

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)

CNRS UMR 7104 – INSERM U1258 – Université de Strasbourg – Illkirch, France

THÈSE

Présentée par :

Mehdi ZOUIOUCH

Soutenue le : **05 Mai 2023**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Sciences de la Vie et de la Santé**

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

MOSPD2 et sites de contact membranaire : une protéine à plusieurs facettes

THÈSE dirigée par :

Docteur ALPY Fabien

DR INSERM, IGBMC, Université de Strasbourg

RAPPORTRICES externes :

Docteur COPIC Alenka

DR CNRS, CRBM, Université de Montpellier

Docteur FOUFELLE Fabienne

DR INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris

EXAMINATEUR interne :

Docteur VITALE Nicolas

DR INSERM, INCI, Université de Strasbourg

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
LISTE D'ABREVIATIONS	4
LISTE DES ILLUSTRATIONS	7
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	9
INTRODUCTION	10
A. Les membranes cellulaires	11
1. Les différents composants des membranes cellulaires	11
2. Adressage et distribution des différents composants membranaires	19
B. Sites de contacts membranaires (MCS) et homéostasie cellulaire	32
1. Généralités sur les MCS	32
2. Mécanismes moléculaires permettant la formation des MCS : exemple des protéines VAPs	33
3. Facteurs connus permettant la régulation des MCS	35
4. Fonctions moléculaires associées aux MCS	37
5. Rôle du ER dans le cycle de vie des gouttelettes lipidiques	38
6. Perturbations des LDs et pathologies : exemple du cancer	42
7. Régulation du système endosomal par le ER	44
C. MOSPD2, une protéine d'ancrage membranaire impliquée dans le cancer	50
1. MOSPD2 est capable de former des MCS via son domaine MSP	50
2. Structure des domaines CRAL-TRIO et leur implication biologique chez l'humain	52
3. MOSPD2, migration cellulaire et cancer	55
D. Objectifs du projet de thèse	57
RESULTATS	59
A. MOSPD2 forme des sites de contact membranaires entre le réticulum endoplasmique et les gouttelettes lipidiques grâce à son domaine CRAL-TRIO	60
1. Introduction et objectifs	60
2. Résultats	60
3. Expériences complémentaires à la publication	63
B. MOSPD2 est impliquée dans la régulation du système endosomal tardif via son domaine MSP	69

1. Introduction et objectifs	69
2. Résultats	69
C. Matériel et méthodes	99
DISCUSSION	101
A. MOSPD2 est impliquée dans l'homéostasie des LDs	102
1. MOSPD2 forme des contacts ER-LD via son domaine CRAL-TRIO	102
2. MOSPD2 et LDs : un rôle d'ancrage et bien plus encore	104
B. La répartition subcellulaire de MOSPD2 est dictée par l'interaction de ses différents domaines avec les membranes	111
1. MOSPD2 est recrutée dans différents sites de contact	111
2. Le métabolisme du cholestérol est-il le lien entre les différentes localisations de MOSPD2 ?	112
C. VAPA, VAPB et MOSPD2 : des protéines ubiquitaires au mécanisme d'action similaire	115
1. En comparaison aux protéines VAPs, MOSPD2 interagit de manière plus stable avec STARD3	115
2. VAPs et MOSPD2 : des protéines pas si redondantes ?	116
D. MOSPD2 régule le cycle de maturation du système endosomal tardif	119
1. MOSPD2 modifie le nombre d'endolysosomes grâce au domaine MSP	119
2. La modulation des endosomes tardifs médiée par MOSPD2 dépend de son interaction avec la protéine STARD3	121
3. Les contacts ER-E médiés par le complexe MOSPD2:STARD3 altèrent la distribution du cholestérol aux endosomes	122
4. Quel est le rôle fonctionnel des contacts médiés par MOSPD2 sur le cycle endosomal ?	126
CONCLUSION	131
BIBLIOGRAPHIE	134

REMERCIEMENTS

Je remercie l'ITMO Cancer AVIESAN pour m'avoir financé durant 3 ans dans le cadre du Plan Cancer. Merci également à l'ARC m'ayant financé pour 6 mois.

Un grand merci aux membres du jury, Dr Copic Alenka, Dr Fougère Fabienne et Dr Vitale Nicolas d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit et juger mon travail.

Je tiens à remercier également les membres de mon comité de suivi de thèse, Nicolas Vitale (encore une fois !) et Joachim Lupberger pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon projet et leurs retours très instructifs.

Merci à mon directeur de thèse, Fabien Alpy, qui m'a encadré sans jamais me restreindre pendant ces (presque) 4 ans. J'ai eu la liberté d'aborder mon projet comme je le voulais, ce qui m'a permis de découvrir la microscopie photonique et la joie de l'analyse d'images ! Merci pour ton aide et tes nombreux conseils grâce auxquels j'ai pu trouver ma voie.

Je tiens également à remercier Catherine Tomasetto qui a cru en moi et m'a accepté dans son laboratoire. Vous avez toujours été honnête, franche et disponible.

Aux membres de l'équipe avec qui j'ai partagé ces quelques années, je vous remercie du fond du cœur pour votre accueil et gentillesse. A Corinne, la (grande) maman du laboratoire, la source de savoir et de potins de l'institut : merci à toi pour les précieux conseils et tous les bons moments que l'on a passé ensemble. A Arthur, avec qui j'ai partagé tellement de choses : je te souhaite beaucoup de bonheur à toi, Charlotte et ta future princesse ! Nos nombreuses conversations me manqueront. A Julie, aka Vomito : ne force pas trop sur la bouteille, ni sur les sushis. J'ai été heureux de partager mon box avec toi, je te lègue la mascotte du labo et mon magnifique portoir rose. Si tu pouvais également envoyer des ondes positives à Lundi, ça serait sympa de la garder en vie... A Amélie, celle qui mange plus vite que son ombre : ta capacité à apprécier la nourriture du RU (la sauce blanche, beurk) m'impressionnera toujours. Ta bonne humeur légendaire me manquera, mais je suis sûr que l'on se reverra au vu de tes nombreux voyages (sans pression) ! Merci à mes collègues de box pour la bonne ambiance au quotidien : Sophie, l'amie des abeilles, et Catherine R., la pro des PCR ! Bon courage à Céline pour la suite du projet ! Une petite pensée aux anciens du laboratoire et de l'institut, Thomas, Laetitia, Duygu, Mélanie et Jacques, vous avez été adorables. Je vous souhaite à tous plein de belles choses et merci pour tout.

Merci aux différentes plateformes de l'institut qui nous facilitent la vie au quotidien, plus particulièrement la plateforme de microscopie où j'ai passé beaucoup (trop ?) d'heures. Un grand merci à nos collaborateurs, plus particulièrement Toshihide et Nario pour leur précieuse aide.

Aux membres de ma famille et leur soutien éternel.

A Pauline et son amour inconditionnel.

A la mémoire de mes proches disparus.

LISTE D'ABREVIATIONS

ACAT: acetyl-CoA acetyltransferase	CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats
ACBD: acyl-CoA-binding domain containing protein	DAG: diacylglycerol
ACSL: long-chain acyl-CoA synthetase	DFCP1: double FYVE-containing protein 1
AGPAT: 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase	DGAT: diacylglycerol O-acyltransferase
AH(s): amphipathic helix(es)	DGK: diacylglycerol kinase
Akt: protein kinase B	EE: early endosome
ANOVA: analysis of variance	E-E: endosome – endosome contact site
APPL1: adaptor protein phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1	EEA1: early endosome antigen 1
ARF: ADP ribosylation factor	EGF: epidermal growth factor
ATP: adenosine triphosphate	EGFR: epidermal growth factor receptor
BAR (domain): Bin/Amphiphysin/Rvs domain	EL: endolysosome
BLI: biolayer interferometry	EM: electron microscopy
BMP/LBPA: bis(monoacylglycerol)phosphate/lysobisphosphatidic acid	ER: endoplasmic reticulum
BSA: bovine serum albumin	ER-E: endoplasmic reticulum – endosome contact site
CCT: chaperonin containing tailless complex polypeptide 1	ERK: extracellular signal-regulated kinase
CFAP65: cilia and flagella-associated protein 65	ER-LD: endoplasmic reticulum – lipid droplet contact site
CHMP1B: charged multivesicular body protein 1b	ESCRT: endosomal sorting complexes required for transport
CIDEA: cell death inducing DFFA like effector A	FAM21: family with sequence similarity 21
CMA: chaperon-mediated autophagy	FATP1: fatty acid transport protein 1
CRAL-TRIO (domain): cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) and triple functional domain protein (TRIO) domain	FFAT: two phenylalanines (FF) in an acidic tract
	FFNT: two phenylalanines (FF) in a neutral tract
	FIT: fat storage-inducing transmembrane protein
	FL: full length
	FRAP: fluorescence recovery after photobleaching
	FRB-FKBP: FK506-rapamycin binding – FK506-binding protein

FYVE (domain): Fab1p, YOTB, Vac1p and EEA1 domain

GPCR(s): G-coupled protein receptor(s)

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GFP: green fluorescent protein

GPAT: glycerol-3-phosphate acyltransferase

GPL(s): glycerophospholipid(s)

IDR: intrinsically disordered region

IF: immunofluorescence

ILV: intraluminal vesicle

KA1 (domain): kinase associated-1 domain

KD: knock-down

KO: knock-out

Kv: voltage-gated potassium channel

LAMP1: lysosomal associated membrane protein 1

(MAP1)LC3: microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

LD(s): lipid droplet(s)

LDL: low density lipoprotein

LDLR: low density lipoprotein receptor

LE: late endosome

LPA: lysophosphatidic acid

LPC: lysophosphocholine

LPDS: lipoprotein-deficient serum

LTD(s): lipid-binding domain(s)

LTP(s): lipid-transfer protein(s)

MCS: membrane contact site

MCTP2: multiple C2 and transmembrane domain containing 2

MDA-MB: M.D. Anderson metastasis breast cancer

MIGA2: mitoguardin 2

MIT (domain): microtubule interacting and transport domain

MOSPD: motile sperm domain containing protein

MPR: mannose phosphate receptor

MSP (domain): major sperm protein domain

mTOR: mechanistic target of rapamycin

MVB: multivesicular body

NBD: nitrobenzoxadiazole

NPC1: Niemann-Pick disease type C1

NRZ: NAG, RINT1 and ZW10

ORP(s): OSBP-related protein(s)

OSBP: oxysterol-binding protein

PA: phosphatidic acid

PAP: phosphatidic acid phosphatase

PBS: phosphate-buffered saline

PC: phosphatidylcholine

PCR: polymerase chain reaction

PE: phosphatidylethanolamine

PFA: paraformaldehyde

PFO: perfringolysin O

PG: phosphatidylglycerol

PH (domain): pleckstrin homology domain

pH: potential of hydrogen

PI: phosphatidylinositol

PIKfyve: FYVE finger-containing phosphoinositide kinase

PIP: phosphatidylinositol phosphate

PITP: phosphatidylinositol transfer protein alpha

PLA: phospholipase A

PLD: phospholipase D

PLIN: perilipin

PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor alpha

PS: phosphatidylserine
PTPIP51: protein tyrosine phosphatase interacting protein 51
PUFA: polyunsaturated fatty acid
PX (domain): phox homology domain
Rab: Ras-associated binding
RILP: Rab-interacting lysosomal protein
RNA: ribonucleic acid
RNF26: RING finger protein 26
S1P: sphingosine-1-phosphate
SCARB1: scavenger receptor class B type 1
SCD1: acyl-CoA desaturase 1
SE(s): sterol ester(s)
siRNA: small interfering ribonucleic acid
SL(s): sphingolipid(s)
SNX: sorting nexin
SPR: surface plasmon resonance
SQSTM1: sequestosome-1

SREBP: sterol regulatory element-binding protein
STARD: star-related lipid transfer domain containing protein
START (domain): steroidogenic acute regulatory protein related lipid transfer domain
TAG(s): triacylglycerol(s)
TMCC1: transmembrane and coiled-coil domain family 1
TOLLIP: toll-interacting protein
UBE2J1: ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1
VAP(s): vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein(s)
VPS: vacuolar protein sorting
WASH: Wiskott-Aldrich Syndrome Protein and SCAR homolog
WT: wild type
α-TTP: alpha-tocopherol transfer protein

LISTE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

Figure I1 : Représentation des trois grands groupes de lipides membranaires et de leur diversité

Figure I2 : Interdépendance des différents composants membranaires et propriétés biophysiques associées

Figure I3 : Les compositions membranaires définissent l'identité des organites et leur morphologie variable

Figure I4 : Les différentes voies d'adressage des protéines transmembranaires aux organites

Figure I5 : Les différents types d'interaction des protéines périphériques avec les membranes

Figure I6 : Voies de synthèse des lipides membranaires

Figure I7 : Les différents modes de transport de lipides entre organites

Figure I8 : Etapes du transfert de lipides entre deux membranes par un LTP

Figure I9 : Sites de contact membranaires entre le réticulum endoplasmique et des endosomes

Figure I10 : Formation et maintien des sites de contact membranaires par les protéines VAPs et MOSPD2

Figure I11 : Biogenèse des gouttelettes lipidiques

Figure I12 : Cycle de maturation du système endosomal et les différents compartiments le composant

Figure I13 : Structure et localisation des protéines VAPs et MOSPD2

Figure I14 : Structure du domaine CRAL-TRIO avec ou sans ligand

RESULTATS

Figure R1 : Le domaine CRAL-TRIO de MOSPD2 est capable de lier certains phospholipides *in vitro*.

Figure R2 : MOSPD2, via son domaine CRAL-TRIO, induit une relocalisation subcellulaire du PA à l'interface ER-LD

Figure R3 : Synthèse du processus d'analyse d'images pour la quantification des endosomes tardifs

Figure R4 : La perte d'expression de MOSPD2 induit une altération des endosomes tardifs

Figure R5 : La perte d'expression de MOSPD2 n'induit pas d'altération morphologique des endosomes précoces

Figure R6 : MOSPD2 régule le nombre d'endolysosomes actifs

Figure R7 : Etapes principales du processus d'analyse d'images pour la quantification des endosomes tardifs lors de la surexpression de protéines

Figure R8 : Le domaine MSP de MOSPD2 est nécessaire pour restaurer l'homéostasie des endosomes tardifs

Figure R9 : La perte d'expression de STARD3 induit une altération morphologique des endosomes tardifs équivalente à celle de MOSPD2

Figure R10 : La présence de STARD3 est indispensable pour que MOSPD2 puisse restaurer l'homéostasie des endosomes tardifs

Figure R11 : Etapes-clés du processus d'analyse d'images pour la quantification de la sonde filipin.

Figure R12 : La perte d'expression de MOSPD2 induit une hausse de cholestérol à la surface des endosomes tardifs

Figure R13 : La perte d'expression de MOSPD2 ou de STARD3 entraîne une relocalisation subcellulaire du cholestérol à la membrane limitante des endosomes tardifs

Figure R14 : L'absence de MOSPD2 peut être compensée en surexprimant des protéines partenaires fonctionnelles

Figure R15 : La surexpression de STARD3 et non de MOSPD2 induit une altération fonctionnelle des endosomes tardifs

DISCUSSION

Figure D1 : Différentes hypothèses de la fonction médiée par MOSPD2 aux contacts ER-LD

Figure D2 : MOSPD2 forme de multiples MCS par deux mécanismes distincts

Figure D3 : STARD3 forme un complexe d'interaction plus stable avec MOSPD2 qu'avec les protéines VAPs

Figure D4 : Rôle des contacts ER-E médiés par MOSPD2 sur le cycle de maturation du système endosomal tardif

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Liste de publications

- MOSPD2 is an endoplasmic reticulum-lipid droplet tether functioning in LD homeostasis. **Mehdi Zouiouich**, Thomas Di Mattia, Arthur Martinet, Julie Eichler, Corinne Wendling, Nario Tomishige, Erwan Grandgirard, Nicolas Pascal JeanPaul Fuggetta, Catherine Fromental-Ramain, Giulia Mizzon, Calvin Dumesnil, Maxime Carpentier, Bernardo Reina-San-Martin, Carole Mathelin, Yannick Schwab, Abdou Rachid Thiam, Toshihide Kobayashi, Guillaume Drin, Catherine Laure Tomasetto, Fabien Alpy. Journal of Cell Biology, 2022. DOI: 10.1083/jcb.202110044

Liste de communications

- Lipid droplets and oleosomes, 2nd edition. Strasbourg, France, le 3 décembre 2021. Communication orale.
- Journées Campus Illkirch. Illkirch, France, le 23 mai 2022. Communication orale.
- Club Exo-Endo 24^{ième} édition. Munster, France, le 16 juin 2022. Poster.
- Journées Jeunes Chercheurs, ARC. Paris, France, le 21 novembre 2022. Poster.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

A. Les membranes cellulaires

Les cellules eucaryotes possèdent une architecture complexe, définie par la présence d'une forte compartimentalisation des fonctions cellulaires dans des sous-unités appelées organites. A l'image de la cellule et sa membrane plasmique, ces compartiments cellulaires sont le plus souvent délimités par une membrane. Les membranes exercent, entre autres, un rôle structural et sont constituées de nombreux lipides et de protéines. Les membranes biologiques jouent également un rôle fonctionnel crucial dans la communication entre les organites, essentielle au bon fonctionnement de la cellule.

En résumé, les membranes cellulaires sont des éléments fondamentaux de la structure et la fonction des cellules eucaryotes. Elles maintiennent la compartimentalisation des cellules et certains organites tout en régulant l'échange de substances entre ces compartiments, contribuant ainsi à l'homéostasie de la cellule et de l'organisme.

1. Les différents composants des membranes cellulaires

b. Les lipides

Les lipides, constituants majoritaires des membranes biologiques, sont le plus souvent définis comme des molécules insolubles dans l'eau mais solubles dans des solvants organiques (Fahy et al. 2011). Cette définition assez vague et parfois trompeuse (certains lipides sont solubles dans l'eau), englobe de nombreuses molécules. En effet, il existe plus d'un millier de types de lipides, variant selon les organismes et types cellulaires (Corradi et al. 2019). Les trois grands groupes de lipides retrouvés majoritairement dans les membranes cellulaires correspondent aux glycérophospholipides, les stérols et les sphingolipides (Figure I1) (Harayama and Riezman 2018).

INTRODUCTION

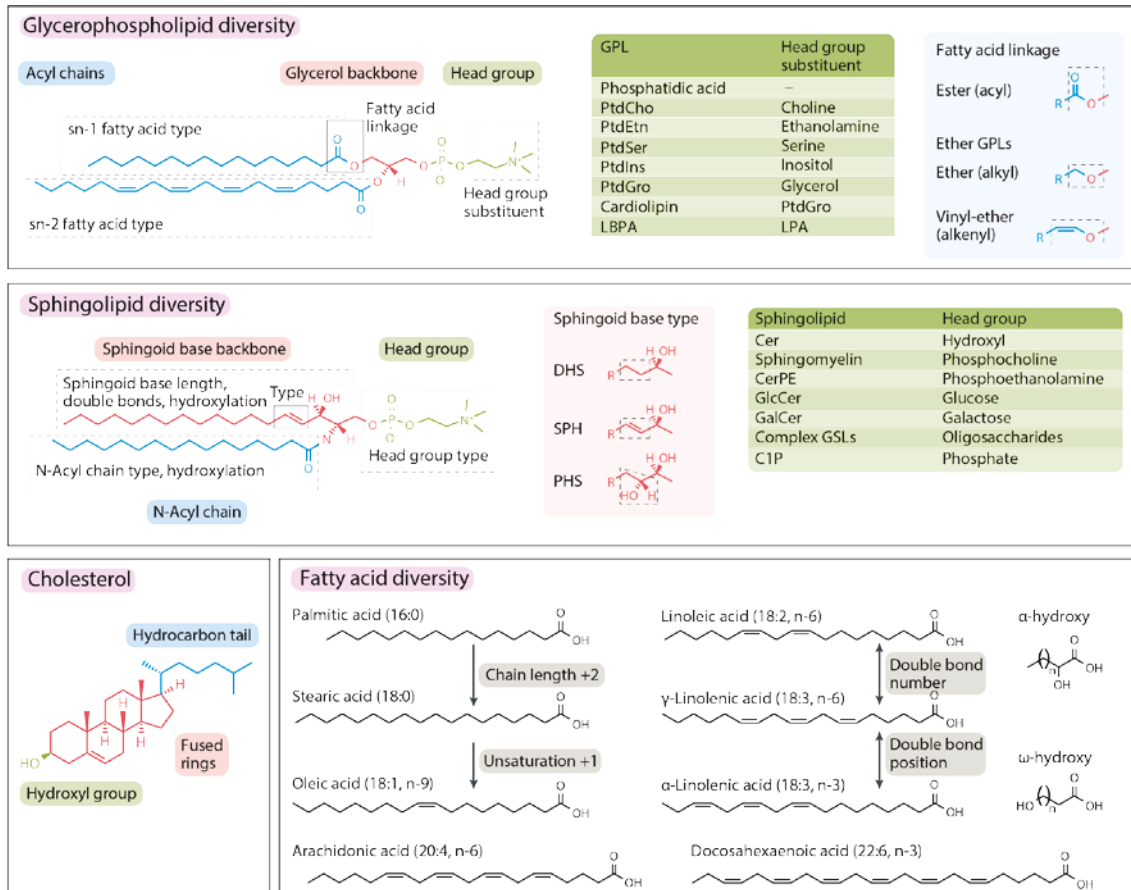


Figure I1. Représentation des trois grands groupes de lipides membranaires et de leur diversité.

Ces trois groupes correspondent aux glycérophospholipides (GPL), aux sphingolipides (SL) et aux stérols (représentés ici par le cholestérol, composant majoritaire de cette classe). Ces lipides peuvent varier selon la nature des chaînes aliphatiques, le type de liaison de ces chaînes et le résidu constituant la tête polaire.

Figure adaptée de Harayama and Riezman, 2018.

Les glycérophospholipides (GPLs) correspondent à la classe la plus abondante de lipides dans les membranes cellulaires avec une proportion d'environ 75% (Dowhan and Bogdanov 2002). Ils sont composés d'un squelette de glycérol, de deux chaînes d'acides gras et d'un groupe phosphate. Le groupe phosphate rend les glycérophospholipides polaires, ce qui leur permet d'interagir avec l'eau et d'autres substances polaires, tandis que les chaînes d'acides gras sont hydrophobes, ce qui leur permet de s'associer et de former une membrane stable. Les différents types de GPLs proviennent d'une différence de résidu accolé à la tête polaire. Chaque classe de phospholipides comprend à son tour de nombreuses espèces moléculaires, c'est-à-dire des molécules qui ont le même groupement au niveau de la tête mais qui diffèrent par leurs chaînes acyles (Hermansson, Hokynar, and Somerharju 2011). Les deux principaux types de glycérophospholipides sont la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) (van Meer, Voelker, and Feigenson 2008). La PC est le GPL

INTRODUCTION

le plus abondant des membranes biologiques et est importante pour maintenir l'intégrité structurelle de la membrane. La PE est également abondante dans les membranes biologiques et joue un rôle dans les événements de fusion et fission membranaires. D'autres types importants de glycérophospholipides comprennent le phosphatidylinositol (PI) et ses dérivés phosphorylés (PIPs), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylglycérol (PG).

Les sphingolipides (SLs) sont des lipides dérivés de la sphingosine, un alcool gras sur lequel un acide gras se greffe par une liaison amide pour former un céramide. Les SLs les plus abondants sont la sphingomyéline et les glycosphingolipides (van Meer, Voelker, and Feigenson 2008). La sphingomyéline jouent notamment un rôle structural important dans les membranes, en modulant leur fluidité via la densité lipidique (Holthuis and Menon 2014). Ce sont également des lipides pouvant interagir avec le cholestérol (au niveau des domaines liquide-ordonnés) et capables de se lier à certaines protéines (Levental and Lyman 2022). Les SLs sont les lipides structuraux les plus abondants derrière les GPLs (Casares, Escribá, and Rosselló 2019).

Les stérols sont des lipides très peu polaires représentés majoritairement par le cholestérol. Ces lipides sont constitués d'un noyau à 4 cycles (noyau cyclopentanoperhydrophénanthrène) et d'un groupe hydroxyle en position 3. Le cholestérol joue un rôle structural très important dans la fluidité et la stabilité des bicouches lipidiques en régulant le niveau d'empaquetage des lipides et la diffusion latérale (Maxfield and Mondal 2006). Ce lipide est également capable de former des microdomaines membranaires (domaines liquide-ordonnés) impliqués dans le recrutement de certaines protéines ou induisant leur changement conformationnel (Levental and Lyman 2022). En plus de leur rôle structural dans la membrane cellulaire, les stérols jouent également des rôles fonctionnels importants dans l'organisme. Par exemple, le cholestérol est impliqué dans la synthèse d'hormones, d'acides biliaires et de vitamine D (Schoop et al. 2021).

c. Les protéines membranaires

Les protéines sont des molécules biologiques complexes constituées d'acides aminés et capables de remplir de nombreuses fonctions essentielles à l'homéostasie cellulaire. Les protéines membranaires correspondent à une classe très variée avec diverses activités uniques, interagissant de manière constitutive ou transiente avec les membranes (Wojcik and Kriechbaumer 2021). On retrouve dans cette catégorie des protéines indispensables telles que les canaux ioniques, des pompes à efflux, les protéines de jonctions membranaires, etc. On distingue deux grandes classes de protéines membranaires : les protéines membranaires intégrales (ou intrinsèques) et les protéines membranaires

INTRODUCTION

périphériques (ou extrinsèques) (Boes, Godoy-Hernandez, and McMillan 2021). La distinction entre ces deux classes se fait selon le mode d'interaction avec la membrane biologique.

Les protéines membranaires intégrales (ou transmembranaires) sont directement intégrés dans la membrane, elles contiennent donc un ou plusieurs domaines transmembranaires hydrophobes interagissant avec les lipides (Hegde and Keenan 2022). Ces protéines représentent à elles seules environ 25% du nombre total de protéines codées chez l'Homme (Krogh et al. 2001). On retrouve dans cette catégorie par exemple les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), permettant la transduction de nombreux signaux moléculaires comme les hormones ou les neurotransmetteurs (Cherezov et al. 2007).

Les protéines membranaires périphériques se retrouvent d'un seul côté de la membrane et interagissent soit directement avec les lipides membranaires, soit avec des protéines membranaires (Boes, Godoy-Hernandez, and McMillan 2021). Les domaines de ces protéines reconnaissent les membranes par deux grands types d'interactions non exclusifs : électrostatique ou hydrophobe (Whited and Johns 2015). Contrairement à la première classe, ces protéines peuvent interagir transitoirement avec les membranes (à l'exception de certaines protéines à ancrage lipidique) (Goñi 2002). On retrouve dans cette catégorie de nombreuses enzymes du métabolisme lipidique et les protéines de transfert lipidique (LTPs) que nous développerons plus tard.

d. Propriétés des membranes biologiques

INTRODUCTION

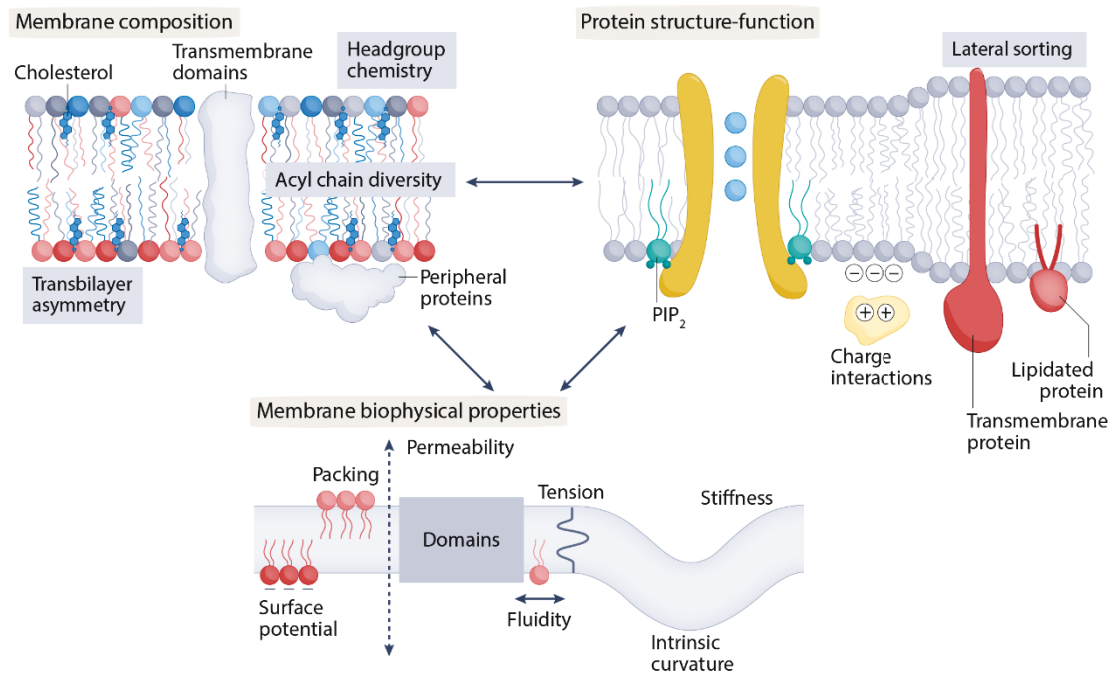


Figure I2. Interdépendance des différents composants membranaires et propriétés biophysiques associées.

La composition membranaire, définie par les lipides et protéines constituant ces membranes, régule les propriétés biophysiques comme la fluidité, l'empaquetage ou encore la rigidité membranaire. Par ailleurs, l'activité des protéines est modifiée par ces paramètres biophysiques et la nature des lipides environnants. De manière réciproque, la composition en lipide est régulée par l'activité protéique et selon les propriétés biophysiques membranaires. Ainsi, il existe une interdépendance des différents composants membranaires, définissant les paramètres biophysiques et régulant ainsi divers processus cellulaires.

Figure adaptée de Levental and Lyman, 2022.

La plupart des membranes retrouvées dans les cellules eucaryotes correspondent à des bicouches lipidiques, structures dépendantes des propriétés amphiphiles des lipides comme les GPLs. Les têtes polaires sont en contact avec le milieu aqueux, c'est-à-dire le cytosol ou la matrice extracellulaire pour la membrane plasmique. Les chaînes aliphatiques, hydrophobes, sont quant à elles protégées du milieu aqueux en étant au centre des deux feuillets de lipides. Une exception de cette structure en bicouche correspond aux gouttelettes lipidiques (LDs, ou vésicules lipidiques), organites stockant des lipides sous formes neutres et entourées par une monocouche de lipides (Thiam, Farese Jr, and Walther 2013). Les bicouches sont souvent asymétriques : différents types de lipides sont ségrégés et enrichis d'un côté ou de l'autre des membranes (Levental and Lyman 2022). Les membranes biologiques peuvent être définies par leurs propriétés biophysiques, c'est-à-dire les caractéristiques physiques et chimiques, déterminant à leur tour la fonction associée aux membranes.

Les propriétés biophysiques de ces membranes biologiques sont extrêmement variables et dynamiques, et définissent leur comportement et fonction (Munro 2002). Par exemple, la tension, la rigidité ou la courbure membranaire dépendent du type de lipides

INTRODUCTION

constituant la membrane, la saturation des acides gras ou encore des charges des têtes polaires (Harayama and Riezman 2018). Les protéines membranaires jouent également un rôle dans la régulation de ces propriétés. En effet, l'interaction entre les protéines membranaires et les lipides est complexe et multiforme, régulant les membranes de nombreuses manières (Figure I2) (Levental and Lyman 2022) :

Le niveau d'empaquetage des lipides peut être modifié par une incompatibilité entre la longueur d'un domaine transmembranaire et l'épaisseur de la membrane. Cette incompatibilité peut par exemple entraîner la compression des lipides ce qui empêche l'exposition de leur partie hydrophobe. A l'inverse, ce stress mécanique provoqué par cette incompatibilité peut aussi influencer la conformation et l'activité des protéines comme les GPCRs (Botelho et al. 2006).

La fluidité est un paramètre régulant la diffusion latérale des protéines et lipides. L'enrichissement en cholestérol et SLs, retrouvé notamment au niveau de la membrane plasmique, induit la formation de sous-domaines membranaires parfois appelés « rafts, ou radeaux lipidiques ». Selon les domaines transmembranaires, les protéines peuvent être partitionnées ou non dans les rafts et ainsi former, par exemple, des complexes de signalisation (Stone et al. 2017). Ces sous-domaines influencent également la conformation des protéines transmembranaires et par conséquent régulent leur activité.

La perméabilité, c'est-à-dire la capacité de la membrane à laisser passer des molécules. Ce paramètre est crucial pour la cellule et permet de créer par exemple des gradients de concentration pour les molécules hydrophiles comme les ions. Afin de réguler la concentration ionique des différents compartiments cellulaires, des canaux ioniques correspondant à des protéines intrinsèques existent. De façon intéressante, l'ouverture de ces canaux peut être régulée par la présence de lipides spécifiques. C'est le cas pour le canal potassique Kir2.2, capable de s'ouvrir en présence du lipide PI(4,5)P2 (Hansen, Tao, and MacKinnon 2011).

Cette liste non exhaustive nous montre l'interdépendance entre les protéines et lipides membranaires, régulant les propriétés biophysiques des membranes biologiques et par conséquent leurs fonctions.

e. Hétérogénéité des membranes

INTRODUCTION

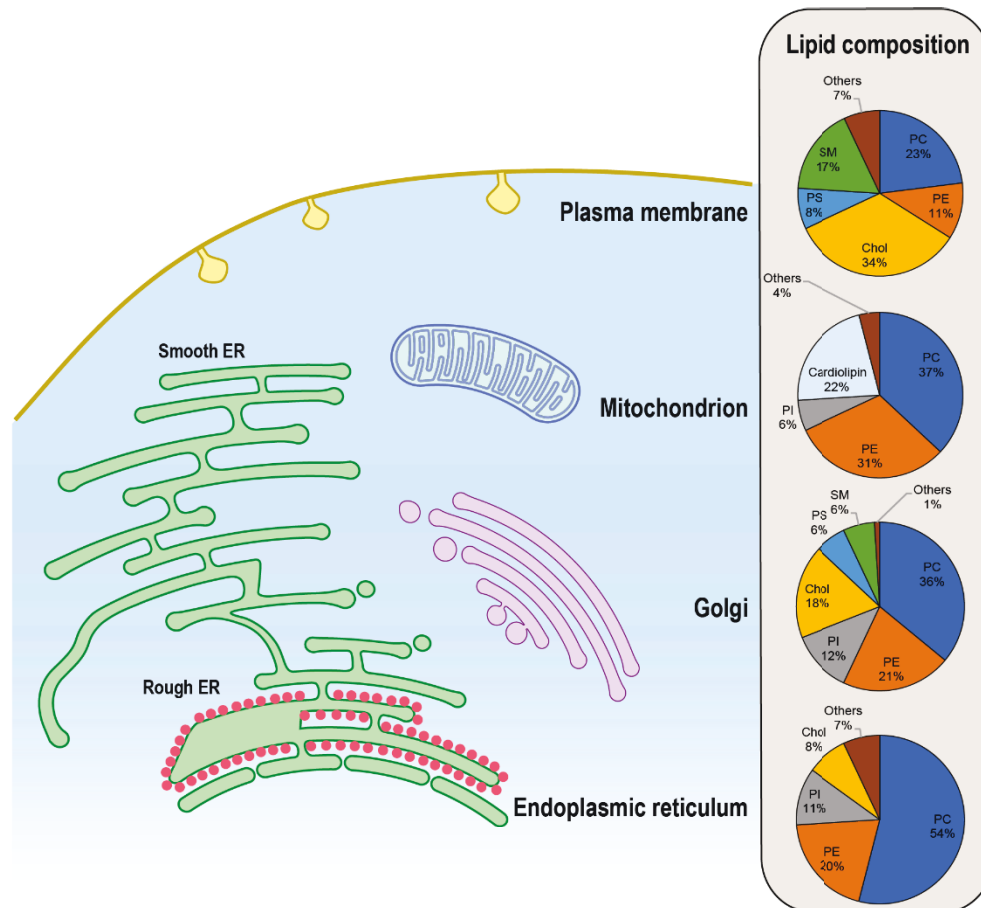


Figure I3. Les compositions membranaires définissent l'identité des organites et leur morphologie variable.

Les membranes sont des structures hétérogènes, définies par les lipides et protéines les constituant. Par exemple, la membrane plasmique est plutôt rigide en comparaison à la membrane du réticulum endoplasmique. Cette différence provient, entre autres, des niveaux différents de cholestérol et de sphingomyéline dans ces membranes. De même, la morphologie variable observée entre organites et pour un même organite, souvent associée à des fonctions spécifiques, provient d'un changement dans la composition membranaire.

SM:sphingomyéline; PC:phosphatidylcholine; PE:phosphatidyléthanolamine
Chol:cholestérol; PS:phosphatidylsérine;PI:phosphatidylinositol

Figure adaptée de Casares, Escriba and Rossello, 2019.

Données de composition lipidique provenant de Escriba *et al.*, 2015.

Les organites représentent des sous-unités cellulaires ayant des fonctions et des morphologies distinctes, pouvant varier au cours du temps (Shibata et al. 2009). Ils représentent ainsi des structures dynamiques, capable de changer de taille ou de forme afin de s'adapter au contexte cellulaire et maintenir l'homéostasie (Bozelli and Epand 2020). La plupart des organites possèdent une membrane contribuant aux rôles intrinsèques de ces derniers, comme le réticulum endoplasmique (ER), l'appareil de Golgi, les mitochondries ou encore les endosomes. Ces fonctions distinctes dépendent des protéines et lipides composant leur membrane. L'hétérogénéité membranaire entre compartiments (mais également au niveau d'un même compartiment) définit la variété des fonctions cellulaires exécutées par les organites.

INTRODUCTION

Hétérogénéité membranaire inter-organite. Les organites sont enrichis en certains lipides ou protéines et peuvent posséder des composants uniques, comme par exemple l'acide lysobisphosphatidique (LBPA), aussi nommé bis(monoacylglycero)phosphate (BMP), retrouvé exclusivement au niveau des endosomes tardifs (Kobayashi et al. 1998). De même, il existe un gradient de concentration croissant en cholestérol entre le réticulum endoplasmique (ER), l'appareil de Golgi et la membrane plasmique (Figure I3) (Casares, Escribá, and Rosselló 2019). Le taux de cholestérol élevé de la membrane plasmique, combiné à la présence de sphingomyéline, entraînent des propriétés biophysiques uniques (forte rigidité, formation de domaines ordonnés, emballage plus élevé) (Levental and Lyman 2022). Ces fortes différences de composition en lipide sont importantes pour la localisation des protéines membranaires et pourraient également restreindre leur activité à certaines membranes cellulaires.

Hétérogénéité membranaire intra-organite. La membrane d'un même organite peut également être hétérogène et avoir des sous-domaines associés à des fonctions spécifiques. Par exemple, le ER possède une structure complexe composée de tubules et de citernes, formant respectivement le ER lisse, impliqué dans la synthèse de lipides et le ER granuleux, impliqué dans la synthèse des protéines. En effet, les ribosomes synthétisant les protéines s'associent préférentiellement aux citernes du ER, alors que la diminution de la tubulation du ER impacte négativement le métabolisme lipidique (Heald and Cohen-Fix 2014; Friedman and Voeltz 2011).

Remodelage membranaire. Les membranes sont des structures dynamiques, sujettes à des modifications au cours du temps que l'on appelle remodelage membranaire. Par exemple, les processus de vésiculation ou tubulation membranaires sont des événements transitoires correspondant à du remodelage membranaire et régulant de nombreuses fonctions cellulaires, les plus connues étant les voies de sécrétion et d'endocytose (Graham and Kozlov 2010). Ces processus entraînent une modification des paramètres biophysiques des membranes comme la courbure ou la fluidité. Ces paramètres peuvent être influencés par l'asymétrie transversale lipidique, le type de lipide présent, l'oligomérisation de protéines intégrales, l'attachement de la membrane au cytosquelette, ou bien encore l'interaction avec des protéines périphériques via des hélices amphipathiques (McMahon and Gallop 2005).

En conclusion, la diversité membranaire définit et régule à la fois les nombreuses fonctions associées aux membranes et est donc à la base même de la physiologie cellulaire.

INTRODUCTION

2. Adressage et distribution des différents composants membranaires

La diversité de composition des membranes, en protéines et en lipides, régle les fonctions associées à ces membranes. Cette distribution des protéines et des lipides n'est pas aléatoire et est maintenu par divers mécanismes permettant de conserver ou de modifier dynamiquement la composition membranaire (Holthuis and Levine 2005; Behnia and Munro 2005).

f. Mécanismes d'adressage des protéines transmembranaires

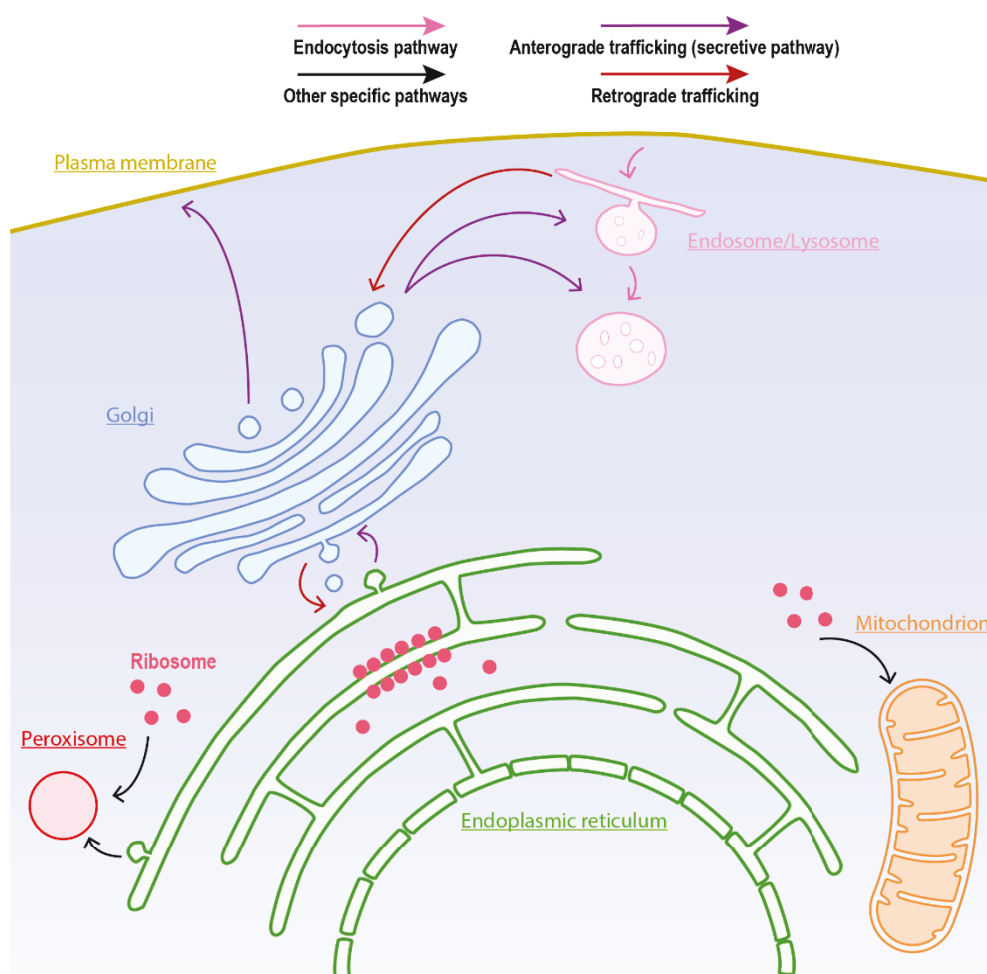


Figure I4. Les différentes voies d'adressage des protéines transmembranaires aux organites.

Les protéines intégrales sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique ou du cytosol et suivent différentes voies d'adressage selon l'organe de destination. Les mitochondries et peroxisomes possèdent des machineries spécifiques permettant l'ancrage des protéines intégrales. Les organites de la voie de sécrétion, c'est-à-dire le réticulum endoplasmique, le Golgi, la membrane plasmique et les endosomes, sont capables d'échanger des protéines transmembranaires par transport vésiculaire via la voie antérograde ou rétrograde.

INTRODUCTION

La biosynthèse des protéines se produit au niveau des ribosomes, qui peuvent être retrouvés au niveau du cytosol ou bien attachés à la surface du ER (Alberts 2015). La plupart des protéines transmembranaires sont d'abord ancrées à la surface du ER avant d'être exportées vers d'autres organites (Figure 14). Ces protéines peuvent être intégrées directement pendant leur synthèse (adressage co-traductionnelle) ou bien après avoir été complètement synthétisées (adressage post-traductionnelle) (Hegde and Keenan 2022). Ces différents mécanismes sont mis en place selon la localisation de la séquence d'adressage des protéines et son niveau d'hydrophobicité. Cette séquence correspond soit à un peptide signal ou bien au premier domaine transmembranaire synthétisé. Ces voies d'adressage ne sont pas utilisées pour les mitochondries et les peroxysomes qui possèdent leur propre machinerie d'intégration des protéines transmembranaires (Wojcik and Kriechbaumer 2021). Il existe tout de même des exceptions, certaines protéines intégrales des peroxysomes proviennent en effet du ER (van der Zand, Braakman, and Tabak 2010).

Les protéines membranaires sont ensuite adressées vers leur organite de résidence en passant par la voie de sécrétion. Par différents processus de vésiculation, les protéines quittent le ER via des sites de sortie pour aller au Golgi, puis vers les autres organites (lysosomes, membrane plasmique, endosomes) (Derby and Gleeson 2007). En plus de son rôle prépondérant dans les modifications post-traductionnelles des protéines, le Golgi est également une plateforme de tri pour les protéines (et les lipides) permettant l'adressage à différents organites (De Matteis and Luini 2008). Selon les propriétés physicochimiques des domaines transmembranaires et la présence de motifs en bordure de ceux-ci, les protéines sont adressées à différents organites. Par exemple, le motif KKXX présent sur certaines protéines résidentes du ER interagit directement avec le complexe COPI, permettant le retour des protéines du Golgi vers le ER (Derby and Gleeson 2007; Bannykh, Nishimura, and Balch 1998).

En revanche, toutes les protéines transmembranaires ne semblent pas présenter de motifs d'adressage. Il est probable qu'une incompatibilité entre la membrane et le domaine transmembranaire d'une protéine conduise à son clustering et une interaction avec certaines protéines de transport (comme le complexe COP), entraînant la formation de vésicules et leur transport vers d'autres membranes (Hanulová and Weiss 2012). La rétention des protéines au niveau du ER ou du Golgi pourrait également se produire par la formation de complexes de protéines résidentes trop volumineux pour être transportés par des vésicules (Alberts 2015). Une explication alternative pourrait être que ces protéines ne produisent pas de défaut de compatibilité membranaire et n'activeraient donc pas les processus de vésiculation (Hanulová and Weiss 2012).

g. Mécanismes d'interaction des protéines membranaires périphériques

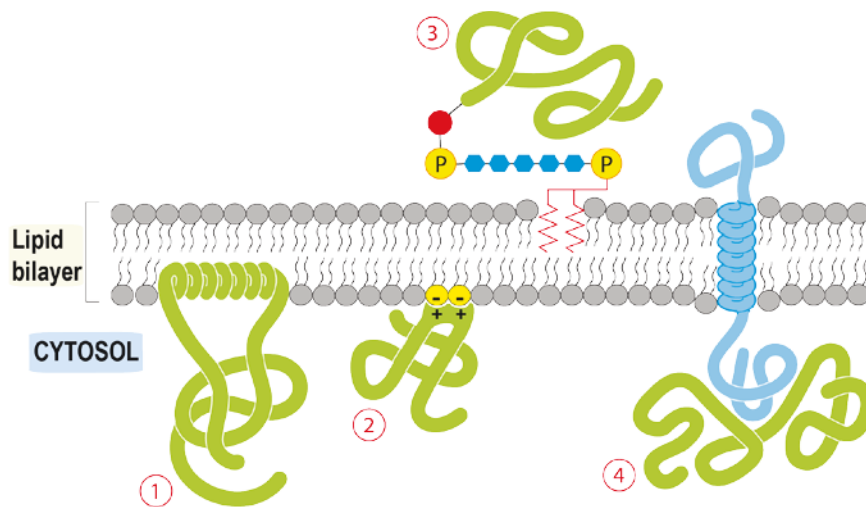


Figure I5. Les différents types d'interaction des protéines périphériques avec les membranes.

(1) Interaction hydrophobe représentée par une hélice amphiphile. (2) Interaction électrostatique représentée par domaine de liaison membranaire. (3) Modification post-traductionnelle représentée par un ancrage lipidique (GPI). (4) Interaction protéine-protéine, ici avec une protéine intégrale en bleu. Ces types d'interaction ne sont pas mutuellement exclusifs, au contraire, ces interactions sont le plus souvent combinées.

Figure adaptée de Bruce Alberts, 2015.

Contrairement aux protéines transmembranaires qui doivent transiter par le ER, les protéines périphériques sont pour la plupart synthétisées dans le cytosol et peuvent être recrutées directement à la surface d'un organe pour effectuer leur fonction (Munro 2002). Ces protéines utilisent différentes stratégies afin d'interagir avec les membranes que l'on peut regrouper en 4 grands types non exclusifs : interaction hydrophobe, interaction électrostatique, modification post-translationnelle et interaction protéine-protéine (Figure I5) (Whited and Johns 2015; Cho and Stahelin 2005). Ces protéines ont besoin de distinguer les différentes membranes et combinent le plus souvent ces différents types d'interactions.

L'adressage de ces protéines à des organites distincts se fait essentiellement par la reconnaissance de lipides spécifiques peu abondants (notamment les phosphoinositides), de paramètres biophysiques comme la courbure membranaire, ou grâce à des protéines périphériques ou intégrales (Munro 2002; Bigay and Antonny 2012). Parmi ces nombreuses méthodes d'adressage, on retrouve notamment :

Les hélices amphipathiques (AHs). Elles correspondent à des structures protéiques cylindriques, le plus souvent en hélices- α , contenant une face apolaire et une face polaire (Giménez-Andrés, Čopič, and Antonny 2018; Kitamata, Inaba, and Suetsugu 2020). Cette différence de polarité provient de la ségrégation des résidus polaires et des résidus

INTRODUCTION

hydrophobes entre les deux faces opposées. Cette caractéristique des AHs permet leur insertion de manière parallèle à la surface des membranes et agissent comme des tensioactifs (Chorlay and Thiam 2020). La face hydrophile se retrouve du côté des têtes polaires des lipides alors que la face hydrophobe se retrouve au niveau des chaînes d'acides gras. Les séquences correspondantes à ces hélices sont souvent non-structurées en solution et forment une hélice une fois en contact avec les membranes (Giménez-Andrés, Čopič, and Antonny 2018). C'est le cas par exemple de la protéine CCT, une enzyme importante pour la synthèse de PC ; ou bien pour la protéine PLIN4, impliquée dans la régulation du métabolisme des gouttelettes lipidiques (Cornell 2016; Čopič et al. 2018).

Les AHs sont capables de se lier à différentes membranes, comme le ER, les peroxysomes, les endosomes, la membrane plasmique ou encore les LDs. De nombreux paramètres régulent leur interaction avec les membranes : la longueur des AHs, la nature des résidus hydrophobes et polaires (présence de charges ou non), la composition lipidique de la membrane ou encore les propriétés biophysiques de cette dernière (courbure, défaut d'emballage) (Giménez-Andrés, Čopič, and Antonny 2018; Kitamata, Inaba, and Suetsugu 2020; Prévost et al. 2018). De manière intéressante, les AHs ne servent pas seulement d'ancrage membranaire pour les protéines, mais peuvent aussi jouer un rôle dans le remodelage membranaire ou dans la reconnaissance de la courbure membranaire (Drin and Antonny 2010). Par exemple, lors de l'endocytose clathrine-dépendante, la protéine epsin 1, via son AH, est capable de courber la membrane et par conséquent, régule positivement le processus de vésiculation (Ford et al. 2002). Il est également important de souligner que les AHs ne sont pas retrouvées exclusivement dans les protéines périphériques mais peuvent aussi être présentes dans des protéines transmembranaires. C'est le cas par exemple de la protéine SNX14, une protéine résidente du ER et capable de lier les LDs via une hélice amphipathique ; ou de la protéine MIGA2, attachée à la surface des mitochondries et interagissant avec les LDs par un mécanisme similaire (Datta et al. 2019; Freyre et al. 2019).

Les domaines de liaison membranaire. Selon la littérature, on les retrouve également sous le nom de domaine liant des lipides (lipid-binding domains) ou domaine liant des phospholipides (DiNitto, Cronin, and Lambright 2003; Cho and Stahelin 2005; Hurley 2006; Hammond and Balla 2015). N'ayant pas trouvé de consensus concernant leur définition, ces domaines sont ici définis comme étant capables de se lier de manière transitoire à une membrane en interagissant avec des lipides. Les domaines impliqués dans le transport de lipides (LTPs) que nous développerons plus tard ne sont pas intégrés dans cette famille. Ils existent plus d'une dizaine de familles de domaines différentes (e.g. PH, C1, C2, FYVE, BAR, etc.) que l'on retrouve fréquemment dans des protéines multimodales (Lemmon 2008). Les interactions médiées par ces domaines peuvent compléter d'autres types d'interaction

INTRODUCTION

membranaire afin de favoriser le recrutement d'une protéine périphérique à une membrane (Pemberton and Balla 2019). En plus de cette fonction d'ancrage, ces domaines peuvent également avoir un rôle sur l'activité d'autres domaines d'une protéine en régulant leur conformation de manière allostérique. Par exemple, le domaine PH de la protéine Akt et sa liaison à différents PIPs active de manière allostérique l'activité enzymatique de cette kinase (Ebner et al. 2017).

Ces domaines protéiques sont capables de reconnaître de manière spécifique un lipide (stéréospécificité) ou bien de reconnaître des propriétés biophysiques d'une membrane (courbure, charge) (Stahelin 2009). Par exemple, les domaines PH, FYVE ou PX sont capables de reconnaître avec une certaine spécificité différentes espèces de PIPs. De manière intéressante, la reconnaissance de lipides spécifiques peut être appliquée comme outil de recherche en utilisant ces domaines comme sondes lipidiques (Kassas et al. 2017; Kay et al. 2012). De nombreuses sondes couramment utilisées en laboratoire pour marquer les PIPs correspondent à des domaines protéiques PH ou FYVE et permettent de déterminer quels organites sont enrichis pour ces lipides (Hammond and Balla 2015). Cette spécificité d'interaction peut être couplée à un autre paramètre biophysique, comme par exemple le pH (S. A. Lee et al. 2005; He et al. 2008; Hom et al. 2007). En effet, certaines protéines ont une meilleure affinité pour les PIPs à pH acide qui favorise la protonation de résidus histidines, des acides aminés fréquemment impliqués dans l'interaction avec les PIPs ; cette interaction peut également être complétée par des interactions électrostatiques non spécifiques avec des lipides anioniques.

D'un autre côté, certains domaines comme la superfamille BAR ou domaine KA1 interagissent avec les membranes via une reconnaissance non spécifique de lipides (Pemberton and Balla 2019; Moravcevic, Oxley, and Lemmon 2012). Les domaines BAR reconnaissent et génèrent de la courbure membranaire, qu'elle soit positive (N-BAR, F-BAR) ou négative (I-BAR). Pour cela, ces domaines utilisent des interactions électrostatiques délocalisées (à des endroits différents de la membrane) et reconnaissent la géométrie des membranes qui doit être conforme à leur forme spécifique (en banane) afin de pouvoir interagir (Qualmann, Koch, and Kessels 2011). Le recrutement progressif de protéines contenant des domaines BAR pourrait par exemple faciliter le processus de vésiculation durant l'endocytose clathrine-dépendante.

Pour conclure, les mécanismes de recrutement de protéines périphériques sont très variés et sont influencés par de nombreux paramètres membranaires. Ces protéines combinent la plupart du temps plusieurs mécanismes afin de réguler leur localisation et leur dynamique de recrutement. Cette régulation spatiotemporelle permet l'interaction d'une protéine dans un contexte membranaire particulier ou selon des conditions de signalisation

INTRODUCTION

spécifique. Ces interactions multivalentes peuvent jouer un rôle dans l'avidité d'une protéine pour une membrane mais aussi influencer l'activité ou la conformation d'autres domaines des protéines multimodales.

h. Distribution intra-organite des lipides

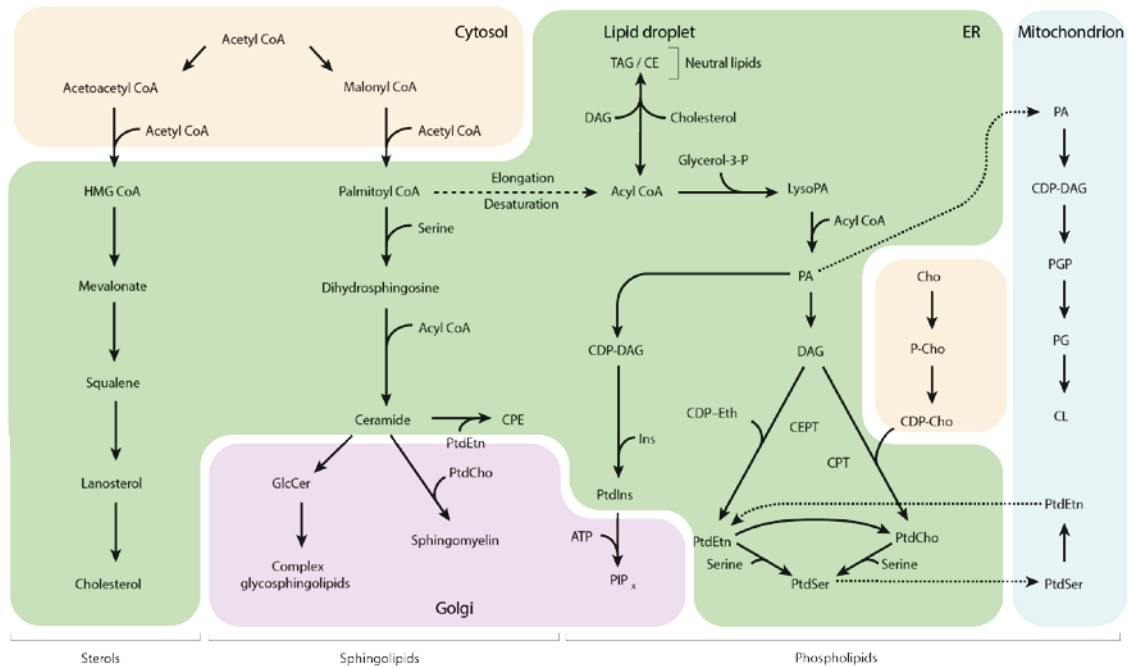


Figure I6. Voies de synthèse des lipides membranaires.

Localisation des voies de synthèse des lipides membranaires majeurs. La plupart des lipides sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique. Certains de ces lipides servent de précurseurs à d'autres lipides synthétisés au niveau d'organites distincts comme le Golgi ou les mitochondries. Ces échanges peuvent se faire par un transport non vésiculaire et/ou vésiculaire selon les organites concernés.

Figure adaptée de Holthuis *et al.*, 2014.

A l'image des protéines intégrales, le ER est le site principal de synthèse de la plupart des lipides et produit notamment les stérols, les GPLs et les céramides (Figure I6) (Alberts 2015; Holthuis and Menon 2014). Le ER est également le site de biogenèse des LDs, permettant le stockage de lipides neutres (Walther, Chung, and Jr 2017). De même, le Golgi est un lieu de synthèse important pour la production de sphingolipides et la mitochondrie pour la cardiolipine et son précurseur le PG (van Meer, Voelker, and Feigenson 2008; Fagone and Jackowski 2009). La diversité de la composition membranaire en lipides ne dépend donc pas seulement d'une compartimentalisation de la synthèse des lipides car celle-ci est assez limitée, mais plutôt de mécanismes divers permettant leur échange, dégradation et/ou modification entre organites (Blom, Somerharju, and Ikonen 2011). Au niveau d'un même

INTRODUCTION

organite, cette hétérogénéité membranaire est également retrouvée entre les deux feuillets membranaires (*i.e.* asymétrie transversale) ou bien via la formation de sous-domaines membranaires (ou nanodomains).

L'asymétrie transversale. Les lipides contenues dans une bicouche lipidique sont soumis à différents mouvements : rotation sur eux-mêmes, diffusion latérale et mouvement de flip-flop correspondant au passage d'un feuillet à l'autre (Pomorski and Menon 2016). Ce phénomène de flip-flop se produit à des vitesses différentes selon la nature du lipide et est accélérée par différentes classes de protéines. Les flippases et floppases sont des protéines intégrales permettant le transfert unidirectionnel de lipides d'un feuillet à un autre en consommant de l'ATP (Kobayashi and Menon 2018; Hankins et al. 2015). Les flippases transfèrent les lipides du feuillet exoplasmique au feuillet cytosolique alors que les floppases jouent le rôle inverse. Les scramblases correspondent à une autre classe de protéines, impliquées dans un transfert bidirectionnel des lipides entre les feuillets, sans consommer d'ATP. Le ER est le site de synthèse de nombreux composants membranaires et doit par conséquent être capable de s'expandre de manière uniforme. Cette expansion nécessite le transfert rapide des lipides entre les deux feuillets car ces derniers sont synthétisés essentiellement du côté cytosolique (Pomorski and Menon 2016). Le ER possède des scramblases actives de manière constitutive, permettant le transfert rapide de lipides après leur synthèse (Mathiassen, Menon, and Pomorski 2021).

L'asymétrie membranaire est également maintenue par d'autres mécanismes de rétention encore mal compris. Par exemple, la PS est enrichie dans le feuillet luminal du ER malgré la présence de nombreuses scramblases peu spécifiques (Hankins et al. 2015). La PS semble donc piégée d'un côté de la membrane, ce qui pourrait être dû à des interactions électrostatiques avec des protéines lumineales (Holthuis and Menon 2014).

La formation de nanodomains membranaires. Ces nanodomains correspondent à des « sous-compartiments » membranaires possédant des propriétés biophysiques distincts, avec un diamètre estimé entre 4-200 nm (Cebecauer et al. 2018). Ces domaines possèdent souvent un état physique différent du reste de la membrane (phase liquide-ordonnée ou liquide non ordonnée). La faible taille et le caractère souvent transiant de ces domaines compliquent leur étude (Lingwood and Simons 2010). Les 'lipid-rafts', correspondant à des nanodomains souvent trouvés à la membrane plasmique, jouent des rôles importants dans la transduction de signaux (Garcia-Parajo et al. 2014).

La formation de ces domaines est multifactorielle : mélange peu miscible de lipides pouvant provoquer la séparation de phase (chaîne d'acides gras, conformation géométrique des lipides, affinité ou immiscibilité avec le cholestérol), auto-agrégation d'un composant

INTRODUCTION

membranaire, interaction latérale préférentielle entre différents composants, interaction électrostatique, courbure membranaire, etc. (Cebecauer et al. 2018). Par exemple, les PIPs et notamment le PI(4,5)P2 peuvent être retrouvés dans des nanodomaines par divers mécanismes, du fait de leur interaction avec le cholestérol ou des cations divalents (Graber, Gericke, and Kooijman 2014). De même, des études *in silico* révèlent que l'interaction de domaines PH avec des PIPs (PIP3 et PI(4,5)P2) pourrait conduire au regroupement de ces lipides dans la membrane, soulignant le rôle des protéines périphériques dans l'induction du remodelage membranaire local (Yamamoto et al. 2016). De manière intéressante, il a récemment été montré que les sites de contact membranaire médiés par le ER, que nous développerons plus tard, peuvent, sous certaines conditions, induire des changements de phase (domaines liquide-ordonnées ou désordonnées) et pourraient ainsi correspondre à des nanodomaines (King et al. 2020).

i. Mécanismes de distribution des lipides entre organites

INTRODUCTION

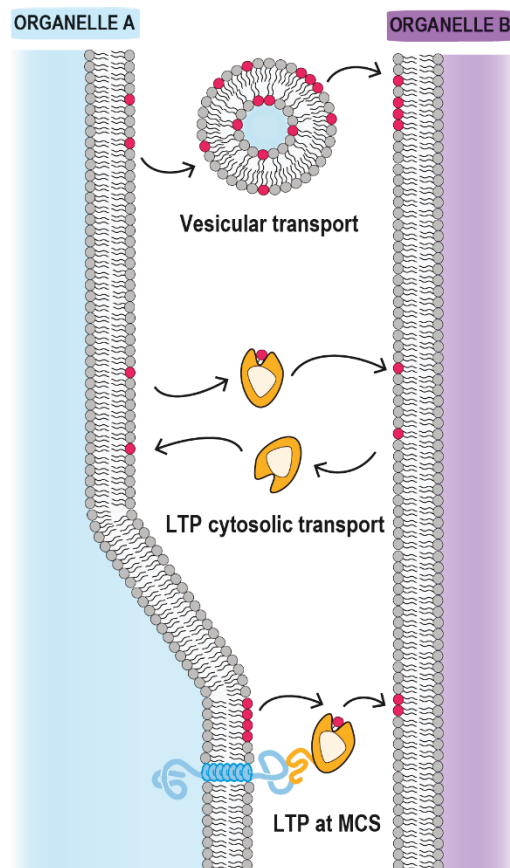


Figure I7. Les différents modes de transport de lipides entre organites.

Les lipides peuvent être transportés par voie vésiculaire ou par des protéines de transfert de lipides (LTP). Ces protéines sont capables de prendre en charge un lipide et de le transporter vers une autre membrane à travers le cytosol. Certaines de ces LTP fonctionnent spécifiquement au niveau de zones d'échanges particulières, appelées sites de contact membranaires (MCS). Ces MCS sont caractérisés par le rapprochement des membranes de deux organites, ce qui favoriserait l'échange de lipides par voie non vésiculaire.

Figure adaptée de Blom, Somerharju and Ikonen, 2014.

Comme pour les protéines transmembranaires, les lipides synthétisés au ER peuvent transiter vers d'autres organites en suivant la voie de sécrétion (van Meer, Voelker, and Feigenson 2008). Or, tous les organites ne sont pas connectés à cette voie (e.g. mitochondries). Un autre mécanisme de transport inter-organite des lipides est effectuée par un transport non-vésiculaire, consistant en un échange monomérique de lipides. Cet échange peut être réalisé spontanément par un lipide, dû à sa désorption d'une membrane et sa diffusion dans un milieu aqueux vers une autre membrane (Holthuis and Levine 2005). Cette réaction peut être accélérée par une classe de protéines appelée LTPs, permettant le transfert ciblé de lipides entre organites (Figure I7).

Transport vésiculaire. Le transport vésiculaire comprend la voie de sécrétion, l'endocytose et la voie rétrograde (van Meer, Voelker, and Feigenson 2008; Hermansson, Hokynar, and Somerharju 2011). Ce transport permet le transit bidirectionnel de lipides entre

INTRODUCTION

le ER, le Golgi, la membrane plasmique et les endosomes. Comment le tri des lipides est effectué par ce transport reste encore peu compris. Les changements des paramètres biophysiques au niveau du Golgi, provoqués en partie par la synthèse de SLs et le tri des protéines, semblent être impliqués dans la ségrégation de certains lipides (Holthuis and Levine 2005). D'après des données *in vitro*, la formation de régions liquide-ordonnées pourrait induire une vésiculation voire une fission membranaire (Baumgart, Hess, and Webb 2003). Il est donc probable que la formation de nanodomains soit importante pour la distribution des lipides (et protéines) par voie vésiculaire. Comme vu précédemment pour le transport des protéines intégrales, ces nanodomains pourraient également favoriser le recrutement de la machinerie permettant le processus de vésiculation (Hanulová and Weiss 2012; Holthuis and Levine 2005). Bien que primordial pour le transport de protéines, la voie vésiculaire a une place moins prépondérante pour le transport de lipides. En effet, malgré le blocage du transport vésiculaire par diverses approches pharmacologiques et génétiques, le transfert de divers lipides comme les GPLs ou les stérols s'effectue principalement par transport non-vésiculaire médié par les LTPs (van Meer, Voelker, and Feigenson 2008; Voelker 2005).

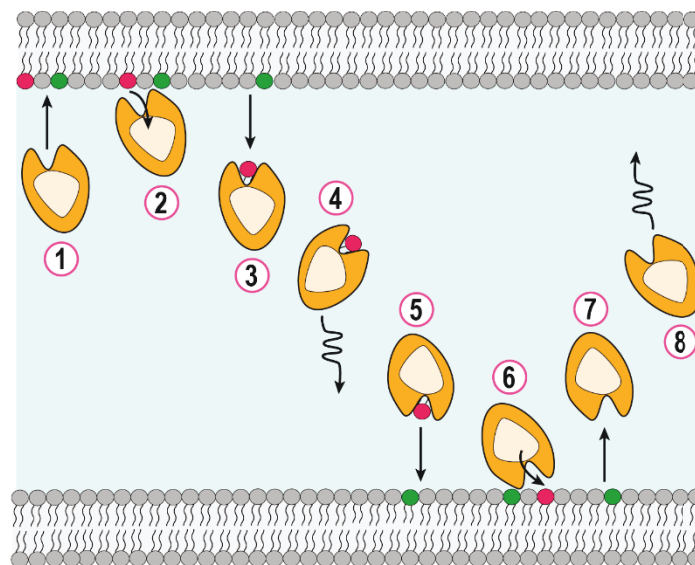


Figure I8. Etapes du transfert de lipide entre deux membranes par un LTP.

Cycle de transfert de lipide médié par un LTP. 1: liaison du LTP à la membrane donneuse; 2: extraction du lipide; 3: désancrage du LTP de la membrane donneuse; 4: diffusion; 5: liaison du LTP à la membrane acceptrice; 6: insertion du lipide dans la membrane acceptrice; 7: désancrage du LTP de la membrane acceptrice; 8: diffusion.

Figure adaptée de Wong *et al.*, 2019.

Transport par les LTPs. Le transport de lipides entre organites nécessite une alternative à la voie de sécrétion qui ne connecte pas tous les organites. Cette voie non-vésiculaire correspond à la prise en charge de lipides par des protéines de transfert de lipide (LTPs) possédant un domaine de transfert de lipide (LTDs) (Chiapparino et al. 2016). De façon

INTRODUCTION

intéressante, cette voie non-vésiculaire est également importante pour les organites faisant partie de la voie de sécrétion, permettant par exemple des échanges entre le ER et la membrane plasmique (Wong, Gatta, and Levine 2019; Lev 2010). Le rôle de ces LTPs est de faciliter le transport de lipides dans une phase aqueuse. Le transfert de lipides comprend plusieurs étapes (Figure I8) : accrochage à la membrane des LTPs, extraction des lipides, détachement de la protéine, diffusion cytosolique, puis réinsertion du lipide dans une nouvelle membrane. Cette capacité à transférer des lipides est le plus souvent définie par des expériences *in vitro*, démontrant une accélération du mouvement de lipides entre deux populations de liposomes. La capacité de solubiliser des lipides *in vitro* peut se traduire par plusieurs rôles *in vivo* : transfert entre membranes, détection de lipides ou encore présentation de lipides à d'autres protéines (Wong, Čopič, and Levine 2017).

Les LTPs contiennent un domaine LTD, soluble dans l'eau et le plus souvent globulaire (ou parfois formant un tunnel hydrophobe), ayant une cavité hydrophobe pouvant accommoder la plupart du temps un lipide à la fois (Chiapparino et al. 2016). Ces LTPs peuvent être des protéines périphériques ou bien intégrales. Il existe plus de 156 protéines identifiées comme étant des LTPs, regroupées en 27 familles différentes (Wong, Gatta, and Levine 2019). Les LTPs d'une même famille peuvent se lier à des ligands différents, même s'ils partagent une homologie de séquence élevée. On retrouve notamment :

Famille à domaine ORD. Nommée d'après son membre fondateur, oxysterol-binding protein (OSBP), la famille OSBP-related proteins (ORPs) inclut 12 membres possédant tous un domaine ORD. Ces protéines sont capables de reconnaître plusieurs ligands : un phosphoinositide commun, le PI4P, et un autre lipide de nature variable (Nakatsu and Kawasaki 2021). Les protéines OSBP, ORP1L et ORP2 sont capables de transporter du cholestérol alors que d'autres membres de la famille, comme ORP5 ou ORP8, transportent du PS (Wong, Gatta, and Levine 2019). Cette famille couvre le transport de lipides entre la plupart des organites, certaines protéines comme ORP2 transportent leur ligand à travers le cytosol entre deux membranes alors que d'autres, comme OSBP, fonctionnent au niveau de sites de contact membranaire (Mesmin et al. 2013; H. Wang et al. 2019).

Famille à domaine START. Les protéines à domaine START (Steroidogenic Acute Regulatory protein) related lipid transfer) sont au nombre de 15 chez l'Homme et permettent le transfert de divers lipides dont le cholestérol et ses dérivés, les céramides, ou bien des phospholipides (Alpy and Tomasetto 2014). Comme pour les ORP, les organites et les fonctions associées sont très variés. La protéine STARD3, membre de la famille START, a été identifiée au laboratoire car surexprimée dans les tumeurs malignes du sein (Tomasetto et al. 1995). Cette protéine intégrale des endosomes tardifs est capable de transporter du

INTRODUCTION

cholestérol *in vitro* et contribue à la régulation du flux de cholestérol au niveau des endosomes (Wilhelm et al. 2017).

Famille à domaine CRAL-TRIO (ou Sec14). Cette famille dont le rôle reste peu compris, contient 28 membres chez l'Homme. La protéine Sec14 chez la levure est le prototype de cette famille et est importante pour la viabilité de ces organismes (Bankaitis et al. 1990). Les ligands sont extrêmement variables : vitamines lipophiles, PG, PI, PC, squalène, etc. (Saito, Tautz, and Mustelin 2007). Il existe à ce jour peu d'évidences *in vivo* suggérant un rôle de transfert par ces protéines. L'hypothèse actuelle serait que la protéine Sec14 (et ses homologues) régule l'activité de kinases (PI4-OH kinases), en présentant leur substrat à ces enzymes et donc facilitant leur accessibilité (Bankaitis, Mousley, and Schaaf 2010). Cette famille aurait ainsi un rôle de senseur de lipides couplé à un rôle de présentation, permettant la régulation spatiotemporelle de processus de signalisation et métabolique (Ile, Schaaf, and Bankaitis 2006; Schaaf et al. 2008). La protéine MOSPD2, étudiée dans cette thèse, possède un domaine CRALTRIO mais ses ligands et sa fonction restent à ce jour inconnus.

Les LTPs sont capables de transporter leur(s) ligand(s) dans le sens du gradient de concentration, ou à l'inverse du gradient. Par exemple, le transport peut être couplé à des pompes consommant de l'ATP, fournir un lipide précurseur converti dans la membrane acceptrice, ou bien impliquer un contre-échange en transférant deux lipides différents entre les membranes. Les propriétés biophysiques membranaires régulent également l'activité des LTPs (Bigay and Antonny 2012). En effet, les défauts d'emballage d'une membrane provenant par exemple du taux de saturation des chaînes d'acides gras entraînent l'exposition de parties hydrophobes, réduisant le seuil énergétique nécessaire au lipide pour quitter ou s'intégrer dans la membrane. Ces défauts d'emballage peuvent aussi faciliter le recrutement de LTPs utilisant par exemple des hélices amphipathiques. De même, tous les lipides présents dans une membrane ne sont pas accessibles aux LTPs. C'est le cas par exemple du cholestérol à la membrane plasmique, ségrégué en trois réservoirs qui diffèrent par leur accessibilité à des sondes cytosoliques (Das et al. 2014). La régulation de l'accessibilité aux lipides est également un moyen permettant à la cellule de maintenir des concentrations élevées en lipides dans une certaine membrane.

La capacité des LTPs à interagir avec les membranes est primordiale pour réguler leur activité. Les LTPs sont pour la plupart multimodales et possèdent souvent des domaines de liaison membranaire permettant leur localisation à des organites spécifiques (Wong, Gatta, and Levine 2019). De manière intéressante, de nombreux LTPs sont souvent retrouvés au niveau de sous-domaines membranaires appelées sites de contact membranaire (MCS). Les MCSs, défini par le rapprochement de deux membranes, sont enrichis en LTPs ou protéines

INTRODUCTION

liées à la synthèse de lipides (Lev 2010; Lahiri, Toulmay, and Prinz 2015). En plus de leur rôle important dans le métabolisme lipidique, les MCS régulent de nombreux autres processus physiologiques.

B. Sites de contacts membranaires (MCS) et homéostasie cellulaire

1. Généralités sur les MCS

Les sites de contact membranaire (MCS) correspondent à un rapprochement des membranes de deux organites sans fusion membranaire ; les membranes sont de manière générale séparées par une distance inférieure à 30 nm (Figure I9) (Scorrano et al. 2019). Les MCS sont des zones d'échanges de molécules (ions, acides aminés, lipides) entre organites, ayant des fonctions et une composition membranaire spécifiques. Ce champ de recherche s'est développé assez récemment, malgré la première description d'une forte proximité entre les organites dans les années 50 par des observations en microscopie électronique (Bernhard and Rouiller 1956). Les premiers papiers caractérisant un rôle fonctionnel de ces contacts inter-organites datent des années 90 et montrent un rôle des contacts entre le ER et les mitochondries dans la synthèse de lipides et la réponse calcique (J E Vance 1991; Rizzuto et al. 1998). Depuis, les contacts ont été observés entre tous les organites cellulaires et peuvent être de nature homotypique ou hétérotypique (Valm et al. 2017). Les contacts sont transitoires, même si leur demi-vie peut varier selon les organites (Valm et al. 2017). Aujourd'hui, les MCS sont reconnus comme étant impliqués dans de nombreux processus cellulaires, comme la fission mitochondriale ou endosomale, l'homéostasie calcique et lipidique, le positionnement des organites, l'autophagie, etc. (Wu, Carvalho, and Voeltz 2018; Prinz, Toulmay, and Balla 2020). L'étude des MCS est un champ de recherche très actif, se focalisant sur la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à ces différentes fonctions, les aspects structuraux des contacts, et leur implication dans des processus physiopathologiques.

Malgré de nombreuses avancées, le degré de complexité des MCS limite certains aspects de l'étude de ces structures. Les MCS possèdent des caractéristiques membranaires protéiques et lipidiques spécifiques (Scorrano et al. 2019). La compréhension de l'ensemble des interactions et de leurs rôles dans la fonction de ces structures peut s'avérer difficile pour plusieurs raisons techniques. On retrouve par exemple un problème de résolution en microscopie optique qui ne permet pas d'évaluer l'ensemble de l'organisation moléculaire. La microscopie électronique résout ce problème de résolution mais limite le nombre de protéines étudiées en même temps et ne permet pas d'étudier la dynamique de ces contacts, une des caractéristiques principales définissant ces structures. De plus, il est difficile de garder les structures dans un état natif en microscopie électronique, nécessitant de nouvelles approches comme la cryo-EM (Fernández-Busnadiego, Saheki, and De Camilli 2015). De même, les approches biochimiques sont dénaturantes et détruisent l'intégrité de ces structures, pouvant entraîner des contaminations membranaires et des données peu spécifiques. De nouvelles approches émergent et permettent de contourner certaines limitations techniques, comme par

INTRODUCTION

exemple la microscopie optique de super-résolution (Huang et al. 2020). En revanche, ces techniques émergentes restent encore restreintes à certains laboratoires.

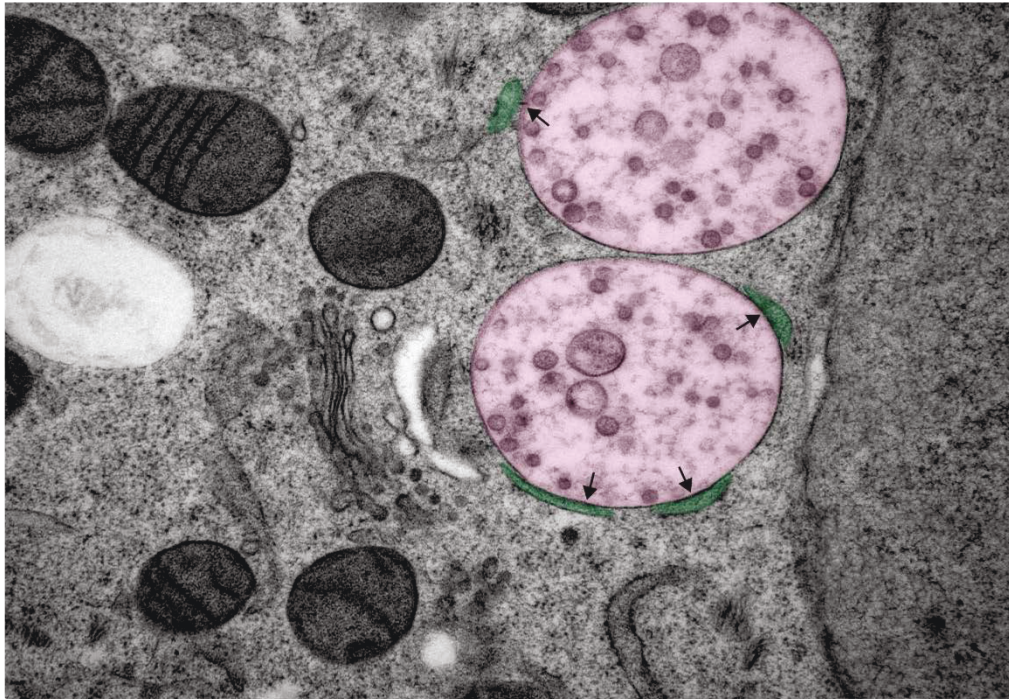


Figure I9. Sites de contact membranaires entre le réticulum endoplasmique et des endosomes.

Image de microscopie électronique montrant plusieurs sites de contact membranaires (flèches noires) entre le réticulum endoplasmique (en vert) et des endosomes (en rose). Ces zones sont définies par la forte proximité des membranes sans fusion apparente. Données provenant de cellules HeLa surexprimant la protéine endosomale STARD3, favorisant la formation de contacts entre le réticulum et les endosomes.

2. Mécanismes moléculaires permettant la formation des MCS : exemple des protéines VAPs

Une des caractéristiques définissant les MCS est l'interaction des deux membranes opposées par des protéines d'ancrage. Cette fonction est médiée par des protéines capables d'interagir avec d'autres protéines sur la membrane opposée ou bien de se lier directement à l'autre membrane (M. J. Phillips and Voeltz 2016; Eisenberg-Bord et al. 2016). Toutes les protéines augmentant l'affinité d'un organite pour un autre organite rentrent dans cette catégorie de protéines d'ancrage (Prinz, Toulmay, and Balla 2020). De nombreuses protéines correspondent à cette définition, ce qui pourrait expliquer pourquoi il est difficile d'abolir les MCS entre organites en inhibant différentes paires de protéines (Manford et al. 2012). Il est important de souligner que ces protéines peuvent remplir d'autres fonctions simultanément à ce rôle d'ancrage, comme par exemple le transport de lipides à l'image des protéines ORP.

Complexes d'interaction majeurs du ER : les protéines VAPs. Le réticulum endoplasmique (ER) est l'organite le plus vaste de la cellule et a des fonctions cellulaires essentielles : synthèse de protéines et de lipides, distribution par voie vésiculaire, homéostasie calcique, biogenèse des LDs, etc. Le ER est organisé en feuillettes et tubules, se propageant dans toute la cellule à travers le cytosol. Cette architecture particulière le rend propice à former de nombreux contacts avec tout type d'organite (Wu, Carvalho, and Voeltz 2018; M. J. Phillips and Voeltz 2016). Son rôle primordial dans la cellule nécessite une coordination des activités avec les autres organites. Les MCS médiés par le ER permettent une synchronisation des différentes activités cellulaires et maintiennent ainsi l'homéostasie cellulaire. L'interaction protéine-protéine permettant la formation des MCS entre ER et les autres organites est en grande partie médiée par une famille de protéines intégrales ubiquitaires du ER, les protéines **VAPs (VAMP-associated protein)** (Murphy and Levine 2016). Les protéines VAPA et VAPB sont les deux membres les mieux décrits de cette famille. Ces protéines possèdent un domaine Major Sperm Protein (MSP) permettant leur interaction avec des protéines à motif FFAT (Two Phenylalanines ['FF'] in an Acidic Tract) (Kaiser et al. 2005). Les motifs FFAT sont retrouvés dans des protéines périphériques mais également dans des protéines intégrales d'autres organites, comme la mitochondrie ou les endosomes (Alpy et al. 2013; De Vos et al. 2012; Wyles, McMaster, and Ridgway 2002). Les VAPs interagissent avec de nombreuses protéines, permettant la formation de différents types de MCS et la régulation de nombreux processus cellulaires (Figure I10) (Murphy and Levine 2016; James and Kehlenbach 2021). Plus récemment, un autre membre de cette famille a été caractérisé par notre laboratoire (Di Mattia et al. 2018). La protéine Motile Sperm Domain-containing Protein 2 (MOSPD2), ancrée au ER, possède un domaine MSP ayant une structure proche de celles des protéines VAPs et est également capable d'interagir avec des protéines à motifs FFAT, permettant ainsi la formation de MCS. On retrouve également dans cette famille les protéines intégrales du ER MOSPD1 et MOSPD3. Une étude récente rapporte que ces deux protéines peuvent former des MCS grâce à leur domaine MSP en interagissant avec des motifs appelés FFNT (Two Phenylalanines ['FF'] in a Neutral Tract) (Cabukusta et al. 2020). Les protéines à domaine MSP peuvent ainsi être catégorisées selon leur type d'interaction : VAPA, VAPB et MOSPD2 interagissant avec les motifs FFAT et un autre sous-groupe incluant MOSPD1 et MOSPD3, capable de lier des motifs FFNT. Le dernier membre de la famille à domaine MSP est nommée CFAP65 (ou CCDC108) et possède un rôle dans la fertilité et la spermatogenèse (W. Wang et al. 2021). En revanche, cette protéine est très peu étudiée et aucune donnée n'existe actuellement concernant son implication dans la formation de MCS ni sa capacité à lier des motifs FFAT/FFNT.

INTRODUCTION

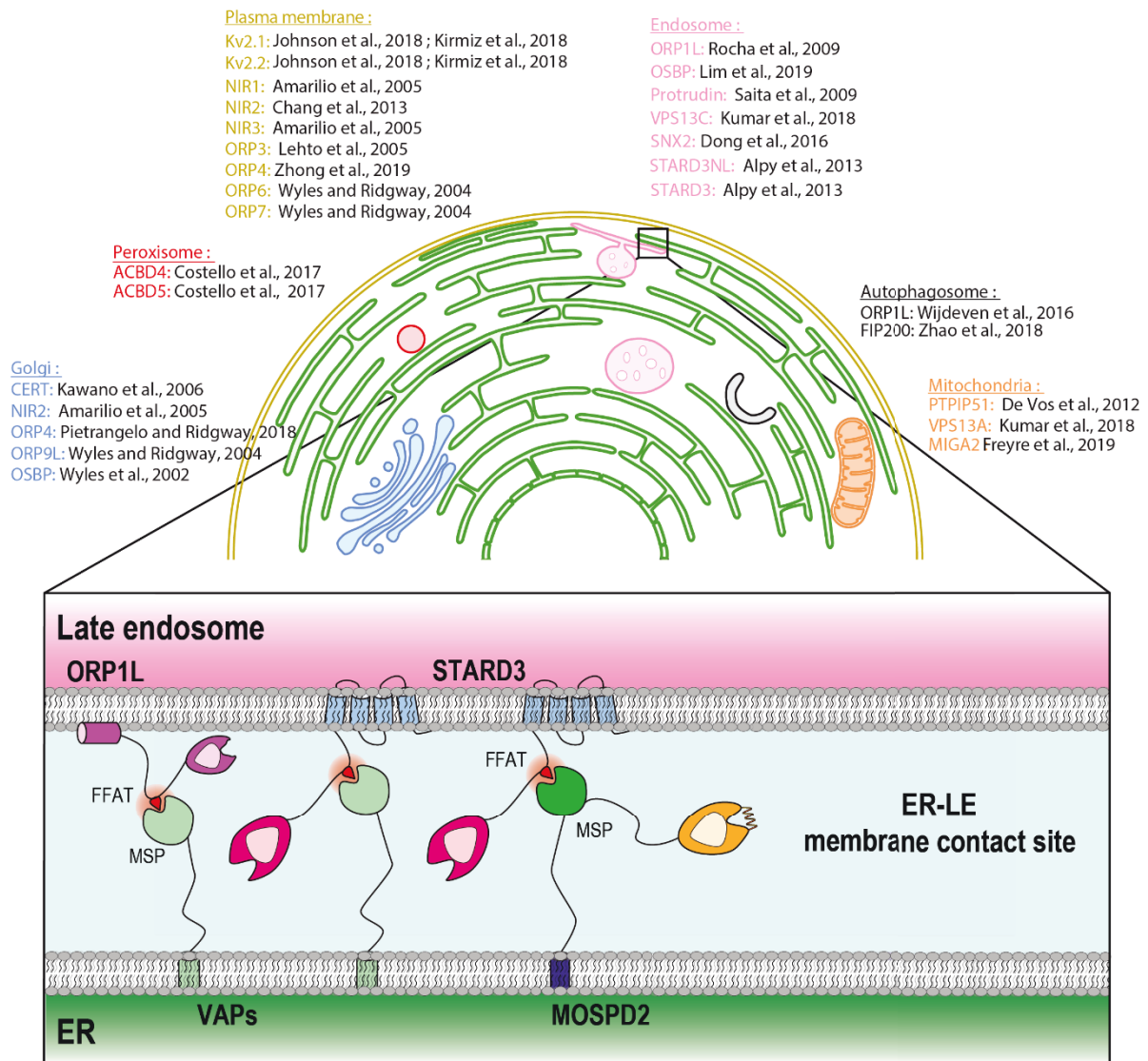


Figure I10. Formation et maintien des sites de contact membranaires par les protéines VAPs et MOSPD2.

VAPA, VAPB et MOSPD2 sont des protéines intégrales du réticulum endoplasmique (ER), capables de former des ponts moléculaires entre le ER et de nombreux organites. Via leur domaine MSP, ces protéines reconnaissent et interagissent avec d'autres protéines possédant un motif FFAT, une courte séquence peptidique. Par exemple, les VAPs et MOSPD2 peuvent se lier aux protéines ORP1L ou STARD3, formant ainsi des contacts entre le ER et les endosomes tardifs.

3. Facteurs connus permettant la régulation des MCS

Abondance des protéines d'ancrage. Les contacts inter-organites correspondent à des structures dynamiques et transitoires (Valm et al. 2017). Un des facteurs les plus importants régulant ces contacts est l'abondance des protéines d'ancrage (Kors, Kurian, et al. 2022). En effet, la surexpression de protéines d'ancrage comme ACBD5 ou STARD3, des partenaires des protéines VAPs, augmentent la formation de MCS (Costello et al. 2017; Alpy et al. 2013). Ces données suggèrent que selon le type cellulaire ou l'état métabolique d'une même cellule, les MCS sont modifiés. Par exemple, lors de la privation de nutriments des

INTRODUCTION

cellules HeLa, les contacts entre le ER et la membrane plasmique augmentent afin de stimuler la biogenèse d'autophagosomes (Nascimbeni et al. 2017). De même, une compétition entre différentes protéines pour une même cible peut altérer la formation de MCS. La protéine α -synuclein, impliquée dans la maladie de Parkinson, est capable de se lier au domaine MSP de la protéine VAPB, induisant une baisse des contacts ER-mitochondrie médiés par la protéine PTP51 (Paillusson et al. 2017).

Composition lipidique des membranes. De nombreuses protéines retrouvées aux MCS possèdent des domaines de liaison membranaire. Ces domaines permettent aux protéines d'interagir avec des membranes spécifiques, enrichies en certains lipides. La composition lipidique des membranes est sujette à un contrôle homéostatique permettant aux cellules de s'adapter à leur environnement (Ernst, Ballweg, and Levental 2018). Comme mentionné précédemment, les MCS possèdent leur propre lipidome, suggérant une modulation des protéines pouvant être recrutées à ces structures (King et al. 2020). De même, cette modulation des lipides permet d'initier la formation ou non d'un site de contact selon la présence d'un lipide. Par exemple, la protéine ORP1L est capable de détecter le niveau de cholestérol des endosomes tardifs par son domaine ORD, induisant un changement de conformation de la protéine (Rocha et al. 2009). Lorsque le niveau de cholestérol est faible sur les endosomes, ORP1L interagit avec les protéines VAPs et forme des contacts ER-endosomes. A l'inverse, lorsque la membrane limitante des endosomes devient chargée en cholestérol, le domaine ORD de ORP1L se lie au cholestérol, induisant un changement de conformation et la perte d'interaction avec les protéines VAPs.

Modifications post-traductionnelles. La modification d'affinité des interactions par des modifications post-traductionnelles est une autre façon de réguler les contacts. Notre laboratoire a récemment montré que certains motifs FFAT, appelés phospho-FFAT, peuvent être phosphorylés permettant ainsi leur interaction avec les domaines MSP de manière rapide et réversible (Di Mattia et al. 2020). Ce changement d'affinité a des conséquences fonctionnelles importantes, le transport de lipides médié par STARD3 nécessite cette phosphorylation afin de pouvoir s'effectuer. Plus récemment, une autre équipe a suggéré que la phosphorylation de certains motifs FFAT à une autre position pourrait avoir l'effet inverse et bloquer l'interaction avec les protéines VAPs avec leur partenaire (Kors, Hacker, et al. 2022). Une autre modification connue est l'ubiquitination, pouvant conduire à la dégradation des protéines ou bien altérer leur capacité d'interaction (Kors, Kurian, et al. 2022). C'est le cas par exemple du complexe UBE2J1 et RNF26, des protéines intégrales du ER, capables d'ubiquitiner la protéine cytosolique SQSTM1 (ou p62) (Cremer et al. 2021). Cette modification de p62 permet son interaction avec des protéines endosomales comme TOLLIP, induisant la formation de MCS ER-endosome et la régulation de la réponse à l'EGF et la voie Akt.

INTRODUCTION

Protéines à IDR. De nombreuses protéines retrouvées aux MCS possèdent des régions intrinsèquement désordonnées (IDR), comme les protéines VAPs ou certains LTPs comme OSBP (Jamecna and Antonny 2021). Une des fonctions associées à ces régions est d'agir comme une barrière entropique, limitant l'encombrement protéique. La protéine OSBP possède une IDR lui permettant d'éviter de former des contacts homotypiques Golgi-Golgi et joue également sur la densité de protéines aux MCS (Jamecna et al. 2019). La diminution de l'encombrement protéique permet à OSBP d'être plus mobile à cette interface ER-Golgi. De manière intéressante, les protéines VAPs possèdent également des IDR régulant leur localisation aux MCS. En effet, une étude récente montre que le raccourcissement de cette région chez la protéine VAPA entraîne une relocalisation importante de cette protéine aux contacts ER-mitochondrie, au détriment des contacts ER-Golgi (Subra et al. 2023). Ainsi, la flexibilité fournie par ces IDR joue un rôle important sur les capacités d'interaction des protéines VAPs et par conséquent la formation de MCS.

4. Fonctions moléculaires associées aux MCS

D'un point de vue moléculaire, les MCS correspondent à des sous-domaines membranaires spécialisés dans l'échange de molécules permettant de synchroniser différentes activités cellulaires. Les deux fonctions principales identifiées sont l'échange de lipides et d'ions (Holthuis and Levine 2005; Burgoyne, Patel, and Eden 2015; Prinz, Toulmay, and Balla 2020). De nombreuses LTPs ont été identifiées aux sites de contact membranaires, dont notamment des protéines de la famille à domaine ORD précédemment abordées (Wong, Čopič, and Levine 2017; Hanada 2018; Egea 2021). En plus de ces LTPs, on retrouve également un enrichissement d'enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique, comme cela a été montré pour les contacts ER-mitochondrie (Jean E. Vance 2020; Rusiñol et al. 1994). Par ailleurs, des modifications post-traductionnelles sont aussi associées aux MCS. C'est le cas par exemple de l'enzyme PTP1B située au ER, capable de déphosphoryler des récepteurs à activité tyrosine kinase aux contacts ER-Endosome (Stuible and Tremblay 2010). De même, on retrouve un enrichissement de kinases et phosphatases de PI dans ces structures, dont notamment l'enzyme Sac1 permettant à OSBP d'effectuer des contre-échanges de lipides (Selitrennik and Lev 2016; Mesmin et al. 2013). Des protéines associées à des voies de signalisation sont également retrouvées dans des complexes protéiques localisés dans ces structures. C'est le cas par exemple de l'enzyme Akt, localisée dans des contacts ER-mitochondrie (Giorgi et al. 2010). De même, il a été récemment montré que SREBP1, un facteur de transcription majeur de la voie du cholestérol, est enrichi aux sites de contacts ER-mitochondrie (Ganji et al. 2023). En résumé, la fonction des MCS ne se limite pas

INTRODUCTION

à un simple remodelage membranaire local, mais ces structures servent également de plateformes de signalisation intracellulaire et permettent ainsi la régulation de nombreuses activités cellulaires, et plus globalement l'homéostasie cellulaire. Par la suite, deux sites de contacts seront abordés plus en détail, à savoir les contacts ER-LD et ER-Endosome.

5. Rôle du ER dans le cycle de vie des gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques (LDs) sont des organites atypiques, consistant en une accumulation de lipides neutres protégés par une hémi-membrane de phospholipides et prenant vie depuis le ER (Walther, Chung, and Jr 2017). De ce fait, le ER a une place cruciale dans la biologie des LDs et permet leur régulation tout le long de leur cycle de vie. Longtemps considérés comme de simples réservoirs inertes, l'étude de ces organites a pris de l'ampleur ces dernières années, mettant en avant de nombreuses fonctions associées aux LDs et des répercussions dans différents processus physiopathologiques (Welte 2015; Herker et al. 2021; J. A. Olzmann and Carvalho 2019).

Biogenèse des LDs (Figure I11). L'initiation de la formation des LDs se fait au ER via la synthèse de lipides neutres, correspondant essentiellement à des triacylglycérols (TAGs) et esters de stérols (SEs) (Walther, Chung, and Jr 2017). D'autres lipides peuvent être retrouvés dans le cœur des LDs, comme des esters de rétinols, le squalène ou encore des éthers de lipides selon les conditions de culture ou le type cellulaire (Bartz et al. 2007; Ajat et al. 2017; Ta et al. 2012). La synthèse des TAGs *de novo* est constituée de 4 étapes : du glycéro-3-phosphate en lyso-PA (par GPAT), lyso-PA en PA (par AGPAT), PA en diacylglycérol (DAG) (par PAP) et DAG en TAG (par DGAT) (Coleman 2004). Certaines de ces enzymes sont des protéines intégrales du ER ; il a également été montré qu'au moins une isoforme des enzymes impliquées dans chaque étape de cette voie de synthèse est capable de se retrouver aux LDs afin de faciliter l'expansion de ces organites (Wilfling et al. 2013). La synthèse des SEs et leur rôle dans la biogenèse est moins bien documentée que celles des TAGs ; on sait néanmoins que des enzymes impliquées dans la voie de synthèse du cholestérol sont retrouvés au ER et semble également se localiser aux LDs d'après des données de protéomique (Goodman 2009; Henne, Goodman, and Hariri 2020). De plus, la synthèse de SEs semble suffisante pour initier la formation de LDs chez la levure (Czabany et al. 2008). Les lipides neutres nouvellement synthétisés se retrouvent entre les deux feuilletts de la membrane du ER et lorsqu'une certaine concentration critique est atteinte, ces lipides vont nucléer, c'est-à-dire entraîner une séparation de phase (Thiam and Forêt 2016). Cette nucléation forme des structures en lentille d'environ 30-60nm chez la levure après induction de la biogenèse de TAGs (Choudhary et al.

INTRODUCTION

2015). Plusieurs facteurs peuvent influencer le processus de nucléation : la morphologie du ER via la courbure membranaire, l'accumulation des lipides neutres au lieu de synthèse (vitesse de synthèse plus rapide que la diffusion latérale), la présence de certaines protéines comme fat storage-inducing transmembrane proteins (FIT), Seipin, long-chain acyl-coenzyme A synthetase (ACSL) capables de baisser la barrière énergétique en interagissant ou favorisant le recrutement de certains phospholipides par exemple (Thiam and Forêt 2016). Il est également possible que la nucléation soit détectée par ces différentes protéines ce qui entraînerait leur recrutement. Cette lentille de lipides neutres va ensuite bourgeonner et former une vésicule du côté du cytosol, donnant ainsi une LD initiale (Walther, Chung, and Jr 2017). Le processus de vésiculation pourrait être déterminé par la tension de surface, provenant essentiellement de la composition membranaire, en lipides et protéines, et plus particulièrement de son asymétrie transversale (Thiam and Forêt 2016; Chorlay and Thiam 2018). Les protéines FIT sont nécessaires pour ce processus de vésiculation, leur perte empêchant les LDs de se développer au niveau du cytosol (Choudhary et al. 2015). Des données montrent que les cellules déficientes en FIT accumulent du DAG, et que la normalisation de la quantité de ce lipide permet de rétablir la maturation des LDs (Choudhary et al. 2018). Récemment, d'autres études ont mis en avant une activité catalytique pour FIT2 nécessaire pour l'homéostasie des LDs (Hayes et al. 2018; Becuwe et al. 2020). La perte de FIT2 entraîne également un défaut de morphologie du ER. Le mécanisme moléculaire impliquant FIT dans la maturation des LDs est encore incertain. De même, il a été montré chez la levure que certaines périlipines pourraient cibler les LDs de manière précoce afin de favoriser les premières étapes de la biogenèse (Gao et al. 2017). Les LDs restent connectées au ER par un pont membranaire, permettant la translocation de protéines intégrales du ER vers la surface des LDs (Renne, Klug, and Carvalho 2020; Kory, Farese, and Walther 2016; Olarte et al. 2020). Les protéines cytosoliques sont recrutées aux LDs la plupart du temps par une hélice amphipathique ou des interactions protéiques, mais d'autres mécanismes comme l'ancrage lipidique ont déjà été décrits (Bersuker and Olzmann 2017; Olarte et al. 2022). La connexion physique entre le ER et les LDs semblent maintenue par des complexes protéiques, incluant la protéine seipin (Jeeyun Chung et al. 2019; Olarte et al. 2022). Une population de LDs pourrait par la suite se détacher du ER par un mécanisme inconnu. En revanche, des données suggèrent que ce processus est réversible et nécessite pour cela le complexe ARF1-COPI qui pourrait déstabiliser la membrane des LDs afin de favoriser leur fusion avec le ER (Wilfling et al. 2014; Thiam et al. 2013; J. A. Olzmann and Carvalho 2019).

INTRODUCTION

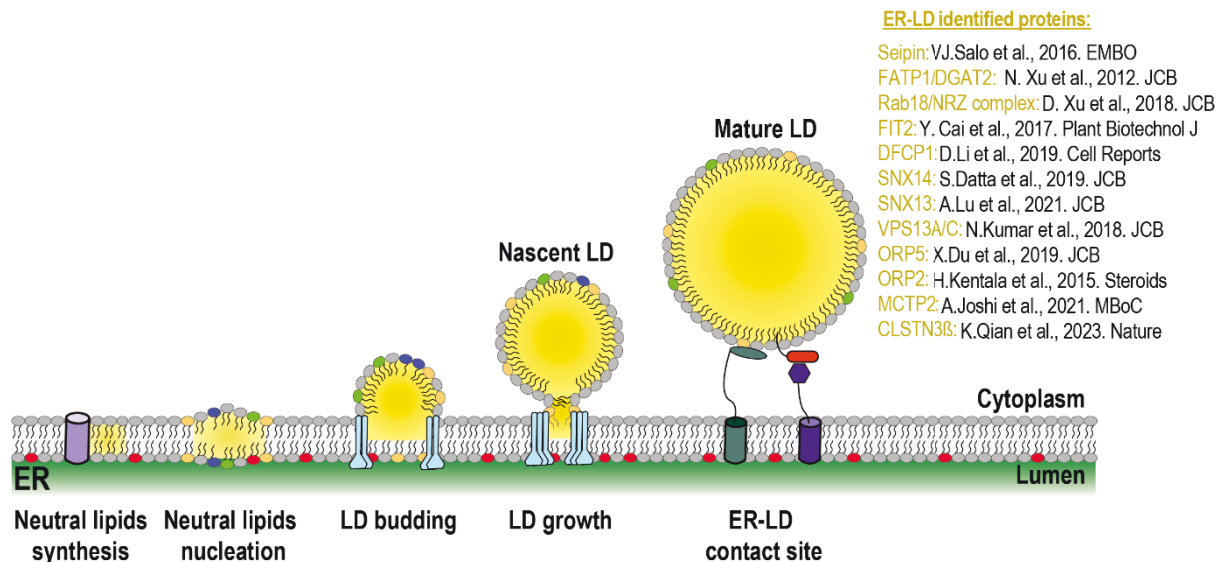


Figure I11. Biogenèse des gouttelettes lipidiques.

Les gouttelettes lipidiques (LD) prennent naissance dans la bicouche du réticulum endoplasmique (ER). Les lipides neutres constituant le cœur des LD sont synthétisés entre les deux feuillettes de la membrane du ER. Ces lipides neutres vont subir une séparation de phase, conduisant à leur nucléation. Cette accumulation va vésiculer du côté cytosolique puis grandir par un flux continu de lipides. Ces différentes étapes sont caractérisées par des changements de composition membranaire. La majorité des LD matures restent en contact avec le ER via différentes protéines identifiées.

Figure adaptée de Gao *et al.*, 2019.

Contact ER-LDs. Des données de microscopie à fluorescence suggèrent qu'environ 85% des LDs sont en contacts avec le ER (Valm et al. 2017). Malgré l'existence de ponts membranaires, essentiellement décrits chez la levure, des contacts ER-LD sans fusion ont été visualisés par microscopie électronique dans des tissus humains (Salo et al. 2016; Jacquier et al. 2011; Datta et al. 2019). Plusieurs protéines ont été décrites au niveau de ces interfaces, dont notamment :

Seipin. Responsable du syndrome de Berardinelli-Seip, une sévère lipodystrophie congénitale, la protéine seipin (ou BSCL2) est la plus étudiée des contacts ER-LD (Magré et al. 2001). Seipin est une protéine intégrale du ER capable de s'oligomériser afin de former des structures en forme d'anneau (Sui et al. 2018; Arlt et al. 2022). Cette structure semble faciliter le processus de nucléation des TAGs, dont la transition de phase s'effectue plus rapidement en présence de seipin (Zoni et al. 2021; Prasanna et al. 2021). De même, ce complexe permet de réguler le flux de TAGs contenu dans la bicouche du ER vers le cœur des LDs en formation (Salo et al. 2019). Seipin joue également un rôle sur l'accumulation de DAG, ce qui pourrait favoriser le recrutement de certaines protéines (Zoni et al. 2021). Le rôle de seipin ne se limite pas aux TAGs mais semble s'étendre à d'autres lipides neutres, dont les SEs (Renne, Corey, and Ver 2022; Dumesnil et al. 2023). Malgré ces récentes découvertes, il reste encore de nombreuses zones d'ombres sur le rôle de seipin dans la maturation des LDs. En effet, de

INTRODUCTION

nombreuses protéines semblent interagir avec seipin, mais la relevance biologique de la plupart de ces interactions est encore incertaine (Rao and Goodman 2021).

VPS13A et VPS13C. Ces protéines périphériques appartiennent à la famille des LTPs. Des études suggèrent qu'elles pourraient être localisées aux contacts ER-LD (Kumar et al. 2018; Yeshaw et al. 2019). Ces protéines possèdent un motif FFAT leur permettant d'interagir avec les protéines VAPs au ER d'un côté et se lie de l'autre côté aux LDs par des hélices amphipathiques (Kumar et al. 2018). En revanche, leur fonction au niveau de ces contacts reste assez obscure. En effet, la perte de VPS13A a été associée à une hausse du nombre de LDs dans une étude, et à une baisse dans une autre (Yeshaw et al. 2019; Chen et al. 2022). Cette différence proviendrait selon les auteurs des lignées cellulaires utilisées entre les deux études (Chen et al. 2022). Concernant VPS13C, une étude rapporte que sa perte d'expression dans du tissu adipeux brun entraîne une hausse de la taille des LDs et une baisse du contenu en TGs (Ramseyer, Kimler, and Granneman 2018). De manière intrigante, les auteurs notent que VPS13C est enrichi à des contacts LD-mitochondrie. De même, la perte d'interaction avec les protéines VAPs n'abroge pas le recrutement de VPS13A aux LDs, suggérant que cette protéine est capable d'être recrutée directement à la surface des LDs, sans que ce recrutement soit spécifique des contacts ER-LD (Yeshaw et al. 2019). Il serait intéressant d'analyser l'importance de leur localisation aux contacts ER-LD par des expériences de sauvetage, même si la taille importante de ces protéines complique leur étude.

ORP5. Cette protéine est également un membre de la famille des LTPs et est capable d'effectuer un transfert de lipides entre de nombreux organites (J. Chung et al. 2015; Monteiro-Cardoso et al. 2022). Contrairement à la plupart des membres de la famille ORP, ORP5 ne possède pas de motif FFAT mais un domaine transmembranaire l'ancrant au ER (Oikkonen and Li 2013). Il existe à ce jour une seule publication sur la localisation de ORP5 aux contacts ER-LD (Du et al. 2020). Cette protéine possède un domaine de liaison membranaire PH, et un LTD ORD. De manière intéressante, la délétion du domaine PH semble augmenter le recrutement de ORP5 aux LDs. La liaison aux LDs est médiée par le domaine ORD, potentiellement par une hélice amphipathique. La perte d'expression de ORP5 entraîne une augmentation de la taille des LDs, mais cette étude ne fournit pas de données sur le nombre ou l'aire total. Les auteurs suggèrent que ORP5 serait capable d'effectuer un contre-échange PI(4)P/PS au niveau des contacts ER-LD (Du et al. 2020). Une étude récente montre également qu'ORP5 se retrouve dans les contacts ER-mitochondrie et favorise la biogenèse des LDs en régulant la localisation de seipin (Guyard et al. 2022). Dans cette même famille, la protéine ORP2 a également été suggérée comme pouvant se localiser aux contacts ER-LD mais ces données nécessitent confirmation (Kentala et al. 2015).

SNX14. Des mutations entraînant la perte de fonction de la protéine SNX14 sont associées à une forme d'ataxie cérébelleuse appelée SCAR20 (Thomas et al. 2014; Shukla

INTRODUCTION

et al. 2017). Les études caractérisant la fonction moléculaire de SNX14 sont récentes. SNX14 a d'abord été montrée comme étant une protéine intégrale du ER, impliquée dans l'homéostasie lipidique de la cellule (Bryant et al. 2018). En effet, sa délétion perturbe les concentrations de lipides neutres (TAGs et SEs) et la distribution du cholestérol. Cette même étude rapporte le recrutement de SNX14 aux LDs après traitement à l'acide oléique, induisant la biogenèse des LDs. Cette localisation aux contacts ER-LD a été confirmée par la même équipe en 2019 (Datta et al. 2019). Le recrutement de SNX14 est médié par une hélice amphipathique située dans un domaine cytosolique. SNX14 est une protéine d'ancrage ER-LD : sa surexpression entraîne une hausse de ces contacts. De plus, sa perte d'expression entraîne une diminution de l'aire totale des LDs. Ce rôle dans la régulation de l'homéostasie des LDs nécessite son ancrage aux LDs. SNX14 interviendrait tôt dans la biogenèse des LDs et favoriserait la synthèse de TAGs. La même équipe a également montré que les cellules déficientes pour SNX14 sont plus sensibles à un stress nutritif induit par le palmitate, un acide gras saturé (Datta et al. 2020). Ce phénotype est caractérisé par un défaut morphologique du ER, une accumulation d'acides gras libres et un changement de la composition des chaînes aliphatiques des lipides. Les auteurs font l'hypothèse que SNX14 est impliquée dans l'homéostasie de la saturation des lipides, en interagissant avec la protéine SCD1, une désaturase formant des acides gras monoinsaturés. SNX14 favorise également la formation de LDs en période d'influx élevé d'acides gras, évitant ainsi un stress cellulaire.

Cette liste de protéines retrouvées aux contacts ER-LD est non exhaustive, on retrouve également DGAT2 et FATP1, Rab18 et le complexe NRZ, DFCP1, MCTP2, etc. (Figure I11) (J. A. Olzmann and Carvalho 2019; Joshi et al. 2021; D. Li et al. 2019). De nombreuses protéines associées aux contacts ER-LD sont impliquées dans des maladies héréditaires neurodégénératives ou métaboliques (Herker et al. 2021). En revanche, le rôle des contacts ER-LD dans la physiopathologie de ces maladies reste méconnu. En effet, les contacts ER-LD correspondent à un champ de recherche assez récent et les mécanismes moléculaires de régulation des LDs sont encore peu compris. En plus de ces maladies héréditaires, les LDs sont aussi associées à des pathologies plus fréquentes comme l'athérosclérose ou certains cancers (Petan, Jarc, and Jusović 2018).

6. Perturbations des LDs et pathologies : exemple du cancer

Afin de pouvoir alimenter leur forte prolifération, les cellules cancéreuses adaptent leur métabolisme énergétique (Hanahan and Weinberg 2011). La première modification métabolique des cellules cancéreuses décrite concerne le métabolisme du glucose, les

INTRODUCTION

cellules passant d'un métabolisme aérobie à anaérobie, un processus appelé effet Warburg. Il apparaît que le métabolisme des lipides est également crucial pour la biologie des cellules cancéreuses (Currie et al. 2013). En effet, les cellules cancéreuses en prolifération ont des besoins élevés en lipides, qu'elles peuvent obtenir par différentes sources comme par exemple la biosynthèse, l'autophagie, ou l'endocytose (Petan 2020). Ces différents points d'entrée de lipides convergent vers les LDs, permettant ainsi de réguler le flux de lipides dans la cellule et d'adapter leur utilisation selon les besoins. Par exemple, une étude a démontré que des cellules cancéreuses du sein triple négative (TNBC) sont capables de séquestrer des acides gras polyinsaturés (PUFAs) dans des lipides neutres stockés dans les LDs en limitant leur lipolyse ou bien en stimulant un remodelage membranaire par des phospholipases (sPLA2) (Jarc et al. 2018). Ainsi, ces cellules limitent le stress oxydatif causé par les PUFAs et sont également capables d'utiliser ces lipides en période de stress nutritif afin de survivre. Les LDs agissent comme des tampons énergétiques, permettant aux cellules cancéreuses d'avoir une flexibilité métabolique nécessaire à leur survie dans différentes conditions environnementales.

De façon intéressante, il a été montré que la quantité de LDs dans les cellules cancéreuses est corrélée à l'agressivité tumorale, en particulier dans le cancer du sein (Shyu et al. 2018; Abramczyk et al. 2015). De même, une étude analysant des tumeurs de patientes atteintes de cancers du sein a mis en évidence un lien entre le taux d'esters de stérols et le niveau de prolifération et un mauvais pronostic clinique (de Gonzalo-Calvo et al. 2015). Un taux élevé de SEs corrèle avec la surexpression des récepteurs LDLR, SCARB1 et de l'enzyme ACAT1 responsable de l'estérification du cholestérol. En bloquant ACAT1 par traitement pharmacologique, il est possible de diminuer la prolifération de plusieurs lignées de cancer du sein (Antalis et al. 2010). Ces résultats ont également été retrouvés dans des cellules de cancer de la prostate (Yue et al. 2014). En effet, ces cellules cancéreuses accumulent aussi des SEs et l'inhibition d'ACAT1 diminue leur agressivité. En plus de cet effet métabolique, les LDs sont également impliquées dans la chimiorésistance en séquestrant par exemple des molécules anticancéreuses hydrophobes (Shyu et al. 2018; Antunes et al. 2022).

Ces différents éléments montrent que les LDs sont des organites cellulaires centraux dans la biologie des cellules cancéreuses. Il existe de plus en plus d'études démontrant l'implication des LDs dans le processus tumoral (Fader Kaiser et al. 2022). En revanche, il existe très peu de données sur les mécanismes moléculaires régulant le cycle de vie des LDs. Comprendre comment la formation des LDs est régulée et comment ces organites impactent la progression tumorale est essentiel pour envisager d'exploiter cette voie métabolique comme marqueur de progression ou cible thérapeutique. Au vu de la proximité du ER avec les LDs et son implication dans leur biogenèse, il est probable que les contacts ER-LD soient une voie de régulation importante du métabolisme lipidique des cellules cancéreuses.

7. Régulation du système endosomal par le ER

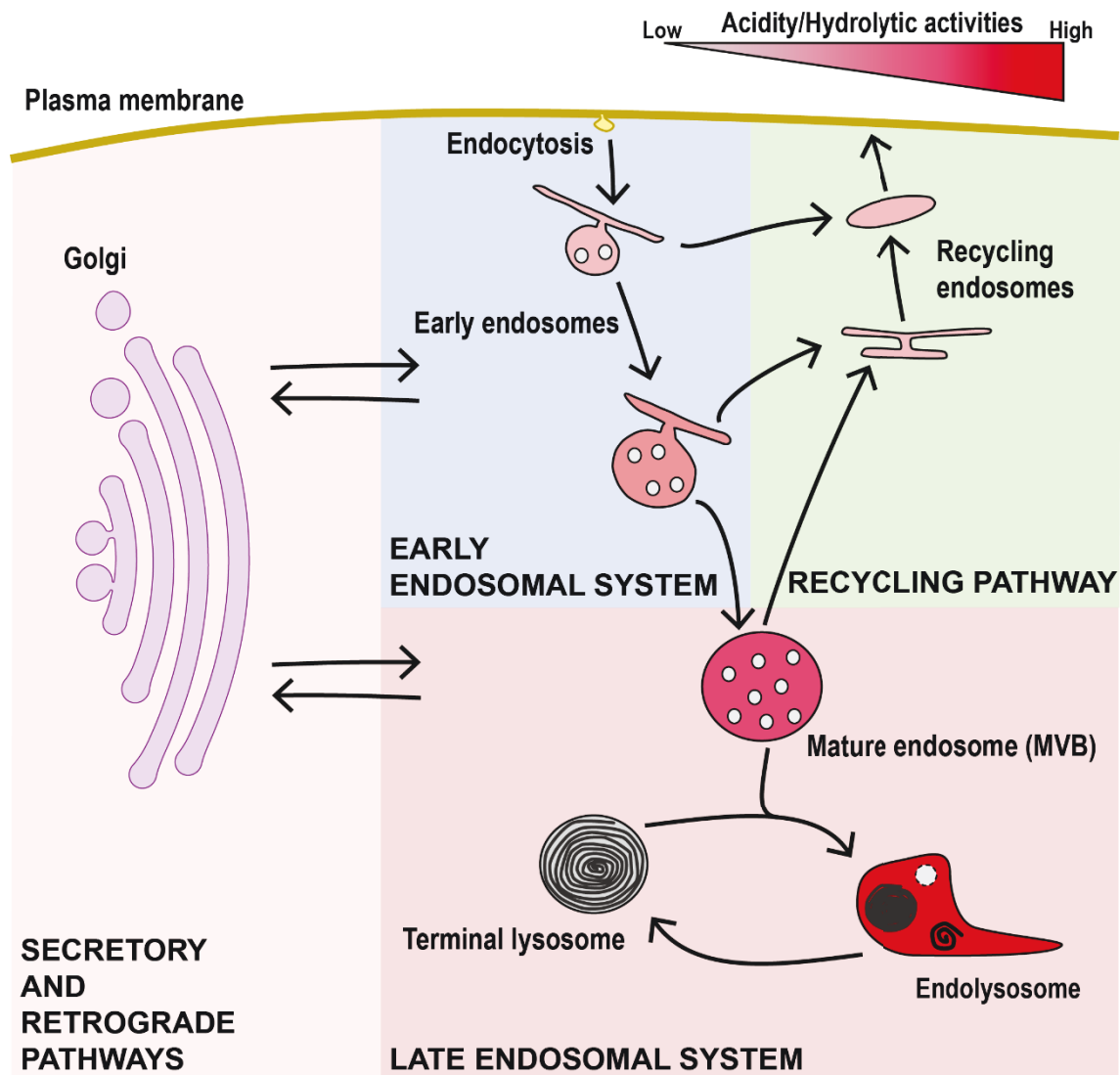


Figure I12. Cycle de maturation du système endosomal et les différents compartiments le composant.

Le processus d'endocytose est initié à la membrane plasmique via différents mécanismes. Les endosomes précoces correspondent au premier compartiment du système endosomal. Ces endosomes sont en contact avec le Golgi et peuvent fournir du matériel à la voie de recyclage ou bien continuer leur maturation en fusionnant de manière homotypique. Le système endosomal tardif correspond au site de dégradation des macromolécules d'origine exogène ou endogène, grâce à différentes enzymes hydrolytiques, les plus souvent actives à pH acide. Le Golgi communique avec le système endosomal tardif afin de réguler la composition des différents compartiments grâce à la voie de sécrétion et la voie rétrograde. La voie de recyclage permet de redistribuer des composants membranaires comme des récepteurs à la membrane plasmique afin d'éviter leur dégradation.

Figure adaptée de Huotari and Helenius., 2011 et Bright *et al.*, 2016.

Les différents compartiments du système endosomal. Les endosomes correspondent à une classe hétérogène d'organites faisant le lien entre la cellule et son environnement (Figure I12). Le processus d'endocytose est initié à la membrane plasmique par différentes machineries, où une vésiculation du côté cytosolique de la membrane se met en place afin de former des cavités qui vont se détacher par fission membranaire, donnant

INTRODUCTION

ainsi des endosomes précoces (EE) (Huotari and Helenius 2011; Scott, Vacca, and Gruenberg 2014). Les EE, de morphologie variable, correspondent à un premier nœud de distribution du système endosomal. En effet, une voie de recyclage existe permettant le retour de certaines molécules à la membrane plasmique, comme c'est le cas de certains récepteurs par exemple. Les EE peuvent aussi continuer leur cycle intracellulaire en formant des endosomes matures. De même, ils peuvent communiquer avec le Golgi par la voie rétrograde. Le passage d'un type d'organite à un autre est caractérisé par un changement dans la composition membranaire, à l'image de la conversion Rab5-Rab7 correspondant au passage d'un EE à un endosome mature (C. Bissig and Gruenberg 2013). Récemment, il a été montré que la maturation des EE dépend de contacts hétérotypiques entre différents stades de maturation de ces organites, entraînant ainsi un échange de matériel permettant un changement de leur composition membranaire (York et al. 2022). Par la suite, les endosomes matures (MVB) font partie du premier point d'entrée dans le cycle du système endosomal tardif, au côté des autophagosomes et des vésicules dérivés du Golgi (Scott, Vacca, and Gruenberg 2014, 20). Ces structures peuvent fusionner avec des lysosomes, formant un organite hybride parfois appelé endolysosome ou autolysosome selon l'organite en question (Luzio, Pryor, and Bright 2007; Bright, Davis, and Luzio 2016; Barral et al. 2022). L'échange de matériel entre ces organites peut également se faire via des contacts transients appelés « kiss and run » (Bright, Gratian, and Luzio 2005). Ces organites hybrides et les lysosomes matures, à la morphologie, pH, et composition membranaire variables, correspondent aux compartiments de dégradation de matériels endogènes ou exogènes (Barral et al. 2022; Ballabio and Bonifacino 2020). Ces compartiments sont capables de se reformer par fission membranaire (Yu et al. 2010; Christin Bissig et al. 2017). Ainsi, le système endosomal tardif est caractérisé par des cycles d'événements de fission et fusion membranaire, régulant le processus d'hydrolyse et des voies de signalisations majeures à l'image de mTOR (Puertollano 2014).

Contacts ER-Endosome (ER-E). Lors de la maturation des endosomes, les contacts avec le ER sont de plus en plus fréquents. Une étude s'est intéressée à la colocalisation par microscopie confocale des EE (positifs pour le marqueur Rab5) et des endosomes tardifs (LE ; positifs pour le marqueur Rab7) avec le ER au cours du temps (Friedman et al. 2013). Sur une durée de 2 minutes, environ 50% des EE restent en contact permanent avec le ER contre 99% des LE. De même, il existe des différences entre les EE marqués par APPL1 (marqueur précoce des EE) et EEA1 (marqueur tardif des EE), démontrant que ces contacts augmentent progressivement lors de la maturation. De manière intéressante, les endosomes en contact avec le ER sont plus mobiles et capables de bouger sur de longues distances grâce aux microtubules, alors que les endosomes ne touchant pas le ER sont plus statiques (Guo et al. 2018). Les contacts ER-endosomes aideraient à stabiliser les endosomes et leur connexion

INTRODUCTION

aux microtubules. Il existe aujourd'hui un nombre élevé de protéines identifiées dans les contacts ER-E (Di Mattia, Tomasetto, and Alpy 2020). On retrouve par exemple des LTPs, des phosphatases et des canaux ioniques permettant de réguler de nombreux processus comme le positionnement des endosomes, les événements de tubulations et fissions membranaires, mais encore la modulation de la signalisation intracellulaire (Raiborg, Wenzel, and Stenmark 2015; Neefjes, Jongsma, and Berlin 2017; Di Mattia, Tomasetto, and Alpy 2020). Il est important de souligner que les contacts ER-E altèrent également le ER. En effet, plusieurs études ont montré un remodelage de l'architecture du ER par des événements de fission ou de tubules entraînés par ces MCS (Guo et al. 2018; Spits et al. 2021). Une étude rapporte également que la composition en PI(3)P des endosomes précoces, permettant la formation de contacts ER-E, altère la morphologie du ER (Jang et al. 2022). La perte des contacts ER-E entraîne une augmentation des feuillettes du ER, au détriment des tubules. Ce changement morphologique est associé à une modification de la redistribution des acides gras entre les LDs et les mitochondries.

Fission et tubulation des endosomes. L'implication du ER dans la fission des endosomes a été observée il y a environ une décennie par microscopie confocale sur des EE positifs au marqueur Rab5 (Rowland et al. 2014). De manière intrigante, ces contacts étaient positifs pour FAM21, une protéine du complexe WASH. Le complexe protéique WASH est impliqué dans le tri des endosomes vers le recyclage ou bien vers le Golgi en promouvant la polymérisation de l'actine et ainsi la tubulation/fission des endosomes (Seaman, Gautreau, and Billadeau 2013). Le complexe WASH est recruté aux endosomes par un autre complexe protéique, le retromer (Helfer et al. 2013; Seaman, Gautreau, and Billadeau 2013). Deux ans après cette publication, une autre équipe montra que les protéines intégrales du ER VAPs sont capables d'interagir directement avec la protéine SNX2, faisant partie du retromer (Dong et al. 2016). Cette interaction est nécessaire afin de réguler la composition en PI(4)P des endosomes, l'échange de matériel entre le Golgi et les endosomes et l'accumulation endosomale d'actine. En revanche, le processus de fission n'a pas été analysé dans ce papier. En 2018, l'équipe de Gia Voeltz identifia deux protéines impliquées dans la fission endosomale médiée par le ER (Hoyer et al. 2018). La protéine TMCC1 est une protéine intégrale du ER que l'on retrouve enrichie dans des contacts ER-E impliqués dans la fission des endosomes tardifs, positifs pour Rab7. La perte de fonction de cette protéine diminue le nombre d'événements de fission médiés par le complexe WASH. Ces contacts ER-E sont également positifs pour la protéine endosomale Coronin 1C, dont la perte d'expression diminue la formation des contacts et le processus de fission endosomale. En revanche, aucune explication sur les mécanismes moléculaires d'action de ces protéines n'est fournie, il est donc possible que ces protéines n'interagissent pas ensemble. Durant cette même période, une équipe publia deux articles reliant la protéine M1-spastin aux contacts ER-E et un rôle dans la

INTRODUCTION

fission endosomale (Allison et al. 2013; 2017). Dans un premier temps, il a été rapporté que la perte d'expression de la protéine intégrale du ER M1-spastin induit une augmentation du processus de tubulation des endosomes. Cette formation de tubules d'endosomes dépend des microtubules et du domaine ATPase de spastin permettant la fragmentation des microtubules. De plus, spastin possède un domaine MIT capable d'interagir avec deux protéines du complexe ESCRT-III, CHMP1B et IST1. La perte d'expression de IST1 induit une augmentation du nombre de tubules. Ainsi, les contacts ER-E médiés par le complexe M1-spastin:IST1 permet la fission des endosomes. Cette interaction est également importante pour le trafic rétrograde endosome-Golgi et impacte la morphologie et l'acidité des lysosomes (Allison et al. 2017).

Transport de cholestérol. Le cholestérol peut être biosynthétisé au niveau du ER ou bien provenir de lipoprotéines endocytées (Ikonen and Zhou 2021). De plus, le ER est sensible au niveau de cholestérol contenu dans sa membrane, permettant ainsi de réguler finement l'homéostasie du cholestérol (Eberlé et al. 2004). Il est estimé qu'environ 30% du cholestérol provenant des LDL sont transférés directement des endosomes au ER, démontrant l'importance des contacts ER-endosome dans la régulation de ce lipide (Meng et al. 2020) A ce jour, de nombreux LTPs pouvant lier du cholestérol ont été localisés aux contacts ER-endosome, mais leur rôle reste souvent incertain.

On retrouve par exemple ORP1L, la LTP la plus étudiée des contacts ER-endosome. Cette protéine a d'abord été montrée comme ayant un rôle de senseur de cholestérol, régulant la formation de MCS ER-E (Rocha et al. 2009; van der Kant, Fish, et al. 2013). Lorsque la membrane limitante des endosomes est faible en cholestérol, ORP1L est capable d'interagir avec les VAPs afin de former des MCS. En revanche, si les endosomes sont enrichis en cholestérol, le domaine ORD se lie à ce lipide, induisant un changement de la conformation d'ORP1L empêchant l'interaction avec les VAPs. ORP1L interagit alors avec le complexe Rab7-RILP, permettant le recrutement du complexe HOPS et de la dynéine, induisant le transport des endosomes par les microtubules et favorisant leur fusion (Wijdeven et al. 2016). ORP1L serait également capable de transférer du cholestérol. Une étude suggère que cette protéine pourrait, dans des conditions pauvres en LDL, transférer du cholestérol provenant du ER vers les endosomes, favorisant ainsi la formation de vésicules intraluminales (Eden et al. 2016). Ainsi, le rôle d'ancrage d'ORP1L via son interaction avec les VAPs serait couplé à un processus de transport de cholestérol (Rocha et al. 2009). Le phénotype observé sur la formation des ILVs pourrait aussi provenir d'un effet indirect de ORP1L sur le positionnement des endosomes et non à un transfert direct de cholestérol (Eden et al. 2016). Un an après cette étude, une autre équipe a publié un article montrant qu'ORP1L pourrait transférer du cholestérol des endosomes au ER (K. Zhao and Ridgway 2017). En effet, des cellules déficientes en ORP1L présentent un défaut d'estérification du cholestérol, une augmentation

INTRODUCTION

de la voie de biosynthèse du cholestérol et une accumulation de cholestérol au niveau des endosomes tardifs provenant d'un défaut de redistribution intracellulaire. Ainsi, ORP1L serait capable d'exporter le cholestérol de la membrane limitante des endosomes vers le ER. La protéine OSBP, de la même famille que ORP1L, est également impliquée dans le transport de cholestérol à l'interface ER-E. Récemment, il a été montré que cette protéine, dans des cellules NPC1 mutantes, est capable de transférer du cholestérol du ER vers les endosomes, en échange de PI(4)P (Lim et al. 2019). Cette accumulation de cholestérol à la membrane limitante des endosomes, médiée par OSBP, dépend de son recrutement aux contacts ER-E par les protéines VAPs et permettrait d'activer le complexe mTOR. Dans cette même famille, les protéines ORP5 et ORP6 seraient également impliquées dans un transport de cholestérol des endosomes au ER (Du et al. 2011; Ouimet et al. 2016). D'autres études sont nécessaires afin d'éclaircir le rôle de cette famille aux contacts ER-E.

D'autres LTPs ont également été retrouvées dans les contacts ER-E. On retrouve par exemple la protéine Gramd1b, située sur le ER, connue pour sa capacité de transport de cholestérol de la membrane plasmique vers le ER (Sandhu et al. 2018). Une étude a montré par marquage en microscopie électronique que Gramd1b est située aux contacts ER-E et que sa perte d'expression est associée à une diminution des contacts entre le ER et les lysosomes (Höglinger et al. 2019). De plus, Gramd1b interagirait directement avec NPC1, la protéine intégrale majeure des endosomes tardifs permettant l'export de cholestérol. A l'image des contacts ER-membrane plasmique, Gramd1b pourrait médier un transfert de cholestérol des endosomes au ER. Une autre protéine localisée aux contacts ER-E est STARD3 (aussi appelée MLN64), une protéine intégrale des endosomes tardifs (Alpy et al. 2001). STARD3 est capable d'interagir avec les protéines VAPs et MOSPD2 et sa surexpression entraîne des contacts massifs entre le ER et les endosomes (Alpy et al. 2013; Di Mattia et al. 2018; 2020). Il a également été montré qu'une fois surexprimée, STARD3 entraîne une relocalisation importante de cholestérol dans les endosomes tardifs, qui proviendrait d'une accumulation de vésicules et membranes intraluminales (Wilhelm et al. 2017). De plus, STARD3 est capable *in vitro* d'accélérer le transfert de cholestérol entre liposomes. Ainsi, les auteurs font l'hypothèse que STARD3 médie un transfert de cholestérol du ER aux endosomes et favorise la formation de membranes intraluminales. Il est important de souligner que la surexpression de STARD3 altère le processus de tubulation des endosomes et favoriserait leur fusion (Alpy et al. 2013; Hölttä-Vuori et al. 2005). De plus, la présence de structures membranaires complexes dans le lumen des endosomes, médiée par la surexpression de STARD3, suggère plutôt une accumulation de matériel endogène provenant de structures autophagiques. Il est donc possible qu'en jouant sur la dynamique de maturation des endosomes, STARD3 puisse moduler le contenu en cholestérol de ces derniers sans effectuer un transfert du ER vers les endosomes. D'autres études sont nécessaires afin d'éclaircir ce point.

INTRODUCTION

Pour conclure, les contacts ER-E mais également les autres MCS médiés par le ER permettent de réguler de nombreux processus cellulaires, notamment des voies de signalisation ayant un impact global sur l'homéostasie cellulaire. Ainsi, l'identification de protéines permettant la formation et le maintien de ces MCS est un champ de recherche important auquel le laboratoire participe activement.

INTRODUCTION

C. MOSPD2, une protéine d'ancrage membranaire impliquée dans le cancer

1. MOSPD2 est capable de former des MCS via son domaine MSP

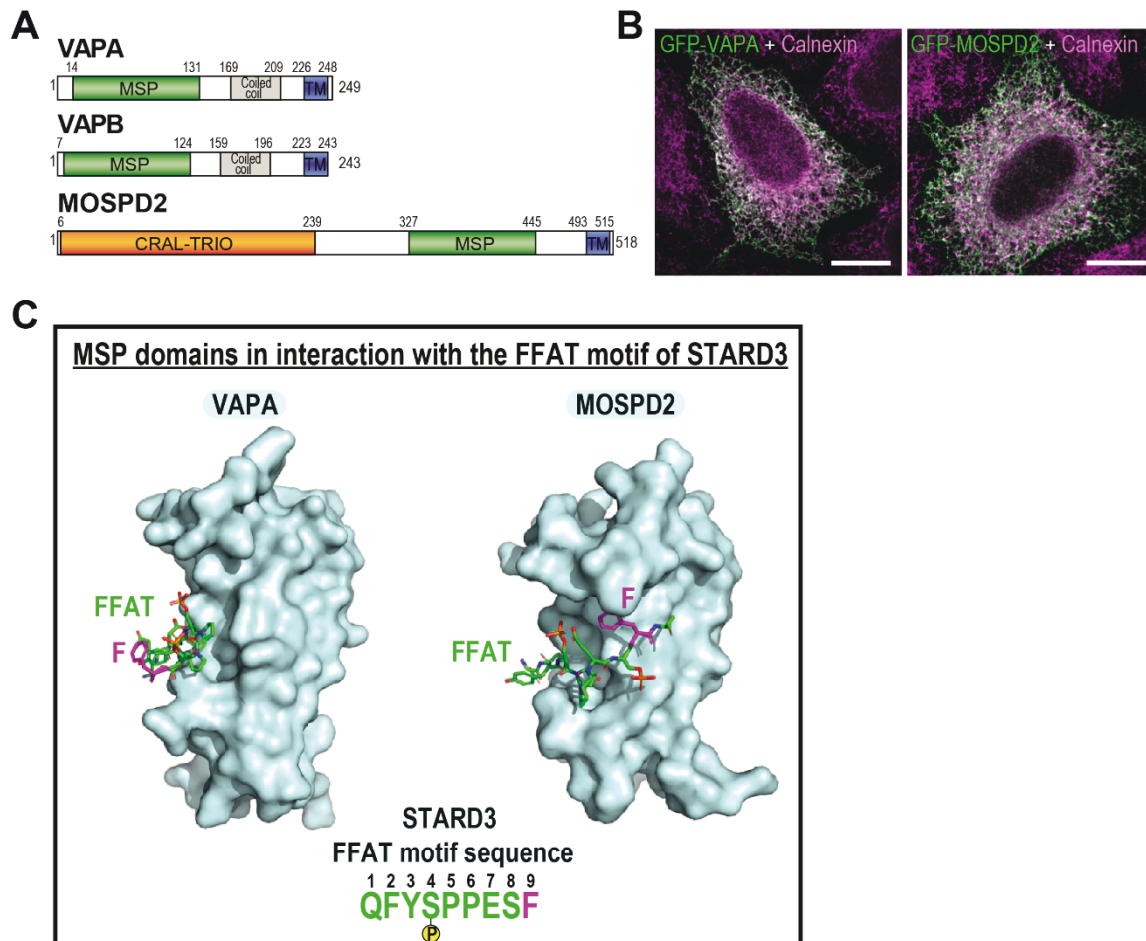


Figure I13. Structure et localisation des protéines VAPs et MOSPD2.

(A) Représentation de la structure des protéines VAPA, VAPB et MOSPD2. Ces protéines possèdent un domaine transmembranaire (TM) permettant leur ancrage au réticulum endoplasmique. VAPA et VAPB ont aussi un domaine coiled-coil, impliqué dans leur dimérisation. Les trois protéines possèdent un domaine MSP, permettant la formation de sites de contact via interaction protéine-protéine. MOSPD2 a un domaine additionnel, nommé CRAL-TRIO, appartenant à la famille des domaines de transfert de lipides (LTD).

(B) Image d'immunofluorescence obtenue par microscopie confocale des protéines GFP-VAP ou GFP-MOSPD2 (en vert) avec un marqueur du réticulum endoplasmique, la calnexine (en magenta). Ces protéines possèdent une localisation réticulaire typique, composée d'un réseau de tubules et de feuillettes. Barres d'échelles : 10 μ m.

(C) Structure des domaines MSP de VAPA ou MOSPD2 (en cyan), obtenues par cristallographie, en interaction avec le motif FFAT de STARD3 (en vert). La phénylalanine en position 9 du motif FFAT (en magenta) est capable d'interagir avec le domaine MSP de MOSPD2, via une poche hydrophobe, et non avec celui de VAPA. Images réalisées par Arthur Martinet en utilisant le logiciel PyMOL.

(C) Figure adaptée de Di Mattia, Martinet *et al.*, 2020.

Les protéines VAPs sont retrouvées dans de nombreux MCS et régulent ainsi diverses activités cellulaires (Murphy and Levine 2016). Pourtant, l'inhibition de l'expression de ces protéines dans des cellules n'affectent pas leur viabilité et ne semble pas altérer drastiquement

INTRODUCTION

la fréquence des contacts entre le ER et certains organites comme les endosomes ou bien les peroxysomes (Eden et al. 2016; Costello et al. 2017). Ces données suggèrent que d'autres protéines puissent remplir la même fonction d'ancrage entre le ER et le reste de la cellule. Afin d'identifier d'autres protéines pouvant remplir la même fonction que VAPA et VAPB, l'équipe a utilisé une approche de protéomique (Di Mattia et al. 2018). Les protéines VAPs interagissent avec d'autres protéines contenant un motif FFAT, une courte séquence peptidique (Kaiser et al. 2005). Le laboratoire a utilisé un peptide synthétique correspondant au motif FFAT de ORP1 comme appât pour une expérience de pull-down (Di Mattia et al. 2018). Ensuite, l'élution a été analysée par spectrométrie de masse et un score d'enrichissement a été calculé en comparaison à un peptide contrôle. Grâce à cette expérience, l'équipe a identifié la protéine MOSPD2 et a réalisé une analyse structure-fonction. Comme les protéines VAPs, MOSPD2 est une protéine intégrale du ER, ubiquitaire, ancrée via un domaine transmembranaire C-terminal (Figure I13A et B). MOSPD2 possède également un domaine MSP capable de lier le motif FFAT de ORP1 avec une affinité proche de celles des VAPs, avec une constante de dissociation d'environ 1 μ M. Cette capacité à lier des motifs FFAT *in vitro* a ensuite été confirmée sur extraits cellulaires, par co-immunoprécipitation de MOSPD2 avec des protéines à motifs FFAT, comme les protéines des endosomes STARD3 et STARD3NL. Cette interaction protéine-protéine induit la formation de contacts entre liposomes *in vitro* et l'enrichissement de MOSPD2 à des MCS dans des modèles cellulaires. Par ces résultats, l'équipe confirma que la protéine MOSPD2 interagit de la même façon que les VAPs avec les motifs FFAT et que ce mécanisme moléculaire permet d'induire la formation de MCS entre le ER et différents organites. De manière intrigante, l'inhibition de l'expression de MOSPD2 altère la fréquence des contacts ER-E et entre endosomes, contrairement aux protéines VAPs. En effet, dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2, la surface de contact entre le ER et les endosomes est diminuée d'environ 40-50% contre une augmentation d'environ 80-100% des contacts entre endosomes. L'inhibition simultanée de VAPA et VAPB n'interfère pas autant sur ces contacts, suggérant un rôle spécifique de MOSPD2 dans la régulation du système endosomal.

La capacité d'interaction des domaines MSP des protéines VAPs et MOSPD2 avec les motifs FFAT a été caractérisée plus en détail par le laboratoire en 2020. De façon intéressante, les motifs FFAT sont hétérogènes et peuvent être classés en motif conventionnel ou phospho-FFAT selon leur séquence primaire (Di Mattia et al. 2020). Les motifs conventionnels ne sont pas sujets à des modifications post-traductionnelles et interagissent de manière constitutive avec les domaines MSP. En revanche, des modifications des régions proches du motif FFAT peuvent modifier l'affinité de ce motif et ainsi jouer sur l'interaction avec les domaines MSP. C'est le cas par exemple de la protéine CERT, dont la phosphorylation d'une sérine en amont de son motif FFAT augmente son affinité pour les protéines VAPs (Kumagai, Kawano-Kawada,

INTRODUCTION

and Hanada 2014). Les phospho-FFAT sont quant à eux des motifs capables d'être directement phosphorylés, modifiant ainsi leur capacité d'interaction avec les domaines MSP. C'est le cas par exemple de la protéine endosomale STARD3 ou bien de la protéine mitochondriale MIGA2, dont les motif FFAT doivent être phosphorylés pour qu'elles interagissent avec les protéines VAPs et MOSPD2. De manière intrigante, certains motifs FFAT, comme ceux des protéines Kv2.1 et Kv2.2, interagissent avec les protéines VAPs et non avec MOSPD2. Ces données suggèrent que ces protéines partagent un mécanisme moléculaire commun, mais que des différences structurelles de leur domaine MSP définissent des partenaires préférentiels en modulant leur capacité d'interaction. En effet, l'équipe a également montré que l'affinité *in vitro* de MOSPD2 pour le phospho-FFAT de STARD3 est environ 5 fois plus élevée que l'affinité de VAPA pour le même motif. De plus, les structures des domaines MSP des VAPs et MOSPD2 ont été obtenues par cristallographie et ont permis de mettre en évidence des différences d'interaction pour le motif FFAT de STARD3. Le domaine MSP de MOSPD2 serait capable d'engager une interaction hydrophobe supplémentaire avec le résidu en position 9 (une phénylalanine) de ce motif FFAT en comparaison aux protéines VAPs, ce qui pourrait expliquer cette différence d'affinité (Figure I13C). Par ces expériences, l'équipe a démontré que les protéines VAPs et MOSPD2 reconnaissent différents types de motif FFAT en utilisant un mode d'interaction commun, mais que le répertoire de protéines reconnues par VAPs et MOSPD2 diffèrent par leur nature ou par leur affinité.

Cette différence d'interaction protéine-protéine médiée par le domaine MSP entre les protéines VAPs et MOSPD2 pourrait expliquer l'implication spécifique de MOSPD2 dans la régulation des contacts ER-Endosomes précédemment observée (Di Mattia et al. 2018). MOSPD2 pourrait avoir un partenaire endosomal unique, ou ayant une différence d'affinité assez importante pour ne pas être compensée par des interactions avec les protéines VAPs qui sont pourtant plus abondantes que MOSPD2 dans les cellules HeLa (Di Mattia et al. 2018). Contrairement aux protéines VAPs, MOSPD2 possède un autre domaine en N-terminal, du côté cytosolique, nommé CRAL-TRIO. A ce jour, ce domaine de MOSPD2 n'a pas été caractérisé et pourrait aussi être responsable de l'altération des contacts ER-Endosomes observée lors de la perte d'expression de MOSPD2.

2. Structure des domaines CRAL-TRIO et leur implication biologique chez l'humain

INTRODUCTION

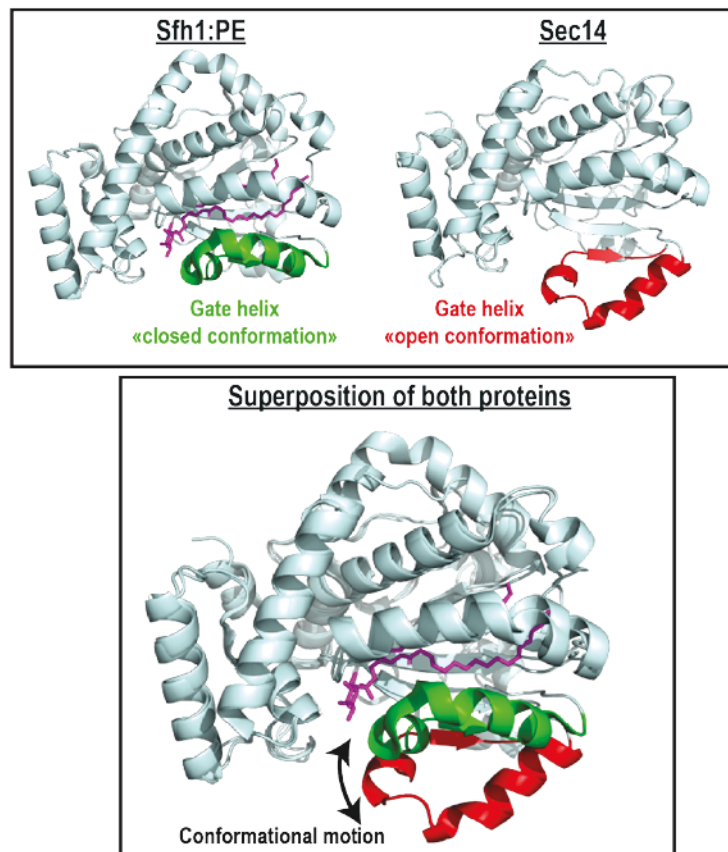


Figure I14. Structure du domaine CRAL-TRIO avec ou sans ligand.

Sfh1 et Sec14 sont des protéines de levure constituées d'un domaine CRAL-TRIO. Sfh1 fut cristallisée avec un ligand, la phosphatidyléthanolamine (PE, en magenta) (PDB: 3B74). Sec14 fut cristallisée dans sa forme apo (sans ligand naturel) (PDB: 1AUA). L'hélice amphiphile recouvrant la poche hydrophobe existe sous plusieurs conformations, selon la présence du ligand ou non. La conformation fermée (en vert), permet de protéger le ligand du milieu aqueux et entraîne l'interaction de l'hélice avec le ligand. La position ouverte (en rouge), expose l'hélice au milieu aqueux, dont la partie hydrophobe. La superposition des deux protéines permet de mettre en évidence le changement de conformation de l'hélice.

Images réalisées par Arthur Martinet en utilisant le logiciel PyMOL.

Comme précédemment abordé, la famille des domaines CRAL-TRIO (souvent retrouvée sous le nom de Sec14) appartient aux LTDs (Chiapparino et al. 2016). Leur fonction *in vivo* reste incertaine : Sec14, la protéine de levure la plus étudiée de cette famille, aurait un rôle de présentation de lipides à des enzymes favorisant ainsi le processus de vésiculation du Golgi (Bankaitis, Mousley, and Schaaf 2010). Le domaine CRAL-TRIO est globulaire, composé de 11 hélices α , 8 hélices 3_{10} , et 6 brins β (Tripathi et al. 2019). Une des caractéristiques de ce domaine est la présence d'une cavité hydrophobe, composée d'un fond en feuillet β et d'une hélice mobile permettant de fermer la poche. De façon intéressante, les propriétés électrostatiques de la surface du domaine semblent assez conservées. Le domaine CRAL-TRIO possède une distribution électrostatique asymétrique, avec un côté essentiellement chargé négativement et le côté opposé, vers l'entrée de la poche, possédant des régions chargées positivement. Cette polarisation des charges aurait un rôle dans

INTRODUCTION

l'orientation du domaine et son interaction avec les membranes. L'hélice mobile à l'entrée de la poche hydrophobe, aussi appelée « gate helix », change de conformation selon la présence d'un ligand ou non (Schaaf et al. 2008; Ryan et al. 2007). Les structures de protéines à domaine CRAL-TRIO obtenues avec ou sans ligand permettent de mettre en évidence la mobilité de cette hélice (Figure I14) (Schaaf et al. 2008; Arai and Kono 2021). En présence d'un ligand, l'hélice se positionne en conformation « fermée », avec la partie hydrophobe de l'hélice faisant face à l'entrée de la poche. Dans la structure du domaine sans ligand, l'hélice est en position « ouverte », avec la partie hydrophobe exposée au solvant. Ce changement de conformation a été suggéré comme pouvant réguler la liaison du domaine à des membranes et l'activité d'extraction/transfert de lipides des protéines α -TTP chez l'humain ou Sec14 chez la levure (Arai and Kono 2021; Sugiura et al. 2019; 2021). Par ailleurs, les ligands sont très hétérogènes : vitamine E, PI, différents PIPs, PG, squalène, cholestérol, etc. (Saito, Tautz, and Mustelin 2007). Cette forte diversité de ligands pourrait provenir de la flexibilité du domaine, suggérant des rôles biologiques variées entre les membres de cette famille (Tripathi et al. 2019). Il existe chez l'humain 28 protéines à domaine CRAL-TRIO. Malgré l'implication de certaines de ces protéines dans des maladies graves, cette famille reste très peu caractérisée (Curwin and McMaster 2008). On retrouve par exemple :

α -TTP. La protéine α -tocopherol transport protein (α -TTP), l'une des plus étudiée chez l'humain, est capable de lier des formes actives de vitamine E (K. C. Min, Kovall, and Hendrickson 2003). Des mutations de cette protéine sont associées à une ataxie provenant d'un stress oxydatif neuronal issue d'un défaut de distribution en vitamine E (Ulatowski et al. 2022; Curwin and McMaster 2008). D'un point de vue moléculaire, cette protéine cytosolique serait capable de récupérer une molécule de vitamine E aux lysosomes par un mécanisme de reconnaissance encore indéterminé (S. Chung et al. 2016; Arai and Kono 2021). Ensuite, la liaison de son ligand entraînerait un changement de conformation du domaine, correspondant au recouvrement de la poche hydrophobe contenant le ligand par une hélice alpha. Dans cette conformation, la protéine se détacherait des lysosomes, puis serait capable d'interagir avec la membrane plasmique grâce à sa reconnaissance du PI(4,5)P2 (Kono et al. 2013). Cette liaison entraînerait l'ouverture de l'hélice, le relargage du ligand dans la membrane plasmique par un potentiel échange contre du PI(4,5)P2 (Arai and Kono 2021).

Clavesin-1. Une autre protéine de cette famille est clavesin-1 (ou CRALBPL), une protéine périphérique capable de lier le Golgi et les endosomes (Kato et al. 2009). Cette protéine est capable de lier du PI(3,5)P2 par son domaine CRAL-TRIO, mais un mutant fonctionnel abolissant cette liaison n'empêche pas le recrutement de clavesin-1 aux endosomes. De plus, la perte d'expression de cette protéine induit une altération morphologique des endosomes tardifs positifs à LAMP1. Le mécanisme moléculaire de ce phénotype endosomal est inconnu, les auteurs suggèrent que clavesin-1 pourrait modifier la

INTRODUCTION

composition en PI(3,5)P2 des endosomes tardifs. Par ailleurs, cette protéine est surexprimée dans différents types de cancers, dont des hépatocarcinomes (S. Zhao et al. 2008).

Dbs. De manière intéressante, le domaine CRAL-TRIO pourrait réguler l'activité d'autres domaines de protéines multimodales de manière allostérique. C'est le cas par exemple du proto-oncogène Dbs, un membre de la famille des facteurs d'échange de nucléotidique guanylique spécifiques de Rho (RhoGEF) (Kostenko et al. 2005). Cette protéine de plus de 1000 acides aminés possède, entre autres, un domaine Dbl homology (DH) interagissant avec les GTPases et un domaine de liaison membranaire PH. La délétion du domaine CRAL-TRIO stimule les capacités oncogéniques de cette protéine, comme montré par des tests de clonogénicité. Ce domaine régule également la localisation intracellulaire de Dbs : la forme entière est localisée en périnucléaire et colocalise avec le Golgi alors que la délétion du domaine Sec14 induit la localisation de la protéine à la membrane plasmique. Le domaine Sec14 de Dbs est capable de lier des PIPs, plus particulièrement le PI(4,5)2. De plus, ce domaine CRAL-TRIO interagirait directement avec le domaine PH de cette même protéine. Ainsi, le domaine CRAL-TRIO serait capable d'inhiber l'activité oncogénique de Dbs en séquestrant la protéine au Golgi et en interagissant de manière intramoléculaire avec le domaine PH, empêchant sa liaison à la membrane plasmique.

Comme vu à travers ces différents exemples, les fonctions et conséquences biologiques des protéines à domaine CRAL-TRIO sont divers. Il n'existe pas de consensus sur le mécanisme moléculaire médié par ces domaines et les ligands sont très variés. Il semble tout de même que la liaison *in vitro* aux PI/PIPs soit un mécanisme commun, même si la relevance *in vivo* est souvent incertaine. Il est donc difficile d'émettre des hypothèses sur la fonction du domaine CRAL-TRIO de MOSPD2. Au vu de la diversité des fonctions des domaines CRAL-TRIO, il est tout à fait imaginable que le défaut de contacts ER-Endosome induit par la perte d'expression de MOSPD2 puisse dépendre du domaine CRAL-TRIO.

3. MOSPD2, migration cellulaire et cancer

Une équipe a publié en 2017 un article démontrant l'implication de MOSPD2 dans le processus de migration cellulaire (Mendel et al. 2017). L'inhibition de l'expression de MOSPD2 dans des monocytes diminue leur capacité migratoire, indépendamment de la chimiokine utilisée. Dans les cellules déficientes en MOSPD2, il y a une diminution de la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2, deux voies de signalisation majeures de la migration. Les auteurs montrent également que parmi les cellules du système immunitaire, les monocytes et les neutrophiles sont les deux types cellulaires ayant la plus forte expression de MOSPD2. De plus, l'inhibition

INTRODUCTION

de l'expression de MOSPD2 dans les neutrophiles affecte leur capacité migratoire, ce qui n'est pas le cas des lymphocytes T qui expriment faiblement cette protéine. Cette étude suggère que dans certains types cellulaires, par un mécanisme moléculaire non identifié, MOSPD2 serait capable de moduler des voies de signalisation et ainsi réguler le processus de migration cellulaire.

La même équipe a publié une autre étude en 2019 démontrant cette fois un lien entre MOSPD2 et la migration de cellules cancéreuses (Salem et al. 2019). Par immunohistochimie, les auteurs montrent que l'expression de MOSPD2 est augmentée dans des tissus cancéreux en comparaison à des tissus sains. C'est le cas par exemple pour le colon, l'œsophage, le foie, le rein et le sein. De manière intrigante, l'expression de MOSPD2 semble corrélée à la capacité d'invasion des cancers du sein. En effet, l'intensité du marquage par immunohistochimie est plus forte sur des coupes de cancers invasifs/métastatiques que sur des coupes de carcinomes *in situ*. De plus, l'inhibition de l'expression de MOSPD2 dans des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 diminue leur capacité migratoire en réponse à l'EGF, sans affecter leur prolifération. La capacité d'invasion a également testée dans différentes lignées de cancers du sein par un test d'invasion basé sur des sphéroïdes 3D dans une matrice. Dans ces expériences, les cellules déficientes en MOSPD2 ne sont plus capables de traverser la matrice et de former des sphéroïdes, confirmant l'implication de MOSPD2 dans le processus de migration et plus particulièrement l'invasion cellulaire. En ligne avec la précédente étude démontrant une baisse de la voie Akt et ERK dans les monocytes, les auteurs montrent que les cellules MDA-MB-231 déficientes pour MOSPD2 ont un défaut de phosphorylation d'Akt et ERK en réponse à l'EGF. Afin de confirmer l'importance de MOSPD2 dans le processus d'invasion, les auteurs ont injecté des cellules MDA-MB-231 déficientes ou non pour MOSPD2 dans des souris immunodéficientes. La taille de la tumeur primaire ne varie pas selon l'expression de MOSPD2. En revanche, la taille des ganglions lymphatiques et le volume de métastases sont diminués lors de l'inhibition de MOSPD2. Cette étude démontre l'importance de MOSPD2 dans un processus physiopathologique important, la dissémination de cellules cancéreuses.

En résumé, MOSPD2 contribue à la migration de différents types cellulaires en modulant des voies de signalisation comme Akt et ERK. Cette protéine est également retrouvée surexprimée dans différents cancers, et son expression corrèle au degré d'invasivité de cancers du sein. De plus l'inhibition de MOSPD2 diminue les capacités migratoires et invasives dans des modèles cellulaires et animaux. En revanche, le mécanisme moléculaire par lequel MOSPD2 régule ces voies de signalisation reste incompris.

D. Objectifs du projet de thèse

MOSPD2 est une protéine intégrale du ER peu caractérisée, pourtant, des études récentes montrent que celle-ci est capable de réguler des processus physiopathologiques importants et pourrait correspondre à une cible thérapeutique intéressante dans certains cancers (Mendel et al. 2017; Salem et al. 2019). En effet, l'inhibition de l'expression de MOSPD2 réduit la formation de métastases dans un modèle animal de cancer du sein (Salem et al. 2019). MOSPD2 est impliquée dans les processus de migration cellulaire, en modulant par un mécanisme inconnu des voies de signalisation (Mendel et al. 2017; Salem et al. 2019). Afin de mieux comprendre comment cette protéine régule ces processus biologiques, des études caractérisant sa structure et les fonctions associées sont nécessaires. Ce projet de thèse, par ses différents objectifs, vise à élucider les fonctions moléculaires médiées par MOSPD2 en étudiant différentes caractéristiques associées à cette protéine la distinguant des protéines VAPs.

Des données de l'équipe, non publiées lors de mon arrivée au laboratoire, montraient que MOSPD2 est parfois enrichie dans des sous-domaines du ER lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules HeLa. De manière frappante, cette distribution subcellulaire n'est pas retrouvée avec les protéines VAPs, suggérant une localisation subcellulaire spécifique de MOSPD2 et donc une potentielle fonction unique. Contrairement aux protéines VAPs, MOSPD2 possède un domaine CRAL-TRIO. Ce domaine dont la fonction est inconnue pour MOSPD2, appartient à la famille des LTDs, suggérant qu'en plus de sa fonction d'ancrage, cette protéine pourrait médier un transport de lipide. Nous avons donc voulu comprendre si ce domaine pouvait être impliqué dans cette localisation spécifique de MOSPD2. Une explication alternative serait une différence d'interaction entre MOSPD2 et les VAPs pour une même protéine à motif FFAT, induisant l'enrichissement de MOSPD2 à un site de contact particulier. Un argument allant contre cette hypothèse est que ce type d'interaction, MSP-FFAT, n'est pas connu pour induire des accumulations lorsque les protéines VAPs sont surexprimées. Le premier objectif principal de mon projet correspondait à étudier ce phénomène, en identifiant la nature de cette localisation et d'évaluer si MOSPD2 exerce une fonction spécifique au niveau de ces sous-domaines réticulaires.

A l'image des protéines VAPA et VAPB, MOSPD2 est une protéine intégrale du ER, capable de former des MCS via son domaine MSP (Di Mattia et al. 2018). Ces domaines interagissent avec des protéines à motif FFAT, correspondant à de courtes séquences peptidiques permettant ainsi la formation de ponts moléculaires entre le ER et d'autres organites (Kaiser et al. 2005; Di Mattia et al. 2020). De manière intrigante, MOSPD2 semble impliquée spécifiquement dans la régulation des contacts ER-E. En effet, la perte d'expression de MOSPD2 augmente la surface de contacts entre endosomes et diminue de manière

INTRODUCTION

concomitante les contacts ER-E. La perte d'expression simultanée des VAPs n'induit pas ce même phénotype. Cette différence par rapport aux protéines VAPs reste inexpliquée. De même, l'impact fonctionnel de la modification de ces contacts sur le système endosomal n'a pas été étudié. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer cette différence : MOSPD2 pourrait, via son domaine additionnel CRAL-TRIO, réguler ces contacts. Alternativement, MOSPD2 serait capable d'avoir des partenaires protéiques spécifiques, comme suggéré par des différences d'affinité observées *in vitro* entre les domaines MSP de VAPs et MOSPD2 pour un même motif FFAT (Di Mattia et al. 2020). Cette hypothèse implique qu'une interaction MSP-FFAT, médiée par MOSPD2, ne serait pas substituable par les protéines VAPs. Le second objectif principal de ma thèse a été de tester ces hypothèses afin de comprendre comment MOSPD2 est capable de réguler les contacts ER-E et d'étudier le rôle de MOSPD2 dans le cycle endosomal.

RESULTATS

RESULTATS

A. MOSPD2 forme des sites de contact membranaires entre le réticulum endoplasmique et les gouttelettes lipidiques grâce à son domaine CRAL-TRIO

1. Introduction et objectifs

Les sites de contact membranaire (MCS) sont des zones d'échanges privilégiées entre organites et régulent de nombreux processus cellulaires (Prinz, Toulmay, and Balla 2020). La formation des MCS dépend de protéines d'ancrage, tels les protéines VAPA et VAPB (VAPs) que l'on retrouve au réticulum endoplasmique (ER) qui sont capables d'interagir avec d'autres protéines via leur domaine MSP. L'équipe a identifié en 2018 un nouveau membre de la famille VAPs, la protéine MOSPD2, capable elle aussi de former des MCS par son domaine MSP (Di Mattia et al. 2018). En revanche, MOSPD2 se distingue des VAPs par la présence d'un domaine additionnel, le domaine CRAL-TRIO, appartenant à la grande famille des domaines de transfert de lipides (LTDs) (Chiapparino et al. 2016). A ce jour, aucune donnée concernant le CRAL-TRIO de MOSPD2 n'a été publiée.

Des données non publiées de l'équipe montraient que MOSPD2, une fois surexprimée, se retrouve enrichi dans des sous-domaines du ER. De manière intrigante, ce phénomène n'est pas observé avec les protéines VAPs, suggérant qu'il corresponde à une fonction unique de MOSPD2. En effet, cette protéine possède un domaine additionnel par rapport aux protéines VAPs, évoquant un potentiel rôle supplémentaire. De même, il est possible que la reconnaissance de protéines via son domaine MSP diffère par rapport aux VAPs et permette son interaction à un MCS spécifique, comme suggéré par des données *in vitro* (Di Mattia et al. 2020). Les objectifs de mon travail étaient de comprendre par quel mécanisme MOSPD2 se retrouve enrichi dans ces sous-domaines du ER et s'il existe une fonction associée à cette localisation particulière.

2. Résultats

a. Résumé

MOSPD2 étant capable de former des contacts entre le ER et d'autres organites cellulaires tels que les mitochondries, les endosomes ou bien le Golgi, nous avons émis l'hypothèse que les enrichissements de MOSPD2 observés dans des sous-domaines du ER correspondent à des contacts entre le ER un autre organite. La première étape a été d'identifier cet organite par des expériences de co-marquage avec différents marqueurs d'organites. Cela nous a permis d'identifier que les organites en question sont des gouttelettes lipidiques (LDs)

RESULTATS

marquées par le BODIPY, une sonde hydrophobe ayant une forte affinité pour les lipides neutres contenues dans les LDs. Grâce à de la microscopie corrélative fluorescence-électronique, nous avons ensuite confirmé que MOSPD2 est retrouvée au niveau des sites de contact ER-LD. Cette expérience a permis de montrer que MOSPD2 n'est pas transloquée à la surface des LDs, ce qui est le cas de certaines protéines intégrales du ER possédant un motif en tête d'épingle (Kory, Farese, and Walther 2016).

J'ai également vérifié que l'accumulation de MOSPD2 aux contacts ER-LD est visualisable au niveau endogène. Pour cela, nous avons généré une lignée HeLa exprimant de manière endogène une protéine de fusion mClover3-MOSPD2 en utilisant la méthode CRISPR-Cas9. La mClover3 est une protéine fluorescente permettant de suivre la localisation de MOSPD2 par microscopie confocale. Après induction de la biogenèse des LDs par traitement avec de l'acide oléique, j'ai pu observer des accumulations de mClover3-MOSPD2 autour des LDs dans cette lignée modifiée, confirmant ainsi la localisation de la protéine au niveau endogène. En parallèle, nous avons utilisé d'autres lignées, nommées Huh-7 et 501-MEL, correspondant respectivement à une lignée d'hépatocarcinome et de mélanome, ayant une expression endogène importante de MOSPD2 en comparaison aux cellules HeLa. Dans ces deux lignées, l'utilisation d'anticorps dirigés contre MOSPD2 a permis de mettre en évidence les mêmes types d'enrichissements autour des LDs. Ainsi, la localisation de MOSPD2 aux contacts ER-LD est retrouvée dans différents types cellulaires.

Nous nous sommes ensuite demandé si MOSPD2 pouvait réguler l'homéostasie des LDs. Pour cela, j'ai quantifié le nombre et la taille des LDs dans des modèles de perte de fonction de MOSPD2 obtenus par knock-down via siRNA ou knock-out (KO) via CRISPR-Cas9. Dans ces cellules déficientes en MOSPD2, le nombre et la taille des LDs sont fortement réduits. Cette régulation des LDs est spécifique à MOSPD2 et n'est pas retrouvée avec les protéines VAPA et VAPB. De plus, nous avons quantifié les deux grandes classes de lipides neutres présents dans les LDs par analyse biochimique : les triacylglycérols (TAG) et les esters de stérols. La perte d'expression de MOSPD2 induit une baisse significative des esters de stérols mais pas des TAG.

L'étape suivante a été de comprendre par quel mécanisme MOSPD2 est recrutée aux LDs. De manière intrigante, nous avons trouvé que ce recrutement ne dépend pas du domaine MSP mais du domaine CRAL-TRIO. Ce recrutement se fait grâce à une interaction de type protéine-membrane, via une hélice amphipathique à la surface du domaine CRAL-TRIO. Cette interaction a été caractérisée plus en détail *in vitro* et nécessite la présence de défauts d'emballage et de charges négatives sur la membrane liée par MOSPD2.

Afin de comprendre comment MOSPD2 régule les LDs, des expériences de sauvetage ont été réalisées avec différentes formes mutantes de MOSPD2. Pour cela, ces mutants ont été exprimés dans une lignée déficiente en MOSPD2 et le nombre de LDs a ensuite été

RESULTATS

analysé par immunofluorescence. Par cette analyse, nous avons découvert que la régulation des LDs médiée par MOSPD2 dépend du domaine CRAL-TRIO et non du domaine MSP. De plus, la liaison aux LDs médiée par l'hélice amphipathique sans la présence du reste du domaine CRAL-TRIO ne permet pas de réguler les LDs. Ce résultat montre qu'en plus d'un rôle d'ancrage aux LDs, médié par l'hélice amphipathique, le domaine CRAL-TRIO a une autre activité importante pour la fonction des LDs. Au vu des données de la littérature, il est probable que le domaine CRAL-TRIO soit impliqué dans un transfert ou une présentation de lipides à l'interface ER-LD via sa poche hydrophobe (Bankaitis, Mousley, and Schaaf 2010).

Ces résultats ont été publiés en 2022 dans le « Journal of Cell Biology » dans un article dont je suis le premier auteur (Zouiouich et al. 2022). Dans ce papier, j'ai effectué la majorité des expériences d'immunofluorescence, les quantifications liées à l'analyse d'images, les expériences de biochimie (TLC et kits biochimiques), j'ai également participé à l'imagerie et le traitement post-analytique des données de microscopie corrélative, les expériences de FRAP, de pull-down des LDs artificielles et j'ai généré la lignée cellulaire HeLa knock-in mClover3-MOSPD2 par CRISPR-Cas9. J'ai aussi participé à la conception de l'étude, la mise en place des expériences et la rédaction de l'article.

b. Publication

(Zouiouich et al. 2022)

ARTICLE

MOSPD2 is an endoplasmic reticulum–lipid droplet tether functioning in LD homeostasis

Mehdi Zouiouich^{1,2,3,4} , Thomas Di Mattia^{1,2,3,4} , Arthur Martinet^{1,2,3,4} , Julie Eichler^{1,2,3,4} , Corinne Wendling^{1,2,3,4} , Nario Tomishige⁵ , Erwan Grandgirard^{1,2,3,4} , Nicolas Fuggetta⁶ , Catherine Fromental-Ramain^{1,2,3,4} , Giulia Mizzon⁷ , Calvin Dumesnil⁹, Maxime Carpentier⁹, Bernardo Reina-San-Martin^{1,2,3,4} , Carole Mathelin^{1,2,3,4,8} , Yannick Schwab⁷ , Abdou Rachid Thiam⁹ , Toshihide Kobayashi⁵ , Guillaume Drin⁶ , Catherine Tomasetto^{1,2,3,4} , and Fabien Alpy^{1,2,3,4} 

Membrane contact sites between organelles are organized by protein bridges. Among the components of these contacts, the VAP family comprises ER–anchored proteins, such as MOSPD2, that function as major ER–organelle tethers. MOSPD2 distinguishes itself from the other members of the VAP family by the presence of a CRAL-TRIO domain. In this study, we show that MOSPD2 forms ER–lipid droplet (LD) contacts, thanks to its CRAL-TRIO domain. MOSPD2 ensures the attachment of the ER to LDs through a direct protein–membrane interaction. The attachment mechanism involves an amphipathic helix that has an affinity for lipid packing defects present at the surface of LDs. Remarkably, the absence of MOSPD2 markedly disturbs the assembly of lipid droplets. These data show that MOSPD2, in addition to being a general ER receptor for inter-organelle contacts, possesses an additional tethering activity and is specifically implicated in the biology of LDs via its CRAL-TRIO domain.

Introduction

The ER, a major membrane-bound organelle of eukaryotic cells, ensures diverse functions such as lipid synthesis, protein synthesis and folding, calcium storage, etc. The ER has a network architecture spreading throughout the cytosol, and is in physical contact with other organelles such as mitochondria, endosomes/lysosomes, autophagic structures, peroxisomes, lipid droplets, and the plasma membrane (Wu et al., 2018). These contacts, which do not lead to organelle fusion, are named membrane contact sites. They are scaffolded by protein bridges connecting the two membranes and involving protein–membrane and protein–protein interactions (Gatta and Levine, 2017).

Many molecular players involved in the formation of contact sites have been identified in recent years (Di Mattia et al., 2020b; Prinz et al., 2019; Wu et al., 2018). A few of them act as general receptors that recruit a variety of tethering partners and hold a central role in the biology of inter-organelle contacts. The ER-resident VAMP-associated protein (VAP) protein family plays a major role in the formation of contacts between the ER and the other organelles, as well as to the plasma membrane. This family comprises six proteins divided into two subfamilies.

The first sub-family comprises VAP-A, VAP-B, and motile sperm domain-containing protein 2 (MOSPD2) that are anchored in the ER membrane by a transmembrane helix (Murphy and Levine, 2016; Di Mattia et al., 2018). VAP-A, VAP-B, and MOSPD2 act as ER receptors that bind multiple protein ligands, either cytosolic or localized on the surface of other organelles, to connect them with the ER (Di Mattia et al., 2018; Murphy and Levine, 2016). VAP-A, VAP-B, and MOSPD2 have a major sperm protein (MSP) domain exposed to the cytosol; this domain hooks proteins that possess a small linear motif named FFAT (two phenylalanines in an acidic tract; Mikitova and Levine, 2012; Loewen et al., 2003; Di Mattia et al., 2018). Recently, a novel subfamily comprising MOSPD1 and MOSPD3 was characterized; these proteins have an MSP domain that recognizes FFNT (two phenylalanines in a neutral tract) motifs (Cabukusta et al., 2020). Lastly, the sixth family member named CFAP65 (Cilia- and flagella-associated protein 65) is involved in ciliogenesis (Zhao et al., 2022).

The functions of VAP-A and VAP-B are well studied; they are central proteins for the formation of inter-organelle contacts and function in lipid transport, ion homeostasis, and autophagy

¹IGBMC, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France; ²Inserm, UMR-S 1258, Illkirch, France; ³CNRS, UMR 7104, Illkirch, France; ⁴Université de Strasbourg, IGBMC UMR 7104- UMR-S 1258, Illkirch, France; ⁵Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, UMR 7021 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France; ⁶Université Côte d'Azur, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France; ⁷European Molecular Biology Laboratory, Cell Biology and Biophysics Unit, Heidelberg, Germany; ⁸Institut de Cancérologie Strasbourg Europe, Strasbourg, France; ⁹Laboratoire de Physique de l'École Normale Supérieure, Université Paris Sciences and Lettres, Centre National de la Recherche Scientifique, Sorbonne Université, Université de Paris, Paris, France.

Correspondence to Fabien Alpy: Fabien.Alpy@igbmc.fr; Catherine Tomasetto: Catherine-Laure.Tomasetto@igbmc.fr.

© 2022 ZOUIOUICH et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

(Murphy and Levine, 2016; Wilhelm et al., 2017; Zhao et al., 2018; Mesmin et al., 2013; Kirmiz et al., 2018; Johnson et al., 2018). In contrast, the function of MOSPD2 is still elusive. MOSPD2 is a genuine member of the VAP family: It shares with VAP-A and VAP-B a large number of tethering partners and promotes the formation of contacts between the ER and many organelles (Di Mattia et al., 2018, 2020a). Unlike VAP-A, VAP-B, MOSPD1, and MOSPD3, which only possess an MSP domain in addition to their transmembrane (TM) domain, MOSPD2 possesses an additional cytosolic domain named CRAL-TRIO (cellular retinaldehyde-binding protein [CRALBP] and triple functional domain protein [TRIO]) at its amino terminus. The CRAL-TRIO domain (also called the Sec14 domain) is present in 28 proteins in human and contains a hydrophobic pocket that, in the case of Sec14p and α -tocopherol transfer protein, can bind/transport small lipophilic molecules such as phospholipids or tocopherols (Chiapparino et al., 2016). Knowing that MOSPD2 contains a CRAL-TRIO domain, we hypothesized that it may have a broader function than the VAP proteins. Here, we show that in addition to serving as a VAP-like tether that establishes ER-organelle contacts through protein-protein interactions, MOSPD2 also tethers the ER to lipid droplets (LDs) by protein-membrane interactions. LDs are ubiquitous organelles that serve as universal lipid stores in cells; they consist of a neutral lipid oil core surrounded by a monolayer of phospholipids associated with peripheral proteins (Olmann and Carvalho, 2019; Thiam and Beller, 2017; Thiam et al., 2013). In this report, we found that the absence of MOSPD2 compromises LD assembly, showing that MOSPD2 is involved in the biology of LDs.

Results

MOSPD2 is involved in the biology of LDs

MOSPD2 is an ER-resident protein (Di Mattia et al., 2018). When expressed in HeLa cells, GFP-labeled MOSPD2 exhibited a distinctive reticular localization pattern throughout the cytoplasm and co-localized with the ER marker Calnexin (Fig. 1 A, a). Remarkably, in about half of the cells, MOSPD2 was additionally found in ring- and comma-shaped structures that were also positive for the ER marker Calnexin (Fig. 1 A, b and c). This shows that in some cells, MOSPD2 can be enriched in subregions of the ER. Importantly, VAP-A and VAP-B were never observed in similar ring-like structures, suggesting that only MOSPD2 can specifically populate these ER subdomains (Fig. 1 B). We then checked whether these MOSPD2-enriched areas corresponded to contact sites between the ER and a particular organelle by performing co-localization experiments using markers of LDs (Nile Red; Fig. S1 A), early endosomes (EEA1), late endosomes/lysosomes (Lamp1), mitochondria (OPA1), and Golgi (GM130; Fig. S2, A–D). MOSPD2-positive rings did not overlap with endosomes, Golgi, and mitochondria. In contrast, ring- and comma-shaped MOSPD2-positive structures were found to be around LDs labeled with Nile Red. To confirm this observation, LD biogenesis in HeLa cells was stimulated by oleic acid (OA) treatment (Listenberger and Brown, 2007). After this treatment, most HeLa cells had numerous and large LDs massively surrounded by ring- and comma-shaped structures

positive for MOSPD2 (Fig. 1 C). This accumulation of MOSPD2-positive ER around LDs was also found in other tested cell lines, including hepatocytes (Huh7), melanoma (501-mel), and mammary epithelial (MCF7) cells (Fig. S1, B–D).

To examine whether endogenous MOSPD2 can be seen in association with LDs, we generated a reporter cell line. The endogenous MOSPD2 gene was modified in HeLa cells using the CRISPR/Cas9 method to fuse the coding sequence of the fluorescent protein mClover3 in frame with that of MOSPD2 (Fig. S3, A and B). As observed by expressing GFP-MOSPD2, endogenous mClover3-MOSPD2 was present in structures in contact with LDs (Fig. 1 D). Next, in Huh-7 and 501-MEL cells, which express higher levels of endogenous MOSPD2 than HeLa cells (Fig. S3 C), we could analyze this protein using a specific antibody (Fig. S3, D and E). We found that the endogenous MOSPD2 did accumulate in ring- and comma-shaped structures around some LDs in Huh7 and 501-MEL cells treated with OA (Fig. S3, D and E). These data indicate that endogenous MOSPD2 is localized around a subset of LDs.

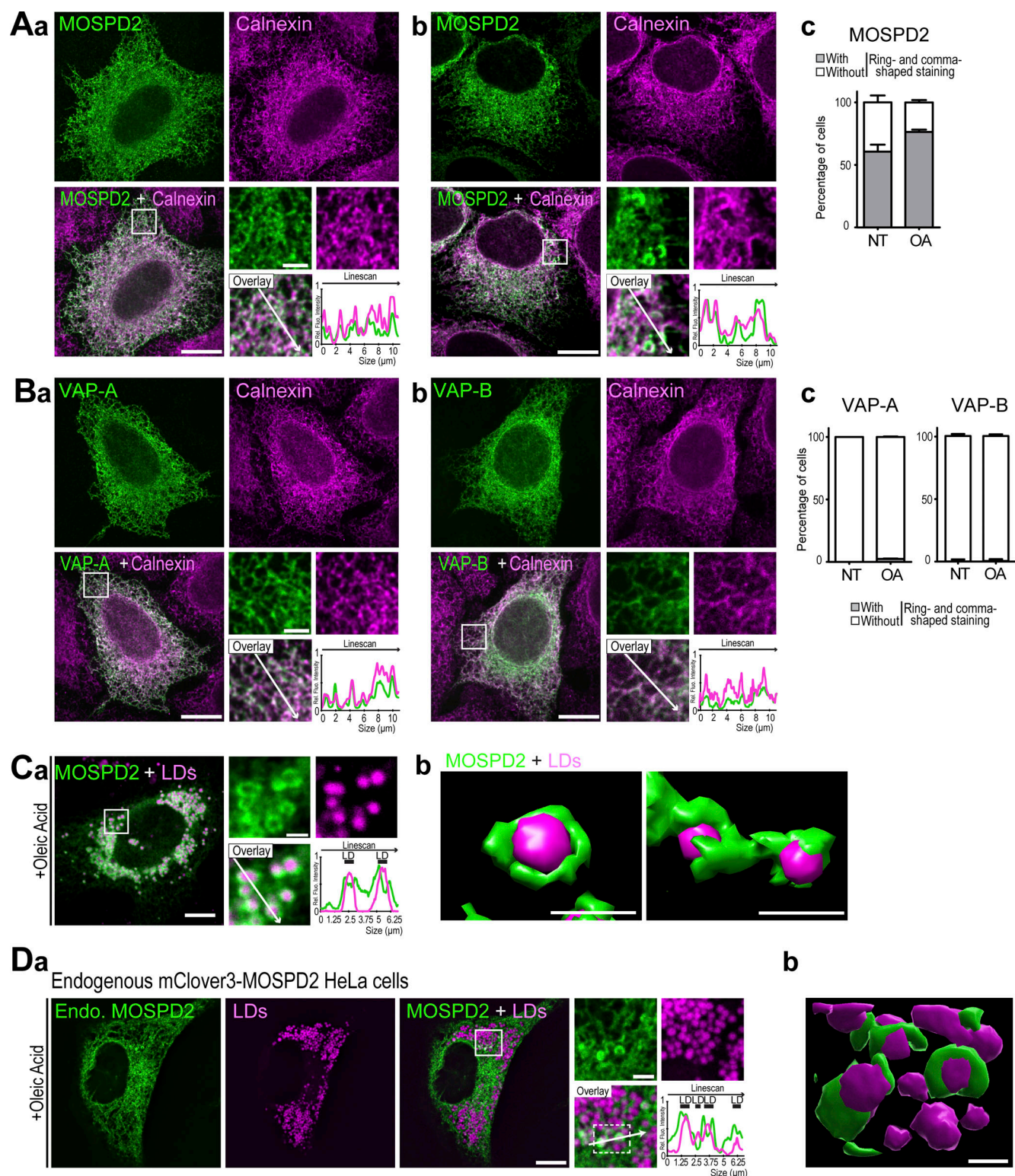
These observations prompted us to investigate whether MOSPD2 has a role in LD biology. We first established several cell models of MOSPD2 deficiency. MOSPD2 was either knocked-down using a pool of siRNAs or knocked-out using a CRISPR/Cas9 approach in HeLa cells (Fig. 2 A); two independent knock-out clones (KO#1 and KO#2) were analyzed. The number and size of LDs labeled with BODIPY 493/503 were then quantified in MOSPD2 knocked-down, knocked-out, and control cells (Fig. 2, B and C; and S4 A). Strikingly, compared with control cells, MOSPD2-deficient cells contained fewer (~2-fold) and smaller (~40% decrease) LDs. To compare the effect of MOSPD2 deficiency with that of VAP-A and VAP-B, we silenced VAP-A and VAP-B either individually or together using pools of siRNAs (Fig. S5 A). The LDs were then labeled (Fig. S5 B), and their number and size quantified (Fig. S5 C). The silencing of VAP-A and/or VAP-B had no effect on the number and size of LDs, thus showing that among the FFAT-binding proteins of the VAP family, only MOSPD2 has a specific role in LD biology.

We next determined the level of neutral lipids in MOSPD2-deficient cells by quantifying total cellular triacylglycerols (TAG) and cholesterol esters (CE) using thin-layer chromatography (TLC; Fig. 2 D). In MOSPD2-deficient cells, TAG levels were unchanged while CE were reduced by ~40%. To further substantiate this phenotype, cholesterol, phospholipids, CE, and TAG were quantified by enzymatic methods in wild type and MOSPD2 knock-out cells (Fig. 2 E). While cholesterol, phospholipids, and TAG remained unchanged in MOSPD2-deficient cells, CE levels were reduced by ~40%. These data show that in the absence of MOSPD2, the level of neutral lipids, especially CE, is decreased.

Together, these data suggest that MOSPD2 is present in ER subdomains in contact with LDs and show that MOSPD2 is involved in the biology of LDs.

MOSPD2 is dynamically recruited to ER-LD contacts

MOSPD2 is present in comma-shaped structures that are also positive for the ER marker Calnexin. This suggests both that MOSPD2 is in ER sheets that do not completely encircle LDs, and



level, treated with OA, and labeled with LipidTOX (magenta). b: 3D reconstruction from confocal images of MOSPD2-positive ER (green) around LDs (magenta) using Imaris (white dashed rectangle from overlay panel). Scale bar: 500 nm. **(A, B, and D)** Images were acquired on a spinning-disk confocal microscope (Nikon CSU-X1, 100× NA 1.4). Scale bars: 10 μ m (insets, 2 μ m). **(C)** Confocal microscope (Leica SP5, 63× NA 1.4) images, scale bars: 10 μ m (insets, 2 μ m).

that it does not translocate at the surface of LDs, meaning that it remains in ER-LD contact sites. To examine this, we performed correlative light and electron microscopy (CLEM). GFP-MOSPD2-expressing cells were processed for electron microscopy and embedded in a fluorescence-preserving resin. Thick sections were imaged by spinning-disk confocal microscopy and then by transmission electron microscopy (TEM; Fig. 3 A). GFP-MOSPD2 fluorescence correlated with the presence of ER sheets in contact with LDs. Noteworthy, we confirmed that comma-shaped fluorescent structures corresponded to areas of ER in contact with LDs. Fluorescence was absent from the surface of LDs making no contact with the ER. These data indicate that MOSPD2 accumulates in ER regions in contact with LDs.

The fact that MOSPD2 is both distributed throughout the entire ER membrane and enriched in subdomains of the ER surrounding LDs suggests that it is in equilibrium between ER-LD contact sites and the remainder of the ER. To analyze the dynamics of MOSPD2 movement between these two regions, we performed fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments. GFP-MOSPD2 was expressed in HeLa cells, and individual LDs were bleached (Fig. 3, B and D). GFP-MOSPD2 fluorescence rapidly recovered ($t_{1/2}$ of ~ 8 s) and reached a plateau equivalent to $\sim 50\%$ of the initial fluorescence (Fig. 3, B and D). In comparison, the LD protein Perilipin-2 (PLIN2) fused with GFP remained permanently associated with LDs with no recovery observed for the duration of the experiment (Fig. 3, C and D). The localization of MOSPD2 is balanced between distinct areas of the ER, some of which are in contact with the LDs, and half of the protein pool can rapidly move in and out these two regions.

We noted that the MOSPD2 signal was not uniform around LDs, suggesting that the surface of LDs might have sub-domains. To examine this, we performed co-localization experiments between GFP-MOSPD2 and endogenous PLIN3, a coat protein of LDs. Of interest, while both proteins were present around LDs, they exhibited a different distribution, the two signals being mostly mutually exclusive, as observed by confocal and super-resolution microscopy (Fig. 3, E and F). This supports the notion that, in terms of protein composition, the surface of LDs has distinct territories, either sticking to the ER (MOSPD2 territory) or being free (PLIN3 territory), and that contacts define them.

MOSPD2 is recruited around mature LDs. Next, to determine whether MOSPD2 is already recruited early in the life of LDs, we visualized the location of GFP-MOSPD2 following the induction of LD biogenesis by OA using live cell imaging (Fig. 3 G). As shown in Fig. 3 G, GFP-MOSPD2 was recruited early during LD biogenesis: GFP-MOSPD2 was already present in areas that were not yet detected by the LD marker LipidTox. Thus, MOSPD2 is associated with LDs at different stages of their life.

Overall, these results demonstrate that MOSPD2 dynamically distributes between specific subdomains of the ER: ER membranes in contact with LDs and the remainder of the ER.

MOSPD2 tethers the ER to LDs

Since associations between the ER and LDs are frequent events, we wondered whether MOSPD2 merely populates existing ER-LD contacts or, instead, contributes to making these contacts. To address this question, we determined by TEM whether the overexpression of MOSPD2 generates more ER-LD contacts. In control cells, LDs made few focal contacts with the ER (Fig. 4 A, a). In contrast, in cells expressing MOSPD2, LDs were frequently associated with long segments of ER encircling them (Fig. 4 A, b).

To evaluate the capacity of MOSPD2 to drive ER-LD contact formation more quantitatively, we examined by light microscopy the recruitment of the ER around LDs in cells where MOSPD2 was overexpressed. The ER surface was labeled with a red fluorescent marker (mScarlet-ER) and the radial distribution of the fluorescence signal was measured around LDs (Fig. 4, B and C; and Fig. S4 B). In cells expressing the mScarlet-ER marker alone, the fluorescent signal was evenly distributed in the cytosol, with no enrichment around LDs (Fig. 4, B and D). In contrast, in cells expressing MOSPD2, the ER marker accumulated in the periphery of LDs, thus showing that MOSPD2 expression promotes the formation of ER-LD contacts. This was specific to MOSPD2 since VAP-A expression did not result in ER accumulation around the LDs (Fig. 4, B and D). Furthermore, consistent with data from Fig. 1, the relative fluorescence of MOSPD2 was 2-fold higher at the periphery of LDs than in the remaining part of the cytoplasm, whereas VAP-A fluorescence was homogeneously distributed; this confirmed that MOSPD2 accumulates around LDs (Fig. 4 E).

We next addressed whether MOSPD2 association with LDs relies on Seipin. Seipin, a protein encoded by the *BSC1* gene, which is mutated in lipodystrophy, is a major tether localized in ER-LD junctions tightly controlling LD assembly (Szymanski et al., 2007; Salo et al., 2016; Gao et al., 2019). Since we found MOSPD2 at ER-LD contacts, especially during the early stages of LD formation (Fig. 3 G), we asked whether this localization relies on Seipin. We found that in cells knocked-out or silenced for Seipin, MOSPD2 still localized to ER-LD contacts (Fig. 5, A and B), indicating that Seipin was not required for MOSPD2-mediated ER-LD contact formation.

Collectively, these data show that MOSPD2 favors the tethering of the ER with LDs.

The MSP domain of MOSPD2 is dispensable for the formation of ER-LD contacts

MOSPD2 contains an MSP domain involved in protein-protein interactions and a CRAL-TRIO domain, which is potentially a lipid transfer domain (Di Mattia et al., 2018; Chiapparino et al., 2016). We first reasoned that the MSP domain could mediate the formation of ER-LD contacts to position the CRAL-TRIO domain at the ER/LD interface. To test this hypothesis, we constructed a deletion mutant lacking the MSP domain (Fig. 6 A). This mutant was transfected in HeLa cells in which LD biogenesis was

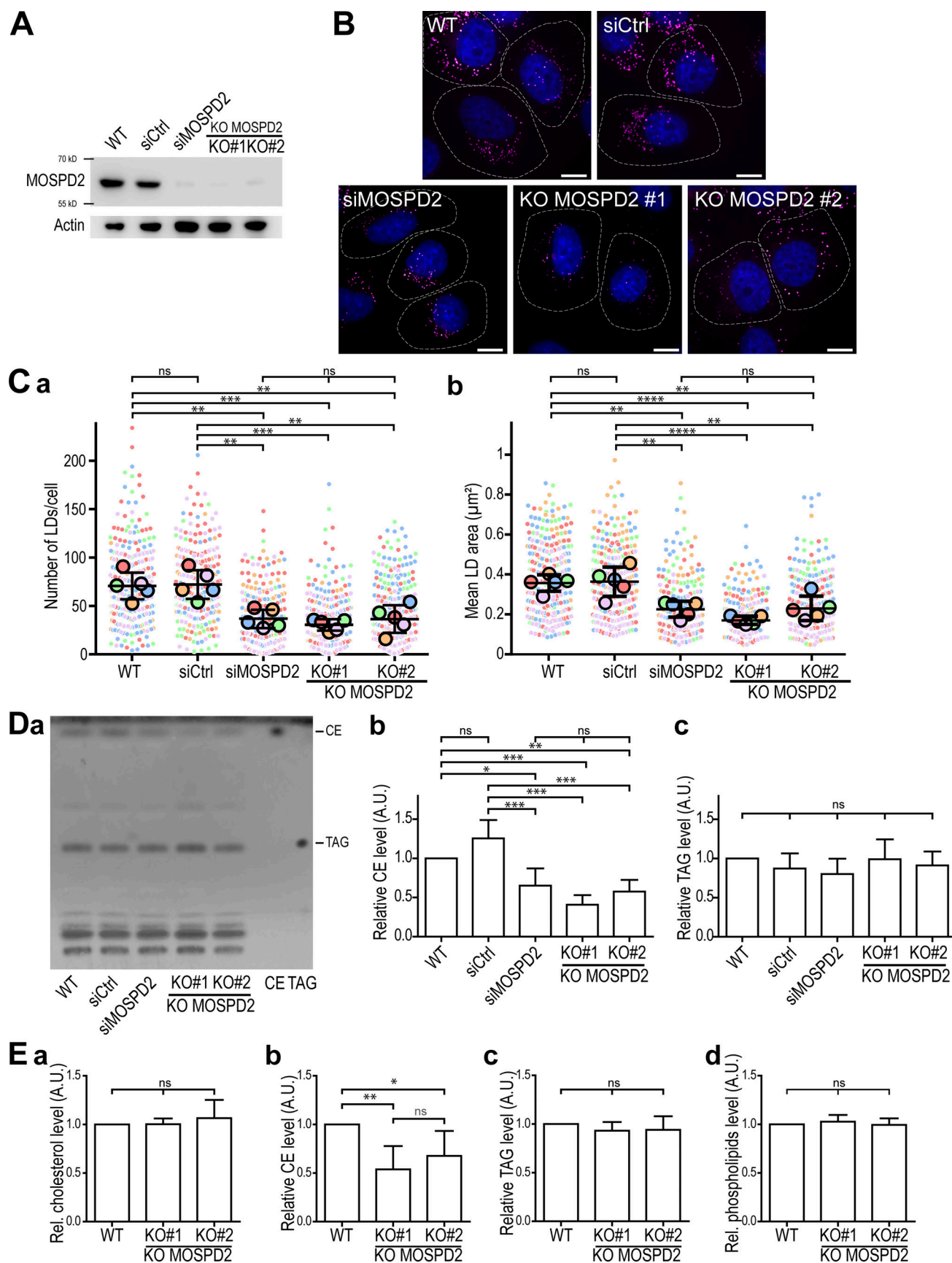


Figure 2. **MOSPD2 is involved in LD homeostasis.** (A) Western blot analysis of MOSPD2 protein level in control HeLa cells (WT), HeLa cells transfected with control siRNAs (siCtrl), siRNAs targeting MOSPD2 (siMOSPD2), and in two MOSPD2-deficient HeLa cell clones (KO#1 and KO#2) established by CRISPR/Cas9

gene editing. **(B)** Representative confocal images of parental HeLa cells (WT), of HeLa cells transfected with control siRNAs (siCtrl), and with siRNAs targeting MOSPD2 (siMOSPD2), and of MOSPD2-deficient HeLa cell clones (KO#1 and KO#2) labeled with BODIPY 493/503 (LDs, magenta) and Hoechst 33258 (nuclei, blue). Scale bars: 10 μ m. Images were acquired on a spinning-disk confocal microscope (Nikon CSU-X1, 100 $\times$ NA 1.4). The contour of each cell is delimited by a white dotted line. **(C)** Number (a) and area (b) of LDs in cells shown in B. Data are displayed as Superplots (Lord et al., 2020) showing the mean number and area of LDs per cell (small dots) or per independent experiment (large dots). Independent experiments ($n = 5$) are color-coded. Means and error bars (SD) are shown as black bars. Data were collected from 398 (WT), 323 (siCtrl), 280 (siMOSPD2), 333 (KO#1), and 413 (KO#2) cells. One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (ns, not significant; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; $n = 5$ independent experiments). **(D)** a: TLC analysis of lipids extracted from cells shown in A. Neutral lipids were separated with hexane/diethylether/AcOH (80:20:2 vol/vol) and revealed with primuline. CE and TAG were used as standards. b and c: Relative levels of CE (b) and TAG (c) detected by TLC. Means and error bars (SD) are shown. One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; $n = 4$ independent experiments). **(E)** Enzymatic quantification of cholesterol (a), cholesterol ester (b), triacylglycerol, (c) and phospholipid (d) in control HeLa cells (WT) and MOSPD2-deficient HeLa cell clones (KO#1 and KO#2). Means and error bars (SD) are shown. One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; $n = 6$ independent experiments). A.U., arbitrary unit. Source data are available for this figure: SourceData F2.

induced by OA, and we analyzed its ability to form ring- and comma-shaped structures around LDs, i.e., to form ER-LD contacts. Unexpectedly, we observed that the MOSPD2 Δ MSP mutant localized in ring- and comma-shaped structure around LDs like the WT protein; in fact, we noted that the recruitment around LDs was even more frequent than that of the WT protein (97 vs. 77%, Fig. 6, B and C). Likewise, the mutation of two key residues in the MSP domain (R404D/L406D referred to here as RD/LD mutant), precluding the recognition of FFAT motifs (Di Mattia et al., 2018), resulted in a massive recruitment of MOSPD2 at the periphery of LDs in most cells, both in the presence (Fig. 6, A–C) and in the absence of OA (Fig. 5 C). Consistent with this observation, CLEM experiments performed with cells expressing GFP-MOSPD2 RD/LD mutant (Fig. 5 D) showed that the protein accumulated in ER strands in tight contact with LDs.

To further ascertain that the MSP domain of MOSPD2 is dispensable for the formation of ER-LD contacts, cells expressing GFP-tagged MOSPD2 MSP deletion mutant (GFP-MOSPD2 Δ MSP) and the RD/LD mutant (GFP-MOSPD2 RD/LD) were processed for TEM (Fig. 6 D). In cells expressing MOSPD2 mutants lacking the MSP domain (GFP-MOSPD2 Δ MSP) or having a defective MSP domain (GFP-MOSPD2 RD/LD), the ER remained extensively attached to LDs (Fig. 6 D).

Thus, the MSP domain is not involved in the formation of ER-LD contacts, and may even limit the recruitment of MOSPD2 at ER-LD contacts.

The CRAL-TRIO and TM domains of MOSPD2 mediate the formation of ER-LD contacts

Since the MSP domain of MOSPD2 is not necessary for the formation of ER-LD contacts, we alternatively examined the contribution of the TM and CRAL-TRIO domains by testing deletion mutants (GFP-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO and GFP-MOSPD2 Δ TM; Fig. 6 A). In contrast to WT MOSPD2 that accumulated in ring- and comma-shaped structures, MOSPD2 devoid of the CRAL-TRIO domain had a reticular-only localization, thus showing that the CRAL-TRIO domain is necessary for the recruitment of MOSPD2 to LDs (Fig. 6, B and C).

Cells expressing the GFP-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO deletion mutant were further analyzed by TEM. Compared with cells expressing WT MOSPD2 in which extended and frequent ER-LD contacts were observed, cells expressing this mutant only harbored focal ER-LD contacts (Fig. 6 D). Jointly, these results point

to a crucial role of the CRAL-TRIO domain for the ability of MOSPD2 to create ER-LD contacts.

In addition, we observed that the MOSPD2 mutant devoid of TM remained cytosolic and did not accumulate on the LD surface (Fig. 6, B and C). To better understand this, the TM domain of MOSPD2 was substituted with the TM of the ER-anchored phosphatase SAC1 that comprises two transmembrane helices (named TM(SAC1); Fig. 6 E). While the fusion protein GFP-TM(SAC1) was evenly localized in the ER, the chimeric protein composed of the MOSPD2 CRAL-TRIO and MSP domains fused with the TM(SAC1) domain was present in the ER and accumulated around LDs. Similarly, the fusion protein comprising only the CRAL-TRIO domain of MOSPD2 and the TM(SAC1) domain was also present in the ER and enriched around LDs (Fig. 6 E). Thus, MOSPD2 needs an ER-anchor to be localized in contact with LDs.

Together, these data show that the TM and CRAL-TRIO domains are necessary for MOSPD2 binding to LDs.

An amphipathic helix in the CRAL-TRIO domain of MOSPD2 is required for binding to LDs

Proteins that associate with LDs do so via at least two known modalities: Class I proteins are embedded in the ER bilayer and can diffuse laterally to the LD monolayer, while Class II proteins translocate from the cytosol to the surface of LDs (Olzmann and Carvalho, 2019; Kory et al., 2016). Most Class II proteins associate with LDs through an amphipathic α -helix (AH), in which hydrophobic and polar residues are segregated to form two distinct faces along the helix axis. This topology allows AH to efficiently bind membranes because hydrophobic residues can insert between lipid acyl chains whereas polar residues can make polar contacts with lipid headgroups. The LD surface has more packing defects than a bilayer, i.e., gaps in the phospholipid layer, which are favorable for the insertion of hydrophobic residues and thus the association of Class II proteins (Giménez-Andrés et al., 2018; Chorlay and Thiam, 2020; Chorlay et al., 2021). Because MOSPD2 is anchored to the ER and does not diffuse to the LD monolayer, we hypothesized that the CRAL-TRIO domain might behave like a Class II protein and thus possess an AH. As no experimental structure of the CRAL-TRIO domain of MOSPD2 was available, we built structural models of the protein using SWISS-MODEL and AlphaFold (Waterhouse et al., 2018; Jumper et al., 2021), and identified AHs in the models. We determined their hydrophobicity and hydrophobic

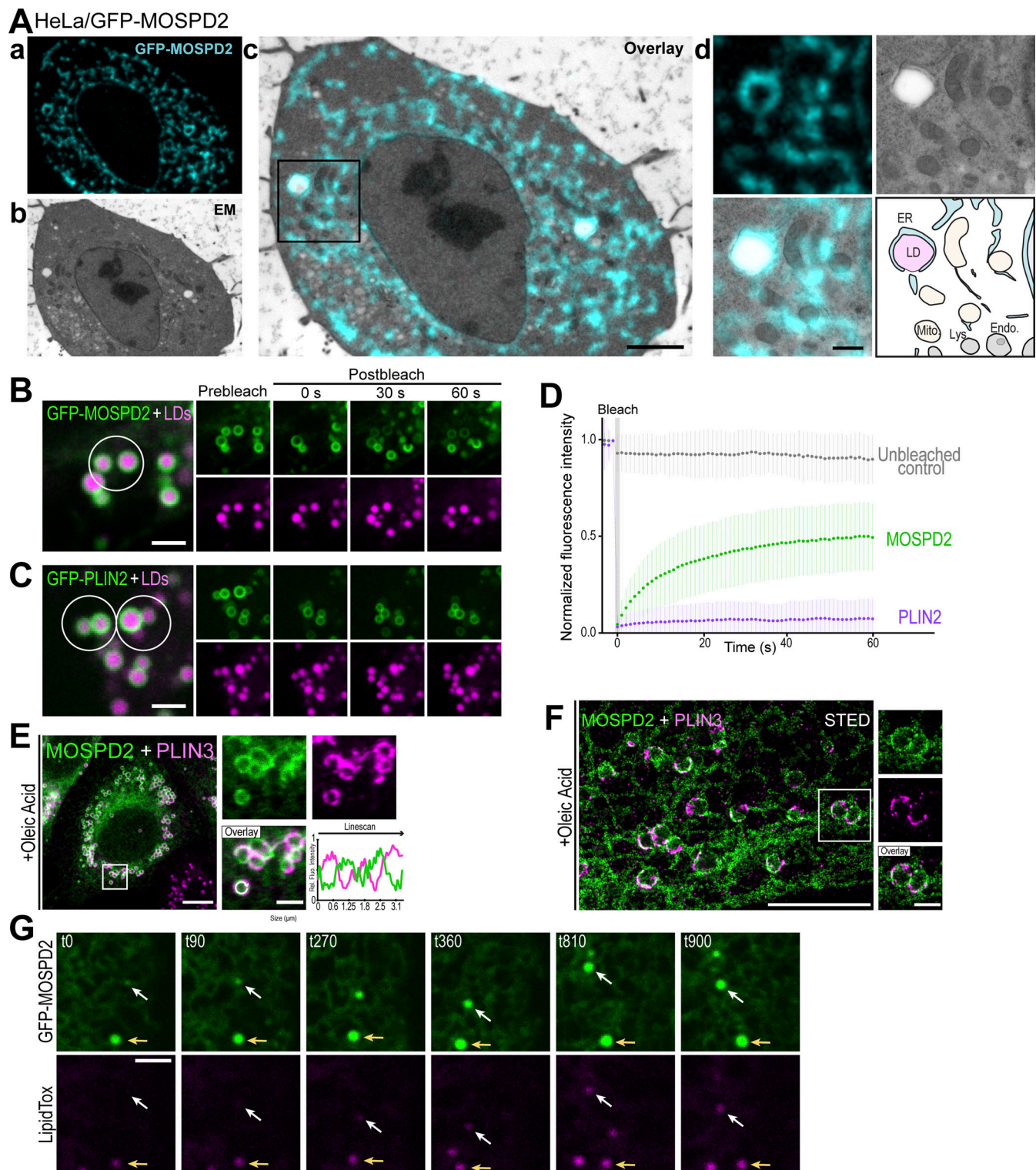


Figure 3. MOSPD2 is dynamically recruited to ER-LD contact sites. (A) CLEM of HeLa/GFP-MOSPD2 cells. **a**: fluorescence microscopy image; **b**: EM image; **c**: correlation of GFP-MOSPD2 and EM images (scale bar: 2 μm); **d**: composite showing higher magnification images of the area outlined in black in **c** (scale bar: 500 nm); bottom right: interpretation scheme showing contacts between organelles; ER and lipid droplets are in cyan and pink, respectively. Mitochondria and endosomes/lysosomes are in light yellow and gray, respectively. **(B–D)** FRAP analysis of MOSPD2 and PLIN2 mobility. GFP-MOSPD2 (**B**) and GFP-PLIN2 (**C**) expressing cells were treated with OA and labeled with LipidTOX. GFP fluorescence was photobleached in the area outlined in white, and images acquired every second over a 1-min period. Scale bars: 2 μm. **(D)** Lineplot showing the relative fluorescence intensity in the photobleached region of GFP-MOSPD2 (green) and GFP-PLIN2 (purple) expressing cells. The grey curve shows the relative fluorescence intensity of GFP-positive LDs that were not bleached. Means and error bars (SD) of relative fluorescence intensities of 56 (GFP-MOSPD2), 57 (GFP-PLIN2), and 72 (unbleached control) regions of interest from 20, 13, and 26 cells, respectively. Data from three independent experiments. **(E and F)** HeLa cells expressing GFP-MOSPD2 (green) were treated with OA and labeled with

anti-PLIN3 antibodies (magenta). Images were acquired by confocal microscopy (Leica SP8, 63× NA 1.4; E), or by STED super-resolution microscopy (F). MOSPD2 and PLIN3 were heterogeneously distributed around LDs. Scale bar: 10 μm (insets, 2 μm) in E and 5 μm (insets, 1 μm) in F. Subpanels on the right are higher magnification images of the area outlined. The overlay panel shows merged channels. In E, linescan shows fluorescence intensities of the green and magenta channels along the white circular arrow of the overlay subpanel (i.e., at the surface of LDs). (G) HeLa cells expressing GFP-MOSPD2 were imaged live during LDs induction (stained with LipidTOX) by OA addition. The white arrow shows an enrichment of MOSPD2 signal before the appearance of LipidTOX staining. The yellow arrow shows the growth of a LD positive for MOSPD2 before the start of the induction. Images were acquired every 90 s (t0-900) on a spinning-disk confocal microscope (Nikon CSU-X1, 100× NA 1.4). Scale bar: 2 μm .

moment using HeliQuest (Gautier et al., 2008) and identified an AH at the end of the CRAL-TRIO domain (Fig. 7, A–D), that is exposed at the surface of the protein and thus potentially able to insert into a membrane. Sequence analyses showed that the helix is highly conserved from Cnidaria to Human (Fig. 7 C). To determine whether this AH is responsible for MOSPD2 binding to LDs, we replaced the bulky hydrophobic residue tryptophan 201 in the middle of the nonpolar face by the negatively charged residue glutamate (mutant W201E) which would perturb the membrane partitioning of this helix. Compared with WT MOSPD2, which is found both in the ER and in ER-LD contacts when expressed in cells, the MOSPD2 W201E mutant was evenly distributed in the ER (Fig. 7, F and G). Moreover, replacing the CRAL-TRIO domain by the AH only (GFP-AH-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO fusion protein) was sufficient to recruit MOSPD2 on LDs (Fig. 7, F and G).

As mentioned before, VAP-A is not recruited in ER-LD contacts (Figs. 1 B and 4 E). To know whether the AH of MOSPD2 could allow the recruitment of VAP-A on LDs, we created a chimeric protein composed of the AH of MOSPD2 fused to VAP-A. Unlike VAP-A, which is distributed evenly in the ER, the fusion protein AH-VAP-A accumulated in ER subdomains around LDs (Fig. 7, H and I).

Combined together, these data show that the AH of MOSPD2 is necessary and sufficient for this ER-bound protein to mediate the formation of ER-LD contacts.

The amphipathic helix of MOSPD2 directly interacts with the surface of LDs

To directly test whether the AH of MOSPD2 could bind LDs, we carried out flotation assays using artificial LDs (aLDs) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled synthetic peptides encompassing the AH of MOSPD2, either wild type or with the W201E mutation (Fig. 8 A). A peptide with a random sequence was used as negative control (Fig. 8 A). aLDs composed of a mix of triolein and surrounded by a monolayer of phosphatidylcholine with di-oleyl (DOPC) and phosphatidylethanolamine with di-oleyl (DOPE) labeled with a fluorescent lipid (Rhodamine-PE) were prepared. The peptides were incubated with these aLDs, mixed with sucrose, and allowed to float over this sucrose cushion (Fig. 8 B). Three fractions corresponding to the top, middle, and bottom position of the cushion were collected, and the fluorescence signal of aLDs and of the peptides were measured. After ultracentrifugation, Rhodamine-labeled aLDs were in the top fraction (Fig. 8 C). The control peptide remained in the bottom fraction, while the peptide corresponding to the AH of MOSPD2 was in the top fraction with aLDs. Unlike the WT AH of MOSPD2, the W201E mutant behaved like the negative control peptide and remained in the bottom fraction. To further

characterize the association of the AH of MOSPD2 to aLDs, we performed aLD-peptide interaction assays (Fig. 8 D). aLDs composed of triolein were mixed with the fluorescent peptides. aLDs were imaged and fluorescence on the surface of aLDs were quantified. In agreement with the flotation assays, the control peptide did not bind to the aLDs, while the peptide corresponding to the AH of MOSPD2 was found attached to the aLDs. The W201E mutant was only minimally retained by the aLDs. Together, these experiments show that the AH of MOSPD2 directly binds to LDs.

We then tested whether the CRAL-TRIO domain binds to LDs via its AH. We produced in *Escherichia coli* and purified the WT and W201E mutant CRAL-TRIO domains of MOSPD2 fused with a His6 tag (Fig. 8 E). We also purified the MSP domain of MOSPD2 fused with a His6 tag as a control (Fig. 8 E). By circular dichroism spectroscopy, we established that secondary structure content of the W201E mutant was identical to that of the WT CRAL-TRIO domain, indicating that the mutation did not impair the folding of the domain (Fig. 7 E). To assess the ability of these three recombinant proteins to bind aLDs, we performed aLD pull-down assays. Each protein was immobilized on magnetic NTA-Ni²⁺ beads, owing to its His6 tag, and incubated with fluorescent aLDs (Fig. 8 F). After several washes to remove unbound aLDs, the beads were imaged (Fig. 8 G) and fluorescence-quantified using a fluorimeter (Fig. 8 H). In the absence of protein or in the presence of the MSP_{His6}, no fluorescence was measured, meaning that aLDs were not retained on the beads (Fig. 8 G, a and b; and 8 H). In contrast, when the wild type CRAL-TRIO_{His6} was attached to the beads, a high fluorescence was detected showing that aLDs were retained by the protein (Fig. 8 G, c and 8 H). In comparison, a much lower aLD retention was observed with the W201E mutant (Fig. 8 G, d and 8 H). These data indicate that the AH of the CRAL-TRIO domain is instrumental for the protein to bind LDs.

To better define which membrane determinants facilitate MOSPD2 binding to LDs, we performed flotation assays with membranes that differ in terms of lipid packing defect and electrostatics (Fig. 8 I). The recombinant CRAL-TRIO domain of the protein was tested with different types of liposomes made of phospholipids and with or without negative charges and/or packing defects. Control liposomes with few packing defects and no charge were composed of DOPC. Negative charges were provided by replacing 30% of phosphatidylcholine by the anionic lipid phosphatidylserine (PS). Finally, packing defects were generated by using phospholipids containing diphytanoyl (diphyt-PC) acyl chains; diphytanoyl is a 16:0 acyl-chain with branched methyl groups that forms large packing defects. The CRAL-TRIO_{His6} protein was poorly bound by control liposomes (no charges, no packing defects). It did not associate either with

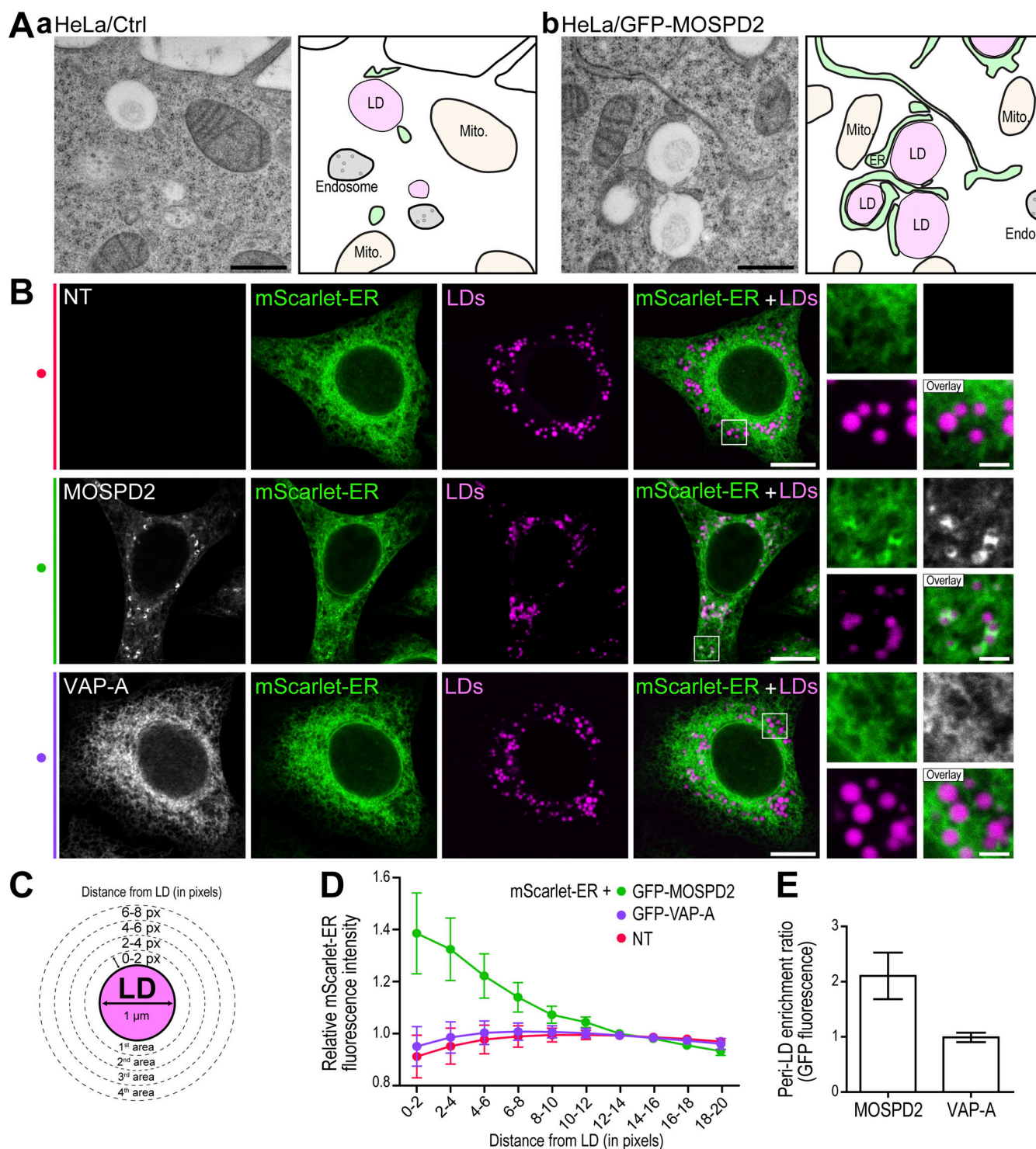


Figure 4. MOSPD2 regulates ER-LD contact sites. (A) TEM images of control HeLa (a) and HeLa/GFP-MOSPD2 cells (b) with their interpretation scheme; the ER and LDs are in green and magenta, respectively. Mitochondria and endosomes are in light yellow and gray, respectively. Scale bars: 500 nm. (B) HeLa cells stably expressing the mScarlet-ER marker (green) were either not transfected (NT, top), transfected with GFP-MOSPD2 (gray, middle), or with GFP-VAP-A (gray, bottom). Cells were treated with OA (50 μ M for 6 h) and LDs stained with LipidTOX (magenta). Images were acquired on a confocal microscope (Leica SP5; 63 $\times$ NA 1.4). Scale bars: 10 μ m (insets, 2 μ m). (C) Schematic representation of the method used for fluorescence quantification around LDs: two pixels-wide areas were segmented around LDs (here represented for a 1- μ m-wide LD), and the mean mScarlet fluorescence intensity was measured in each area. (D) Fluorescence intensity of the ER marker mScarlet-ER around LDs in untransfected (NT, red), GFP-MOSPD2 (green), and GFP-VAP-A (purple) transfected cells. Means $\pm$ SD (NT: 39 cells; GFP-MOSPD2: 42 cells; GFP-VAP-A: 46 cells; from four independent experiments). The relative mScarlet fluorescence intensity corresponds to the mean fluorescence intensity of mScarlet in each area, divided by the mean fluorescence intensity in the cytoplasm away from LDs (10–20 pixels distance from LDs). (E) Relative enrichment of GFP-MOSPD2 and GFP-VAP-A around LDs. The Peri-LD enrichment ratio is the ratio of the mean GFP fluorescence intensity (GFP-MOSPD2 or GFP-VAP-A) in the vicinity of LDs (0–4 pixels distance from LDs; see C), to the mean fluorescence intensity of GFP at a

distance from LDs (10–20 pixels distance from LDs). MOSPD2 fluorescence is twice as high around LDs as in the remainder of the cytoplasm, whereas VAP-A fluorescence is at the same level next to LDs and in the rest of the cytoplasm. Means $\pm$ SD (GFP-MOSPD2: 42 cells; GFP-VAP-A: 46 cells; data from four independent experiments).

liposomes having negative charges only (DOPC/DOPS 70/30), or having packing defects only (diphyt-PC; <6% membrane-bound protein; Fig. 8 I, a). In contrast, more than 60% of the protein was associated with liposomes containing both negative charges and packing defects (diphyt-PC/diphyt-PS 70/30; Fig. 8 I, a).

Flotation assays performed with liposomes bearing packing defects and increasing concentration of negatively charged phospholipids showed that the binding of the CRAL-TRIO_{His6} protein was proportional to the amount of charges (Fig. 8 I, b). Thus, the binding of the CRAL-TRIO domain to packing defects bearing

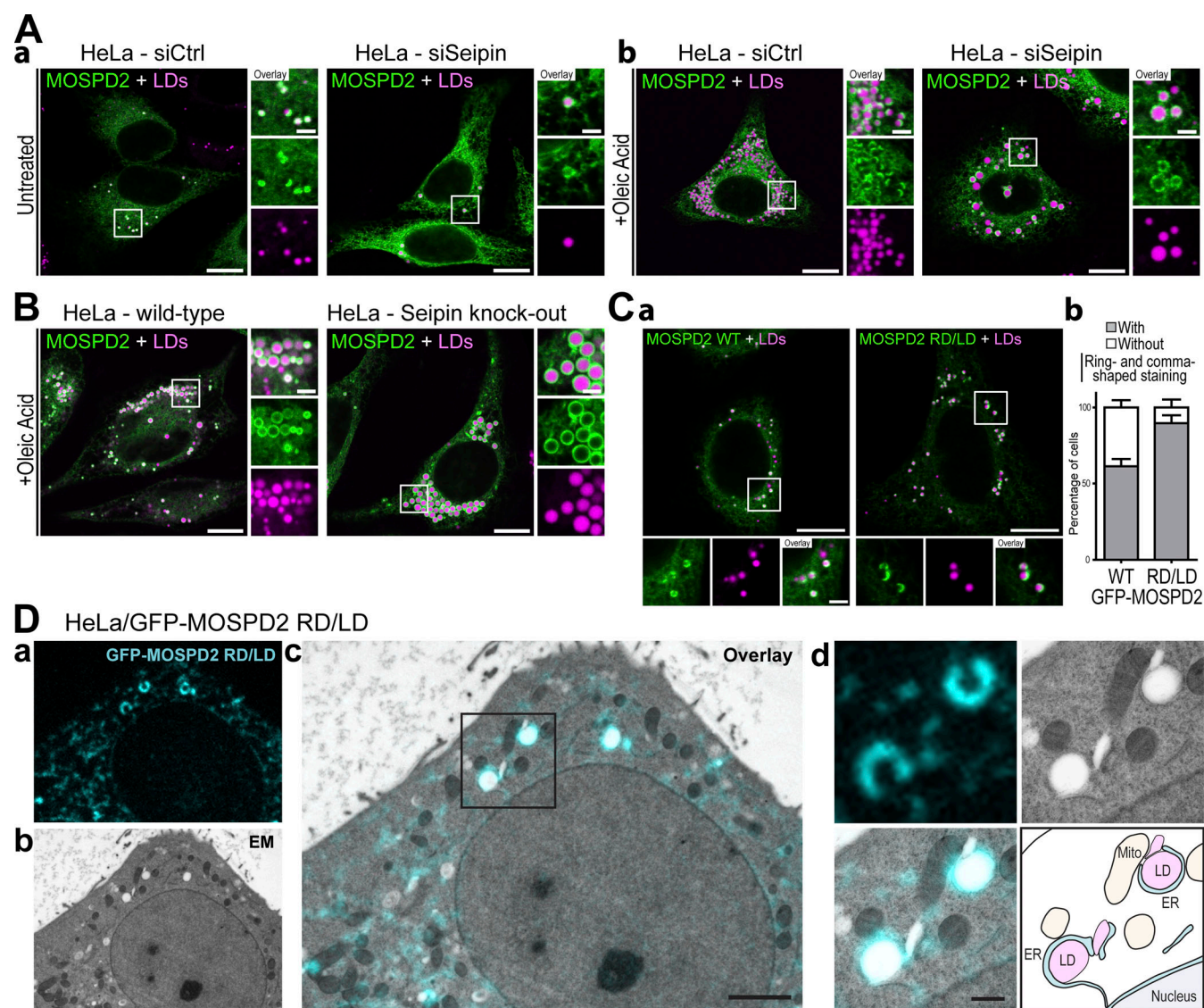


Figure 5. Seipin is dispensable for MOSPD2-mediated ER-LD contact formation and the GFP-MOSPD2 RD/LD mutant is localized in ER-LD contacts. (A) Representative confocal images of the GFP-MOSPD2 WT (green) localization in cells transfected with control siRNAs (left) and siRNAs targeting Seipin (right) and left untreated (a) or treated with OA (b). LDs were stained with Nile Red (magenta). (B) Representative confocal images of the GFP-MOSPD2 WT (green) localization in WT (left) and Seipin knock-out (right) cells treated with OA. LDs were stained with LipidTox (magenta). Note that Seipin silencing or knock-out results in heterogeneous lipid droplet size. In absence of Seipin, MOSPD2 still mediates ER-LD contact formation. (C) a: Representative confocal images of GFP-MOSPD2 WT and RD/LD mutant expressing cells. Cells were not treated with OA. LDs were stained with Nile Red (magenta). b: percentage of cells with GFP-positive ring- or comma-shaped structures. Mean $\pm$ SD; $n = 4$ independent experiments (WT: 156 cells; RD/LD: 162 cells). (D) CLEM of a GFP-MOSPD2 RD/LD expressing cell. a: GFP-MOSPD2 RD/LD fluorescence microscopy image; b: EM image; c: correlation of GFP-MOSPD2 RD/LD fluorescence and EM images (scale bar: 2 μ m); d: higher magnification images of the area outlined in black (scale bar: 500 nm); bottom right: interpretation scheme showing contacts between organelles; ER and lipid droplets are in cyan and pink, respectively. Mitochondria, endosomes/lysosomes and nucleus are in light yellow, gray and light blue, respectively. (A and C) Confocal microscope (Leica SP8, 63 $\times$ NA 1.4) images. (B) Zeiss LSM800 Airyscan images. Scale bars: 10 μ m (insets, 2 μ m).

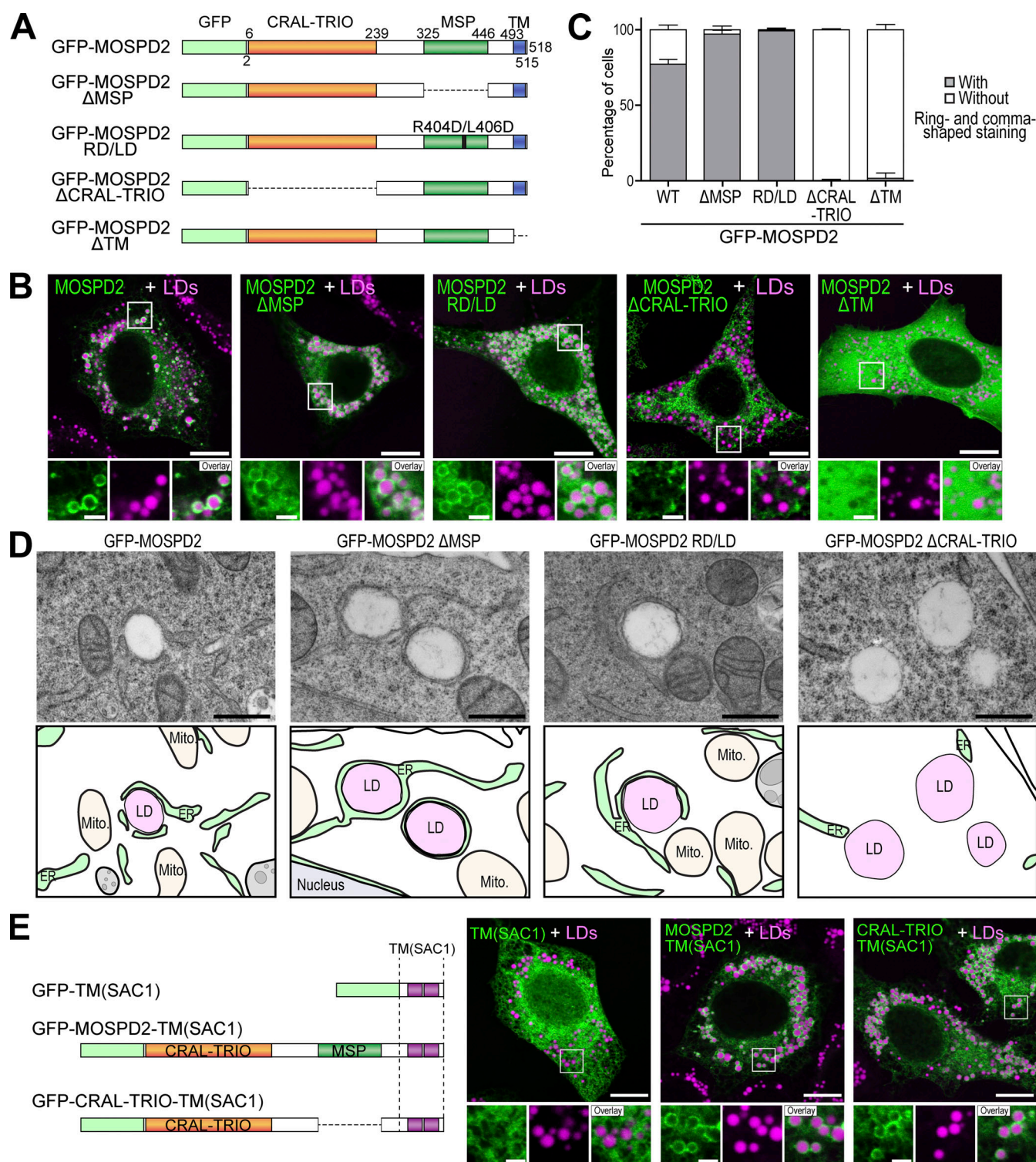


Figure 6. ER-LD contact sites mediated by MOSPD2 depends on its CRAL-TRIO and TM domains. (A) Schematic representation of the different WT and mutant proteins used in the study. Two kinds of mutants were utilized: deletions of specific domains (Δ CRAL-TRIO, Δ MSP, Δ TM) and point mutation (RD/LD) impairing the MSP domain function. (B) Representative confocal images of the GFP-MOSPD2 WT and mutants (green) localization. Cells were treated with OA and LDs stained with Nile Red (magenta). (C) Quantification of cells presenting ring- and comma-shaped staining. Mean $\pm$ SD; $n = 3$ independent experiments (WT: 67 cells; Δ MSP: 138 cells; RD/LD: 152 cells; Δ CRAL-TRIO: 140 cells; Δ TM: 64 cells). (D) EM images of HeLa/GFP-MOSPD2, HeLa/GFP-MOSPD2 Δ MSP, HeLa/GFP-MOSPD2 RD/LD, and HeLa/GFP-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO cells (top) and their interpretation scheme (bottom); the ER and LDs are in green and magenta, respectively. Mitochondria and endosomes are in light yellow and gray, respectively. Scale bars: 500 nm. (E) Left: schematic representation of the different chimeric constructs in which the MOSPD2 TM domain is replaced by the TM of SAC1 (purple). Right: localization of these chimeric proteins (green) and LDs stained with Nile Red (magenta) in HeLa cells treated with OA. In B and E, subpanels on the bottom are higher magnification images of the area outlined. The overlay panel shows merged channels. (B and E) Images were acquired on a confocal microscope (Leica SP8, 63 $\times$ NA 1.4). Scale bars: 10 μ m (insets, 2 μ m).

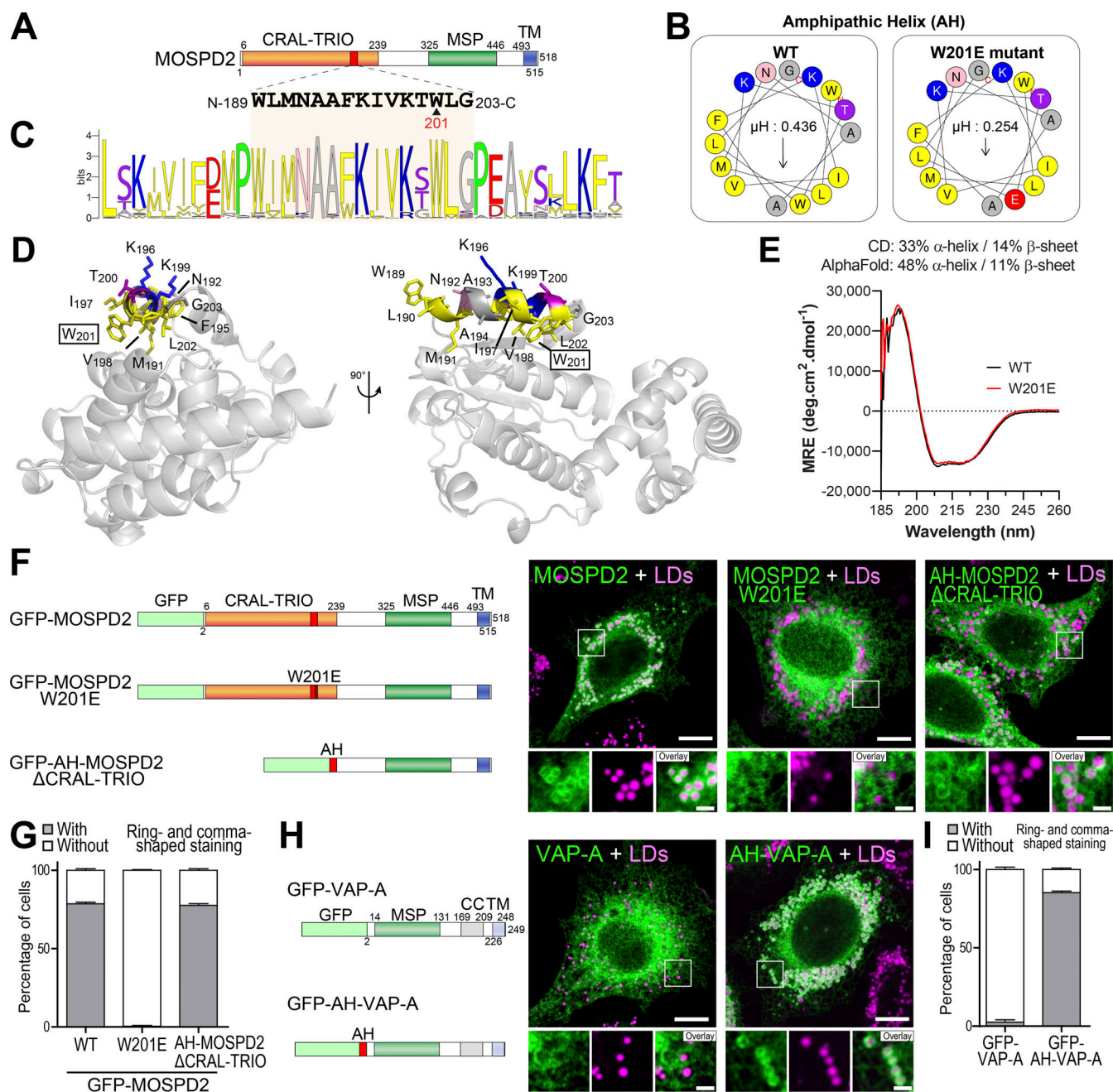


Figure 7. An amphipathic helix in the CRAL-TRIO domain of MOSPD2 mediates its localization at ER-LD contacts. (A) Schematic representation of MOSPD2 showing the position of the amphipathic helix (red) and its sequence. The arrowhead shows the position of residue W201. (B) Helical wheel representation of the WT (left) and W201E mutant (right) AH (aa 189-203) generated with HeliQuest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>; left). The W201E mutation alters the amphipathic character of the helix by reducing its hydrophobic moment (μ_H) from 0.436 to 0.254. (C) WebLogo generated from an alignment of MOSPD2 AH sequence from 44 species. The AH is highlighted in light orange and 10 flanking residues from either side are shown. (D) Ribbon diagram of the structure model of the CRAL-TRIO domain of human MOSPD2 (Uniprot Q8NHP6; residues 1-241) obtained with AlphaFold (Jumper et al., 2021). The domain is in light grey except for the amphipathic helix depicted in stick model with residues colored as in B. (E) Far-UV circular dichroism spectrum of the MOSPD2 CRAL-TRIO domain and its W201E variant (6.7 μM) in 20 mM Tris, pH 7.4, 120 mM NaF buffer. MRE, mean residue ellipticity. The percentage of α -helix, β -sheet and turn, deriving from the analysis of the spectrum (WT) are given as well as the values deriving from the structure model (AlphaFold) using the Define Secondary Structure of Protein algorithm. (F) Left: Schematic representation of GFP-MOSPD2 constructs either WT (GFP-MOSPD2), bearing a mutation in the AH (GFP-MOSPD2 W201E), or containing a deletion of the CRAL-TRIO domain together with an insertion of the AH (AH-MOSPD2- Δ CRAL-TRIO). Right: Localization of these constructs in HeLa cells treated with OA; LDs were stained with Nile Red (magenta). Images were acquired on a confocal microscope (Leica SP5, 63 $\times$ NA 1.4). Scale bars: 10 μm (insets, 2 μm). (G) Quantification of cells showing ring- or comma-shaped staining for these constructs. Mean $\pm$ SD; $n = 3$ independent experiments (MOSPD2 WT: 117 cells; MOSPD2 W201E: 156 cells; AH-MOSPD2- Δ CRAL-TRIO: 113 cells). (H) Left: Schematic representation of WT GFP-VAP-A and GFP-AH-VAP-A chimera in which the AH of MOSPD2 was fused at the N-terminus of VAP-A. Right: localization of the different constructs. LDs were stained with Nile Red in HeLa cells treated with OA. Confocal microscope (Leica SP5, 63 $\times$ NA 1.4) images. Scale bars: 10 μm (insets, 2 μm). (I) Quantification of cells showing ring- or comma-shaped staining for GFP-VAP-A and GFP-AH-VAP-A chimera. Mean $\pm$ SD; $n = 3$ independent experiments (VAP-A WT: 109 cells; AH-VAP-A: 102 cells). In F and H, composite subpanels on the bottom are higher magnification images of the area outlined. The overlay panel shows merged channels.

Zouiouich et al.

MOSPD2 a two-armed tether

Journal of Cell Biology

12 of 25

<https://doi.org/10.1083/jcb.202110044>

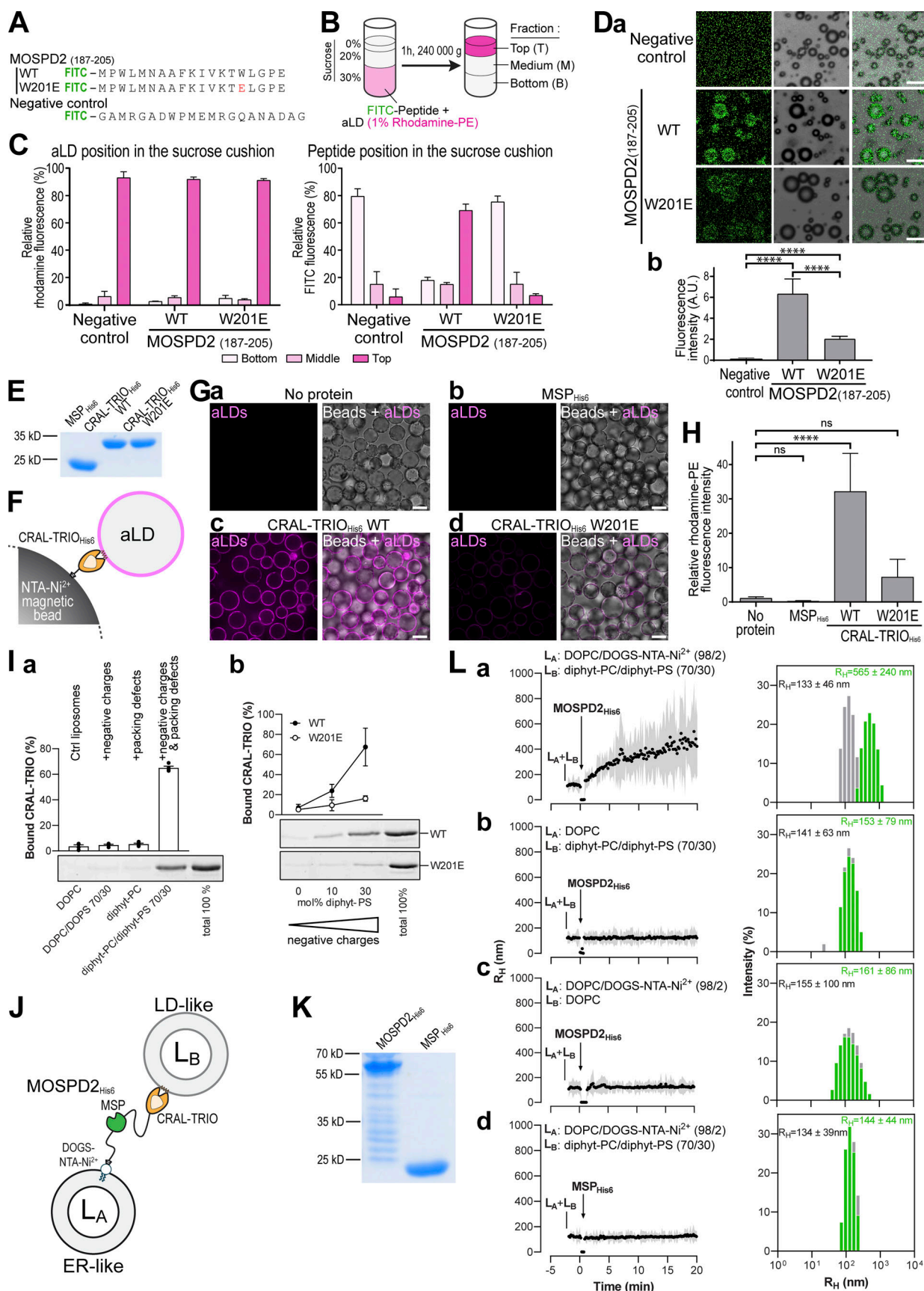


Figure 8. **The CRAL-TRIO domain of MOSPD2 directly interacts with aLDs.** (A) Peptides used for aLDs flotation assays. Peptides corresponding to the WT or W201E mutant AH of MOSPD2 (residues 187-205), and negative control composed of a random sequence, were coupled with FITC at their amino-terminal

end. **(B)** Principle of aLDs flotation assays. Fluorescent peptides were incubated with aLDs containing 1 mol% Rhodamine-PE, then ultracentrifuged to allow aLDs to float on the sucrose cushion. Top, middle and bottom fractions were collected and FITC and rhodamine fluorescence quantified. **(C)** aLDs flotation assays. Left: Relative rhodamine fluorescence (i.e., aLDs); right: Relative FITC fluorescence (i.e., peptides), in the bottom (light pink), middle (pink) and top (dark pink) fractions. Means ($\pm$ SD) from $n = 5$ independent experiments. **(D)** aLDs peptide interaction assay. a: Representative images of aLDs incubated with peptides shown in A. Scale bars: 10 μ m. b: quantification of peptide fluorescence on aLDs. Means ($\pm$ SD); $n = 2$ independent experiments (negative control: 1,397; WT AH: 231; W201E AH: 198 aLDs). Student's t test (****, $P < 0.0001$). **(E)** Coomassie blue staining of the recombinant MSP_{His6}, WT CRAL-TRIO_{His6}, and mutant CRAL-TRIO_{His6} W201E proteins after SDS-PAGE. **(F)** Principle of aLDs pull-down assay. Proteins were immobilized on magnetic NTA-Ni²⁺ beads, owing to their His6 tag, and incubated with fluorescent aLDs. **(G)** Representative confocal images of NTA-Ni²⁺ beads either not coated with recombinant proteins (a, no protein) or coated with recombinant domains of MOSPD2 (b, MSP_{His6}; c, WT CRAL-TRIO_{His6}; and d, mutant CRAL-TRIO_{His6} W201E) and incubated with fluorescent aLDs (magenta). Left: Confocal section of aLD fluorescence; right: Superposition with brightfield images showing the beads. Spinning-disk confocal microscope (Nikon CSU-X1, 100 $\times$ NA 1.4) images. Scale bars: 10 μ m. **(H)** Quantification of aLDs recruitment on NTA-Ni²⁺ beads. Rhodamine fluorescence was measured using a fluorimeter. Means $\pm$ SD. Kruskal-Wallis with Tukey's multiple comparisons test (ns, not significant; ****, $P < 0.0001$; $n = 6$ independent experiments). **(I)** a: Flotation assays. CRAL-TRIO_{His6} (0.75 μ M) was mixed with liposomes (0.75 mM lipids) only made of DOPC or diphyt-PC or composed of DOPC/DOPS (7/3 mol/mol) or diphyt-PC/diphyt-PS (7/3 mol/mol) in HK buffer at 25°C for 10 min. After centrifugation, the liposomes were recovered at the top of a sucrose cushion and analyzed by SDS-PAGE. The amount of protein recovered in the top fraction (lane 1–4) was quantified and the fraction of liposome-bound CRAL-TRIO_{His6} was determined using the content of lane 5 (total 100%) as a reference. Data are represented as mean $\pm$ SEM (error bars; $n = 4$). b: Flotation assays. WT (closed circle) and W201E mutant (open circle) MOSPD2 CRAL-TRIO_{His6} proteins (0.75 μ M) were mixed for 10 min with liposomes (0.75 mM lipids) only made of diphyt-PC or additionally containing 10 or 30 mol% diphyt-PS. Data are represented as mean $\pm$ SEM (error bars; $n = 3$ –5). **(J)** Principle of the membrane tethering assay. **(K)** Coomassie blue staining of the recombinant MOSPD2_{His6} and MSP_{His6} proteins after SDS-PAGE. **(L)** Membrane tethering assays. L_A liposomes (50 μ M total lipids) composed of DOPC/DOGS-NTA-Ni²⁺ (98/2 mol/mol; a, b, and d) or DOPC (b) were mixed with L_B liposomes (50 μ M), composed of diphyt-PC/diphyt-PS (70/30 mol/mol) (a, b, and d) or DOPC (c) in HK buffer at 25°C. After 2 min, MOSPD2_{His6} (a–c) or MSP_{His6} (d; 0.4 μ M) was added and the size of liposomes was measured for 23 min. Left: Mean radius (dots) and polydispersity (shaded area) over time. Right: Hydrodynamic radius (R_H) distribution before (gray bars) and after the reaction (green bars). These experiments are representative of several independent experiments ($n = 3$ –5). Source data are available for this figure: SourceData F8.

liposomes is tuned by electrostatics. Noteworthy, almost no binding was seen with MOSPD2 CRAL-TRIO W201E even in the presence of more packing defects and negative charges (Fig. 8 I, b). Collectively, these data show that in vitro the association of the CRAL-TRIO domain of MOSPD2 with a membrane is facilitated by the presence of very large packing defects and negatively charged lipids, both of which are characteristics of the LD surface.

Finally, we examined in vitro whether MOSPD2 was able to directly connect the ER with LDs by performing membrane tethering assays. These were done using two populations of liposomes, L_A and L_B, mimicking the ER and LDs, respectively. The association of liposomes into large particles as a result of membrane tethering was measured by dynamic light scattering (DLS). L_A liposomes made of DOPC and doped with DOGS-NTA-Ni²⁺ were mixed with L_B liposomes composed of diphyt-PC/diphyt-PS (70/30 mol/mol; Fig. 8 J). Then, MOSPD2_{His6}, corresponding to the cytosolic part of MOSPD2 tagged with a C-terminal His6 tag (Fig. 8 K), was added so that L_A liposomes were covered by the protein and constituted ER-like liposomes. A rapid increase in the initial mean radius of liposomes was observed suggesting that MOSPD2, once attached to L_A liposomes, connected them with L_B liposomes (Fig. 8 L, a). In contrast, no aggregation occurred when L_A liposomes were devoid of attached MOSPD2_{His6} (Fig. 8 L, b), or when they were covered by the MSP domain of MOSPD2 (MSP_{His6}; Fig. 8 L, d). Moreover, no aggregation was observed when L_B liposomes were replaced with liposomes that did not mimic LDs (i.e., without packing defects and negative charges; Fig. 8 L, c).

These data showed that MOSPD2, anchored to the ER by its C-terminus, directly connects this compartment with a second one delimited by a membrane with large packing defects and anionic lipids, such as LDs, owing to its CRAL-TRIO domain.

The formation of ER-LD contacts mediated by the CRAL-TRIO domain is essential for the function of MOSPD2 in the biology of LDs, while the MSP domain is dispensable

In the absence of MOSPD2, lipid droplets are fewer (Fig. 2 C). Having identified the molecular mechanism of ER-LD contact formation mediated by MOSPD2, we asked whether its ability to form ER-LD contacts was required for its role in LD biology. To answer this question, we performed rescue experiments by restoring MOSPD2 expression in knock-out cells (KO#1) using mScarlet-tagged WT or mutant MOSPD2 (Fig. 9, A and B). LDs were then labeled and their number quantified (Fig. 9, C and D). Consistent with data from Fig. 2, B and C, MOSPD2 knock-out cells had two times fewer LDs than wild-type cells (Fig. 9 C, a and b; and 9 D). When mScarlet-MOSPD2 was re-expressed in knock-out cells, the number of LDs was similar to that of WT cells (Fig. 9 C, c and 9 D). Thus, the ectopic expression of MOSPD2 rescues the LD phenotype of MOSPD2 knock-out cells.

Next, we repeated the rescue experiment by expressing two MOSPD2 mutants unable to form ER-LD contacts, a deletion mutant devoid of the CRAL-TRIO domain (mScarlet-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO) and a point mutant with a defective AH (mScarlet-MOSPD2 W201E), in MOSPD2 knock-out cells (Fig. 9, A and B). These two mutants failed to rescue the absence of MOSPD2 (Fig. 9 C, d and e; and 9 D).

In contrast, the expression of a mutant MOSPD2 having an MSP domain unable to bind FFAT motifs (mScarlet-MOSPD2 RD/LD) restored the number of LDs to a level similar to that of WT cells (Fig. 9 C, f; and 9 D). Thus, the ability of MOSPD2 to bind FFAT motifs is dispensable for its function in LDs. These experiments show that the ability of MOSPD2 to form ER-LD contacts by its CRAL-TRIO domain contributes to LD biology.

Finally, we tested whether promoting ER-LD tethering was sufficient to recapitulate the function of MOSPD2. We expressed two constructs lacking a CRAL-TRIO domain but capable of

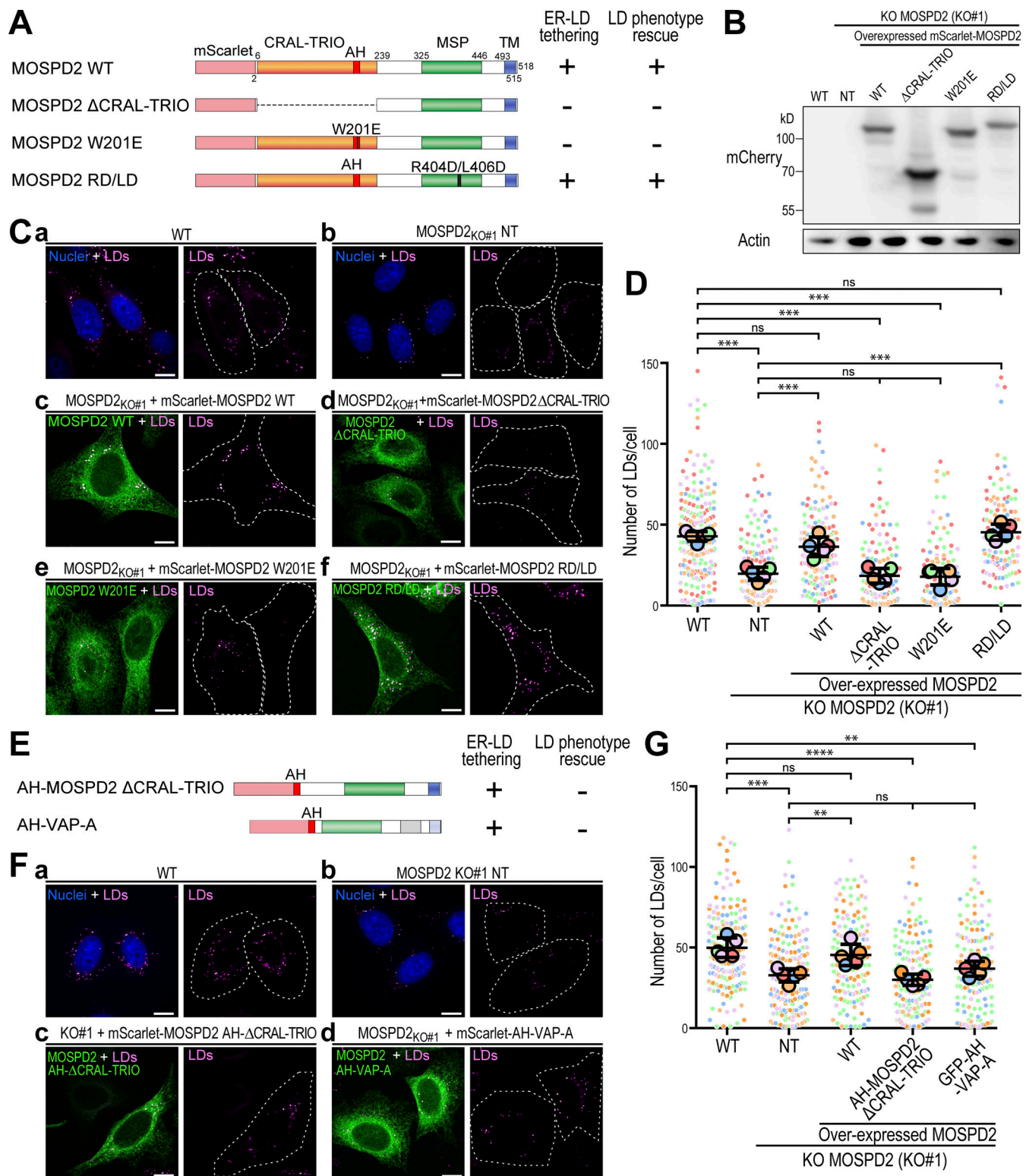


Figure 9. The capacity of MOSPD2 to form ER-LD contact sites is necessary but not sufficient to regulate LDs. (A) Schematic representation of mScarlet-MOSPD2 constructs either WT (mScarlet-MOSPD2) or containing a deletion of the MSP domain (Δ MSP) or the CRAL-TRIO domain (Δ CRAL-TRIO), a mutation in the MSP domain (RD/LD) or in the CRAL-TRIO domain (W201E). For each construct, the LD tethering activity and the rescue (see panels below) are summarized as + or -. (B) Western Blot analysis of WT and MOSPD2 knock-out (KO#1) HeLa cells. MOSPD2 expression was rescued in MOSPD2 knock-out cells using mScarlet-MOSPD2 expression constructs either WT or mutant (mScarlet-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO, W201E, and RD/LD). NT, non-transfected. (C) Representative confocal images of WT and MOSPD2 knock-out (KO#1) HeLa cells in which MOSPD2 expression was restored using mScarlet-MOSPD2 constructs (c, d, e, and f; green) depicted in panel A. As control, untransfected WT (a) and MOSPD2 knock-out (b) cells were imaged. LDs were stained with BODIPY 493/503 (magenta) and nuclei with Hoechst (blue). (D) Quantification of the number of LDs in cells shown in B. Data are displayed as Superplots

showing the mean number of LDs per cell (small dots) and the mean number of LDs per independent experiment (large dots). Independent experiments ($n = 5$) are color-coded. Means and error bars (SD) are shown as black bars. Data were collected from 213 (WT), 200 (KO#1), 150 (KO + mScarlet-MOSPD2 WT), 238 (KO + mScarlet-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO), 126 (KO + mScarlet-MOSPD2 W201E), and 118 (KO + mScarlet-MOSPD2 RD/LD) cells. One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (ns, not significant; ***, $P < 0.001$; $n = 5$ independent experiments). (E) Schematic representation of mScarlet constructs containing the deletion of the CRAL-TRIO domain together with an insertion of the AH (AH-MOSPD2- Δ CRAL-TRIO), and of the GFP-AH-VAP-A chimera in which the AH of MOSPD2 was fused at the N-terminus of VAP-A. For both constructs, the LD tethering activity and the rescue (see panels below) are summarized as + or -. (F) Representative confocal images of WT and MOSPD2 knock-out (KO#1) of HeLa cells in which constructs (green) from panel E were expressed (c and d). As control, untransfected WT (a) and MOSPD2 knock-out (b) cells were imaged. LDs were stained with BODIPY 493/503 (magenta) and nuclei with Hoechst (blue). (G) Quantification of the number of LDs in cells shown in F. Data are displayed as Superplots showing the mean number of LDs per cell (small dots) and the mean number of LDs per independent experiment (large dots). Independent experiments ($n = 5$) are color-coded. Means and error bars (SD) are shown as black bars. Data were collected from 202 (WT), 192 (KO#1), 156 (KO + mScarlet-MOSPD2 WT), 147 (KO + mScarlet-AH-MOSPD2- Δ CRAL-TRIO), and 155 (KO + mScarlet-AH-VAP-A). One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (ns, not significant; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; $n = 5$ independent experiments). (C and F) Images were acquired on a spinning-disk confocal microscope (Nikon CSU-X1, 100 $\times$ NA 1.4). Scale bars: 10 μ m. The cell contour is shown with a white dotted line. Source data are available for this figure: SourceData F9.

promoting ER-LD contact formation (Fig. 7, F-I): a MOSPD2 mutant in which the CRAL-TRIO domain was replaced by the AH only (AH-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO fusion protein), and the chimeric protein composed of the AH of MOSPD2 fused to VAP-A (Fig. 9 E). While these two proteins promoted ER-LD contact formation (Fig. 7, F-I), they did not rescue the number of LDs in MOSPD2-deficient cells (Fig. 9, F and G). These data show that MOSPD2 must connect the ER with the LDs to exert its activity, but that the membrane tethering ability by itself is not sufficient to recapitulate the activity of MOSPD2.

Together, these data show that the ability of MOSPD2 to create ER-LD contacts is crucial for the activity of the protein in the biology of LDs. Moreover, it shows that the CRAL-TRIO domain is instrumental for MOSPD2 function in LDs, while the MSP domain is dispensable.

Discussion

Organelles are no longer considered as isolated compartments but as active units able to constantly communicate and function with each other. The ER plays a key role in the interactions between organelles, as it is a meshwork of membrane tubes and sheets that extend throughout the cytosol and make extensive contacts with other organelles (Wu et al., 2018). LDs, which are involved in cellular energy storage, have a very unique relationship with the ER. They are generated from the ER and maintain regular physical contacts with it throughout their life cycle (Olzmann and Carvalho, 2019; Walther et al., 2017). LD biogenesis starts with the synthesis of neutral lipids in the ER membrane. These newly made lipids nucleate into oil lenses in the ER bilayer that ultimately bud toward the cytosol and grow further. At the beginning of their life, LDs are attached to the ER as their monolayer is continuous with the cytosolic leaflet of the ER membrane (Hugenroth and Bohnert, 2020; Salo and Ikonen, 2019). Eventually, LDs bud toward the cytosol and detach from the ER but continue to establish contacts with the ER by other mechanisms. This physical connectivity might ensure the functional interplay between the ER and LDs. In this study, we reveal that MOSPD2 contributes to this process by forming contacts between the ER and LDs, and participates in the biology of these organelles (Fig. 10).

We previously showed that MOSPD2 mediates the formation of contacts between the ER and endosomes, the Golgi, and

mitochondria (Di Mattia et al., 2018) by a mechanism relying on its MSP domain. By binding to FFAT motifs present in proteins on the surface of these organelles, the MSP domain of MOSPD2 attaches the ER to the other organelle, as do the VAP-A and VAP-B proteins (Di Mattia et al., 2018, 2020a; Murphy and Levine, 2016). Here, we identified that MOSPD2 has a second tethering activity to specifically create ER-LD contacts by a mechanism that does not rely on its MSP domain, but surprisingly on its CRAL-TRIO domain.

The association of this domain with LDs is mediated by an amphipathic helix that is conserved in other members of the CRAL-TRIO family (Bankaitis et al., 2010), and notably its archetypical member, Sec14p (Sha et al., 1998). In this protein, this helix acts as a gate regulating access to the hydrophobic cavity of the protein (Ryan et al., 2007; Bankaitis et al., 1990; Sha et al., 1998). AHs are found in a variety of proteins interacting with

Endoplasmic reticulum – Lipid droplet contact site

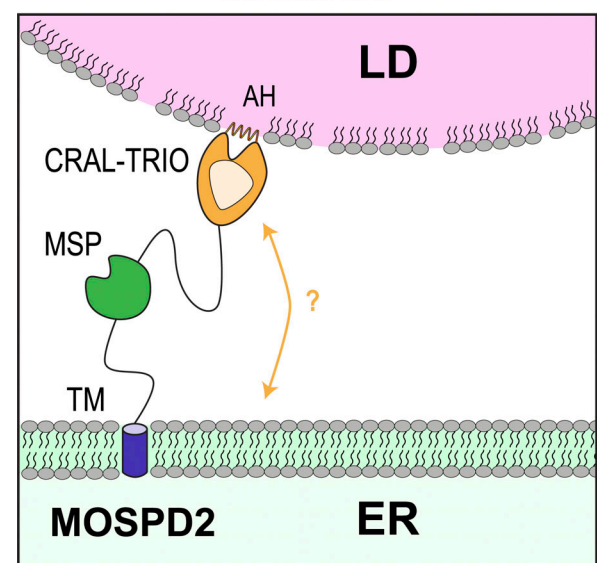


Figure 10. **Schematic representation of ER-LD contact sites mediated by MOSPD2.** MOSPD2 tethers the ER to LDs thanks to its TM and CRAL-TRIO domains. The amphipathic helix located in the CRAL-TRIO domain directly interacts with the surface of LDs. The CRAL-TRIO domain of MOSPD2 might also be involved in lipid binding and/or transport between the ER and LDs.

membranes; they do not have a consensus sequence, and they were shown to interact with diverse polar/non-polar interfaces (Giménez-Andrés et al., 2018). Depending on the type of hydrophobic residues on their apolar side, the nature and charge of residues on their polar side, and their length, they can interact with membranes having distinct properties in terms of lipid composition, charge, curvature, etc. (Giménez-Andrés et al., 2018). AHs binding to LDs have affinity for packing defects owing to the presence of large hydrophobic residues on their apolar face (Prévost et al., 2018; Chorlay and Thiam, 2020; Čopić et al., 2018). In agreement with this notion, mutation of W201 in the AH of MOSPD2 abolishes its binding to LDs. Besides, the CRAL-TRIO domain of MOSPD2 has no or little affinity for other cellular membranes, such as the ER membrane, which is expected to be more packed than the LD surface and contain no more than 15 mol% negatively charged lipids (van Meer et al., 2008; Chorlay and Thiam, 2020; Chorlay et al., 2021).

The main feature of the CRAL-TRIO domain is that it possesses a cavity to specifically host a lipophilic molecule. CRAL-TRIO domain-containing proteins belong to the large category of lipid transfer proteins (Chiapparino et al., 2016). Sec14p can exchange glycerophospholipids (PI and PC) between membranes, whereas retinaldehyde-binding protein 1 and α -tocopherol transfer protein use a CRAL/TRIO domain to convey retinaldehyde and α -tocopherol (vitamin E), respectively. Thus, an appealing hypothesis is that MOSPD2 could transport fatty acids to fuel LD enzymes that build neutral lipids or transports phospholipids to the monolayer of LDs to allow their proper growth. The reduced level of sterol esters in MOSPD2-deficient cells points to a link between MOSPD2 and the metabolism of cholesterol and its derivatives. Therefore, one possibility is that MOSPD2 could transport sterols toward LDs. Interestingly, other lipid transfer proteins are present in ER-LD contacts such as ORP5 and ORP8 (Guyard et al., 2021; Du et al., 2020), thus raising the possibility that ER-LD contacts are a major platform for the non-vesicular exchange of lipids. If MOSPD2 is a lipid transporter, we can speculate that the AH of the CRAL-TRIO domain of MOSPD2 has a dual function: interacting with the surface of LDs to mediate the formation of ER-LD contacts and being a gate to access the hydrophobic cavity of the CRAL-TRIO domain of the protein. However, a debate still exists on whether Sec14p exchanges lipids between organelles in yeast. As proposed for Sec14p, rather than transporting lipids, MOSPD2 could act by presenting its lipid substrate to an enzyme and thus increase its activity (Lete et al., 2020). Accordingly, we cannot exclude that MOSPD2 acts directly on sterol or sterol-ester metabolism. Further work will be needed to determine whether MOSPD2 mediates lipid transport at the ER/LD interface.

It is intriguing that a single protein possesses two tethering mechanisms targeting distinct organelles: on the one hand, the MSP domain which allows the formation of contacts with many organelles via protein-protein interactions and on the other hand the CRAL-TRIO domain, which contacts only one organelle, the LD, via a protein-membrane interaction. The ability of MOSPD2 to tether the ER to other organelles using two alternate molecular mechanisms is a new illustration of the plasticity of

inter-organelle contacts. Indeed, other tether proteins alternate between distinct contacts. For instance, the mitochondria-bound protein MIGA2 is present in mitochondria-ER contacts when bound to VAP proteins, thanks to its Phospho-FFAT motif, and alternatively in mitochondria-LD contacts by directly binding to the surface of LDs, thanks to an amphipathic helix. These two localizations of MIGA2 most probably reflect alternate functions of the protein related to cellular metabolism (Klemm, 2021; Freyre et al., 2019). Similarly, some members of the VPS13 family are present in different inter-organelle contacts, in contact with LDs using an AH (Yeshaw et al., 2019; Wang et al., 2021; Kumar et al., 2018; Ramseyer et al., 2018), and with the ER using FFAT and Phospho-FFAT (Guillén-Samander et al., 2021; Wang et al., 2021). In the case of MOSPD2, either deleting the MSP domain or preventing its binding to FFAT motifs, unexpectedly promoted the formation of ER-LD contacts. This observation suggests that MOSPD2 is balanced between two kinds of membrane contact sites: MSP domain-dependent contacts that involve FFAT-containing partners of MOSPD2 and CRAL-TRIO domain-dependent contacts that involve the direct recognition of the surface of LDs by MOSPD2. It is plausible that regulation mechanisms exist to control the repartition of MOSPD2 between the two types of contact sites in which the protein might then play distinct roles. In line with this, we have recently shown that phosphorylation of FFAT-like motifs, which we named Phospho-FFAT, allows a regulatable MSP-dependent formation of contact sites (Di Mattia et al., 2020a). Thus, the Phospho-FFAT phosphorylation status of MOSPD2 partners can probably indirectly control pools of MOSPD2 in and out of ER-LD contacts. We also observed that in cells producing large amounts of LDs, MOSPD2 accumulated in ER-LD contacts, suggesting that ER-LD contacts are privileged and that the metabolic state of the cell probably dictates the localization and function of MOSPD2. Moreover, the binding of MOSPD2 to LDs might also be tuned by the lipid composition of LDs; in agreement with our *in vitro* data, changes in the phospholipid monolayer or in the neutral core of LDs most probably regulate the affinity of binding of MOSPD2. Accordingly, endogenous MOSPD2 is not enriched on the surface of all LDs, raising the possibility that it preferentially attaches to a subpopulation of LDs (e.g., sterol-rich LDs), as previously shown for some members of the Perilipin family (Hsieh et al., 2012). It is not yet known whether the absence of MOSPD2 affects the amount of ER-LD contacts. Moreover, it is unclear whether the association of MOSPD2 with LDs is at the expense of other specific contacts or simply reduces the amount of MOSPD2 that can be recruited by FFAT-containing partners. In either case, this would represent an additional level of control of contacts between the ER and other organelles.

To summarize, we report that MOSPD2 builds ER-LD contacts and thereby affects LD homeostasis. MOSPD2 shares many similarities with VAP-A and VAP-B: these three proteins recognize FFAT and Phospho-FFAT motifs, they have many partners in common, and by this molecular mechanism are involved in the formation of contacts between the ER and many organelles. The finding that MOSPD2 makes additional contacts through a mechanism distinct to that of VAP-A and VAP-B provides specificity and expands the repertoire of contacts that

this protein can make. The formation of contacts between the ER and other organelles is a plastic phenomenon involving complex networks of interactions, and future work should provide evidence on how the recruitment of MOSPD2 in a given inter-organelle contact is orchestrated.

Materials and methods

Cloning and constructs

The GFP-MOSPD2 (WT and RD/LD mutant), GFP-VAP-A, and GFP-TM(SAC1) expression vectors were previously described (Alpy et al., 2013; Di Mattia et al., 2018).

The GFP-MOSPD2 Δ MSP, GFP-MOSPD2 Δ TM, GFP-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO, GFP-MOSPD2 W201E expression vectors were constructed by overlap extension PCR using GFP-MOSPD2 as a template and the following central primers: GFP-MOSPD2 Δ MSP: 5'-AGTGTATTTAAAGGCCCGAAAGCAGTAAACCAAAC-3' and 5'-GTTTGGTTTACTGCTTTGCGGGCCTTTAAATACACT-3'; GFP-MOSPD2 Δ TM: 5'-CAGCGTTGTATCTGAATTCAGCAGCTGCTGCTTCC-3' and 5'-CAGCTGCTGGAATTCAGATACAACGCTGAATTTGGTC-3'; GFP-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO: 5'-ATCATCTAC TAGTGGTGGATAGCTAGAATTCGAAGCTTGAGCTCGAGA-3' and 5'-TCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCAGCTATCCACCACTAGTA GATGAT-3'; GFP-MOSPD2 W201E: 5'-ATTGTGAAAACCGAACTT GGTCCAGAAGCAGTGAGC-3' and 5'-TTCTGGACCAAGTTCGGT TTTTACAATTTTGAAAGC-3'; and the peripheral primers 5'-GAG ACGGCCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3', and 5'-GAGAG GATCCTTAAGTGTACAATAAATAGAAG-3'. PCR fragments were cloned by ligation into the BamHI and EagI-linearized pQCXIP vector.

The GFP-AH-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO expression vector was obtained by PCR using GFP-MOSPD2 as template and the following central primers 5'-TGGACCAAGCCAGGTTTTCACAAT TTTGAAAGCAGCATTCATTAACCAAGGCATAGAATTCGAAGC TTGAGCTCGAGA-3' and 5'-TGGACCAAGCCAGGTTTTCACAAT TTTGAAAGCAGCATTCATTAACCAAGGCATAGAATTCGAAGC TTGAGCTCGAGA-3' and the peripheral primers 5'-GGAATT GATCCGCGGCCGCCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT-3' and 5'-GGGCGGAATTCCGGATCTTAAGTGTACAATAAATAGAA GAAAGAGGTGACAAAAGCAAG-3'. PCR fragments were cloned using the SLiCE (Seamless Ligation Cloning Extract) method (Okegawa and Motohashi, 2015) into the NotI and BamHI-linearized pQCXIP vector.

GFP-AH-VAP-A construct was obtained by PCR using the following primers: 5'-GGAATTGATCCGCGGCCCGGATGGTG AGCAAGGGCGAGGAGCTGT-3', 5'-TGGACCAAGCCAGGTTT CACAATTTTGAAGCAGCATTCATTAACCAAGGCATAGAATT CGAAGCTTGAGCTCGAGA-3', and 5'-TGCCTTGGTTAATGAATG CTGCTTTCAAATTTGTGAAAACCTGGCTTGGTCCAGCGTCCG CCTCAGGGGCCATG-3', 5'-GGGCGGAATTCCGGATCTACAAG ATGAATTTCCCTAG-3', and GFP-VAP-A as a template. PCR fragments were cloned by SLiCE into the NotI and BamHI-linearized pQCXIP vector.

The GFP-MOSPD2-TM(SAC1) construct was obtained by PCR using the following primers: 5'-GGAATTGATCCGCGGCCCGG ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT-3', 5'-AACAACCATGAT AATAGGCAAAGCCAGGAAGATACAACGCTGAACCTGGTCTTC

AAGCTT-3', and 5'-TTCCTGGCTTTGCCTATTATCATGGTTGTT-3', 5'-GGGCGGAATTCCGGATCTCAGTCTATCTTTTCTTCTGG ACCAGTCT-3', and GFP-MOSPD2 and GFP-TM(SAC1) as a template, respectively. PCR fragments were cloned by SLiCE into the NotI and BamHI-linearized pQCXIP vector.

GFP-CRALTRIO-TM(SAC1) construct was obtained by PCR using the following primers: 5'-GGAATTGATCCGCGGCCCGG ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT-3', 5'-AACAACCATGAT AATAGGCAAAGCCAGGAAGGGCCTTTAAATACACTCAATGG-3', and 5'-TTCCTGGCTTTGCCTATTATCATGGTTGTT-3', 5'-GGGCGGAATTCCGGATCTCAGTCTATCTTTTCTTCTGGACC AGTCT-3', and GFP-MOSPD2 and GFP-TM(SAC1) as a template, respectively. PCR fragments were cloned using the SLiCE method into the NotI and BamHI-linearized pQCXIP vector.

mScarlet-ER construct was obtained by PCR using the following primers: 5'-GGAATTGATCCGCGGCCCGCACCATGGTGA GCAAGGGC-3', 5'-CCGACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGCCG GTGGAGTGGCGGCCCTCGGAGC-3', and 5'-GCTGTACAAGTC CGGATTCCTGGCTTTGCCTATTATCATGGTTGTTGCCTTT-3', 5'-GGGGGGGGCGGAATTCCTCAGTCTATCTTTTCTTCTGGACCA GTCTGGGAGC-3' and pmScarlet-C1 (gift from Dorus Gadella, University of Amsterdam, Amsterdam, Netherlands; Addgene plas- mid # 85042; <http://n2t.net/addgene:85042>; RRID:Addgene_85042) and GFP-TM(SAC1) as a template, respectively. PCR frag- ments were cloned using the SLiCE method into the NotI and BamHI-linearized pQCXIP vector.

mScarlet-MOSPD2 WT, mScarlet-MOSPD2 W201E, mScarlet-MOSPD2 RD/LD, mScarlet-MOSPD2 AH- Δ CRAL-TRIO, and mScarlet-AH-VAP-A were obtained from GFP-MOSPD2 WT, GFP-MOSPD2 W201E, GFP-MOSPD2 RD/LD, GFP-MOSPD2 AH- Δ CRAL-TRIO, and GFP-AH-VAP-A in which the GFP cassette was excised by SbfI and XhoI digestion and replaced using SLiCE by the coding sequence of mScarlet amplified by PCR using the primers: 5'-TGCATTGGAACGGACCTGCAGCCACCATGGTGA GCAAGGGCGAGGAGTGTCAA-3' and 5'-GCAGAATTCGAA GCTTGAGCTCGAGATCTGAGTCCGGACTTGTACAGCTCGTCC AT-3' and pmScarlet-C1 as a template.

mScarlet-MOSPD2 Δ CRAL-TRIO was obtained from mScarlet-MOSPD2 WT in which the coding sequence of MOSPD2 was ex- cised by XhoI and BamHI digestion and replaced using SLiCE by MOSPD2 Δ CRAL-TRIO coding sequence amplified by PCR using the primers: 5'-TCCGGACTCAGATCTCGAAGCTATCCACCACTA GTAGATGATGACTTCCAGACCCCACTGTGTGAG-3' and 5'- GGGCGGAATTCCGGATCTTAAGTGTACAATAAATAGAAGAAA GAGGTGACAAAAGCAAG-3'.

All constructs were verified by DNA sequencing (Eurofins Genomics).

Cell culture, transfection, and infection

HeLa cells (American Type Culture Collection [ATCC] CCL-2, RRID:CVCL_0030) were maintained in DMEM (4.5 g/liter glu- cose) with 5% FCS and 40 μ g/ml gentamycin. 293T cells (ATCC CRL-3216) were maintained in DMEM (4.5 g/liter glucose) with 10% FCS, 100 UI/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Huh-7 cells (JCRB0403, RRID:CVCL_0336) were maintained in DMEM (4.5 g/liter glucose) with 10% FCS, 0.1 mM Non Essential Amino Acids, 1 mM sodium pyruvate, and 40 μ g/ml gentamycin.

501-MEL cells (RRID:CVCL_4633; obtained from Dr. Colin Goding, University of Oxford, Oxford, UK) were maintained in RPMI without Hepes with 10% FCS and 40 µg/ml gentamycin. MCF-7 cells (ATCC HTB-22) were maintained in DMEM (1 g/liter glucose) with 10% FCS, 0.6 µg/ml insulin, and 40 µg/ml gentamycin.

HeLa WT and Seipin-KO (kind gift from Hongyuan Robert Yang, University of New South Wales, Sydney, Australia) were maintained in DMEM High Glucose (Dutscher) with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin. They were transfected using jetPEI transfection reagent (PolyPlus #101-10N).

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

siRNA transfections were performed using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Control siRNA (D-001810-10) and MOSPD2-targeting siRNAs (J-017039-09) were SMARTpool ON-TARGETplus obtained from Horizon Discovery.

Oleic acid was complexed with fatty acid-free BSA, as described in [Listenberger and Brown \(2007\)](#), and diluted in cell culture medium. Unless otherwise stated, cells were treated overnight with 400 µM OA.

CRISPR/Cas9-mediated genome editing

To generate MOSPD2 KO clones, HeLa cells were plated in 100-mm dishes and transfected with pX751 mCherry-Cas9 HF plasmid (gRNA deleting MOSPD2 exon 5: 5'-CAAGTGCAACAGTTTCTCATT-3'/5'-TGTTTGACTACACTCAGCT-3') using X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche). 48 h after transfection, clones were sorted and isolated in 96-well plates using FACS (Fusion). Clones were then screened by PCR (5'-CATCTTAGCTACCACCACCTGAACAGTTTAC-3'/5'-GCCTCGACATGTACCTCTCC-3' and 5'-CATCTTAGCTACCACCACCTGAACAGTTTAC-3'/5'-AATTGCTGCTGAAGGGTTTGTAGGTATC-3') and further analyzed by Western Blot (anti-MOSPD2; HPA003334; Sigma-Aldrich, RRID:AB_2146004) and Sanger sequencing (Eurofins Genomics).

To generate endogenous mClover3-MOSPD2 knock-in cells, HeLa cells were plated in 100-mm dishes and transfected with the pX852 plasmid (encoding mCherry-Cas9 and two gRNAs: 5'-AACCGCAATCACATCCACGA-3'/5'-CACCTTGCCATGATCACCG-3') and the repair template (synthesized by ProteoGenix). The repair template was composed of two homology arms of 1,000 bp flanking a puromycin resistance gene and mClover3 coding sequence separated by a P2A cleavage site. The insertion was made in the first exon of MOSPD2 genomic sequence to allow expression of a fusion protein with mClover3 at the N-terminus of MOSPD2. 3 d after transfection, cells were selected with medium containing 0.5 µg/µl of puromycin. After 5 d of selection, cells were sorted in 96-well plates. Clones were

screened by PCR (5'-GTGAATTTTCATGTAGACTGGAGGATGTTTGGCAGC-3'/5'-GCGAGGCGCACCGTGGGCTTGACTCGGTC-3' and 5'-ACACATGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCC-3'/5'-GCTTAACCTCTTTCACAGTAACCAAAATGAC-3') and analyzed by Western Blot (anti-GFP and anti-MOSPD2) and Sanger sequencing (Eurofins Genomics).

Immunofluorescence

Cells were grown on glass coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min. After blocking with 1% bovine serum albumin in PBS (PBS-BSA), cells were incubated overnight at 4°C with the primary antibody in PBS-BSA. Primary antibodies were: rabbit anti-MOSPD2 (1:250; HPA003334; Sigma-Aldrich, RRID:AB_2146004), rabbit anti-GFP (1:1,000; TP401; Torrey Pine Biolabs, RRID:AB_10013661), mouse anti-GFP (1:1,000; 2A3; IGBMC), rabbit anti-Calnexin (1:1,000; 10427-2-AP; Proteintech, RRID:AB_2069033), anti-PLIN3 (1:1,000; GP36; Progen), mouse anti-EEA1 (1:1,000; 610457; BD Biosciences, RRID:AB_397830), rabbit anti-ORP1 (1:200; EPR8646; Abcam), rabbit anti-GM130 (1:500; 11308-1-AP; ProteinTech, RRID:AB_2115327), mouse anti-Lamp1 H4A3 (1:50; DSHB, RRID:AB_2296838) and mouse anti-OPA-1 (1:1,000; 1A8; IGBMC). Cells were washed twice in PBS and incubated for 30 min with the secondary antibody (Alexa-Fluor 488 [RRID: AB_2535792 and AB_141607], AlexaFluor 555 [RRID: AB_2762848 and AB_162543], AlexaFluor 647 [RRID: AB_2536183 and AB_162542] from Thermo Fisher Scientific and Abberior STAR 580 [RRID: AB_2620153] from Abberior). After two washes with PBS, the slides were mounted in ProLong Gold (Invitrogen). Observations were made with a Leica TCS SP5 inverted confocal microscope (63×, NA 1.4), a Leica SP8 UV inverted confocal microscope (63×, NA 1.4), and a spinning-disk confocal microscope (CSU-XI; Nikon, 100×, NA 1.4). 2D-Stimulated Emission Depletion (STED) imaging was performed with a Leica SP8 STED 3× microscope in a thermostated chamber at 21°C and equipped with a STED motorized oil immersion objective (HC PL Apo 100×/NA 1.40 CS2). Excitation was performed with white-light laser and depletion with a 775 nm pulsed laser (STED 775). Excitation and depletion lasers were calibrated with the STED auto beam alignment tool during imaging sessions. HeLa WT and KO Seipin cells were observed on a Carl ZEISS LSM 800 Airyscan microscope.

To stain LDs, cells were incubated after permeabilization with either BODIPY 493/503 (0.5 µg/ml in 150 mM NaCl; Thermo Fisher Scientific), Nile Red (1:8,000 in 150 mM NaCl; Thermo Fisher Scientific), or HCS DeepRed LipidTOX (1:1,000 in PBS; Invitrogen) for 20 min at room temperature.

Quantification of ring-like/coma-shaped structures

HeLa WT cells were plated in 24-well plates (30,000 cells/well) and transfected the same day. 2 d after transfection, cells were fixed using 4% PFA in PBS, washed two times with PBS, and mounted on glass slides in ProLong Gold (Invitrogen).

Images were acquired on a Leica SP5 inverted confocal (63× oil objective, NA 1.4). The presence of enrichments (coma- and ring-shaped structures) was confirmed by eyes from two individuals.

Quantification of LD number and size

Two million cells were plated in T75 flasks and allowed to grow for 48 h. 30,000 cells were then plated in 24-well plates on glass coverslips. For the rescue experiment, HeLa MOSPD2 KO#1 cells were transfected the same day with different plasmids as previously described. After 48 h, cells were fixed in 4% PFA PBS and permeabilized as described above. LDs were stained using BODIPY 493/503 and nuclei with Hoechst for 20 min. Cells were mounted on glass slides in ProLong Gold (Invitrogen). Images were acquired on a spinning-disk CSU-X1 (Nikon, 100× NA 1.4) using the same setup every time (laser power, number of z-slices, exposition length). Cells were selected based on the nuclei channel to avoid any bias.

For image processing (illustrated in Fig. S4 A), a z-stack projection (max intensity) was performed on ImageJ Fiji (Schindelin et al., 2012). These images were then processed using CellProfiler (McQuinn et al., 2018). First, cells were manually segmented to create cell masks. Then, LDs were identified as objects with a diameter ≥ 2 pixels (i.e., 220 nm) within cell masks using the global threshold strategy and the minimum cross-entropy method. Multiple parameters (object intensity, object neighbors, and object size/shape) were analyzed on identified LDs and these data were treated using Spyder 4.1 (Python 3.7) and GraphPad Prism. See https://github.com/mzouiouich/Quantifications_MOSPD2.

Quantification of ER fluorescence signal around LDs

Stable mScarlet-ER HeLa cells were plated in 24-well plates (30,000 cells/well) and transfected the same day with either GFP-VAP-A or GFP-MOSPD2. 36 h later, cells were treated with 50 μ M of OA for 6 h. Cells were fixed in PFA 4% PBS, permeabilized with Triton X-100 0.1%, and LDs were stained using HCS DeepRed LipidTOX as described above. Images were acquired on a Leica SP5 inverted confocal (63× oil objective, NA 1.4) and cells were selected based on the GFP signal.

Image processing (illustrated in Fig. S4 B) was performed on CellProfiler. In brief, cells were manually selected and the nucleus was excluded (cell mask). The LDs were identified as objects superior or equal to 4 pixels of diameter using the global threshold strategy and the minimum cross-entropy method. Then, 2 pixels-wide areas were added from 0 to 20 pixels around LDs. These areas are mutually exclusive, meaning that the same pixel can be measured only once (i.e., for one LD). Multi-parametric measurements were performed for each area around LDs in the GFP channel (MOSPD2 and VAP-A) and mScarlet channel (ER marker). Data were analyzed on Excel and GraphPad. See https://github.com/mzouiouich/Quantifications_MOSPD2.

CLEM

EM was performed as previously described (Di Mattia et al., 2018; Wilhelm et al., 2017; Alpy et al., 2013). 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. Thick sections (~250 nm) were collected on carbon-coated copper grids (200 Mesh; AGS160; Agar Scientific).

EM grids were placed on a MatTek glass bottom dish in a drop of water and imaged with a spinning-disk confocal microscope

(CSU-X1, Nikon, 100× oil objective, NA 1.4). The position of the imaged cells was determined using the asymmetrical center mark of the grid. Then, samples were imaged with a transmission electron microscope (Philips CM12) coupled to an Orius 1000 CCD camera (Gatan). Images were processed and merged with the open-source software Icy (de Chaumont et al., 2012) using the eC-CLEM plugin (Paul-Gilloteaux et al., 2017).

FRAP

Cells were plated on 35-mm glass bottom dishes (MatTek), transfected with plasmids encoding GFP-MOSPD2 or GFP-PLIN2 (gift from Elina Ikonen, University of Helsinki, Helsinki, Finland; Addgene plasmid # 87161; <http://n2t.net/addgene:87161>; RRID:Addgene_87161), and allowed to grow for 24 h. Cells were then treated with 400 μ M OA overnight. HCS LipidTOX Deep Red Neutral Lipid Stain (H34477; Invitrogen) at a 1:2,000 dilution was added to the medium without phenol red 10 min prior imaging. Experiments were performed using the spinning-disk CSU-X1 (Nikon; 100× oil objective, NA 1.4). A region of interest was photobleached with the 405-nm laser line at 15% laser power and 5 repetitions. Recovery of fluorescence was monitored every second for 1 min immediately after photobleaching.

Protein expression and purification

The recombinant WT, the mutants CRAL-TRIO_{His6} (MOSPD2 2-246) and MSP_{His6} (MOSPD2 315-445) proteins, and the recombinant MOSPD2_{His6} (MOSPD2 1-490) protein corresponding to the full-length protein with its carboxyl-terminal transmembrane region deleted were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) at 20°C for 16 h upon induction with 1 mM IPTG (at an OD_{600nm} = 0.5). Cells were suspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 30 mM imidazole, 1 mM dithiothreitol, protease inhibitors tablets cOmplete; Roche). Cells were lysed by a Cell Disruptor TS SERIES (Constant Systems Ltd.) and the lysate was first centrifuged at 3,500 *g* for 15 min, then at 50,000 *g* for 45 min, and filtered through a 0.22- μ m membrane. Purification was performed on an ÄKTA Start chromatography system (GE Healthcare Life Sciences) using HisTrap HP 1 ml columns. Proteins were eluted with Elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM imidazole, 1 mM dithiothreitol) and further purified by gel filtration (HiLoad 16/60 Superdex 200; GE) in GF Buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM dithiothreitol). Proteins were concentrated with an Amicon Ultra-4 10 kD centrifugal filter unit (Merck). Protein concentration was determined by UV-spectroscopy.

Peptide synthesis

Peptides were synthesized on an Applied biosystem 433A peptide synthesizer using standard Fmoc chemistry and purified by reverse phase HPLC using a preparative scale column (Phenomenex: Kinetex EVO C18, 100 Å, 5 μ M, 250 × 21.2 mm). Molecular weight and purity of the peptides were confirmed by mass spectrometry.

SDS-PAGE, Western blot, and Coomassie blue staining

SDS-PAGE and Western blot analysis were performed as previously described (Alpy et al., 2005) using the following

antibodies: rabbit anti-GFP (1:2,000; TP401; Torrey Pine Biolabs), rabbit anti-MOSPD2 (1:250; HPA003334; Sigma-Aldrich), rabbit anti-mCherry (1:1,000; ab167453; Abcam), and mouse anti-actin (1:5,000; ACT-2D7; IGBMC).

Protein gels were stained with Coomassie blue (PageBlue Protein Staining Solution; Thermo Fisher Scientific).

Lipids

DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine), diphytanoyl-PC (1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), DOPS (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine), diphytanoyl-PS (1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine), NBD-PE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)), 18:1 Liss Rhod PE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[lissamine rhodamine B sulfonyl]), and DOGS-NTA-Ni²⁺ (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[(*N*-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl] [nickel salt]) were purchased from Avanti Polar Lipids. Glyceryl trioleate was purchased from Sigma-Aldrich.

TLC

Two million cells were plated in T75 flask and allowed to grow for 48 h. Then, 500,000 cells were plated in 6-well plates. After 24 h, cells were lysed with 0.1% SDS. Proteins were quantified, and the lysate equivalent to 450 µg of proteins was transferred into a new tube and the volume adjusted to 800 µl. Lipids were extracted using Bligh & Dyer protocol (water/chloroform/methanol with a ratio of 1.8:2:2 vol/vol) in glass tubes (Bligh and Dyer, 1959). After 5 min of centrifugation at 400 g, the lower-phase containing the lipids was transferred into a disposable glass tube and dried under a nitrogen stream. Lipids were solubilized in three drops of a chloroform/methanol mix (9:1 vol/vol) and applied to an HPTLC plate by capillarity. CE and TAG standards were also applied to the plate. The plate was then developed in a neutral lipid solvent (hexane/diethylether/AcOH with a ratio of 80:20:2 vol/vol) and primuline solution was used for revelation. Images were acquired on an ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare Life Sciences) using EtBr as fluorescence and the 605DF40 filter. The intensity of CE and TAG bands were quantified using Fiji.

Enzymatic quantification of lipids

Two million cells were plated in T75 flask and allowed to grow for 48 h. Then, 500,000 cells were plated in 6-well plates. After 24 h, cells from two wells were scraped in PBS and lipids extracted using the same protocol as for TLC (Bligh & Dyer protocol). After drying under nitrogen, lipids were solubilized in 200 µl of ethanol 95%. Quantifications were then performed according to the manufacturers' instructions (Cholesterol Amplex Red from Thermo Fisher Scientific [A12216], High Sensitivity Triglyceride Fluorometric Assay Kit from Sigma-Aldrich [MAK264-1KT], and Phospholipid quantification Assay Kit from Sigma-Aldrich [CS0001-1KT]).

aLDs preparation

aLDs were prepared as described in [Prévost et al. \(2018\)](#) with slight modifications. Phospholipids (DOPC, DOPE, and

Rhodamine-DOPE with a ratio of 73:25:2 mol/mol, respectively) were added to triolein at a 0.5% molar ratio in a glass tube. The solvent was evaporated under a stream of nitrogen and 1 ml of HK buffer (50 mM Hepes, pH 7.2, 120 mM K-acetate) was added. The solution was vortexed for 3 min. Then, aLDs were extruded 11 times through polycarbonate filters (Nuclepore Track-Etch Membrane; Whatman) with a pore diameter of 100 nm using a mini-extruder (Avanti Polar Lipids). The size was verified by dynamic light scattering measurements on a DynaPro (Protein Solutions). The preparation was used in a couple of hours after extrusion.

aLDs flotation assay

Each peptide (1 µM) was mixed with aLDs (1 mM), vortexed, and incubated at room temperature for 15 min. The solution (volume of 390 µl) was adjusted to 30% (wt/wt) sucrose by mixing with 260 µl of a 75% sucrose HK buffer. Two layers (520 µl of 25% sucrose and 130 µl of sucrose-free HK buffer) were gently added on top. Samples were centrifuged at 240,000 g for 1 h in a swing rotor (SWTi 60) at 20°C and decelerated without brake. The bottom (520 µl), middle (520 µl), and top (260 µl) fractions were collected and the fluorescence was measured using a fluorimeter (Pherastar FSX; BMG LABTECH).

aLDs and peptide interaction assay

aLDs were prepared following the protocol developed in [Chorlay and Thiam \(2020\)](#). Briefly, 5 µl of triolein was mixed with 70 µl of HKM buffer (50 mM Hepes, 120 mM K-acetate, and 1 mM MgCl₂ at pH 7.4), vortexed for 5 s, and sonicated in a bath sonicator for 10 s. Then each peptide was separately mixed and incubated with aLDs at a concentration of 1 µM. The resulting emulsions were then introduced in a glass chamber for visualization. Fluorescence data were acquired 30 min after incubation with a laser scanning microscope (LSM 800; Carl Zeiss). Fluorescence intensity was measured after segmentation of individual aLDs.

aLDs pull-down assay

aLDs pull-down assays were performed as described in [Kassas et al. \(2017\)](#). NTA-Ni²⁺ beads (PureProteome Nickel Magnetic Beads, LSKMAGH10; Millipore) were first washed with HK buffer. Then, 1 µM of recombinant proteins (MSP_{His6}, WT, and W201E CRAL-TRIO_{His6}) was added to the beads and incubated 20 min under agitation at 4°C. To remove the excess of proteins, beads were washed twice with HK buffer. Afterward, aLDs (1 mM) were added to the beads and incubated 20 min again under agitation at 4°C. Beads were then washed three times with HK buffer and resuspended in a final volume of 30 µl of HK buffer. For imaging, 10 µl of the suspension were dropped on a glass bottom dish (MatTek) and imaged on a spinning-disk CSU-X1 (Nikon; 100× NA 1.4). Fluorescence was measured with a fluorimeter (Pherastar FSX; BMG LABTECH) using 20 µl of suspension.

Liposome preparation

Lipids stored in stock solutions in CHCl₃ were mixed at the desired molar ratio in glass tubes. The solvent was removed in a dryer-block at 33°C under a nitrogen flow. If the mixture

contained DOGS-NTA-Ni²⁺, it was pre-warmed at 33°C for 5 min prior to drying. The lipid film was hydrated in HK buffer to obtain a suspension of multi-lamellar vesicles. The multi-lamellar vesicles suspensions were frozen and thawed five times and then extruded through polycarbonate filters of 0.2 µm pore size using a mini-extruder (Avanti Polar Lipids). Liposomes were stored at 4°C and in the dark when containing fluorescent lipids and used within 2 d.

Flotation experiment

The CRAL-TRIO_{His6} protein (0.75 µM) was incubated with liposomes (0.75 mM total lipids) with a given lipid composition doped with 0.1 mol% NBD-PE in 150 µl of HK buffer at 25°C for 10 min under agitation at 800 rpm. The suspension was adjusted to 28% (wt/wt) sucrose by mixing 100 µl of a 60% (wt/wt) sucrose solution in HK buffer and overlaid with 200 µl of HK buffer containing 24% (wt/wt) sucrose and 50 µl of sucrose-free HK buffer. The sample was centrifuged at 240,000 g in a swing rotor (TLS-55 Beckmann) for 1 h. The bottom (250 µl), middle (150 µl), and top (100 µl) fractions were collected. The bottom and top fractions were analyzed by SDS-PAGE by direct fluorescence and after staining with SYPRO Orange, using a FUSION FX fluorescence imaging system.

Circular dichroism

The experiments were performed on a Jasco J-815 spectrometer at room temperature with a quartz cell of 0.05 cm path length (Starna). The CRAL-TRIO_{His6} protein (WT or W201E mutant) was dialysed against a 20 mM Tris, pH 7.4, 120 mM NaF buffer to remove glycerol. Each spectrum is the average of 10 scans recorded from 185–260 nm with a bandwidth of 1 nm, a step size of 0.5 nm, and a scan speed of 50 nm min⁻¹. The protein concentration was 6.7 µM. A control spectrum of buffer was subtracted from each protein spectrum. The spectra were analyzed in the 185–240 nm range using the BeStSel method provided online (Micsonai et al., 2015).

Dynamic light scattering measurements of liposome aggregation

The experiments were performed at 25°C in a Dynamo apparatus (Protein Solutions). L_A liposomes (50 µM total lipids) made only of DOPC or composed of DOPC/DOGS-NTA-Ni²⁺ (98/2 mol/mol) were mixed with L_B liposomes (50 µM, made of DOPC or composed of diphytanoyl-PC and diphytanoyl-PS [70/30 mol/mol]) in 20 µl of a freshly degassed HK buffer in a quartz cell. A first set of 12 autocorrelations curves was acquired to determine the size distribution of the initial liposome suspensions. Then, MOSPD2_{His6} or MSP_{His6} (0.4 µM final concentration) was added manually and mixed thoroughly. The kinetics of aggregation was measured during 23 min 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 kinetics, the autocorrelation functions were fitted assuming that the size distribution is a simple Gaussian function. This mode, referred to as the monomodal or cumulant algorithm, gives a mean hydrodynamic radius and the width (or polydispersity). Before and after the aggregation process, the autocorrelation functions were fitted

using a more refined algorithm, referred to as a regularization algorithm. This algorithm is able to resolve several populations of different sizes, such as free liposomes and liposome aggregates.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney or the Kruskal-Wallis non-parametric test and with the One-way ANOVA or Student's *t* test parametric tests (Prism; GraphPad). Conditions were compared with the Dunn's and Tukey's multiple comparisons tests, respectively. P-values <0.05, <0.01, <0.001, and <0.0001 are identified with one, two, three, and four asterisks, respectively. ns: P ≥ 0.05.

Online supplemental material

Fig. S1 shows data that support the findings presented in Fig. 1 on the localization of MOSPD2 around LDs in different cell lines. Fig. S2 shows the co-labeling of MOSPD2 and markers of early/late endosomes, mitochondria, and Golgi. Fig. S3 shows data that support the findings shown in Fig. 1 on the localization of endogenous MOSPD2. Fig. S4 shows the image analysis workflows used for LD and ER quantifications. Fig. S5 shows that the silencing of VAP-A and VAP-B does not affect LDs.

Acknowledgments

We thank Alastair McEwen for his critical reading of the manuscript. We thank the members of the Molecular and Cellular Biology of Breast Cancer team (IGBMC) for helpful advice and discussions. We are grateful to the members of the IGBMC Imaging Center, especially Elvire Guiot for her help with FRAP analysis and Bertrand Vernay for his help with CellProfiler. We thank Paolo Ronchi from the Electron Microscopy Core Facility at the European Molecular Biology Laboratory Heidelberg and Coralie Spiegelhalter and Danièle Spehner from the IGBMC for their help with electron microscopy. We thank Marko Lampe from the Advanced Light Microscopy Facility at the European Molecular Biology Laboratory Heidelberg for his help with STED microscopy. We thank the IGBMC cell culture facility (Betty Heller), the peptide synthesis facility (Pascal Eberling), the Flow Cytometry facility (Claudine Ebel and Muriel Philipps), Molecular Biology and Virus Service (Paola Rossolillo and Nicole Jung), the Integrated Structural Biology platform (Catherine Birck and Pierre Poussin-Courmontagne), and the polyclonal and monoclonal antibody facility (Moustapha Oulad-Abdelghani) for their excellent technical assistance.

M. Zouiouich received a fellowship from ITMO Cancer AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé/National Alliance for Life Sciences and Health) within the framework of the Cancer Plan (<https://itcancer.aviesan.fr/>). T. Di Mattia received a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (<https://www.frm.org/>). A. Martinet received a fellowship from the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (<https://www.fondation-arc.org/>). J. Eichler received a fellowship from EUR Integrative Molecular & Cellular Biology (IMCBio; ANR-17-EURE-0023; <https://imcbio.unistra.fr/>). This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-21-CE13-0014-01 and ANR-19-CE44-0003; <https://anr.fr/>), and from the Ligue Contre le Cancer (Conférence

de Coordination Interrégionale du Grand Est; <https://www.ligue-cancer.net>). This work of the Interdisciplinary Thematic Institute IMCBio, as part of the ITI 2021-2028 program of the University of Strasbourg (<http://www.unistra.fr>), Centre national de la recherche scientifique (<http://www.cnrs.fr/>), and Inserm (<http://www.inserm.fr/>), was supported by IdEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002) and by SFRI-STRAT'US project (ANR 20-SFRI-0012) and EUR IMCBio (ANR-17-EURE-0023) under the framework of the French Investments for the Future Program.

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: M. Zouiouich, T. Di Mattia, C. Tomasetto, and F. Alpy conceptualized the study. Investigations were performed by M. Zouiouich (immunofluorescence, image analysis and quantifications, CLEM, lipid biochemistry, FRAP, aLD pull-down assay, generation of knock-in cell lines and molecular biology), T. Di Mattia (immunofluorescence, FRAP, CLEM, and molecular biology), A. Martinet (immunofluorescence, lipid biochemistry, and aLD pull-down assay), J. Eichler (aLD flotation experiment and aLD pull-down assay), C. Wendling (generation of knock-out cell lines and molecular biology), N. Tomishige (TLC experiment), E. Grandgirard (FRAP and CLEM), N. Fuggetta (liposome flotation assays and DLS), C. Ramain (molecular biology), G. Mizzon (CLEM), C. Dumesnil (aLD peptide interaction assay), M. Carpentier (immunofluorescence of Seipin KO cells), A.R. Thiam (aLD peptide interaction assay and immunofluorescence of Seipin KO cells), G. Drin (circular dichroism), and F. Alpy (CLEM, electron microscopy, aLD pull-down assay, and molecular biology). Validation of experiments was done by M. Zouiouich, T. Di Mattia, A. Martinet, J. Eichler, C. Wendling, N. Fuggetta, C. Dumesnil, M. Carpentier, A.R. Thiam, G. Drin, and F. Alpy. Formal analysis was done by M. Zouiouich, T. Di Mattia, J. Eichler, C. Dumesnil, G. Drin, and F. Alpy. Methodology was developed by M. Zouiouich, T. Di Mattia, J. Eichler, C. Wendling, N. Tomishige (lipid biochemistry), B. Reina-San-Martin (CRISPR-Cas9 genome editing), Y. Schwab (CLEM), A.R. Thiam (aLDs and peptide interaction assay), T. Kobayashi (lipid biochemistry), G. Drin (liposome flotation assay and DLS experiment), C. Tomasetto, and F. Alpy. Funding acquisition obtained by C. Mathelin, A.R. Thiam, G. Drin, C. Tomasetto, and F. Alpy. Supervision by A.R. Thiam, T. Kobayashi, G. Drin, C. Tomasetto, and F. Alpy. The original draft was written by M. Zouiouich, T. Di Mattia, G. Drin, C. Tomasetto, and F. Alpy. Review and editing of manuscript by M. Zouiouich, T. Di Mattia, J. Eichler, N. Tomishige, C. Mathelin, A.R. Thiam, T. Kobayashi, G. Drin, C. Tomasetto, and F. Alpy. Project administration managed by F. Alpy.

Submitted: 12 October 2021

Revised: 11 February 2022

Accepted: 16 March 2022

References

- Alpy, F., V.K. Latchumanan, V. Keding, A. Janoshazi, C. Thiele, C. Wendling, M.-C. Rio, and C. Tomasetto. 2005. Functional characterization of the MENTAL domain. *J. Biol. Chem.* 280:17945–17952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500723200>
- Alpy, F., A. Rousseau, Y. Schwab, F. Legueux, I. Stoll, C. Wendling, C. Spiegelhalter, P. Kessler, C. Mathelin, M.-C. Rio, 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. <https://doi.org/10.1242/jcs.139295>
- Bankaitis, V.A., J.R. Aitken, A.E. Cleves, and W. Dowhan. 1990. An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature*. 347:561–562. <https://doi.org/10.1038/347561a0>
- Bankaitis, V.A., C.J. Mousley, and G. Schaaf. 2010. The Sec14 superfamily and mechanisms for crosstalk between lipid metabolism and lipid signaling. *Trends Biochem. Sci.* 35:150–160. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.008>
- Bligh, E.G., and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Cabukusta, B., I. Berlin, D.M. van Elsland, I. Forkink, M. Spits, A.W.M. de Jong, J.J.L.L. Akkermans, R.H.M. Wijdeven, G.M.C. Janssen, P.A. van Veelen, and J. Neefjes. 2020. Human VAPome analysis reveals MOSPD1 and MOSPD3 as membrane contact site proteins interacting with FFAT-related FFNT motifs. *Cell Rep.* 33:108475. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108475>
- Chiapparino, A., K. Maeda, D. Turei, J. Saez-Rodriguez, and A.-C. Gavin. 2016. The orchestra of lipid-transfer proteins at the crossroads between metabolism and signaling. *Prog. Lipid Res.* 61:30–39. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.10.004>
- Chorlay, A., and A.R. Thiam. 2020. Neutral lipids regulate amphipathic helix affinity for model lipid droplets. *J. Cell Biol.* 219:e201907099. <https://doi.org/10.1083/jcb.201907099>
- Chorlay, A., L. Forêt, and A.R. Thiam. 2021. Origin of gradients in lipid density and surface tension between connected lipid droplet and bilayer. *Biophys. J.* 120:5491–5503. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.11.022>
- Čopič, A., S. Antoine-Bally, M. Giménez-Andrés, C. La Torre Garay, B. Antonny, M.M. Manni, S. Pagnotta, J. Guihot, and C.L. Jackson. 2018. A giant amphipathic helix from a perilipin that is adapted for coating lipid droplets. *Nat. Commun.* 9:1332. <https://doi.org/10.1038/s41467-018>
- de Chaumont, F., S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Hervé, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, et al. 2012. Icy: An open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat. Methods.* 9:690–696. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2075>
- Di Mattia, T., L.P. Wilhelm, S. Ikhlef, C. Wendling, D. Spehner, Y. Nominé, F. Giordano, C. Mathelin, G. Drin, C. Tomasetto, and F. Alpy. 2018. Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO Rep.* 19:e45453. <https://doi.org/10.15252/embr.201745453>
- Di Mattia, T., A. Martinet, S. Ikhlef, A.G. McEwen, Y. Nominé, C. Wendling, P. Poussin-Courmontagne, L. Voilquin, P. Eberling, F. Ruffenach, et al. 2020a. FFAT motif phosphorylation controls formation and lipid transfer function of inter-organelle contacts. *EMBO J.* 39:e104369. <https://doi.org/10.15252/embr.2019104369>
- Di Mattia, T., C. Tomasetto, and F. Alpy. 2020b. Faraway, so close! Functions of endoplasmic reticulum-endosome contacts. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 1865:158490. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.06.016>
- Du, X., L. Zhou, Y.C. Aw, H.Y. Mak, Y. Xu, J. Rae, W. Wang, A. Zadoorian, S.E. Hancock, B. Osborne, et al. 2020. ORP5 localizes to ER-lipid droplet contacts and regulates the level of PI(4)P on lipid droplets. *J. Cell Biol.* 219:e201905162. <https://doi.org/10.1083/jcb.201905162>
- Freyre, C.A.C., P.C. Rauher, C.S. Ejsing, and R.W. Klemm. 2019. MIGA2 links mitochondria, the ER, and lipid droplets and promotes de novo lipogenesis in adipocytes. *Mol. Cell.* 76:811–825.e14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.011>
- Gao, M., X. Huang, B.-L. Song, and H. Yang. 2019. The biogenesis of lipid droplets: Lipids take center stage. *Prog. Lipid Res.* 75:100989. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.100989>
- Gatta, A.T., and T.P. Levine. 2017. Piecing together the patchwork of contact sites. *Trends Cell Biol.* 27:214–229. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.010>
- Gautier, R., D. Douguet, B. Antonny, and G. Drin. 2008. HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific-helical properties. *Bioinformatics.* 24:2101–2102. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>
- Giménez-Andrés, M., A. Čopič, and B. Antonny. 2018. The many faces of amphipathic helices. *Biomolecules.* 8:45:E45. <https://doi.org/10.3390/biom8030045>
- Guillén-Samander, A., M. Leonzino, M.G. Hanna IV, N. Tang, H. Shen, and P. De Camilli. 2021. VPS13D bridges the ER to mitochondria and

- peroxisomes via Miro. *J. Cell Biol.* 220:e202010004. <https://doi.org/10.1083/jcb.202010004>
- Guyard V., V.F. Monteiro-Cardoso, M. Omrane, C. Sauvanet, A. Houcine, C. Boulogne, K.B. Mbarek, N. Vitale, O. Facklaris, N.E. Khallouki, et al. 2021. Orp5 and Orp8 orchestrate lipid droplet biogenesis and maintenance at ER-mitochondria contact sites. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.11.11.468233>
- Hsieh, K., Y.K. Lee, C. Londos, B.M. Raaka, K.T. Dalen, and A.R. Kimmel. 2012. Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets. *J. Cell Sci.* 125:4067–4076. <https://doi.org/10.1242/jcs.104943>
- Huguenoth, M., and M. Bohnert. 2020. Come a little bit closer! Lipid droplet-ER contact sites are getting crowded. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 1867:118603. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118603>
- Johnson, B., A.N. Leek, L. Solé, E.E. Maverick, T.P. Levine, and M.M. Tamkun. 2018. Kv2 potassium channels form endoplasmic reticulum/plasma membrane junctions via interaction with VAPA and VAPB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 115:E7331–E7340. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805757115>
- Jumper, J., R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, et al. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 596: 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021s4103819-2>
- Kassas, N., E. Tanguy, T. Thahouly, L. Fouillen, D. Heintz, S. Chasserot-Golaz, M.-F. Bader, N.J. Grant, and N. Vitale. 2017. Comparative characterization of phosphatidic acid sensors and their localization during frustrated phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 292:4266–4279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.742346>
- Kirmiz, M., N.C. Vierra, S. Palacio, and J.S. Trimmer. 2018. Identification of VAPA and VAPB as Kv2 channel-interacting proteins defining endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions in mammalian brain neurons. *J. Neurosci.* 38:7562–7584. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0893-18.2018>
- Klemm, R.W. 2021. Getting in touch is an important step: Control of metabolism at organelle contact sites. *Contact.* 4:2515256421993708. <https://doi.org/10.1177/2515256421993708>
- Kory, N., R.V. Farese, and T.C. Walther. 2016. Targeting fat: Mechanisms of protein localization to lipid droplets. *Trends Cell Biol.* 26:535–546. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.007>
- Kumar, N., M. Leonzino, W. Hancock-Cerutti, F.A. Horenkamp, P. Li, J.A. Lees, H. Wheeler, K.M. Reinisch, and P.D. Camilli. 2018. VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites. *J. Cell Biol.* 217:3625–3639. <https://doi.org/10.1083/jcb.201807019>
- Lete, M.G., A. Tripathi, V. Chandran, V.A. Bankaitis, and M.I. McDermott. 2020. Lipid transfer proteins and instructive regulation of lipid kinase activities: Implications for inositol lipid signaling and disease. *Adv. Biol. Regul.* 78:100740. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2020.100740>
- Listenberger, L.L., and D.A. Brown. 2007. Fluorescent detection of lipid droplets and associated proteins. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 35:24.2.1–24.2.11. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb2402s35>
- Loewen, C.J.R., A. Roy, and T.P. Levine. 2003. A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J.* 22:2025–2035. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg201>
- Lord, S.J., K.B. Velle, R.D. Mullins, and L.K. Fritz-Laylin. 2020. SuperPlots: Communicating reproducibility and variability in cell biology. *J. Cell Biol.* 219(6). <https://doi.org/10.1083/jcb.202001064>
- McQuinn, C., A. Goodman, V. Chernyshev, L. Kametsky, B.A. Cimini, K.W. Karhohs, M. Doan, L. Ding, S.M. Rafelski, D. Thirstrup, et al. 2018. CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS Biol.* 16:e2005970. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005970>
- Mesmin, B., J. Bigay, J. Moser von Filseck, S. Lacas-Gervais, G. Drin, and B. Antonny. 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.056>
- Miconai, A., F. Wien, L. Kernya, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, and J. Kardos. 2015. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112: E3095–E3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500851112>
- Mikitova, V., and T.P. Levine. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030455>
- Murphy, S.E., and T.P. Levine. 2016. VAP, a versatile access point for the endoplasmic reticulum: Review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 1861:952–961. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.009>
- Okegawa, Y., and K. Motohashi. 2015. A simple and ultra-low cost homemade seamless ligation cloning extract (SLICE) as an alternative to a commercially available seamless DNA cloning kit. *Biochem. Biophys. Rep.* 4: 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.09.005>
- Olzmann, J.A., and P. Carvalho. 2019. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20:137–155. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>
- Paul-Gilloteaux, P., X. Heiligenstein, M. Belle, M.-C. Domart, B. Larijani, L. Collinson, G. Raposo, and J. Salamero. 2017. eC-CLEM: Flexible multi-dimensional registration software for correlative microscopies. *Nat. Methods.* 14:102–103. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4170>
- Pettersen, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, and T.E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25(13):1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Prévost, C., M.E. Sharp, N. Kory, Q. Lin, G.A. Voth, R.V. Farese, and T.C. Walther. 2018. Mechanism and determinants of amphipathic helix-containing protein targeting to lipid droplets. *Dev. Cell.* 44:73–86.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.12.011>
- Prinz, W.A., A. Toulmay, and T. Balla. 2019. The functional universe of membrane contact sites. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21:1–18. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0180-9>
- Ramseyer, V.D., V.A. Kimler, and J.G. Granneman. 2018. Vacuolar protein sorting 13C is a novel lipid droplet protein that inhibits lipolysis in brown adipocytes. *Mol. Metab.* 7:57–70. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.10.014>
- Ryan, M.M., B.R.S. Temple, S.E. Phillips, and V.A. Bankaitis. 2007. Conformational dynamics of the major yeast phosphatidylinositol transfer protein Sec14p: Insight into the mechanisms of phospholipid exchange and diseases of Sec14p-like protein deficiencies. *Mol. Biol. Cell.* 18: 1928–1942. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-11-1024>
- Saló, V.T., and E. Ikonen. 2019. Moving out but keeping in touch: Contacts between endoplasmic reticulum and lipid droplets. *Curr. Opin. Cell Biol.* 57:64–70. <https://doi.org/10.1016/j.cceb.2018.11.002>
- Saló, V.T., I. Belevich, S. Li, L. Karhinen, H. Vihinen, C. Vigouroux, J. Magré, C. Thiele, M. Hölttä-Vuori, E. Jokitalo, and E. Ikonen. 2016. Seipin regulates ER-lipid droplet contacts and cargo delivery. *EMBO J.* 35: 2699–2716. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695170>
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, et al. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods.* 9: 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Sha, B., S.E. Phillips, V.A. Bankaitis, and M. Luo. 1998. Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein. *Nature.* 391:506–510. <https://doi.org/10.1038/35179>
- Szymanski, K.M., D. Binns, R. Bartz, N.V. Grishin, W.-P. Li, A.K. Agarwal, A. Garg, R.G.W. Anderson, and J.M. Goodman. 2007. The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 20890–20895. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704154104>
- Thiam, A.R., and M. Beller. 2017. The why, when and how of lipid droplet diversity. *J. Cell Sci.* 130:315–324. <https://doi.org/10.1242/jcs.192021>
- Thiam, A.R., R.V. Farese Jr, and T.C. Walther. 2013. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14:775–786. <https://doi.org/10.1038/nrm3699>
- van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- Walther, T.C., J. Chung, and R.V. Farese. 2017. Lipid droplet biogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33:491–510. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbioan100616-060608>
- Wang, J., N. Fang, J. Xiong, Y. Du, Y. Cao, and W.-K. Ji. 2021. An ESCRT-dependent step in fatty acid transfer from lipid droplets to mitochondria through VPS13D-TSG101 interactions. *Nat. Commun.* 12:1252. <https://doi.org/10.1038/s41467-021>
- Waterhouse, A., M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F.T. Heer, T.A.P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, et al. 2018. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46:W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wilhelm, L.P., C. Wendling, B. Védie, T. Kobayashi, M.-P. Chenard, C. Tomasetto, G. Drin, and F. Alpy. 2017. STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *EMBO J.* 36:1412–1433. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695917>

- Wu, H., P. Carvalho, and G.K. Voeltz. 2018. Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *Science*. 361:eaan5835. <https://doi.org/10.1126/science.aan5835>
- Yeshaw, W.M., M. van der Zwaag, F. Pinto, L.L. Lahaye, A.I. Faber, R. Gómez-Sánchez, A.M. Dolga, C. Poland, A.P. Monaco, S.C. van IJzendoorn, et al. 2019. Human VPS13A is associated with multiple organelles and influences mitochondrial morphology and lipid droplet motility. *eLife*. 8: e43561. <https://doi.org/10.7554/eLife.43561>
- Zhao, H., J. Sun, C. Insinna, Q. Lu, Z. Wang, K. Nagashima, J. Stauffer, T. Andresson, S. Specht, S. Perera, et al. 2022. Male infertility-associated Ccdc108 regulates multiciliogenesis via the intraflagellar transport machinery. *EMBO Rep*. e52775. <https://doi.org/10.15252/embr.202152775>
- Zhao, Y.G., N. Liu, G. Miao, Y. Chen, H. Zhao, and H. Zhang. 2018. The ER contact proteins VAPA/B interact with multiple autophagy proteins to modulate autophagosome biogenesis. *Curr. Biol*. 28:1234–1245.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.002>

Supplemental material

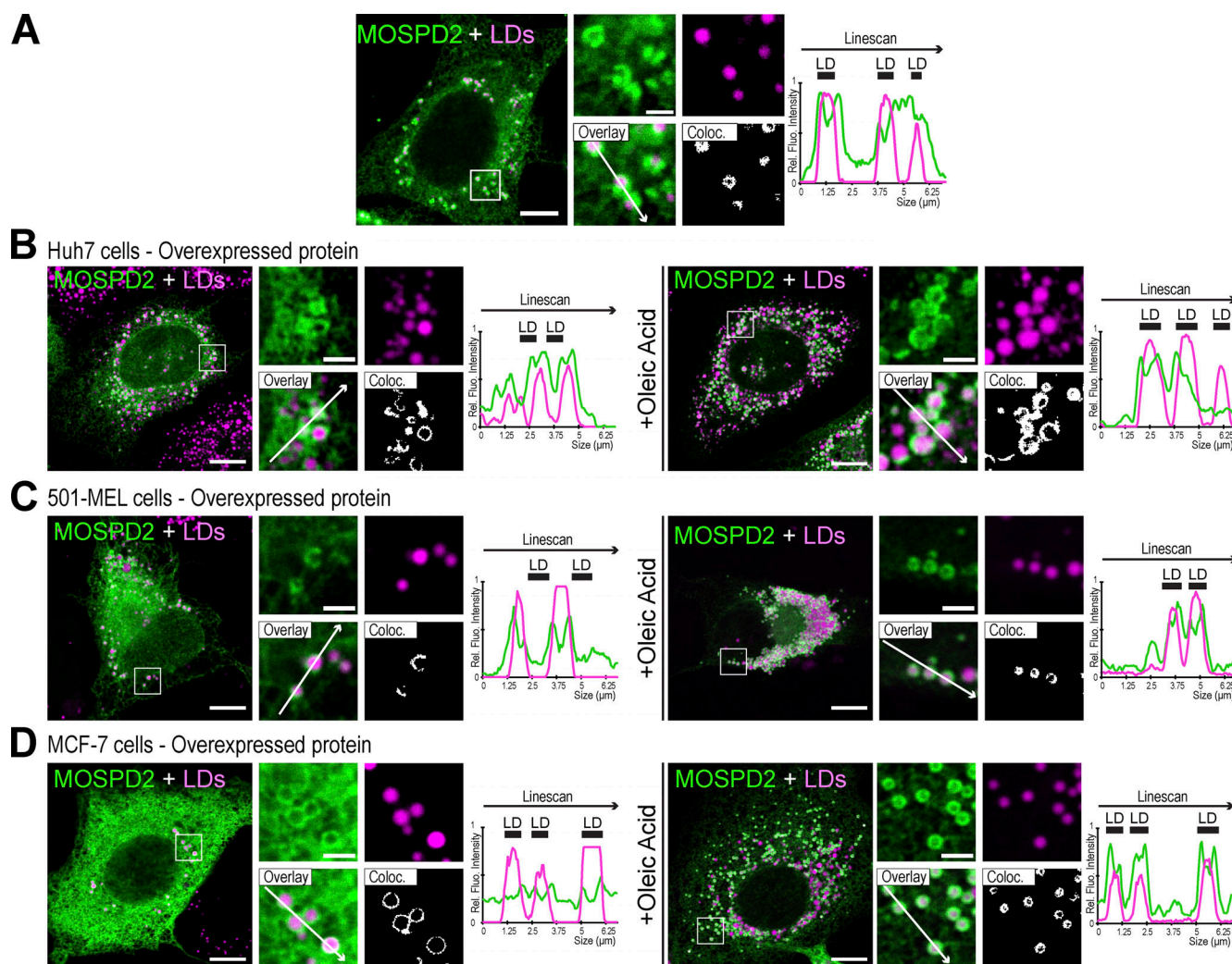
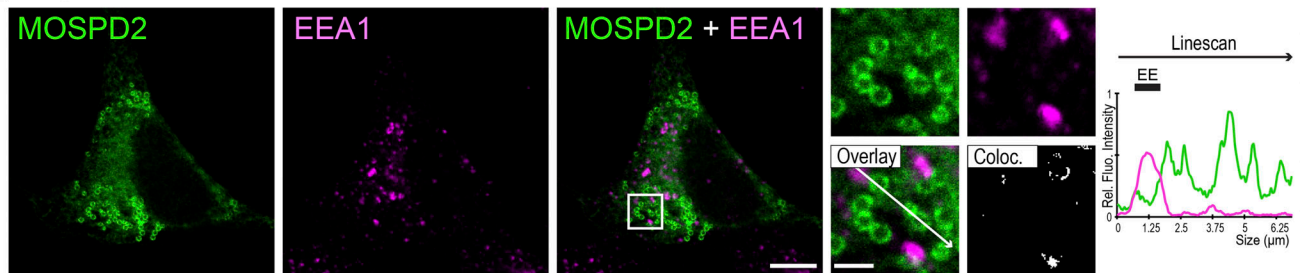
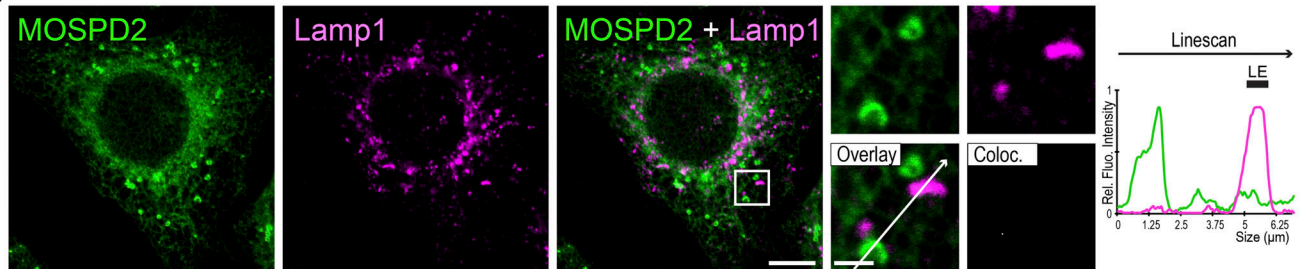


Figure S1. **MOSPD2 is enriched around LDs in different cell lines.** (A) HeLa cells expressing GFP-MOSPD2 (green) and not treated with OA were labeled with Nile Red to stain LDs (magenta). (B–D) Localization of GFP-MOSPD2 (green) in Huh-7 (B), 501-MEL (C), and MCF7 (D) cells. Cells were either treated with OA (right) or not treated (left). LDs were stained using Nile Red (magenta). Subpanels on the right are higher magnification images of the outlined areas. The overlay panel shows merged channels. The coloc panel displays a colocalization mask in which pixels of the green and magenta channels that co-localize are shown in white. Linescan shows fluorescence intensities of the green and magenta channels along the white arrow from the overlay subpanel. Black rectangles indicate the position of LDs. (A–D) Scale bars: 10 μ m (insets, 2 μ m). Confocal microscope (Leica SP5, 63 $\times$ NA 1.4) images.

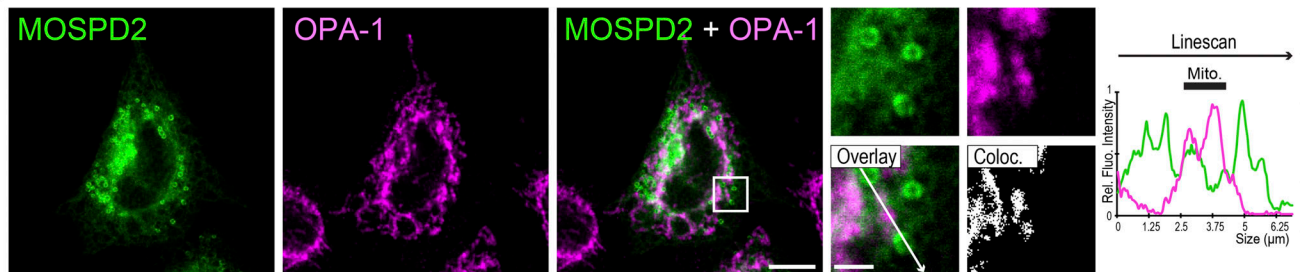
A Early Endosome



B Late Endosome



C Mitochondria



D Golgi

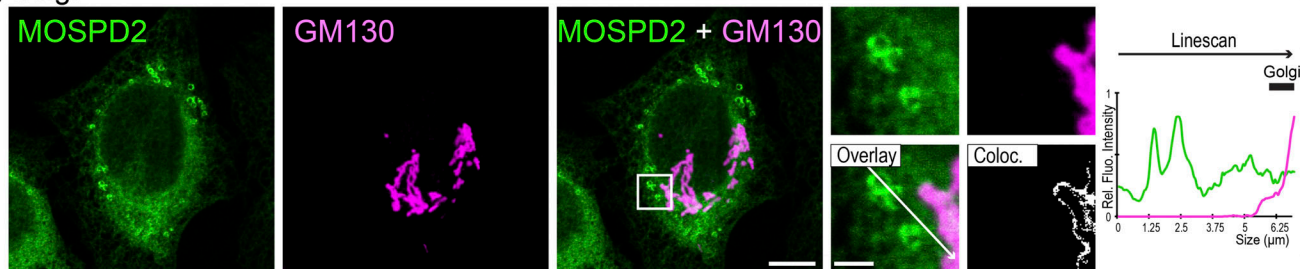


Figure S2. **Colocalization of MOSPD2 with different organelles.** (A–D) Colocalization in HeLa cells transfected with GFP-MOSPD2 (green) of MOSPD2 and endogenous EEA1 (A, magenta), Lamp1 (B, magenta), OPA-1 (C, magenta), and GM130 (D, magenta). Subpanels on the right are higher magnification images of the outlined areas. The overlay panel shows merged channels. The coloc panel displays a colocalization mask in which pixels of the green and magenta channels that co-localize are shown in white. Linescan shows fluorescence intensities of the green and magenta channels along the white arrow from the overlay subpanel. Black rectangles indicate the position of early endosomes (EE; A), late endosomes (LE; B), mitochondria (Mito.; C), and the Golgi apparatus (Golgi; D). Scale bars: 10 μ m (insets, 2 μ m). Images were acquired on a confocal microscope (Leica SP5, 63 $\times$ NA 1.4).

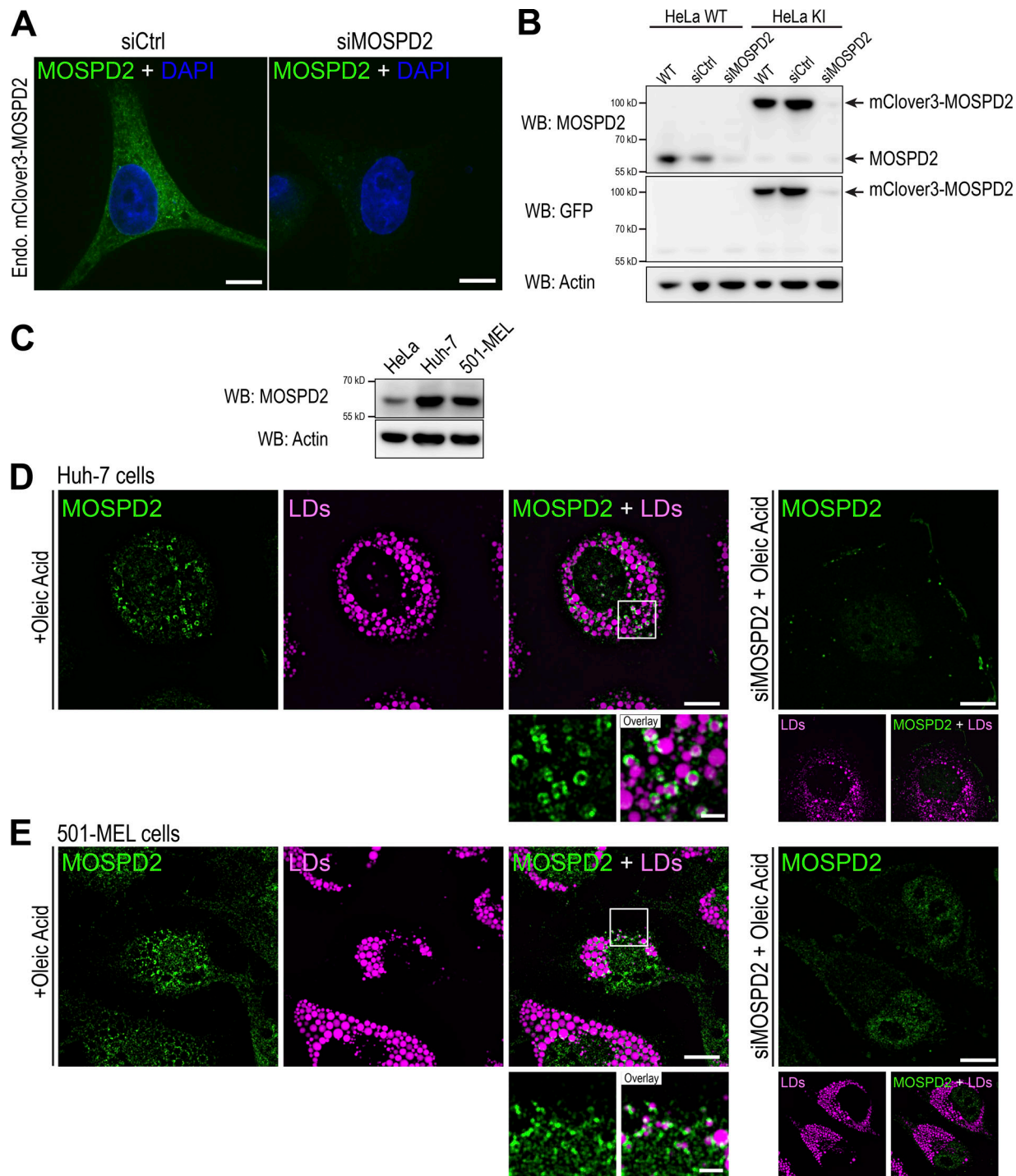
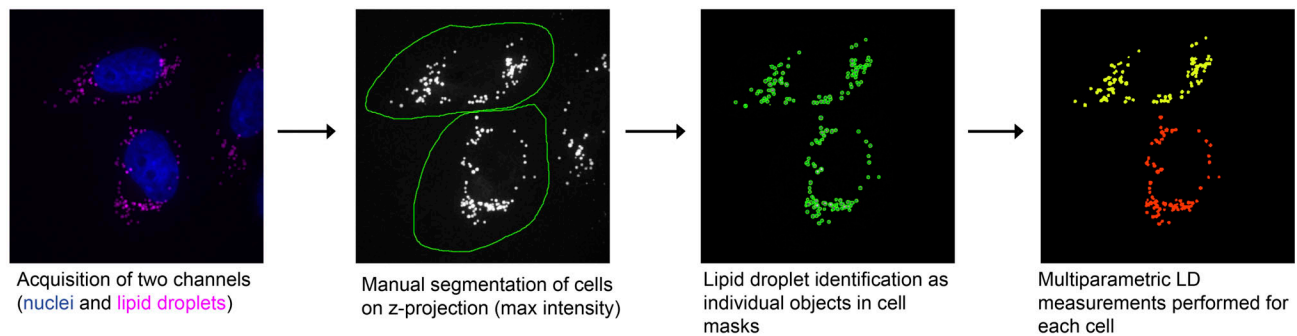


Figure S3. **Characterization of CRISPR/Cas9 knock-in HeLa cells and endogenous localization of MOSPD2.** (A) Live confocal images of HeLa cells expressing mClover3-MOSPD2 (green) at the endogenous level and transfected with control siRNAs (siCtrl) and siRNAs targeting MOSPD2 (siMOSPD2) to confirm the specificity of mClover3 signal. Scale bars: 10 μ m. (B) Western blot (WB) analysis of MOSPD2 expression in WT (HeLa WT) and mClover3-MOSPD2 knock-in (HeLa KI) HeLa cells transfected with control siRNAs (siCtrl) and siRNAs targeting MOSPD2 (siMOSPD2). mClover3 was detected using anti-GFP antibodies. (C) Western blot analysis of MOSPD2 expression in HeLa, Huh-7, and 501-MEL cells. (D and E) Colocalization of endogenous MOSPD2 (labeled with anti-MOSPD2, in green) and LDs (labeled with LipidTOX, in magenta) in Huh-7 cells (D) or 501-MEL (E) after OA treatment. Panels on the right show the background signal of anti-MOSPD2 antibodies in cells transfected with siRNAs targeting MOSPD2 (siMOSPD2). Subpanels show the LD staining. Left: Subpanels on the bottom are higher magnification images of the area outlined. The overlay panel shows merged channels. Scale bars: 10 μ m (insets, 2 μ m). (A, D, and E) Images were acquired on a spinning-disk confocal microscope (Nikon CSU-X1, 100 $\times$ NA 1.4). Source data are available for this figure: SourceData FS3.

A Overview of the image analysis workflow for LD quantification



B Overview of the image analysis workflow for ER quantification

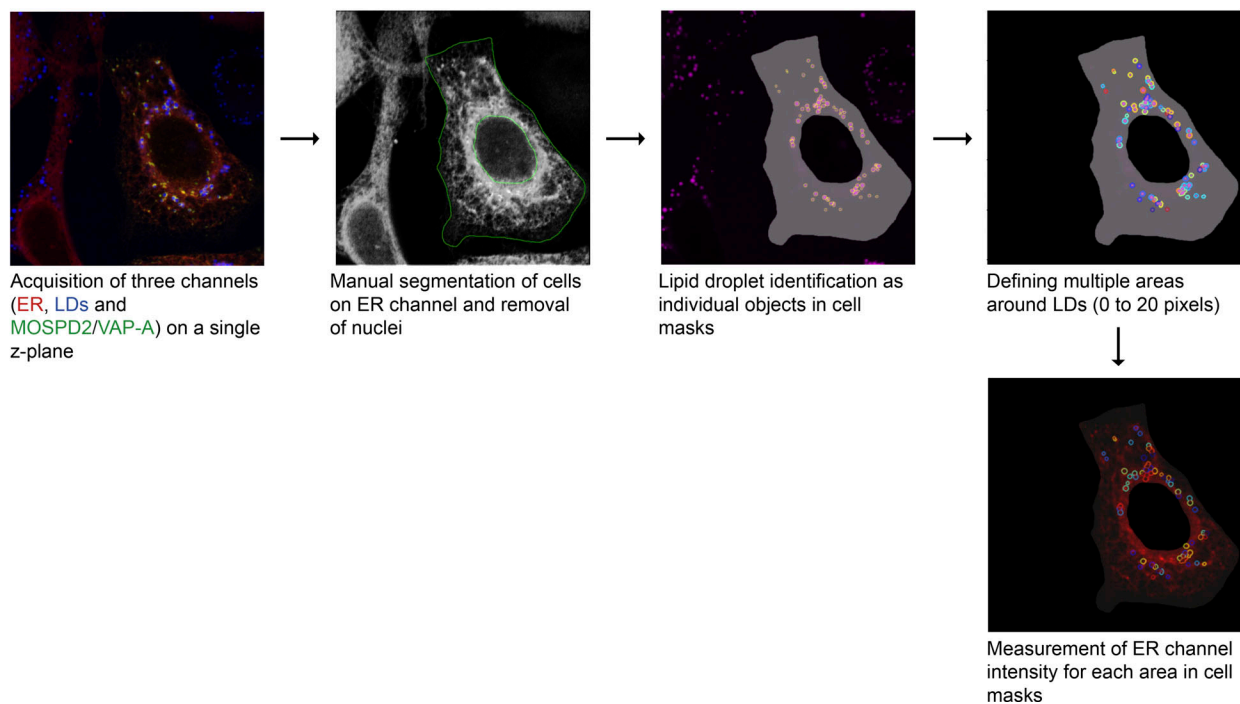


Figure S4. **Image analysis workflows for LD and ER quantifications.** (A) Cells stained with BODIPY 493/503 (LDs) and Hoechst (nuclei) were imaged on multiple z slices using a confocal microscope. Z-stack projection (max intensity) images were generated using Fiji and processed using CellProfiler. Cells were manually segmented and LDs identified as objects ≥ 2 pixels of diameter. Multi-parametric object measurements were performed on the identified LDs. (B) Cells were treated with OA at $50 \mu\text{M}$ for 6 h before imaging. Three channels were acquired: LDs (stained with HCS DeepRed LipidTox), the ER (stained with the ER marker mScarlet-ER), and MOSPD2/VAP-A (tagged with GFP). Cells were manually segmented and masks of the cytoplasm (i.e., without the nuclei) were generated with CellProfiler. LDs were identified as objects ≥ 4 pixels of diameter. Multiple areas (2-pixel wide) from 0 to 20 pixels around each LD were added. Multi-parametric measurements were performed for each area around LDs in the red (mScarlet-ER) and green (GFP-MOSPD2/VAP) channels.

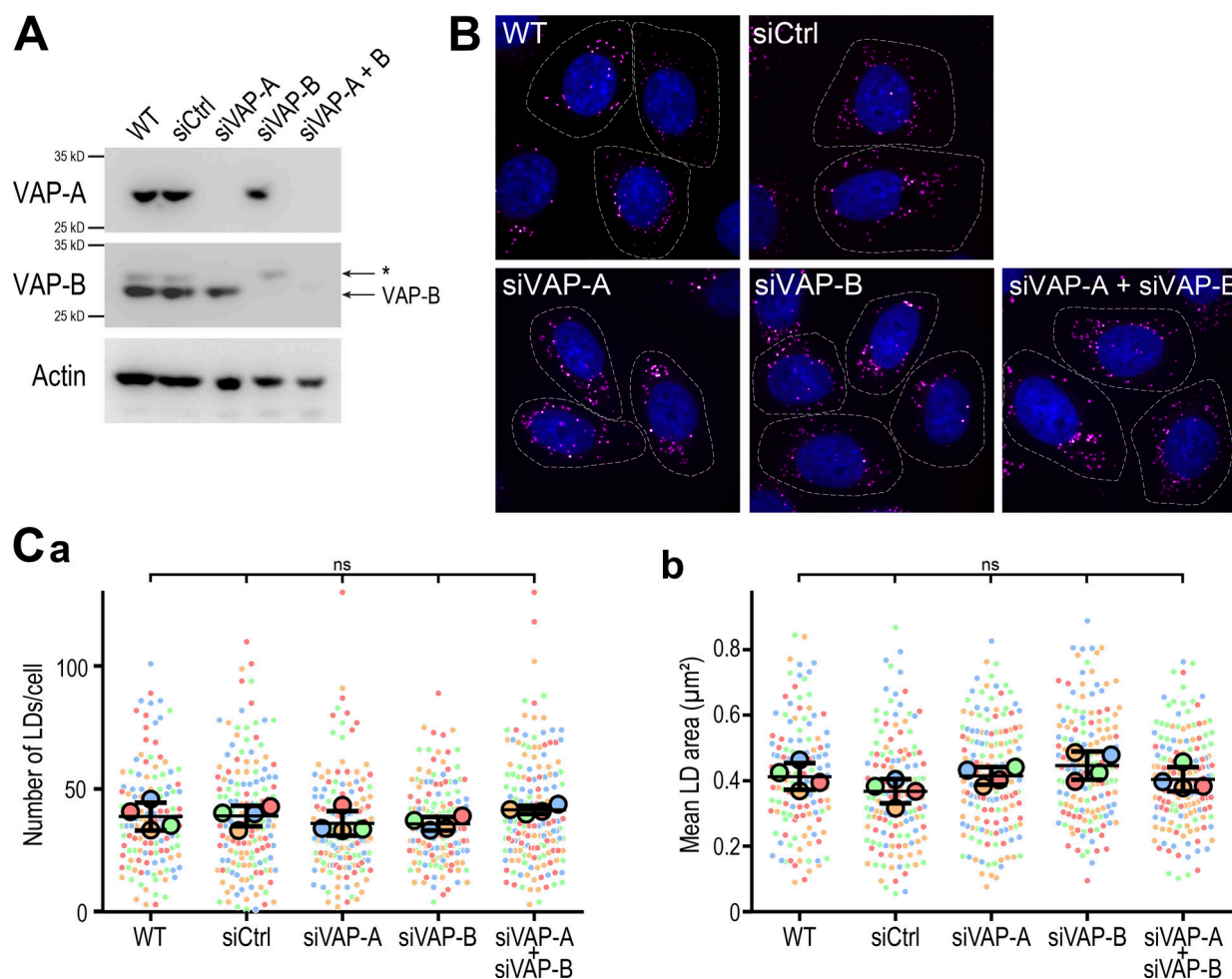


Figure S5. VAP-A and VAP-B are not involved in LD homeostasis. **(A)** Western blot analysis of VAP proteins level in control HeLa cells (WT), HeLa cells transfected with control siRNAs (siCtrl), and with siRNAs targeting VAP-A (siVAP-A), VAP-B (siVAP-B), and both (siVAP-A + B). The band labeled with an * on VAP-B blot corresponds to cross-reactivity with VAP-A. **(B)** Representative confocal images of parental HeLa cells (WT) and HeLa cells transfected with control siRNAs (siCtrl), and with siRNAs targeting VAP-A (siVAP-A), VAP-B (siVAP-B), or both (siVAP-A + B). Cells were labeled with BODIPY 493/503 (LD, magenta) and Hoechst 33258 (nuclei, blue). The cell contour is delimited by a white dotted line. Scale bars: 10 μm . Images were acquired on a spinning-disk confocal microscope (Nikon CSU-X1, 100 $\times$ NA 1.4). **(C)** Number (a) and area (b) of LDs in cells shown in B. Data are displayed as Superplots showing the mean number and area of LDs per cell (small dots), and the mean number and area of LDs per independent experiment (large dots). Independent experiments ($n = 4$) are color-coded. Means and error bars (SD) are shown as black bars. Data were collected from 98 (WT), 118 (siCtrl), 134 (siVAP-A), 129 (siVAP-B), and 135 (siVAP-A + VAP-B) cells. One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (ns, not significant; $n = 4$ independent experiments). Source data are available for this figure: SourceData F55.

3. Expériences complémentaires à la publication

Afin de mieux comprendre comment le domaine CRAL-TRIO de MOSPD2 régule les LDs, des expériences additionnelles aux données présentées dans la publication ont été réalisées. La famille CRAL-TRIO étant connue pour pouvoir lier et transporter des lipides *in vitro*, MOSPD2 pourrait également remplir cette fonction au niveau des sites de contact ER-LD. Ce mécanisme moléculaire pourrait expliquer comment MOSPD2 favorise la maturation des LDs et l'accumulation de lipides neutres.

c. Quels sont les ligands du domaine CRAL-TRIO de MOSPD2 ?

L'équipe a effectué plusieurs expériences *in vitro* avant mon arrivée au laboratoire afin d'identifier de possibles ligands du domaine CRAL-TRIO de MOSPD2. Pour cela, le domaine CRAL-TRIO a été produit dans des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) puis purifié par chromatographie d'affinité et d'exclusion. Une fois purifié, le domaine a été déposé sur des membranes « PIP Strips » afin de tester des interactions protéine-lipide (Figure R1A). Ces membranes contiennent différents types de lipides immobilisés, correspondant essentiellement à des glycérophospholipides. Après incubation avec le domaine recombinant, les protéines non fixées à la membrane sont lavées, puis la présence de la protéine recombinante est révélée par chimioluminescence.

Grâce à ces expériences, on observe que le domaine CRAL-TRIO de MOSPD2 a une bonne affinité pour les lipides phosphoinositides (PIP), et plus particulièrement le PI(3,5)P₂. De manière générale, MOSPD2 semble pouvoir se lier à certains lipides ayant une charge négative comme la phosphatidylsérine (PS) et l'acide phosphatidique (PA) mais n'est pas capable de lier d'autres glycérophospholipides comme la phosphatidylcholine (PC) ou la phosphatidyléthanolamine (PE). Cette expérience ne permet pas de différencier une interaction de surface entre les lipides et la protéine, d'une interaction spécifique provenant la poche hydrophobe du domaine. Il est donc difficile de conclure sur la nature des liaisons observées.

Une deuxième approche *in vitro* a été mise en place afin de confirmer les résultats obtenus sur membrane. Pour cela, la capacité du domaine CRAL-TRIO à former un complexe avec des lipides fluorescents a été évaluée par gel natif. Le laboratoire possède différents lipides couplés au nitrobenzoxadiazole (NBD), une molécule fluorescente. En revanche, nous ne disposons pas de lipides PIPs couplés à une molécule fluorescente, ces lipides n'ont donc pas été testés. Les lipides fluorescents sont mélangés au domaine recombinant CRAL-TRIO, puis ce mélange est déposé sur un gel natif afin de ne pas dénaturer la structure du complexe.

RESULTATS

Après migration, il est possible de révéler la présence du lipide dans le gel grâce à la fluorescence du NBD, et la présence du domaine par coloration au bleu de Coomassie (Figure R1B). On observe sur ce gel que le domaine CRAL-TRIO est capable de lier le NBD-PS et également le NBD-PA. En revanche, aucune interaction n'est observée avec le NBD-PC, le NBD-PE ou bien différents types de cholestérols fluorescents (22-NBD, 25-NBD et 24-TopFluor). Ces données concordent avec les premiers résultats obtenus par membrane « PIP Strips » qui montraient une interaction intermédiaire avec le PS et le PA. En revanche, comme pour la première expérience, une interaction de surface n'est pas complètement à exclure lors de ce type de manipulation.

En conclusion, des données générées au laboratoire avant ma venue ont permis de déterminer que le domaine CRAL-TRIO de MOSPD2 possède une certaine affinité pour différents glycérophospholipides, dont le PA et le PS, qui ont été confirmés par deux approches *in vitro*.

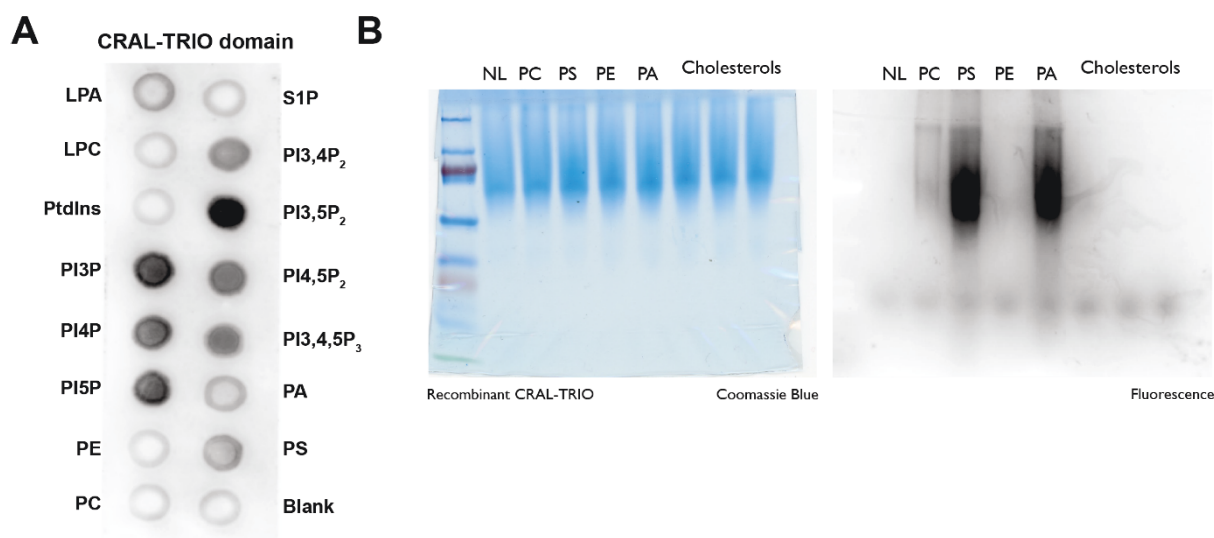


Figure R1. Le domaine CRAL-TRIO de MOSPD2 est capable de lier certains phospholipides *in vitro*. Expériences réalisées par Corinne Wendling

(A) Essai d'interaction protéine-lipide sur membrane PIP Strips. Le domaine CRAL-TRIO recombinant a été incubé à 0.1 µg/mL sur ces membranes pendant 1h puis révélé par chimioluminescence (n=2).

(B) Interaction protéine-lipide par migration sur gel natif. 15 µg du domaine CRAL-TRIO recombinant ont été incubés avec 1 µg de différents lipides couplés à du NBD. La présence du domaine est révélée par bleu de Coomassie et les lipides par fluorescence (n=3). Les colonnes cholestérols correspondent à du 22-NBD, 25-NBD et 24-TopFluor cholestérol.

LPA: Lysophosphatidic acid; LPC: Lysophosphocholine;
PtdIns: Phosphatidylinositol (PI); PIP: Phosphatidylinositol phosphate;
PE: Phosphatidylethanolamine; PC: Phosphatidylcholine;
S1P: Sphingosine-1-phosphate; PA: Phosphatidic acid;
PS: Phosphatidylserine; NL: No lipid

RESULTATS

d. La surexpression de MOSPD2 entraîne-t-elle une modification de la composition lipidique des sites de contact ER-LD ?

Les données générées *in vitro* sur la liaison du domaine CRAL-TRIO à des glycérophospholipides nous ont orientés vers l'étude du rôle de MOSPD2 dans la distribution subcellulaire du PA et du PS. Faisant suite aux résultats publiés, nous avons émis l'hypothèse que MOSPD2 pourrait moduler la composition en PA et/ou PS des sites de contact ER-LD, favorisant ainsi la maturation des LDs. Pour rappel, le domaine CRAL-TRIO possède deux fonctions régulant les LDs : l'ancrage à la membrane des LDs par l'hélice amphipathique et une autre fonction médiée par le reste du domaine et nécessaire au maintien de l'homéostasie des LDs. Au vu de la littérature portant sur la famille CRAL-TRIO et des expériences *in vitro* précédemment décrites, il est possible que ce domaine soit capable de lier ou transporter du PA et/ou du PS à l'interface ER-LD.

Afin d'étudier l'influence de MOSPD2 sur la distribution subcellulaire du PA et du PS, j'ai co-transfecté différentes formes de MOSPD2 avec des sondes fluorescentes marquant le PA (GFP-Opi et GFP-PDE, un don de Nicolas Vitale) ou le PS (mCherry-LactC2, un don de Toshihide Koyabashi ; GFP-evt-2-PH, un don de Tom Taguchi) dans des cellules Huh-7 (Kassas et al. 2017; Kay et al. 2012; S. Lee et al. 2015). Ces sondes correspondent à des fusions entre une protéine fluorescente et un domaine ou peptide liant le lipide. La sonde mCherry-LactC2 utilise le domaine discoidin-type C2 de la lactadherin et la sonde GFP-evt-2-PH est constituée de deux domaines PH en tandem de la protéine evectin-2 (Kay et al. 2012; S. Lee et al. 2015). Pour le PA, la sonde GFP-Opi utilise au domaine liant le PA (PABD) de la protéine de levure Opi1p contre le domaine PABD de la protéine mammifère PDE4A1 (Kassas et al. 2017). Les cellules Huh-7 ont été traitées 6h à l'acide oléique afin d'induire la formation de grandes LDs, facilitant l'analyse de colocalisation par microscopie confocale. Un fort signal cytoplasmique des sondes PA empêchait de quantifier correctement un enrichissement en bordure des LDs (données non montrées). Afin d'éliminer ce signal, j'ai perméabilisé les cellules à la saponine 0.1% dans du PBS, durant 1 minute avant fixation à la paraformaldéhyde (PFA). Le reste du protocole d'immunofluorescence correspond à celui publié (Zouiouich et al. 2022). La sonde GFP-PDE marquant le PA a été co-transfectée avec des vecteurs codant pour trois formes de MOSPD2 fusionnées à la protéine fluorescente mScarlet : la forme sauvage (FL), le mutant RD/LD du domaine MSP ne pouvant pas interagir avec les motifs FFAT, et la forme AH-ΔCRAL-TRIO, dépourvue de domaine CRAL-TRIO mais gardant la capacité de lier les LDs car fusionné avec l'hélice amphipathique (Figure R2A et R2Ba) (Di Mattia et al. 2018; Zouiouich et al. 2022). Pour les autres sondes, seules les formes FL et AH-ΔCRAL-TRIO ont été utilisées (Figure R2Bb, données non montrées pour les sondes PS). La corrélation entre les signaux fluorescents de MOSPD2 et des sondes a été quantifiée par

RESULTATS

cellule grâce au coefficient de Pearson. Cette mesure permet de déterminer s'il existe une co-distribution entre les deux signaux, c'est-à-dire un lien entre la localisation des signaux (co-occurrence) mais également un rapport de proportionnalité entre leur intensité.

Cette quantification montre que la forme entière de MOSPD2 (FL) colocalise de manière plus importante avec les deux sondes marquant le PA, GFP-Opi et GFP-PDE, que la forme mutante AH- Δ CRAL-TRIO (Figure R2Ca et R2Cb). Les sondes s'accumulent essentiellement au niveau des zones enrichies en MOSPD2, et non sur l'ensemble du pourtour des LDs. Cette différence de colocalisation ne s'explique pas par un changement de localisation de MOSPD2 car le mutant est autant enrichi au niveau des LDs que la forme entière (Zouiouich et al. 2022). Afin de vérifier un potentiel rôle du domaine MSP, le mutant RD/LD a été utilisé avec l'une des sondes. Dans ce cas, on n'observe aucune différence de colocalisation par rapport à la forme sauvage. Le domaine MSP ne semble donc pas impliqué dans la redistribution du PA. Concernant le PS, les deux sondes utilisées étaient peu enrichies autour des LDs avec les deux formes de MOSPD2 utilisées (données non montrées). Aucune différence de localisation des sondes marquant le PS n'a été observée entre les cellules exprimant les formes FL et AH- Δ CRAL-TRIO de MOSPD2.

En conclusion, MOSPD2 est capable, via son domaine CRAL-TRIO, d'agir sur la redistribution subcellulaire du PA au niveau des sites de contact ER-LD.

RESULTATS

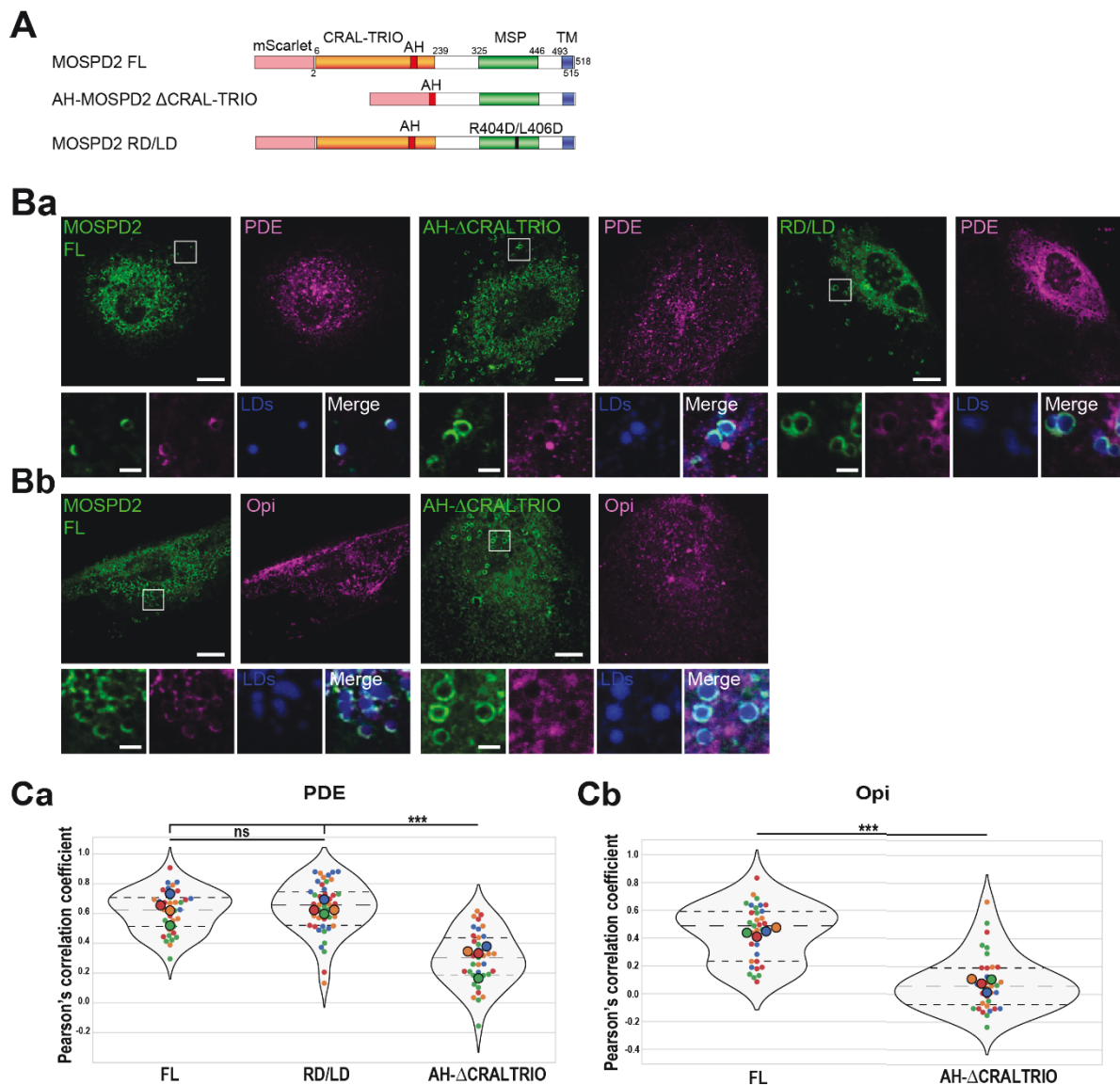


Figure R2. MOSPD2, via son domaine CRAL-TRIO, induit une relocalisation subcellulaire du PA à l'interface ER-LD.

(A) Schéma représentant les différents mutants de MOSPD2 utilisés pour la quantification panel (B) et (C).
FL: full length (forme entière)

(B) Images d'immunofluorescence montrant une co-transfection des sondes PDE (Ba) ou Opi (Bb) (en magenta) avec MOSPD2 forme entière (FL), MOSPD2 AH-ΔCRALTRIO ou RD/LD (en vert). Les gouttelettes lipidiques (LDs) sont marquées au LipidTox (en bleu). Marquages réalisés sur lignée Huh-7 traitées à l'acide oléique 400 μM pendant 6 heures. Barre d'échelle images principales: 10 μm. Barre d'échelle des encarts inférieurs: 2 μm.

(C) Quantification du coefficient de Pearson entre la sonde PDE (Ca) ou Opi (Cb) et les différentes formes de MOSPD2. Représentation en superplot avec violinplot. Les points à bord noir correspondent aux valeurs d'expériences alors que les points sans bordure correspondent aux valeurs par cellule. Chaque expérience indépendante est représentée par une couleur différente. Les traits en pointillés du violinplot correspondent aux quartiles (i.e. 25%, 50%, 75%). Les tests statistiques sont réalisés sur les moyennes d'expériences. (Ca) n=4 expériences, incluant 119 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey. (Cb) n=4 expériences, incluant 68 cellules; test de Student.
ns: non significatif, ***: p-value < 0.01

Par ces expériences complémentaires, nous avons montré que le domaine CRAL-TRIO de MOSPD2 est capable de lier des phospholipides *in vitro*, et plus particulièrement le

RESULTATS

PA et le PS. De plus, la surexpression de MOSPD2 dans des modèles cellulaires entraîne un enrichissement en PA à l'interface ER-LD. Ce phénomène dépend du domaine CRAL-TRIO et non du domaine MSP. Ces données confortent l'hypothèse selon laquelle MOSPD2, via son domaine CRAL-TRIO, est impliquée dans un remodelage membranaire des contacts ER-LD par un potentiel rôle de transport ou de présentation de lipides.

B. MOSPD2 est impliquée dans la régulation du système endosomal tardif via son domaine MSP

1. Introduction et objectifs

Dans la publication de Di Mattia *et al.*, l'équipe a montré que l'absence de MOSPD2 affecte la formation des sites de contacts entre le ER et les endosomes (ER-E). En effet, dans des cellules n'exprimant plus MOSPD2, les contacts ER-E sont diminués. De plus, le nombre de contacts entre endosomes (E-E) est augmenté (Di Mattia *et al.* 2018). Les protéines VAPA, VAPB et MOSPD2 sont toutes les trois impliquées dans la formation de contacts ER-endosomes (ER-E) grâce à leur domaine MSP permettant des interactions protéine-protéine (Di Mattia *et al.* 2018; M. J. Phillips and Voeltz 2016). Cependant, la perte de l'expression de VAPA et VAPB n'induit pas le même phénotype que la perte de MOSPD2, c'est-à-dire une modification conjointe des contacts ER-E et E-E.

Ces données suggèrent que le rôle de pont moléculaire de MOSPD2 ne soit pas complètement substituable par les protéines VAPA et VAPB. En effet, l'équipe a récemment montré que les domaines MSP des protéines VAPs et MOSPD2 ont *in vitro* des affinités différentes pour certains motifs FFAT (Di Mattia *et al.* 2020). Il est imaginable que cette différence observée *in vitro* puisse se traduire *in vivo* par le fait que les VAPs et MOSPD2 aient des partenaires préférentiels différents. Une autre possibilité est que le domaine CRAL-TRIO, distinguant MOSPD2 des VAPs, puisse aussi être impliqué dans cette régulation des contacts ER-E.

Les objectifs de mon projet étaient donc d'évaluer la fonction de MOSPD2 sur le système endosomal et de comprendre par quel moyen MOSPD2 régule les contacts ER-E.

2. Résultats

a. Quelles sont les conséquences de la perte d'expression de MOSPD2 sur le système endosomal ?

Les MCS ER-E régulent de nombreux processus du système endosomal (Neefjes, Jongsma, and Berlin 2017; Di Mattia, Tomasetto, and Alpy 2020). Les contacts E-E sont également connus comme régulant la fonction des endosomes, en permettant par exemple l'acidification des endosomes tardifs (Bright, Davis, and Luzio 2016; Bright, Gratian, and Luzio 2005). Par convention, le terme endosome tardif (LE) englobe ici les différents stades de maturation du système endosomal tardif soit : endosome mature (ou MVB), endolysosome et lysosome. Au vu de l'importance des différents contacts sur l'homéostasie des endosomes, la

RESULTATS

perte d'expression de MOSPD2 pourrait avoir un impact fonctionnel sur le système endosomal. Afin de vérifier cela, j'ai quantifié différents paramètres associés aux endosomes précoces et tardifs par immunofluorescence. J'ai réalisé un marquage endogène de la protéine LAMP1 pour marquer les endosomes tardifs et un marquage de la protéine EEA1 pour les endosomes précoces dans des cellules HeLa WT ou déficientes pour MOSPD2 (Scott, Vacca, and Gruenberg 2014). Les deux lignées déficientes pour MOSPD2 (KO#1 et KO#2) ont été obtenues par la méthode CRISPR/Cas9 et sont décrites dans (Zouiouich et al. 2022). Les images ont été acquises sur un confocal inversé CSU-X1 (objectif à huile 100×, NA 1.4). Les endosomes étant des structures assez hétérogènes dans leur forme et intensité, j'ai mis en place une segmentation d'objets par une approche d'apprentissage profond pour analyser les images. Pour cela, j'ai utilisé la plateforme open-source ZeroCostDL4Mic qui utilise le langage Python afin de donner accès à des algorithmes d'apprentissage profond en ligne, disponible sur Google Colab (von Chamier et al. 2021). J'ai ainsi entraîné un modèle sur le réseau neuronal StarDist, permettant la segmentation d'instances, sur des images de marquage LAMP1 endogène annotées avec le logiciel QuPath (Bankhead et al. 2017). Une fois satisfait du modèle obtenu, j'ai appliqué ce processus d'analyse d'images aux différents échantillons afin d'obtenir des masques d'objets segmentés (Figure R3). Une fois la segmentation réalisée, les images et leurs masques ont été traités avec le logiciel CellProfiler (Carpenter et al. 2006). Ce logiciel permet d'analyser facilement des lots d'images et peut fournir de nombreux paramètres sur l'image ou les objets. Pour ces quantifications, j'ai analysé trois paramètres principaux : le nombre et la taille des objets, et les contacts entre objets (via le pourcentage de surface en contact entre objets).

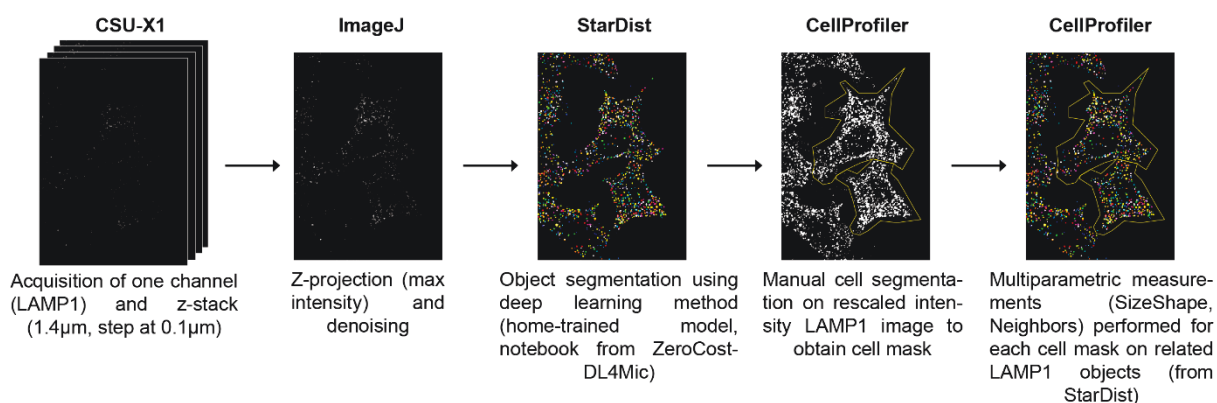


Figure R3. Synthèse du processus d'analyse d'images pour la quantification des endosomes tardifs

La quantification des endosomes tardifs (LE) positifs pour LAMP1 montre une importante augmentation du nombre de LE, et une diminution de leur taille dans les cellules MOSPD2 KO comparativement aux cellules contrôles (Figure R4Aa-c). En ligne avec les données obtenues en 2018 par microscopie électronique, les cellules n'exprimant

RESULTATS

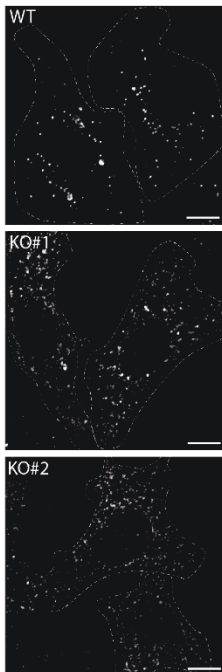
plus MOSPD2 présentent plus de contacts E-E (Figure R4Ad) (Di Mattia et al. 2018). De plus, ces endosomes sont très dispersés et possèdent également une structure plus tubulaire que leur homologue WT (Figure R4Aa et données non montrées).

Afin de confirmer l'augmentation du nombre d'endosomes tardifs, j'ai utilisé un deuxième marqueur de ces structures, un lipide initialement nommé acide lysobisphosphatidique (LBPA ; maintenant nommé bis(monoacylglycero)phosphate (BMP)) (Figure R4Ba) (Kobayashi et al. 1998). Contrairement à LAMP1 qui décore la surface des LE, le LBPA est retrouvé à l'intérieur de ces organites de manière non uniforme. Malgré cela, on observe tout de même une hausse du nombre d'endosomes positifs au LBPA dans les cellules déficientes en MOSPD2, confirmant ainsi les résultats obtenus précédemment avec LAMP1 (Figure R4Bb).

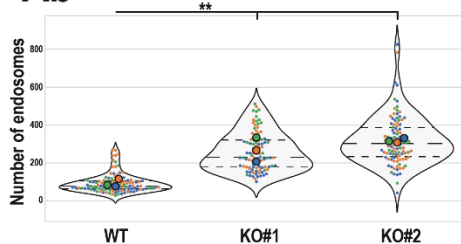
RESULTATS

Aa

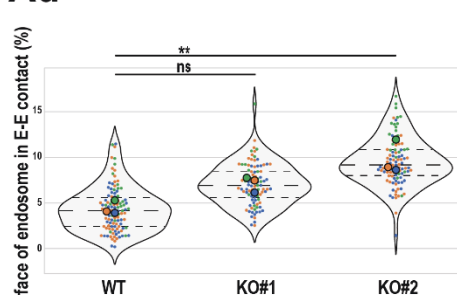
LAMP1



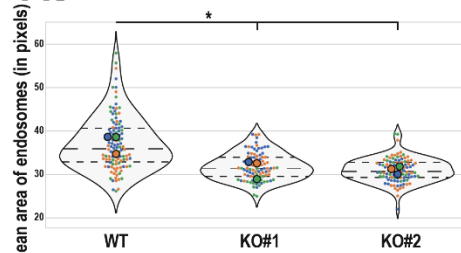
Ab



Ad

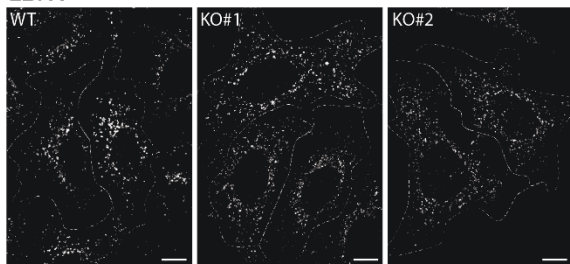


Ac



Ba

LBPA



Bb

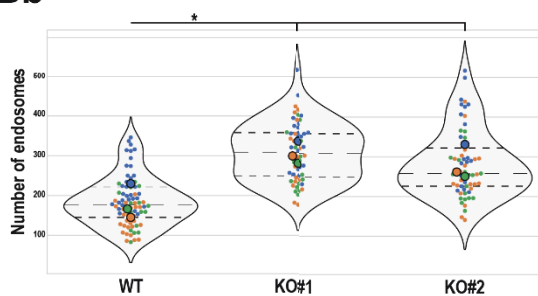


Figure R4. La perte d'expression de MOSPD2 induit une altération des endosomes tardifs.

(A) Quantification par immunofluorescence des endosomes tardifs par marquage endogène de LAMP1 dans les cellules HeLa WT ou MOSPD2 KO#1 et KO#2. (Aa) Images représentatives des expériences de quantification des objets LAMP1 par IF. Représentations en superplot des quantifications du nombre d'endosomes (Ab), de leur taille moyenne (Ac) et de la surface moyenne en contact entre endosomes (Ad). n=3 expériences, incluant 308 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

(B) Quantification par immunofluorescence des endosomes tardifs par marquage endogène de LBPA dans les cellules HeLa WT ou MOSPD2 KO#1 et KO#2. (Ba) Images d'IF représentatives de la quantification LBPA. (Bb) Superplot représentant le nombre d'objets LBPA. n=3 expériences, incluant 201 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

Barres d'échelle: 10 μ m. Les cellules sont délimitées par un trait pointillé blanc.

Représentation en superplot avec violinplot: les points à bord noir correspondent aux valeurs d'expériences alors que les points sans bordure correspondent aux valeurs par cellule. Chaque expérience indépendante est représentée par une couleur différente. Les traits en pointillés du violinplot correspondent aux quartiles (*i.e.* 25%, 50%, 75%). Les tests statistiques sont réalisés sur les moyennes d'expériences.

ns: non significatif; *: p-value < 0.05; **: p-value < 0.01

Les endosomes précoces ont également été quantifiés grâce à un marquage de la protéine EEA1 (Figure R5Aa). Contrairement aux endosomes tardifs, aucune modification liée au nombre (panel Ab), taille ou contact E-E (panel Ac et Ad), n'est associée à la perte d'expression de MOSPD2 pour les endosomes précoces.

RESULTATS

En conclusion, la perte d'expression de MOSPD2 entraîne des changements morphologiques des endosomes tardifs qui sont plus petits et nombreux, sans pour autant impacter les endosomes précoces. Ces données suggèrent que cette protéine est capable d'altérer la dynamique des endosomes tardifs, ce qui pourrait avoir des conséquences sur la fonction de ces organites.

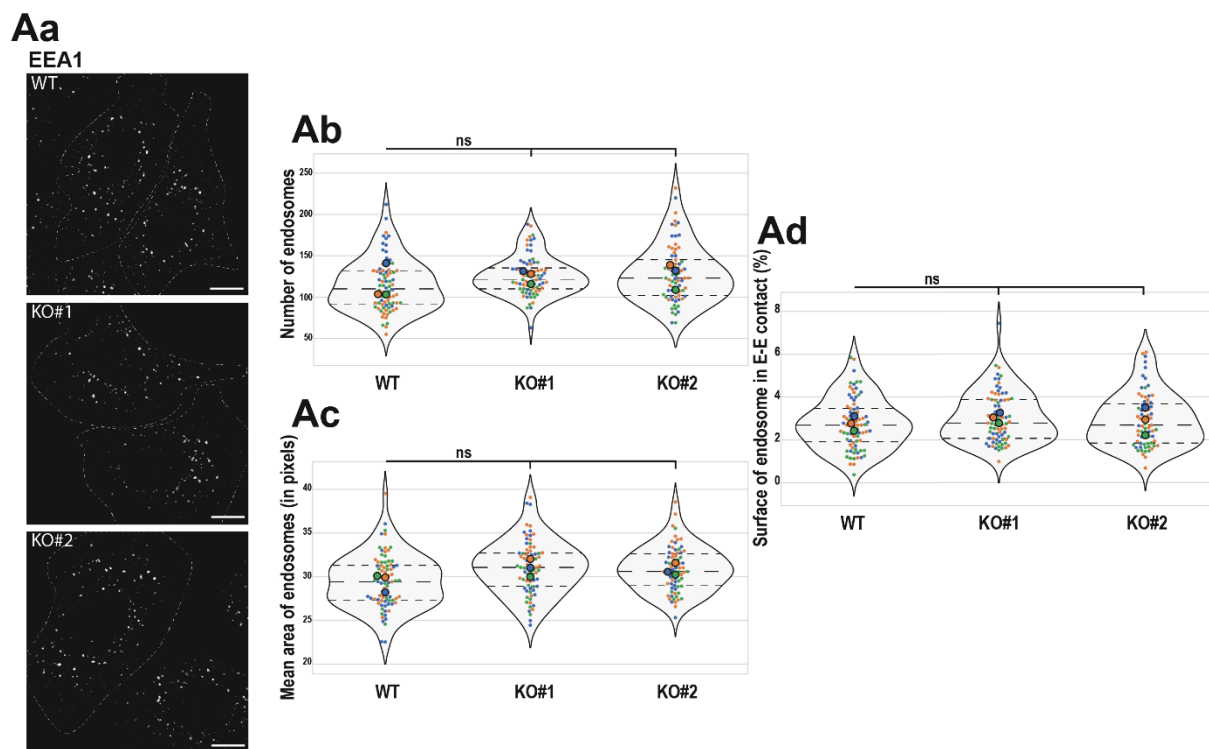


Figure R5. La perte d'expression de MOSPD2 n'induit pas d'altération morphologique des endosomes précoces.

(A) Quantification par immunofluorescence des endosomes précoces par marquage endogène de EEA1 dans les cellules HeLa WT ou MOSPD2 KO#1 et KO#2. (Aa) Images représentatives des expériences de quantification des objets EEA1 par IF. Représentations en superplot des quantifications du nombre d'endosomes (Ab), de leur taille moyenne (Ac) et de la surface moyenne en contact entre endosomes (Ad). n=3 expériences, incluant 229 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

Barres d'échelle: 10 µm. Les cellules sont délimitées par un trait pointillé blanc.

Représentation en superplot avec violinplot: les points à bord noir correspondent aux valeurs d'expériences alors que les points sans bordure correspondent aux valeurs par cellule. Chaque expérience indépendante est représentée par une couleur différente. Les traits en pointillés du violinplot correspondent aux quartiles (i.e. 25%, 50%, 75%). Les tests statistiques sont réalisés sur les moyennes d'expériences.

ns: non significatif

b. Quel est l'impact de MOSPD2 sur l'activité hydrolytique des endosomes tardifs ?

Le système endosomal tardif correspond à une classe hétérogène d'organites, comprenant les endosomes matures (ou MVBs), les endolysosomes et les lysosomes (Barral et al. 2022). Ces organites sont liés entre eux par un cycle de maturation allant des endosomes

RESULTATS

matures jusqu'aux lysosomes, en passant par état intermédiaire appelé endolysosomes. Ce cycle régule la capacité de dégradation de matériel endogène et exogène, où les endolysosomes correspondent aux compartiments les plus actifs (Bright, Davis, and Luzio 2016). Au vu des résultats obtenus, démontrant une altération morphologique importante des LE, j'ai voulu regarder les capacités de dégradation de ces organites. Afin d'explorer l'impact fonctionnel de MOSPD2 sur le système endosomal tardif, j'ai analysé l'acidité et les capacités hydrolytiques de ces organites grâce au LysoTracker Red DND-99 et au DQ-Red BSA respectivement.

Le LysoTracker est une sonde correspondant à une base faible, ayant de l'affinité pour les compartiments acides. Cette sonde est couramment utilisée afin de marquer les endosomes tardifs. De manière pratique, le LysoTracker est ajouté dans le milieu de culture à 100nM, environ 15min avant fixation. Un co-marquage de LysoTracker et de LAMP1 a été effectué dans les cellules HeLa WT et déficientes pour MOSPD2 afin d'évaluer le nombre d'endosomes tardifs acides (Figure R6A). Sur ces images, on observe une importante colocalisation du marquage LysoTracker avec le marqueur LAMP1 dans les cellules WT mais également dans les cellules MOSPD2 KO, malgré la hausse d'endosomes LAMP1⁺. Une quantification du nombre d'endosomes positifs au LysoTracker montre que les cellules n'exprimant plus MOSPD2 ont un nombre plus important de compartiments acides (Figure R6B). La taille des objets LysoTracker⁺ étant équivalentes entre les différentes lignées (données non montrées), ces résultats suggèrent une augmentation du volume de compartiments acides dans les cellules MOSPD2 KO. Il est possible que cette différence de taille observé entre le marquage LAMP1 et LysoTracker proviennent de la nature de ces marqueurs. LAMP1 correspond à un marqueur membranaire de surface et se retrouve donc sur les vésicules et tubules. A l'inverse LysoTracker, réagit avec les protons contenus dans le lumen, donnant un signal observable selon le volume du lumen et de son acidité. Le ratio surface/volume des tubules est supérieur à celui des vésicules, par conséquent, le LysoTracker serait moins apte à marquer ces structures tubulaires, comme observé sur l'agrandissement (Figure R6A).

L'acidité des endosomes tardifs est le plus souvent corrélée à leur capacité de dégradation dû à la présence d'enzymes actives à pH acide (Saftig and Klumperman 2009). J'ai donc évalué cette capacité d'hydrolyse en utilisant la sonde DQ-Red BSA. Cette sonde est capturée par endocytose de phase fluide et lorsqu'elle est dégradée dans un compartiment actif, celle-ci va émettre de la fluorescence (par phénomène de dequenching). Les lignées HeLa contrôles (WT) et n'exprimant plus MOSPD2 (KO#1 et KO#2) ont été incubées pendant 4 heures avec cette sonde à 10 µg/mL avant fixation. Ensuite, le nombre d'objets positifs pour la sonde DQ-Red BSA a été quantifié par immunofluorescence (Figure R6Ca). Comme observé avec la sonde LysoTracker, les lignées dépourvues de MOSPD2 présentent un plus

RESULTATS

grand nombre d'organites positifs pour la sonde DQ-Red BSA, en comparaison aux cellules sauvages (Figure R6Cb).

En résumé, la perte d'expression de MOSPD2 induit une augmentation du nombre de compartiments acides et hydrolytiques, correspondant probablement aux endolysosomes actifs. Ainsi, la protéine MOSPD2 est capable de moduler un aspect fonctionnel important des endosomes tardifs, qui est leur capacité hydrolytique. Ces données suggèrent que MOSPD2 est impliquée dans la maturation des endosomes tardifs et pourrait réguler la dynamique du cycle du système endosomal tardif.

RESULTATS

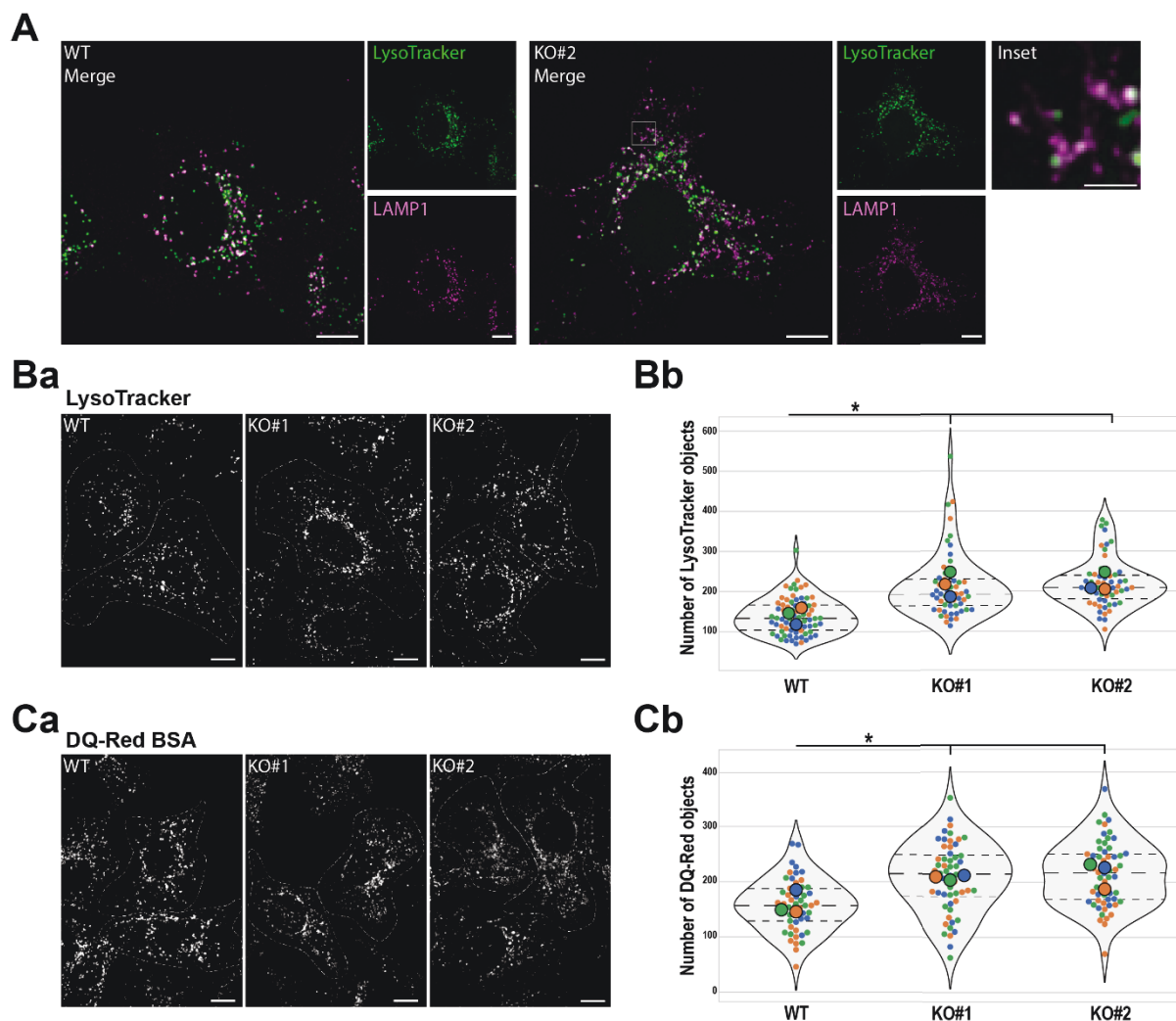


Figure R6. MOSPD2 régule le nombre d'endolysosomes actifs.

(A) Images d'immunofluorescence montrant un co-marquage LAMP1 (en magenta) et LysoTracker (en vert) dans des cellules HeLa WT ou MOSPD2 KO (KO#2). Le panel inset correspond au carré blanc sur le merge. Barres d'échelle: 10 μ m (2 μ m pour l'inset).

(B) Quantification par immunofluorescence des compartiments acides par marquage LysoTracker dans les cellules HeLa WT ou MOSPD2 KO#1 et KO#2. (Aa) Images représentatives des expériences de quantification des objets LysoTracker par IF. Représentations en superplot des quantifications du nombre d'objets LysoTracker (Ab). n=3 expériences, incluant 193 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

(C) Quantification par immunofluorescence des compartiments dégradatifs par marquage DQ-Red BSA dans les cellules HeLa WT ou MOSPD2 KO#1 et KO#2. (Ca) Images d'IF représentatives de la quantification d'objets DQ-Red. (Cb) Superplot représentant le nombre d'objets DQ-Red. n=3 expériences, incluant 169 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

Barres d'échelle: 10 μ m. Les cellules sont délimitées par un trait pointillé blanc.

Représentation en superplot avec violinplot: les points à bord noir correspondent aux valeurs d'expériences alors que les points sans bordure correspondent aux valeurs par cellule. Chaque expérience indépendante est représentée par une couleur différente. Les traits en pointillés du violinplot correspondent aux quartiles (i.e. 25%, 50%, 75%). Les tests statistiques sont réalisés sur les moyennes d'expériences.

*: p-value < 0.05

RESULTATS

c. Quel domaine de MOSPD2 est impliqué dans la régulation des endosomes tardifs ?

Après avoir confirmé l'importance de MOSPD2 dans l'homéostasie des endosomes tardifs, j'ai voulu comprendre comment MOSPD2 est capable de réguler ces organites. Pour cela, MOSPD2, sous forme sauvage ou mutante, a été réexprimé dans les cellules dépourvues de MOSPD2 (lignée KO#2), et le phénotype endosomal a été analysé par immunofluorescence. De manière pratique, j'ai quantifié le nombre et la taille moyenne des endosomes positifs au marqueur LAMP1 grâce à un processus d'image proche de celui précédemment utilisé (Figure R7).

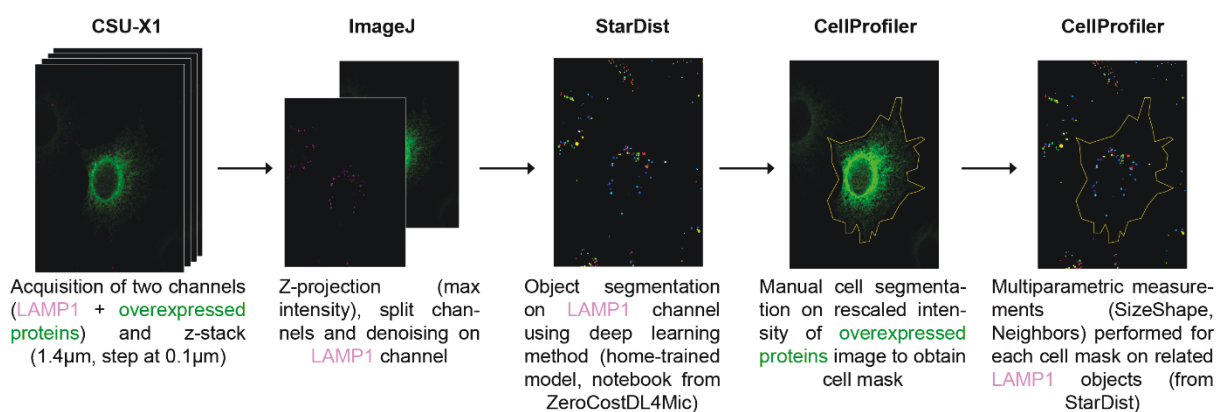


Figure R7. Etapes principales du processus d'analyse d'images pour la quantification des endosomes tardifs lors de la surexpression de protéines

Pour évaluer le rôle de chaque domaine de la protéine, j'ai utilisé 5 formes mutantes de MOSPD2 en plus de la forme sauvage (FL) (Figure R8A et B). Les mutants MOSPD2 Δ MSP et RD/LD sont incapables d'interagir avec des protéines à motif FFAT et donc de former des MCS (Di Mattia et al. 2018). Le mutant MOSPD2 Δ CRAL-TRIO et le mutant MOSPD2 W201E ne forment pas des contacts ER-LD (Zouiouich et al. 2022). Le mutant MOSPD2 AH- Δ CRAL-TRIO forme toujours ces contacts ER-LD mais ne régule pas le nombre de LDs. Comme observé auparavant, les cellules de la lignée déficiente pour MOSPD2 (MOSPD2 KO#2) présentent des endosomes plus nombreux et plus petits que les cellules WT (Figure R8Ca et Cb). Lorsque l'on réintroduit la forme sauvage de MOSPD2 (FL) dans ces cellules, le nombre et la taille des LE sont normalisés. En revanche, la surexpression des mutants MOSPD2 Δ MSP ou MOSPD2 RD/LD ne rétablit ni le nombre ni la taille des endosomes. Ces données suggèrent que le domaine MSP de MOSPD2 est indispensable à la fonction de MOSPD2 dans la régulation du système endosomal. A l'inverse, les mutations du domaine CRAL-TRIO (AH- Δ CRAL-TRIO et W201E) ou la délétion de ce dernier (Δ CRAL-TRIO) entraînent un retour à la normale du nombre d'endosomes. On retrouve également une hausse de la taille moyenne

RESULTATS

des endosomes mais à des degrés différents selon les formes mutantes du CRAL-TRIO. En effet, le mutant AH- Δ CRAL-TRIO induit la plus grande hausse de la taille des endosomes alors que le mutant W201E a un phénotype plus mitigé.

En conclusion, le domaine MSP de MOSPD2, et sa capacité de lier les motifs FFAT, sont nécessaires pour la fonction endosomale de MOSPD2, alors que le domaine CRAL-TRIO de la protéine ne semble pas requis.

RESULTATS

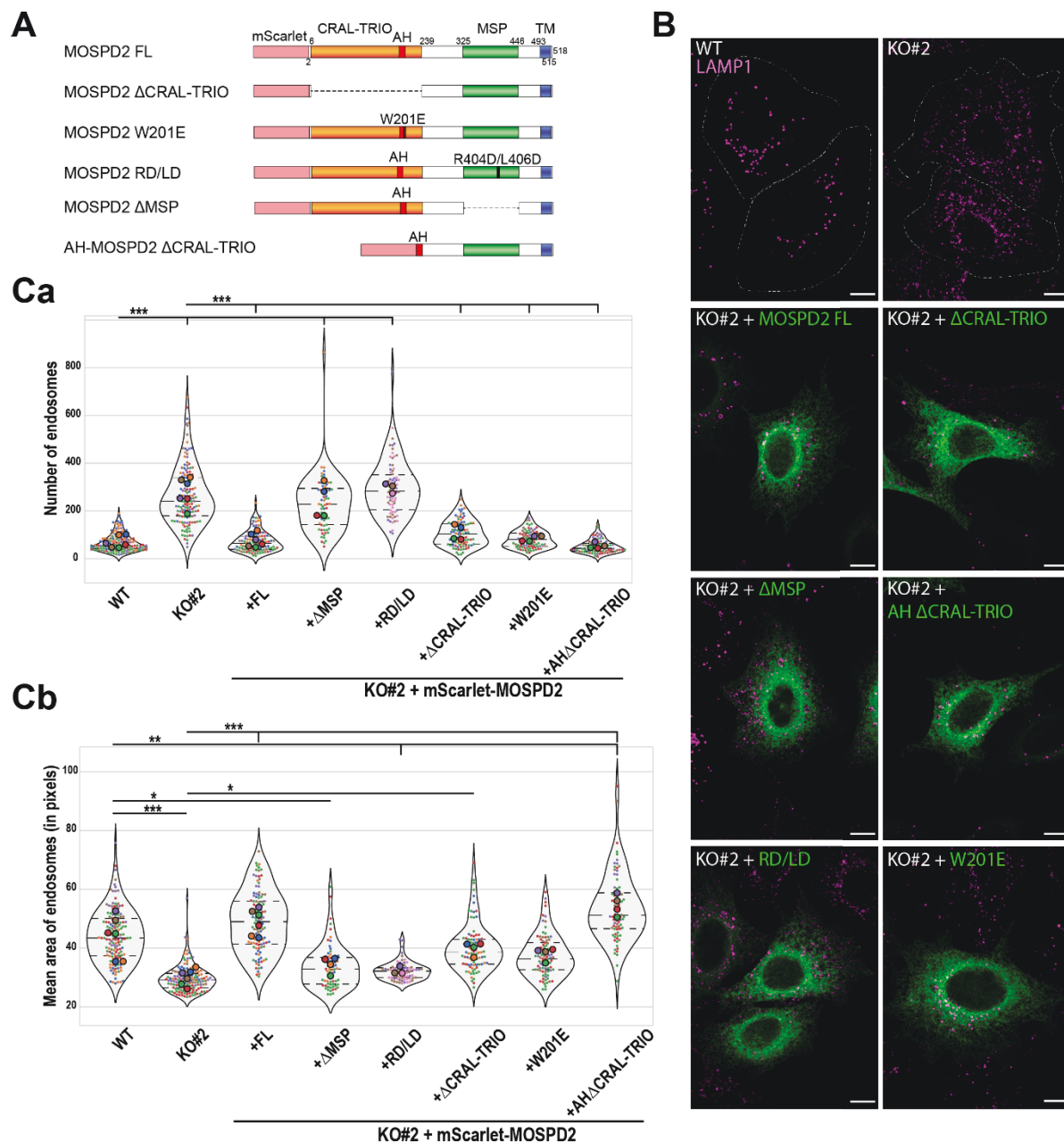


Figure R8. Le domaine MSP de MOSPD2 est nécessaire pour restaurer l'homéostasie des endosomes tardifs.

(A) Schéma représentant les différents mutants de MOSPD2 utilisés pour la quantification panel (B) et (C). FL: full length (forme entière)

(B) Images d'immunofluorescence représentatives des quantifications de LAMP1 panel (C). mScarlet-MOSPD2 (en vert) a été transfecté dans des cellules HeLa MOSPD2 KO (KO#2) puis les endosomes tardifs ont été quantifiés par un marquage LAMP1 (en magenta).

(C) Superplot représentant les quantifications du nombre d'endosomes tardifs (LAMP1) (Ca) et de leur taille moyenne (Cb). n=3-6 expériences, incluant 813 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

Barres d'échelle: 10 μm. Les cellules sont délimitées par un trait pointillé blanc.

Représentation en superplot avec violinplot: les points à bord noir correspondent aux valeurs d'expériences alors que les points sans bordure correspondent aux valeurs par cellule. Chaque expérience indépendante est représentée par une couleur différente. Les traits en pointillés du violinplot correspondent aux quartiles (i.e. 25%, 50%, 75%). Les tests statistiques sont réalisés sur les moyennes d'expériences.

*: p-value < 0.05; **: p-value < 0.01; ***: p-value < 0.001

RESULTATS

d. Peut-on retrouver le même phénotype endosomal en réduisant l'expression de protéines partenaires de MOSPD2 ?

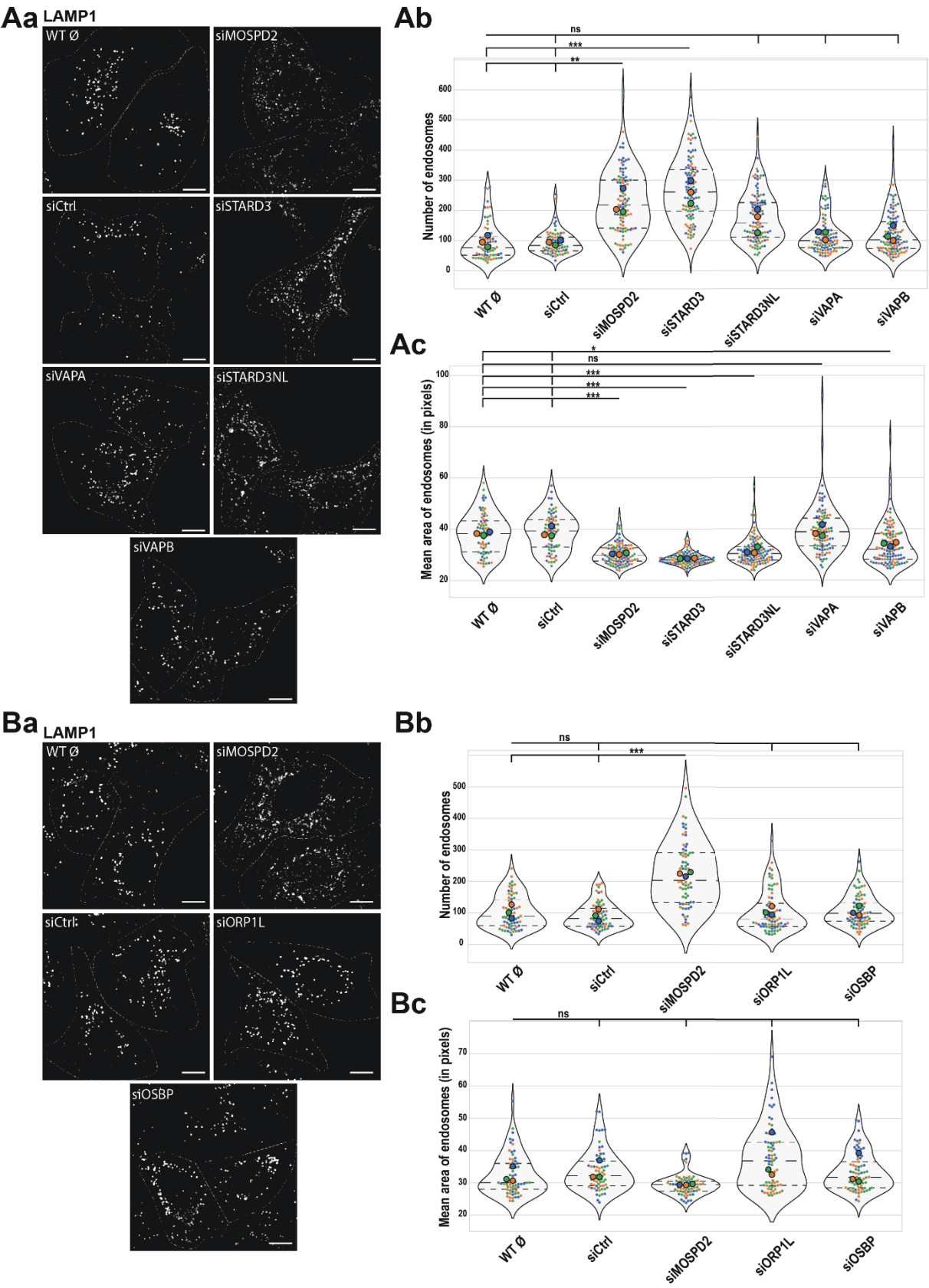
MOSPD2 permet la formation et le maintien de contacts ER-E en jouant un rôle d'ancrage. Le domaine MSP de cette protéine interagit avec les motifs FFAT de protéines présentes à la surface des endosomes comme STARD3, STARD3NL, ORP1L ou OSBP (Di Mattia et al. 2018; 2020). Ces partenaires endosomaux de MOSPD2 sont impliqués dans le transport de lipides (à l'exception de STARD3NL), et plus particulièrement du cholestérol (Meng et al. 2020). Comme le domaine MSP de MOSPD2 et sa capacité de lier les motifs FFAT sont indispensables pour la fonction endosomale de MOSPD2, on peut imaginer que ce rôle de MOSPD2 soit lié à la formation d'un complexe protéique avec un de ses partenaires des endosomes. Il est donc possible que le phénotype observé dans les cellules déficientes pour MOSPD2 soit retrouvé dans des cellules n'exprimant plus le partenaire de MOSPD2 impliqué dans la biologie des endosomes.

Afin de tester cette hypothèse, j'ai inhibé l'expression de STARD3, STARD3NL, ORP1L et OSBP dans des cellules HeLa WT par interférence ARN (knock-down ; KD) en utilisant des cocktails de siRNA (small interfering RNA), conditions nommées respectivement siSTARD3, siSTARD3NL, siORP1L et siOSBP (Figure R9Aa et Bb). Puisque VAPA et VAPB jouent un rôle d'ancrage similaire à celui de MOSPD2 et interagissent avec les mêmes protéines, j'ai aussi ciblé l'expression de VAPA et VAPB avec des siRNA afin de tester si le phénotype endosomal observé est spécifique à MOSPD2. De plus, j'ai ciblé l'expression de MOSPD2 avec des siRNA (condition siMOSPD2) comme contrôle positif du phénotype endosomal. Pour ces expériences, j'ai quantifié le nombre et la taille des endosomes LAMP1⁺. On peut voir que les cellules siMOSPD2 ont un phénotype similaire à celui des lignées déficientes en MOSPD2 précédemment utilisées (lignées MOSPD2 KO#1 et KO#2), avec une hausse du nombre d'endosomes et une diminution de leur taille (panel Ab et Ac). Ce même phénotype est retrouvé dans les cellules siSTARD3, alors que les cellules siSTARD3NL présentent un défaut seulement sur la taille des endosomes et non leur nombre. A l'opposé, la perte d'expression d'ORP1L et OSBP (Figure R9B) n'affecte pas le nombre et la taille des endosomes. De manière intéressante, la perte d'expression de VAPA ou de VAPB ne change pas le nombre d'endosomes et induit une légère baisse de leur taille dans le cas des cellules siVAPB.

En résumé, la perte d'expression de STARD3 et de MOSPD2 conduit à un phénotype similaire consistant en une augmentation du nombre d'endosomes tardifs et une réduction de leur taille. Ainsi, STARD3 pourrait être un partenaire privilégié de MOSPD2 ayant un impact sur la maturation des endosomes tardifs. De plus, ces données confirment que le phénotype endosomal est spécifique de MOSPD2, suggérant que les protéines VAPs et MOSPD2

RESULTATS

possèdent des fonctions différentes, probablement liées à des capacités d'interaction différentes.



RESULTATS

Figure R9. La perte d'expression de STARD3 induit une altération morphologique des endosomes tardifs équivalente à celle de MOSPD2.

(A) Quantification par immunofluorescence des endosomes tardifs par marquage endogène de LAMP1 dans des cellules HeLa WT KD par siRNAs pour MOSPD2, STARD3, STARD3NL, VAPA et VAPB. (Aa) Images représentatives des expériences de quantification des objets LAMP1 par IF. Superplot des quantifications du nombre d'endosomes (Ab) et de leur taille moyenne (Ac) des cellules HeLa WT KD. n=3 expériences, incluant 672 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

(B) Quantification par immunofluorescence des endosomes tardifs par marquage endogène de LAMP1 dans des cellules HeLa WT KD par siRNAs pour MOSPD2, ORP1L et OSBP. (Ba) Images représentatives des expériences de quantification des objets LAMP1 par IF. Représentation en superplot des quantifications du nombre d'endosomes (Bb) et de leur taille moyenne (Bc) des cellules HeLa WT KD. n=3 expériences, incluant 348 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

Barres d'échelle: 10 μ m. Les cellules sont délimitées par un trait pointillé blanc.

Représentation en superplot avec violinplot: les points à bord noir correspondent aux valeurs d'expériences alors que les points sans bordure correspondent aux valeurs par cellule. Chaque expérience indépendante est représentée par une couleur différente. Les traits en pointillés du violinplot correspondent aux quartiles (i.e. 25%, 50%, 75%). Les tests statistiques sont réalisés sur les moyennes d'expériences.

ns: non significatif; *: p-value < 0.05; **: p-value < 0.01; ***: p-value < 0.001

e. Est-ce que la présence de STARD3 est nécessaire pour que MOSPD2 puisse réguler les endosomes tardifs ?

Les résultats obtenus précédemment nous montrent que les cellules n'exprimant plus MOSPD2 ou STARD3 possèdent un phénotype associé aux endosomes tardifs très similaire. Ces deux protéines étant capables d'interagir ensemble, ces données suggèrent que le phénotype observé dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2 provient de l'absence de formation du complexe STARD3:MOSPD2 à l'interface entre le ER et les endosomes.

Dans le but d'évaluer si la présence de STARD3 est nécessaire à la fonction de MOSPD2 au niveau des endosomes, j'ai réalisé des expériences de sauvetage de la fonction de MOSPD2 en absence de STARD3. Pour cela, j'ai inhibé l'expression de STARD3 grâce à des ARN interférents (siSTARD3) dans une lignée déficiente pour MOSPD2 (MOSPD2 KO#2) (Figure R10Aa) puis j'ai réexprimé soit un marqueur du ER (mScarlet-ER) comme contrôle, soit la protéine MOSPD2 (mScarlet-MOSPD2). J'ai ensuite quantifié le nombre et la taille moyenne des endosomes tardifs via un marquage de LAMP1 (Figure R10Ab et Ac). Tout d'abord, la perte d'expression de STARD3, STARD3NL ou de ORP1L dans une lignée déficiente pour MOSPD2 ne change pas le nombre d'endosomes ni leur taille (condition contrôle mScarlet-ER). Il n'y a pas d'effet cumulatif associé à la perte d'expression de MOSPD2 et STARD3, confortant l'hypothèse que le phénotype observé dépend de l'interaction entre ces deux protéines. La réintroduction de MOSPD2 dans les cellules MOSPD2 KO#2 siCtrl restaure le nombre d'endosomes et leur taille, comme précédemment observé (Figure R8). Ce retour à la normale est également observé en absence de STARD3NL et ORP1L (conditions siSTARD3NL et siORP1L) pour le nombre d'endosomes. En revanche, la surexpression de MOSPD2 dans les cellules siSTARD3 n'induit aucune normalisation des

RESULTATS

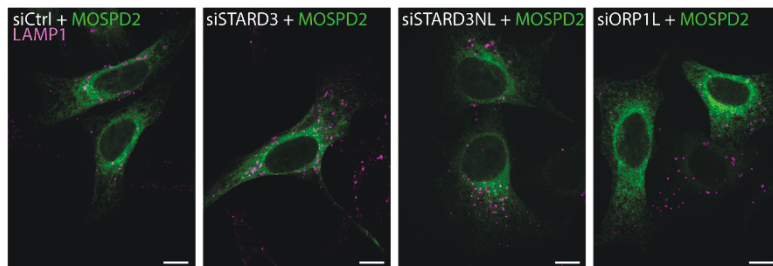
deux paramètres étudiés. Ces résultats nous montrent que la capacité de MOSPD2 à réguler les endosomes tardifs dépend de la présence de STARD3. L'interaction entre ces deux protéines semblent bien responsable du défaut associé aux endosomes tardifs.

Des données *in vitro* publiées récemment par l'équipe montrent que MOSPD2 possède une meilleure affinité pour STARD3 que les deux protéines VAPs (Di Mattia et al. 2020). Il est probable que cette différence d'affinité *in vitro* puisse se traduire *in vivo* par une interaction plus stable de STARD3 avec MOSPD2 qu'avec les protéines VAPs. Afin d'évaluer l'affinité des protéines VAPs et de MOSPD2 pour STARD3 dans un modèle cellulaire, j'ai effectué des expériences de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP ; Fluorescence Recovery After Photobleaching) (Figure R10B). Cette technique de microscopie consiste à blanchir le signal de fluorescence en envoyant des impulsions laser à haute énergie sur une zone choisie de l'échantillon, puis à observer le retour de la fluorescence au cours du temps ; ce retour de fluorescence correspond au déplacement de molécules fluorescentes de la zone de l'échantillon non blanchie vers la zone blanchie. Pour cette expérience, j'ai coexprimé GFP-VAPA, GFP-VAPB ou GFP-MOSPD2 avec mCherry-STARD3 dans des cellules COS-7. Ces cellules sont de grande taille et allongées, ce qui facilite l'analyse des données de FRAP. Dans notre cas, la surexpression des VAPs et MOSPD2 avec STARD3 conduit à un enrichissement de ces protéines au niveau de contacts ER-E (Di Mattia et al. 2018; Alpy et al. 2013) (panel Ba). Le signal GFP au niveau des contacts a été photoblanchi ; l'observation du retour de fluorescence de la GFP dans la zone photoblanchie rend compte de la vitesse de diffusion des protéines GFP⁺ vers les contacts ER-E. La stabilité du signal GFP au cours du temps a été contrôlée sur des endosomes non photoblanchis et reste identique sur la durée de l'expérience (données non montrées). Au bout de 20 secondes, le niveau de fluorescence de la protéine GFP-MOSPD2 revient à environ 55% du signal initial, alors que l'intensité de fluorescence de GFP-VAPA et GFP-VAPB reviennent à respectivement 70% et 80% du niveau initial (panel Bb). De même, la moitié du signal initial est récupérée en environ 3 secondes pour GFP-VAPA et 2 secondes pour GFP-VAPB, contre environ 14 secondes pour GFP-MOSPD2. Ces données montrent que la protéine MOSPD2 diffuse moins vite que les protéines VAPs au niveau de ces contacts ER-E créés par STARD3, ce qui suggère que MOSPD2 forme des interactions plus stables avec STARD3.

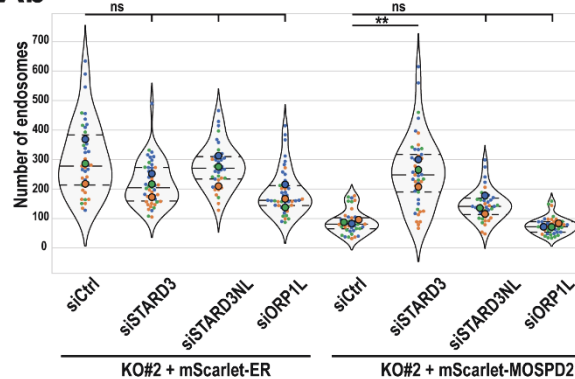
En conclusion, la régulation du système endosomal par MOSPD2 dépend de la présence de STARD3. De plus, MOSPD2 semble posséder une meilleure affinité *in vivo* pour STARD3 que les protéines VAPs. Cette différence d'affinité d'interaction pourrait expliquer pourquoi les protéines VAPs ne sont pas capables de compenser la perte de MOSPD2 au niveau endogène. Ces données confortent l'hypothèse selon laquelle MOSPD2 interagit préférentiellement avec STARD3 et que le défaut endosomal observé dans les cellules déficientes en MOSPD2 provient de la perte de fonction du complexe MOSPD2:STARD3.

RESULTATS

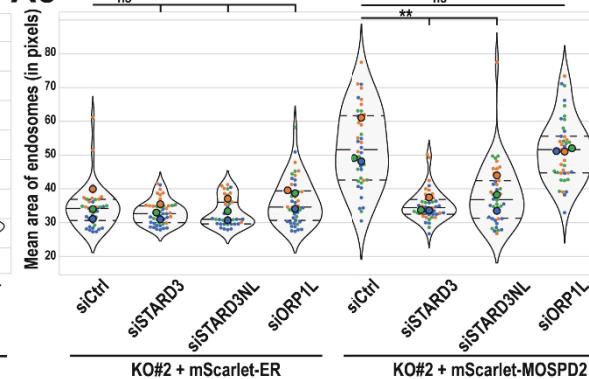
Aa KO#2



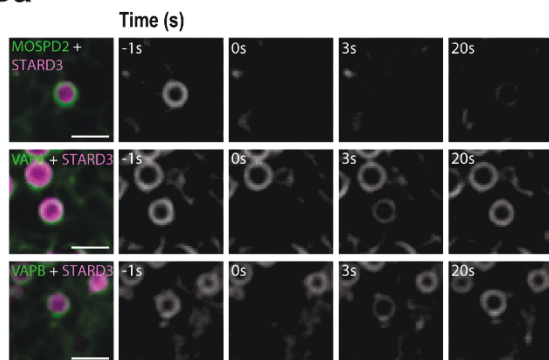
Ab



Ac



Ba



Bb

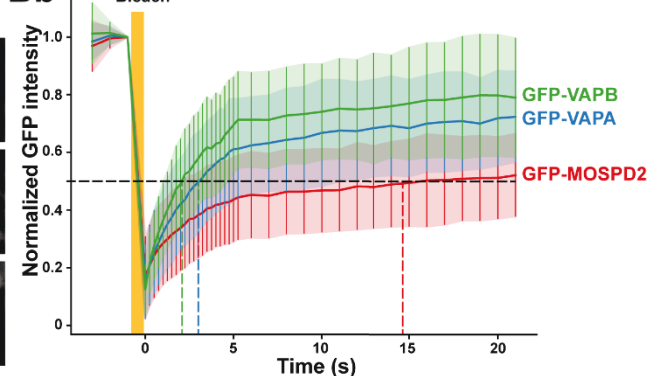


Figure R10. La présence de STARD3 est indispensable pour que MOSPD2 puisse restaurer l'homéostasie des endosomes tardifs.

(A) Quantification par immunofluorescence des endosomes tardifs par marquage endogène de LAMP1 dans les cellules HeLa MOSPD2 KO (KO#2) et KD par siRNA pour STARD3, STARD3NL ou ORP1L. Un marqueur du RE (mScarlet-ER) ou MOSPD2 (mScarlet-MOSPD2) ont ensuite été exprimés transitoirement. (Aa) Images d'immunofluorescence de la quantification LAMP1 (en magenta) montrant les conditions surexprimant MOSPD2 (en vert). Superplot des quantifications du nombre d'endosomes (Ab) et de leur taille moyenne (Ac). n=3 expériences, incluant 335 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

(B) Analyse de FRAP dans des cellules COS-7 surexprimant mCherry-STARD3 avec GFP-VAPA ou GFP-MOSPD2. Le signal GFP est photoblanchi à t0, des images sont prises toutes les 250ms pendant 5s puis toutes les 1s pendant 15s. (Ba) Images représentatives de zones blanches pour chaque condition. Barres d'échelles: 2 μm. (Bb) Représentation en lineplot avec écart-type des résultats de FRAP. n=2 expériences, incluant 41 endosomes pour GFP-VAPA, 23 pour GFP-VAPB et 47 pour GFP-MOSPD2. Les traits pointillés correspondent au temps nécessaire pour récupérer 50% du signal initial.

Barres d'échelle: 10 μm. Les cellules sont délimitées par un trait pointillé blanc.

Représentation en superplot avec violinplot: les points à bord noir correspondent aux valeurs d'expériences alors que les points sans bordure correspondent aux valeurs par cellule. Chaque expérience indépendante est représentée par une couleur différente. Les traits en pointillés du violinplot correspondent aux quartiles (i.e. 25%, 50%, 75%). Les tests statistiques sont réalisés sur les moyennes d'expériences.

ns: non significatif; **: p-value < 0.01

RESULTATS

f. Est-ce que la perte d'expression de MOSPD2 ou de STARD3 affecte la localisation du cholestérol endosomal ?

STARD3 est une protéine connue pour ses capacités à transférer du cholestérol entre le ER et les endosomes via son domaine START (Wilhelm et al. 2017). Sa surexpression entraîne la formation d'endosomes matures riches en cholestérol que l'on retrouve au niveau de vésicules intraluminales. Au vu du rôle de STARD3 et de la dérégulation du système endosomal tardif dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2 ou STARD3, j'ai voulu investiguer la localisation du cholestérol dans ces organites dans les modèles de perte de fonction. En effet, la perte du complexe MOSPD2:STARD3 pourrait avoir des conséquences sur la redistribution du cholestérol intracellulaire car STARD3 ne pourrait plus remplir sa fonction de transfert de cholestérol entre le ER et les LE, via son domaine START.

Pour étudier cette hypothèse, j'ai effectué un co-marquage de LAMP1 et du cholestérol marqué avec la filipin, une sonde fluorescente d'origine naturelle se liant au cholestérol libre. Par immunofluorescence, j'ai pu analyser l'intensité de la filipin par cellule, au niveau des endosomes tardifs, et ainsi comparer la distribution endosomale du cholestérol entre différentes conditions (Figure R11).

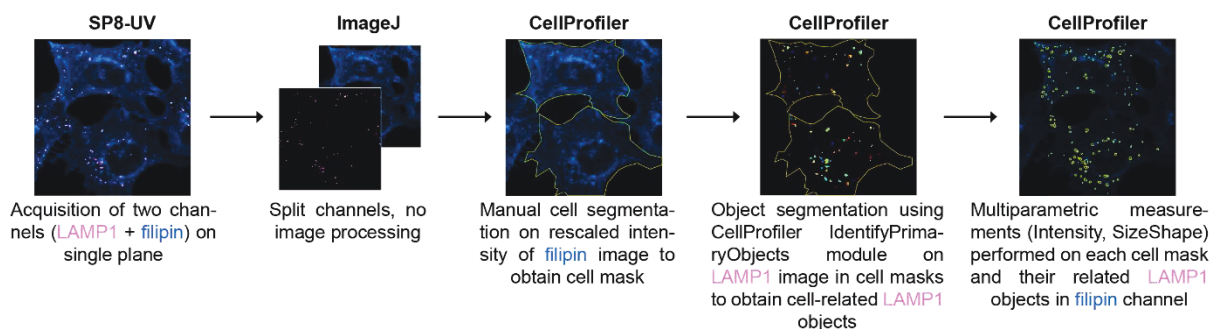


Figure R11. Etapes-clés du processus d'analyse d'images pour la quantification de la sonde filipin.

Dans un premier temps, j'ai analysé la distribution du cholestérol dans les cellules HeLa WT et les cellules déficientes pour MOSPD2 (Figure R12Aa et Ab). Dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2, le marquage du cholestérol avec la filipin est plus hétérogène et présente une texture plus granuleuse. Ces pics d'intensité de fluorescence de la sonde colocalisent pour la plupart d'entre eux avec le marquage LAMP1. La mesure d'intensité de la filipin confirme que le cholestérol est augmenté au niveau des endosomes tardifs dans les lignées déficientes en MOSPD2 (panel Ac). Ces données montrent que la protéine MOSPD2 est impliquée dans la régulation du transport du cholestérol endosomal.

De manière intrigante, les endosomes observés par microscopie électronique dans des cellules siMOSPD2 sont peu denses aux électrons avec quelques vésicules intraluminales de

RESULTATS

petites tailles (Di Mattia et al. 2018). Cette hausse de marquage filipin au niveau endosomal pourrait provenir d'une accumulation de cholestérol à la membrane limitante des endosomes plutôt que d'une accumulation de cholestérol dans les membranes intraluminales. Afin de tester cette hypothèse, j'ai transfecté des cellules HeLa WT et les deux lignées dépourvues de MOSPD2 avec un plasmide exprimant la protéine mCherry-D4H (Figure R12B). La D4H est un domaine modifié d'une toxine liant le cholestérol, la perfringolysine O (PFO) (Maekawa and Fairn 2015). Cette mutation permet à cette sonde de se lier à une membrane à partir d'une concentration en cholestérol de 20mol % contre 30mol % pour la forme sauvage du domaine (Maekawa 2017). Dans les cellules WT, la sonde mCherry-D4H présente un marquage majoritairement diffus. En revanche, un marquage ponctiforme/circulaire pouvant correspondre à des endosomes était plus fréquemment observé dans les lignées déficientes pour MOSPD2 (KO#1 et KO#2), suggérant une accumulation de cholestérol à la membrane limitante d'organites.

L'expression de la sonde étant assez faible, j'ai utilisé une autre méthode afin de confirmer la nature de ces organites et l'accumulation de cholestérol intracellulaire. Je me suis servi de la protéine recombinante GFP-D4 afin de marquer les membranes riches en cholestérol, combiné à différents marqueurs d'endosomes tardifs dans le but de confirmer la nature des organites (Figure R12C). Pour cela, les cellules sont fixées à la paraformaldéhyde (PFA) puis perméabilisées grâce à un bain rapide dans de l'azote liquide. Cette méthode permet de perméabiliser la membrane plasmique tout en limitant les dommages associés à la membrane des endosomes (Lim et al. 2019). La sonde GFP-D4 est ensuite ajoutée après blocage à la BSA, puis fixée par PFA. Des marquages supplémentaires de la protéine LAMP1 avec des anticorps, et des compartiments acides (endolysosomes/lysosomes) avec la sonde LysoTracker ont été effectués afin de visualiser les endosomes tardifs. Dans les cellules HeLa WT, on observe un marquage de la surface d'une minorité d'endosomes tardifs par la sonde GFP-D4, que ce soit pour des endosomes positifs à LAMP1 ou au LysoTracker (panel Ca). La sonde GFP-D4 semble globalement marquer peu d'endosomes tardifs. En revanche, dans la lignée déficiente pour MOSPD2 (KO#2), le marquage de la sonde D4 est plus présent, plus intense et se retrouve à la surface de nombreux endosomes tardifs positifs à LAMP1 ou au LysoTracker. Ces données confirment que les organites marqués par la mCherry-D4H dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2 sont bien des endosomes tardifs, positifs à LAMP1 et/ou LysoTracker.

De manière intrigante, la GFP-D4 semble mieux colocaliser avec la sonde LysoTracker que le marquage LAMP1. Il est possible que la perméabilisation au bain d'azote limite l'accès de l'anticorps anti-LAMP1 à son épitope, alors que la sonde LysoTracker, incubée sur cellules vivantes, diffuse librement aux endosomes (Duvvuri et al. 2004). Pour cette raison, j'ai utilisé un masque LysoTracker plutôt que LAMP1 afin de quantifier l'intensité du marquage de la

RESULTATS

sonde GFP-D4 aux endosomes tardifs via un processus d'analyse proche de celui utilisé pour la filipin (panel Cb). On observe sur cette quantification que l'intensité du signal GFP-D4 aux endosomes tardifs est bien plus importante dans les cellules déficientes en MOSPD2 comparées aux cellules sauvages. Ces données confirment que la perte d'expression de MOSPD2 induit une relocalisation du cholestérol au niveau de la membrane limitante des endosomes tardifs.

RESULTATS

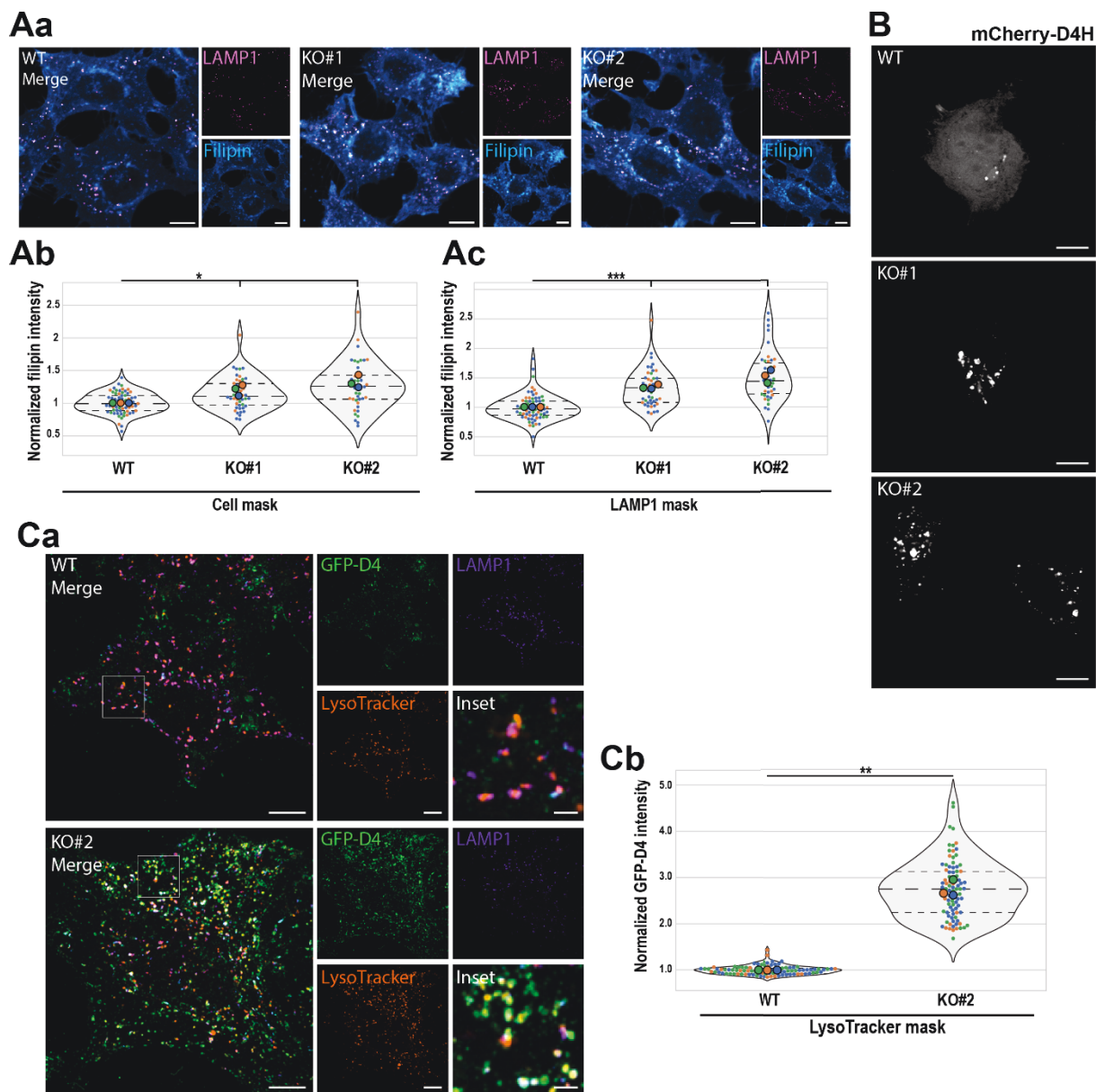


Figure R12. La perte d'expression de MOSPD2 induit une hausse de cholestérol à la surface des endosomes tardifs.

(A) Quantification par immunofluorescence du cholestérol par marquage filipin dans les endosomes tardifs (LAMP1) dans les cellules HeLa WT ou MOSPD2 KO (KO#1 et KO#2). (Aa) Images représentatives de la quantification de la filipin (en cyan) dans les endosomes tardifs (en magenta). Barres d'échelle: 10 μ m. Quantifications représentées en superplot de l'intensité de la filipin dans un masque des cellules (Ab) ou dans un masque correspondant aux endosomes tardifs (Ac). n=3 expériences, incluant 158 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

(B) Images d'immunofluorescence correspondant à des cellules HeLa WT ou MOSPD2 KO (KO#1 et KO#2) exprimant transitoirement la sonde mCherry-D4H. Barres d'échelle: 10 μ m.

(C) Quantification de la sonde recombinante GFP-D4 marquant les membranes riches en cholestérol dans des cellules HeLa WT ou MOSPD2 KO (KO#2). (Ca) Images d'immunofluorescence montrant la sonde GFP-D4 (en vert) avec un co-marquage des endosomes tardifs via LAMP1 (en violet) et LysoTracker (en orange). Le panel inset correspond au carré blanc sur le merge. Barres d'échelle: 10 μ m (2 μ m pour l'inset). (Cb) Superplot représentant la quantification de l'intensité de la sonde GFP-D4 au niveau des endosomes tardifs (masque LysoTracker). n=3 expériences, incluant 186 cellules; paired T-test.

*: p-value < 0.05; **: p-value < 0.01; ***: p-value < 0.001

RESULTATS

À la suite de ces résultats, j'ai voulu savoir si la relocalisation du cholestérol est présente également dans les cellules dépourvues de protéine STARD3. En effet, la perte d'expression de MOSPD2 et STARD3 conduit au même phénotype endosomal, soit une hausse du nombre de LE et une diminution de leur taille (Figure R9). De plus, la régulation des LE par MOSPD2 nécessite la présence de STARD3 (Figure R10). Au vu de ces données, il est probable que la redistribution du cholestérol aux endosomes soit aussi partagée avec STARD3 de manière spécifique. Pour tester cette hypothèse, la localisation subcellulaire du cholestérol a été analysée à l'aide de la filipin en combinaison avec un marquage LAMP1, dans différentes cellules HeLa traitées par un cocktail de siRNA. L'expression de la protéine STARD3 a été inhibée (siSTARD3), de même que MOSPD2 utilisée ici comme contrôle positif (siMOSPD2). L'expression de STARD3NL (siSTARD3NL) et VAPA (siVAPA) ont également été réduites (Figure R13Aa et Ab). Ces deux protéines ne partagent pas le même phénotype endosomal LAMP1 que MOSPD2 et STARD3 (Figure R9) et servent ici de contrôles négatifs. Comme attendu, la perte d'expression de MOSPD2 induit une hausse du marquage filipin au niveau des endosomes tardifs (Figure R13Ac). Le même phénomène est observé dans les cellules n'exprimant plus STARD3. En revanche, les lignées siSTARD3NL et siVAPA ne présentent pas d'altérations significatives de la localisation du cholestérol en comparaison aux deux lignées contrôles siCtrl et WT. Ces résultats suggèrent une redistribution du cholestérol au niveau des endosomes tardifs suite à la perte d'expression de STARD3.

Afin de savoir si la redistribution du cholestérol dans les cellules n'exprimant plus STARD3 provient, comme pour les cellules déficientes en MOSPD2, d'une accumulation à la membrane limitante des endosomes, la sonde recombinante GFP-D4 a été utilisée (Figure R13B). Le même protocole que décrit précédemment a été appliqué, c'est-à-dire un co-marquage GFP-D4 avec la sonde LysoTracker (panel Ba). La lignée déficiente en MOSPD2 (KO#2) montrait une accumulation de la sonde GFP-D4 aux endosomes tardifs (Figure R12C). Ce même phénotype est retrouvé dans les cellules siMOSPD2, avec un marquage intense à la GFP-D4 aux endosomes et également une hausse du nombre de compartiments acides, positifs au LysoTracker (Figure R13Bb et Bc). Par ailleurs, cette expérience montre que les cellules dépourvues de STARD3 présentent plus de LE positifs pour la sonde LysoTracker que les cellules contrôles ; ce phénotype est similaire à celui des cellules n'exprimant plus MOSPD2 (panel Bb). De plus, une forte accumulation de la sonde GFP-D4 à la surface des endosomes tardifs est observée, confirmant l'enrichissement en cholestérol vu grâce la sonde filipin (panel Bc). La relocalisation du cholestérol à la membrane limitante des endosomes tardifs associée à la perte d'expression de MOSPD2 ou de STARD3 a également été observée dans une autre lignée cellulaire, les cellules HCC1954 (carcinome du sein HER2+) (données non montrées). La régulation du cholestérol endosomal médiée par MOSPD2 et STARD3 n'est

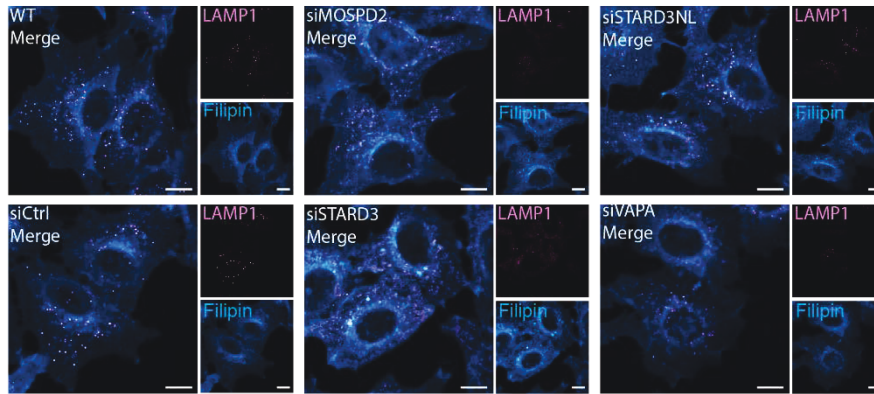
RESULTATS

donc pas une fonction spécifique aux cellules HeLa mais semble être un mécanisme partagé par d'autres types cellulaires.

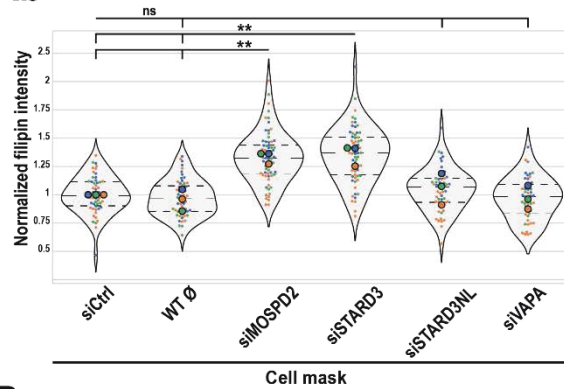
En conclusion, MOSPD2 et STARD3 sont toutes les deux impliquées dans la régulation du cholestérol endosomal et des modèles de perte de fonction de ces deux protéines présentent le même phénotype de redistribution subcellulaire du cholestérol. L'impact sur le cycle de maturation des endosomes tardifs semble également être un point commun à ces deux protéines, comme observé par l'augmentation de compartiments acides. STARD3 étant un transporteur de cholestérol, ces données suggèrent que l'interaction de cette protéine avec MOSPD2, en plus de former des contacts ER-E, permet de réguler le cholestérol à cette interface. D'autres expériences sont nécessaires afin de comprendre si le défaut de localisation du cholestérol à la membrane limitante est la cause ou une conséquence des altérations morphologiques et fonctionnelles des endosomes tardifs observées dans les cellules déficientes en MOSPD2 ou STARD3.

RESULTATS

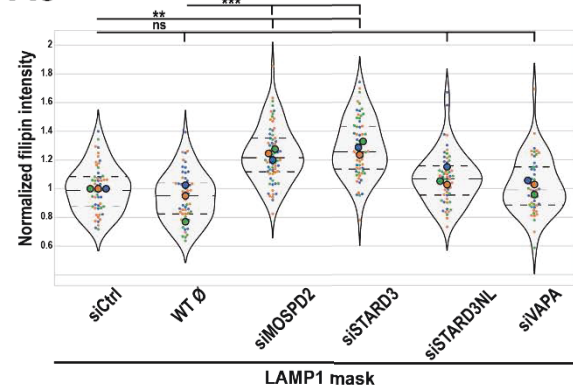
Aa



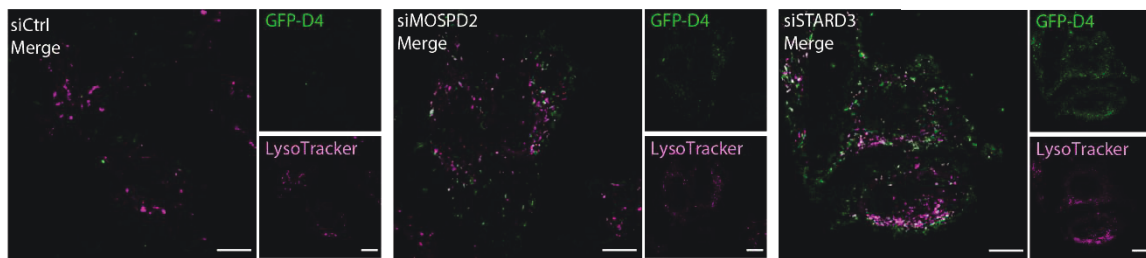
Ab



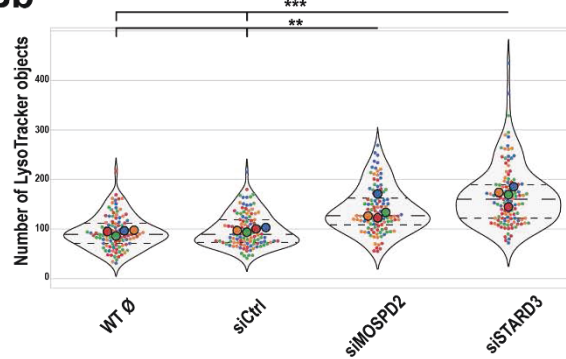
Ac



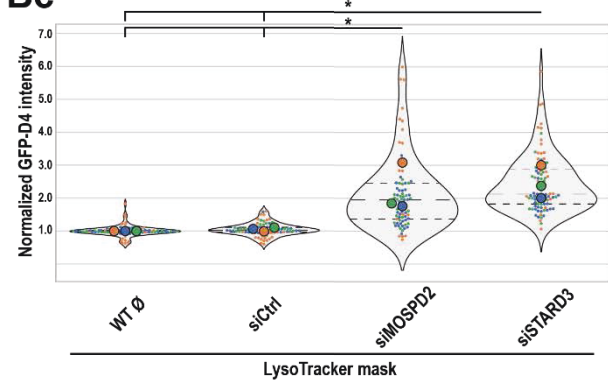
Ba



Bb



Bc



RESULTATS

Figure R13. La perte d'expression de MOSPD2 ou de STARD3 entraîne une relocalisation subcellulaire du cholestérol à la membrane limitante des endosomes tardifs.

(A) Quantification par immunofluorescence du cholestérol par marquage filipin dans les endosomes tardifs (LAMP1) dans les cellules HeLa WT knocked-down par siRNAs pour MOSPD2, STARD3, STARD3NL et VAPA. (Aa) Images représentatives de la quantification de la filipin (en cyan) dans les endosomes tardifs (en magenta). Barres d'échelle: 10 μ m. Quantifications représentées en superplot de l'intensité de la filipin dans un masque des cellules (Ab) ou dans un masque correspondant aux endosomes tardifs (Ac). n=3 expériences, incluant 349 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

(B) Quantification par immunofluorescence du cholestérol aux endosomes tardifs et des compartiments acides dans les cellules HeLa WT knocked-down par siRNAs pour MOSPD2 et STARD3. (Ba) Images d'immunofluorescence montrant le co-marquage GFP-D4 (en vert) avec LysoTracker (en magenta) réalisé dans les conditions siCtrl, siMOSPD2 et siSTARD3 (Bb) Superplot représentant la quantification du nombre d'objets LysoTracker dans les cellules HeLa WT KD. n=4 expériences, incluant 448 cellules. 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey. (Bc) Représentation en superplot de la quantification de l'intensité de la sonde recombinante GFP-D4 au niveau des endosomes tardifs marqués au LysoTracker. n=3, incluant 334 cellules. 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

ns: non significatif; *: p-value < 0.05; **: p-value < 0.01; ***: p-value < 0.001

g. Peut-on outrepasser l'absence de MOSPD2 en forçant l'interaction des VAPs avec STARD3 ?

Comme vu précédemment avec les données de FRAP, les complexes MOSPD2:STARD3 sont plus stables que les complexes VAPs:STARD3 (Figure R10B). Cette différence d'affinité concorde avec les données obtenues *in vitro*, démontrant une meilleure affinité de STARD3 avec MOSPD2 (Di Mattia et al. 2020). Cette différence d'interaction pourrait expliquer la diminution des sites de contact ER-E précédemment observée dans les cellules siMOSPD2 (Di Mattia et al. 2018). En effet, au niveau endogène, STARD3 interagirait de manière préférentielle avec MOSPD2, permettant ainsi la formation de contacts ER-E et un transport de cholestérol. Dans ce cas, l'inhibition de l'expression de MOSPD2 conduirait à la perte des contacts ER-E médiés par STARD3 et un défaut de transport de cholestérol. Lors des interactions médiées par leur domaine MSP, les protéines VAPs et MOSPD2 jouent des rôles similaires correspondant à une fonction d'ancrage et pourraient donc, théoriquement, se substituer entre elles. Cette redondance entre les VAPs et MOSPD2 suggère que la perte de MOSPD2 pourrait être compensée par l'interaction forcée de VAPA et VAPB avec STARD3.

Afin de tester la redondance d'interaction des protéines VAPs et MOSPD2, j'ai forcé la formation de MCS entre le ER et les endosomes tardifs en surexprimant différentes formes de STARD3 dans des cellules n'exprimant plus MOSPD2 (Figure R14Aa). Le nombre et la taille des endosomes tardifs ont été quantifiés par IF grâce à un marquage LAMP1 (panel Ab et Ac). La forme STARD3 FL correspond à la forme sauvage et est capable de normaliser le nombre d'endosomes. La taille des endosomes est cependant fortement augmentée, un phénotype connu de la surexpression de STARD3 (Alpy et al. 2013). Le mutant STARD3 SP/DA correspond à une forme active du motif phospho-FFAT de STARD3, faisant de nombreux contacts ER-E (Di Mattia et al. 2020). Cette protéine mutante se comporte comme la forme

RESULTATS

sauvage, c'est-à-dire normalise le nombre d'endosomes et augmente leur taille moyenne. En revanche, le mutant STARD3 S209A, une forme inactive du phospho-FFAT, incapable d'interagir avec les domaines MSP, n'est pas en mesure de normaliser le nombre d'endosomes. Ces données nous montrent que le phénotype associé à la perte d'expression de MOSPD2 peut être régulé en forçant les MCS médiés par STARD3. Le mécanisme moléculaire effectué par MOSPD2 à cette interface ER-E est partagée par les protéines VAPs, en revanche ces protéines diffèrent par leur affinité d'interaction pour STARD3.

Dans les cellules HeLa, les protéines VAPs sont retrouvés en excès à la surface du ER en comparaison à leurs partenaires d'interaction tels que STARD3 (Nagaraj et al. 2011). La surexpression de VAPA ne devrait donc pas modifier l'équilibre d'interaction ER-E. Afin de confirmer cela, VAPA a été surexprimé dans une lignée déficiente en MOSPD2 (KO#2). Comme attendu, cette surexpression de VAPA ne permet pas de normaliser le nombre d'endosomes tardifs (ni leur taille) (panel Ab et Ac). Ces résultats confortent l'idée que les protéines VAPs ne sont pas le facteur limitant dans la formation de ces MCS et que le phénotype associé aux cellules déficientes en MOSPD2 provient d'un défaut de contacts ER-E médiés par le complexe MOSPD2:STARD3.

h. Peut-on normaliser les endosomes tardifs dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2 en forçant le transport de cholestérol hors des endosomes ?

En forçant la formation de contacts ER-E médiés par STARD3 dans des cellules déficientes en MOSPD2, le phénotype endosomal est modifié (Figure R14). Ces données nous montrent que restaurer l'interface ER-E est important pour réguler les endosomes tardifs dans ces cellules. En revanche, ces résultats ne nous permettent pas de savoir quel mécanisme moléculaire au niveau des structures ER-E est responsable de la normalisation du phénotype endosomal. Au vu de l'accumulation de cholestérol aux endosomes tardifs précédemment observé dans les cellules déficientes en MOSPD2 et STARD3 (Figure R13) et du rôle de transport de cholestérol médié par cette dernière, il est probable que les contacts ER-E médiés par STARD3 régulent les endosomes en diminuant leur composition en cholestérol. Afin de tester l'importance du transport de cholestérol dans la régulation des LE, un mutant de STARD3 n'ayant plus le domaine START (Δ START), permettant le transport de cholestérol, a été exprimé dans des cellules déficientes en MOSPD2. Les endosomes tardifs ont ensuite été quantifiés par IF via un marquage LAMP1 (Figure R14Aa). Ce mutant Δ START est incapable de transporter du cholestérol mais forme toujours des contacts ER-E (Alpy et al. 2013). De manière intéressante, ce mutant n'est pas capable de normaliser complètement le nombre d'endosomes positifs à LAMP1 dans les cellules déficientes en MOSPD2, mais présente un

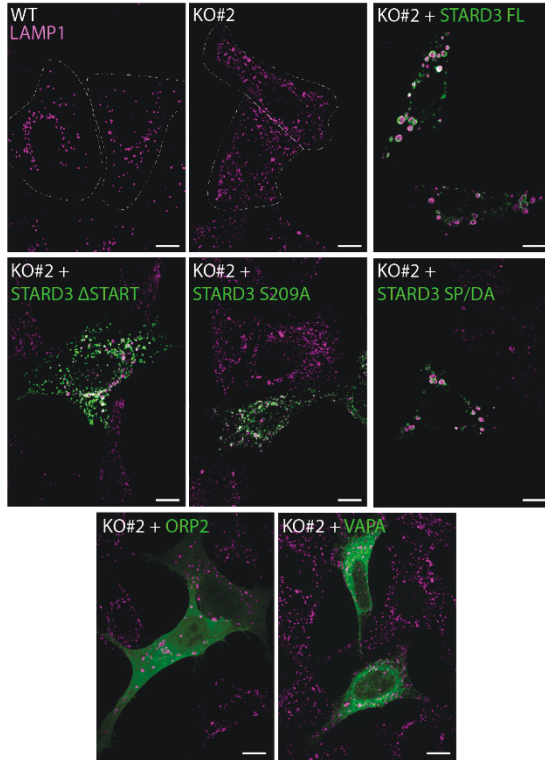
RESULTATS

sauvetage partiel (panel Ab). De même, en comparaison à la protéine STARD3 FL, la forme mutante Δ START n'induit pas une hausse importante de la taille des endosomes (panel Ac). Ces résultats suggèrent que la fonction de transport de cholestérol médié par STARD3 pourrait être importante dans la régulation des endosomes tardifs. Afin d'étudier plus en profondeur l'importance de la régulation du cholestérol sur le défaut endosomal, la protéine ORP2 a été surexprimée. ORP2 est une protéine cytosolique, impliquée dans un contre-échange de lipides cholestérol/PI(4,5)P2 des endosomes vers la membrane plasmique (H. Wang et al. 2019). La perte d'expression de ORP2 entraîne une accumulation de cholestérol à la membrane limitante des endosomes tardifs (Takahashi et al. 2021). Cette protéine est donc impliquée dans l'efflux de cholestérol des endosomes tardifs. Sa surexpression dans les cellules déficientes en MOSPD2 entraîne un retour à la normale du nombre d'endosomes et une augmentation de leur taille (Figure R14Ab et Ac). La normalisation du nombre d'endosomes semble en revanche moins importante que lors de la surexpression de la forme entière de STARD3 (FL). Ces données suggèrent que le défaut endosomal observé dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2 peut être compensé par l'export de cholestérol hors des endosomes tardifs.

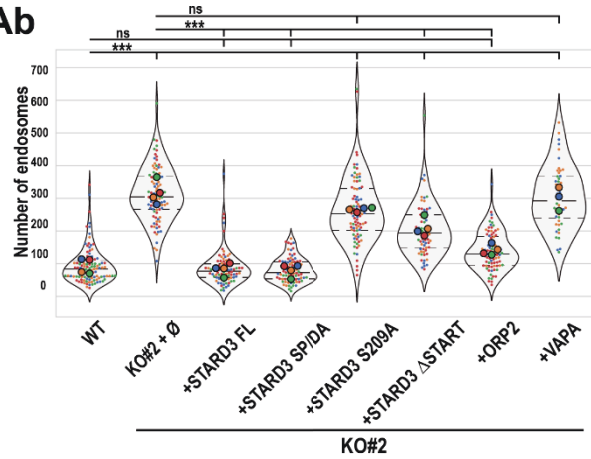
En conclusion, la perte d'expression de MOSPD2 peut être compensée en forçant l'interaction des protéines VAPs avec les endosomes tardifs via la surexpression de STARD3. Ces données soulignent que contrairement à son interaction avec STARD3 qui semble spécifique, le rôle effectué par MOSPD2 aux contacts ER-E ne l'est pas. MOSPD2 et les VAPs sont des protéines ayant un mécanisme d'interaction redondant mais qui se distinguent par leur affinité d'interaction à une même protéine. De plus, l'accumulation de cholestérol observée à la membrane limitante semble jouer un rôle important dans ce phénotype endosomal. En effet, la surexpression du mutant Δ START ne permet pas de corriger complètement le défaut endosomal malgré la hausse de contacts ER-E alors que l'expression de la protéine ORP2, capable d'exporter le cholestérol hors des endosomes, normalise ce phénotype.

RESULTATS

Aa



Ab



Ac

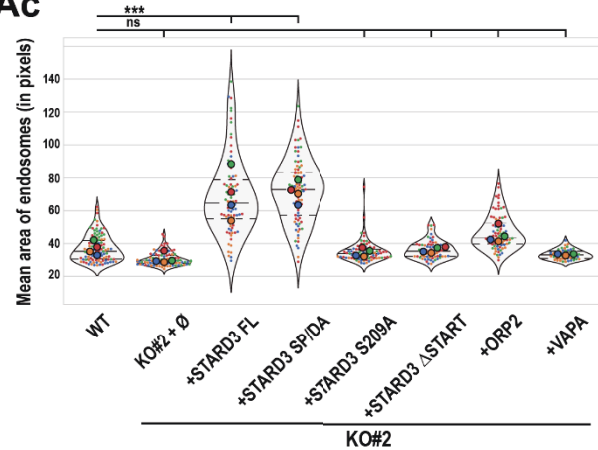


Figure R14. L'absence de MOSPD2 peut être compensée en surexprimant des protéines partenaires fonctionnelles.

(A) Quantification par immunofluorescence des endosomes tardifs par marquage endogène de LAMP1 dans les cellules HeLa WT transfectées avec différentes formes de STARD3, ORP2 ou VAPA. (Aa) Images d'immunofluorescence représentant les expériences de quantification avec LAMP1 (en magenta) et les protéines surexprimées (en vert). Représentations en superplot des quantifications du nombre d'endosomes (Ab) et de leur taille moyenne (Ac). n=3-4 expériences, incluant 656 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

Barres d'échelle: 10 μm. Les cellules sont délimitées par un trait pointillé blanc.

Représentation en superplot avec violinplot: les points à bord noir correspondent aux valeurs d'expériences alors que les points sans bordure correspondent aux valeurs par cellule. Chaque expérience indépendante est représentée par une couleur différente. Les traits en pointillés du violinplot correspondent aux quartiles (i.e. 25%, 50%, 75%). Les tests statistiques sont réalisés sur les moyennes d'expériences.

ns: non significatif; ***: p-value < 0.001

i. Quelles sont les conséquences fonctionnelles de la surexpression de MOSPD2 et de STARD3 sur les endosomes tardifs ?

La perte d'expression de MOSPD2 et de STARD3 induit une augmentation du nombre de compartiments acides et hydrolytiques, correspondant essentiellement aux endolysosomes (Bright, Davis, and Luzio 2016). A l'inverse, la surexpression de STARD3 induit la formation d'endosomes matures, riches en cholestérol et en vésicules/membranes intraluminales (Alpy et al. 2013; Wilhelm et al. 2017). STARD3 favorise la formation d'endosomes matures, ce qui

RESULTATS

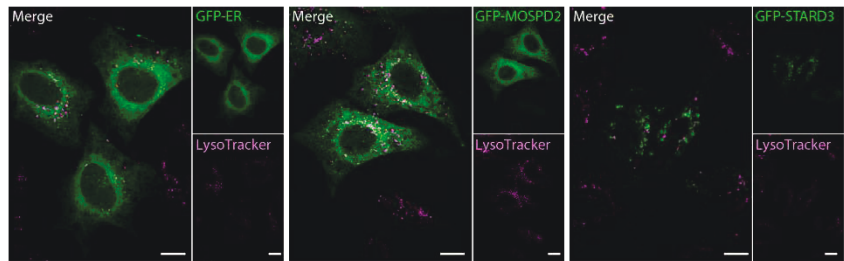
pourrait se faire au dépend de la maturation vers les endolysosomes. Pour tester cette hypothèse, j'ai surexprimé STARD3, MOSPD2 ou un marqueur du ER dans des HeLa WT et j'ai quantifié le nombre de compartiments acides (LysoTracker, Figure R15A) et le nombre de compartiments hydrolytiques (DQ-Red BSA, Figure R15B) correspondant aux endolysosomes actifs.

Dans les cellules exprimant GFP-MOSPD2, on trouve des niveaux comparables d'endosomes positifs au LysoTracker et au DQ-Red par rapport à la condition contrôle GFP-ER (panel Ab et Bb). La surexpression de MOSPD2 ne change donc pas le nombre d'endolysosomes ni leur taille (panel Ac et Bc). En revanche, les cellules exprimant GFP-STARD3 présentent une baisse du nombre de compartiments acides et hydrolytiques, avec une tendance à la hausse de leur taille moyenne. Malgré cette hausse, l'aire totale représentée par les compartiments LysoTracker⁺ et DQ-Red⁺ reste plus faible dans les cellules exprimant GFP-STARD3 que dans les autres conditions (données non montrées).

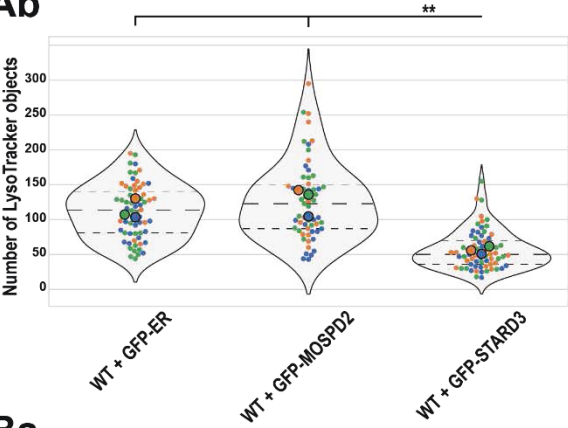
Ces résultats montrent que la formation d'endosomes matures médiée par STARD3 se fait au dépend des endolysosomes. Il existe donc un équilibre dynamique entre les différents compartiments du système endosomal tardif qui peut être contrebalancé par la surexpression de STARD3. En revanche, la surexpression de MOSPD2 ne modifie pas cet équilibre. Ces données supportent l'idée selon laquelle MOSPD2 n'est pas le facteur limitant dans la formation de ces contacts ER-E et que sa capacité à réguler les endosomes tardifs dépend de la disponibilité de STARD3.

RESULTATS

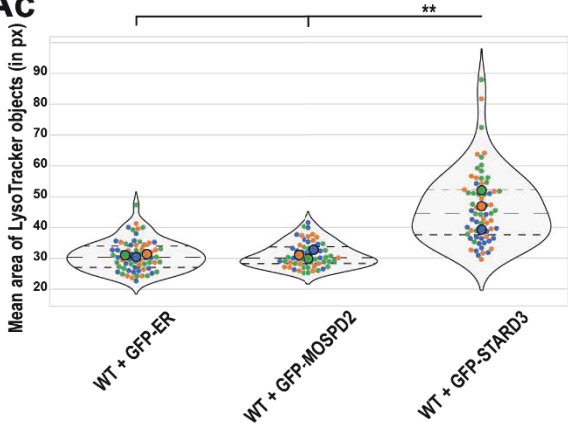
Aa



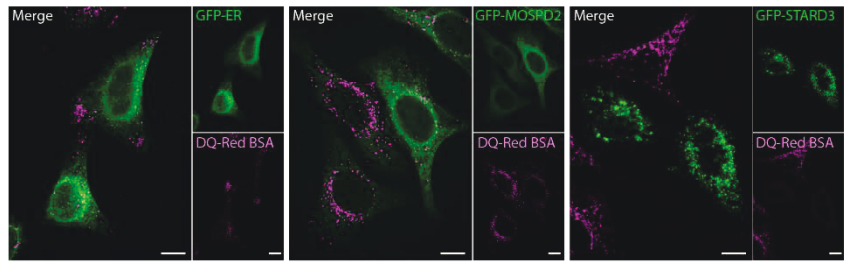
Ab



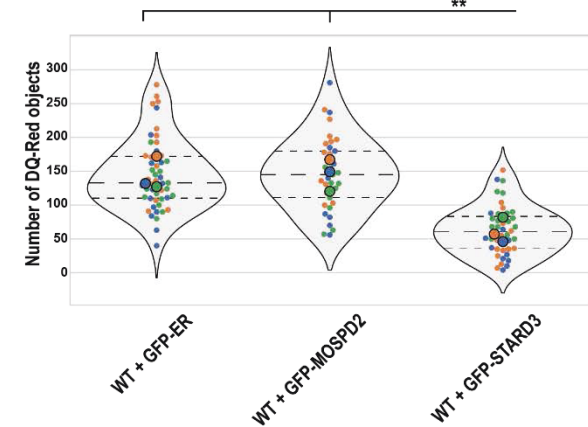
Ac



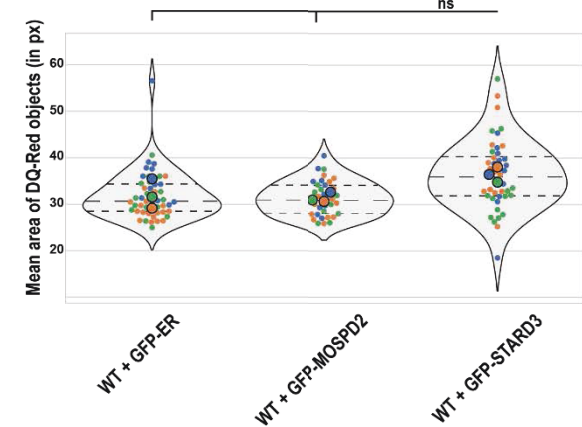
Ba



Bb



Bc



RESULTATS

Figure R15. La surexpression de STARD3 et non de MOSPD2 induit une altération fonctionnelle des endosomes tardifs.

(A) Quantification par immunofluorescence des compartiments acides par marquage LysoTracker dans des cellules HeLa WT surexprimant un marqueur du RE, MOSPD2 ou STARD3 (Aa) Images d'immunofluorescence montrant le co-marquage LysoTracker (en magenta) et les protéines GFP- surexprimées (en vert). Représentations en superplot démontrant le nombre d'objets LysoTracker (Ab) et leur taille moyenne (Ac). n=3 expériences, incluant 193 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

(B) Quantification par immunofluorescence des compartiments hydrolytiques par marquage DQ-Red BSA dans des cellules HeLa WT surexprimant un marqueur du RE, MOSPD2 ou STARD3 (Ba) Images d'immunofluorescence montrant le co-marquage DQ-Red (en magenta) et les protéines GFP- surexprimées (en vert). Représentations en superplot démontrant le nombre d'objets DQ-Red (Bb) et leur taille moyenne (Bc). n=3 expériences, incluant 132 cellules; 1way ANOVA avec test de comparaison de Tukey.

Barres d'échelle: 10 μ m. Les cellules sont délimitées par un trait pointillé blanc.

Représentation en superplot avec violinplot: les points à bord noir correspondent aux valeurs d'expériences alors que les points sans bordure correspondent aux valeurs par cellule. Chaque expérience indépendante est représentée par une couleur différente. Les traits en pointillés du violinplot correspondent aux quartiles (*i.e.* 25%, 50%, 75%). Les tests statistiques sont réalisés sur les moyennes d'expériences.

ns: non significatif; **: p-value < 0.01

RESULTATS

C. Matériel et méthodes

Liste des réactifs d'immunofluorescence :

Réactif	Référence	Protocole d'utilisation
anti-LAMP1	H4A3 DSHB	Dilution au 1/100 dans du PBS BSA 1%, incubation 2h à température ambiante
anti-EEA1	610457 BD Biosciences	Dilution au 1/1000 dans du PBS BSA 1%, incubation 2h à température ambiante
anti-LBPA	6C4	Dilution à 10µg/mL dans du PBS BSA 1%, incubation 2h à température ambiante (Kobayashi et al. 1998)
anti-STARD3	pAbMLN64-Nt-1611	Dilution au 1/2000 dans du PBS BSA 1%, incubation 2h à température ambiante (Alpy et al. 2001)
GFP-D4	Produite au laboratoire (Ohno-Iwashita et al. 2004)	Dilution au 1/200 dans du PBS BSA 1%, incubation 2h à température ambiante (Wilhelm et al. 2017)
DQ-Red BSA	D12051 Thermo	Dilution à 10µg/mL (stock dans du PBS 1X) dans un milieu de culture cellulaire, incubation 4h avant fixation
LysoTracker Red DND-99	L7528 Thermo	Dilution à 100nM dans un milieu de culture cellulaire, incubation 15min avant fixation
Filipin	F-9765 Sigma	Dilution à 0.1mg/mL dans du DMSO, incubation 30min après fixation (Wilhelm et al. 2017)

Protocole immunofluorescence

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre pendant 48h, puis fixées à la paraformaldéhyde (PFA) 4% dans du PBS pendant 15min. Ensuite, les cellules sont lavées au PBS 1X deux fois, puis perméabilisées à la filipin pendant 20min. Après deux lavages au PBS 1X, les cellules sont incubées dans du PBS BSA 1% pendant 30min avant ajout des anticorps primaires (anti-EEA1, anti-LAMP1, anti-STARD3) pendant 2h à température ambiante. Pour l'anticorps anti-LBPA, les cellules ont été perméabilisées avec de la digitonine à 50µg/mL pendant 5min. Les cellules sont ensuite lavées deux fois, puis les anticorps secondaires (gamme AlexaFluor de Thermo Fisher) sont ajoutés pendant 1h. Après deux lavages, les lamelles sont montées sur lame dans du ProLong Gold (Invitrogen).

Marquage filipin

RESULTATS

Le même protocole d'immunofluorescence est utilisé que précédemment. En revanche, après ajout des anticorps secondaires, les cellules sont incubées à nouveau avec de la filipin pendant 30min avant le montage sur lame.

Marquage GFP-D4

Contrairement au protocole d'immunofluorescence précédent, les cellules sont perméabilisées par un rapide bain d'azote (environ 1sec). Après blocage dans du PBS BSA 1% pendant 30min, la GFP-D4 est ajoutée pendant 2h à température ambiante. Puis, après deux lavages de 5min au PBS 1X, les cellules sont fixées à nouveau avec de la PFA 4% dans du PBS pendant 10min. Les cellules peuvent ensuite être montées sur lame ou bien un protocole d'IF classique peut être appliqué afin d'ajouter un marquage par anticorps.

Perméabilisation sur cellules vivantes

Pour la visualisation des sondes GFP-PA, les cellules ont été incubées dans de la saponine 0.1% dans du PBS pendant 1min avant fixation à la PFA. Le protocole d'IF est ensuite le même que précédemment expliqué.

Le reste de la méthodologie correspond à ce qui est décrit dans Zouiouich et al. 2022.

DISCUSSION

DISCUSSION

A. MOSPD2 est impliquée dans l'homéostasie des LDs

A mon arrivée au laboratoire, des données non publiées montraient que la surexpression de MOSPD2 induisait parfois son enrichissement dans des sous-domaines du ER. De manière intrigante, cette localisation n'est pas retrouvée avec les protéines VAPs, suggérant une fonction unique de MOSPD2. Les résultats que j'ai obtenus lors de ma thèse ont permis de mieux comprendre ce phénomène, en caractérisant cette nouvelle localisation et le rôle de MOSPD2 associé à celle-ci.

1. MOSPD2 forme des contacts ER-LD via son domaine CRAL-TRIO

MOSPD2 est une protéine intégrale du ER, capable de former des MCS en interagissant avec des protéines à motif FFAT via son domaine MSP (Di Mattia et al. 2018). L'enrichissement de MOSPD2 dans des sous-domaines du ER semblait indiquer une localisation spécifique de MOSPD2 en comparaison aux VAPs. Grâce à la microscopie à fluorescence et électronique corrélative, nous avons mis en évidence que ces enrichissements correspondent à des contacts ER-LD. De manière intéressante, la surexpression de MOSPD2 augmente le recrutement du ER aux LDs, suggérant un rôle d'ancrage de la protéine. Contrairement aux autres MCS médiés par cette protéine qui dépendent du domaine MSP, MOSPD2 forme des contacts ER-LD grâce à une hélice amphipathique présente dans son domaine CRAL-TRIO permettant une interaction protéine-membrane. Cette hélice amphipathique est conservée dans les protéines à domaine CRAL-TRIO et est parfois appelée « gate helix » car celle-ci recouvre l'entrée de la poche hydrophobe (Ryan et al. 2007; Helbling et al. 2014). En revanche, le rôle de liaison aux membranes médié par cette hélice amphipathique n'a jamais été montré auparavant, mais seulement suggéré pour la protéine Sec14 (Sugiura et al. 2021). Les hélices amphipathiques sont un moyen fréquent d'interaction protéine-membrane, notamment avec les LDs (Prévost et al. 2018; Giménez-Andrés, Čopič, and Antonny 2018). Certaines caractéristiques, comme la présence de larges résidus hydrophobes, facilitent la liaison aux LDs. C'est le cas pour la protéine MOSPD2, qui possède deux tryptophanes dans la face hydrophobe de l'hélice amphipathique. La mutation d'un de ces résidus hydrophobes en résidu polaire abroge le recrutement de MOSPD2 aux LDs dans un modèle cellulaire et réduit fortement l'affinité dans un modèle *in vitro*, démontrant l'importance fonctionnelle de ce résidu dans l'hélice, et par conséquent celle de l'hélice. Ce type de recrutement est essentiellement décrit pour des protéines cytosoliques, bien que

DISCUSSION

certaines protéines intégrales comme les protéines SNX14 et MIGA2 ont récemment été montrées comme utilisant aussi une hélice amphipathique pour s'ancrer aux LDs (Kory, Farese, and Walther 2016; Datta et al. 2019; Freyre et al. 2019).

Le niveau d'affinité d'une protéine pour lier les LDs est un facteur de localisation important à ces organites. En effet, il existe un phénomène d'encombrement protéique à la surface des LDs, correspondant à une compétition entre les protéines pour se lier à la surface limitée des LDs (Kory et al. 2015). Cet encombrement pourrait être un moyen de réguler la présence de certaines protéines lors de changements membranaires provoqués par exemple par la maturation (expansion) ou lipolyse (rétraction) des LDs. Cette compétition semble essentiellement impacter les protéines cytosoliques recrutées par des hélices amphipathiques, mais il est probable que ce même phénomène soit retrouvé au niveau des contacts ER-LD. Plusieurs facteurs peuvent réguler l'ancrage de l'hélice amphipathique de MOSPD2 aux LDs. La caractérisation *in vitro* du domaine CRAL-TRIO a permis de montrer que l'ancrage nécessite la présence de défauts d'empaquetage et de charges négatives à la membrane. Des interactions électrostatiques médiées par la surface du domaine ou bien la face polaire de l'hélice amphipathique sont nécessaires à la stabilisation de l'interaction. La composition en phospholipides de la membrane est donc un premier facteur pouvant réguler l'ancrage de MOSPD2 aux LDs. La nature des lipides neutres contenus dans les LDs est également un autre moyen de réguler les interactions médiées par les hélices amphipathiques (Chorlay and Thiam 2020). Des données non publiées, obtenues par notre collaborateur Rachid Thiam, montrent que l'hélice amphipathique de MOSPD2 possède une meilleure affinité pour les LDs contenant des esters de stérol, en comparaison à des LDs contenant seulement de la trioléine. En ligne avec ces résultats, le recrutement au niveau endogène de MOSPD2 semble plus important lorsque l'on stimule la synthèse d'esters de stérol plutôt que la synthèse de TAG (données non montrées). Ainsi, les lipides neutres semblent être un autre facteur régulant l'interaction de MOSPD2 aux LDs. La composition des LDs est très hétérogène entre différents types cellulaires, mais également entre différentes LDs au sein d'une même cellule (Thiam and Beller 2017). Certaines protéines comme les périlipines sont connues pour cibler des populations spécifiques de LDs (Hsieh et al. 2012). Au vu des données obtenues, il est possible que MOSPD2 cible préférentiellement les LDs riches en esters de stérol. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi les esters de stérols sont plus impactés par la perte de MOSPD2 que les TAG. Afin d'étudier cela, il serait possible d'utiliser une sonde cholesteryl-BODIPY pour marquer les LDs positives aux esters de stérols, ou bien en utilisant de la microscopie à lumière polarisée. Cette technique permet de distinguer les LDs riches en esters de stérol qui se comportent, en fonction de la température, comme un cristal liquide polarisant la lumière (Shimobayashi and Ohsaki 2019). De même, il est

DISCUSSION

envisageable de tester l'affinité de MOSPD2 pour différents types de LDs en utilisant la technique de FRAP après stimulation à l'acide oléique, favorisant la synthèse de TAG, ou traitement au cholestérol, favorisant la synthèse d'esters de stérol. Ces expériences permettraient de mieux comprendre comment l'ancrage de MOSPD2 est régulé par la composition des LDs.

En résumé, nous avons montré que le domaine CRAL-TRIO ancre la protéine MOSPD2 aux LDs grâce à une hélice amphipathique située à l'entrée de la poche hydrophobe. Cette interaction est modulable par la composition en phospholipides et par les lipides neutres contenus dans les LDs. D'autres travaux sont nécessaires afin de mieux comprendre comment est régulée l'affinité de MOSPD2 pour les LDs et s'il existe une population de LDs spécifiquement ciblée par cette protéine.

2. MOSPD2 et LDs : un rôle d'ancrage et bien plus encore

La perte d'expression de MOSPD2 conduit à une diminution du nombre de LDs matures et de leur taille, démontrant l'implication de cette protéine dans l'homéostasie des LDs. Cette protéine est recrutée de manière précoce dans la biogenèse des LDs, suggérant un rôle de support de MOSPD2 dans la maturation des LDs. De manière intrigante, la régulation des LDs dépend du domaine CRAL-TRIO, dont la fonction restait à ce jour inconnue. Le domaine CRAL-TRIO médie l'ancrage de MOSPD2 aux LDs mais possède une autre activité nécessaire à la régulation des LDs. En effet, l'expression, dans les cellules dépourvues de MOSPD2, d'un mutant de MOSPD2 dans lequel le domaine CRAL-TRIO est remplacé par l'hélice amphipathique, ne permet pas de restaurer le nombre de LDs alors que ce mutant permet la formation de contacts ER-LD. La famille des protéines à domaine CRAL-TRIO fait partie des protéines de transfert de lipide (LTPs), même si le rôle de transfert dans le cas de la protéine Sec14 reste controversé (Bankaitis, Mousley, and Schaaf 2010). Cette protéine aurait plutôt un rôle de présentation de lipides, facilitant l'accessibilité d'un substrat pour une enzyme et favorisant ainsi une réaction métabolique. MOSPD2 pourrait donc avoir une activité autre qu'un transfert de lipides à l'interface ER-LD. A ce jour, aucun transfert de lipides n'a été observé *in vitro* pour le domaine CRAL-TRIO par notre collaborateur Guillaume Drin. Un des problèmes majeurs limitant ces expériences est l'identification de ligands de MOSPD2. En effet, des données *in vitro* indiquent que cette protéine possède une certaine affinité pour des phospholipides, notamment le PA et le PS. Le domaine CRAL-TRIO recombinant est capable de fixer du PA et du PS couplé à du NBD. En revanche, ces expériences ne nous permettent pas de conclure si cette interaction est spécifique de la poche

DISCUSSION

hydrophobe ou si cette interaction se fait à la surface du domaine. D'autres approches sont utilisables afin d'étudier des ligands de MOSPD2 : il est possible d'effectuer des expériences de résonance plasmonique de surface (SPR) ou de l'interférométrie sur biomembrane (BLI), deux techniques permettant l'analyse d'interactions protéine-lipide et la mesure d'affinité d'interaction (Wallner et al. 2013; Del Vecchio and Stahelin 2016). Une autre approche plus directe consiste à obtenir la structure du domaine CRAL-TRIO avec un ligand par cristallographie aux rayons X. Nous avons récemment obtenu une structure du domaine CRAL-TRIO produit dans la bactérie puis purifiée par chromatographie d'affinité et d'exclusion. L'analyse de cette structure montre la présence d'un ligand à l'intérieur de la poche hydrophobe (données non montrées). Ce ligand correspond à une chaîne aliphatique, malheureusement nous ne pouvons pas distinguer l'espèce lipidique. La protéine recombinante étant produite dans des bactéries, il est probable que le ligand bactérien retrouvé dans cette structure diffère du ligand naturel de MOSPD2 chez l'humain. Une approche de lipidomique sur domaine recombinant, comme réalisée pour la protéine Them1, est envisagée au laboratoire (Tillman et al. 2020). En résumé, le domaine recombinant est mélangé à un extrait de lipides puis purifié avant analyse par spectrométrie de masse. La recherche de ligands du domaine CRAL-TRIO est donc un point important qui pourra permettre de mieux comprendre la fonction MOSPD2 dans l'homéostasie lipidique.

L'utilisation de sondes marquant le PA dans un modèle cellulaire montre que la présence de MOSPD2 induit une accumulation de ce lipide à l'interface ER-LD. La même approche n'a pas permis de mettre en évidence une différence pour la PS, ce qui pourrait être dû à un manque de sensibilité de cette méthode ou bien que la concentration de ce lipide ne soit pas modifiée par MOSPD2. L'utilisation de sondes recombinantes pourrait aider à gagner en sensibilité et permettrait d'étudier d'autres lipides comme les PIPs par exemple. De plus, le manque de résolution ne nous permet pas de savoir si cette accumulation de PA se passe sur la membrane du ER et/ou des LDs. Pour cela, il faudrait utiliser des techniques de microscopie électronique ou bien des approches de super-résolution. En lien avec les données obtenues sur la régulation des LDs, l'accumulation de PA nécessite également la présence d'un domaine CRAL-TRIO fonctionnel. Plusieurs scénarios pouvant conduire à l'accumulation de PA par MOSPD2 sont envisageables (Figure D1). La première option correspond à un transfert direct de PA au niveau des contacts ER-LD. Dans ce cas, le PA ne serait pas métabolisé sur la membrane réceptrice, induisant son accumulation. Cela signifierait que MOSPD2 transporte le PA contre son gradient de concentration, et pourrait donc effectuer en échange un contre-transport d'un autre lipide. La seconde hypothèse correspond à celle de l'équipe de Bankaitis avec Sec14, c'est-à-dire une présentation de lipides (Schaaf et al. 2008). MOSPD2 pourrait faciliter l'accessibilité d'un substrat à une enzyme, favorisant ainsi la synthèse de PA. La

DISCUSSION

troisième possibilité correspond à un transfert de lipides vers la membrane réceptrice qui seraient ensuite métabolisés en PA par une enzyme. Ce scénario résout le problème de gradient de lipides et permettrait à MOSPD2 d'effectuer un transfert direct entre membranes, sans contre-échange. La dernière possibilité correspond à l'extraction d'un lipide d'une membrane donneuse, ce lipide est ensuite présenté à une enzyme sans être directement incorporé dans la membrane opposée. Cette hypothèse nécessite une enzyme ayant un domaine catalytique accessible depuis le cytosol.

DISCUSSION

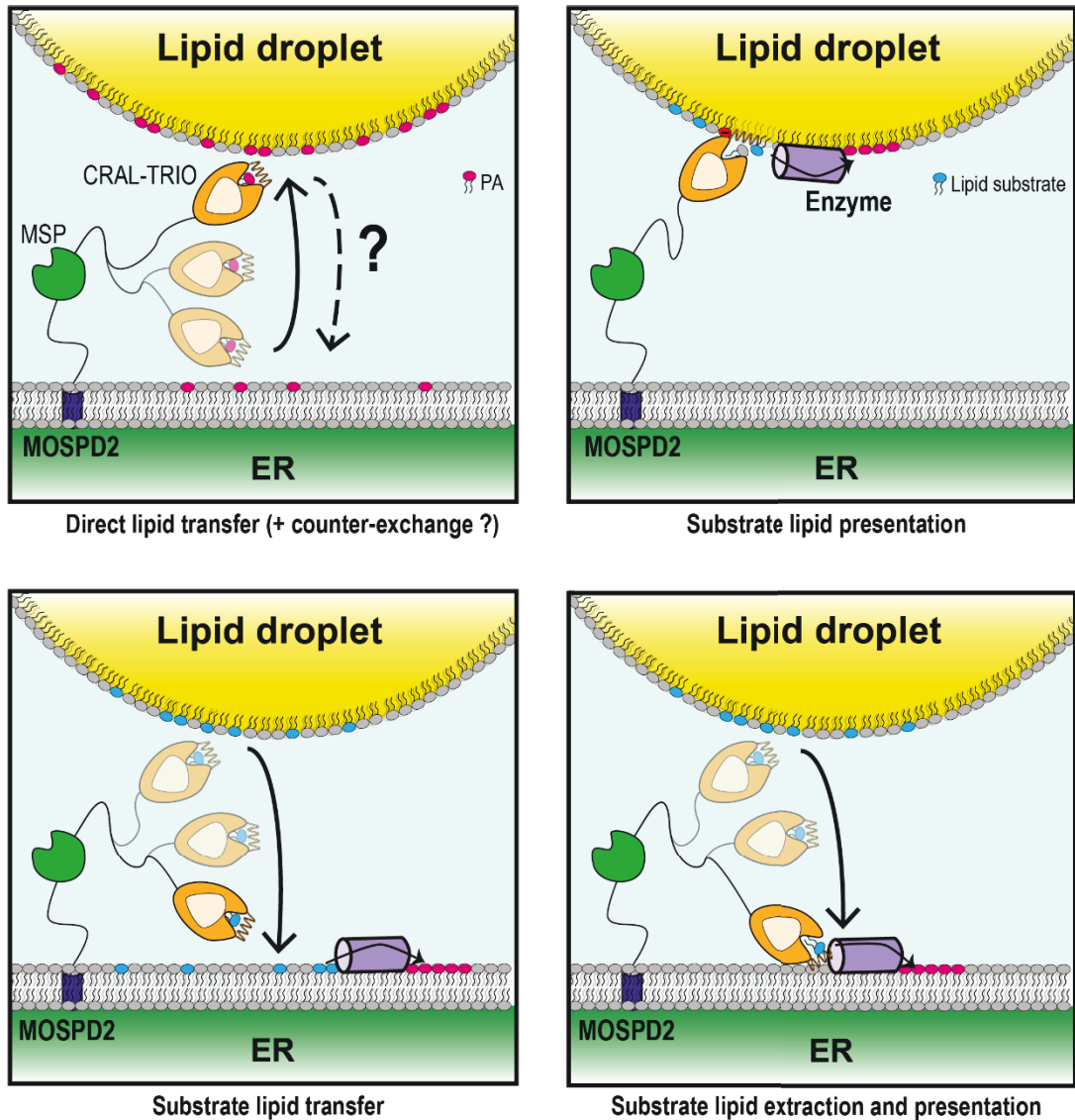


Figure D1. Différentes hypothèses de la fonction médiée par MOSPD2 aux contacts ER-LD.

La surexpression de MOSPD2 induit une accumulation d'acide phosphatidique (PA) aux contacts ER-LD. Différentes hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Premièrement, MOSPD2 pourrait effectuer un transfert direct de PA entre les deux membranes, potentiellement associé à un contre-échange d'une autre molécule. Dans un deuxième cas, MOSPD2 pourrait faciliter une réaction enzymatique en présentant un lipide à une enzyme capable de catalyser ce substrat en PA. La troisième possibilité correspond à un transfert d'un substrat d'une membrane à une autre, qui serait ensuite catalysé par une enzyme présente sur la membrane réceptrice. Dernièrement, MOSPD2 pourrait extraire un lipide d'une membrane pour présenter directement ce substrat à une enzyme localisée sur la membrane opposée, sans étape d'insertion du substrat dans la membrane acceptrice.

L'hélice amphipathique du domaine CRAL-TRIO existe sous plusieurs conformations selon la présence ou non d'un ligand dans la poche hydrophobe (Ryan et al. 2007; S. E. Phillips et al. 1999; Sha et al. 1998). Des données récentes montrent que la liaison de Sec14 à une membrane accélère sa capacité d'extraction/transfert de lipides (Sugiura et al. 2019; 2021). En revanche, si le ligand de Sec14 se trouve dans une membrane sur laquelle la protéine se lie difficilement, alors le transfert de lipides est diminué. De même, l'ajout d'un

DISCUSSION

ligand dans une membrane diminue le nombre de protéines Sec14 ancrées à cette membrane. Ces données suggèrent que l'ancrage à la membrane régule la capacité d'extraction/transfert *in vitro* de Sec14. L'extraction d'un lipide d'une membrane semble nécessiter l'ancrage de Sec14 à cette dernière et qu'une fois lié à un ligand, le domaine CRAL-TRIO perd de l'affinité pour la membrane car l'hélice se positionne en conformation « fermée ». Ces deux aspects du domaine CRAL-TRIO, régulés de manière intrinsèque, permettraient à la protéine Sec14 constituée de ce seul domaine, de posséder une spécificité de localisation et de restreindre son activité spatialement. Ces idées restent spéculatives car aucun mutant de Sec14 déficient pour l'ancrage membranaire, autrement dit un mutant de l'hélice amphipathique, n'a encore été publié. La modulation de la capacité de liaison à une membrane, associée à l'activité de transfert de lipides médiée par des LTPs, a déjà été étudiée pour les protéines PITPa et Osh6p (Shadan et al. 2008; Lipp et al. 2019). Dans le cas de MOSPD2, cela voudrait dire que le ligand n'est probablement pas localisé au ER car la protéine pourrait difficilement extraire le lipide de la membrane. De ce fait, l'option 1 correspondant au contre-échange semble la moins plausible car la protéine doit extraire un lipide sur chaque membrane. De même, l'option 3 dans laquelle MOSPD2 transfère un lipide qui est ensuite métabolisé est possible mais semble peu efficace car la protéine doit aussi interagir avec la membrane du ER. Le quatrième scénario, correspondant à l'extraction de lipides combinée à la présentation à une enzyme élimine le problème de l'interaction de MOSPD2 avec la membrane du ER. Cette option et celle numéro deux, correspondant à l'hypothèse de Bankaitis pour Sec14, sont les scénarios qui semblent les plus probables au vu des données actuelles obtenues au laboratoire et celles de la littérature. De plus, la surexpression de MOSPD2 ne semble pas avoir d'effet drastique sur la morphologie des LDs matures (données non montrées), suggérant un rôle auxiliaire de cette protéine, en ligne avec les scénarios de présentation de lipides. Il est important de relever que l'accumulation de PA médiée par la surexpression de MOSPD2 pourrait aussi correspondre à un événement secondaire provenant de la stimulation d'une autre réaction par MOSPD2.

Le PA est un phospholipide anionique et conique, précurseur de nombreux lipides et impliqué dans la signalisation intracellulaire (Tanguy et al. 2019). Ce lipide peut être synthétisé depuis plusieurs sources. Premièrement, en partant du glycerol-3-phosphate, métabolisé en lyso-PA par les glycerol phosphate acyltransferase (GPAT), puis en PA par les lyso-PA acyltransferases (LPAAT/AGPAT). Le PA peut également provenir de phosphatidylcholine (PC), cette réaction étant médiée par les phospholipases D (PLD). De même, le PA peut être produit en partant du DAG grâce aux DAG-kinases (DGK). Certaines enzymes GPAT et AGPAT comme GPAT4 et AGPAT3 sont des protéines du ER pouvant se localiser aux LDs et sont importantes pour l'expansion de LDs (Wilfling et al. 2013). Les enzymes PLD sont

DISCUSSION

également impliquées dans la formation de LDs : leur présence est nécessaire afin de former des LDs dans des expériences utilisant des microsomes ; ces résultats ont été confirmés dans un modèle cellulaire montrant que PLD1 favorise la maturation des LDs (Andersson et al. 2006; Marchesan et al. 2003). De manière intéressante, PLD1 est retrouvée aux LDs et son activité est stimulée par traitement à l'acide oléique (Nakamura, Banno, and Tamiya-Koizumi 2005). Bien que moins documenté, les DGK sont aussi impliqués dans la régulation des LDs et peuvent moduler l'activité lipolytique de certaines enzymes retrouvées aux LDs (Qiu et al. 2016; Nakano et al. 2018). L'accumulation de PA observée lors de la surexpression de MOSPD2 peut avoir plusieurs origines. Il serait intéressant de bloquer ces différentes voies (par des approches de manipulation génétique ou par traitement pharmacologique) afin d'étudier si l'enrichissement en PA médié par MOSPD2 provient d'une source spécifique. De même, on pourrait mesurer l'activité de ces enzymes dans différentes conditions d'expression de MOSPD2 par des kits biochimiques ou des approches *in vitro* utilisant des protéines recombinantes. L'identification de la source de PA aiderait à la compréhension du rôle de MOSPD2 aux LDs.

Le PA est un lipide ayant de nombreuses fonctions et pourrait par conséquent réguler la maturation des LDs par divers procédés. Par exemple, la présence de PA aux contacts ER-LD pourrait servir à recruter des protéines liant ce phospholipide, comme la protéine seipin par exemple (Yan et al. 2018). Ce lipide est aussi connu pour inhiber le processus de vésiculation des LDs *in vitro* et favoriser la fusion des LDs *in vivo* (Ben M'barek et al. 2017; Fei et al. 2011). L'activité de fusion se produisant dans des contacts LD-LD est réalisée par la protéine CIDEA, qui lie le PA (Barneda et al. 2015). Le PA est également capable de moduler l'activité de certaines enzymes comme cela a été montré pour mTOR, et peut lier des facteurs de transcription comme Opi1p chez la levure ou PPAR α chez l'Homme (Fang et al. 2001; Loewen et al. 2004; Mahankali et al. 2015). Afin de mieux comprendre l'impact du PA aux contacts ER-LD, il serait possible de cibler des enzymes métabolisant le PA comme PLD1 (synthétise le PA) ou Lipin (consomme le PA) à ces contacts en utilisant par exemple des protéines chimères. Cette méthodologie a récemment été utilisée afin de cibler PLD1 aux lysosomes (Hussain et al. 2021). Une autre alternative consisterait à utiliser le système FRB-FKBP fusionné à une enzyme d'intérêt (Inobe and Nukina 2016). Ce système est inductible à la rapamycine et permet de former des complexes FRB:rapamycine:FKBP. Ainsi, en ciblant FRB sur le ER et FKBP sur les LDs, il serait possible de créer des contacts ER-LD et de concentrer l'action d'une enzyme à ces sites de contact lors de l'ajout de rapamycine. Ces expériences pourraient nous renseigner sur l'importance de la modulation du PA aux contacts ER-LD dans la maturation des LDs. Il serait intéressant de voir si l'on peut compenser la perte de MOSPD2 en induisant une accumulation de PA aux contacts ER-LD par exemple.

DISCUSSION

En conclusion, MOSPD2 régule positivement la maturation des LDs. Cette fonction est associée au domaine CRAL-TRIO, appartenant à la famille des LTDs. En plus de son rôle d'ancrage aux LDs via une hélice amphipathique, ce domaine est responsable d'une seconde activité nécessaire au maintien de l'homéostasie des LDs. Au vu des données de la littérature et de celles obtenues au laboratoire, il est probable que MOSPD2 soit impliquée dans un remodelage membranaire local des contacts ER-LDs via un transport ou une présentation de lipides. Le changement de la composition membranaire médié par MOSPD2, comme observé par la modification en acide phosphatidique, pourrait favoriser la maturation des LDs par divers processus. D'autres expériences sont nécessaires afin de mieux comprendre la fonction de MOSPD2 aux contacts ER-LD.

B. La répartition subcellulaire de MOSPD2 est dictée par l'interaction de ses différents domaines avec les membranes

1. MOSPD2 est recrutée dans différents sites de contact

Les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent que MOSPD2 est présent dans différents MCS grâce à deux modes de recrutement distincts (Figure D2). D'une part, le domaine MSP de MOSPD2 permet l'interaction avec des protéines à motif FFAT. D'autre part, son domaine CRAL-TRIO forme des contacts par une interaction protéine-membrane. Ces deux types d'interaction pourraient expliquer pourquoi MOSPD2 se retrouve enrichie aux LDs en condition basale et non aux autres MCS. Comme démontré par les expériences de FRAP, MOSPD2 a une cinétique de diffusion bien plus lente aux LDs qu'aux endosomes surexprimant un partenaire d'interaction, la protéine STARD3. L'interaction avec les LDs via son domaine CRAL-TRIO semble plus longue, en accord avec un éventuel rôle de transfert ou de présentation de lipides. Ainsi, la protéine pourrait avoir tendance à s'accumuler aux interfaces ER-LDs car sa diffusion latérale est significativement diminuée au niveau de ces structures.

Comment MOSPD2 se répartit-elle entre ces différents contacts ? Il est intéressant de relever que lors de l'inactivation du domaine MSP (Δ MSP ou RD/LD), le recrutement de MOSPD2 aux LDs est plus prononcé. Ces données suggèrent que MOSPD2 possède plusieurs localisations/fonctions distinctes, médiées soit par le domaine CRAL-TRIO soit par le domaine MSP. Ce genre de recrutement à différents organites est plutôt retrouvé dans des protéines cytosoliques, mais récemment, plusieurs protéines intégrales ont montré cette même capacité. On retrouve par exemple : la protéine mitochondriale MIGA2, impliquée dans la lipogenèse *de novo*, formant des MCS avec le ER via un motif phospho-FFAT ou bien avec les LDs grâce à une hélice amphipathique (Freyre et al. 2019) ; la protéine intégrale du ER SNX13, impliquée dans l'homéostasie du cholestérol, formant des MCS avec les endosomes tardifs et les LDs (Lu et al. 2022). La compréhension des fonctions associées à chaque MCS pour ces protéines reste à ce jour assez limitée.

Il existe trois fractions de MOSPD2 à la surface du ER : MOSPD2 libre, MOSPD2 en interaction via son domaine CRAL-TRIO et MOSPD2 en interaction via son domaine MSP. On sait que la suppression du domaine MSP augmente la fraction de MOSPD2 aux LDs, il serait intéressant de voir si la suppression du domaine CRAL-TRIO augmente son recrutement aux contacts ER-E par exemple. On peut imaginer que selon le contexte ou type cellulaire, MOSPD2 va remplir différents rôles. Il est possible par exemple que dans les cellules exprimant fortement STARD3, MOSPD2 ait plutôt tendance à former des MCS ER-E au détriment de contacts ER-LD. La disponibilité de protéines partenaires pourrait être un facteur

DISCUSSION

jouant sur le taux de recrutement de MOSPD2 aux LDs. De manière intéressante, certains motifs FFAT peuvent être modifiés par phosphorylation (Di Mattia et al. 2020). Cette modification post-traductionnelle permet de réguler les interactions de ces motifs avec les protéines VAPs et MOSPD2. L'état de phosphorylation des protéines partenaires est donc un autre moyen de réguler la présence de MOSPD2 entre les différents MCS. Il n'est pas exclu que MOSPD2 soit aussi sujette à des modifications post-traductionnelles pouvant réguler sa localisation. A l'image de la phosphorylation des motifs FFAT, on peut imaginer que certains signaux permettent de réduire/augmenter l'affinité du domaine CRAL-TRIO pour la membrane des LDs, permettant ainsi à la protéine MOSPD2 de s'associer ou se dissocier rapidement.

Comme nous l'avons vu, il est possible d'étudier la dynamique de recrutement de MOSPD2 à différents organites dans des modèles cellulaires en utilisant la technique de FRAP. Afin de comprendre s'il existe une régulation de l'interaction de MOSPD2 par les domaines MSP et CRAL-TRIO à chaque MCS, on pourrait utiliser cette technique pour évaluer le temps de diffusion de MOSPD2. Par exemple, il serait possible de comparer le recrutement aux LDs de la forme sauvage à celui d'un mutant RD/LD, ou d'un mutant AH- Δ CRAL-TRIO et comparer les cinétiques de diffusion de ces différentes protéines. Cette expérience nous indiquerait si le domaine MSP influence la stabilité d'interaction aux LDs de MOSPD2, et si la poche hydrophobe du domaine CRAL-TRIO régule également cette interaction. De même, on pourrait comparer la forme sauvage de MOSPD2 aux mutants Δ CRAL-TRIO et AH- Δ CRAL-TRIO et quantifier les enrichissements aux endosomes pour voir si le domaine CRAL-TRIO affecte les interactions aux contacts ER-E. Les données obtenues lors de cette thèse mettent en avant deux types d'interaction de MOSPD2 avec les membranes permettant la localisation de cette protéine à différents endroits. Il serait intéressant à l'avenir de comprendre comment les différents domaines de MOSPD2 régulent ces différentes localisations et influent sur leurs fonctions associées.

2. Le métabolisme du cholestérol est-il le lien entre les différentes localisations de MOSPD2 ?

Quel est le lien entre les différents sites de contacts organisés par MOSPD2 ? Les cellules déficientes pour MOSPD2 présentent une baisse du niveau d'esters de stérols et une hausse de cholestérol libre. De plus, les données de RNA-seq provenant des cellules déficientes en MOSPD2 obtenues par CRISPR-Cas9 (clones KO#1 et KO#2) montrent une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la voie de synthèse de cholestérol

DISCUSSION

(données non montrées). Dans les cellules déficientes en MOSPD2, il y a une accumulation de cholestérol aux endosomes, soulignant un problème de distribution de cholestérol. Un problème de transfert de cholestérol des endosomes au ER pourrait expliquer la hausse de la synthèse de cholestérol *de novo* et le défaut de stockage sous forme d'esters. Les expériences de sauvetage montrent qu'une forme mutante de MOSPD2 dépourvue du domaine CRAL-TRIO restaure le phénotype endosomal, à l'instar de la protéine sauvage, alors qu'elle ne normalise pas le nombre de LDs. A l'inverse, la forme mutante de MOSPD2 dépourvue du domaine MSP suffit à normaliser le nombre de LDs, mais ne restaure pas le phénotype endosomal. Au vu de ses données, il semble que MOSPD2 puisse agir de manière différentielle sur le métabolisme du cholestérol via ses deux domaines. Il est important de souligner que ces expériences de sauvetage ne reflètent pas des conditions physiologiques et peuvent donc présenter des défauts. La surexpression exogène d'un mutant permet de montrer qu'un domaine est indispensable pour une fonction. C'est le cas par exemple du domaine CRAL-TRIO pour la régulation des LDs. En revanche, on ne peut pas exclure que le domaine MSP soit impliqué, au niveau endogène, dans la fonction de la protéine au niveau des LDs, par exemple en stabilisant les interactions du domaine CRAL-TRIO avec les LDs. En effet, on peut imaginer dans ce cas, que la surexpression du domaine CRAL-TRIO permette de compenser la perte d'interaction médiée par le domaine MSP via le grand nombre de protéines disponibles.

Peut-on attribuer l'effet observé dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2 sur le métabolisme du cholestérol à un site de contact particulier ? Dans le cas des différentes expériences de sauvetage réalisées, l'effet sur la voie de synthèse de cholestérol ou sur le contenu lipidique cellulaire n'a pas été étudié. Il faudrait reproduire ces expériences de sauvetage et étudier par lipidomique et/ou qPCR l'effet sur le métabolisme lipidique en regardant par exemple le contenu en esters de stérol et l'expression des ACATs ou d'autres enzymes de la voie de synthèse du cholestérol. Cette expérience permettrait de déterminer lequel des deux domaines fonctionnels de MOSPD2, le domaine MSP ou le domaine CRAL-TRIO, régule la biosynthèse du cholestérol et/ou la biosynthèse d'esters de stérols.

En conclusion, il est possible que MOSPD2 agisse de manière séquentielle, selon le contexte métabolique. Dans un premier temps, MOSPD2 permettrait le transfert de cholestérol des endosomes au ER via le domaine MSP. Puis, lorsque la synthèse d'esters de stérols est enclenchée, le recrutement de MOSPD2 aux LDs serait favorisé. Cette protéine pourrait alors aider la maturation des LDs et le stockage d'esters de stérols par un mécanisme non identifié médié par son domaine CRAL-TRIO, formant ainsi un cercle vertueux. La présence de MOSPD2 aux LDs pourrait favoriser l'engagement du cholestérol dans une voie métabolique plutôt qu'une autre, comme son stockage sous forme d'esters.

DISCUSSION

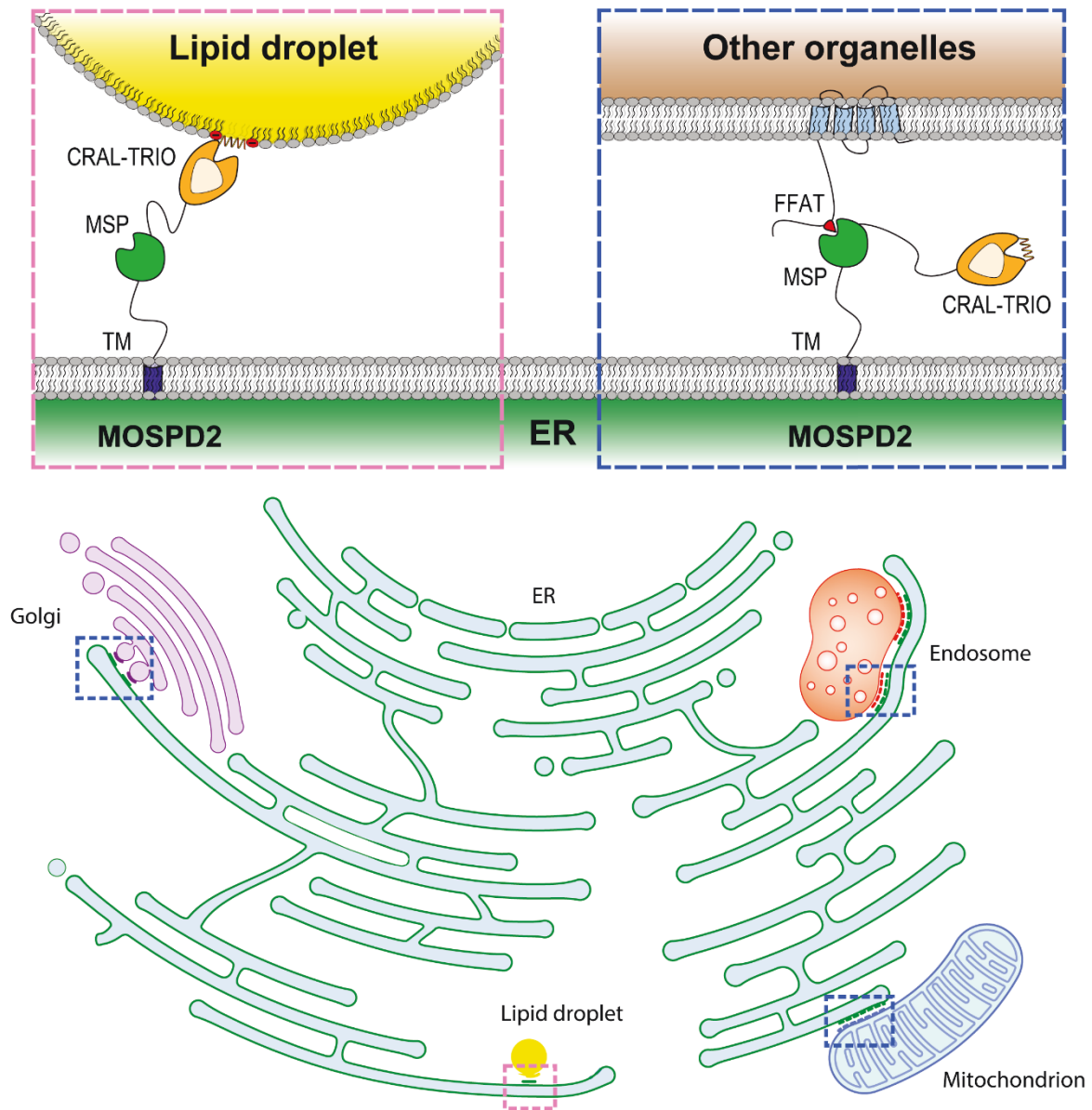


Figure D2. MOSPD2 forme de multiples MCS par deux mécanismes distincts.

La protéine MOSPD2, ancrée au ER, est capable de former des ponts moléculaires entre le réticulum endoplasmique et de nombreux organites. Pour cela, MOSPD2 est capable d'interagir avec d'autres protéines contenant un motif FFAT grâce à son domaine MSP. Cette interaction protéine-protéine est identique à celle déjà décrite pour les protéines VAPs. En revanche, MOSPD2 forme des contacts ER-LD par un autre mécanisme, impliquant son domaine CRAL-TRIO. Ce domaine possède une hélice amphiphile, capable de se lier directement à l'hémi-membrane des LD possédant des propriétés biophysiques spécifiques. Cette interaction protéine-membrane médiée par le domaine CRAL-TRIO de MOSPD2 induit la formation de contacts entre le réticulum endoplasmique et les gouttelettes lipidiques.

C. VAPA, VAPB et MOSPD2 : des protéines ubiquitaires au mécanisme d'action similaire

1. En comparaison aux protéines VAPs, MOSPD2 interagit de manière plus stable avec STARD3

Les protéines VAPA, VAPB et MOSPD2 sont des molécules d'ancrage, souvent considérées comme ayant des rôles équivalents. L'équipe a récemment montré *in vitro* que les protéines VAPs et MOSPD2 peuvent avoir des affinités différentes pour un même motif FFAT (Di Mattia et al. 2020). Par exemple, les protéines VAPs sont capables de lier le motif FFAT des canaux potassiques Kv2.1 et Kv2.2, ce qui n'est pas le cas pour la protéine MOSPD2. De même, le motif FFAT de STARD3 interagit avec le domaine MSP des protéines VAPs et MOSPD2, avec des affinités différentes (3.6 μ M pour VAPA, 4.8 μ M pour VAPB et 0.35 μ M pour MOSPD2). L'affinité entre VAPs, MOSPD2 et STARD3 est en plus régulée par des phosphorylations à différentes positions du motif FFAT, ce qui permet probablement une modulation rapide et réversible de l'interaction. En accord avec cette étude, une autre équipe a également montré par des expériences de co-immunoprécipitation ciblant les protéines VAPs ou MOSPD2 cotransfectées avec STARD3, que STARD3 est précipitée en plus grande quantité par MOSPD2 que par les VAPs (Cabukusta et al. 2020). De manière intrigante, le domaine MSP de MOSPD2 est légèrement différent comparé à ceux des VAPs car celui-ci possède une poche hydrophobe en surface permettant une interaction supplémentaire avec la phénylalanine en position 9 du motif FFAT de STARD3 (Di Mattia et al. 2020). Cette interaction supplémentaire pourrait expliquer la meilleure affinité du domaine MSP pour le motif FFAT *in vitro* et la différence d'interaction que j'ai observée lors de l'expérience de FRAP. En effet, MOSPD2 est plus stablement associé à STARD3, comme le montre la cinétique de retour de fluorescence assez lente en comparaison aux protéines VAPs (Figure D3). D'autres facteurs pourraient influencer cette différence. Par exemple, les protéines VAPs possèdent un domaine coiled-coil permettant leur dimérisation, ce qui diminue leur diffusion latérale (Weir et al. 2001). Pour conclure, il serait intéressant d'utiliser cette même technique avec d'autres partenaires dont les affinités sont connues *in vitro*, à l'image de ORP1L (Di Mattia et al. 2020). Ces expériences nous permettraient de vérifier que la diffusion plus lente de MOSPD2 dépend de son interaction plus stable avec STARD3 et non d'autres propriétés intrinsèques de MOSPD2.

2. VAPs et MOSPD2 : des protéines pas si redondantes ?

Les protéines VAPs sont des protéines ubiquitaires, ayant un rôle central dans la formation de contacts entre le ER et les autres organites. Plusieurs études ont permis d'identifier de potentiels partenaires protéiques des protéines VAPs (Huttlin et al. 2021; Cabukusta et al. 2020; James et al. 2019). Sur plus de 250 partenaires identifiés, environ la moitié sont communs aux protéines VAPA et VAPB (James and Kehlenbach 2021). Sur plus de 150 partenaires potentiels identifiés pour MOSPD2, environ 60 sont communs avec les protéines VAPs. Cet écart entre les partenaires identifiés pour MOSPD2 et les VAPs pourrait s'expliquer en partie par la présence du domaine CRAL-TRIO dans MOSPD2, qui pourrait interagir avec certaines protéines. Ces données suggèrent qu'une partie de leur activité pourrait être redondante, mais que des fonctions spécifiques semblent les distinguer. La mutation ponctuelle de la protéine VAPB est par exemple impliquée dans des cas de sclérose en plaque amyotrophique, causant des agrégats protéiques (Kors, Costello, and Schrader 2022; Nishimura et al. 2004). Cette même mutation dans VAPA ne conduit pourtant pas au même défaut (Prosser et al. 2008). De plus, la même étude rapporte que la surexpression de VAPA ralentit la voie antérograde entre le ER et le Golgi, ce qui n'est pas le cas pour VAPB. Il existe donc des différences fonctionnelles entre ces protéines, qui ne s'expliquent pas exclusivement par leur différence d'abondance. Cette idée est en accord avec les données obtenues lors des expériences de sauvetage du phénotype endosomal dans les cellules déficientes pour MOSPD2. En effet, la surexpression de VAPA ne permet pas de compenser l'absence de MOSPD2 pour le phénotype endosomal. Pourtant, un mutant de la protéine MOSPD2 dépourvu du domaine CRAL-TRIO, et donc ayant une organisation similaire aux protéines VAPs avec un domaine MSP et un domaine transmembranaire, est capable d'effectuer cette tâche. Ces données suggèrent que les différences d'affinité entre les domaines MSP des protéines VAPs et MOSPD2 ont un impact important *in vivo*, et limitent la capacité de ces protéines à se compenser fonctionnellement.

Bien que moins abondante que les protéines VAPs dans les cellules HeLa, MOSPD2 est capturée en plus grande quantité que ces dernières lors d'expériences de pull-down utilisant le motif FFAT de STARD3 comme appât, ce qui dénote une forte interaction entre MOSPD2 et STARD3 (Di Mattia et al. 2020). J'ai modifié l'algorithme utilisé par l'équipe pour identifier les motifs phospho-FFAT du protéome humain afin de rechercher spécifiquement les motifs FFAT ayant une structure proche de celui de STARD3, c'est-à-dire avec une phénylalanine en position 9. Cet outil permet d'orienter la recherche de partenaires des protéines VAPs et MOSPD2 en identifiant des motifs FFAT potentiels, et de différencier les motifs FFAT conventionnels ou phosphorylables en attribuant un score selon les types d'acides

DISCUSSION

aminés et leur position dans le motif. Plus le score est faible, plus il y a de chance que la séquence en question corresponde réellement à un motif FFAT car proche d'un motif consensus. Sur le protéome humain (<https://www.uniprot.org/teomes/UP000005640>), 3201 protéines ont un score phospho-FFAT inférieur ou égal à 3 (considéré comme un bon score) contre 2744 protéines pour les motifs conventionnels. Sur ces milliers de protéines, 129 et 139 possèdent une phénylalanine en position 9 respectivement de leur phospho-FFAT ou FFAT conventionnel. De plus, des enrichissements en termes d'ontologie des gènes (GO, Gene Ontology) sont retrouvés parmi les protéines à motifs phospho-FFAT potentiels. On retrouve notamment : le transport transmembranaire de glucose, le métabolisme des sphingolipides, mais aussi la transmission synaptique et plus particulièrement la voie GABAergique. De manière intrigante, le cerveau correspond à l'organe ayant la plus haute expression en ARN de MOSPD2. De plus, il a été récemment montré que les VAPs sont impliqués dans la formation de contacts ER-PM dans des interneurons GABAergiques (Vullhorst et al. 2023). Il serait intéressant d'évaluer *in vitro* l'interaction des domaines MSP de MOSPD2 et des VAPs avec des peptides de synthèse correspondant à ces motifs FFAT spécifiques, possédant une phénylalanine en position 9. Ce criblage pourrait être un moyen d'identifier de nouveaux partenaires spécifiques ou ayant une affinité plus importante pour MOSPD2 afin d'identifier plus facilement de nouvelles fonctions associées à cette protéine.

En conclusion, MOSPD2 se distingue des protéines VAPs par sa forte capacité d'interaction avec STARD3 (Figure D3). Cette différence d'affinité a des conséquences fonctionnelles importantes *in vivo*, car la surexpression de la protéine VAPA ne permet pas de compenser la perte de MOSPD2 et de rétablir l'homéostasie du cycle endosomal. La redondance entre les protéines VAPs et MOSPD2 est donc limitée.

DISCUSSION

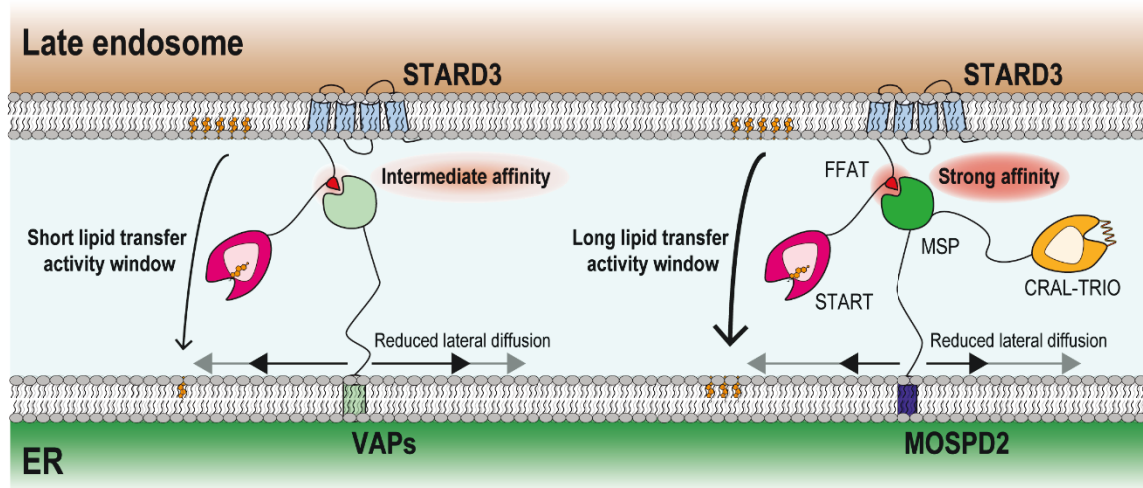


Figure D3. STARD3 forme un complexe d'interaction plus stable avec MOSPD2 qu'avec les protéines VAPs.

La protéine endosomale STARD3 possède un motif phospho-FFAT, reconnu par les domaines MSP des protéines VAPs et MOSPD2. Cette interaction protéine-protéine permet la formation de contacts entre le ER et les endosomes tardifs. Malgré un mécanisme d'interaction commun, MOSPD2 possède une meilleure affinité que les protéines VAPs pour STARD3. Cette différence d'interaction est visible *in vivo* par une vitesse de diffusion latérale bien plus réduite pour MOSPD2 que les protéines VAPs au niveau des contacts médiés par STARD3. De plus, cet écart d'affinité aurait des conséquences fonctionnelles importantes sur le transport de cholestérol médié par STARD3, qui serait essentiellement médié par les complexes d'interaction contenant MOSPD2.

D. MOSPD2 régule le cycle de maturation du système endosomal tardif

Les données obtenues lors de ma thèse viennent compléter l'étude menée par l'équipe en 2018. Il avait été observé que la perte d'expression de MOSPD2 conduit à une diminution de l'étendue des contacts ER-E, ainsi qu'à une augmentation des contacts E-E (Di Mattia et al. 2018). Ce phénotype n'a pas été observé avec les protéines VAPs, suggérant un rôle spécifique de MOSPD2 dans la régulation de ces contacts. À la suite de ces résultats, j'ai voulu évaluer l'importance de ces contacts sur l'homéostasie des endosomes, et également comprendre comment MOSPD2 régule ces contacts.

1. MOSPD2 modifie le nombre d'endolysosomes grâce au domaine MSP

La perte de fonction de MOSPD2, par interférence ARN ou inactivation de gène, conduit à une altération du système endosomal tardif, caractérisée par une augmentation du nombre de vésicules positives pour le marqueur LAMP1, indiquant une hausse du nombre d'endosomes tardifs. Il est possible que LAMP1 soit surexprimée dans ces cellules. Cependant, ce phénotype a également été observé en utilisant un autre marqueur, un anticorps anti-LBPA dirigé contre un lipide spécifique des endosomes tardifs (J. Gruenberg 2020). Le système endosomal tardif se répartit en plusieurs compartiments : endosomes matures, endolysosomes et lysosomes (Barral et al. 2022). Ce système endosomal est également capable de fusionner avec des structures autophagiques pour donner d'autres organites appelés amphisomes ou autolysosomes. Ces compartiments sont reliés par un cycle de maturation correspondant à des changements dans leur composition membranaire ; les signaux régulant ce cycle sont en revanche encore peu compris. Les cellules déficientes en MOSPD2 présentent une augmentation des endolysosomes (EL), comme suggéré par la hausse d'endosomes positifs au LysoTracker et à la sonde DQ-Red BSA, permettant de marquer respectivement l'acidité et l'activité hydrolytique. En revanche, on ne peut pas savoir avec les méthodes utilisées dans cette thèse si cette hausse des EL se fait au détriment des autres compartiments comme les lysosomes matures. En effet, il n'existe pas de marqueur spécifique permettant de distinguer les lysosomes matures des EL. Pour cela, il faudrait quantifier ces compartiments sur des images de microscopie électronique car ces lysosomes sont très denses aux électrons. Il serait aussi possible d'utiliser un marquage au MPR (mannose phosphate receptor) afin de distinguer les endosomes matures. Les MPRs partent

DISCUSSION

du Golgi vers les endosomes tardifs par transport vésiculaire afin de délivrer leur cargo. Ce cargo est relâché à pH acide et les MPRs sont recyclés vers le Golgi en suivant la voie rétrograde, permettant ainsi de distinguer les endosomes matures (positifs pour le MPR et Lamp1) des EL/Lysosomes (négatifs pour le MPR mais positifs pour Lamp1) (Brown, Goodhouse, and Farquhar 1986). Il serait également intéressant de suivre la cinétique d'internalisation et de dégradation de molécules (e.g. récepteurs membranaires) en utilisant par exemple de l'EGF fluorescent. Des données de la littérature et d'autres non publiées que j'ai réalisées montrent que les cellules déficientes pour MOSPD2 sont moins capables de migrer en réponse à l'EGF (Salem et al. 2019). Au vu du défaut endosomal observé, il est probable que les cinétiques de dégradation ou de recyclage de l'EGFR soient modifiées. De manière intrigante, un retard de la dégradation de l'EGF a déjà été observé pour STARD3 (Hölttä-Vuori et al. 2005). Ce retard ne provient pas d'un défaut de passage des endosomes précoces aux endosomes tardifs, mais plutôt d'un confinement dans les endosomes tardifs dispersés en périphérie.

Les contacts ER-E médiés par MOSPD2 dépendent du domaine MSP. Lors des expériences de sauvetage des cellules déficientes en MOSPD2, la présence de ce domaine fonctionnel est indispensable pour restaurer l'homéostasie endosomale. A l'inverse, le domaine CRAL-TRIO ne semble lui pas nécessaire. De manière intrigante, la capacité à restaurer la taille des endosomes diffère selon les mutants du domaine CRAL-TRIO. En effet, le mutant AH- Δ CRAL-TRIO semble plus performant afin de normaliser la taille des endosomes en comparaison au mutant de l'hélice amphipathique W201E (Figure R8). Les différences observées sur la capacité à restaurer la taille des endosomes entre les différents mutants du domaine CRAL-TRIO pourraient suggérer que l'hélice amphipathique participe à la reconnaissance et à la stabilité d'interaction de la protéine MOSPD2 avec les endosomes. Cette différence pourrait également provenir de variations de niveau d'expression des différents mutants. Afin de distinguer ces possibilités, il serait possible de tester *in vitro* la capacité de l'hélice à lier des membranes en bicouche ayant des propriétés proches de celles des endosomes en effectuant des expériences de flottaison de liposomes par exemple. De même, il serait possible de réaliser des expériences de FRAP pour comparer la diffusion aux sein des contacts ER-E d'une forme sauvage de MOSPD2 à des formes présentant des mutations de l'hélice. Ces expériences nous renseigneraient sur l'implication du domaine CRAL-TRIO et plus particulièrement de l'hélice amphipathique dans les contacts ER-E médiés par MOSPD2.

2. La modulation des endosomes tardifs médiée par MOSPD2 dépend de son interaction avec la protéine STARD3

Les données obtenues lors de cette thèse montrent que MOSPD2 est capable de réguler les endosomes tardifs via son domaine MSP. Ce domaine permet à MOSPD2 d'interagir avec des protéines à motifs FFAT, suggérant que le phénotype endosomal observé dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2 provient d'un défaut d'interaction avec une ou plusieurs protéines. Entre les différents partenaires de MOSPD2 dont j'ai inhibé l'expression, seule les cellules déficientes pour STARD3 ont montré un phénotype endosomal similaire à MOSPD2, c'est-à-dire une augmentation d'endosomes tardifs positifs à LAMP1, une baisse de leur taille et une hausse de cholestérol associée à ces endosomes. On ne peut pas exclure que MOSPD2 puisse interagir avec d'autres protéines non testées au niveau des endosomes et que ces interactions soient importantes dans la régulation du système endosomal (e.g. ORP2 ou autres partenaires à motif FFAT non identifiés). De plus, la présence de STARD3 est également indispensable pour que MOSPD2 puisse normaliser le phénotype dans des expériences de sauvetage. L'interaction de STARD3 avec MOSPD2 a déjà été montrée à plusieurs reprises par l'équipe (Di Mattia et al. 2018; 2020). STARD3 interagit également avec les protéines VAPs (Alpy et al. 2013). Pourtant, la perte d'expression de VAPA ou de VAPB ne conduit pas au même phénotype endosomal. De manière intrigante, la perte d'expression simultanée de VAPA et VAPB contrebalance l'accumulation de cholestérol médiée par la surexpression de STARD3 (Wilhelm et al. 2017). Ces données peuvent sembler conflictuelles mais plusieurs paramètres sont à prendre en compte. Premièrement, une seule étude a regardé la capacité du motif FFAT de STARD3 à interagir avec les protéines VAPs et MOSPD2 au niveau endogène (Di Mattia et al. 2020). Dans cet article, on peut voir que MOSPD2 est beaucoup plus enrichie par pull-down du motif FFAT de STARD3 que les protéines VAPs. Des expériences de résonance plasmonique de surface (SPR), permettant de calculer des constantes de dissociation pour les domaines MSP avec le motif FFAT de STARD3, ont également été réalisées et montrent que MOSPD2 possède une affinité environ cinq fois plus forte que les protéines VAPs. Ces données concordent avec l'expérience de FRAP que j'ai réalisée, montrant une cinétique de diffusion plus lente de MOSPD2 en interaction avec STARD3, que celle des protéines VAPs interagissant avec STARD3 dans un modèle cellulaire, et donc probablement une interaction plus stable. Deuxièmement, les protéines VAPs sont bien plus abondantes que la protéine MOSPD2 dans les cellules HeLa et interagissent avec d'autres protéines endosomales comme ORP1L ou le complexe WASH (Dong et al. 2016; van der Kant, Zondervan, et al. 2013; Di Mattia et al. 2018). La perte d'expression simultanée de ces deux protéines diminue les sites de contact entre le ER et les endosomes, sans pour

DISCUSSION

autant augmenter les contacts E-E (Di Mattia et al. 2018; Eden et al. 2016). Ces données suggèrent que les protéines VAPs et MOSPD2 exerceraient des fonctions différentes aux mêmes types de MCS. Il est probable que l'effet de la perte d'expression des VAPs sur l'accumulation du cholestérol observée lors de la surexpression de STARD3 provienne d'une perte de spécificité d'interaction provoquée par une surabondance de cette protéine endosomale (Wilhelm et al. 2017). Au niveau endogène, STARD3 semble moins abondante que les protéines VAPs et correspondrait donc au facteur limitant de ces interactions (Nagaraj et al. 2011). Lors de la surexpression de STARD3, le facteur limitant devient la disponibilité des protéines VAPs et MOSPD2. En supprimant les protéines d'ancrage les plus abondantes, VAPA et VAPB, l'effet de la surexpression de STARD3 sur l'accumulation de cholestérol peut être compensé car STARD3 interagit seulement avec MOSPD2. En lien avec cette hypothèse, la surexpression de STARD3 normalise le nombre d'endosomes LAMP1⁺, contrairement à la surexpression de VAPA, dans des cellules déficientes en MOSPD2.

En résumé, MOSPD2 correspond au partenaire préférentiel de STARD3 et semble nécessaire à la fonction de la protéine STARD3. Il est important de souligner que la perte d'expression de MOSPD2 ne semble pas induire une baisse drastique de l'expression de STARD3 (données non montrées). Au contraire, le taux de phosphorylation de STARD3 semble augmenter dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2 (données non montrées), suggérant un mécanisme de compensation.

3. Les contacts ER-E médiés par le complexe MOSPD2:STARD3 altèrent la distribution du cholestérol aux endosomes

Cette étude montre que contrairement aux protéines VAPA et VAPB, MOSPD2 joue un rôle dans la distribution subcellulaire du cholestérol. En effet, la perte d'expression de MOSPD2 conduit à un marquage filipin plus intense, colocalisant avec les endosomes tardifs. L'utilisation de deux approches différentes, correspondant à l'expression exogène d'une protéine chimère mCherry-D4H et des marquages par la sonde recombinante GFP-D4 marquant le cholestérol, montrent un enrichissement du cholestérol au niveau de la membrane limitante des endosomes. Une accumulation intraluminale n'est pas exclue mais difficile à discerner à cause de la faible taille des endosomes dans ces conditions. La perte d'expression de STARD3 conduit à la même redistribution du cholestérol, avec une hausse du marquage filipin et un fort enrichissement à la membrane limitante des endosomes tardifs. Ces données sont en accord avec une étude récente décrivant les gènes régulant le cholestérol, identifiés par criblage CRISPR-KO (Lu et al. 2022). Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence

DISCUSSION

que les pertes d'expression de MOSPD2 et de STARD3 entraînent une hausse de cholestérol au niveau des endosomes.

Le rôle de STARD3 aux endosomes reste à ce jour incertain. Des études ont montré que STARD3 pourrait favoriser l'efflux de cholestérol des endosomes vers les mitochondries, ce qui favoriserait la stéroïdogénèse, et que ce rôle ne dépend pas de la présence de NPC1 (Zhang et al. 2002; Balboa et al. 2017; Charman et al. 2010). Une autre étude montre que la surexpression de STARD3 induit une accumulation de cholestérol intraluminale dans les endosomes tardifs, qui proviendrait d'un transfert de cholestérol du ER aux endosomes (Wilhelm et al. 2017). Or, les résultats que j'ai obtenus semblent montrer un rôle de transport de cholestérol des endosomes vers le ER. Ces données conflictuelles peuvent avoir plusieurs explications. Tout d'abord, il est envisageable que STARD3 puisse transférer du cholestérol du ER aux endosomes dans certaines conditions. Lors de la surexpression de cette protéine, les contacts ER-E sont massifs et plus statiques que la normale. On pourrait imaginer que lors de ces contacts forcés, un transfert non usuel puisse se produire dû à un remodelage membranaire excessif. Une autre explication plus plausible est que l'accumulation de cholestérol provoquée par la surexpression de STARD3 ne provienne pas d'un transfert direct de cholestérol du ER aux endosomes. Des données non publiées de l'équipe montrent que la surexpression de STARD3 entraîne un blocage du flux d'autophagie (WILHELM 2017), en accord avec les données obtenues montrant une diminution du compartiment hydrolytique (baisse des endosomes LysoTracker⁺/DQ-Red⁺). Lors de sa surexpression, STARD3 colocalise en partie avec le marqueur autophagique LC3, mettant en évidence la formation d'amphisomes (données non montrées). Au vu de ces différentes données, il est probable que l'accumulation de cholestérol observée lors de la surexpression de STARD3 provienne d'une diminution de la fusion des amphisomes/endosomes matures avec les endolysosomes, provoquant l'accumulation de matériels positifs à la filipin dans le système endosomal. Ce genre de phénotype est par exemple retrouvé dans la maladie de Niemann Pick de type C (NPC) qui présente un enrichissement d'amphisomes, positifs à la filipin, même si les causes de cette accumulation sont sûrement différentes (Sarkar et al. 2013).

Dans les cellules déficientes pour MOSPD2, la régulation du flux de cholestérol à l'interface ER-E semble importante afin de normaliser le nombre et la taille des endosomes tardifs. En effet, la surexpression d'un mutant de STARD3 incapable de transporter du cholestérol (Δ START) dans des cellules n'exprimant plus MOSPD2 n'entraîne pas un retour à la normale des endosomes, mais seulement un sauvetage partiel. Ce mutant augmente la formation de contacts ER-E (Wilhelm et al. 2017), pourtant, le défaut endosomal n'est pas complètement corrigé. Il est possible que cette forme mutante de STARD3 interagisse avec STARD3 endogène par dimérisation, ce qui pourrait jouer sur les capacités de transfert de la

DISCUSSION

protéine endogène. Ce mutant pourrait aussi entrer en compétition avec STARD3 endogène pour interagir avec les protéines VAPs, limitant les capacités de transfert de la protéine endogène. La diminution partielle du défaut endosomal pourrait donc provenir d'un effet bénéfique correspondant à l'augmentation des MCS ER-E, favorisant le transfert de cholestérol par d'autres protéines de transport présentes à cette interface, combiné à un effet néfaste dû à une diminution du transfert effectué par STARD3 endogène. De plus, l'expression de la protéine ORP2, connue pour exporter du cholestérol des endosomes vers la membrane plasmique, normalise le phénotype endosomal des cellules déficientes pour MOSPD2 (H. Wang et al. 2019). Même si cette protéine n'a pas été décrite comme fonctionnant à l'interface ER-E, il est probable qu'elle en soit capable car ORP2 possède un motif FFAT. Des données non publiées du laboratoire montrent que la surexpression de ORP2 avec des protéines VAPs entraîne leur enrichissement aux endosomes. Il serait intéressant de répéter cette expérience avec un autre transporteur de cholestérol, comme ORP1L, ou bien de muter la protéine ORP2 pour qu'elle ne puisse plus transporter de cholestérol. Ces expériences permettraient de vérifier que l'efflux de cholestérol des endosomes permet de réguler le phénotype endosomal des cellules n'exprimant plus MOSPD2.

Quelle est l'origine du cholestérol s'accumulant dans la membrane limitante des endosomes tardifs des cellules dépourvues de MOSPD2 ? Deux possibilités non exclusives existent : du lumen des endosomes, ou d'autres organites par un transport vésiculaire ou non-vésiculaire. Le cholestérol intraluminal provient de la digestion par des lipases acides de particules LDL, internalisées par endocytose, ou bien de structures autophagiques ayant fusionné avec le système endosomal (Meng et al. 2020). La machinerie principale permettant de transporter ce cholestérol depuis le lumen vers la membrane limitante est constituée des protéines NPC1 et NPC2 (Pfeffer 2019). NPC2 est une protéine soluble dans le lumen, liant le cholestérol et permettant son transfert à NPC1, une protéine intégrale impliquée dans l'intégration du cholestérol à la membrane limitante et son exportation vers d'autres organites. De manière intéressante, NPC2 pourrait également transférer directement du cholestérol aux protéines LAMP2, augmentant ainsi le pool de cholestérol disponible pour exportation à la membrane limitante (J. Li and Pfeffer 2016). Récemment, la protéine LIMP-2 a également été identifiée comme pouvant contribuer au passage du cholestérol du lumen à la membrane limitante (Heybrock et al. 2019). Les mécanismes d'export du cholestérol de la membrane limitante vers les autres organites restent encore incertains. NPC1 est un facteur important de l'export du cholestérol vers d'autres organites, et pourrait communiquer avec des LTPs (Meng et al. 2020). Même si la voie NPC1 semble être la plus efficace dans l'export de cholestérol, forcer la formation de MCS entre le ER et les endosomes tardifs permet de diminuer l'accumulation de cholestérol provoquée par la perte de NPC1 (Höglinger et al. 2019). Les

DISCUSSION

MCS sont donc des sites importants dans l'export de cholestérol dépendant ou non de NPC1 (Lu 2022). Le cholestérol à la membrane limitante pourrait également provenir d'un transfert provenant d'autres organites. En effet, une étude a récemment montré que l'accumulation de cholestérol à la membrane limitante des endosomes tardifs, observée dans des mutants NPC1, provient d'un transfert de cholestérol provenant du ER, médié par la protéine OSBP, permettant de réguler la voie mTOR (Lim et al. 2019). En lien avec ces données, une autre étude a montré que la perte d'expression de OSBP diminue l'accumulation de cholestérol dans des cellules traitées à la U-drug (phénotype équivalent aux mutants NPC1) (Lu et al. 2022). Cette accumulation observée lors de la perte de MOSPD2 ou de STARD3 pourrait donc provenir soit de cholestérol venant par exemple du ER, soit du cholestérol provenant du lumen n'ayant pas encore transité vers d'autres organites. Afin de comprendre d'où provient ce cholestérol, il serait possible de réduire l'expression de OSBP et de NPC1 dans les cellules déficientes en MOSPD2 afin d'observer l'effet sur l'accumulation de cholestérol grâce à un marquage GFP-D4. Il est aussi envisageable d'utiliser un milieu avec un sérum pauvre en lipoprotéines (LPDS), afin de limiter l'apport de cholestérol exogène et favoriser la synthèse *de novo* de cholestérol au ER. Ces expériences permettraient de mieux comprendre où se placent les contacts médiés par MOSPD2 et STARD3 dans la circulation intracellulaire du cholestérol.

En conclusion, STARD3, en complexe avec MOSPD2, semble transférer du cholestérol de la membrane limitante des endosomes tardifs au ER. Ce rôle d'export du cholestérol des endosomes est en accord avec la littérature démontrant un transport des endosomes aux mitochondries et un criblage récent montrant une accumulation de cholestérol dans des lignées déficientes en MOSPD2 ou STARD3 obtenues par CRISPR-Cas9 (Zhang et al. 2002; Balboa et al. 2017; Charman et al. 2010; Lu et al. 2022). En revanche, l'origine de ce cholestérol membranaire reste encore à déterminer. Il est probable qu'il provienne directement du contenu des endosomes, c'est-à-dire de la digestion des ILVs et autres membranes intraluminales. Il est également possible que ce cholestérol provienne d'autres organites, comme cela a été montré avec la protéine OSBP, transférant du cholestérol provenant du ER à la surface des endosomes dans des cellules NPC1 mutantes (Lim et al. 2019). De plus, la régulation du flux de cholestérol visant à diminuer l'accumulation du cholestérol à la membrane limitante semble être un facteur important permettant de normaliser le défaut endosomal des cellules n'exprimant plus MOSPD2. Au vu du phénotype observé, on peut envisager que le complexe MOSPD2:STARD3 soit impliqué dans un transfert de cholestérol permettant un remodelage membranaire local des endosomes régulant la maturation du système endosomal, plutôt qu'une voie de transport intracellulaire majeure du cholestérol à l'image de NPC1.

4. Quel est le rôle fonctionnel des contacts médiés par MOSPD2 sur le cycle endosomal ?

Les résultats obtenus suggèrent que MOSPD2 est capable de réguler la balance entre les événements de fission et de fusion membranaire des endosomes tardifs en interagissant avec la protéine STARD3. Le phénotype observé lors de la perte d'expression de STARD3, c'est-à-dire un nombre élevé d'endosomes de petites tailles et tubulaires, concorde avec une étude publiée en 2005 (Hölttä-Vuori et al. 2005). Dans ce papier, les auteurs montrent que la réduction d'expression de STARD3 par siRNA entraîne la dispersion des endosomes tardifs (LAMP1⁺), phénotype qui ne peut pas être normalisé par la surexpression d'un mutant Δ START (pas de transfert de cholestérol) ou d'un mutant MR/ND (mutation rendant la poche hydrophobe du domaine START non fonctionnel). Ces données concordent avec mes résultats de surexpression de différents mutants de STARD3 dans les cellules déficientes en MOSPD2, montrant une normalisation du phénotype seulement quand STARD3 possède un domaine START et un motif FFAT fonctionnel. La même publication rapporte également que la perte d'expression de STARD3 entraîne un délai de fusion entre endosomes tardifs (Hölttä-Vuori et al. 2005). A l'inverse, la surexpression d'une forme WT augmente ce processus de fusion, ce qui n'est pas le cas du mutant Δ START. Les auteurs font l'hypothèse que STARD3 régule le positionnement des endosomes et leur fusion en régulant leur attachement à l'actine. Ce mécanisme, dépendant du domaine START, pourrait provenir d'une modification du contenu en stérol des endosomes.

Une autre étude montre que la surexpression de STARD3NL, en plus d'augmenter la taille des endosomes et leur regroupement périnucléaire, diminue le processus de tubulation (Alpy et al. 2013). Il est possible que la surexpression de cette protéine, en augmentant la formation de contacts ER-E et en dimérisant avec STARD3, puisse favoriser l'activité de STARD3. Ces données pourraient être liées avec les résultats que j'ai obtenus. En effet, la surexpression de STARD3 augmente la taille des endosomes, alors que son inhibition induit de plus petits endosomes, de forme plus tubulaire. Cette diminution du processus de tubulation a déjà été observée pour NPC1 et est induite par l'accumulation de cholestérol dans les endosomes (Zhang et al. 2001). Cette accumulation intraluminale de cholestérol est retrouvée lors de la surexpression de STARD3, et pourrait éventuellement expliquer le défaut de tubulation (Wilhelm et al. 2017). Il est aussi envisageable que la surexpression de STARD3 limite la motilité des endosomes et induise la fusion de sous-compartiments du système endosomal. Sa surexpression conduit notamment à la formation d'endosomes matures de

DISCUSSION

grandes tailles, riches en membranes intraluminales (Alpy et al. 2013). Mes données montrent que sa surexpression entraîne également une augmentation de la taille des compartiments LysoTracker⁺/DQ-Red⁺, pouvant correspondre aux endolysosomes. Malgré cette hausse de taille, ces endosomes sont moins nombreux et l'aire totale par cellule est diminuée. On peut imaginer que la coalescence des endosomes matures et la présence massive de contacts ER-endosomes médiés par STARD3, limitent les contacts E-E nécessaires à leur maturation et leur acidification (Bright, Gratian, and Luzio 2005).

Les MCS médiés par MOSPD2 et STARD3, semblent donc capables, en régulant le cholestérol à la membrane limitante des endosomes, d'influer sur les événements de fission et de fusion membranaire, permettant ainsi la maturation du système endosomal tardif (Figure D4). L'inhibition de ces protéines entraîne une hausse du cholestérol à la membrane limitante, ce qui pourrait diminuer les événements de fusion. Cela pourrait s'expliquer par exemple par une dysfonction des protéines SNAREs, impliquées dans la fusion membranaire. En effet, la présence de domaines enrichis en cholestérol aux endosomes inhibe la fonction de ces protéines et diminue leur recyclage (Fraldi et al. 2010). De même, la protéine cPLA2 α est recrutée aux endosomes par des domaines riches en cholestérol et induit la vésiculation/scission de ces organites, ce qui pourrait expliquer le nombre important d'endosomes dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2 ou STARD3 (Cai, Caplan, and Naslavsky 2012). En régulant le cholestérol membranaire, MOSPD2 et STARD3 pourraient donc jouer sur la formation de nanodomains membranaires de la surface des endosomes, permettant le recrutement ou l'inhibition de différentes protéines ou complexes protéiques.

De plus, la composition membranaire endosomale en PIPs, lipides régulant de nombreux processus cellulaires, pourrait être impactée par la perte de MOSPD2. L'enzyme PIKfyve synthétise du PI(3,5)P₂ en partant du PI(3)P des endosomes tardifs, un lipide nécessaire au processus de reformation de lysosomes (Choy et al. 2018). Le PI(3,5)P₂, produit par PIKfyve, est un facteur important de l'acidification des vacuoles chez la levure en régulant la pompe à protons V-ATPase (Banerjee et al. 2019). L'inhibition de PIKfyve induit la coalescence du système endosomal et un défaut d'activité hydrolytique (S. H. Min et al. 2019; Soares et al. 2021; Choy et al. 2018). De plus, cette inhibition induit une augmentation du nombre d'ILVs dans les endosomes matures et réduit leur fusion avec les endolysosomes (Hessvik et al. 2016). Ce phénotype est proche de celui observé lors de la surexpression de STARD3, avec la baisse d'objets DQ-Red⁺/LysoTracker⁺ et une augmentation de leur taille. Au vu des nombreux paramètres communs, il est tentant de spéculer que dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2 ou STARD3, les endosomes tardifs sont enrichis en PI(3,5)P₂, alors que la surexpression de STARD3 entraînerait un enrichissement en PI(3)P. De manière intéressante, cet élargissement des endolysosomes causé par l'inhibition de PIKfyve peut être

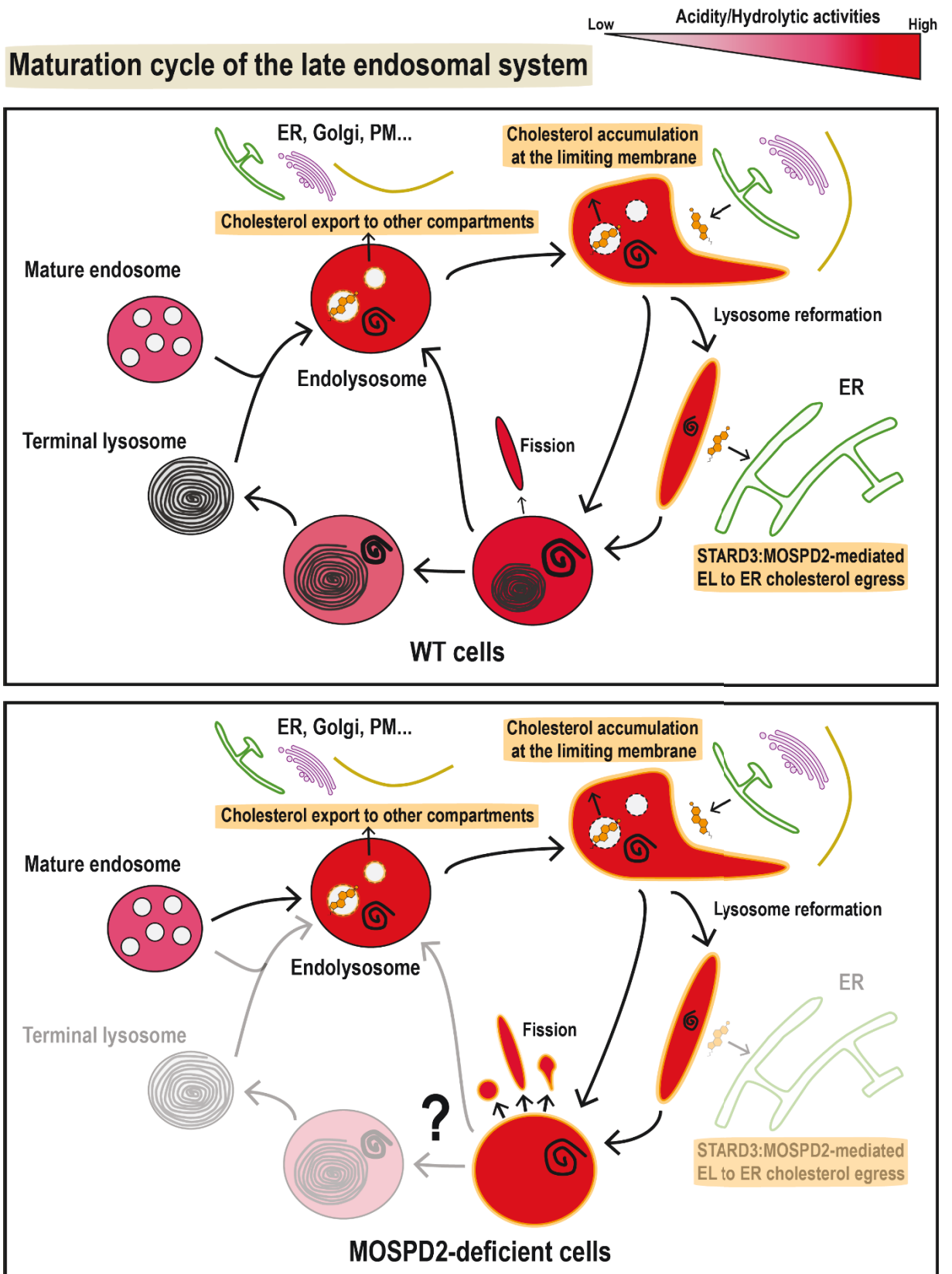
DISCUSSION

empêché en utilisant de la bafilomycin A1 (Compton et al. 2016). Cette molécule diminue l'acidification des endolysosomes en bloquant la pompe V-ATPase, mais inhibe également la fusion entre les endosomes tardifs de manière indépendante de son activité sur la V-ATPase (Mauvezin et al. 2015). L'action de cette molécule sur la coalescence des EL provoquée par la perte de PIKfyve dépendrait de son activité régulant la fusion endosomale, et non de son rôle sur l'acidification (Compton et al. 2016). Il serait intéressant d'utiliser de faibles doses de bafilomycin A1 lors de la surexpression de STARD3 afin de tester si l'on peut également inhiber la formation de larges endosomes. Cette expérience conforterait les données obtenues par Hölttä-Vuori *et al.*, suggérant que STARD3 promeut la fusion des endosomes (Hölttä-Vuori et al. 2005).

De manière intéressante, les domaines membranaires des endosomes enrichis en cholestérol régulent négativement l'autophagie chaperonne-dépendante (CMA) en séquestrant LAMP2-A et en bloquant sa multimérisation (Kaushik, Massey, and Cuervo 2006). En lien avec ces résultats, les cellules déficientes en MOSPD2 semblent présenter une augmentation de particules positives au marqueur de l'autophagie LC3 (données non montrées). Il serait intéressant de regarder plus en détail l'autophagie dans les cellules n'exprimant plus MOSPD2 et plus particulièrement la voie CMA qui semble régulée par les nanodomains enrichis en cholestérol.

Pour conclure, MOSPD2 est capable de moduler la maturation des endosomes en régulant la distribution du cholestérol à l'interface ER-Endosome. Cette modulation consisterait à modifier la composition membranaire des endosomes, permettant ainsi d'inhiber ou d'activer certaines protéines de manière séquentielle, altérant la balance de fission/fusion endosomale. Ces modifications seraient nécessaires au bon déroulement du processus de maturation, en régulant par exemple l'acidification des endosomes médiée par les contacts E-E ou en permettant le passage d'un stade à un autre dans le cycle de maturation des endosomes tardifs.

DISCUSSION



DISCUSSION

Figure D4. Rôle des contacts ER-E médiés par MOSPD2 sur le cycle de maturation du système endosomal tardif.

Dans les cellules sauvages (WT), les endosomes matures fusionnent ou échangent du matériel de manière transitoire avec les lysosomes afin de donner un compartiment hydrolytique actif nommé endolysosome. La digestion de macromolécules conduit à l'exportation de cholestérol du lumen vers différents organites. Les contacts ER-E médiés par le complexe d'interaction STARD3:MOSPD2 serait une voie d'export du cholestérol des endosomes vers le ER, en lien avec le processus de maturation des endosomes tardifs. L'accumulation de cholestérol à la membrane limitante des endosomes tardifs est peu fréquente dans ces cellules. Les endolysosomes/lysosomes sont capables de se reformer par fission membranaire, alimentant ainsi le cycle du système endosomal tardif.

Dans les cellules déficientes en MOSPD2, les endolysosomes actifs sont présents en grande quantité. On retrouve également une accumulation de cholestérol à la membrane limitante des endosomes tardifs, lié à un potentiel défaut d'exportation de ce cholestérol vers le ER, médié par le complexe STARD3:MOSPD2. Ce cholestérol pourrait provenir de la digestion des macromolécules ou bien d'un transport d'autres organites vers la membrane limitante des endosomes. Ce défaut de transport de cholestérol semble lié à une prédominance des événements de tubulation membranaire, associés au processus de fission. Par ailleurs, l'impact de la perte d'expression de MOSPD2 sur la formation de lysosomes matures (ou terminaux) est inconnu.

CONCLUSION

CONCLUSION

CONCLUSION

MOSPD2, une protéine intégrale du ER, a récemment été identifiée par l'équipe comme un membre de la famille des protéines VAPs (Di Mattia et al. 2018). A l'image de VAPA et de VAPB, MOSPD2 est capable de former des MCS entre le ER et d'autres organites grâce à son domaine MSP en interagissant avec des protéines à motif FFAT. Cette protéine possède un domaine additionnel nommé CRAL-TRIO, appartenant à la famille des domaines de transfert de lipide (LTDs), mais sa fonction restait indéterminée jusqu'à ce jour (Chiapparino et al. 2016). Mes travaux de thèse ont permis de montrer que MOSPD2, par ce domaine CRAL-TRIO, est capable d'induire la formation de MCS entre le ER et les LDs grâce à une interaction de type protéine-membrane médiée par une hélice amphipathique. De plus, MOSPD2 est impliquée dans l'homéostasie des LDs et régule leur processus de maturation. Le mécanisme moléculaire médié par le domaine CRAL-TRIO permettant cette régulation reste à déterminer, mais il est probable que MOSPD2 soit impliquée dans un remodelage membranaire local en exerçant une activité de présentation ou de transfert de lipides.

En plus de cette localisation ER-LD spécifique à MOSPD2, cette protéine se distingue aussi des protéines VAPs par sa forte capacité d'interaction et la formation d'un complexe stable avec la protéine endosomale STARD3. Même si les domaines MSP des protéines VAPs et MOSPD2 ont un mécanisme d'action commun, des différences d'affinité pour un même partenaire existent *in vitro* (Di Mattia et al. 2020). Mes travaux mettent en lumière l'impact fonctionnel de cette variation d'affinité dans la régulation d'un processus cellulaire : la maturation du système endosomal tardif. En effet, la protéine MOSPD2, par son domaine MSP, est capable de réguler les endosomes tardifs grâce à son interaction avec la protéine STARD3. Cette interaction n'est pas substituable par VAPA qui possède pourtant un domaine MSP, démontrant ainsi l'importance des affinités d'interaction entre les membres de cette famille et leurs conséquences fonctionnelles *in vivo*.

Ces travaux permettent de mieux comprendre le rôle de MOSPD2 dans l'homéostasie cellulaire et comment sa dérégulation pourrait favoriser le cancer. En effet, MOSPD2 régule le métabolisme du cholestérol et plus particulièrement les esters de stérols, impliqués dans l'agressivité tumorale (Antalis et al. 2010; Yue et al. 2014; de Gonzalo-Calvo et al. 2015). Ainsi, en modulant la disponibilité de ces lipides, et plus globalement des LDs, MOSPD2 pourrait réguler l'invasion tumorale. De même, en altérant la maturation du système endosomal, MOSPD2 serait capable de moduler des voies de signalisation comme EGFR/Akt en modifiant par exemple les processus de phosphorylation/déphosphorylation associés aux récepteurs à activité tyrosine kinase et leur recyclage. Par ailleurs, la modification de la composition membranaire des endosomes tardifs médiée par MOSPD2 pourrait également favoriser le

CONCLUSION

recrutement de protéines pro-tumorigènes, à l'image de Akt. Ainsi, les données obtenues dans cette thèse peuvent servir de piste d'étude afin de mieux caractériser le fonctionnement de MOSPD2 dans le cancer et peut-être à terme, pouvoir l'utiliser comme une cible thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Abramczyk, Halina, Jakub Surmacki, Monika Kopeć, Alicja Klaudia Olejnik, Katarzyna Lubecka-Pietruszewska, and Krystyna Fabianowska-Majewska. 2015. 'The Role of Lipid Droplets and Adipocytes in Cancer. Raman Imaging of Cell Cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 Compared to Adipocytes in Cancerous Human Breast Tissue'. *The Analyst* 140 (7): 2224–35. <https://doi.org/10.1039/C4AN01875C>.
2. Ajat, Mokrish, Martijn Molenaar, Jos F.H.M. Brouwers, Arie B. Vaandrager, Martin Houweling, and J. Bernd Helms. 2017. 'Hepatic Stellate Cells Retain the Capacity to Synthesize Retinyl Esters and to Store Neutral Lipids in Small Lipid Droplets in the Absence of LRAT'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862 (2): 176–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.10.013>.
3. Alberts, Bruce. 2015. *Molecular Biology of the Cell*. Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group.
4. Allison, Rachel, James R. Edgar, Guy Pearson, Tania Rizo, Timothy Newton, Sven Günther, Fiamma Berner, et al. 2017. 'Defects in ER–Endosome Contacts Impact Lysosome Function in Hereditary Spastic Paraplegia'. *Journal of Cell Biology* 216 (5): 1337–55. <https://doi.org/10.1083/jcb.201609033>.
5. Allison, Rachel, Jennifer H. Lumb, Coralie Fassier, James W. Connell, Daniel Ten Martin, Matthew N.J. Seaman, Jamilé Hazan, and Evan Reid. 2013. 'An ESCRT–Spastin Interaction Promotes Fission of Recycling Tubules from the Endosome'. *Journal of Cell Biology* 202 (3): 527–43. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211045>.
6. Alpy, Fabien, Adrien Rousseau, Yannick Schwab, François Legueux, Isabelle Stoll, Corinne Wendling, Coralie Spiegelhalter, et al. 2013. 'STARD3/STARD3NL and VAP Make a Novel Molecular Tether between Late Endosomes and the ER'. *Journal of Cell Science*, January, jcs.139295. <https://doi.org/10.1242/jcs.139295>.
7. Alpy, Fabien, Marie-Elisabeth Stoeckel, Andrée Dierich, Jean-Michel Escola, Corinne Wendling, Marie-Pierre Chenard, Marie T. Vanier, Jean Gruenberg, Catherine Tomasetto, and Marie-Christine Rio. 2001. 'The Steroidogenic Acute Regulatory Protein Homolog MLN64, a Late Endosomal Cholesterol-Binding Protein'. *Journal of Biological Chemistry* 276 (6): 4261–69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006279200>.
8. Alpy, Fabien, and Catherine Tomasetto. 2014. 'START Ships Lipids across Interorganelle Space'. *Biochimie* 96 (January): 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.015>.
9. Andersson, Linda, Pontus Boström, Johanna Ericson, Mikael Rutberg, Björn Magnusson, Denis Marchesan, Michel Ruiz, et al. 2006. 'PLD1 and ERK2 Regulate Cytosolic Lipid Droplet Formation'. *Journal of Cell Science* 119 (11): 2246–57. <https://doi.org/10.1242/jcs.02941>.

BIBLIOGRAPHIE

10. Antalis, Caryl J., Tyler Arnold, Tamkeen Rasool, Bonggi Lee, Kimberly K. Buhman, and Rafat A. Siddiqui. 2010. 'High ACAT1 Expression in Estrogen Receptor Negative Basal-like Breast Cancer Cells Is Associated with LDL-Induced Proliferation'. *Breast Cancer Research and Treatment* 122 (3): 661–70. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0594-8>.
11. Antunes, Patrícia, Adriana Cruz, José Barbosa, Vasco D. B. Bonifácio, and Sandra N. Pinto. 2022. 'Lipid Droplets in Cancer: From Composition and Role to Imaging and Therapeutics'. *Molecules* 27 (3): 991. <https://doi.org/10.3390/molecules27030991>.
12. Arai, Hiroyuki, and Nozomu Kono. 2021. 'α-Tocopherol Transfer Protein (α-TTP)'. *Free Radical Biology and Medicine* 176 (November): 162–75. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.09.021>.
13. Arlt, Henning, Xuewu Sui, Brayden Folger, Carson Adams, Xiao Chen, Roman Remme, Fred A. Hamprecht, et al. 2022. 'Seipin Forms a Flexible Cage at Lipid Droplet Formation Sites'. *Nature Structural & Molecular Biology* 29 (3): 194–202. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00718-y>.
14. Balboa, Elisa, Juan Castro, María-José Pinochet, Gonzalo I. Cancino, Nuria Matías, P J Sáez, Alexis Martínez, et al. 2017. 'MLN64 Induces Mitochondrial Dysfunction Associated with Increased Mitochondrial Cholesterol Content'. *Redox Biology* 12 (August): 274–84. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.024>.
15. Ballabio, Andrea, and Juan S. Bonifacino. 2020. 'Lysosomes as Dynamic Regulators of Cell and Organismal Homeostasis'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (2): 101–18. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0185-4>.
16. Banerjee, Subhrajit, Kaitlyn Clapp, Maureen Tarsio, and Patricia M. Kane. 2019. 'Interaction of the Late Endo-Lysosomal Lipid PI(3,5)P2 with the Vph1 Isoform of Yeast V-ATPase Increases Its Activity and Cellular Stress Tolerance'. *Journal of Biological Chemistry* 294 (23): 9161–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008552>.
17. Bankaitis, Vytas A., Jacqueline R. Aitken, Ann E. Cleves, and William Dowhan. 1990. 'An Essential Role for a Phospholipid Transfer Protein in Yeast Golgi Function'. *Nature* 347 (6293): 561–62. <https://doi.org/10.1038/347561a0>.
18. Bankaitis, Vytas A., Carl J. Mousley, and Gabriel Schaaf. 2010. 'The Sec14 Superfamily and Mechanisms for Crosstalk between Lipid Metabolism and Lipid Signaling'. *Trends in Biochemical Sciences* 35 (3): 150–60. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.008>.
19. Bankhead, Peter, Maurice B. Loughrey, José A. Fernández, Yvonne Dombrowski, Darragh G. McArt, Philip D. Dunne, Stephen McQuaid, et al. 2017. 'QuPath: Open Source Software for Digital Pathology Image Analysis'. *Scientific Reports* 7 (1): 16878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>.

BIBLIOGRAPHIE

20. Bannykh, Sergei I., Noriuki Nishimura, and William E. Balch. 1998. 'Getting into the Golgi'. *Trends in Cell Biology* 8 (1): 21–25. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(97\)01184-7](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(97)01184-7).
21. Barneda, David, Joan Planas-Iglesias, Maria L. Gaspar, Dariush Mohammadyani, Sunil Prasannan, Dirk Dormann, Gil-Soo Han, et al. 2015. 'The Brown Adipocyte Protein CIDEA Promotes Lipid Droplet Fusion via a Phosphatidic Acid-Binding Amphipathic Helix'. *ELife* 4 (November): e07485. <https://doi.org/10.7554/eLife.07485>.
22. Barral, Duarte C., Leopoldo Staiano, Cláudia Guimas Almeida, Dan F. Cutler, Emily R. Eden, Clare E. Futter, Antony Galione, et al. 2022. 'Current Methods to Analyze Lysosome Morphology, Positioning, Motility and Function'. *Traffic* 23 (5): 238–69. <https://doi.org/10.1111/tra.12839>.
23. Bartz, René, Wen-Hong Li, Barney Venables, John K. Zehmer, Mary R. Roth, Ruth Welti, Richard G.W. Anderson, Pingsheng Liu, and Kent D. Chapman. 2007. 'Lipidomics Reveals That Adiposomes Store Ether Lipids and Mediate Phospholipid Traffic',. *Journal of Lipid Research* 48 (4): 837–47. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600413-JLR200>.
24. Baumgart, Tobias, Samuel T. Hess, and Watt W. Webb. 2003. 'Imaging Coexisting Fluid Domains in Biomembrane Models Coupling Curvature and Line Tension'. *Nature* 425 (6960): 821–24. <https://doi.org/10.1038/nature02013>.
25. Becuwe, Michel, Laura M. Bond, Antonio F.M. Pinto, Sebastian Boland, Niklas Mejhert, Shane D. Elliott, Marcelo Cicconet, et al. 2020. 'FIT2 Is an Acyl-Coenzyme A Diphosphatase Crucial for Endoplasmic Reticulum Homeostasis'. *Journal of Cell Biology* 219 (10): e202006111. <https://doi.org/10.1083/jcb.202006111>.
26. Behnia, Rudy, and Sean Munro. 2005. 'Organelle Identity and the Signposts for Membrane Traffic'. *Nature* 438 (7068): 597–604. <https://doi.org/10.1038/nature04397>.
27. Ben M'barek, Kalthoum, Dalila Ajjaji, Aymeric Chorlay, Stefano Vanni, Lionel Forêt, and Abdou Rachid Thiam. 2017. 'ER Membrane Phospholipids and Surface Tension Control Cellular Lipid Droplet Formation'. *Developmental Cell* 41 (6): 591-604.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.05.012>.
28. Bernhard, W., and C. Rouiller. 1956. 'CLOSE TOPOGRAPHICAL RELATIONSHIP BETWEEN MITOCHONDRIA AND ERGASTOPLASM OF LIVER CELLS IN A DEFINITE PHASE OF CELLULAR ACTIVITY'. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2 (4): 73–78. <https://doi.org/10.1083/jcb.2.4.73>.
29. Bersuker, Kirill, and James A. Olzmann. 2017. 'Establishing the Lipid Droplet Proteome: Mechanisms of Lipid Droplet Protein Targeting and Degradation'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862 (10): 1166–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.06.006>.

BIBLIOGRAPHIE

30. Bigay, Joëlle, and Bruno Antonny. 2012. 'Curvature, Lipid Packing, and Electrostatics of Membrane Organelles: Defining Cellular Territories in Determining Specificity'. *Developmental Cell* 23 (5): 886–95. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.009>.
31. Bissig, C., and J. Gruenberg. 2013. 'Lipid Sorting and Multivesicular Endosome Biogenesis'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (10): a016816–a016816. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016816>.
32. Bissig, Christin, Ilse Hurbain, Graça Raposo, and Guillaume van Niel. 2017. 'PIKfyve Activity Regulates Reformation of Terminal Storage Lysosomes from Endolysosomes'. *Traffic* 18 (11): 747–57. <https://doi.org/10.1111/tra.12525>.
33. Blom, T., P. Somerharju, and E. Ikonen. 2011. 'Synthesis and Biosynthetic Trafficking of Membrane Lipids'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (8): a004713–a004713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004713>.
34. Boes, Deborah M., Albert Godoy-Hernandez, and Duncan G. G. McMillan. 2021. 'Peripheral Membrane Proteins: Promising Therapeutic Targets across Domains of Life'. *Membranes* 11 (5): 346. <https://doi.org/10.3390/membranes11050346>.
35. Botelho, Ana Vitória, Thomas Huber, Thomas P. Sakmar, and Michael F. Brown. 2006. 'Curvature and Hydrophobic Forces Drive Oligomerization and Modulate Activity of Rhodopsin in Membranes'. *Biophysical Journal* 91 (12): 4464–77. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.082776>.
36. Bozelli, José Carlos, and Richard M. Epand. 2020. 'Membrane Shape and the Regulation of Biological Processes'. *Journal of Molecular Biology* 432 (18): 5124–36. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.03.028>.
37. Bright, Nicholas A., Matthew J. Gratian, and J. Paul Luzio. 2005. 'Endocytic Delivery to Lysosomes Mediated by Concurrent Fusion and Kissing Events in Living Cells'. *Current Biology* 15 (4): 360–65. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.049>.
38. Bright, Nicholas A., Luther J. Davis, and J. Paul Luzio. 2016. 'Endolysosomes Are the Principal Intracellular Sites of Acid Hydrolase Activity'. *Current Biology* 26 (17): 2233–45. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.046>.
39. Brown, W J, J Goodhouse, and M G Farquhar. 1986. 'Mannose-6-Phosphate Receptors for Lysosomal Enzymes Cycle between the Golgi Complex and Endosomes.' *Journal of Cell Biology* 103 (4): 1235–47. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.4.1235>.
40. Bryant, Dale, Yang Liu, Sanchari Datta, Hanaa Hariri, Marian Seda, Glenn Anderson, Emma Peskett, et al. 2018. 'SNX14 Mutations Affect Endoplasmic Reticulum-Associated Neutral Lipid Metabolism in Autosomal Recessive Spinocerebellar Ataxia 20'. *Human Molecular Genetics* 27 (11): 1927–40. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy101>.

BIBLIOGRAPHIE

41. Burgoyne, Thomas, Sandip Patel, and Emily R. Eden. 2015. 'Calcium Signaling at ER Membrane Contact Sites'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853 (9): 2012–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.022>.
42. Cabukusta, Birol, Ilana Berlin, Daphne M. van Elsland, Iris Forkink, Menno Spits, Anja W.M. de Jong, Jimmy J.L.L. Akkermans, et al. 2020. 'Human VAPome Analysis Reveals MOSPD1 and MOSPD3 as Membrane Contact Site Proteins Interacting with FFAT-Related FFNT Motifs'. *Cell Reports* 33 (10): 108475. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108475>.
43. Cai, Bishuang, Steve Caplan, and Naava Naslavsky. 2012. 'CPLA2 α and EHD1 Interact and Regulate the Vesiculation of Cholesterol-Rich, GPI-Anchored, Protein-Containing Endosomes'. Edited by Jean E. Gruenberg. *Molecular Biology of the Cell* 23 (10): 1874–88. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-10-0881>.
44. Carpenter, Anne E, Thouis R Jones, Michael R Lamprecht, Colin Clarke, In Kang, Ola Friman, David A Guertin, et al. 2006. 'CellProfiler: Image Analysis Software for Identifying and Quantifying Cell Phenotypes'. *Genome Biology* 7 (10): R100. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>.
45. Casares, Doralicia, Pablo V. Escribá, and Catalina Ana Rosselló. 2019. 'Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues'. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (9): 2167. <https://doi.org/10.3390/ijms20092167>.
46. Cebecauer, Marek, Mariana Amaro, Piotr Jurkiewicz, Maria João Sarmiento, Radek Šachl, Lukasz Cwiklik, and Martin Hof. 2018. 'Membrane Lipid Nanodomains'. *Chemical Reviews* 118 (23): 11259–97. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00322>.
47. Chamier, Lucas von, Romain F. Laine, Johanna Jukkala, Christoph Spahn, Daniel Krentzel, Elias Nehme, Martina Lerche, et al. 2021. 'Democratising Deep Learning for Microscopy with ZeroCostDL4Mic'. *Nature Communications* 12 (1): 2276. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22518-0>.
48. Charman, Mark, Barry E. Kennedy, Nolan Osborne, and Barbara Karten. 2010. 'MLN64 Mediates Egress of Cholesterol from Endosomes to Mitochondria in the Absence of Functional Niemann-Pick Type C1 Protein'. *Journal of Lipid Research* 51 (5): 1023–34. <https://doi.org/10.1194/jlr.M002345>.
49. Chen, Shuliang, Melissa A Roberts, Chun-Yuan Chen, Sebastian Markmiller, Hong-Guang Wei, Gene W Yeo, James G Granneman, James A Olzmann, and Susan Ferro-Novick. 2022. 'VPS13A and VPS13C Influence Lipid Droplet Abundance'.
50. Cherezov, Vadim, Daniel M. Rosenbaum, Michael A. Hanson, Søren G. F. Rasmussen, Foon Sun Thian, Tong Sun Kobilka, Hee-Jung Choi, et al. 2007. 'High-Resolution Crystal

BIBLIOGRAPHIE

- Structure of an Engineered Human β_2 -Adrenergic G Protein–Coupled Receptor'. *Science* 318 (5854): 1258–65. <https://doi.org/10.1126/science.1150577>.
51. Chiapparino, Antonella, Kenji Maeda, Denes Turei, Julio Saez-Rodriguez, and Anne-Claude Gavin. 2016. 'The Orchestra of Lipid-Transfer Proteins at the Crossroads between Metabolism and Signaling'. *Progress in Lipid Research* 61 (January): 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.10.004>.
 52. Cho, Wonhwa, and Robert V. Stahelin. 2005. 'Membrane-Protein Interactions in Cell Signaling and Membrane Trafficking'. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 34 (1): 119–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.33.110502.133337>.
 53. Chorlay, Aymeric, and Abdou Rachid Thiam. 2018. 'An Asymmetry in Monolayer Tension Regulates Lipid Droplet Budding Direction'. *Biophysical Journal* 114 (3): 631–40. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.12.014>.
 54. ———. 2020. 'Neutral Lipids Regulate Amphipathic Helix Affinity for Model Lipid Droplets'. *Journal of Cell Biology* 219 (4): e201907099. <https://doi.org/10.1083/jcb.201907099>.
 55. Choudhary, Vineet, Gonen Golani, Amit S. Joshi, Stéphanie Cottier, Roger Schneider, William A. Prinz, and Michael M. Kozlov. 2018. 'Architecture of Lipid Droplets in Endoplasmic Reticulum Is Determined by Phospholipid Intrinsic Curvature'. *Current Biology* 28 (6): 915–926.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.020>.
 56. Choudhary, Vineet, Namrata Ojha, Andy Golden, and William A. Prinz. 2015. 'A Conserved Family of Proteins Facilitates Nascent Lipid Droplet Budding from the ER'. *Journal of Cell Biology* 211 (2): 261–71. <https://doi.org/10.1083/jcb.201505067>.
 57. Choy, Christopher H., Golam Saffi, Matthew A. Gray, Callen Wallace, Roya M. Dayam, Zhen-Yi A. Ou, Guy Lenk, Rosa Puertollano, Simon C. Watkins, and Roberto J. Botelho. 2018. 'Lysosome Enlargement during Inhibition of the Lipid Kinase PIKfyve Proceeds through Lysosome Coalescence'. *Journal of Cell Science*, January, jcs.213587. <https://doi.org/10.1242/jcs.213587>.
 58. Chung, J., F. Torta, K. Masai, L. Lucast, H. Czapla, L. B. Tanner, P. Narayanaswamy, M. R. Wenk, F. Nakatsu, and P. De Camilli. 2015. 'PI4P/Phosphatidylserine Countertransport at ORP5- and ORP8-Mediated ER-Plasma Membrane Contacts'. *Science* 349 (6246): 428–32. <https://doi.org/10.1126/science.aab1370>.
 59. Chung, Jeeyun, Xudong Wu, Talley J. Lambert, Zon Weng Lai, Tobias C. Walther, and Robert V. Farese. 2019. 'LDAF1 and Seipin Form a Lipid Droplet Assembly Complex'. *Developmental Cell* 51 (5): 551–563.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.006>.
 60. Chung, Stacey, Mikel Ghelfi, Jeffrey Atkinson, Robert Parker, Jinghui Qian, Cathleen Carlin, and Danny Manor. 2016. 'Vitamin E and Phosphoinositides Regulate the

BIBLIOGRAPHIE

- Intracellular Localization of the Hepatic α -Tocopherol Transfer Protein'. *Journal of Biological Chemistry* 291 (33): 17028–39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.734210>.
61. Coleman, R. 2004. 'Enzymes of Triacylglycerol Synthesis and Their Regulation'. *Progress in Lipid Research* 43 (2): 134–76. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00051-1).
 62. Compton, Lauren M., Ognian C. Ikononov, Diego Sbrissa, Puneet Garg, and Assia Shisheva. 2016. 'Active Vacuolar H⁺ ATPase and Functional Cycle of Rab5 Are Required for the Vacuolation Defect Triggered by PtdIns(3,5)P₂ Loss under PIKfyve or Vps34 Deficiency'. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 311 (3): C366–77. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00104.2016>.
 63. Čopič, Alenka, Sandra Antoine-Bally, Manuel Giménez-Andrés, César La Torre Garay, Bruno Antonny, Marco M. Manni, Sophie Pagnotta, Jeanne Guihot, and Catherine L. Jackson. 2018. 'A Giant Amphipathic Helix from a Perilipin That Is Adapted for Coating Lipid Droplets'. *Nature Communications* 9 (1): 1332. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03717-8>.
 64. Cornell, Rosemary B. 2016. 'Membrane Lipid Compositional Sensing by the Inducible Amphipathic Helix of CCT'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861 (8): 847–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.12.022>.
 65. Corradi, Valentina, Besian I. Sejdiu, Haydee Mesa-Galloso, Haleh Abdizadeh, Sergei Yu. Noskov, Siewert J. Marrink, and D. Peter Tieleman. 2019. 'Emerging Diversity in Lipid–Protein Interactions'. *Chemical Reviews* 119 (9): 5775–5848. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00451>.
 66. Costello, Joseph L., Inês G. Castro, Christian Hacker, Tina A. Schrader, Jeremy Metz, Dagmar Zeuschner, Afsoon S. Azadi, et al. 2017. 'ACBD5 and VAPB Mediate Membrane Associations between Peroxisomes and the ER'. *Journal of Cell Biology* 216 (2): 331–42. <https://doi.org/10.1083/jcb.201607055>.
 67. Cremer, Tom, Marlieke L.M. Jongsma, Fredrik Trulsson, Alfred C.O. Vertegaal, Jacques Neefjes, and Ilana Berlin. 2021. 'The ER-Embedded UBE2J1/RNF26 Ubiquitylation Complex Exerts Spatiotemporal Control over the Endolysosomal Pathway'. *Cell Reports* 34 (3): 108659. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108659>.
 68. Currie, Erin, Almut Schulze, Rudolf Zechner, Tobias C. Walther, and Robert V. Farese. 2013. 'Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer'. *Cell Metabolism* 18 (2): 153–61. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.017>.
 69. Curwin, Amy, and Christopher McMaster. 2008. 'Structure and Function of the Enigmatic Sec14 Domain-Containing Proteins and Theetiology of Human Disease'. *Future Lipidology* 3 (4): 399–410. <https://doi.org/10.2217/17460875.3.4.399>.

BIBLIOGRAPHIE

70. Czabany, Tibor, Andrea Wagner, Dagmar Zweytick, Karl Lohner, Erich Leitner, Elisabeth Ingolic, and Günther Daum. 2008. 'Structural and Biochemical Properties of Lipid Particles from the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*'. *Journal of Biological Chemistry* 283 (25): 17065–74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800401200>.
71. Das, Akash, Michael S Brown, Donald D Anderson, Joseph L Goldstein, and Arun Radhakrishnan. 2014. 'Three Pools of Plasma Membrane Cholesterol and Their Relation to Cholesterol Homeostasis'. *ELife* 3 (June): e02882. <https://doi.org/10.7554/eLife.02882>.
72. Datta, Sanchari, Jade Bowerman, Hanaa Hariri, Rupali Ugrankar, Kaitlyn M. Eckert, Chase Corley, Gonçalo Vale, Jeffrey G. McDonald, and W. Mike Henne. 2020. 'Snx14 Proximity Labeling Reveals a Role in Saturated Fatty Acid Metabolism and ER Homeostasis Defective in SCAR20 Disease'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (52): 33282–94. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011124117>.
73. Datta, Sanchari, Yang Liu, Hanaa Hariri, Jade Bowerman, and W. Mike Henne. 2019. 'Cerebellar Ataxia Disease–Associated Snx14 Promotes Lipid Droplet Growth at ER–Droplet Contacts'. *Journal of Cell Biology* 218 (4): 1335–51. <https://doi.org/10.1083/jcb.201808133>.
74. De Matteis, Maria Antonietta, and Alberto Luini. 2008. 'Exiting the Golgi Complex'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (4): 273–84. <https://doi.org/10.1038/nrm2378>.
75. De Vos, Kurt J., Gábor M. Mórotz, Radu Stoica, Elizabeth L. Tudor, Kwok-Fai Lau, Steven Ackerley, Alice Warley, Christopher E. Shaw, and Christopher C.J. Miller. 2012. 'VAPB Interacts with the Mitochondrial Protein PTPIP51 to Regulate Calcium Homeostasis'. *Human Molecular Genetics* 21 (6): 1299–1311. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr559>.
76. Del Vecchio, Kathryn, and Robert V. Stahelin. 2016. 'Using Surface Plasmon Resonance to Quantitatively Assess Lipid–Protein Interactions'. In *Lipid Signaling Protocols*, edited by Mark G. Waugh, 1376:141–53. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3170-5_12.
77. Derby, Merran C., and Paul A. Gleeson. 2007. 'New Insights into Membrane Trafficking and Protein Sorting'. In *International Review of Cytology*, 261:47–116. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)61002-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)61002-X).
78. Di Mattia, Thomas, Arthur Martinet, Souade Ikhlef, Alastair G McEwen, Yves Nominé, Corinne Wendling, Pierre Poussin-Courmontagne, et al. 2020. 'FFAT Motif Phosphorylation Controls Formation and Lipid Transfer Function of Inter-organelle Contacts'. *The EMBO Journal* 39 (23). <https://doi.org/10.15252/embj.2019104369>.
79. Di Mattia, Thomas, Catherine Tomasetto, and Fabien Alpy. 2020. 'Faraway, so Close! Functions of Endoplasmic Reticulum–Endosome Contacts'. *Biochimica et Biophysica* 142

BIBLIOGRAPHIE

- Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1865 (1): 158490.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.06.016>.
80. Di Mattia, Thomas, Léa P Wilhelm, Souade Ikhlef, Corinne Wendling, Danièle Spehner, Yves Nominé, Francesca Giordano, et al. 2018. 'Identification of MOSPD2, a Novel Scaffold for Endoplasmic Reticulum Membrane Contact Sites'. *EMBO Reports* 19 (7).
<https://doi.org/10.15252/embr.201745453>.
 81. DiNitto, Jonathan P., Thomas C. Cronin, and David G. Lambright. 2003. 'Membrane Recognition and Targeting by Lipid-Binding Domains'. *Science's STKE* 2003 (213).
<https://doi.org/10.1126/stke.2132003re16>.
 82. Dong, Rui, Yasunori Saheki, Sharan Swarup, Louise Lucast, J. Wade Harper, and Pietro De Camilli. 2016. 'Endosome-ER Contacts Control Actin Nucleation and Retromer Function through VAP-Dependent Regulation of PI4P'. *Cell* 166 (2): 408–23.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.037>.
 83. Dowhan, William, and Mikhail Bogdanov. 2002. 'Functional Roles of Lipids in Membranes'. In *New Comprehensive Biochemistry*. Vol. 36. Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(02\)36003-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(02)36003-4).
 84. Drin, Guillaume, and Bruno Antonny. 2010. 'Amphipathic Helices and Membrane Curvature'. *FEBS Letters* 584 (9): 1840–47.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.022>.
 85. Du, Ximing, Jaspal Kumar, Charles Ferguson, Timothy A. Schulz, Yan Shan Ong, Wanjin Hong, William A. Prinz, Robert G. Parton, Andrew J. Brown, and Hongyuan Yang. 2011. 'A Role for Oxysterol-Binding Protein–Related Protein 5 in Endosomal Cholesterol Trafficking'. *Journal of Cell Biology* 192 (1): 121–35.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201004142>.
 86. Du, Ximing, Linkang Zhou, Yvette Celine Aw, Hoi Yin Mak, Yanqing Xu, James Rae, Wenmin Wang, et al. 2020. 'ORP5 Localizes to ER–Lipid Droplet Contacts and Regulates the Level of PI(4)P on Lipid Droplets'. *Journal of Cell Biology* 219 (1): e201905162.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201905162>.
 87. Dumesnil, Calvin, Lauri Vanharanta, Xavier Prasanna, Mohyeddine Omrane, Maxime Carpentier, Apoorva Bhapkar, Giray Enkavi, et al. 2023. 'Cholesterol Esters Form Supercooled Lipid Droplets Whose Nucleation Is Facilitated by Triacylglycerols'. *Nature Communications* 14 (1): 915. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36375-6>.
 88. Duvvuri, Muralikrishna, Yuping Gong, Dev Chatterji, and Jeffrey P. Krise. 2004. 'Weak Base Permeability Characteristics Influence the Intracellular Sequestration Site in the Multidrug-Resistant Human Leukemic Cell Line HL-60'. *Journal of Biological Chemistry* 279 (31): 32367–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400735200>.

BIBLIOGRAPHIE

89. Eberlé, Delphine, Bronwyn Hegarty, Pascale Bossard, Pascal Ferré, and Fabienne Foufelle. 2004. 'SREBP Transcription Factors: Master Regulators of Lipid Homeostasis'. *Biochimie* 86 (11): 839–48. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.018>.
90. Ebner, Michael, Iva Lučić, Thomas A. Leonard, and Ivan Yudushkin. 2017. 'PI(3,4,5)P 3 Engagement Restricts Akt Activity to Cellular Membranes'. *Molecular Cell* 65 (3): 416–431.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.028>.
91. Eden, Emily R., Elena Sanchez-Heras, Anna Tsapara, Andrzej Sobota, Tim P. Levine, and Clare E. Futter. 2016. 'Annexin A1 Tethers Membrane Contact Sites That Mediate ER to Endosome Cholesterol Transport'. *Developmental Cell* 37 (5): 473–83. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.05.005>.
92. Egea, Pascal F. 2021. 'Mechanisms of Non-Vesicular Exchange of Lipids at Membrane Contact Sites: Of Shuttles, Tunnels and, Funnels'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (November). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.784367>.
93. Eisenberg-Bord, Michal, Nadav Shai, Maya Schuldiner, and Maria Bohnert. 2016. 'A Tether Is a Tether Is a Tether: Tethering at Membrane Contact Sites'. *Developmental Cell* 39 (4): 395–409. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.10.022>.
94. Ernst, Robert, Stephanie Ballweg, and Ilya Levental. 2018. 'Cellular Mechanisms of Physicochemical Membrane Homeostasis'. *Current Opinion in Cell Biology* 53 (August): 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.04.013>.
95. Fader Kaiser, Claudio M., Patricia S. Romano, M. Cristina Vanrell, Cristian A. Pocognoni, Julieta Jacob, Benjamín Caruso, and Laura R. Delgui. 2022. 'Biogenesis and Breakdown of Lipid Droplets in Pathological Conditions'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (February): 826248. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.826248>.
96. Fagone, Paolo, and Suzanne Jackowski. 2009. 'Membrane Phospholipid Synthesis and Endoplasmic Reticulum Function'. *Journal of Lipid Research* 50 (April): S311–16. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800049-JLR200>.
97. Fahy, Eoin, Dawn Cotter, Manish Sud, and Shankar Subramaniam. 2011. 'Lipid Classification, Structures and Tools'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811 (11): 637–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.009>.
98. Fang, Yimin, Montserrat Vilella-Bach, Rebecca Bachmann, Asa Flanigan, and Jie Chen. 2001. 'Phosphatidic Acid-Mediated Mitogenic Activation of MTOR Signaling'. *Science* 294 (5548): 1942–45. <https://doi.org/10.1126/science.1066015>.
99. Fei, Weihua, Guanghou Shui, Yuxi Zhang, Natalie Krahmer, Charles Ferguson, Tamar S. Kapterian, Ruby C. Lin, et al. 2011. 'A Role for Phosphatidic Acid in the Formation of

BIBLIOGRAPHIE

- “Supersized” Lipid Droplets’. Edited by Kaveh Ashrafi. *PLoS Genetics* 7 (7): e1002201. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002201>.
100. Fernández-Busnadiego, Rubén, Yasunori Saheki, and Pietro De Camilli. 2015. ‘Three-Dimensional Architecture of Extended Synaptotagmin-Mediated Endoplasmic Reticulum–Plasma Membrane Contact Sites’. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (16). <https://doi.org/10.1073/pnas.1503191112>.
 101. Ford, Marijn G. J., Ian G. Mills, Brian J. Peter, Yvonne Vallis, Gerrit J. K. Praefcke, Philip R. Evans, and Harvey T. McMahon. 2002. ‘Curvature of Clathrin-Coated Pits Driven by Epsin’. *Nature* 419 (6905): 361–66. <https://doi.org/10.1038/nature01020>.
 102. Fraldi, Alessandro, Fabio Annunziata, Alessia Lombardi, Hermann-Josef Kaiser, Diego Luis Medina, Carmine Spanpanato, Anthony Olind Fedele, et al. 2010. ‘Lysosomal Fusion and SNARE Function Are Impaired by Cholesterol Accumulation in Lysosomal Storage Disorders’. *The EMBO Journal* 29 (21): 3607–20. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.237>.
 103. Freyre, Christophe A.C., Pascal C. Rauher, Christer S. Ejsing, and Robin W. Klemm. 2019. ‘MIGA2 Links Mitochondria, the ER, and Lipid Droplets and Promotes De Novo Lipogenesis in Adipocytes’. *Molecular Cell* 76 (5): 811–825.e14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.011>.
 104. Friedman, Jonathan R., Jared R. DiBenedetto, Matthew West, Ashley A. Rowland, and Gia K. Voeltz. 2013. ‘Endoplasmic Reticulum–Endosome Contact Increases as Endosomes Traffic and Mature’. Edited by Ramanujan S. Hegde. *Molecular Biology of the Cell* 24 (7): 1030–40. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-10-0733>.
 105. Friedman, Jonathan R., and Gia K. Voeltz. 2011. ‘The ER in 3D: A Multifunctional Dynamic Membrane Network’. *Trends in Cell Biology* 21 (12): 709–17. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.004>.
 106. Ganji, Rakesh, Joao A. Paulo, Yuecheng Xi, Ian Kline, Jiang Zhu, Christoph S. Clemen, Conrad C. Wehl, John G. Purdy, Steve P. Gygi, and Malavika Raman. 2023. ‘The P97-UBXD8 Complex Regulates ER-Mitochondria Contact Sites by Altering Membrane Lipid Saturation and Composition’. *Nature Communications* 14 (1): 638. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36298-2>.
 107. Gao, Qiang, Derk D. Binns, Lisa N. Kinch, Nick V. Grishin, Natalie Ortiz, Xiao Chen, and Joel M. Goodman. 2017. ‘Pet10p Is a Yeast Perilipin That Stabilizes Lipid Droplets and Promotes Their Assembly’. *Journal of Cell Biology* 216 (10): 3199–3217. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610013>.
 108. Garcia-Parajo, Maria F., Alessandra Cambi, Juan A. Torreno-Pina, Nancy Thompson, and Ken Jacobson. 2014. ‘Nanoclustering as a Dominant Feature of Plasma Membrane

BIBLIOGRAPHIE

- Organization'. *Journal of Cell Science* 127 (23): 4995–5005.
<https://doi.org/10.1242/jcs.146340>.
109. Giménez-Andrés, Manuel, Alenka Čopič, and Bruno Antonny. 2018. 'The Many Faces of Amphipathic Helices'. *Biomolecules* 8 (3): 45. <https://doi.org/10.3390/biom8030045>.
110. Giorgi, Carlotta, Keisuke Ito, Hui-Kuan Lin, Clara Santangelo, Mariusz R. Wieckowski, Magdalena Lebiedzinska, Angela Bononi, et al. 2010. 'PML Regulates Apoptosis at Endoplasmic Reticulum by Modulating Calcium Release'. *Science* 330 (6008): 1247–51.
<https://doi.org/10.1126/science.1189157>.
111. Goñi, Félix M. 2002. 'Non-Permanent Proteins in Membranes: When Proteins Come as Visitors (Review)'. *Molecular Membrane Biology* 19 (4): 237–45.
<https://doi.org/10.1080/0968768021000035078>.
112. Gonzalo-Calvo, David de, Laura López-Vilaró, Laura Nasarre, Maitane Perez-Olabarria, Tania Vázquez, Daniel Escuin, Lina Badimon, Agusti Barnadas, Enrique Lerma, and Vicenta Llorente-Cortés. 2015. 'Intratumor Cholesteryl Ester Accumulation Is Associated with Human Breast Cancer Proliferation and Aggressive Potential: A Molecular and Clinicopathological Study'. *BMC Cancer* 15 (1).
<https://doi.org/10.1186/s12885-015-1469-5>.
113. Goodman, Joel M. 2009. 'Demonstrated and Inferred Metabolism Associated with Cytosolic Lipid Droplets'. *Journal of Lipid Research* 50 (11): 2148–56.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R001446>.
114. Graber, Zachary T., Arne Gericke, and Edgar E. Kooijman. 2014. 'Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate Ionization in the Presence of Cholesterol, Calcium or Magnesium Ions'. *Chemistry and Physics of Lipids* 182 (September): 62–72.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.11.004>.
115. Graham, Todd R, and Michael M Kozlov. 2010. 'Interplay of Proteins and Lipids in Generating Membrane Curvature'. *Current Opinion in Cell Biology* 22 (4): 430–36.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.05.002>.
116. Gruenberg, Jean. 2020. 'Life in the Lumen: The Multivesicular Endosome'. *Traffic* 21 (1): 76–93. <https://doi.org/10.1111/tra.12715>.
117. Guo, Yuting, Di Li, Siwei Zhang, Yanrui Yang, Jia-Jia Liu, Xinyu Wang, Chong Liu, et al. 2018. 'Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales'. *Cell* 175 (5): 1430-1442.e17.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.057>.
118. Guyard, Valentin, Vera Filipa Monteiro-Cardoso, Mohyeddine Omrane, Cécile Sauvanet, Audrey Houcine, Claire Boulogne, Kalthoum Ben Mbarek, et al. 2022. 'ORP5 and ORP8 Orchestrate Lipid Droplet Biogenesis and Maintenance at ER–Mitochondria

BIBLIOGRAPHIE

- Contact Sites'. *Journal of Cell Biology* 221 (9): e202112107. <https://doi.org/10.1083/jcb.202112107>.
119. Hammond, Gerald R.V., and Tamas Balla. 2015. 'Polyphosphoinositide Binding Domains: Key to Inositol Lipid Biology'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851 (6): 746–58. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.02.013>.
 120. Hanada, Kentaro. 2018. 'Lipid Transfer Proteins Rectify Inter-Organelle Flux and Accurately Deliver Lipids at Membrane Contact Sites'. *Journal of Lipid Research* 59 (8): 1341–66. <https://doi.org/10.1194/jlr.R085324>.
 121. Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. 'Hallmarks of Cancer: The Next Generation'. *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
 122. Hankins, Hannah M., Ryan D. Baldrige, Peng Xu, and Todd R. Graham. 2015. 'Role of Flippases, Scramblases and Transfer Proteins in Phosphatidylserine Subcellular Distribution'. *Traffic* 16 (1): 35–47. <https://doi.org/10.1111/tra.12233>.
 123. Hansen, Scott B., Xiao Tao, and Roderick MacKinnon. 2011. 'Structural Basis of PIP2 Activation of the Classical Inward Rectifier K⁺ Channel Kir2.2'. *Nature* 477 (7365): 495–98. <https://doi.org/10.1038/nature10370>.
 124. Hanulová, Mária, and Matthias Weiss. 2012. 'Protein Sorting and Membrane-Mediated Interactions'. *Biophysical Reviews* 4 (2): 117–24. <https://doi.org/10.1007/s12551-012-0069-8>.
 125. Harayama, Takeshi, and Howard Riezman. 2018. 'Understanding the Diversity of Membrane Lipid Composition'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (5): 281–96. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>.
 126. Hayes, Matthew J, Vineet Choudhary, Namrata Ojha, John JH Shin, Gil-Soo Han, George M. Carman, Christopher JR Loewen, William A Prinz, and Timothy P Levine. 2018. 'Fat Storage-Inducing Transmembrane (FIT or FITM) Proteins Are Related to Lipid Phosphatase/Phosphotransferase Enzymes'. *Microbial Cell* 5 (2): 88–103. <https://doi.org/10.15698/mic2018.02.614>.
 127. He, Ju, Rachel M. Haney, Mohsin Vora, Vladislav V. Verkhusha, Robert V. Stahelin, and Tatiana G. Kutateladze. 2008. 'Molecular Mechanism of Membrane Targeting by the GRP1 PH Domain*'. *Journal of Lipid Research* 49 (8): 1807–15. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800150-JLR200>.
 128. Heald, Rebecca, and Orna Cohen-Fix. 2014. 'Morphology and Function of Membrane-Bound Organelles'. *Current Opinion in Cell Biology* 26 (February): 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.10.006>.

BIBLIOGRAPHIE

129. Hegde, Ramanujan S., and Robert J. Keenan. 2022. 'The Mechanisms of Integral Membrane Protein Biogenesis'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 23 (2): 107–24. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00413-2>.
130. Helbling, Rachel E., Christos Lamprakis, Walter Aeschmann, Cristin S. Bolze, Achim Stocker, and Michele Cascella. 2014. 'Mechanisms of Ligand–Protein Interaction in Sec-14-like Transporters Investigated by Computer Simulations'. *CHIMIA* 68 (9): 615. <https://doi.org/10.2533/chimia.2014.615>.
131. Helfer, Emmanuèle, Michael E. Harbour, Véronique Henriot, Goran Lakisic, Carla Sousa-Blin, Larisa Volceanov, Matthew N.J. Seaman, and Alexis Gautreau. 2013. 'Endosomal Recruitment of the WASH Complex: Active Sequences and Mutations Impairing Interaction with the Retromer: Retromer-WASH Complex Interaction'. *Biology of the Cell* 105 (5): 191–207. <https://doi.org/10.1111/boc.201200038>.
132. Henne, Mike, Joel M. Goodman, and Hanaa Hariri. 2020. 'Spatial Compartmentalization of Lipid Droplet Biogenesis'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1865 (1): S1388198119301283. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.07.008>.
133. Herker, Eva, Gabrielle Vieyres, Mathias Beller, Natalie Krahmer, and Maria Bohnert. 2021. 'Lipid Droplet Contact Sites in Health and Disease'. *Trends in Cell Biology* 31 (5): 345–58. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.01.004>.
134. Hermansson, Martin, Kati Hokynar, and Pentti Somerharju. 2011. 'Mechanisms of Glycerophospholipid Homeostasis in Mammalian Cells'. *Progress in Lipid Research* 50 (3): 240–57. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.02.004>.
135. Hessvik, Nina Pettersen, Anders Øverbye, Andreas Brech, Maria Lyngaas Torgersen, Ida Seim Jakobsen, Kirsten Sandvig, and Alicia Llorente. 2016. 'PIKfyve Inhibition Increases Exosome Release and Induces Secretory Autophagy'. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (24): 4717–37. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2309-8>.
136. Heybrock, Saskia, Kristiina Kanerva, Ying Meng, Chris Ing, Anna Liang, Zi-Jian Xiong, Xialian Weng, et al. 2019. 'Lysosomal Integral Membrane Protein-2 (LIMP-2/SCARB2) Is Involved in Lysosomal Cholesterol Export'. *Nature Communications* 10 (1): 3521. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11425-0>.
137. Höglinger, D., T. Burgoyne, E. Sanchez-Heras, P. Hartwig, A. Colaco, J. Newton, C. E. Futter, S. Spiegel, F. M. Platt, and E. R Eden. 2019. 'NPC1 Regulates ER Contacts with Endocytic Organelles to Mediate Cholesterol Egress'. *Nature Communications* 10 (1): 4276. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12152-2>.

BIBLIOGRAPHIE

138. Holthuis, Joost C. M., and Tim P. Levine. 2005. 'Lipid Traffic: Floppy Drives and a Superhighway'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (3): 209–20. <https://doi.org/10.1038/nrm1591>.
139. Holthuis, Joost C.M., and Anant K. Menon. 2014. 'Lipid Landscapes and Pipelines in Membrane Homeostasis'. *Nature* 510 (7503): 48–57. <https://doi.org/10.1038/nature13474>.
140. Hölttä-Vuori, Maarit, Fabien Alpy, Kimmo Tanhuanpää, Eija Jokitalo, Aino-Liisa Mutka, and Elina Ikonen. 2005. 'MLN64 Is Involved in Actin-Mediated Dynamics of Late Endocytic Organelles'. *Molecular Biology of the Cell* 16 (8): 3873–86. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-12-1105>.
141. Hom, Robert A., Mohsin Vora, Maryann Regner, Oksana M. Subach, Wonhwa Cho, Vladislav V. Verkhusha, Robert V. Stahelin, and Tatiana G. Kutateladze. 2007. 'PH-Dependent Binding of the Epsin ENTH Domain and the AP180 ANTH Domain to PI(4,5)P2-Containing Bilayers'. *Journal of Molecular Biology* 373 (2): 412–23. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.08.016>.
142. Hoyer, Melissa J., Patrick J. Chitwood, Christopher C. Ebmeier, Jonathan F. Striepen, Robert Z. Qi, William M. Old, and Gia K. Voeltz. 2018. 'A Novel Class of ER Membrane Proteins Regulates ER-Associated Endosome Fission'. *Cell* 175 (1): 254-265.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.030>.
143. Hsieh, Kai, Yun Kyung Lee, Constantine Londos, Bruce M. Raaka, Knut Tomas Dalen, and Alan R. Kimmel. 2012. 'Perilipin Family Members Preferentially Sequester to Either Triacylglycerol-Specific or Cholesteryl-Ester-Specific Intracellular Lipid Storage Droplets'. *Journal of Cell Science* 125 (17): 4067–76. <https://doi.org/10.1242/jcs.104943>.
144. Huang, Xue, Chen Jiang, Lihua Yu, and Aimin Yang. 2020. 'Current and Emerging Approaches for Studying Inter-Organelle Membrane Contact Sites'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (March): 195. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00195>.
145. Huotari, Jatta, and Ari Helenius. 2011. 'Endosome Maturation: Endosome Maturation'. *The EMBO Journal* 30 (17): 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>.
146. Hurley, J. 2006. 'Membrane Binding Domains'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761 (8): 805–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.02.020>.
147. Hussain, Syed S., Tuyet-Minh Tran, Timothy B. Ware, Melissa A. Luse, Christopher T. Prevost, Ashley N. Ferguson, Jennifer A. Kashatus, Ku-Lung Hsu, and David F. Kashatus. 2021. 'RalA and PLD1 Promote Lipid Droplet Growth in Response to Nutrient Withdrawal'. *Cell Reports* 36 (4): 109451. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109451>.

BIBLIOGRAPHIE

148. Huttlin, Edward L., Raphael J. Bruckner, Jose Navarrete-Perea, Joe R. Cannon, Kurt Baltier, Fana Gebreab, Melanie P. Gygi, et al. 2021. 'Dual Proteome-Scale Networks Reveal Cell-Specific Remodeling of the Human Interactome'. *Cell* 184 (11): 3022-3040.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.011>.
149. Ikonen, Elina, and Xin Zhou. 2021. 'Cholesterol Transport between Cellular Membranes: A Balancing Act between Interconnected Lipid Fluxes'. *Developmental Cell* 56 (10): 1430–36. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.04.025>.
150. Ile, Kristina E, Gabriel Schaaf, and Vytas A Bankaitis. 2006. 'Phosphatidylinositol Transfer Proteins and Cellular Nanoreactors for Lipid Signaling'. *Nature Chemical Biology* 2 (11): 576–83. <https://doi.org/10.1038/nchembio835>.
151. Inobe, Tomonao, and Nobuyuki Nukina. 2016. 'Rapamycin-Induced Oligomer Formation System of FRB–FKBP Fusion Proteins'. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 122 (1): 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.12.004>.
152. Jacquier, Nicolas, Vineet Choudhary, Muriel Mari, Alexandre Toulmay, Fulvio Reggiori, and Roger Schneider. 2011. 'Lipid Droplets Are Functionally Connected to the Endoplasmic Reticulum in *Saccharomyces Cerevisiae*'. *Journal of Cell Science* 124 (14): 2424–37. <https://doi.org/10.1242/jcs.076836>.
153. Jamecna, Denisa, and Bruno Antonny. 2021. 'Intrinsically Disordered Protein Regions at Membrane Contact Sites'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1866 (11): 159020. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.159020>.
154. Jamecna, Denisa, Joël Polidori, Bruno Mesmin, Manuela Dezi, Daniel Levy, Joëlle Bigay, and Bruno Antonny. 2019. 'An Intrinsically Disordered Region in OSBP Acts as an Entropic Barrier to Control Protein Dynamics and Orientation at Membrane Contact Sites'. *Developmental Cell* 49 (2): 220-234.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.02.021>.
155. James, Christina, and Ralph H. Kehlenbach. 2021. 'The Interactome of the VAP Family of Proteins: An Overview'. *Cells* 10 (7): 1780. <https://doi.org/10.3390/cells10071780>.
156. James, Christina, Marret Müller, Martin W. Goldberg, Christof Lenz, Henning Urlaub, and Ralph H. Kehlenbach. 2019. 'Proteomic Mapping by Rapamycin-Dependent Targeting of APEX2 Identifies Binding Partners of VAPB at the Inner Nuclear Membrane'. *Journal of Biological Chemistry* 294 (44): 16241–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007283>.
157. Jang, Wonyul, Dmytro Puchkov, Paula Samsó, YongTian Liang, Michal Nadler-Holly, Stephan J. Sigrist, Ulrich Kintscher, et al. 2022. 'Endosomal Lipid Signaling Reshapes the Endoplasmic Reticulum to Control Mitochondrial Function'. *Science* 378 (6625): eabq5209. <https://doi.org/10.1126/science.abq5209>.

BIBLIOGRAPHIE

158. Jarc, Eva, Ana Kump, Petra Malavašič, Thomas O. Eichmann, Robert Zimmermann, and Toni Petan. 2018. 'Lipid Droplets Induced by Secreted Phospholipase A2 and Unsaturated Fatty Acids Protect Breast Cancer Cells from Nutrient and Lipotoxic Stress'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1863 (3): 247–65. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.12.006>.
159. Joshi, Amit S., Joey V. Ragusa, William A. Prinz, and Sarah Cohen. 2021. 'Multiple C2 Domain-Containing Transmembrane Proteins Promote Lipid Droplet Biogenesis and Growth at Specialized Endoplasmic Reticulum Subdomains'. Edited by James Olzmann. *Molecular Biology of the Cell* 32 (12): 1147–57. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-09-0590>.
160. Kaiser, Stephen E., Jason H. Brickner, Amy R. Reilein, Tim D. Fenn, Peter Walter, and Axel T. Brunger. 2005. 'Structural Basis of FFAT Motif-Mediated ER Targeting'. *Structure* 13 (7): 1035–45. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.04.010>.
161. Kant, Rik van der, Alexander Fish, Lennert Janssen, Hans Janssen, Sabine Krom, Nataschja Ho, Thijn Brummelkamp, Jan Carette, Nuno Rocha, and Jacques Neefjes. 2013. 'Late Endosomal Transport and Tethering Are Coupled Processes Controlled by RILP and the Cholesterol Sensor ORP1L'. *Journal of Cell Science*, January, jcs.129270. <https://doi.org/10.1242/jcs.129270>.
162. Kant, Rik van der, Ilse Zondervan, Lennert Janssen, and Jacques Neefjes. 2013. 'Cholesterol-Binding Molecules MLN64 and ORP1L Mark Distinct Late Endosomes with Transporters ABCA3 and NPC1'. *Journal of Lipid Research* 54 (8): 2153–65. <https://doi.org/10.1194/jlr.M037325>.
163. Kassas, Nawal, Emeline Tanguy, Tamou Thahouly, Laetitia Fouillen, Dimitri Heintz, Sylvette Chasserot-Golaz, Marie-France Bader, Nancy J. Grant, and Nicolas Vitale. 2017. 'Comparative Characterization of Phosphatidic Acid Sensors and Their Localization during Frustrated Phagocytosis'. *Journal of Biological Chemistry* 292 (10): 4266–79. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.742346>.
164. Katoh, Yohei, Brigitte Ritter, Thomas Gaffry, Francois Blondeau, Stefan Höning, and Peter S. McPherson. 2009. 'The Clavesin Family, Neuron-Specific Lipid- and Clathrin-Binding Sec14 Proteins Regulating Lysosomal Morphology'. *Journal of Biological Chemistry* 284 (40): 27646–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.034884>.
165. Kaushik, Susmita, Ashish C Massey, and Ana Maria Cuervo. 2006. 'Lysosome Membrane Lipid Microdomains: Novel Regulators of Chaperone-Mediated Autophagy'. *The EMBO Journal* 25 (17): 3921–33. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601283>.
166. Kay, Jason G., Mirkka Koivusalo, Xiaoxiao Ma, Thorsten Wohland, and Sergio Grinstein. 2012. 'Phosphatidylserine Dynamics in Cellular Membranes'. Edited by Jean

BIBLIOGRAPHIE

- E. Gruenberg. *Molecular Biology of the Cell* 23 (11): 2198–2212.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e11-11-0936>.
167. Kentala, Henriikka, Simon G. Pfisterer, Vesa M. Olkkonen, and Marion Weber-Boyvat. 2015. 'Sterol Liganding of OSBP-Related Proteins (ORPs) Regulates the Subcellular Distribution of ORP–VAPA Complexes and Their Impacts on Organelle Structure'. *Steroids* 99 (July): 248–58. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.01.027>.
168. King, Christopher, Prabuddha Sengupta, Arnold Y. Seo, and Jennifer Lippincott-Schwartz. 2020. 'ER Membranes Exhibit Phase Behavior at Sites of Organelle Contact'. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, March, 201910854. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910854117>.
169. Kitamata, Manabu, Takehiko Inaba, and Shiro Suetsugu. 2020. 'The Roles of the Diversity of Amphipathic Lipids in Shaping Membranes by Membrane-Shaping Proteins'. *Biochemical Society Transactions* 48 (3): 837–51. <https://doi.org/10.1042/BST20190376>.
170. Kobayashi, Toshihide, and Anant K. Menon. 2018. 'Transbilayer Lipid Asymmetry'. *Current Biology* 28 (8): R386–91. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.007>.
171. Kobayashi, Toshihide, Espen Stang, Karen S. Fang, Philippe de Moerloose, Robert G. Parton, and Jean Gruenberg. 1998. 'A Lipid Associated with the Antiphospholipid Syndrome Regulates Endosome Structure and Function'. *Nature* 392 (6672): 193–97. <https://doi.org/10.1038/32440>.
172. Kono, Nozomu, Umeharu Ohto, Tatsufumi Hiramatsu, Michiko Urabe, Yasunori Uchida, Yoshinori Satow, and Hiroyuki Arai. 2013. 'Impaired A-TTP-PIPs Interaction Underlies Familial Vitamin E Deficiency' 340.
173. Kors, Suzan, Joseph L. Costello, and Michael Schrader. 2022. 'VAP Proteins – From Organelle Tethers to Pathogenic Host Interactors and Their Role in Neuronal Disease'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10 (June): 895856. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.895856>.
174. Kors, Suzan, Christian Hacker, Chloe Bolton, Renate Maier, Lena Reimann, Emily J.A. Kitchener, Bettina Warscheid, Joseph L. Costello, and Michael Schrader. 2022. 'Regulating Peroxisome–ER Contacts via the ACBD5-VAPB Tether by FFAT Motif Phosphorylation and GSK3 β '. *Journal of Cell Biology* 221 (3): e202003143. <https://doi.org/10.1083/jcb.202003143>.
175. Kors, Suzan, Smija M. Kurian, Joseph L. Costello, and Michael Schrader. 2022. 'Controlling Contacts—Molecular Mechanisms to Regulate Organelle Membrane Tethering'. *BioEssays* 44 (11): 2200151. <https://doi.org/10.1002/bies.202200151>.

BIBLIOGRAPHIE

176. Kory, Nora, Robert V. Farese, and Tobias C. Walther. 2016. 'Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets'. *Trends in Cell Biology* 26 (7): 535–46. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.007>.
177. Kory, Nora, Abdou-Rachid Thiam, Robert V. Farese, and Tobias C. Walther. 2015. 'Protein Crowding Is a Determinant of Lipid Droplet Protein Composition'. *Developmental Cell* 34 (3): 351–63. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.007>.
178. Kostenko, Elena V., Gwendolyn M. Mahon, Li Cheng, and Ian P. Whitehead. 2005. 'The Sec14 Homology Domain Regulates the Cellular Distribution and Transforming Activity of the Rho-Specific Guanine Nucleotide Exchange Factor Dbs'. *Journal of Biological Chemistry* 280 (4): 2807–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411139200>.
179. Krogh, Anders, Björn Larsson, Gunnar von Heijne, and Erik L.L. Sonnhammer. 2001. 'Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes' Edited by F. Cohen'. *Journal of Molecular Biology* 305 (3): 567–80. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>.
180. Kumagai, Keigo, Miyuki Kawano-Kawada, and Kentaro Hanada. 2014. 'Phosphoregulation of the Ceramide Transport Protein CERT at Serine 315 in the Interaction with VAMP-Associated Protein (VAP) for Inter-Organellar Trafficking of Ceramide in Mammalian Cells'. *Journal of Biological Chemistry* 289 (15): 10748–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.528380>.
181. Kumar, Nikit, Marianna Leonzino, William Hancock-Cerutti, Florian A. Horenkamp, PeiQi Li, Joshua A. Lees, Heather Wheeler, Karin M. Reinisch, and Pietro De Camilli. 2018. 'VPS13A and VPS13C Are Lipid Transport Proteins Differentially Localized at ER Contact Sites'. *Journal of Cell Biology* 217 (10): 3625–39. <https://doi.org/10.1083/jcb.201807019>.
182. Lahiri, Sujoy, Alexandre Toulmay, and William A Prinz. 2015. 'Membrane Contact Sites, Gateways for Lipid Homeostasis'. *Current Opinion in Cell Biology* 33 (April): 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.12.004>.
183. Lee, Shoken, Yasunori Uchida, Jiao Wang, Tatsuyuki Matsudaira, Takatoshi Nakagawa, Takuma Kishimoto, Kojiro Mukai, et al. 2015. 'Transport through Recycling Endosomes Requires EHD 1 Recruitment by a Phosphatidylserine Translocase'. *The EMBO Journal* 34 (5): 669–88. <https://doi.org/10.15252/emboj.201489703>.
184. Lee, Stephanie A., Rosemary Eyeson, Matthew L. Cheever, Jinming Geng, Vladislav V. Verkhusha, Christopher Burd, Michael Overduin, and Tatiana G. Kutateladze. 2005. 'Targeting of the FYVE Domain to Endosomal Membranes Is Regulated by a Histidine Switch'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (37): 13052–57. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503900102>.

BIBLIOGRAPHIE

185. Lemmon, Mark A. 2008. 'Membrane Recognition by Phospholipid-Binding Domains'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (2): 99–111. <https://doi.org/10.1038/nrm2328>.
186. Lev, Sima. 2010. 'Non-Vesicular Lipid Transport by Lipid-Transfer Proteins and Beyond'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (10): 739–50. <https://doi.org/10.1038/nrm2971>.
187. Levental, Ilya, and Ed Lyman. 2022. 'Regulation of Membrane Protein Structure and Function by Their Lipid Nano-Environment'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, September. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00524-4>.
188. Li, Dongfang, Yan G. Zhao, Di Li, Hongyu Zhao, Jie Huang, Guangyan Miao, Du Feng, Pingsheng Liu, Dong Li, and Hong Zhang. 2019. 'The ER-Localized Protein DFCP1 Modulates ER-Lipid Droplet Contact Formation'. *Cell Reports* 27 (2): 343-358.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.025>.
189. Li, Jian, and Suzanne R Pfeffer. 2016. 'Lysosomal Membrane Glycoproteins Bind Cholesterol and Contribute to Lysosomal Cholesterol Export'. *ELife* 5 (September): e21635. <https://doi.org/10.7554/eLife.21635>.
190. Lim, Chun-Yan, Oliver B. Davis, Hijai R. Shin, Justin Zhang, Charles A. Berdan, Xuntian Jiang, Jessica L. Counihan, Daniel S. Ory, Daniel K. Nomura, and Roberto Zoncu. 2019. 'ER–Lysosome Contacts Enable Cholesterol Sensing by MTORC1 and Drive Aberrant Growth Signalling in Niemann–Pick Type C'. *Nature Cell Biology* 21 (10): 1206–18. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0391-5>.
191. Lingwood, Daniel, and Kai Simons. 2010. 'Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle'. *Science* 327 (5961): 46–50. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>.
192. Lipp, Nicolas-Frédéric, Romain Gautier, Maud Magdeleine, Maxime Renard, Véronique Albanèse, Alenka Čopič, and Guillaume Drin. 2019. 'An Electrostatic Switching Mechanism to Control the Lipid Transfer Activity of Osh6p'. *Nature Communications* 10 (1): 3926. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11780-y>.
193. Loewen, C. J. R., M. L. Gaspar, S. A. Jesch, C. Delon, N. T. Ktistakis, S. A. Henry, and T. P. Levine. 2004. 'Phospholipid Metabolism Regulated by a Transcription Factor Sensing Phosphatidic Acid'. *Science* 304 (5677): 1644–47. <https://doi.org/10.1126/science.1096083>.
194. Lu, Albert. 2022. 'Endolysosomal Cholesterol Export: More than Just NPC1'. *BioEssays* 44 (10): 2200111. <https://doi.org/10.1002/bies.202200111>.
195. Lu, Albert, Frank Hsieh, Bikal R. Sharma, Sydney R. Vaughn, Carlos Enrich, and Suzanne R. Pfeffer. 2022. 'CRISPR Screens for Lipid Regulators Reveal a Role for ER-Bound SNX13 in Lysosomal Cholesterol Export'. *Journal of Cell Biology* 221 (2). <https://doi.org/10.1083/jcb.202105060>.

BIBLIOGRAPHIE

196. Luzio, J. Paul, Paul R. Pryor, and Nicholas A. Bright. 2007. 'Lysosomes: Fusion and Function'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (8): 622–32. <https://doi.org/10.1038/nrm2217>.
197. Maekawa, Masashi. 2017. 'Domain 4 (D4) of Perfringolysin O to Visualize Cholesterol in Cellular Membranes—The Update'. *Sensors* 17 (3): 504. <https://doi.org/10.3390/s17030504>.
198. Maekawa, Masashi, and Gregory D. Fairn. 2015. 'Complementary Probes Reveal That Phosphatidylserine Is Required for the Proper Transbilayer Distribution of Cholesterol'. *Journal of Cell Science* 128 (7): 1422–33. <https://doi.org/10.1242/jcs.164715>.
199. Magré, Jocelyne, Marc Delépine, Eliane Khallouf, Tobias Gedde-Dahl, Lionel Van Maldergem, Eric Sobel, Jeanette Papp, et al. 2001. 'Identification of the Gene Altered in Berardinelli–Seip Congenital Lipodystrophy on Chromosome 11q13'. *Nature Genetics* 28 (4): 365–70. <https://doi.org/10.1038/ng585>.
200. Mahankali, Madhu, Terry Farkaly, Shimpi Bedi, Heather A. Hostetler, and Julian Gomez-Cambronero. 2015. 'Phosphatidic Acid (PA) Can Displace PPAR α /LXR α Binding to The EGFR Promoter Causing Its Transrepression in Luminal Cancer Cells'. *Scientific Reports* 5 (1): 15379. <https://doi.org/10.1038/srep15379>.
201. Manford, Andrew G., Christopher J. Stefan, Helen L. Yuan, Jason A. MacGurn, and Scott D. Emr. 2012. 'ER-to-Plasma Membrane Tethering Proteins Regulate Cell Signaling and ER Morphology'. *Developmental Cell* 23 (6): 1129–40. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.11.004>.
202. Marchesan, Denis, Mikael Rutberg, Linda Andersson, Lennart Asp, Thomas Larsson, Jan Borén, Bengt R. Johansson, and Sven-Olof Olofsson. 2003. 'A Phospholipase D-Dependent Process Forms Lipid Droplets Containing Caveolin, Adipocyte Differentiation-Related Protein, and Vimentin in a Cell-Free System'. *Journal of Biological Chemistry* 278 (29): 27293–300. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301430200>.
203. Mathiassen, Patricia P. M., Anant K. Menon, and Thomas Günther Pomorski. 2021. 'Endoplasmic Reticulum Phospholipid Scramblase Activity Revealed after Protein Reconstitution into Giant Unilamellar Vesicles Containing a Photostable Lipid Reporter'. *Scientific Reports* 11 (1): 14364. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93664-0>.
204. Mauvezin, Caroline, Péter Nagy, Gábor Juhász, and Thomas P. Neufeld. 2015. 'Autophagosome–Lysosome Fusion Is Independent of V-ATPase-Mediated Acidification'. *Nature Communications* 6 (1): 7007. <https://doi.org/10.1038/ncomms8007>.
205. Maxfield, F.R., and M. Mondal. 2006. 'Sterol and Lipid Trafficking in Mammalian Cells'. *Biochemical Society Transactions* 34 (3): 335–39. <https://doi.org/10.1042/BST0340335>.

BIBLIOGRAPHIE

206. McMahon, Harvey T., and Jennifer L. Gallop. 2005. 'Membrane Curvature and Mechanisms of Dynamic Cell Membrane Remodelling'. *Nature* 438 (7068): 590–96. <https://doi.org/10.1038/nature04396>.
207. Meer, Gerrit van, Dennis R. Voelker, and Gerald W. Feigenson. 2008. 'Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (2): 112–24. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>.
208. Mendel, Itzhak, Niva Yacov, Yaniv Salem, Oshrat Propheta-Meir, Eti Ishai, and Eyal Breitbart. 2017. 'Identification of Motile Sperm Domain-Containing Protein 2 as Regulator of Human Monocyte Migration'. *The Journal of Immunology* 198 (5): 2125–32. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601662>.
209. Meng, Ying, Saskia Heybrock, Dante Neculai, and Paul Saftig. 2020. 'Cholesterol Handling in Lysosomes and Beyond'. *Trends in Cell Biology*, March, S0962892420300520. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.02.007>.
210. Mesmin, Bruno, Joëlle Bigay, Joachim Moser von Filseck, Sandra Lacas-Gervais, Guillaume Drin, and Bruno Antonny. 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 (4): 830–43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.056>.
211. Min, K. Christopher, Rhett A. Kovall, and Wayne A. Hendrickson. 2003. 'Crystal Structure of Human α -Tocopherol Transfer Protein Bound to Its Ligand: Implications for Ataxia with Vitamin E Deficiency'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (25): 14713–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.2136684100>.
212. Min, Sang Hee, Aae Suzuki, Lehn Weaver, Jessica Guzman, Yutein Chung, Huiyan Jin, Francina Gonzalez, et al. 2019. 'PIKfyve Deficiency in Myeloid Cells Impairs Lysosomal Homeostasis in Macrophages and Promotes Systemic Inflammation in Mice'. *Molecular and Cellular Biology* 39 (21).
213. Monteiro-Cardoso, Vera F., Leila Rochin, Amita Arora, Audrey Houcine, Eeva Jääskeläinen, Annukka M. Kivelä, Cécile Sauvanet, et al. 2022. 'ORP5/8 and MIB/MICOS Link ER-Mitochondria and Intra-Mitochondrial Contacts for Non-Vesicular Transport of Phosphatidylserine'. *Cell Reports* 40 (12): 111364. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111364>.
214. Moravcevic, Katarina, Camilla L. Oxley, and Mark A. Lemmon. 2012. 'Conditional Peripheral Membrane Proteins: Facing up to Limited Specificity'. *Structure* 20 (1): 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.11.012>.
215. Munro, Sean. 2002. 'Organelle Identity and the Targeting of Peripheral Membrane Proteins'. *Current Opinion in Cell Biology* 14 (4): 506–14. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00350-2](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00350-2).

BIBLIOGRAPHIE

216. Murphy, Sarah E., and Tim P. Levine. 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 (8): 952–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.009>.
217. Nagaraj, Nagarjuna, Jacek R Wisniewski, Tamar Geiger, Juergen Cox, Martin Kircher, Janet Kelso, Svante Pääbo, and Matthias Mann. 2011. 'Deep Proteome and Transcriptome Mapping of a Human Cancer Cell Line'. *Molecular Systems Biology* 7 (1): 548. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.81>.
218. Nakamura, Noriko, Yoshiko Banno, and Keiko Tamiya-Koizumi. 2005. 'Arf1-Dependent PLD1 Is Localized to Oleic Acid-Induced Lipid Droplets in NIH3T3 Cells'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335 (1): 117–23. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.050>.
219. Nakano, Tomoyuki, Keiko Seino, Ichiro Wakabayashi, Diana M. Stafforini, Matthew K. Topham, and Kaoru Goto. 2018. 'Deletion of Diacylglycerol Kinase ϵ Confers Susceptibility to Obesity *via* Reduced Lipolytic Activity in Murine Adipocytes'. *The FASEB Journal* 32 (8): 4121–31. <https://doi.org/10.1096/fj.201701050R>.
220. Nakatsu, Fubito, and Asami Kawasaki. 2021. 'Functions of Oxysterol-Binding Proteins at Membrane Contact Sites and Their Control by Phosphoinositide Metabolism'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (June): 664788. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.664788>.
221. Nascimbeni, Anna Chiara, Francesca Giordano, Nicolas Dupont, Daniel Grasso, Maria I Vaccaro, Patrice Codogno, and Etienne Morel. 2017. 'ER –Plasma Membrane Contact Sites Contribute to Autophagosome Biogenesis by Regulation of Local PI 3P Synthesis'. *The EMBO Journal* 36 (14): 2018–33. <https://doi.org/10.15252/embj.201797006>.
222. Neefjes, Jacques, Marlieke M.L. Jongsma, and Ilana Berlin. 2017. 'Stop or Go? Endosome Positioning in the Establishment of Compartment Architecture, Dynamics, and Function'. *Trends in Cell Biology* 27 (8): 580–94. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.03.002>.
223. Nishimura, Agnes L., Miguel Mitne-Neto, Helga C.A. Silva, Antônio Richieri-Costa, Susan Middleton, Duilio Cascio, Fernando Kok, 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 (5): 822–31. <https://doi.org/10.1086/425287>.
224. Ohno-Iwashita, Yoshiko, Yukiko Shimada, A.Abdul Waheed, Masami Hayashi, Mitsushi Inomata, Megumi Nakamura, Mikako Maruya, and Shintaro Iwashita. 2004.

BIBLIOGRAPHIE

- 'Perfringolysin O, a Cholesterol-Binding Cytolysin, as a Probe for Lipid Rafts'. *Anaerobe* 10 (2): 125–34. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2003.09.003>.
225. Olarte, Maria-Jesus, Siyoung Kim, Morris E. Sharp, Jessica M.J. Swanson, Robert V. Farese, and Tobias C. Walther. 2020. 'Determinants of Endoplasmic Reticulum-to-Lipid Droplet Protein Targeting'. *Developmental Cell* 54 (4): 471–487.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.001>.
226. Olarte, Maria-Jesus, Jessica M.J. Swanson, Tobias C. Walther, and Robert V. Farese. 2022. 'The CYTOLD and ERTOLD Pathways for Lipid Droplet–Protein Targeting'. *Trends in Biochemical Sciences* 47 (1): 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.08.007>.
227. Olkkonen, Vesa M., and Shiqian Li. 2013. 'Oxysterol-Binding Proteins: Sterol and Phosphoinositide Sensors Coordinating Transport, Signaling and Metabolism'. *Progress in Lipid Research* 52 (4): 529–38. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.06.004>.
228. Olzmann, James A., and Pedro Carvalho. 2019. 'Dynamics and Functions of Lipid Droplets'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (3): 137–55. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>.
229. Ouimet, Mireille, Elizabeth J. Hennessy, Coen van Solingen, Graeme J. Koelwyn, Maryem A. Hussein, Bhama Ramkhelawon, Katey J. Rayner, et al. 2016. 'MiRNA Targeting of Oxysterol-Binding Protein-Like 6 Regulates Cholesterol Trafficking and Efflux'. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36 (5): 942–51. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307282>.
230. Paillusson, Sébastien, Patricia Gomez-Suaga, Radu Stoica, Daniel Little, Paul Gissen, Michael J. Devine, Wendy Noble, Diane P. Hanger, and Christopher C. J. Miller. 2017. 'α-Synuclein Binds to the ER–Mitochondria Tethering Protein VAPB to Disrupt Ca²⁺ Homeostasis and Mitochondrial ATP Production'. *Acta Neuropathologica* 134 (1): 129–49. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1704-z>.
231. Pemberton, Joshua G., and Tamas Balla. 2019. 'Polyphosphoinositide-Binding Domains: Insights from Peripheral Membrane and Lipid-Transfer Proteins'. In *Protein Reviews – Purinergic Receptors*, edited by M. Zouhair Atassi, 111:77–137. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/5584_2018_288.
232. Petan, Toni. 2020. 'Lipid Droplets in Cancer'. In . Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/112_2020_51.
233. Petan, Toni, Eva Jarc, and Maida Jusović. 2018. 'Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World'. *Molecules* 23 (8): 1941. <https://doi.org/10.3390/molecules23081941>.

BIBLIOGRAPHIE

234. Pfeffer, Suzanne R. 2019. 'NPC Intracellular Cholesterol Transporter 1 (NPC1)-Mediated Cholesterol Export from Lysosomes'. *Journal of Biological Chemistry* 294 (5): 1706–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.004165>.
235. Phillips, Melissa J., and Gia K. Voeltz. 2016. 'Structure and Function of ER Membrane Contact Sites with Other Organelles'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (2): 69–82. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.8>.
236. Phillips, Scott E, Bingdong Sha, Lora Topalof, Zhigang Xie, James G Alb, Vadim A Klenchin, Phil Swigart, et al. 1999. 'Yeast Sec14p Deficient in Phosphatidylinositol Transfer Activity Is Functional In Vivo'. *Molecular Cell* 4 (2): 187–97. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80366-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80366-4).
237. Pomorski, Thomas Günther, and Anant K. Menon. 2016. 'Lipid Somersaults: Uncovering the Mechanisms of Protein-Mediated Lipid Flipping'. *Progress in Lipid Research* 64 (October): 69–84. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.08.003>.
238. Prasanna, Xavier, Veijo T. Salo, Shiqian Li, Katharina Ven, Helena Vihinen, Eija Jokitalo, Ilpo Vattulainen, and Elina Ikonen. 2021. 'Seipin Traps Triacylglycerols to Facilitate Their Nanoscale Clustering in the Endoplasmic Reticulum Membrane'. Edited by Ana J. Garcia-Saez. *PLOS Biology* 19 (1): e3000998. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000998>.
239. Prévost, Coline, Morris E. Sharp, Nora Kory, Qingqing Lin, Gregory A. Voth, Robert V. Farese, and Tobias C. Walther. 2018. 'Mechanism and Determinants of Amphipathic Helix-Containing Protein Targeting to Lipid Droplets'. *Developmental Cell* 44 (1): 73–86.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.12.011>.
240. Prinz, William A., Alexandre Toulmay, and Tamas Balla. 2020. 'The Functional Universe of Membrane Contact Sites'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (1): 7–24. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0180-9>.
241. Prosser, Derek C., Duvinh Tran, Pierre-Yves Gougeon, Carine Verly, and Johnny K. Ngsee. 2008. 'FFAT Rescues VAPA-Mediated Inhibition of ER-to-Golgi Transport and VAPB-Mediated ER Aggregation'. *Journal of Cell Science* 121 (18): 3052–61. <https://doi.org/10.1242/jcs.028696>.
242. Puertollano, Rosa. 2014. 'MTOR and Lysosome Regulation'. *F1000Prime Reports* 6 (July). <https://doi.org/10.12703/P6-52>.
243. Qiu, Yixuan, Azam Hassaninasab, Gil-Soo Han, and George M. Carman. 2016. 'Phosphorylation of Dgk1 Diacylglycerol Kinase by Casein Kinase II Regulates Phosphatidic Acid Production in *Saccharomyces Cerevisiae*'. *Journal of Biological Chemistry* 291 (51): 26455–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.763839>.

BIBLIOGRAPHIE

244. Qualmann, Britta, Dennis Koch, and Michael Manfred Kessels. 2011. 'Let's Go Bananas: Revisiting the Endocytic BAR Code: Let's Go Bananas: Revisiting the Endocytic BAR Code'. *The EMBO Journal* 30 (17): 3501–15. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.266>.
245. Raiborg, Camilla, Eva M Wenzel, and Harald Stenmark. 2015. 'ER–Endosome Contact Sites: Molecular Compositions and Functions'. *The EMBO Journal* 34 (14): 1848–58. <https://doi.org/10.15252/emboj.201591481>.
246. Ramseyer, Vanesa D., Victoria A. Kimler, and James G. Granneman. 2018. 'Vacuolar Protein Sorting 13C Is a Novel Lipid Droplet Protein That Inhibits Lipolysis in Brown Adipocytes'. *Molecular Metabolism* 7 (January): 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.10.014>.
247. Rao, Monala Jayaprakash, and Joel M. Goodman. 2021. 'Seipin: Harvesting Fat and Keeping Adipocytes Healthy'. *Trends in Cell Biology* 31 (11): 912–23. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.06.003>.
248. Renne, Mike F, Robin A Corey, and Joana Ver. 2022. 'Seipin Concentrates Distinct Neutral Lipids via Interactions with Their Acyl Chain Carboxyl Esters'.
249. Renne, Mike F., Yoel A. Klug, and Pedro Carvalho. 2020. 'Lipid Droplet Biogenesis: A Mystery “Unmixing”?' *Seminars in Cell & Developmental Biology*, March, S1084952118303185. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.03.001>.
250. Rizzuto, Rosario, Paolo Pinton, Walter Carrington, Frederic S. Fay, Kevin E. Fogarty, Lawrence M. Lifshitz, Richard A. Tuft, and Tullio Pozzan. 1998. 'Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses'. *Science* 280 (5370): 1763–66. <https://doi.org/10.1126/science.280.5370.1763>.
251. Rocha, Nuno, Coenraad Kuijl, Rik van der Kant, Lennert Janssen, Diane Houben, Hans Janssen, Wilbert Zwart, and Jacques Neefjes. 2009. 'Cholesterol Sensor ORP1L Contacts the ER Protein VAP to Control Rab7–RILP–P150Glued and Late Endosome Positioning'. *Journal of Cell Biology* 185 (7): 1209–25. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811005>.
252. Rowland, Ashley A., Patrick J. Chitwood, Melissa J. Phillips, and Gia K. Voeltz. 2014. 'ER Contact Sites Define the Position and Timing of Endosome Fission'. *Cell* 159 (5): 1027–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.023>.
253. Rusiñol, A E, Z Cui, M H Chen, and J E Vance. 1994. 'A Unique Mitochondria-Associated Membrane Fraction from Rat Liver Has a High Capacity for Lipid Synthesis and Contains Pre-Golgi Secretory Proteins Including Nascent Lipoproteins.' *Journal of Biological Chemistry* 269 (44): 27494–502. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47012-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47012-3).

BIBLIOGRAPHIE

254. Ryan, Margaret M, Brenda R S Temple, Scott E Phillips, and Vytas A Bankaitis. 2007. 'Conformational Dynamics of the Major Yeast Phosphatidylinositol Transfer Protein Sec14p: Insight into the Mechanisms of Phospholipid Exchange and Diseases of Sec14p-Like Protein Deficiencies□D □V'. *Molecular Biology of the Cell* 18: 15.
255. Saftig, Paul, and Judith Klumperman. 2009. 'Lysosome Biogenesis and Lysosomal Membrane Proteins: Trafficking Meets Function'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (9): 623–35. <https://doi.org/10.1038/nrm2745>.
256. Saito, Kan, Lutz Tautz, and Tomas Mustelin. 2007. 'The Lipid-Binding SEC14 Domain'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771 (6): 719–26. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.02.010>.
257. Salem, Yaniv, Niva Yacov, Oshrat Propheta-Meiran, Eyal Breitbart, and Itzhak Mendel. 2019. 'Newly Characterized Motile Sperm Domain-Containing Protein 2 Promotes Human Breast Cancer Metastasis: Promotion of Human Breast Cancer Metastasis'. *International Journal of Cancer* 144 (1): 125–35. <https://doi.org/10.1002/ijc.31665>.
258. Salo, Veijo T, Ilya Belevich, Shiqian Li, Leena Karhinen, Helena Vihinen, Corinne Vigouroux, Jocelyne Magré, et al. 2016. 'Seipin Regulates ER –Lipid Droplet Contacts and Cargo Delivery'. *The EMBO Journal* 35 (24): 2699–2716. <https://doi.org/10.15252/emj.201695170>.
259. Salo, Veijo T., Shiqian Li, Helena Vihinen, Maarit Hölttä-Vuori, Abel Szkalitsity, Peter Horvath, Ilya Belevich, et al. 2019. 'Seipin Facilitates Triglyceride Flow to Lipid Droplet and Counteracts Droplet Ripening via Endoplasmic Reticulum Contact'. *Developmental Cell* 50 (4): 478-493.e9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.016>.
260. Sandhu, Jaspreet, Shiqian Li, Louise Fairall, Simon G. Pfisterer, Jennifer E. Gurnett, Xu Xiao, Thomas A. Weston, et al. 2018. 'Aster Proteins Facilitate Nonvesicular Plasma Membrane to ER Cholesterol Transport in Mammalian Cells'. *Cell* 175 (2): 514-529.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.033>.
261. Sarkar, Sovan, Bernadette Carroll, Yosef Buganim, Dorothea Maetzel, Alex H.M. Ng, John P. Cassidy, Malkiel A. Cohen, et al. 2013. 'Impaired Autophagy in the Lipid-Storage Disorder Niemann-Pick Type C1 Disease'. *Cell Reports* 5 (5): 1302–15. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.042>.
262. Schaaf, Gabriel, Eric A. Ortlund, Kimberly R. Tyeryar, Carl J. Mousley, Kristina E. Ile, Teresa A. Garrett, Jihui Ren, et al. 2008. 'Functional Anatomy of Phospholipid Binding and Regulation of Phosphoinositide Homeostasis by Proteins of the Sec14 Superfamily'. *Molecular Cell* 29 (2): 191–206. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.026>.

BIBLIOGRAPHIE

263. Schoop, Valentin, Andrea Martello, Emily R. Eden, and Doris Höglinger. 2021. 'Cellular Cholesterol and How to Find It'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1866 (9): 158989. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.158989>.
264. Scorrano, Luca, Maria Antonietta De Matteis, Scott Emr, Francesca Giordano, György Hajnóczky, Benoît Kornmann, Laura L. Lackner, et al. 2019. 'Coming Together to Define Membrane Contact Sites'. *Nature Communications* 10 (1): 1287. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09253-3>.
265. Scott, Cameron C., Fabrizio Vacca, and Jean Gruenberg. 2014. 'Endosome Maturation, Transport and Functions'. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 31 (July): 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.034>.
266. Seaman, Matthew N.J., Alexis Gautreau, and Daniel D. Billadeau. 2013. 'Retromer-Mediated Endosomal Protein Sorting: All WASHed Up!' *Trends in Cell Biology* 23 (11): 522–28. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.04.010>.
267. Selitrennik, Michael, and Sima Lev. 2016. 'The Role of Phosphatidylinositol-Transfer Proteins at Membrane Contact Sites'. *Biochemical Society Transactions* 44 (2): 419–24. <https://doi.org/10.1042/BST20150182>.
268. Sha, Bingdong, Scott E Phillips, Vytas A Bankaitis, and Ming Luo. 1998. 'Crystal Structure of the *Saccharomyces Cerevisiae* Phosphatidylinositol-Transfer Protein' 391.
269. Shadan, Sadaf, Roman Holic, Nicolas Carvou, Patrick Ee, Michelle Li, Judith Murray-Rust, and Shamshad Cockcroft. 2008. 'Dynamics of Lipid Transfer by Phosphatidylinositol Transfer Proteins in Cells'. *Traffic* 9 (10): 1743–56. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00794.x>.
270. Shibata, Yoko, Junjie Hu, Michael M. Kozlov, and Tom A. Rapoport. 2009. 'Mechanisms Shaping the Membranes of Cellular Organelles'. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25 (1): 329–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113324>.
271. Shimobayashi, Shunsuke F., and Yuki Ohsaki. 2019. 'Universal Phase Behaviors of Intracellular Lipid Droplets'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (51): 25440–45. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916248116>.
272. Shukla, Anju, Priyanka Upadhyai, Jhanvi Shah, K. Neethukrishna, Stephanie Bielas, and K.M. Girisha. 2017. 'Autosomal Recessive Spinocerebellar Ataxia 20: Report of a New Patient and Review of Literature'. *European Journal of Medical Genetics* 60 (2): 118–23. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.11.006>.
273. Shyu, Peter, Xing Fah Alex Wong, Karen Crasta, and Guillaume Thibault. 2018. 'Dropping in on Lipid Droplets: Insights into Cellular Stress and Cancer'. *Bioscience Reports* 38 (5). <https://doi.org/10.1042/BSR20180764>.

BIBLIOGRAPHIE

274. Soares, Alberto Carpinteiro, Andreia Ferreira, Jonas Mariën, Charlotte Delay, Edward Lee, John Q. Trojanowski, Dieder Moechars, Wim Annaert, and Louis De Muynck. 2021. 'PIKfyve Activity Is Required for Lysosomal Trafficking of Tau Aggregates and Tau Seeding'. *Journal of Biological Chemistry* 296 (January): 100636. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100636>.
275. Spits, Menno, Iris T Heesterbeek, Lennard M Voortman, Jimmy J Akkermans, Ruud H Wijdeven, Birol Cabukusta, and Jacques Neefjes. 2021. 'Mobile Late Endosomes Modulate Peripheral Endoplasmic Reticulum Network Architecture'. *EMBO Reports* 22 (3). <https://doi.org/10.15252/embr.202050815>.
276. Stahelin, Robert V. 2009. 'Lipid Binding Domains: More than Simple Lipid Effectors'. *Journal of Lipid Research* 50 (April): S299–304. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800078-JLR200>.
277. Stone, Matthew B, Sarah A Shelby, Marcos F Núñez, Kathleen Wisser, and Sarah L Veatch. 2017. 'Protein Sorting by Lipid Phase-like Domains Supports Emergent Signaling Function in B Lymphocyte Plasma Membranes'. *ELife* 6 (February): e19891. <https://doi.org/10.7554/eLife.19891>.
278. Stuiblé, Matthew, and Michel L. Tremblay. 2010. 'In Control at the ER: PTP1B and the down-Regulation of RTKs by Dephosphorylation and Endocytosis'. *Trends in Cell Biology* 20 (11): 672–79. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.08.013>.
279. Subra, Mélody, Manuela Dezi, Joëlle Bigay, Sandra Lacas-Gervais, Aurélie Di Cicco, Ana Rita Dias Araújo, Sophie Abélanet, et al. 2023. 'VAP-A Intrinsically Disordered Regions Enable Versatile Tethering at Membrane Contact Sites'. *Developmental Cell* 58 (2): 121-138.e9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.12.010>.
280. Sugiura, Taichi, Hiroyuki Nakao, Keisuke Ikeda, Danish Khan, Aaron H. Nile, Vytas A. Bankaitis, and Minoru Nakano. 2021. 'Biophysical Parameters of the Sec14 Phospholipid Exchange Cycle – Effect of Lipid Packing in Membranes'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1863 (1): 183450. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183450>.
281. Sugiura, Taichi, Chisato Takahashi, Yusuke Chuma, Masakazu Fukuda, Makiko Yamada, Ukyo Yoshida, Hiroyuki Nakao, et al. 2019. 'Biophysical Parameters of the Sec14 Phospholipid Exchange Cycle'. *Biophysical Journal* 116 (1): 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.3131>.
282. Sui, Xuewu, Henning Arlt, Kelly P. Brock, Zon Weng Lai, Frank DiMaio, Debora S. Marks, Maofu Liao, Robert V. Farese, and Tobias C. Walther. 2018. 'Cryo–Electron Microscopy Structure of the Lipid Droplet–Formation Protein Seipin'. *Journal of Cell Biology* 217 (12): 4080–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.201809067>.

BIBLIOGRAPHIE

283. Ta, Minh T., Tamar S. Kapterian, Weihua Fei, Ximing Du, Andrew J. Brown, Ian W. Dawes, and Hongyuan Yang. 2012. 'Accumulation of Squalene Is Associated with the Clustering of Lipid Droplets'. *FEBS Journal* 279 (22): 4231–44. <https://doi.org/10.1111/febs.12015>.
284. Takahashi, Kohta, Kristiina Kanerva, Lauri Vanharanta, Leonardo Almeida-Souza, Daniel Lietha, Vesa M Olkkonen, and Elina Ikonen. 2021. 'ORP2 Couples LDL-cholesterol Transport to FAK Activation by Endosomal Cholesterol/PI(4,5)P₂ Exchange'. *The EMBO Journal* 40 (14). <https://doi.org/10.15252/emboj.2020106871>.
285. Tanguy, Emeline, Qili Wang, Hervé Moine, and Nicolas Vitale. 2019. 'Phosphatidic Acid: From Pleiotropic Functions to Neuronal Pathology'. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13 (January): 2. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00002>.
286. Thiam, Abdou Rachid, Bruno Antonny, Jing Wang, Jérôme Delacotte, Florian Wilfling, Tobias C. Walther, Rainer Beck, James E. Rothman, and Frédéric Pincet. 2013. 'COPI Buds 60-Nm Lipid Droplets from Reconstituted Water–Phospholipid–Triacylglyceride Interfaces, Suggesting a Tension Clamp Function'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (33): 13244–49. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307685110>.
287. Thiam, Abdou Rachid, and Mathias Beller. 2017. 'The Why, When and How of Lipid Droplet Diversity'. *Journal of Cell Science* 130 (2): 315–24. <https://doi.org/10.1242/jcs.192021>.
288. Thiam, Abdou Rachid, Robert V. Farese Jr, and Tobias C. Walther. 2013. 'The Biophysics and Cell Biology of Lipid Droplets'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (12): 775–86. <https://doi.org/10.1038/nrm3699>.
289. Thiam, Abdou Rachid, and Lionel Forêt. 2016. 'The Physics of Lipid Droplet Nucleation, Growth and Budding'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861 (8): 715–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.04.018>.
290. Thomas, Anna C., Hywel Williams, Núria Setó-Salvia, Chiara Bacchelli, Dagan Jenkins, Mary O'Sullivan, Konstantinos Mengrelis, et al. 2014. 'Mutations in SNX14 Cause a Distinctive Autosomal-Recessive Cerebellar Ataxia and Intellectual Disability Syndrome'. *The American Journal of Human Genetics* 95 (5): 611–21. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.10.007>.
291. Tillman, Matthew C., Norihiro Imai, Yue Li, Manoj Khadka, C. Denise Okafor, Puneet Juneja, Akshitha Adhiyaman, Susan J. Hagen, David E. Cohen, and Eric A. Ortlund. 2020. 'Allosteric Regulation of Thioesterase Superfamily Member 1 by Lipid Sensor Domain Binding Fatty Acids and Lysophosphatidylcholine'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (36): 22080–89. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003877117>.

BIBLIOGRAPHIE

292. Tomasetto, C., C. Régnier, C. Moog-Lutz, M.G. Mattei, M.P. Chenard, R. Lidereau, P. Basset, and M.C. Rio. 1995. 'Identification of Four Novel Human Genes Amplified and Overexpressed in Breast Carcinoma and Localized to the Q11-Q21.3 Region of Chromosome 17'. *Genomics* 28 (3): 367–76. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1163>.
293. Tripathi, Ashutosh, Elliott Martinez, Ahmad J. Obaidullah, Marta G. Lete, Max Lönnfors, Danish Khan, Krishnakant G. Soni, Carl J. Mousley, Glen E. Kellogg, and Vytas A. Bankaitis. 2019. 'Functional Diversification of the Chemical Landscapes of Yeast Sec14-like Phosphatidylinositol Transfer Protein Lipid-Binding Cavities'. *Journal of Biological Chemistry* 294 (50): 19081–98. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011153>.
294. Ulatowski, L., Mikel Ghelfi, Ryan West, J. Atkinson, C.J. Finno, and D. Manor. 2022. 'The Tocopherol Transfer Protein Mediates Vitamin E Trafficking between Cerebellar Astrocytes and Neurons'. *Journal of Biological Chemistry* 298 (3): 101712. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101712>.
295. Valm, Alex M., Sarah Cohen, Wesley R. Legant, Justin Melunis, Uri Hershberg, Eric Wait, Andrew R. Cohen, Michael W. Davidson, Eric Betzig, and Jennifer Lippincott-Schwartz. 2017. 'Applying Systems-Level Spectral Imaging and Analysis to Reveal the Organelle Interactome'. *Nature* 546 (7656): 162–67. <https://doi.org/10.1038/nature22369>.
296. Vance, J E. 1991. 'Newly Made Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Are Preferentially Translocated between Rat Liver Mitochondria and Endoplasmic Reticulum.' *Journal of Biological Chemistry* 266 (1): 89–97. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)52406-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)52406-6).
297. Vance, Jean E. 2020. 'Inter-Organelle Membrane Contact Sites: Implications for Lipid Metabolism'. *Biology Direct* 15 (1): 24. <https://doi.org/10.1186/s13062-020-00279-y>.
298. Voelker, Dennis R. 2005. 'Bridging Gaps in Phospholipid Transport'. *Trends in Biochemical Sciences* 30 (7): 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.05.008>.
299. Vullhorst, Detlef, Mara S. Bloom, Neha Akella, and Andres Buonanno. 2023. 'ER-PM Junctions on GABAergic Interneurons Are Organized by Neuregulin 2/VAP Interactions and Regulated by NMDA Receptors'. *International Journal of Molecular Sciences* 24 (3): 2908. <https://doi.org/10.3390/ijms24032908>.
300. Wallner, Jakob, Gabriele Lhota, Dominik Jeschek, Alexander Mader, and Karola Vorauer-Uhl. 2013. 'Application of Bio-Layer Interferometry for the Analysis of Protein/Liposome Interactions'. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 72 (January): 150–54. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.10.008>.
301. Walther, Tobias C, Jeeyun Chung, and Robert V Farese Jr. 2017. 'Lipid Droplet Biogenesis', 22.

BIBLIOGRAPHIE

302. Wang, Huan, Qianli Ma, Yanfei Qi, Jiangqing Dong, Ximing Du, James Rae, Jue Wang, et al. 2019. 'ORP2 Delivers Cholesterol to the Plasma Membrane in Exchange for Phosphatidylinositol 4, 5-Bisphosphate (PI(4,5)P2)'. *Molecular Cell* 73 (3): 458-473.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.014>.
303. Wang, Weili, Shixiong Tian, Hongchuan Nie, Chaofeng Tu, Chunyu Liu, Yong Li, Dongyan Li, et al. 2021. 'CFAP65 Is Required in the Acrosome Biogenesis and Mitochondrial Sheath Assembly during Spermiogenesis'. *Human Molecular Genetics* 30 (23): 2240–54. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab185>.
304. Weir, M.Lynn, Hong Xie, Amira Klip, and William S. Trimble. 2001. 'VAP-A Binds Promiscuously to Both v- and TSNAREs'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286 (3): 616–21. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5437>.
305. Welte, Michael A. 2015. 'Expanding Roles for Lipid Droplets'. *Current Biology* 25 (11): R470–81. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.004>.
306. Whited, A.M., and A. Johs. 2015. 'The Interactions of Peripheral Membrane Proteins with Biological Membranes'. *Chemistry and Physics of Lipids* 192 (November): 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.07.015>.
307. Wijdeven, Ruud H., Hans Janssen, Leila Nahidiazar, Lennert Janssen, Kees Jalink, Ilana Berlin, and Jacques Neefjes. 2016. 'Cholesterol and ORP1L-Mediated ER Contact Sites Control Autophagosome Transport and Fusion with the Endocytic Pathway'. *Nature Communications* 7 (1): 11808. <https://doi.org/10.1038/ncomms11808>.
308. Wilfling, Florian, Abdou Rachid Thiam, Maria-Jesus Olarte, Jing Wang, Rainer Beck, Travis J Gould, Edward S Allgeyer, et al. 2014. 'Arf1/COPI Machinery Acts Directly on Lipid Droplets and Enables Their Connection to the ER for Protein Targeting'. *ELife* 3 (February): e01607. <https://doi.org/10.7554/eLife.01607>.
309. Wilfling, Florian, Huajin Wang, Joel T. Haas, Natalie Krahmer, Travis J. Gould, Aki Uchida, Ji-Xin Cheng, et al. 2013. 'Triacylglycerol Synthesis Enzymes Mediate Lipid Droplet Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets'. *Developmental Cell* 24 (4): 384–99. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.013>.
310. WILHELM, Léa. 2017. 'Etude Du Rôle de STARD3 Dans Le Transport Du Cholestérol'. Université de Strasbourg.
311. Wilhelm, Léa P, Corinne Wendling, Benoît Védie, Toshihide Kobayashi, Marie-Pierre Chenard, Catherine Tomasetto, Guillaume Drin, and Fabien Alpy. 2017. 'STARD3 Mediates Endoplasmic Reticulum-to-endosome Cholesterol Transport at Membrane Contact Sites'. *The EMBO Journal* 36 (10): 1412–33. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695917>.

BIBLIOGRAPHIE

312. Wojcik, Stefan, and Verena Kriechbaumer. 2021. 'Go Your Own Way: Membrane-Targeting Sequences'. *Plant Physiology* 185 (3): 608–18. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa058>.
313. Wong, Louise H., Alenka Čopič, and Tim P. Levine. 2017. 'Advances on the Transfer of Lipids by Lipid Transfer Proteins'. *Trends in Biochemical Sciences* 42 (7): 516–30. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.05.001>.
314. Wong, Louise H., Alberto T. Gatta, and Tim P. Levine. 2019. 'Lipid Transfer Proteins: The Lipid Commute via Shuttles, Bridges and Tubes'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (2): 85–101. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0071-5>.
315. Wu, Haoxi, Pedro Carvalho, and Gia K. Voeltz. 2018. 'Here, There, and Everywhere: The Importance of ER Membrane Contact Sites'. *Science* 361 (6401): eaan5835. <https://doi.org/10.1126/science.aan5835>.
316. Wyles, Jessica P., Christopher R. McMaster, and Neale D. Ridgway. 2002. 'Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein-A (VAP-A) Interacts with the Oxysterol-Binding Protein to Modify Export from the Endoplasmic Reticulum'. *Journal of Biological Chemistry* 277 (33): 29908–18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201191200>.
317. Yamamoto, Eiji, Antreas C. Kalli, Kenji Yasuoka, and Mark S.P. Sansom. 2016. 'Interactions of Pleckstrin Homology Domains with Membranes: Adding Back the Bilayer via High-Throughput Molecular Dynamics'. *Structure* 24 (8): 1421–31. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.06.002>.
318. Yan, Renhong, Hongwu Qian, Ivan Lukmantara, Mingming Gao, Ximing Du, Nieng Yan, and Hongyuan Yang. 2018. 'Human SEIPIN Binds Anionic Phospholipids'. *Developmental Cell* 47 (2): 248-256.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.010>.
319. Yeshaw, Wondwossen M, Marianne van der Zwaag, Francesco Pinto, Liza L Lahaye, Anita IE Faber, Rubén Gómez-Sánchez, Amalia M Dolga, et al. 2019. 'Human VPS13A Is Associated with Multiple Organelles and Influences Mitochondrial Morphology and Lipid Droplet Motility'. *ELife* 8 (February): e43561. <https://doi.org/10.7554/eLife.43561>.
320. York, Harrison M, Kunaal Joshi, Charles S Wright, Laura Z Kreplin, Samuel Rodgers, Ullhas K Moorthi, Hetvi Gandhi, et al. 2022. 'Deterministic Early Endosomal Maturation Emerges From a Stochastic Trigger-and-Convert Mechanism'. Preprint. Biophysics. <https://doi.org/10.1101/2022.04.15.488498>.
321. Yu, Li, Christina K. McPhee, Lixin Zheng, Gonzalo A. Mardones, Yueguang Rong, Junya Peng, Na Mi, et al. 2010. 'Termination of Autophagy and Reformation of Lysosomes Regulated by MTOR'. *Nature* 465 (7300): 942–46. <https://doi.org/10.1038/nature09076>.

BIBLIOGRAPHIE

322. Yue, Shuhua, Junjie Li, Seung-Young Lee, Hyeon Jeong Lee, Tian Shao, Bing Song, Liang Cheng, et al. 2014. 'Cholesteryl Ester Accumulation Induced by PTEN Loss and PI3K/AKT Activation Underlies Human Prostate Cancer Aggressiveness'. *Cell Metabolism* 19 (3): 393–406. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.019>.
323. Zand, Adabella van der, Ineke Braakman, and Henk F. Tabak. 2010. 'Peroxisomal Membrane Proteins Insert into the Endoplasmic Reticulum'. Edited by Howard Riezman. *Molecular Biology of the Cell* 21 (12): 2057–65. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-02-0082>.
324. Zhang, Mei, Nancy K. Dwyer, Dona C. Love, Adele Cooney, Marcy Comly, Edward Neufeld, Peter G. Pentchev, E. Joan Blanchette-Mackie, and John A. Hanover. 2001. 'Cessation of Rapid Late Endosomal Tubulovesicular Trafficking in Niemann–Pick Type C1 Disease'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (8): 4466–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.081070898>.
325. Zhang, Mei, Pei Liu, Nancy K. Dwyer, Lane K. Christenson, Toshio Fujimoto, Federico Martinez, Marcy Comly, John A. Hanover, E. Joan Blanchette-Mackie, and Jerome F. Strauss. 2002. 'MLN64 Mediates Mobilization of Lysosomal Cholesterol to Steroidogenic Mitochondria'. *Journal of Biological Chemistry* 277 (36): 33300–310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200003200>.
326. Zhao, Kexin, and Neale D. Ridgway. 2017. 'Oxysterol-Binding Protein-Related Protein 1L Regulates Cholesterol Egress from the Endo-Lysosomal System'. *Cell Reports* 19 (9): 1807–18. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.028>.
327. Zhao, Shuo, Chenggang Xu, Hui Qian, Lei Lv, Chaoneng Ji, Chunjing Chen, Xin Zhao, et al. 2008. 'Cellular Retinaldehyde-Binding Protein-Like (CRALBPL), a Novel Human Sec14p-Like Gene That Is Upregulated in Human Hepatocellular Carcinomas, May Be Used as a Marker for Human Hepatocellular Carcinomas'. *DNA and Cell Biology* 27 (3): 159–63. <https://doi.org/10.1089/dna.2007.0634>.
328. Zoni, Valeria, Rasha Khaddaj, Ivan Lukmantara, Wataru Shinoda, Hongyuan Yang, Roger Schneider, and Stefano Vanni. 2021. 'Seipin Accumulates and Traps Diacylglycerols and Triglycerides in Its Ring-like Structure'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (10): e2017205118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017205118>.
329. Zouiouich, Mehdi, Thomas Di Mattia, Arthur Martinet, Julie Eichler, Corinne Wendling, Nario Tomishige, Erwan Grandgirard, et al. 2022. 'MOSPD2 Is an Endoplasmic Reticulum–Lipid Droplet Tether Functioning in LD Homeostasis'. *Journal of Cell Biology* 221 (6). <https://doi.org/10.1083/jcb.202110044>.

Mehdi ZOUIOUCH

MOSPD2 et sites de contact membranaire : une protéine à plusieurs facettes

A l'image des protéines VAPs, MOSPD2 est une protéine ancrée à la surface du réticulum endoplasmique (ER), formant des sites de contacts membranaires (MCS) grâce à son domaine MSP via une interaction protéine-protéine. Contrairement aux VAPs, MOSPD2 possède un domaine additionnel, nommé, CRAL-TRIO, dont la fonction restait à ce jour incertaine. Les travaux réalisés dans cette thèse ont permis de mieux comprendre comment MOSPD2 se distingue fonctionnellement des protéines VAPs. MOSPD2 est capable de former des MCS entre le ER et les gouttelettes lipidiques via son domaine CRAL-TRIO, régulant ainsi le métabolisme lipidique. En plus de cette localisation spécifique à MOSPD2, cette protéine se distingue aussi des protéines VAPs par sa forte affinité d'interaction médiée par son domaine MSP avec la protéine endosomale STARD3, permettant la régulation du système endosomal tardif. Cette interaction n'est pas substituable par les protéines VAPs qui possèdent pourtant également un domaine MSP, démontrant ainsi l'importance des affinités d'interaction entre les membres de cette famille et leurs conséquences fonctionnelles *in vivo*.

Mots-clés : site de contact membranaire, réticulum endoplasmique, métabolisme lipidique, transport de lipide

Like VAP proteins, MOSPD2 is an endoplasmic reticulum (ER)-anchored protein forming membrane contact sites (MCS) through its MSP domain via protein-protein interactions. In contrast to VAP proteins, MOSPD2 has an additional domain, named CRAL-TRIO, whose function remained unclear until now. The work carried out in this thesis has allowed us to better understand how MOSPD2 is functionally distinct from VAPs. MOSPD2 can form MCSs between the ER and lipid droplets via its CRAL-TRIO domain, thus regulating lipid metabolism. In addition to this specific localization, MOSPD2 differs from VAP proteins by its MSP-mediated interaction with the endosomal protein STARD3, enabling the regulation of the late endosomal system. This interaction is not substitutable by the VAP proteins that also possess an MSP domain, thus demonstrating the importance of binding affinities between the members of this family and their functional consequences *in vivo*.

Keywords: membrane contact site, endoplasmic reticulum, lipid metabolism, lipid transport