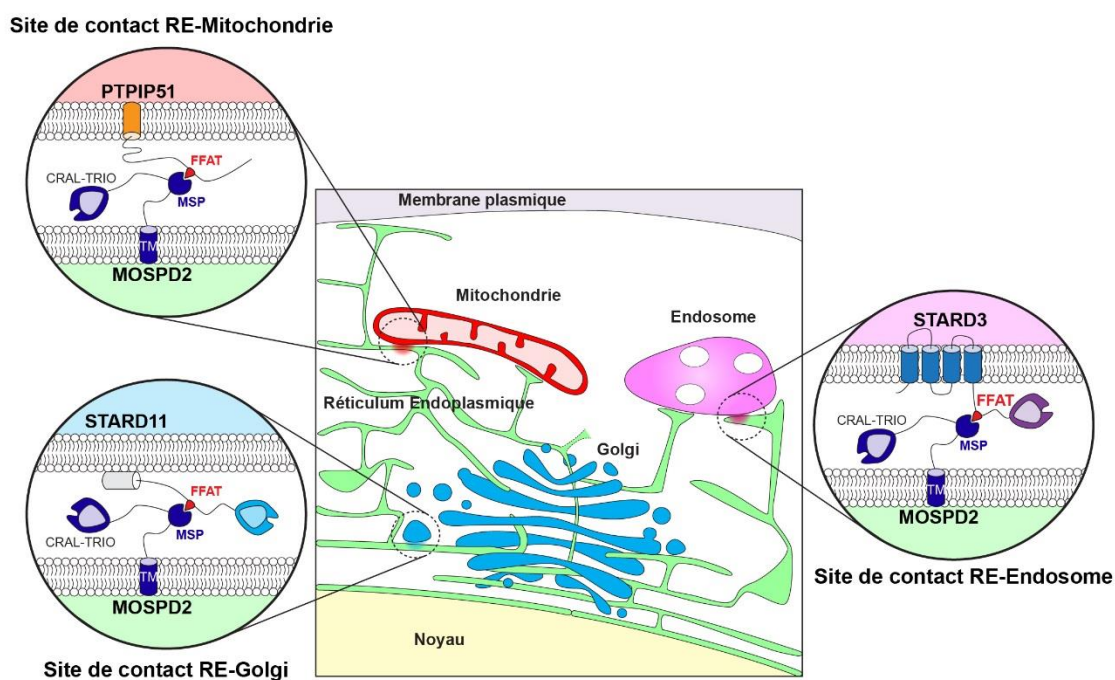


Figure D1 : MOSPD2 bâtit des SCM entre le RE et d'autres organites en s'associant avec les protéines à motif FFAT

MOSPD2 est une protéine composée de trois domaines fonctionnels : un domaine CRAL-TRIO (cellular retinaldehyde-binding protein et triple functional domain protein), un domaine MSP (major sperm protein) ainsi qu'un domaine TM (transmembranaire). Elle est ancrée à la membrane du RE (représenté en vert) grâce à son domaine TM. MOSPD2 est capable de construire des SCM entre le RE et les endosomes (magenta), les mitochondries (rouge) et l'appareil de Golgi (bleu) en interagissant respectivement avec STARD3, PTPIP51 et STARD11. Au niveau moléculaire, ces rapprochements membranaires sont générés par l'interaction du domaine MSP de MOSPD2 et des motifs FFAT de STARD3, PTPIP51 et STARD11 (Di Mattia et al., 2019b).

1. MOSPD2 est une protéine énigmatique

Très peu d'informations sont recensées dans la littérature concernant la protéine MOSPD2. En 2017, Mendel et ses collègues ont montré que MOSPD2 permet de réguler de manière positive la migration des monocytes, des cellules du système immunitaire (Mendel et al., 2017); ces cellules sont recrutées au niveau de lésions où elles pourront évoluer en

phagocytes tels que les macrophages. En 2018, la même équipe a montré, par des expériences d'immunohistochimie, que MOSPD2 est présente en grande quantité dans des tissus cancéreux du sein. *In vitro*, les auteurs ont révélé que l'inhibition de l'expression de MOSPD2 dans des lignées cellulaires cancéreuses mammaires limite leur capacité migratoire et invasive. Aussi, ces cellules affichent une perturbation de la transduction du signal associée au récepteur à activité tyrosine kinase EGFR. Ils ont également montré que MOSPD2 promeut la formation de métastases *in vivo* (Salem et al., 2019). L'ensemble des données de cette équipe supportent l'implication de MOSPD2 dans la migration monocyttaire et la progression tumorale. En ce qui concerne la localisation subcellulaire de la protéine MOSPD2, les auteurs affirment que cette dernière est une protéine de la membrane plasmique ; cette localisation à la surface des cellules étant considérée comme un atout pour un ciblage immunothérapeutique (Mendel et al., 2017; Salem et al., 2019). Cependant, les auteurs n'ont pas fourni de preuves convaincantes de cette localisation. Ils n'ont pas plus donné d'éléments expérimentaux ou théoriques permettant d'expliquer comment cette protéine du RE se retrouve à la membrane plasmique dans les monocytes et les cellules cancéreuses du sein. Leurs données concernant la localisation subcellulaire de MOSPD2 diffèrent de mes résultats expérimentaux. Dans toutes les cellules testées, MOSPD2 est une protéine du RE. Pour conclure, les données de la littérature associent MOSPD2 à des fonctions pro-tumorales sans donner de précisions mécanistiques. Mes travaux de thèse sont plus fondamentaux ; ils ont montré que la protéine participe à la dynamique du RE et des organites cellulaires. Des études ultérieures, grâce par exemple à l'identification de partenaires spécifiques de MOSPD2, permettront de faire le lien entre cette fonction et les processus cancéreux.

2. [MOSPD2 ou VAP, qui choisir ?](#)

En principe, la protéine MOSPD2 est capable de bâtir des contacts en interagissant avec les mêmes partenaires protéiques que les VAPs. Mes résultats expérimentaux indiquent que cette capacité d'ancrage est indépendante de la présence des protéines VAPs. La question qui se pose ainsi est de savoir par quel(s) mécanisme(s) la formation des contacts membranaires médiés par MOSPD2 ou VAP est modulée. Nous avons montré que l'affinité des domaines MSP de MOSPD2 et des VAPs pour un même motif FFAT est similaire (de l'ordre du micromolaire).

Ainsi, il semblerait que la force d'interaction MSP-FFAT ne permette pas de définir la spécificité des contacts. En revanche la quantité des protéines VAPs et MOSPD2 dans les cellules HeLa est très différente. En effet, VAP-A est 30 fois plus abondante que VAP-B et 200 fois plus abondante que MOSPD2. Ainsi, il serait envisageable que la disponibilité de VAP-A, VAP-B ou MOSPD2 guide la formation de sites de contact spécifiques. Une autre possibilité serait que la formation des complexes protéiques VAPs-protéines à motif FFAT et MOSPD2-protéines à motif FFAT soit modulée par des modifications post-traductionnelles, à travers l'action de protéines régulatrices. Dans la littérature, il a été montré que des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, peuvent modifier l'affinité de protéines contenant un motif FFAT avec les VAPs. Ces modifications ont pour conséquence la perturbation de la formation des contacts membranaires. Par exemple, la phosphorylation d'une sérine en amont du motif FFAT dans la protéine STARD11 augmente l'interaction STARD11-VAPs (Kumagai et al., 2014). Il serait intéressant de savoir si la phosphorylation de STARD11 régule de manière similaire ou opposée la capacité de cette protéine à interagir avec MOSPD2. Alternativement, ce sont les modifications post-traductionnelles des protéines VAPs et MOSPD2 qui pourraient moduler leur capacité d'interaction avec les protéines à motif FFAT. En accord avec cette idée, il existe de multiples sites de phosphorylation dans les séquences des protéines VAPs et MOSPD2 (Hornbeck et al., 2004). De telles modifications pourraient constituer un moyen d'atténuer ou d'accentuer l'interaction qui agirait sur la formation des contacts membranaires dans les cellules. Pour tester cette possibilité, les résidus phosphorylables identifiés dans les séquences des protéines VAPs et MOSPD2 pourront être mutés par des résidus non-phosphorylables. La conséquence de ces mutations sur la formation des contacts membranaires pourra être analysée en suivant la même démarche expérimentale que celle suivie pour la protéine MOSPD2 sauvage et le mutant RD/LD incapable de se lier au motif FFAT (Di Mattia et al., 2018a).

[3. Quelles sont les fonctions associées à la formation des SCM impliquant MOSPD2 et les protéines à motif FFAT?](#)

En termes d'évolution, la protéine MOSPD2 est apparue plus tard que les protéines VAPs. Ces dernières sont présentes chez les animaux, les plantes et les champignons alors que MOSPD2 n'est présente que chez les animaux. MOSPD2 se distingue des VAPs par la présence d'un

domaine supplémentaire localisé à son extrémité N-terminale, le domaine CRAL-TRIO. Ce domaine est présent dans de nombreux règnes du vivant incluant les mycètes. L'archétype de la protéine à domaine CRAL-TRIO est la protéine Sec14 de levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Cette protéine est impliquée dans des contre-échanges de lipides, en particulier le PI et la PC (Bankaitis et al., 1990; Sha et al., 1998). Ainsi, la présence de ce domaine, vraisemblablement impliqué dans le transfert de lipides, fait de MOSPD2 un récepteur unique à la surface du RE apparu plus tardivement dans l'évolution ; MOSPD2 serait un récepteur du RE bi-fonctionnel capable de ponter les membranes (une fonction associée à son domaine MSP) et d'échanger des lipides (une fonction associée à son domaine CRAL-TRIO).

Les fonctions des contacts associés aux VAPs dépendent de la capacité de ces protéines à rapprocher les membranes. A mon sens, il est plausible que les protéines VAPs et MOSPD2 aient des fonctions d'attachement de membranes redondantes. Par exemple, il a été montré au travers de travaux réalisés au laboratoire, que la protéine STARD3 est capable de transporter du cholestérol du RE vers les endosomes au niveau des SCM. Cette fonction d'échangeur de cholestérol est dépendante de sa capacité à interagir avec les protéines VAPs qui permet de générer des SCM (Wilhelm et al., 2017). Il serait intéressant de savoir si STARD3 est également capable de transporter du cholestérol au niveau des contacts formés avec MOSPD2. Au niveau expérimental, des protocoles ont été établis au sein du laboratoire, permettant de marquer et de quantifier le cholestérol intracellulaire par l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques, comme la Filipin. Ces méthodes pourront être utilisées pour analyser la fonction des complexes impliquant STARD3 et MOSPD2 dans le transport du cholestérol.

D'un autre côté, la présence additionnelle du domaine CRAL-TRIO au sein des contacts formés par MOSPD2 suppose l'existence d'une fonction supplémentaire d'échange de lipides et en conséquence, de modification fonctionnelle des organites. Il est tentant de spéculer que MOSPD2 soit principalement en complexe avec des LTP, comme les protéines de la famille des protéines à domaine START (STARD3, STARD11...) ou ORP (OSBP...). Ce partenariat rendrait possible le transport de plusieurs espèces lipidiques au niveau d'un contact membranaire RE-Organite unique. Nous pouvons imaginer que les complexes protéiques impliquant MOSPD2 pourraient modifier les compositions membranaires des organites en participant à des échanges croisés de deux, ou trois (ou même plus) espèces lipidiques aux SCM RE-Organite. Par exemple, dans le cas d'une association avec la protéine OSBP, si le domaine CRAL-TRIO de MOSPD2 pouvait transporter du PI alors le complexe pourrait participer à un cycle de transport

de lipides. En effet, OSBP est capable de contre-échanger du PI(4)P et du cholestérol entre les membranes du RE et du trans-Golgi, et ce, au niveau des SCM RE-*trans* Golgi. Le PI(4)P est synthétisé à partir de PI dans la membrane du *trans* Golgi, transporté par OSBP vers le RE, et dégradé dans la membrane du RE en PI. Ce cycle permet de fournir l'énergie nécessaire pour permettre le transport de cholestérol par OSBP du RE vers le trans-Golgi (Mesmin et al., 2013). MOSPD2 pourrait transporter le PI du RE vers le *trans*-Golgi en fonction de son gradient de concentration pour fermer le cycle du transport de PI/PI(4)P entre les membranes de ces deux organites. Pour pouvoir valider ce scénario, il est essentiel de connaître la spécificité et la capacité de transport du domaine CRAL-TRIO de MOSPD2. Des approches employant le domaine CRAL-TRIO recombinant, de type « lipid overlay » ou échange de lipides entre liposomes, apporteraient la réponse.

4. [Comment MOSPD2 module-t-elle l'architecture intracellulaire ?](#)

Pour connaître la fonction physiologique de MOSPD2 sur l'architecture intracellulaire, nous avons comparé l'ultrastructure de cellules déficientes pour MOSPD2 à celle de cellules contrôles par microscopie électronique. La perte de MOSPD2 affecte les contacts entre le RE et les endosomes. En effet, une diminution d'environ 50% de la surface des endosomes en contact avec le RE a été notée dans les cellules déficientes pour MOSPD2, comparativement aux cellules contrôles. La méthode que nous avons utilisée pour quantifier les contacts est la stéréologie. Cette méthode quantifie le pourcentage du périmètre de l'endosome en contact avec le RE. Cette quantification a été réalisée sur des centaines d'endosomes issus de coupes d'une dizaine de cellules. Nous n'avons pas quantifié des coupes sériées permettant d'apprécier la cellule en entier, cependant, l'analyse d'un grand nombre d'endosomes permet de s'approcher de la réalité cellulaire.

L'explication immédiate de la diminution des contacts RE-Endosome dans les cellules dépourvues de MOSPD2 est que l'absence de cette protéine diminue les complexes entre MOSPD2 et les protéines endosomales à domaine FFAT comme ORP1L, STARD3 et STARD3NL. Ceci a pour conséquence la diminution de la capacité du RE à former des ponts avec les endosomes. De plus, MOSPD2 possède sans doute d'autres partenaires sur les endosomes avec lesquelles elle pourrait créer des liens moléculaires entre ces deux organites.

De manière remarquable, bien que cela n'ait pas été quantifié, d'après les observations des images de microscopie électronique, il semble qu'il y a plus d'endosomes dans les cellules dépourvues de MOSPD2. Ainsi, la diminution des contacts RE-Endosome que nous avons observée pourrait être due à l'augmentation du ratio endosome/RE. A l'avenir, il sera intéressant de confirmer l'effet physiologique de MOSPD2 sur la formation des SCM RE-Endosome. Il sera nécessaire de procéder à des ajustements méthodologiques. Pour les quantifications réalisées par microscopie électronique, nous avons identifié l'endosome selon des critères assez larges : un organe circulaire entouré d'une membrane et possédant une ou plusieurs vésicules intra-luminales (Scott et al., 2014). Or, le système endosomal est complexe et composé de plusieurs sous-types d'endosomes incluant les endosomes précoces, tardifs et les lysosomes. A l'avenir, pour avoir une idée plus précise de la nature des endosomes impactés par la perte de MOSPD2, nous envisageons de quantifier la présence des contacts par la technique de PLA dans des systèmes de perte de fonction (cellules knock-down et knock-out pour MOSPD2) et gain de fonction (cellules surexprimant MOSPD2), et ce, entre les protéines calnexine (protéine répartie de manière relativement homogène dans la membrane du RE) et Rab5 (Ras-related protein 5) ou Rab7, des protéines respectivement associées aux endosomes précoces et aux endosomes tardifs/lysosomes. Pour quantifier la quantité d'endosomes dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2, le système endosomal sera marqué dans sa globalité avec une sonde fluorescente de type dextran-Alexa488. La surface des endosomes pourra être calculée grâce à des logiciels de traitement d'images.

Nous pouvons également nous poser la question suivante : comment MOSPD2 pourrait-elle réguler la quantité des endosomes dans la cellule ? Il serait possible que cette protéine agisse sur la biogenèse des endosomes, ou alternativement, sur leur dégradation. Certains facteurs de transcription, comme TFEB et TFE3 (transcription factor EB et E3), ont été identifiés comme des régulateurs de la biogenèse du système endolysosomal (Puertollano et al., 2018). Sous forme phosphorylée, ces facteurs sont inactifs dans le cytoplasme. Sous forme déphosphorylée, TFEB et TFE3 sont internalisés dans le noyau pour induire la transcription de gènes cibles (Napolitano and Ballabio, 2016). La quantité des transcrits et des protéines TFEB et TFE3 pourra être analysée dans les cellules déficientes pour MOSPD2. L'expression de marqueurs autophagiques tels que LC3-II (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) pourra également être analysée.

De manière concomitante à la diminution des contacts RE-Endosome dans les cellules déficientes pour MOSPD2, nous avons observé une augmentation des contacts homotypiques Endosome-Endosome. Comment MOSPD2 régule-t-elle la formation de ces contacts est une question ouverte. Ce phénotype peut être une conséquence directe de la diminution des contacts RE-Endosome. En effet, nous avons vu dans la partie introductive que le RE est impliqué dans la maturation et le positionnement des endosomes. Il est ainsi envisageable qu'un défaut dans la formation des contacts RE-Endosome puisse favoriser l'accumulation d'endosomes à certains endroits de la cellule et promouvoir ainsi leur rencontre. Le rapprochement des endosomes avec leurs homologues peut également être favorisé par l'augmentation globale du nombre d'endosomes dans les cellules. De manière intéressante, nous avons observé par microscopie électronique la présence de contrastes plus élevés au niveau des membranes situées à l'interface des contacts Endosome-Endosome. Ces zones de densité aux électrons plus intenses, suggèrent l'existence de complexes protéiques spécifiques permettant d'établir et de maintenir ces contacts. A ce jour, aucun complexe de ce genre n'a été caractérisé.

En parallèle de la quantification des contacts RE-Endosome, nous avons quantifié la surface des mitochondries en contact avec le RE. Les cellules déficientes pour MOSPD2 ou pour MOSPD2, VAP-A et VAP-B ne présentent pas d'altération des contacts RE-Mitochondrie. Ces données suggèrent que la perte de ces protéines peut être compensée par d'autres systèmes d'ancrage.

Section II : MOSPD2, une nouvelle protéine des gouttelettes lipidiques

Mes travaux non publiés indiquent que MOSPD2 est associée à des capacités d'ancrage indépendantes de son domaine MSP et de son habilité à interagir avec les protéines à motif FFAT. En effet, MOSPD2 est recrutée au niveau de sous-domaines du RE en contact avec les GL, et ce, de manière dépendante de la présence d'une hélice amphiphile localisée dans son domaine CRAL-TRIO.

1. Pourquoi MOSPD2 présente-t-elle une hétérogénéité en termes de localisation dans les cellules ?

Au sein d'une population de cellules exprimant stablement la protéine GFP-MOSPD2, dans la moitié des cas, GFP-MOSPD2 possède une localisation réticulaire caractéristique du RE et dans l'autre moitié, cette protéine est également présente dans les contacts RE-GL. Nous pouvons imaginer que dans la première population de cellules, la protéine se répartit de manière homogène dans la membrane du RE et interagit de manière dynamique avec ses partenaires à motif FFAT présents partout dans la cellule. Dans la seconde population, la protéine s'associe préférentiellement avec la membrane des GL et n'interagit plus (ou moins) avec les protéines à motif FFAT. Cette notion est soutenue par le fait que lorsque MOSPD2 n'est plus capable d'interagir avec les protéines à motif FFAT (MOSPD2 RD/LD), cette protéine est dans la majorité des cellules (90%) enrichie au niveau des contacts RE-GL. Les mécanismes permettant de réguler l'attachement de MOSPD2 avec les protéines à motif FFAT ou avec la membrane des GL ne sont pas encore identifiés. Toutefois, dans des conditions où la formation des GL est induite (traitement à l'acide oléique), la totalité des cellules présente un enrichissement de la protéine GFP-MOSPD2 au niveau des contacts RE-GL. Ainsi, il est fort plausible que les capacités d'ancrage de MOSPD2 dépendent du contexte et du type cellulaire. La prochaine étape sera d'analyser la localisation de la protéine endogène dans des modèles cellulaires plus physiologiques, comme les cellules adipocytaires, cellules composant le tissu adipeux.

2. MOSPD2, une protéine d'une nouvelle classe ?

Les protéines des GL sont subdivisées en deux sous-catégories, la classe 1 et la classe 2, en fonction des mécanismes associés à leur recrutement à la surface des GL. La première classe est composée de protéines membranaires qui se répartissent entre le RE et les GL. En absence de GL dans la cellule, ces protéines sont localisées dans le RE. Elles se déplacent de la membrane du RE vers la membrane des GL lors de leur formation grâce à la présence de ponts membranaires (continuités membranaires). La protéine ACSL3, par exemple, appartient à cette catégorie (Kassan et al., 2013; Kory et al., 2016). La deuxième classe est composée de protéines capables de s'associer à la membrane des GL à partir du cytoplasme, et ce, principalement grâce à une hélice amphiphile (Giménez-Andrés et al., 2018; Kory et al., 2016). Les protéines périlipines (comme TIP47) appartiennent à cette catégorie (Figure D2).

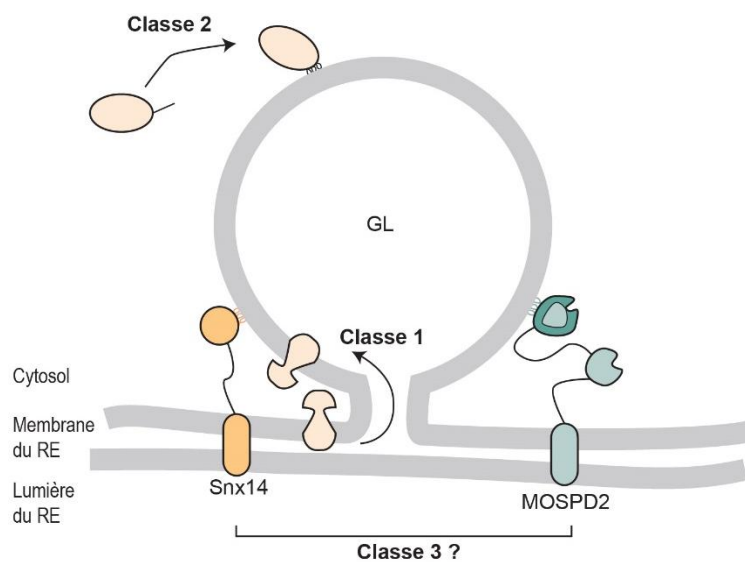


Figure D2 : MOSPD2 est une nouvelle protéine des GL

Les protéines de classe 1 atteignent la membrane des gouttelettes lipidiques (GL) à partir de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Celles de la classe 2 s'associent aux GL à partir du cytosol. Les protéines Snx14 et MOSPD2 sont à la fois associées au RE à travers des domaines TM et à la membrane de la GL par des hélices amphiphiles. Ces protéines pourraient constituer une nouvelle classe de protéines associées aux GL.

De manière intéressante, MOSPD2 ne semble appartenir à aucune de ces deux catégories référencées dans la littérature. En effet, d'après mes données, MOSPD2 doit être ancrée dans la membrane du RE à travers son domaine TM pour pouvoir reconnaître la surface des GL grâce à son hélice amphiphile. A l'inverse des protéines de classe 1, MOSPD2 maintient à la fois un contact avec le RE et avec la membrane des GL. Une telle organisation est également retrouvée

pour la protéines Snx14 (Datta et al., 2019). MOSPD2 et Snx14 constitueraient une nouvelle classe de protéines associées aux GL (Figure D2).

3. Quelles fonctions MOSPD2 remplit-elle aux contacts RE-GL ?

MOSPD2 est enrichie dans des sous-domaines du RE en contact avec les GL. Dans des futures expériences, nous analyserons si MOSPD2 régule l'établissement des contacts RE-GL. Pour cela, la stéréologie permettra de quantifier les contacts entre ces deux organites dans des systèmes de perte et de gain de fonction de la protéine MOSPD2. Il sera également intéressant de réaliser des images en trois dimensions sur le volume d'une cellule entière, par la technique de SIF-MEB (sonde ionique focalisée couplée à la microscopie électronique à balayage), afin de voir s'il existe ou non (et en quelle quantité) des ponts membranaires entre le RE et les GL dans les cellules déficientes ou exprimant MOSPD2, comparativement à des cellules contrôles. Rappelons ici qu'à travers les ponts membranaires, les protéines des GL de classe 1 atteignent la membrane de ces organites et participent à leur maturation. Les expériences de SIF-MEB pourront être complétées par des expériences de FRAP. Cette technique permettra de caractériser la dynamique de recrutement des protéines de classe 1 (comme ACSL3) à la surface des GL, dans des cellules où l'expression de MOSPD2 est altérée. Ces expériences permettront d'apporter des informations sur l'implication de MOSPD2 dans la régulation de la dynamique de protéines des GL, et ainsi, sur la fonction de MOSPD2 à l'interface des contacts RE-GL.

D'après mes expériences réalisées sur cellules vivantes, MOSPD2 semble être recrutée lors d'étapes précoces de la biogenèse des GL. Cet aspect pourra être validé par le co-marquage des cellules avec la protéine GFP-MOSPD2 et le LiveDrop, une sonde permettant de marquer les GL naissantes (Wang et al., 2016a). Le fait que MOSPD2 soit recrutée précocement lors de la formation des GL suggère que cette protéine joue un rôle dans la biogenèse des GL. A l'avenir, l'impact de MOSPD2 sur l'homéostasie des GL sera déterminé. La taille et le nombre des GL, à la fois dans des cellules déficientes pour MOSPD2 ou exprimant MOSPD2 (sous forme sauvage ou incapable d'interagir avec les GL), seront analysés. Ces études apporteront des informations sur le lien entre les SCM RE-GL et la biogenèse des GL.

De façon intéressante, j'ai montré que le domaine CRAL-TRIO possède une fonction d'ancrage à travers la présence d'une hélice amphiphile localisée à son extrémité C-terminale.

D'après la modélisation du domaine CRAL-TRIO de MOSPD2, l'hélice amphiphile est exposée vers le milieu extérieur, ce qui est compatible avec le fait qu'elle soit capable de reconnaître la surface des GL. Dans la littérature, le CRAL-TRIO a été identifié comme un domaine impliqué dans le transport de lipides (Chiapparino et al., 2016). La présence d'une hélice amphiphile permet peut-être de faciliter la fonction d'échange des lipides associée à MOSPD2 à l'interface entre le RE et les GL. En effet, nous pouvons imaginer que ce domaine serve à la fois à maintenir les contacts RE-GL et à échanger des lipides. Un lipide tel que la PC serait une cible avantageuse du CRAL-TRIO de MOSPD2. En effet, la PC est d'une part synthétisée dans le RE et présente en grande quantité dans sa membrane, et d'autre part, constitue le glycérophospholipide majeur des GL (van Meer et al., 2008). Dans le cas où la quantité de PC deviendrait critique dans la membrane des GL, MOSPD2 pourrait transporter la PC du RE vers les GL selon son gradient de concentration.

Finalement, il sera intéressant d'analyser l'impact de MOSPD2 sur l'adipogenèse *in vitro* et *in vivo*. La lignée pré-adipocytaire murine 3T3-F442A est une lignée capable de se différencier en adipocytes *in vitro* via l'utilisation d'un cocktail de différenciation, et *in vivo*, dans un modèle de greffe chez la souris. L'expression du transcrit et de la protéine MOSPD2 pourra être analysée pré et post-différenciation. Nous pourrions également générer des lignées 3T3-F442A déficientes pour MOSPD2. *In vitro*, l'adipogenèse sera étudiée en analysant l'expression de facteurs clés impliqués dans cette voie comme PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ). La structure des GL pourra également être analysée dans ces cellules par microscopie électronique. *In vivo*, les cellules 3T3-F442A pourront être injectées au niveau sous-cutané chez des souris syngéniques. Des études histologiques et l'analyse de l'expression des facteurs clés pourront être réalisés sur les coussins gras issus de l'injection des cellules 3T3-F44A. Cette expérience nous permettra de déterminer si l'absence de MOSPD2 modifie la capacité de différenciation des adipocytes à l'échelle de l'organisme.

En conclusion générale, mes travaux apportent de nouveaux éléments permettant de mieux comprendre la biologie des SCM. J'ai identifié et caractérisé un nouvel harpon moléculaire attaché au RE, la protéine MOSPD2. D'un côté, MOSPD2 partage des caractéristiques structurelles et fonctionnelles avec les protéines VAPs, un domaine transmembranaire C-terminal responsable de l'ancrage de la protéine dans la membrane du RE, et un domaine MSP capable de lier des protéines contenant des motifs FFAT associées à

d'autres organites, tels que les endosomes, les mitochondries et l'appareil de Golgi. La formation de ces complexes engendre la formation de SCM RE-Endosome/Mitochondrie/Golgi. Ces découvertes complètent le paysage moléculaire des SCM. D'un autre côté, MOSPD2 se distingue des VAPs par la présence d'un domaine additionnel nommé CRAL-TRIO. Ce domaine est responsable de l'enrichissement de MOSPD2 aux contacts membranaires RE-GL.

Complément d'information sur le matériel et la méthode

Cette partie « Matériels et Méthodes » vient compléter celle présente dans l'article de la section I du chapitre « Résultats ».

1. Clonage et constructions

La séquence codante pour les mutants GFP-MOSPD2 Δ MSP, GFP-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO, et GFP-MOSPD2 W201E a été générée par mutagenèse dirigée (amorces pour le Δ MSP : 5'-AGT GTA TTT AAA GGC CCC GAA AGC AGT AAA CCA AAC-3' et 5'-GTT TGG TTT ACT GCT TTC GGG GCC TTT AAA TAC ACT-3' ; amorces pour le Δ CRAL-TRIO : 5'-CA TCA TCA TCA TCA TCA CTG AAG ATC CGG CTG-3' et 5'-AGG ATC AGT TCC ACC CAT GTG GGG AGG CAG-3' ; amorces pour le W201E : 5'-ATT GTG AAA ACC GAA CTT GGT CCA GAA GCA GTG AGC-3' et 5'-TTC TGG ACC AAG TTC GGT TTT CAC AAT TTT GAA AGC-3'). La séquence codante pour GFP-TM MOSPD2, GFP-CRAL-TRIO MOSPD2 et GFP-MOSPD2 CAAX a été amplifiée par PCR avec les amorces suivantes : pour le GFP-TM MOSPD2 5'- GAGA CGG CCG ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG-3' et 5'-AGA GGA TCC TTA ACT GTA CAA TAA ATA GAA GAA AGA GGT GAC AAA AGC AAG CAA GAG CAT TGT TAA GGA AAG CAG CAG CTG CTG GAA CCA GAT ACA ACG AGA ATT CGA AGC TTG AGC TCG-3' ; pour le GFP-CRAL-TRIO MOSPD2 5'-GAGA CGG CCG ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG-3' et 5'- AGA GGA TCC TTA ACT GTA CAA TAA ATA GAA GAA AGA GGT GAC AAA AGC AAG CAA GAG CAT TGT TAA GGA AAG CAG CAG CTG CTG GAA CCA GAT ACA ACG ATA CTT GAA AGG ATC AGT TCC-3' ; pour le GFP-MOSPD2 CAAX 5'- GAGA CGG CCG ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG-3' et 5'- GAGA GGA TCC CTA CATA ATT ACA CAC TTT GTC TTT GAC TTC TTT TTC TTT TTA CCG ATA CAA CGC TGA ACT TGG TCT TCA AGC TTC-3'. Pour l'ensemble de ces constructions, la matrice utilisée était le vecteur pEGFP-C1_MOSPD2, généré comme précédemment décrit (Di Mattia et al., 2018a). Les séquences codantes pour GFP-MOSPD2 Δ MSP, GFP-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO, et GFP-MOSPD2 W201E, GFP-TM MOSPD2, GFP-CRAL-TRIO MOSPD2 et GFP-MOSPD2 CAAX ont ensuite été sous-clonées dans le vecteur rétroviral pQCXIP. Finalement, afin de générer un vecteur contenant la séquence de la protéine de fusion GFP-MOSPD2 SAC1, la stratégie de clonage In Fusion a été utilisée. Cette technique permet de simplifier les étapes de clonage traditionnelles et elle présente un taux d'efficacité plus élevé.

Elle se base sur la recombinaison de fragments d'ADN complémentaires. Ici les fragments d'ADN amplifiés par PCR possèdent des régions à leurs extrémités 5' et 3' complémentaires aux extrémités d'un vecteur linéarisé. Afin d'associer les fragments et le vecteur, une recombinaison homologue *in vitro* est faite grâce à un extrait protéique bactérien qui possède toute la machinerie nécessaire pour permettre une recombinaison homologue efficace. Deux fragments de PCR ont été générés. Le premier fragment d'ADN (PCR1) codant pour la protéine GFP-MOSPD2 dépourvu de son domaine TM a été obtenu à partir de la matrice pEGFP-C1_MOSPD2 et le deuxième fragment (PCR2) codant pour les domaines TM de la protéine SAC1 a été obtenu à partir de la matrice pEGFP-C1_SAC1 généré comme précédemment décrit (Alpy et al., 2013). Les amorces suivantes ont été utilisées : PCR1, 5'-GGAATTGATCCGCGGCCGCCG ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG T-3' et 5'-AACAACCATGATAATAGGCAAAGCCAGGAA GAT ACA ACG CTG AAC TTG GTC TTC AAG CTT-3'; PCR2, 5-'TTCCTGGCTTTGCCTTATCATGGTTGTT-3' et 5'-GGGCGGAATTCCGGATC TCA GTC TAT CTT TTC TTT CTG GAC CAG TCT-3'. Ces fragments ont ensuite été intégrés dans le vecteur pQCXIP préalablement linéarisé avec les enzymes *NotI* et *BamHI*, et ce, grâce à une étape de recombinaison homologue *in vitro*. Cette dernière étape a été réalisée comme précédemment décrit (Okegawa and Motohashi, 2015).

2. Induction de la formation des GL

Afin d'induire la formation des GL, les cellules HeLa sont cultivées dans un milieu DMEM avec 1g/L de glucose, 5% de sérum de veau fœtal, 40 µg/mL de gentamycine et supplémenté par 400 µM d'acide oléique (concentration finale). L'acide oléique est au préalable complexée avec de l'albumine de sérum bovin (ratio molaire de 8 :1) comme décrit dans Listenberger et Brown, 2007 (Listenberger and Brown, 2007).

3. Marquage des GL *in cellulo*

Les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées comme précédemment décrit (Alpy et al., 2002). Les GL sont marquées grâce à plusieurs sondes : le Bodipy 493/503 (D-3922, Thermo Scientific), le Nile Red (N-1142, Thermo Scientific) et le HCS Lipid Tox deep red (H-

34477, Thermo Scientific). Ces sondes sont des marqueurs de lipides neutres, lipides contenus dans les GL. Les cellules fixées sont incubées 15 minutes à température ambiante avec les sondes Bodipy 493/503, Nile Red et LipidTox respectivement diluées au 5000^{ème}, 8000^{ème} et 1000^{ème} dans du NaCl 150mM. Pour le marquage des GL dans les cellules vivantes, le LipidTox est directement dilué au 1000^{ème} dans le milieu de culture. Les cellules sont ensuite imagées 15 minutes plus tard sans rinçage/lavage au préalable.

4. [Imagerie sur cellules vivantes](#)

Time-Lapse : Les cellules HeLa/GFP-MOSPD2 sont cultivées sur des boîtes de Petri à fond en verre de 35 mm (MatTek). Une fois qu'elles ont atteint une confluence d'environ 40%, les GL sont marquées au LipidTox et les cellules placées dans une chambre thermostatée (37°C, 5% CO₂) montée sur un microscope confocal spinning disk Leica (objectif : 100X ; ouverture numérique 1,4). Après avoir mis les cellules en présence d'acide oléique (400 µM), l'acquisition débute.

Expérience de FRAP : Similairement, la culture des cellules se fait sur des boîtes de Petri à fond en verre de 35 mm (MatTek). Une fois qu'elles ont atteint une confluence d'environ 60%, les cellules sont traitées à l'acide oléique (400 µM). Seize heures post-traitement, les GL sont marquées avec du LipidTox. Les cellules vivantes sont placées dans une chambre thermostatée (37°C, 5% CO₂) montée sur un microscope confocal spinning disk Nikon (objectif : 100X ; ouverture numérique 1,4). La fluorescence de la protéine GFP a été éteinte par un flash lumineux intense et bref obtenu à partir d'un laser 488 utilisé à pleine puissance.

5. [Expériences de CLEM et STED](#)

Les expériences de CLEM ont été réalisées comme précédemment décrit (Alpy et al., 2013). Pour les expériences de STED, des cellules HeLa/GFP-MOSPD2 ont été cultivées sur des lamelles en verre. Une fois qu'elles ont atteint une confluence d'environ 60%, les cellules sont traitées à l'acide oléique (400 µM). Seize heures post-traitement, l'immunofluorescence a été réalisée comme précédemment décrit (Alpy et al., 2002). Les protéines GFP-MOSPD2 et TIP-47 ont été détectées en utilisant respectivement des anticorps de souris anti-GFP (1:1000 ; 2A3,

Merck) et de cochon d'Inde anti-TIP-47 (1:500 ; GP32, ProGen). Des anticorps secondaires de chèvre anti-souris conjugués à Abberior STAR 635p (1 :500 ; Abberior) et de chèvre anti-cochon d'Inde conjugués à l'Alexa 594 (1 :1000 ; Molecular Probes) ont été utilisés. Pour l'imagerie STED, nous avons utilisé un microscope STED/RESOLFT Abberior (Abberior Instruments ; Expert Line) utilisant le logiciel Inspector (Abberior Instruments). Le microscope se compose d'un étage IX83 (Olympus) en combinaison avec un objectif à huile UPlan-S Achromat 100x / ouverture numérique 1,4 (Olympus). Des images super-résolues ont été acquises par « donut-shaped depletion » à l'aide d'un laser pulsé de 775 nm et d'un laser pulsé de 590 et 640 nm.

6. Proximity Ligation Assay

L'expérience de PLA a été réalisée avec le système Duolink (Sigma). Les protéines endogènes MOSPD2 et STARD3 ont été détectées en utilisant respectivement des anticorps de lapin anti-MOSPD2 (1:250; A105239, Sigma) et de souris anti-STARD3 (1 :1000 ; 3G11, Wilhelm et al., 2017). L'acquisition des points fluorescents a été réalisée avec un microscope confocal spinning disk Andor (Andor Revolution). La quantification du nombre de points fluorescents a été faite avec le logiciel ICY (fonction spot detector ; <https://icy.bioimageanalysis.org>, de Chaumont et al., 2012).

7. Expériences de « pull-down » MOSPD2 et VAP-A

Les expériences de « pull-down » avec les domaines MSP recombinants sauvages et mutés des protéines MOSPD2 et VAP-A en fusion avec une étiquette 6-His ont été réalisées comme précédemment décrit (Di Mattia et al., 2018a).

8. Western Blot

Les expériences de Western Blot ont été réalisées comme précédemment décrit (Alpy et al., 2005) avec les anticorps suivants : anti-6His de lapin (1 :1000 ; Euromedex) et anti-ORP1L de souris (1 :1000, ab131175, Abcam).

9. Analyse in silico

La structure secondaire du domaine CRAL-TRIO de MOSPD2 a été prédite grâce au serveur CFSSP (Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server, Ashok Kumar, 2013). Le caractère hydrophobe des hélices a été défini grâce au logiciel Heliquest (Gautier et al., 2008). La structure tridimensionnelle du domaine CRAL-TRIO a été modélisée grâce au logiciel Swiss-Model (Waterhouse et al., 2018).

Références bibliographiques

- A -

Alpy, F., Wendling, C., Rio, M.-C., and Tomasetto, C. (2002). MENTHO, a MLN64 Homologue Devoid of the START Domain. *Journal of Biological Chemistry* 277, 50780–50787.

Alpy, F., Latchumanan, V.K., Kedinger, V., Janoshazi, A., Thiele, C., Wendling, C., Rio, M.-C., and Tomasetto, C. (2005). Functional Characterization of the MENTAL Domain. *Journal of Biological Chemistry* 280, 17945–17952.

Alpy, F., Legueux, F., Bianchetti, L., and Tomasetto, C. (2009). Les protéines à domaine START, des trafiquants intracellulaires de lipides. *M/S Revues: Synthèse*.

Alpy, F., Rousseau, A., Schwab, Y., Legueux, F., Stoll, I., Wendling, C., Spiegelhalter, C., Kessler, P., Mathelin, C., Rio, M.-C., et al. (2013). STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *Journal of Cell Science* 126, 5500–5512.

Amarilio, R., Ramachandran, S., Sabanay, H., and Lev, S. (2005). Differential Regulation of Endoplasmic Reticulum Structure through VAP-Nir Protein Interaction. *Journal of Biological Chemistry* 280, 5934–5944.

Ashok Kumar, T. (2013). CFSSP: Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server. *WIDE SPECTRUM: Research Journal*. 1(9):15-19.

- B -

Bankaitis, V.A., Aitken, J.R., Cleves, A.E., and Dowhan, W. (1990). An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* 347, 561–562.

Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R. (1994). COPII: A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77, 895–907.

Baron, Y., Pedrioli, P.G., Tyagi, K., Johnson, C., Wood, N.T., Fountaine, D., Wightman, M., and Alexandru, G. (2014). VAPB/ALS8 interacts with FFAT-like proteins including the p97 cofactor FAF1 and the ASNA1 ATPase. *BMC Biol* 12, 39.

Bernhard, W. (1956). CLOSE TOPOGRAPHICAL RELATIONSHIP BETWEEN MITOCHONDRIA AND ERGASTOPLASM OF LIVER CELLS IN A DEFINITE PHASE OF CELLULAR ACTIVITY. *The Journal of Cell Biology* 2, 73–78.

Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 517–529.

Bersuker, K., Peterson, C.W.H., To, M., Sahl, S.J., Savikhin, V., Grossman, E.A., Nomura, D.K., and Olzmann, J.A. (2018). A Proximity Labeling Strategy Provides Insights into the Composition and Dynamics of Lipid Droplet Proteomes. *Developmental Cell* 44, 97-112.e7.

de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605–610.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell* 89, 331–340.

Bui, M., Gilady, S.Y., Fitzsimmons, R.E.B., Benson, M.D., Lynes, E.M., Gesson, K., Alto, N.M., Strack, S., Scott, J.D., and Simmen, T. (2010). Rab32 Modulates Apoptosis Onset and Mitochondria-associated Membrane (MAM) Properties. *J. Biol. Chem.* 285, 31590–31602.

- C -

Caplan, S., Hartnell, L.M., Aguilar, R.C., Naslavsky, N., and Bonifacino, J.S. (2001). Human Vam6p promotes lysosome clustering and fusion in vivo. *The Journal of Cell Biology* 154, 109–122.

Chang, C.-L., Hsieh, T.-S., Yang, T.T., Rothberg, K.G., Azizoglu, D.B., Volk, E., Liao, J.-C., and Liou, J. (2013). Feedback Regulation of Receptor-Induced Ca²⁺ Signaling Mediated by E-Syt1 and Nir2 at Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions. *Cell Reports* 5, 813–825.

de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., Meas-Yedid, V., Pankajakshan, P., Lecomte, T., Le Montagner, Y., et al. (2012). Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat Methods* 9, 690–696.

Chen, H.-J., Anagnostou, G., Chai, A., Withers, J., Morris, A., Adhikaree, J., Pennetta, G., and de Bellerocche, J.S. (2010). Characterization of the Properties of a Novel Mutation in VAPB in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Biol. Chem.* 285, 40266–40281.

Chenna, R. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research* 31, 3497–3500.

Chiapparino, A., Maeda, K., Turei, D., Saez-Rodriguez, J., and Gavin, A.-C. (2016). The orchestra of lipid-transfer proteins at the crossroads between metabolism and signaling. *Progress in Lipid Research* 61, 30–39.

Cho, B., Cho, H.M., Jo, Y., Kim, H.D., Song, M., Moon, C., Kim, H., Kim, K., Sesaki, H., Rhyu, I.J., et al. (2017). Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division. *Nat Commun* 8, 15754.

Chorlay, A., Monticelli, L., Veríssimo Ferreira, J., Ben M'barek, K., Ajjaji, D., Wang, S., Johnson, E., Beck, R., Omrane, M., Beller, M., et al. (2019). Membrane Asymmetry Imposes Directionality on Lipid Droplet Emergence from the ER. *Developmental Cell* S1534580719303740.

Choudhary, V., Jacquier, N., and Schneider, R. (2011). The topology of the triacylglycerol synthesizing enzyme Lro1 indicates that neutral lipids can be produced within the luminal compartment of the endoplasmic reticulum: Implications for the biogenesis of lipid droplets. *Communicative & Integrative Biology* 4, 781–784.

Chung, J., Torta, F., Masai, K., Lucast, L., Czapla, H., Tanner, L.B., Narayanaswamy, P., Wenk, M.R., Nakatsu, F., and De Camilli, P. (2015). PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science* 349, 428–432.

Cohen, S. (2018). Lipid Droplets as Organelles. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 83–110.

Copeland, D.E. (1959). An Association between Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum in Cells of the Pseudobranch Gland of a Teleost. *The Journal of Cell Biology* 5, 393–396.

Costello, J.L., Castro, I.G., Hacker, C., Schrader, T.A., Metz, J., Zeuschner, D., Azadi, A.S., Godinho, L.F., Costina, V., Findeisen, P., et al. (2017). ACBD5 and VAPB mediate membrane associations between peroxisomes and the ER. *The Journal of Cell Biology* jcb.201607055.

Coy-Vergara, J., Rivera-Monroy, J., Urlaub, H., Lenz, C., and Schwappach, B. (2019). A trap mutant reveals the physiological client spectrum of TRC40. *J Cell Sci* jcs.230094.

Crooks, G.E. (2004). WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Research* 14, 1188–1190.

Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol* 174, 915–921.

Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T.G., Balla, T., and Hajnóczky, G. (2010). Imaging Interorganelle Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface. *Molecular Cell* 39, 121–132.

Csordás, G., Weaver, D., and Hajnóczky, G. (2018). Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. *Trends in Cell Biology* 28, 523–540.

- D -

Datta, S., Liu, Y., Hariri, H., Bowerman, J., and Henne, W.M. (2019). Cerebellar ataxia disease-associated Snx14 promotes lipid droplet growth at ER–droplet contacts. *The Journal of Cell Biology* jcb.201808133.

De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., and Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 336–340.

De Vos, K.J., Morotz, G.M., Stoica, R., Tudor, E.L., Lau, K.-F., Ackerley, S., Warley, A., Shaw, C.E., and Miller, C.C.J. (2012). VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. *Human Molecular Genetics* 21, 1299–1311.

Di Mattia, T., Wilhelm, L.P., Ikhlef, S., Wendling, C., Spehner, D., Nominé, Y., Giordano, F., Mathelin, C., Drin, G., Tomasetto, C., et al. (2018a). Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO Reports* e45453.

Di Mattia, T., Tomasetto, C., and Alpy, F. (2018b). A Third Musketeer on the ER: MOSPD2 is a Novel VAP-related Receptor for FFAT Motifs. *Contact* 1, 251525641880973.

Di Mattia, T., Tomasetto, C., and Alpy, F. (2019a). Faraway, so close! Functions of Endoplasmic reticulum–Endosome contacts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*.

Di Mattia, T., Tomasetto, C., and Alpy, F. (2019b). MOSPD2, un connecteur inter-organites. *Med Sci (Paris)* 35, 23–25.

Dong, R., Saheki, Y., Swarup, S., Lucast, L., Harper, J.W., and De Camilli, P. (2016). Endosome-ER Contacts Control Actin Nucleation and Retromer Function through VAP-Dependent Regulation of PI4P. *Cell* 166, 408–423.

- E -

Eden, E.R., Sanchez-Heras, E., Tsapara, A., Sobota, A., Levine, T.P., and Futter, C.E. (2016). Annexin A1 Tethers Membrane Contact Sites that Mediate ER to Endosome Cholesterol Transport. *Developmental Cell* 37, 473–483.

Eisenberg-Bord, M., Shai, N., Schuldiner, M., and Bohnert, M. (2016). A Tether Is a Tether Is a Tether: Tethering at Membrane Contact Sites. *Developmental Cell* 39, 395–409.

Eisenberg-Bord, M., Mari, M., Weill, U., Rosenfeld-Gur, E., Moldavski, O., Castro, I.G., Soni, K.G., Harpaz, N., Levine, T.P., Futerman, A.H., et al. (2018). Identification of seipin-linked factors that act as determinants of a lipid droplet subpopulation. *J. Cell Biol.* 217, 269–282.

Elbaz-Alon, Y., Eisenberg-Bord, M., Shinder, V., Stiller, S.B., Shimoni, E., Wiedemann, N., Geiger, T., and Schuldiner, M. (2015). Lam6 Regulates the Extent of Contacts between Organelles. *Cell Reports* 12, 7–14.

- F -

Favaloro, V., Vilardi, F., Schlecht, R., Mayer, M.P., and Dobberstein, B. (2010). Asna1/TRC40-mediated membrane insertion of tail-anchored proteins. *Journal of Cell Science* 123, 1522–1530.

Filadi, R., Pendin, D., and Pizzo, P. (2018). Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death Dis* 9, 330.

Filseck, J.M. von, Čopič, A., Delfosse, V., Vanni, S., Jackson, C.L., Bourguet, W., and Drin, G. (2015). Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science* 349, 432–436.

von Filseck, J.M., Vanni, S., Mesmin, B., Antonny, B., and Drin, G. (2015). A phosphatidylinositol-4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes. *Nature Communications* 6, 6671.

Fonseca, T.B., Sánchez-Guerrero, Á., Milosevic, I., and Raimundo, N. (2019). Mitochondrial fission requires DRP1 but not dynamins. *Nature* 570, E34–E42.

Friedman, J.R., and Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature* 505, 335–343.

Friedman, J.R., Webster, B.M., Mastronarde, D.N., Verhey, K.J., and Voeltz, G.K. (2010). ER sliding dynamics and ER–mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *The Journal of Cell Biology* 190, 363–375.

Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science* 334, 358–362.

Friedman, J.R., DiBenedetto, J.R., West, M., Rowland, A.A., and Voeltz, G.K. (2013). Endoplasmic reticulum–endosome contact increases as endosomes traffic and mature. *MBoC* 24, 1030–1040.

Furuita, K., Jee, J., Fukada, H., Mishima, M., and Kojima, C. (2010). Electrostatic Interaction between Oxysterol-binding Protein and VAMP-associated Protein A Revealed by NMR and Mutagenesis Studies. *J. Biol. Chem.* 285, 12961–12970.

- G -

Galmes, R., Houcine, A., van Vliet, A.R., Agostinis, P., Jackson, C.L., and Giordano, F. (2016). ORP5/ORP8 localize to endoplasmic reticulum–mitochondria contacts and are involved in mitochondrial function. *EMBO Rep.* 17, 800–810.

Gao, L., Aizaki, H., He, J.-W., and Lai, M.M.C. (2004). Interactions between Viral Nonstructural Proteins and Host Protein hVAP-33 Mediate the Formation of Hepatitis C Virus RNA Replication Complex on Lipid Raft. *Journal of Virology* 78, 3480–3488.

Gatta, A.T., and Levine, T.P. (2017). Piecing Together the Patchwork of Contact Sites. *Trends in Cell Biology* 27, 214–229.

Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., and Drin, G. (2008). HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics* 24, 2101–2102.

Giacomello, M., and Pellegrini, L. (2016). The coming of age of the mitochondria–ER contact: a matter of thickness. *Cell Death Differ* 23, 1417–1427.

Giménez-Andrés, M., Čopič, A., and Antonny, B. (2018). The Many Faces of Amphipathic Helices. *Biomolecules* 8, 45.

Giordano, F., Saheki, Y., Idevall-Hagren, O., Colombo, S.F., Pirruccello, M., Milosevic, I., Gracheva, E.O., Bagriantsev, S.N., Borgese, N., and De Camilli, P. (2013). PI(4,5)P₂-Dependent

and Ca²⁺-Regulated ER-PM Interactions Mediated by the Extended Synaptotagmins. *Cell* *153*, 1494–1509.

Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D.R., Kular, G.S., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J.M., and De Matteis, M.A. (2004). FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat. Cell Biol.* *6*, 393–404.

Gomez-Suaga, P., Paillusson, S., Stoica, R., Noble, W., Hanger, D.P., and Miller, C.C.J. (2017). The ER-Mitochondria Tethering Complex VAPB-PTPIP51 Regulates Autophagy. *Current Biology* *27*, 371–385.

Gong, J., Sun, Z., Wu, L., Xu, W., Schieber, N., Xu, D., Shui, G., Yang, H., Parton, R.G., and Li, P. (2011). Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *J Cell Biol* *195*, 953–963.

Goyal, U., and Blackstone, C. (2013). Untangling the web: Mechanisms underlying ER network formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1833*, 2492–2498.

Guo, Y., Cordes, K.R., Farese, R.V., and Walther, T.C. (2009). Lipid droplets at a glance. *Journal of Cell Science* *122*, 749–752.

Guo, Y., Li, D., Zhang, S., Yang, Y., Liu, J.-J., Wang, X., Liu, C., Milkie, D.E., Moore, R.P., Tulu, U.S., et al. (2018). Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales. *Cell* *175*, 1430-1442.e17.

Gupta, G., and Song, J. (2016). C-Terminal Auto-Regulatory Motif of Hepatitis C Virus NS5B Interacts with Human VAPB-MSP to Form a Dynamic Replication Complex. *PLoS ONE* *11*, e0147278.

Gupta, G., Qin, H., and Song, J. (2012). Intrinsically Unstructured Domain 3 of Hepatitis C Virus NS5A Forms a “Fuzzy Complex” with VAPB-MSP Domain Which Carries ALS-Causing Mutations. *PLoS ONE* *7*, e39261.

- H -

Hamamoto, I., Nishimura, Y., Okamoto, T., Aizaki, H., Liu, M., Mori, Y., Abe, T., Suzuki, T., Lai, M.M.C., Miyamura, T., et al. (2005). Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B. *Journal of Virology* *79*, 13473–13482.

Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., and Nishijima, M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* *426*, 803–809.

Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E.M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P.J., Simmons, Z., and van den Berg, L.H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers* *3*, 17071.

Hegde, R.S., and Keenan, R.J. (2011). Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 787–798.

Helle, S.C.J., Kanfer, G., Kolar, K., Lang, A., Michel, A.H., and Kornmann, B. (2013). Organization and function of membrane contact sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833, 2526–2541.

Herdman, C., and Moss, T. (2016). Extended-Synaptotagmins (E-Syts); the extended story. *Pharmacological Research* 107, 48–56.

Hernández-Alvarez, M.I., Sebastián, D., Vives, S., Ivanova, S., Bartoccioni, P., Kakimoto, P., Plana, N., Veiga, S.R., Hernández, V., Vasconcelos, N., et al. (2019). Deficient Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Phosphatidylserine Transfer Causes Liver Disease. *Cell* 177, 881–895.e17.

Hirabayashi, Y., Kwon, S.-K., Paek, H., Pernice, W.M., Paul, M.A., Lee, J., Erfani, P., Raczkowski, A., Petrey, D.S., Pon, L.A., et al. (2017). ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca²⁺ dynamics in mammalian neurons. *Science* 358, 623–630.

Holthuis, J.C.M., and Levine, T.P. (2005). Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 209–220.

Hönscher, C., Mari, M., Auffarth, K., Bohnert, M., Griffith, J., Geerts, W., van der Laan, M., Cabrera, M., Reggiori, F., and Ungermann, C. (2014). Cellular Metabolism Regulates Contact Sites between Vacuoles and Mitochondria. *Developmental Cell* 30, 86–94.

Hornbeck, P.V., Chabra, I., Kornhauser, J.M., Skrzypek, E., and Zhang, B. (2004). PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *PROTEOMICS* 4, 1551–1561.

Huttlin, E.L., Ting, L., Bruckner, R.J., Gebreab, F., Gygi, M.P., 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.

Huttlin, E.L., Bruckner, R.J., Paulo, J.A., Cannon, J.R., Ting, L., Baltier, K., Colby, G., Gebreab, F., Gygi, M.P., Parzen, H., et al. (2017). Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature* 545, 505–509.

- | -

Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., and Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* 25, 2966–2977.

- K -

Kaiser, S.E., Brickner, J.H., Reilein, A.R., Fenn, T.D., Walter, P., and Brunger, A.T. (2005). Structural Basis of FFAT Motif-Mediated ER Targeting. *Structure* 13, 1035–1045.

- Kakimoto, Y., Tashiro, S., Kojima, R., Morozumi, Y., Endo, T., and Tamura, Y. (2018). Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system. *Scientific Reports* 8.
- Kassan, A., Herms, A., Fernández-Vidal, A., Bosch, M., Schieber, N.L., Reddy, B.J.N., Fajardo, A., Gelabert-Baldrich, M., Tebar, F., Enrich, C., et al. (2013). Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains. *The Journal of Cell Biology* 203, 985–1001.
- Kawano, M., Kumagai, K., Nishijima, M., and Hanada, K. (2006). Efficient Trafficking of Ceramide from the Endoplasmic Reticulum to the Golgi Apparatus Requires a VAMP-associated Protein-interacting FFAT Motif of CERT. *Journal of Biological Chemistry* 281, 30279–30288.
- Kim, S., Leal, S.S., Ben Halevy, D., Gomes, C.M., and Lev, S. (2010). Structural Requirements for VAP-B Oligomerization and Their Implication in Amyotrophic Lateral Sclerosis-associated VAP-B(P56S) Neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 285, 13839–13849.
- Kim, S., Kedan, A., Marom, M., Gavert, N., Keinan, O., Selitrennik, M., Laufman, O., and Lev, S. (2013). The phosphatidylinositol-transfer protein Nir2 binds phosphatidic acid and positively regulates phosphoinositide signalling. *EMBO Rep* 14, 891–899.
- Kim, Y.J., Guzman-Hernandez, M.-L., Wisniewski, E., and Balla, T. (2015). Phosphatidylinositol-Phosphatidic Acid Exchange by Nir2 at ER-PM Contact Sites Maintains Phosphoinositide Signaling Competence. *Developmental Cell* 33, 549–561.
- Kopito, R.R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology* 10, 524–530.
- Kornmann, B. (2010). Le complexe ERMES: Une connexion haut débit entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries. *Med Sci (Paris)* 26, 145–146.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2009). An ER-Mitochondria Tethering Complex Revealed by a Synthetic Biology Screen. *Science* 325, 477–481.
- Kornmann, B., Osman, C., and Walter, P. (2011). The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 14151–14156.
- Korobova, F., Ramabhadran, V., and Higgs, H.N. (2013). An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2. *Science* 339, 464–467.
- Kory, N., Farese, R.V., and Walther, T.C. (2016). Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets. *Trends in Cell Biology* 26, 535–546.
- Kumagai, K., Yasuda, S., Okemoto, K., Nishijima, M., Kobayashi, S., and Hanada, K. (2005). CERT Mediates Intermembrane Transfer of Various Molecular Species of Ceramides. *J. Biol. Chem.* 280, 6488–6495.

Kumagai, K., Kawano-Kawada, M., and Hanada, K. (2014). Phosphoregulation of the Ceramide Transport Protein CERT at Serine 315 in the Interaction with VAMP-associated Protein (VAP) for Inter-organelle Trafficking of Ceramide in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 289, 10748–10760.

Kumar, N., Leonzino, M., Hancock-Cerutti, W., Horenkamp, F.A., Li, P., Lees, J.A., Wheeler, H., Reinisch, K.M., and De Camilli, P. (2018). VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites. *The Journal of Cell Biology* 217, 3625–3639.



Larroquette, F., Seto, L., Gaub, P.L., Kamal, B., Wallis, D., Larivière, R., Vallée, J., Robitaille, R., and Tsuda, H. (2015). *Vapb* /Amyotrophic lateral sclerosis 8 knock-in mice display slowly progressive motor behavior defects accompanying ER stress and autophagic response. *Hum. Mol. Genet.* 24, 6515–6529.

Lee, J.E., Westrate, L.M., Wu, H., Page, C., and Voeltz, G.K. (2016). Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature* 540, 139–143.

Lev, S. (2004). The role of the Nir/rdgB protein family in membrane trafficking and cytoskeleton remodeling. *Experimental Cell Research* 297, 1–10.

Lev, S. (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 739–750.

Lev, S., Halevy, D.B., Peretti, D., and Dahan, N. (2008). The VAP protein family: from cellular functions to motor neuron disease. *Trends in Cell Biology* 18, 282–290.

Levine, T. (2004). Short-range intracellular trafficking of small molecules across endoplasmic reticulum junctions. *Trends in Cell Biology* 14, 483–490.

Levine, T., and Loewen, C. (2006). Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 371–378.

Levine, T.P., and Munro, S. (1998). The pleckstrin homology domain of oxysterol-binding protein recognises a determinant specific to Golgi membranes. *Current Biology* 8, 729–739.

Li, D., Zhao, Y.G., Li, D., Zhao, H., Huang, J., Miao, G., Feng, D., Liu, P., Li, D., and Zhang, H. (2019). The ER-Localized Protein DFCP1 Modulates ER-Lipid Droplet Contact Formation. *Cell Reports* 27, 343-358.e5.

Listenberger, L.L., and Brown, D.A. (2007). Fluorescent detection of lipid droplets and associated proteins. *Current Protocols in Cell Biology* 24–2.

Litvak, V., Dahan, N., Ramachandran, S., Sabanay, H., and Lev, S. (2005). Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. *Nat Cell Biol* 7, 225–234.

Loewen, C.J.R., and Levine, T.P. (2005). A Highly Conserved Binding Site in Vesicle-associated Membrane Protein-associated Protein (VAP) for the FFAT Motif of Lipid-binding Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 280, 14097–14104.

Loewen, C.J., Roy, A., and Levine, T.P. (2003). A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *The EMBO Journal* 22, 2025–2035.

López-Doménech, G., Covill-Cooke, C., Ivankovic, D., Halff, E.F., Sheehan, D.F., Norkett, R., Birsá, N., and Kittler, J.T. (2018). Miro proteins coordinate microtubule- and actin-dependent mitochondrial transport and distribution. *EMBO J.* 37, 321–336.

Losón, O.C., Song, Z., Chen, H., and Chan, D.C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular Biology of the Cell* 24, 659–667.

- M -

Magré, J., Delépine, M., Khallouf, E., Gedde-Dahl, T., Van Maldergem, L., Sobel, E., Papp, J., Meier, M., Mégarbané, A., BSCL Working Group, et al. (2001). Identification of the gene altered in Berardinelli–Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet* 28, 365–370.

Manford, A.G., Stefan, C.J., Yuan, H.L., MacGurn, J.A., and Emr, S.D. (2012). ER-to-Plasma Membrane Tethering Proteins Regulate Cell Signaling and ER Morphology. *Developmental Cell* 23, 1129–1140.

Manor, U., Bartholomew, S., Golani, G., Christenson, E., Kozlov, M., Higgs, H., Spudich, J., and Lippincott-Schwartz, J. (2015). A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. *ELife* 4, e08828.

van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 112–124.

Mendel, I., Yacov, N., Salem, Y., Propheta-Meirán, O., Ishai, E., and Breitbart, E. (2017). Identification of Motile Sperm Domain-Containing Protein 2 as Regulator of Human Monocyte Migration. *The Journal of Immunology* 198, 2125–2132.

Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J., Lacas-Gervais, S., Drin, G., and Antonny, B. (2013). A Four-Step Cycle Driven by PI(4)P Hydrolysis Directs Sterol/PI(4)P Exchange by the ER-Golgi Tether OSBP. *Cell* 155, 830–843.

Mikitova, V., and Levine, T.P. (2012). Analysis of the Key Elements of FFAT-Like Motifs Identifies New Proteins That Potentially Bind VAP on the ER, Including Two AKAPs and FAPP2. *PLoS ONE* 7, e30455.

Modi, S., López-Doménech, G., Halff, E.F., Covill-Cooke, C., Ivankovic, D., Melandri, D., Arancibia-Cárcamo, L., Burden, J.J., Lowe, A.R., and Kittler, J.T. (2019). Dual role of Miro protein clusters in mitochondrial cristae organisation and ER-Mitochondria Contact Sites (*Cell Biology*).

Moffat, J., Grueneberg, D.A., Yang, X., Kim, S.Y., Kloepfer, A.M., Hinkle, G., Piqani, B., Eisenhaure, T.M., Luo, B., Grenier, J.K., et al. (2006). A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. *Cell* 124, 1283–1298.

Moldavski, O., Amen, T., Levin-Zaidman, S., Eisenstein, M., Rogachev, I., Brandis, A., Kaganovich, D., and Schuldiner, M. (2015). Lipid Droplets Are Essential for Efficient Clearance of Cytosolic Inclusion Bodies. *Developmental Cell* 33, 603–610.

Moustaqim-Barrette, A., Lin, Y.Q., Pradhan, S., Neely, G.G., Bellen, H.J., and Tsuda, H. (2014). The amyotrophic lateral sclerosis 8 protein, VAP, is required for ER protein quality control. *Human Molecular Genetics* 23, 1975–1989.

Murphy, S.E., and Levine, T.P. (2016). VAP, a Versatile Access Point for the Endoplasmic Reticulum: Review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861, 952–961.

- N -

Napolitano, G., and Ballabio, A. (2016). TFEB at a glance. *J Cell Sci* 129, 2475–2481.

Nascimbeni, A.C., Giordano, F., Dupont, N., Grasso, D., Vaccaro, M.I., Codogno, P., and Morel, E. (2017). ER–plasma membrane contact sites contribute to autophagosome biogenesis by regulation of local PI3P synthesis. *The EMBO Journal* e201797006.

Ngo, M., and Ridgway, N.D. (2009). Oxysterol Binding Protein–related Protein 9 (ORP9) Is a Cholesterol Transfer Protein That Regulates Golgi Structure and Function. *MBoC* 20, 1388–1399.

Nikawa, J., Murakami, A., Esumi, E., and Hosaka, K. (1995). Cloning and sequence of the SCS2 gene, which can suppress the defect of INO1 expression in an inositol auxotrophic mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* 118, 39–45.

Nishimura, A.L., Mitne-Neto, M., Silva, H.C.A., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J.R.M., Gillingwater, T., Webb, J., et al. (2004). A Mutation in the Vesicle-Trafficking Protein VAPB Causes Late-Onset Spinal Muscular Atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The American Journal of Human Genetics* 75, 822–831.

Nishimura, Y., Hayashi, M., Inada, H., and Tanaka, T. (1999). Molecular Cloning and Characterization of Mammalian Homologues of Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated (VAMP-Associated) Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254, 21–26.

Nissilä, E., Ohsaki, Y., Weber-Boyvat, M., Perttilä, J., Ikonen, E., and Olkkonen, V.M. (2012). ORP10, a cholesterol binding protein associated with microtubules, regulates apolipoprotein B-100 secretion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821, 1472–1484.

Novikoff, P.M. (1971). GOLGI APPARATUS, GERL, AND LYSOSOMES OF NEURONS IN RAT DORSAL ROOT GANGLIA, STUDIED BY THICK SECTION AND THIN SECTION CYTOCHEMISTRY. *The Journal of Cell Biology* 50, 859–886.

- O -

Okegawa, Y., and Motohashi, K. (2015). A simple and ultra-low cost homemade seamless ligation cloning extract (SLiCE) as an alternative to a commercially available seamless DNA cloning kit. *Biochemistry and Biophysics Reports* 4, 148–151.

Olkonen, V.M. (2015). OSBP-Related Protein Family in Lipid Transport over Membrane Contact Sites. *Lipid Insights* 8s1, LPI.S31726.

Olzmann, J.A., and Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20, 137–155.

Orci, L., Glick, B.S., and Rothman, J.E. (1986). A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: Its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell* 46, 171–184.

- P -

Paul, D., Madan, V., and Bartenschlager, R. (2014). Hepatitis C Virus RNA Replication and Assembly: Living on the Fat of the Land. *Cell Host & Microbe* 16, 569–579.

Pennetta, G., Hiesinger, P.R., Fabian-Fine, R., Meinertzhagen, I.A., and Bellen, H.J. (2002). *Drosophila* VAP-33A Directs Bouton Formation at Neuromuscular Junctions in a Dosage-Dependent Manner. *Neuron* 35, 291–306.

Peretti, D., Dahan, N., Shimoni, E., Hirschberg, K., and Lev, S. (2008). Coordinated Lipid Transfer between the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Complex Requires the VAP Proteins and Is Essential for Golgi-mediated Transport. *MBoC* 19, 3871–3884.

Pérez-Sancho, J., Tilsner, J., Samuels, A.L., Botella, M.A., Bayer, E.M., and Rosado, A. (2016). Stitching Organelles: Organization and Function of Specialized Membrane Contact Sites in Plants. *Trends in Cell Biology* 26, 705–717.

Phillips, M.J., and Voeltz, G.K. (2015). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17, 69–82.

Prévost, C., Sharp, M.E., Kory, N., Lin, Q., Voth, G.A., Farese, R.V., and Walther, T.C. (2018). Mechanism and Determinants of Amphipathic Helix-Containing Protein Targeting to Lipid Droplets. *Developmental Cell* 44, 73-86.e4.

Puertollano, R., Ferguson, S.M., Brugarolas, J., and Ballabio, A. (2018). The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization. *The EMBO Journal* 37, e98804.

- R -

Raiborg, C., Wenzel, E.M., Pedersen, N.M., and Stenmark, H. (2016). Phosphoinositides in membrane contact sites. *Biochem. Soc. Trans.* *44*, 425–430.

Rambourg, A., Clermont, Y., and Hermo, L. (1979). Three-dimensional architecture of the Golgi apparatus in Sertoli cells of the rat.

Rapizzi, E., Pinton, P., Szabadkai, G., Wieckowski, M.R., Vandecasteele, G., Baird, G., Tuft, R.A., Fogarty, K.E., and Rizzuto, R. (2002). Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *J Cell Biol* *159*, 613–624.

Raturi, A., and Simmen, T. (2013). Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: The mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1833*, 213–224.

Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* *262*, 744–747.

Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses. *Science* *280*, 1763–1766.

Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., Zwart, W., and Neefjes, J. (2009). Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7–RILP–p150^{Glued} and late endosome positioning. *The Journal of Cell Biology* *185*, 1209–1225.

Rohwedder, A., Zhang, Q., Rudge, S.A., and Wakelam, M.J.O. (2014). Lipid droplet formation in response to oleic acid in Huh-7 cells is mediated by the fatty acid receptor FFAR4. *Journal of Cell Science* *127*, 3104–3115.

Ruby, J.R., Dyer, R.F., and Skalko, R.G. (1969). Continuities between mitochondria and endoplasmic reticulum in the mammalian ovary. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* *97*, 30–37.

- S -

Saheki, Y., and De Camilli, P. (2017). Endoplasmic Reticulum–Plasma Membrane Contact Sites. *Annu. Rev. Biochem.* *86*, 659–684.

Saito, K., Tautz, L., and Mustelin, T. (2007). The lipid-binding SEC14 domain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* *1771*, 719–726.

Salem, Y., Yacov, N., Propheta-Meirani, O., Breitbart, E., and Mendel, I. (2019). Newly characterized motile sperm domain-containing protein 2 promotes human breast cancer metastasis: Promotion of human breast cancer metastasis. *Int. J. Cancer* *144*, 125–135.

- Salo, V.T., Belevich, I., Li, S., Karhinen, L., Vihinen, H., Vigouroux, C., Magré, J., Thiele, C., Hölttä-Vuori, M., Jokitalo, E., et al. (2016). Seipin regulates ER–lipid droplet contacts and cargo delivery. *EMBO J.* *35*, 2699–2716.
- Salo, V.T., Li, S., Vihinen, H., Hölttä-Vuori, M., Szkalitsy, A., Horvath, P., Belevich, I., Peränen, J., Thiele, C., Somerharju, P., et al. (2019). Seipin Facilitates Triglyceride Flow to Lipid Droplet and Counteracts Droplet Ripening via Endoplasmic Reticulum Contact. *Developmental Cell* S1534580719303880.
- Santel, A., and Fuller, M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell. Sci.* *114*, 867–874.
- Santos, M.F., Rappa, G., Karbanová, J., Kurth, T., Corbeil, D., and Lorico, A. (2018). VAMP-associated protein-A and oxysterol-binding protein–related protein 3 promote the entry of late endosomes into the nucleoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* *293*, 13834–13848.
- Saravanan, R.S., Slabaugh, E., Singh, V.R., Lapidus, L.J., Haas, T., and Brandizzi, F. (2009). The targeting of the oxysterol-binding protein ORP3a to the endoplasmic reticulum relies on the plant VAP33 homolog PVA12. *The Plant Journal* *58*, 817–830.
- Schrader, M., Godinho, L.F., Costello, J.L., and Islinger, M. (2015). The different facets of organelle interplay—an overview of organelle interactions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* *3*.
- Schuiki, I., and Daum, G. (2009). Phosphatidylserine decarboxylases, key enzymes of lipid metabolism. *IUBMB Life* *61*, 151–162.
- Schuldiner, M., and Bohnert, M. (2017). A different kind of love – lipid droplet contact sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* *1862*, 1188–1196.
- Schwarz, D.S., and Blower, M.D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 79–94.
- Scorrano, L., De Matteis, M.A., Emr, S., Giordano, F., Hajnóczky, G., Kornmann, B., Lackner, L.L., Levine, T.P., Pellegrini, L., Reinisch, K., et al. (2019). Coming together to define membrane contact sites. *Nature Communications* *10*.
- Scott, C.C., Vacca, F., and Gruenberg, J. (2014). Endosome maturation, transport and functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *31*, 2–10.
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., and Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *18*, 361–374.
- Sha, B., Phillips, S.E., Bankaitis, V.A., and Luo, M. (1998). phosphatidylinositol- transfer protein. *391*, 5.

Shai, N., Yifrach, E., van Roermund, C.W.T., Cohen, N., Bibi, C., Ilst, L., Cavellini, L., Meurisse, J., Schuster, R., Zada, L., et al. (2018). Systematic mapping of contact sites reveals tethers and a function for the peroxisome-mitochondria contact. *Nature Communications* 9.

Shiao, Y.J., Lupo, G., and Vance, J.E. (1995). Evidence that phosphatidylserine is imported into mitochondria via a mitochondria-associated membrane and that the majority of mitochondrial phosphatidylethanolamine is derived from decarboxylation of phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.* 270, 11190–11198.

Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W.A., Palazzo, A.F., Kozlov, M.M., and Rapoport, T.A. (2010). Mechanisms Determining the Morphology of the Peripheral ER. *Cell* 143, 774–788.

Skehel, P., Martin, K., Kandel, E., and Bartsch, D. (1995). A VAMP-binding protein from *Aplysia* required for neurotransmitter release. *Science* 269, 1580–1583.

Skehel, P.A., Fabian-Fine, R., and Kandel, E.R. (2000). Mouse VAP33 is associated with the endoplasmic reticulum and microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 1101–1106.

Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.-L., and van der Bliek, A.M. (2001). Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *MBoC* 12, 2245–2256.

Soni, K.G., Mardones, G.A., Sougrat, R., Smirnova, E., Jackson, C.L., and Bonifacino, J.S. (2009). Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets. *Journal of Cell Science* 122, 1834–1841.

Sood, A., Jeyaraju, D.V., Prudent, J., Caron, A., Lemieux, P., McBride, H.M., Laplante, M., Tóth, K., and Pellegrini, L. (2014). A Mitofusin-2–dependent inactivating cleavage of Opa1 links changes in mitochondria cristae and ER contacts in the postprandial liver. *PNAS* 111, 16017–16022.

Soussan, L., Burakov, D., Daniels, M.P., Toister-Achituv, M., Porat, A., Yarden, Y., and Elazar, Z. (1999). ERG30, a VAP-33–related Protein, Functions in Protein Transport Mediated by COPI Vesicles. *The Journal of Cell Biology* 146, 301–312.

Stefanovic, S., and Hegde, R.S. (2007). Identification of a Targeting Factor for Posttranslational Membrane Protein Insertion into the ER. *Cell* 128, 1147–1159.

Stoica, R., De Vos, K.J., Paillusson, S., Mueller, S., Sancho, R.M., Lau, K.-F., Vizcay-Barrena, G., Lin, W.-L., Xu, Y.-F., Lewis, J., et al. (2014). ER–mitochondria associations are regulated by the VAPB–PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nature Communications* 5.

Stone, S.J., and Vance, J.E. (2000). Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *J. Biol. Chem.* 275, 34534–34540.

Suárez-Rivero, J., Villanueva-Paz, M., de la Cruz-Ojeda, P., de la Mata, M., Cotán, D., Oropesa-Ávila, M., de Laveria, I., Álvarez-Córdoba, M., Luzón-Hidalgo, R., and Sánchez-Alcázar, J. (2016). Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases. *Diseases* 5, 1.

Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M.R., Cavagna, D., Nagy, A.I., Balla, T., and Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *The Journal of Cell Biology* 175, 901–911.

- T -

Takeuchi, A., Kim, B., and Matsuoka, S. (2015). The destiny of Ca²⁺ released by mitochondria. *J Physiol Sci* 65, 11–24.

Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., and Fujimoto, T. (2002). The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44507–44512.

- V -

Valm, A.M., Cohen, S., Legant, W.R., Melunis, J., Hershberg, U., Wait, E., Cohen, A.R., Davidson, M.W., Betzig, E., and Lippincott-Schwartz, J. (2017). Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature* 546, 162–167.

Vance, J.E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265, 7248–7256.

Vance, J.E. (2014). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841, 595–609.

Venditti, R., Rega, L.R., Masone, M.C., Santoro, M., Polishchuk, E., Sarnataro, D., Paladino, S., D’Auria, S., Varriale, A., Olkkonen, V.M., et al. (2019a). Molecular determinants of ER–Golgi contacts identified through a new FRET–FLIM system. *The Journal of Cell Biology* jcb.201812020.

Venditti, R., Masone, M.C., Rega, L.R., Di Tullio, G., Santoro, M., Polishchuk, E., Serrano, I.C., Olkkonen, V.M., Harada, A., Medina, D.L., et al. (2019b). The activity of Sac1 across ER–TGN contact sites requires the four-phosphate-adaptor-protein-1. *The Journal of Cell Biology* jcb.201812021.

Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., and Rapoport, T.A. (2006). A Class of Membrane Proteins Shaping the Tubular Endoplasmic Reticulum. *Cell* 124, 573–586.

- W -

Wang, X., and Schwarz, T.L. (2009). The Mechanism of Ca²⁺-Dependent Regulation of Kinesin-Mediated Mitochondrial Motility. *Cell* 136, 163–174.

Wang, H., Becuwe, M., Housden, B.E., Chitraju, C., Porras, A.J., Graham, M.M., Liu, X.N., Thiam, A.R., Savage, D.B., Agarwal, A.K., et al. (2016a). Seipin is required for converting nascent to mature lipid droplets. *ELife* 5, e16582.

Wang, P., Richardson, C., Hawkins, T.J., Sparkes, I., Hawes, C., and Hussey, P.J. (2016b). Plant VAP27 proteins: domain characterization, intracellular localization and role in plant development. *New Phytol* 210, 1311–1326.

Watari, H., Arakane, F., Moog-Lutz, C., Kallen, C.B., Tomasetto, C., Gerton, G.L., Rio, M.-C., Baker, M.E., and Strauss, J.F. (1997). MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 8462–8467.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., et al. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* 46, W296–W303.

Weir, M.L., Klip, A., and Trimble, W.S. (1998). Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): a broadly expressed protein that binds to VAMP. *Biochem. J.* 333, 247–251.

Weir, M.L., Xie, H., Klip, A., and Trimble, W.S. (2001). VAP-A Binds Promiscuously to both v- and tSNAREs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286, 616–621.

Weixel, K.M., Blumental-Perry, A., Watkins, S.C., Aridor, M., and Weisz, O.A. (2005). Distinct Golgi Populations of Phosphatidylinositol 4-Phosphate Regulated by Phosphatidylinositol 4-Kinases. *J. Biol. Chem.* 280, 10501–10508.

Wilfling, F., Wang, H., Haas, J.T., Krahmer, N., Gould, T.J., Uchida, A., Cheng, J.-X., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F., et al. (2013). Triacylglycerol Synthesis Enzymes Mediate Lipid Droplet Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets. *Developmental Cell* 24, 384–399.

Wilhelm, L.P., Tomasetto, C., and Alpy, F. (2016). Touche! STARD3 and STARD3NL tether the ER to endosomes. *Biochemical Society Transactions* 44, 493–498.

Wilhelm, L.P., Wendling, C., Védie, B., Kobayashi, T., Chenard, M., Tomasetto, C., Drin, G., and Alpy, F. (2017). STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *The EMBO Journal* 36, 1412–1433.

Woźniak, M.J., Bola, B., Brownhill, K., Yang, Y.-C., Levakova, V., and Allan, V.J. (2009). Role of kinesin-1 and cytoplasmic dynein in endoplasmic reticulum movement in VERO cells. *J. Cell. Sci.* 122, 1979–1989.

Wu, H., Carvalho, P., and Voeltz, G.K. (2018). Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *CELL BIOLOGY* 11.

Wu, L., Xu, D., Zhou, L., Xie, B., Yu, L., Yang, H., Huang, L., Ye, J., Deng, H., Yuan, Y.A., et al. (2014). Rab8a-AS160-MSS4 Regulatory Circuit Controls Lipid Droplet Fusion and Growth. *Developmental Cell* 30, 378–393.

- X -

Xu, D., Li, Y., Wu, L., Li, Y., Zhao, D., Yu, J., Huang, T., Ferguson, C., Parton, R.G., Yang, H., et al. (2018). Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions. *The Journal of Cell Biology* jcb.201704184.

- Y -

Yamamoto, Y., and Sakisaka, T. (2012). Molecular Machinery for Insertion of Tail-Anchored Membrane Proteins into the Endoplasmic Reticulum Membrane in Mammalian Cells. *Molecular Cell* 48, 387–397.

Yen, C.-L.E., Stone, S.J., Koliwad, S., Harris, C., and Farese, R.V. (2008). *Thematic Review Series: Glycerolipids*. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J. Lipid Res.* 49, 2283–2301.

Yeshaw, W.M., van der Zwaag, M., Pinto, F., Lahaye, L.L., Faber, A.I., Gómez-Sánchez, R., Dolga, A.M., Poland, C., Monaco, A.P., van IJendoorn, S.C., et al. (2019). Human VPS13A is associated with multiple organelles and influences mitochondrial morphology and lipid droplet motility. *ELife* 8, e43561.

- Z -

Zhao, K., and Ridgway, N.D. (2017). Oxysterol-Binding Protein-Related Protein 1L Regulates Cholesterol Egress from the Endo-Lysosomal System. *Cell Reports* 19, 1807–1818.

Zhao, Y.G., Liu, N., Miao, G., Chen, Y., Zhao, H., and Zhang, H. (2018). The ER Contact Proteins VAPA/B Interact with Multiple Autophagy Proteins to Modulate Autophagosome Biogenesis. *Current Biology* 28, 1234-1245.e4.

Les organites sont des compartiments fonctionnels au sein des cellules eucaryotes. Ils ont longtemps été considérés comme étant séparés les uns des autres, mais l'avancée des connaissances en biologie cellulaire a montré qu'ils communiquaient et s'associaient pour former un réseau dynamique interconnecté. L'établissement de sites de contact membranaire ou SCM, issus des jeux d'interactions protéine-protéine et/ou protéine-membrane, permet de créer des connexions physiques entre deux organites distincts. Les SCM représentent un des principaux modes de communication entre les organites. Le champ disciplinaire des SCM s'enrichit constamment grâce à la découverte de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans l'attachement des organites entre eux. C'est dans ce contexte de recherche que nous avons identifié un nouvel acteur impliqué dans la formation de SCM, appelé MOSPD2 (motile sperm domain-containing protein 2). La protéine MOSPD2 est présente dans l'organite cellulaire le plus étendu de la cellule, le réticulum endoplasmique ou RE. Elle y est ancrée à sa surface grâce à un domaine transmembranaire. Cette protéine possède deux autres domaines nommés MSP (major sperm protein) et CRAL-TRIO (cellular retinaldehyde-binding protein et triple functional domain protein). Par l'intermédiaire de son domaine MSP, MOSPD2 interagit avec de nombreuses protéines dont la caractéristique commune est de posséder un court motif protéique nommé FFAT (two phenylalanines in an acidic tract). Par les jeux d'associations avec ses partenaires protéiques présents sur différents organites, MOSPD2 permet l'établissement de contacts entre le RE et les endosomes, les mitochondries et l'appareil de Golgi. Par un autre mécanisme moléculaire, MOSPD2 est également retrouvée au niveau des SCM entre le RE et les gouttelettes lipidiques (GL). Cette localisation implique le domaine CRAL-TRIO qui reconnaît la membrane des GL. Ces résultats montrent une nouvelle façon de piéger des organites dans le grand filet cytoplasmique qu'est le RE.

Mots clés : réticulum endoplasmique, site de contact membranaire, protéines VAPs, gouttelettes lipidiques.

Organelles are functional compartments of eukaryotic cells. For a long time, they were considered to be separated from each other, but advances in cell biology have shown that they communicate and associate to form a dynamic interconnected network. The establishment of membrane contact sites or MCS, mediated by protein-protein and/or protein-membrane interactions, enables the creation of physical connections between two distinct organelles. MCS are recognized as one of the main modes of communication between organelles. The field of MCS is constantly expanding thanks to the discovery of new molecular actors involved in organelle tethering. It is in this research context that we have identified MOSPD2 (motile sperm domain-containing protein 2) as a new factor involved in MCS formation. The MOSPD2 protein is located in the most extensive cellular organelle of the cell, the endoplasmic reticulum or ER. It is anchored to its surface through a transmembrane domain. This protein has two other domains named MSP (major sperm protein) and CRAL-TRIO (cellular retinaldehyde-binding protein and triple functional domain protein). Through its MSP domain, MOSPD2 interacts with many proteins which common feature is to have a short protein motif called FFAT (two phenylalanines in an acidic tract). By binding with its protein partners present at the surface of different organelles, MOSPD2 establishes physical contacts between the ER and endosomes, mitochondria and the Golgi apparatus. By another molecular mechanism, MOSPD2 is also found at sites of contact between the ER and lipid droplets (LD). This location involves the CRAL-TRIO domain, which is able to bind the LD membrane. Collectively, these results show how a large net covering the entire cytoplasm made by the ER can trap a large variety of cellular organelles.

Keywords: endoplasmic reticulum, membrane contact site, VAP proteins, lipid droplets.