



HAL
open science

Fonctionnement des échangeurs phosphatidylsérine / phosphatidylinositol 4-phosphate à l'interface entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique

Nicolas-Frédéric Lipp

► **To cite this version:**

Nicolas-Frédéric Lipp. Fonctionnement des échangeurs phosphatidylsérine / phosphatidylinositol 4-phosphate à l'interface entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2020. Français. NNT : 2020COAZ6027 . tel-03153809

HAL Id: tel-03153809

<https://theses.hal.science/tel-03153809v1>

Submitted on 26 Feb 2021

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

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



THÈSE DE DOCTORAT

Fonctionnement des échangeurs
phosphatidylsérine / phosphatidylinositol 4-phosphate
à l'interface entre le réticulum endoplasmique et la
membrane plasmique

Nicolas-Frédéric LIPP

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences de la Vie et de la Santé d'Université Côte d'Azur

Mention : Interactions moléculaires et cellulaires

Dirigée par le Dr Guillaume DRIN

Soutenue le : 16 novembre 2020

Devant le jury, composé de :

Laurent COUNILLON, Professeur,
Université Côte d'Azur

Isabel ALVES, Directrice de recherche,
Université de Bordeaux

Jacqueline CHERFILS, Directrice de recherche,
ENS - Université Paris Saclay

Fabien ALPY, Chargé de recherche,
Université de Strasbourg

Martine BASSILANA, Directrice de recherche,
Université Côte d'Azur

Guillaume DRIN, Directeur de recherche,
Université Côte d'Azur



Fonctionnement des échangeurs

phosphatidylsérine / phosphatidylinositol 4-phosphate à l'interface entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique

Président du jury

Pr Laurent COUNILLON, Professeur, Université Côte d'Azur

Rapporteurs

Dr Isabel ALVES, Directrice de recherche, Université de Bordeaux

Dr Jacqueline CHERFILS, Directrice de recherche, ENS - Université Paris Saclay

Examineurs

Dr Fabien ALPY, Chargé de recherche, Université de Strasbourg

Dr Martine BASSILANA, Directrice de recherche, Université Côte d'Azur

Directeur de thèse

Dr Guillaume DRIN, Directeur de recherche, Université Côte d'Azur

Résumé

Les protéines de transfert lipidique (LTPs) favorisent la solubilisation des lipides et assurent leur distribution entre des membranes biologiques distinctes. Les protéines Osh6p et Osh7p dans les cellules de levure et les protéines ORP5 et ORP8 dans les cellules humaines sont des LTPs homologues qui partagent une fonction commune : elles transportent la phosphatidylsérine (PS) depuis son lieu de synthèse, le réticulum endoplasmique (RE) vers la membrane plasmique où la PS est abondante et essentielle pour les fonctions cellulaires. Pour exécuter ce transport vectoriel, la PS est échangée contre un second lipide – le phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P) – qui est ensuite transporté en sens inverse depuis la membrane plasmique vers le RE. Dans la cellule, le PI(4)P est continuellement produit dans la membrane plasmique et dégradé dans le RE, respectivement par des PI 4-kinases et une PI-phosphatase, ce qui permet d'entretenir un gradient de concentration de PI(4)P constant entre les deux membranes. En exploitant ce gradient, Osh6p/Osh7p et ORP5/8 tirent l'énergie nécessaire à l'accumulation de PS dans la membrane plasmique.

Avec Osh6p, le laboratoire a observé *in vitro* que ce mécanisme d'échange de lipides est très rapide et ceci est vérifié dans la levure. Ceci est sans doute suffisant pour approvisionner la membrane plasmique, dont la surface double en un temps de division cellulaire, avec la quantité appropriée de PS.

Durant ma thèse, j'ai examiné deux aspects du mécanisme d'échange PS/PI(4)P. Premièrement, j'ai étudié comment Osh6p/Osh7p assurent le transport rapide de ces lipides à l'interface entre deux membranes, l'une étant légèrement anionique (le RE) et l'autre très anionique (la membrane plasmique). Deuxièmement, j'ai étudié ce qui permet à Osh6p et Osh7p de transporter la PS avec précision uniquement entre ces deux membranes dans la levure.

Par des approches de biochimie, de reconstitution *in vitro* et de spectroscopie de fluorescence en temps réel, j'ai pu mettre en évidence, premièrement, qu'Osh6p, en changeant de conformation lors de la capture de la PS ou du PI(4)P, limitait son temps de rétention sur des membranes anioniques lors d'un processus d'échange, ce qui lui permet de l'effectuer rapidement. Deuxièmement, j'ai contribué à montrer qu'Osh6p effectuait des échanges précis, uniquement à l'interface RE/membrane plasmique, en interagissant avec le facteur d'attachement de membranes Ist2p. L'ensemble de ces études améliore notre compréhension des flux lipidiques dans la cellule et ouvre de nouvelles perspectives concernant la régulation de ces machineries essentielles au fonctionnement de la cellule.

Mots-clés : protéine de transfert de lipide, protéine ORP/Osh, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol 4-phosphate, membrane plasmique, réticulum endoplasmique.

Abstract

Lipid transfer proteins (LTPs) facilitate the solubilization of lipids and ensure their distribution between distinct biological membranes. Osh6p and Osh7p proteins in yeast cells and the ORP5 and ORP8 proteins in human cells are homologous LTPs that share a common function: they transport phosphatidylserine (PS) from its site of synthesis, the endoplasmic reticulum (ER), to the plasma membrane where PS is abundant and essential for a number of cellular functions. To perform this vectorial transport, these proteins exchange PS for a second lipid – phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P)– that is next transported in the opposite direction from the plasma membrane to the ER. In the cell, PI(4)P is continuously made in the plasma membrane and hydrolyzed in the ER, respectively by PI 4-kinases and a PI-phosphatase, and this maintains a constant concentration gradient between the two membranes. By exploiting this gradient, Osh6p/Osh7p and ORP5/8 derive the necessary energy to contribute to the accumulation of PS in the plasma membrane.

About Osh6p, our lab measured *in vitro* that this exchange mechanism is very fast, and this is also observed in yeast. This is likely sufficient to supply the plasma membrane whose surface area doubles in a cell division time, with the appropriate amount of PS.

During my thesis, I examined two aspects of the PS/PI(4)P exchange mechanism. First, I studied how Osh6p/Osh7p ensure rapid lipid transfer at the interface of two membranes, one that is slightly anionic (*i.e.*, the ER) and the other one that is very anionic (*i.e.*, the plasma membrane). Second, I examined what imparts Osh6p and Osh7p with the ability to accurately transport PS solely between these two membranes in yeast.

Using biochemical, *in vitro* reconstitution assays and real-time fluorescence spectroscopy approaches, I demonstrated, first that Osh6p by undergoing a conformation change when encapsulating PS or PI(4)P limits its retention time on anionic membranes during an exchange process, and is therefore very rapid. Second, I contributed to demonstrating that Osh6p performs accurate exchange, only at the ER/plasma membrane interface, by interacting with the membrane tethering factor Ist2p. All these studies improve our understanding of lipid flows in the cell and open new perspectives concerning the regulation of these essential machineries critical for cell function.

Keywords: Lipid transfer protein, ORP/Osh protein, phosphatidylserine, phosphatidylinositol 4-phosphate, plasma membrane, endoplasmic reticulum.

Contrat de diffusion

Ce document intitulé : « Fonctionnement des échangeurs phosphatidylsérine / phosphatidylinositol 4 phosphate à l'interface entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique » ; et produit par son auteur : « Nicolas-Frédéric Lipp » ; est diffusé sous contrat Creative Commons « Attribution – Pas d'Utilisation Commerciale – Pas de Modification 4.0 International ».

Vous êtes libre de le reproduire, de le distribuer et de le communiquer au public à condition d'en mentionner le nom de l'auteur et de ne pas le modifier, le transformer, l'adapter, ni l'utiliser à des fins commerciales.

Cette licence s'applique à l'ensemble de ce manuscrit **à l'exception 1)** des figures pour lesquelles un nom d'auteur est mentionné et **2)** des articles qui sont présentés. Ces figures et articles sont tous droits réservés et ont été utilisées avec autorisation. Pour utiliser ce matériel, vous devez obtenir une autorisation du propriétaire des droits d'auteur ou vous référer à la licence de diffusion de la publication citée et référencée dans le chapitre « Bibliographie ».

[CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) 

« En ce sens l'évolution sélective, fondée sur le choix des rares et précieux incidents que contient aussi, parmi une infinité d'autres, l'immense réservoir du hasard microscopique, constitue une sorte de machine à remonter le temps »

Jacques Monod

« Ce n'est pas l'organisation vivante qui émane d'un principe vital, c'est la vie qui émerge de l'organisation vivante »

Edgar Morin

« Deux forces règnent sur l'univers : lumière et pesanteur »

Simone Weil

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie le **Dr Isabel Alves** et le **Dr Jacqueline Cherfils** pour le temps consacré à la lecture et la révision de ce manuscrit. Je remercie le **Dr Fabien Alpy** d'avoir suivi mon travail au cours de ces trois années de thèse. Merci pour les conseils et pour les échantillons de protéines. Je remercie le **Dr Martine Bassilana** d'avoir accepté d'examiner mon travail en tant que spécialiste des levures. Je remercie également le **Pr Laurent Counillon** d'avoir accepté de présider mon jury. Merci d'avoir suivi mes années de thèses, de m'avoir conseillé, et d'avoir contribué à me faire aimer la biochimie durant toutes ces années de fac.

Je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur de thèse, le **Dr Guillaume Drin**. Merci de m'avoir permis d'étudier un mécanisme moléculaire aussi précisément que nous l'avons fait. Je n'oublierai pas ce premier jour où tu m'as fait découvrir l'énigme qu'est Osh6p, ni toutes ces discussions qui nous ont permis de mieux percer quelques-uns de ses mystères. Je te remercie de m'avoir aidé, soutenu, encouragé et corrigé quand cela était nécessaire. Merci aussi pour le temps que tu as consacré à me relire et à me conseiller pendant les rédactions, pour la confiance que tu m'as accordée pour l'encadrement d'étudiants et pour les colloques et autres rencontres auxquels j'ai participé. J'espère sincèrement pouvoir être, un jour, capable de transmettre mon savoir à un doctorant comme tu as su le faire avec moi.

Aussi, je tiens à remercier les membres de notre petit laboratoire. Je souhaite remercier en premier lieu le **Dr Souade Ikhlef** qui m'a accompagné et compris dans cette aventure. Merci, Souade, d'avoir été là dans les meilleurs moments comme les plus difficiles. Tu as été un exemple pour moi, un peu comme une grande sœur et comme si la paillasse était notre PS4. Je remercie le **Dr Julie Milanini**, merci Julie pour toutes les bonnes ondes et les conseils que tu m'as transmis ; et aussi pour les Canistrelli et autres gourmandises. C'était vraiment agréable d'être aux côtés d'une enseignante-chercheuse aussi passionnée que toi. Je remercie également **Maud Magdeleine** sans qui beaucoup de choses auraient été tout simplement impossible au cours de ma thèse. Je regrette certaines choses comme tu t'en doutes, mais je retiens surtout ta bienveillance qui a contribué à me faire aimer le labo. Je remercie aussi **Nicolas Fuggetta** pour sa sympathie. J'ai rarement vu quelqu'un d'aussi amical et attentionné que toi, préserve cette qualité !

Je remercie ensuite tout particulièrement le **Dr Alenka Čopič** : Thank you so much Alenka for this wonderful collaboration, thank you for your tips, for your help, and thank you for encouraging me during this Ph. D., I keep very good memories of all our meetings in Valbonne or across the Atlantic. I also thanks **Dr Juan Martin d'Ambrosio**, thank you JM for your sympathy and for letting me to take part to this fascinating discovery. Merci aussi au **Dr Véronique Albanèse** sans qui une bonne part de mes travaux aurait été incomplets. Même si nous nous sommes rencontré qu'une seule fois avant ma thèse, je n'oublie pas les conseils que tu m'avais donnés.

Ensuite, je remercie l'ensemble de l'équipe BA qui m'a accueilli avant notre déménagement. À commencer par le **Dr Bruno Antony**, que je remercie pour le prêt d'une partie de son laboratoire et de ses équipements. Merci, Bruno, pour tous ces échanges philosophiques sur les sciences, le monde de la recherche et sur la communauté « Lipid Biology ». Merci aussi pour vos (tes ?) conseils qui m'ont aidé à prendre confiance en moi, à Sophia comme à Waterville. Ensuite, je tiens à remercier tout particulièrement le **Dr Romain Gautier**, d'abord merci Romain pour tous tes enseignements à la fac, PyMoL est devenu un de mes passe-temps favoris grâce à toi. Merci aussi de t'être rendu disponible pour répondre à toutes mes questions de physiques moléculaires ou de bioinfo. Enfin, merci pour cette collaboration et toutes ces heures de calculs sans lesquelles l'histoire d'Osh6p serait inanimée et austère. Ensuite, je remercie avec une mention spéciale le **Dr Joëlle Bigay**, merci infiniment, Joëlle, pour toute l'expertise en biochimie que tu m'as transmise, d'avoir toujours accepté de prendre le temps de répondre à mes questions et de m'avoir laissé monopoliser le Jasco parfois pendant de longues semaines. Ensuite, je pense bien sûr au **Dr Bruno Mesmin**, merci pour toutes ces discussions scientifiques, ta manière d'expliquer des choses complexes simplement, ton humour et ta gentillesse, c'est très agréable. Des remerciements aussi pour le **Dr Hélène Barelli** et le

Dr Carole Baron, merci pour ces précieux conseils concernant la carrière scientifique. Sans oublier les **Dr Amanda Patel** et **Dr David Kovacs**, ainsi que **Meng Chen Tsai** : Thank you for all these moments that help me fight against my shyness and fear of speaking English. Thank you, David and Meng, for the evenings spent together; beers are always good, because of yeast! Je remercie aussi **Joël Polidori** pour son aide à la façon Géo Trouvetou. Merci de m'avoir aidé à sauver quelques purifs. Enfin une pensée à **Antoine Reynaud** et **Mélody Subra** à qui je transmets tous mes vœux de réussite pour la fin de leur thèse.

Par ailleurs, je tiens à remercier tout spécialement la sympathique équipe de la plateforme « omique ». Et surtout, je remercie **Lucile Fleuriot** et le **Dr Delphine Debayle** pour toutes les collaborations aussi bien en protéomique, qu'en lipidomique, ce fut toujours agréable et très intéressant de travailler avec vous, j'ai appris beaucoup de choses sur la « MassSpec ». Je remercie aussi le **Dr Anne Sophie Gay** de m'avoir aidé à compléter une analyse protéo. Et aussi **Nathalie Leroudier** pour tous les séquençages. Ensuite, je remercie l'équipe MFL, merci aux **Dr Michel Franco**, **Dr Frédéric Luton** et **Dr Éric Macia**, d'avoir partagé une partie de leurs locaux et un peu de leurs réactifs ou matériels. Merci pour votre sympathie et votre bonne humeur à tous les trois. Je pense aussi au **Dr Monserat Vazquez Rojas**, merci Monsé pour ton soutien, merci d'avoir ensoleillé le couloir avec un peu de Mexique.

Je présente aussi mes remerciements à l'ensemble de l'**IPMC** et à la direction pour cet accueil chaleureux durant ces années, avec un merci tout particulier pour la bourse de voyage qui m'a permis de rejoindre la « *Gordon Conference – Lipid Biology* » ; un moment inoubliable et très enrichissant !

Je remercie aussi l'ensemble de l'équipe pédagogique du département SVS, et une pensée toute particulière pour le **Dr Isabelle Garcia** avec qui c'était un plaisir d'apprendre à enseigner (et corriger beaucoup de copies !). Merci, Yza, tu as aussi fortement contribué à me faire aimer la biochimie pour la vie et c'était un honneur d'enseigner la photosynthèse et la biotech à tes côtés.

Ensuite, je remercie les amis, d'abord **Bonnie**, merci de m'avoir soutenu de A à Z, merci pour tes confidences, ton amitié et ta présence à chaque instant. Je n'oublierai pas l'Auvergne, la Kermesse, les Randos, les Quiz, le Serissa du Japon... Merci aussi à **Raph** d'avoir été présent pendant tous ces bons moments. Ensuite j'ai une pensée particulière pour mon amie de toujours **Julia** qui malgré la distance m'a toujours soutenu, écouté et conseillé quand j'en avais besoin. Une pensée particulière pour toi aussi **Floriane**, merci pour ces longues heures de discussion qui remontent le moral. Je pense aussi à **Robin** et toutes nos conversations de geek qui m'ont bien aidé à aller toujours plus loin et à réfléchir toujours plus. Merci pour les campings, les soirées, les jeux de société, l'open space, etc... autant d'activités qui m'ont évité un repli sur moi. Je pense bien sûr à **Vinc** et **Clo**, merci à vous les gars de supporter mon optimisme naïf légendaire. Merci également à **Irina** de m'avoir soutenu à de nombreuses occasions et pour tous ces bons moments qui m'ont aidé à profiter un peu de la vie, si tu lis ce manuscrit, il y a des parties qui vont te rappeler d'effroyables souvenirs tu es prévenue. Je remercie aussi **Margaux** pour toutes ces années de témoignage d'amitié, je te donne le même conseil qu'à Irina. Aussi, **Fanny**, merci de m'avoir soutenu et encouragé, je te souhaite réussite, succès et de faire de belles découvertes sur le monde microbien. Je n'oublie pas **David Pat'**, un mec en or ! Enfin **Marie** et **Seb**, merci à vous d'avoir été présent, on a passé de super bons moments tous ensemble, il était cool ce petit groupe !

Enfin vient la famille : je tiens à remercier les deux personnes qui compte le plus pour moi : **mes parents**. Merci à toutes les deux ! Merci pour l'éducation que vous m'avez donnée, merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir encouragé, rassuré et motivé. Sans vous tout cela n'aurait jamais été possible. Vous m'avez appris que n'importe quel défi de la vie, aussi difficile soit-il, peut être surmonté si on garde courage, motivation et volonté. Je vous dois tout ! Vous êtes les meilleures !

Je remercie également mes grands-parents de m'avoir soutenu et m'avoir témoigné leur affection pendant toutes ces longues études. Et je n'oublie pas le tonton, la tata, la cousine et les cousins, merci d'avoir donné des nouvelles régulièrement. Loin des yeux près du cœur !

Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	13
ABRÉVIATIONS	15
I. BIOLOGIE DES MEMBRANES CELLULAIRES.....	18
A. HISTOIRE DE LA BIOLOGIE DES MEMBRANES.....	18
B. LA CELLULE EUCARYOTE : DES MEMBRANES DANS DES MEMBRANES	20
C. NAISSANCE DE LA BIOCHIMIE DES LIPIDES ET DE LA BIOPHYSIQUE DES MEMBRANES	24
D. STRUCTURE PHYSICO-CHIMIQUE DES MEMBRANES.....	28
1. <i>Diversité des lipides</i>	28
2. <i>Les trois grandes classes de lipides</i>	30
3. <i>La forme et la nature des lipides</i>	38
4. <i>Propriétés physiques des membranes</i>	40
E. DISTRIBUTION DES LIPIDES ET IDENTITÉ DES ORGANITES.....	52
1. <i>Composition en lipide du RE</i>	52
2. <i>Composition en lipide de la membrane plasmique</i>	54
3. <i>Le modèle des territoires cellulaires</i>	56
II. COMMENT LES PROTÉINES RECONNAISSENT-ELLES LES MEMBRANES ?	58
A. PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DES PROTÉINES	58
B. DIFFÉRENTS TYPES DE PROTÉINES MEMBRANAIRES	60
1. <i>Les protéines membranaires intégrales</i>	60
2. <i>Les protéines membranaires périphériques</i>	62
C. DES MODULES AMPHITROPIQUES POUR RECONNAÎTRE DES LIPIDES	63
1. <i>Les modules stéréosélectifs des têtes polaires</i>	63
2. <i>Les domaines PH, des senseurs versatiles de lipides</i>	64
D. DES MODULES ASPÉCIFIQUES SENSEURS DES PROPRIÉTÉS MEMBRANAIRE : EFFETS DE L'ÉLECTROSTATIQUE ET DE L'HYDROPHOBICITÉ.....	68
1. <i>La protéine MARCKS : un « switch » électrostatique</i>	68
2. <i>Des hélices amphipathiques pour détecter le remodelage membranaire</i>	72
3. <i>Le couple Arf1 et ArfGAP1 comme un double « Switch » au Golgi</i>	74
III. LE DÉFI DE LA LOGISTIQUE DES LIPIDES DANS LA CELLULE	78
A. OÙ ET COMMENT SONT SYNTHÉTISÉS LES LIPIDES	78
1. <i>La formation des acides gras</i>	78
2. <i>La formation des glycérolipides : ajout de glycérol et génération de LPA</i>	80

3.	<i>La formation de l'acide phosphatidique (PA) : acylation en sn2 du LPA.....</i>	82
4.	<i>La formation de diacylglycérol (DAG) par déphosphorylation du PA.....</i>	83
5.	<i>La Formation des glycérophospholipides autres que le PA.....</i>	84
6.	<i>Formation du CDP-DAG : un précurseur de la synthèse de PI, et de PS chez les mycètes.</i>	85
7.	<i>La formation de PI chez les eucaryotes.....</i>	87
8.	<i>Formation de PS chez les mycètes.....</i>	89
9.	<i>La formation de PC et de PE par la voie de Kennedy et la synthèse de PS chez les mammifères.....</i>	92
10.	<i>La formation des triacylglycérol (TAG) : acylation en sn3 du glycérol des DAG</i>	94
B.	LES LIPID TRANSFER PROTEINS (LTPs) POUR DISTRIBUER LES LIPIDES	96
1.	<i>Comment les lipides franchissent-ils le cytosol ?.....</i>	96
2.	<i>Des navettes spécialisées pour transporter les lipides</i>	102
3.	<i>Le transport de lipides entre membranes : un cycle en plusieurs étapes.....</i>	103
4.	<i>Les Starkins et le modèle STARD.....</i>	105
5.	<i>Les PITP : des Starkins bispécifiques.....</i>	109
6.	<i>Sec14p un nanoréacteur pour maintenir la sécrétion ?.....</i>	122
7.	<i>Les ORPs pour transporter en masse les lipides.....</i>	132
8.	<i>Le mécanisme d'échange PS/PI(4)P pour maintenir le gradient de PS ?</i>	142
IV.	L'ÉCHANGE PS/PI(4)P : UN MÉCANISME EFFICACE ? POURQUOI ?	156
A.	MÉTHODOLOGIE	158
1.	<i>Description structurelle des protéine in silico</i>	158
2.	<i>Méthodes de bio-ingénierie.....</i>	162
3.	<i>Analyses des interactions moléculaires par spectroscopie en lumière UV - visible</i>	174
4.	<i>Mesure d'avidité des protéines pour les membranes par flottaison.....</i>	197
B.	RÉSULTATS	198
1.	<i>Un mécanisme de commutation électrostatique pour contrôler l'activité de transport de lipides de la protéine Osh6p.....</i>	198
	ARTICLE I.....	205
2.	<i>Osh6p requiert Ist2p pour sa localisation dans les contacts RE-membrane plasmique et assurer un transport efficace de PS chez la levure</i>	240
	ARTICLE II.....	249
V.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	275
	BIBLIOGRAPHIE.....	281
	ANNEXES	317

Liste des figures

FIGURE 1 ÉVOLUTION DE L'ÉTUDE DES MEMBRANES ET DES LIPIDES.....	19
FIGURE 2 CELLULE DE GANGLION SPINAL OBSERVÉE PAR CAMILLO GOLGI EN 1899	19
FIGURE 3 ILLUSTRATIONS DE CELLULES EUCARYOTES GÉANTES	21
FIGURE 4 STRUCTURES SIMILAIRES DES ORGANITES DANS LES TROIS RÈGNES MAJEURS D'EUCARYOTES	23
FIGURE 5 PREMIER ESSAI DE LIPIDOMIQUE DU CERVEAU EN 1884.....	25
FIGURE 6 ÉVOLUTION DE LA THÉORIE DES MEMBRANES.....	27
FIGURE 7 CLASSIFICATION HIÉRARCHIQUE DES LIPIDES	29
FIGURE 8 CONSTRUCTION DES GLYCÉROPHOSPHOLIPIDES	31
FIGURE 9 NOMENCLATURE ET STRUCTURES CHIMIQUES DES ACIDES GRAS.....	35
FIGURE 10 ESPÈCES MAJORITAIRES DE STÉROL DANS LES MEMBRANES EUCARYOTES	36
FIGURE 11 CONSTRUCTION DES SPHINGOLIPIDES.....	37
FIGURE 12 PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE QUELQUES LIPIDES	39
FIGURE 13 COMMENT LES LIPIDES FORMENT SPONTANÉMENT DES MEMBRANES DANS L'EAU	41
FIGURE 14 COMPORTEMENT D'ASSEMBLAGE EN PHASE DES LIPIDES	43
FIGURE 15 FORMATION DE MEMBRANES COURBÉES	45
FIGURE 16 LES DÉFAUTS DE COMPACTITÉ SONT DES CAVITÉS EN SURFACE DES MEMBRANES	47
FIGURE 17 EFFET DES PHOSPHOLIPIDES ANIONIQUES SUR LA CHARGE DE SURFACE DES MEMBRANES	49
FIGURE 18 COMPOSITION EN LIPIDES DU RE ET DE LA MEMBRANE PLASMIQUE CHEZ LA LEVURE ET LES MAMMIFÈRES.....	53
FIGURE 19 LA COMPOSITION EN LIPIDES DES ORGANITES DÉTERMINE DES TERRITOIRES MEMBRANAIRES PARTICULIERS.....	57
FIGURE 20 LES DIFFÉRENTS TYPES DE PROTÉINES MEMBRANAIRES.....	61
FIGURE 21 STRATÉGIES D'INTERACTION DES PROTÉINES AMPHITROPIQUES	62
FIGURE 22 MODÈLES DE PLUSIEURS MODULES STÉRÉOSÉLECTIFS DES LIPIDES LIÉS AUX MEMBRANES	63
FIGURE 23 RECONNAISSANCE STÉRÉOSÉLECTIVE DES PIPs PAR LES DOMAINES PH ET INTERACTION AVEC LA MEMBRANE	67
FIGURE 24 LA PROTÉINE MARCKS POSSÈDE UN MÉCANISME DE COMMUTATION ÉLECTROSTATIQUE	71
FIGURE 25 MODÈLE DE LIAISON DU COUPLE Arf1 ET ArfGAP1 AUX MEMBRANES.....	77
FIGURE 26 LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DES ACIDES GRAS	79
FIGURE 27 FORMATION DE LYSO-PA	81
FIGURE 28 FORMATION DU PA	82
FIGURE 29 FORMATION DU DAG ET INTERCONVERSION PA / DAG	83
FIGURE 30 ACTIVATION DU PA EN CDP-DAG	86
FIGURE 31 FORMATION DU PI À PARTIR DE CDP-DAG	88
FIGURE 32 FORMATION DE PS DANS LA LEVURE À PARTIR DE CDP-DAG	91
FIGURE 33 LA VOIE DE KENNEDY : SYNTHÈSE DE PC ET DE PE.....	93
FIGURE 34 PRODUCTION DE TRIACYLGLYCÉROL (TAG)	95
FIGURE 35 MODÈLE DE TRANSPORT DES LTPs EN HUIT ÉTAPES MINIMALES	104

FIGURE 36 LE DOMAINE START CONSERVÉ DANS 15 PROTÉINES HUMAINES.....	106
FIGURE 37 RESSEMBLANCE ENTRE LES PROTÉINES « STARKINS » ET FONCTIONNEMENT DE STARD4	108
FIGURE 38 CLASSIFICATION DES PITPS.....	109
FIGURE 39 MODALITÉS DE CAPTURE DE LA PC ET DU PI DANS LA PROTÉINE PITPA.....	111
FIGURE 40 MODÈLE D'INTERACTION DE LA PITPA AVEC LA MEMBRANE LORS DE L'ÉCHANGE DE LIPIDES	113
FIGURE 41 LE CYCLE DES PHOSPHOINOSITIDES : SÉPARATION ENTRE LE RE ET LA MEMBRANE PLASMIQUE	115
FIGURE 42 MODÈLE D'ÉCHANGE PI / PA DE NIR2 À L'INTERFACE ENTRE LE RE ET LA MEMBRANE PLASMIQUE	121
FIGURE 43 PLÉIOTROPIE DE SEC14P SUR LE MÉTABOLISME DES LIPIDES ENTRE LE GOLGI ET LE RE	125
FIGURE 44 STRUCTURE DU DOMAINE DE LIAISON AUX LIPIDES DE SEC14P ET SES HOMOLOGUES	127
FIGURE 45 MODÈLE DU NANORÉACTEUR SEC14P.....	129
FIGURE 46 DIVERSITÉ DE LA FAMILLE DES ORP / OSH	133
FIGURE 47 MODÈLE D'ÉCHANGE STÉROL / PI(4)P D'Osh4P ET OSBP	141
FIGURE 48 LOCALISATION D'Osh6P ET D'Osh7P DANS LA LEVURE.....	144
FIGURE 49 APPARTENANCE D'Osh6/7 ET ORP5/8/9/10/11 À UN MÊME GROUPE MONOPHYLÉTIQUE.....	146
FIGURE 50 COMPARAISON DES STRUCTURES D'Osh6P LIÉS À LA PS ET AU PI(4)P.....	151
FIGURE 51 OSH6P EFFECTUE DES CYCLES D'ÉCHANGE PS/PI(4)P ENTRE LE RE ET LA MEMBRANE PLASMIQUE	154
FIGURE 52 OPR5 ET ORP8 ÉCHANGENT LA PS ET PI(4)P ENTRE LE RE ET LA MEMBRANE PLASMIQUE	155
FIGURE 53 MARQUAGE FLUORESCENT DES PROTÉINES POUR DÉTECTER LEURS INTERACTIONS AVEC LES MEMBRANES	173
FIGURE 54 LE DÉCALAGE DE STOKES	175
FIGURE 55 LE NIVEAU D'ÉNERGIE DES ÉLECTRONS DÉFINIT LES INTERACTIONS LUMIÈRE-MATIÈRE.....	177
FIGURE 56 LE DIAGRAMME DE JABLONSKI EXPLIQUE LE PHÉNOMÈNE DE FLUORESCENCE.....	181
FIGURE 57 SPECTRES D'ABSORPTION ET D'ÉMISSION DES MOLÉCULES FLUORESCENTES UTILISÉES DANS L'ÉTUDE D'Osh6P	187
FIGURE 58 SPECTRE D'ABSORPTION ET SPECTRES D'ÉMISSION DE FLUORESCENCE DE NBD-Osh6P	191
FIGURE 59 PRINCIPE DU FRET APPLIQUÉ À L'EXTINCTION D'UN FLUOROPHORE SUR UNE MEMBRANE	193
FIGURE 60 PRINCIPE DE MESURE DU TRANSPORT DE PS OU DE PI(4)P ENTRE LIPOSOMES.....	195

Abréviations

3PG : 3-phosphoglycérate	DGK : Diacylglycéról kinase
ACAT : Acyl-CoA cholesterol acyltransferase	DHAP : Dihydroxyacetone phosphate
ADN : Acide desoxyribonucléique	DHE : 22-dihydroérgosterol
ADNc : ADN complémentaire	DMF : Diméthylformamide
ADP : Adénosine diphosphate	DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
AGPAT : 1-acylglycerol-3-phosphate-0-acyltransferase	DTT : Dithiothréitol
Akt : RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (protein kinase B)	EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
ALPS : Amphipathic lipid packing sensor	EGFR : Epidermal growth factor receptor
AP-1 : Clathrin assembly protein complex 1	EKI : Éthanolamine kinase
Arf1 : ADP-ribosylation factor 1	ENTH : Epsin N-terminal homology
ARN : Acide ribonucléique	EPT : Éthanolamine phosphotransférase
ATP : Adénosine triphosphate	ESR : Résonance paramagnétique électronique
BLAST : Basic local alignment search tool	FAPP : Phosphatidylinositol-four-phosphate adapter protein 1
C-ter : Carboxy-terminal	FYVE : Fab1, YOTB, Vac1, EEA1 zinc finger domain
C2 : Constant region 2 of PKC homology domain	GAP : GTPase-activating protein
C2_{Lact} : Domaine C2 de la lactadherine	GDP : Guanosine diphosphate
Ca²⁺ : Cation calcium	Gga2 : Golgi-localized, Gamma-adaptin ear homology, Arf-binding protein
CaM : Calmoduline	Golgi : Appareil de Golgi
CDP : Cytidine diphosphate	GPAT : Glycerol-3-phosphate acyltransferase
CK : Choline kinase	GPL : Glycérophospholipide
CL : Cardiolipine	Gro3P : Glycerol 3-phosphate
CMP : Cytidine monophosphate	GST : Glutathione S-transferase
CoA : Coenzyme A	GTP : Guanosine triphosphate
COPI : Coat protein complex I	HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
CPM : 7-Diethylamino-3-(4'-Maleimidylphenyl)-4-Methylcoumarin	HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
CPT : Choline phosphotransférase	IANBD : N, N'-Diméthyl-N-[iodoacétyl]-N'-[7-nitrobenz-2-Oxa-1,3-diazol-4 -yl]Éthylènediamine
CRAL-TRIO : Cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) and Triple functional domain protein (Trio)	Ins : Inositol
CTP : Cytidine triphosphate	Ins(1,4,5)P₃ : Inositol (1,4,5)-triphosphate
DAG : diacylglycéról	InsP : Inositol phosphate
DGBL : DAG binding-like	IPP : inositol polyphosphate phosphatase
DGK : Diacylglycerol kinase	IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
	LNS2 : Lipin/Ned1/Smp2

LPA : lyso-phosphatidic acid
LPAAT : lyso-phosphatidic acid acyltransferase
LTP : Lipid transfer protein
MAFFT : Multiple Alignment using Fast Fourier Transform
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MARCKS : Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
Mg²⁺ : Cation magnésium
MLV : Multilamellar vesicle
N-ter : Amino-terminal
Na⁺ : Cation sodium
NBD : nitrobenzoxadiazole
NCBI : National Center for Biotechnology Information
Nir : PYK2 N-terminal domain-interacting receptors
nsLTP : non-specific lipid transfer protein
ORD : OSBP Related Domain
ORP : Oxysterol-binding protein-Related Protein
OSBP : OxySterol Binding Protein
Osh : Oxysterol binding protein homolog
PA : Phosphatidic Acid
PAP : Phosphatidic Acid Phosphatase
PC : Phosphatidylcholine
PCTP : PC transfer protein
PDAT : Phospholipid : diacylglycerol acyltransferase
PDB : Protein Data Bank
PE : Phosphatidyléthanolamine
PG : Phosphatidylglycérol
PH : Pleckstrin Homology
Pi : Phosphate inorganique
PI : Phosphatidylinositol
PI(3)P : Phosphatidylinositol 3-Phosphate
PI(4,5)P₂ : Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PI(4)P : Phosphatidylinositol 4-phosphate
PI(5)P : Phosphatidylinositol 5-phosphate
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase
PI4K : Phosphatidylinositol 4-kinase
PIP : Phosphoinositides phosphate
PIP5K : Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase
PITD : PI transfer domain
PITP : PI transfer protein
PKC : Protéine kinase C
PLC δ 1 : Phospholipase C δ 1
PLD : Phospholipase D
POPS : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine
PPi : Pyrophosphate
PS : Phosphatidylsérine
Psd : Phosphatidylsérine décarboxylase
Pss : Phosphatidylsérine synthase
RdgB β : Retinal degeneration B homolog β
RE : Réticulum endoplasmique
Rhod-PE : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)
RMN : Résonance magnétique nucléaire
Sac1p : Suppressor of actin mutations 1 protein
SDS : Sodium dodecylsulfate
Sec14p : SEcretory 14 protein
Sfh : Sec fourteen homolog
SL : Sphingolipide
sn1, sn2 : Stereospecific numbering 1 , 2
StAR : Steroidogenic acute regulatory protein
STARD : StAR-related lipid transfer protein
SUV : Small unilamellar vesicle
TAG : Triacylglycérol
TM : TransMembrane domain
TMEM16 : TransMEMbrane protein 16
TRIO : Triple functional domain protein
Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminomethane
UPGMA : unweighted pair group method with arithmetic mean

I. Biologie des membranes cellulaires

A. Histoire de la biologie des membranes

L'histoire des membranes est intrinsèquement liée à la biologie, depuis 1960, près d'un article sur deux référencés par Pubmed mentionne les membranes (**Fig. 1**). Le mot membrane est dérivé du latin « *membrana* » qui signifie peau ou parchemin, lui-même dérivé du mot « *membrum* » qui signifie membre. L'occurrence du mot membrane en biologie démarre très tôt, au moins depuis 1363 dans l'ouvrage « *La grande Chirurgie* » rédigé par le chirurgien Français Guy de Chauliac. Dans le second chapitre de son ouvrage : « *De l'anatomie de la peau, de la graisse, de la chair et des muscles* », Chauliac décrit les pannicules et les membranes comme des toiles qui tapissent et enferment les organes sous lesquelles s'accumulent les graisses. Il est remarquable de s'apercevoir qu'à cette époque la notion de membrane était déjà associée aux graisses et donc aux lipides. Bien plus tard, dans les années 1670s, on commença à rendre compte de l'existence des microbes, qui sont des organismes unicellulaires, grâce au développement de la microscopie par Antonie van Leeuwenhoek et Robert Hooke. Dans son ouvrage *Micrographia*, Hooke proposa le terme cellule pour définir les petites « bulles » ou « cavernes » qu'il observait au microscope. Le mot cellule est issu de l'expression chambre de moine (du latin *cellula*). En effet, il décrit que chaque cellule est séparée du reste de l'environnement par des films dépourvus de trou. Sans employer le terme membrane, il utilise le terme film pour décrire une substance cornée, rigide et transparente entourant une cavité remplie d'une substance différente, mais de nature similaire à la substance extérieure à la cellule. Les membranes sont donc des barrières qui délimitent des compartiments. Avec les progrès de la microscopie, Karl August Möbius suggéra en 1882 que les organismes unicellulaires sont constitués de petits organes qu'il nomma les *organula* par analogie avec les organismes pluricellulaires qui sont constitués d'organes. Le terme *organula* deviendra par la suite organelle en anglais et allemand, et organite en français. Enfin, on attribue souvent la paternité de la découverte d'un des premiers organites à Camillo Golgi qui décrivit la structure particulière de l'appareil de Golgi en étudiant les fibres nerveuses (**Fig. 2**).

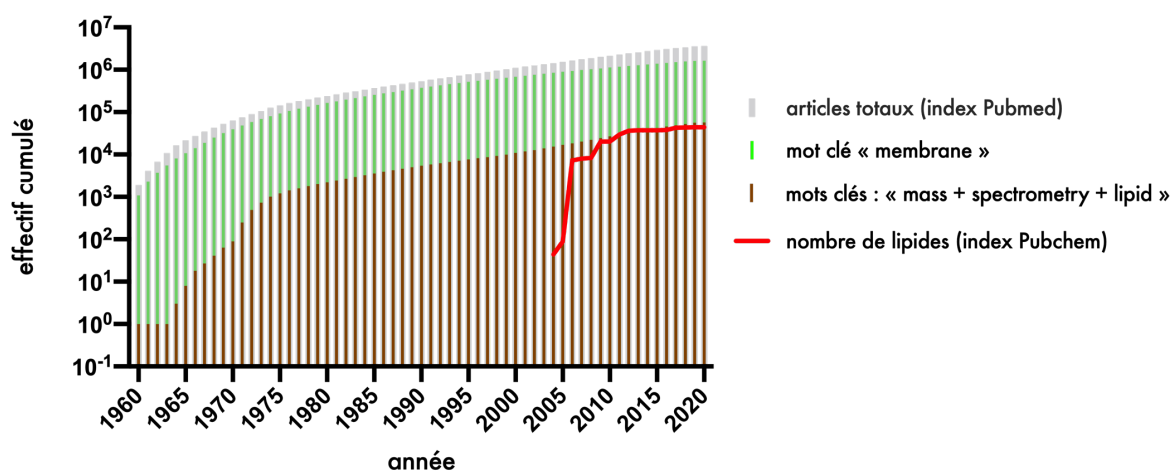


Figure 1 | Évolution de l'étude des membranes et des lipides

Le nombre total d'articles référencés par Pubmed et cumulés par année (gris) est comparé au nombre d'articles qui mentionnent les membranes (vert). L'émergence de la lipidomique (marron) et le référencement de nouveaux lipides sur Pubchem (rouge) rendent compte de l'ampleur de la diversité des lipides.

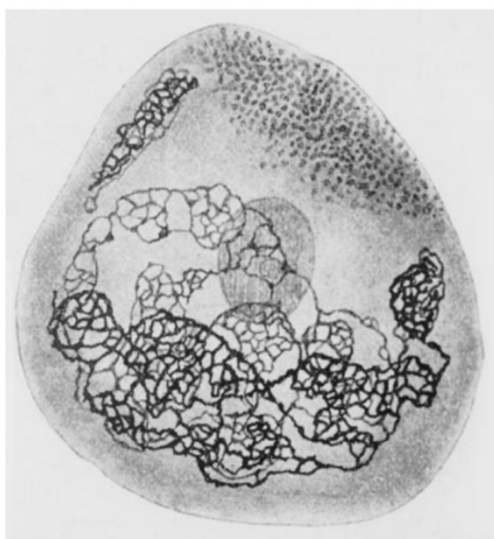


Figure 2 | Cellule de ganglion spinal observée par Camillo Golgi en 1899

Sur cette micrographie, on observe le noyau, un appareil réticulaire interne, désigné par Golgi comme « apparato reticolare interno », et la membrane plasmique qui délimite la cellule. Adaptée d'après Dröscher, 1998⁴⁰¹

B. La cellule eucaryote : des membranes dans des membranes

Les lipides s'assemblent spontanément en milieu aqueux pour former soit des micelles, soit des bicouches lipidiques qui séparent deux compartiments aqueux. Une autre possibilité d'assemblage correspond à la formation d'une monocouche de lipides amphiphiles qui enferme une phase apolaire qui peut être constituée d'autres lipides. Dans les cellules eucaryotes, on rencontre des bicouches qui délimitent les organites et les monocouches qui définissent les gouttelettes lipidiques.

La membrane plasmique est une bicouche de lipides dans laquelle de nombreuses protéines sont incluses et qui séparent le milieu extracellulaire du cytoplasme. Le cytoplasme est composé d'une fraction soluble : le cytosol et d'une fraction qui sédimente : les organites. La membrane plasmique définit la taille de la cellule, pouvant être de l'ordre de 3 à 4 μm de diamètre pour *S. cerevisiae* jusqu'à des dimensions de l'ordre du mètre par exemple dans les cas des neurones ou des organismes unicellulaires tels que le « Blob » ou *Physarum polycephalum*, un myxomycète (**Fig. 3**). La cellule contient de nombreux organites avec des structures et des caractéristiques très différentes.

Le réticulum endoplasmique (RE) est un vaste réseau de membranes tubulaires et contigües semblable à une structure en éponge. Il sépare le cytosol, d'un compartiment : le *lumen*. Ce réseau membranaire enchâsse et définit également le noyau cellulaire dont la structure est globalement sphérique.

L'appareil de Golgi est semblable à un ensemble de saccules écrasées appelées citernes, qui forment un empilement de membranes d'aspect lamellaire. Les citernes de cet organite sont en réalité connectées de façon éparse par des tubules membranaires faisant communiquer leur contenu interne. De plus, l'appareil de Golgi est bordé de nombreuses vésicules qui bourgeonnent depuis les citernes. L'appareil de Golgi peut comporter jusqu'à une centaine de membranes empilées et en considérant l'épaisseur d'une bicouche de lipides ($\sim 4 \text{ nm}$), l'appareil de Golgi peut atteindre une épaisseur de 8 μm . Enfin, la structure du Golgi qui est décrite comme un empilement de citernes n'est pas valable pour tous les eucaryotes, c'est notamment le cas de la levure (**Fig. 4B**). De plus de nombreuses observations indiquent que le Golgi se fragmente au cours de la division cellulaire. Enfin les cellules contiennent parfois plusieurs appareils de Golgi et c'est particulièrement le cas dans les cellules végétales qui en contiennent des centaines.

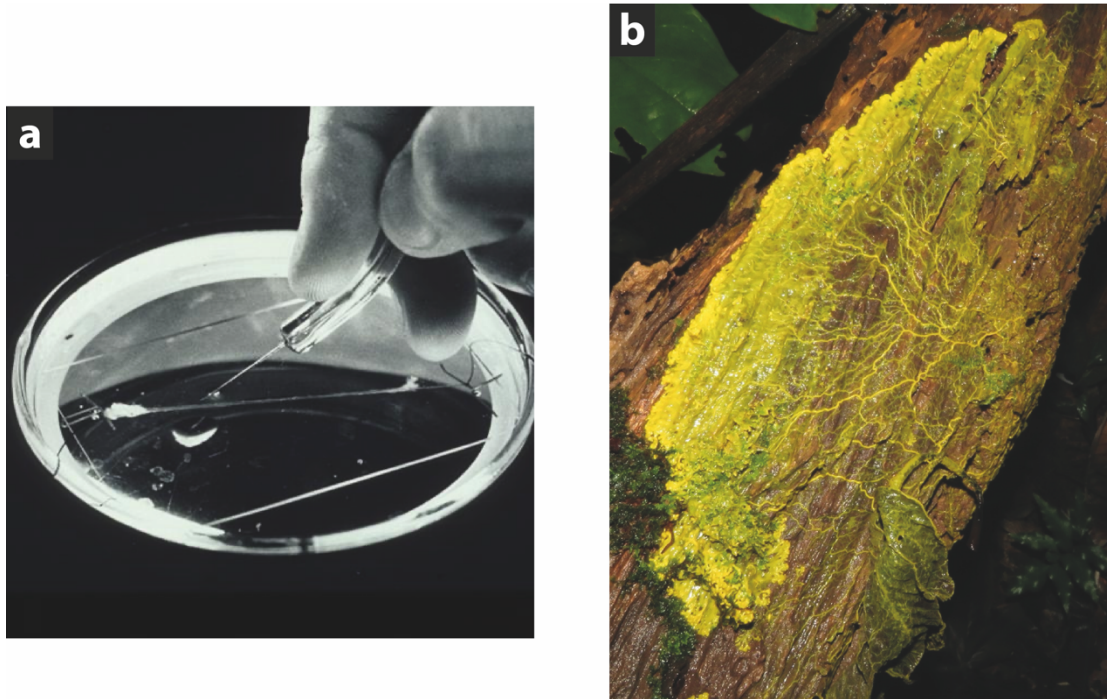


Figure 3 | Illustrations de cellules eucaryotes géantes

a) Axone géant de calmar dans une coupelle pointée par une aiguille.

Source : NIH History Office – Wikimedia Common

b) *Physarum polycephalum* ou « Blob », une seule cellule se répand en réseau sur un souche de bois.

Source : Rich Hoyer – Wikimedia Common

Les endosomes, les lysosomes, le peroxysome, et les vésicules d'endocytose correspondent à des compartiments bien sphériques, plus ou moins grands avec des diamètres généralement de l'ordre de 100 nm à $5\text{ }\mu\text{m}$. La levure et les plantes contiennent une vacuole, il s'agit d'une membrane géante qui enferme un compartiment qui stocke des composés hydrosolubles. La vacuole peut occuper jusqu'à 30% du volume d'une levure¹ et plus encore chez les plantes lors de stress hydrique.

Enfin, les cellules eucaryotes contiennent des organites qui ressemblent à des organismes unicellulaires qui ont été phagocytés par la cellule sans que les membranes de la cellule et de ces organismes aient fusionné. C'est pourquoi, lorsqu'on observe les mitochondries, nous pouvons distinguer la membrane externe qui est à l'interface entre le cytosol et l'espace intermembranaire mitochondrial et la membrane interne qui sépare l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Chez les végétaux les plastes ont une structure semblable à celle des mitochondries, mais en plus, la matrice appelée *stroma* contient un réseau membranaire appelé membrane thylakoïde. Ces observations sont en partie à l'origine de la théorie endosymbiotique. Par exemple, la membrane interne de ces organites est riche en lipides d'origine bactérienne comme la cardiolipine. Ces organites pris ensemble occupent un volume relativement important de la cellule en raison de leur nombre. De plus, les analyses récentes par tomographie électronique² révèlent que les mitochondries peuvent former un réseau dynamique³ qui diffère des représentations courantes dans lesquelles la mitochondrie a la forme d'un bâtonnet de $0,5$ à $1\text{ }\mu\text{m}$ de long.

Il est remarquable d'observer à quel point la structure des organites est conservée à travers les différents grands groupes d'eucaryotes (**Fig. 4**). Chacune de ces structures assurent un rôle particulier : le RE est le site principal de synthèse des protéines et des lipides ; l'appareil de Golgi est essentiel pour la maturation, le contrôle qualité, le tri et la sécrétion des protéines ; les mitochondries assurent la production d'énergie ; les endosomes et les lysosomes interviennent dans l'absorption et le recyclage de composés extracellulaires ; le noyau protège l'ADN génomique. Pour permettre chacune de ces fonctions, les membranes cellulaires ont des caractéristiques particulières. Par exemple, la membrane plasmique est épaisse et résiste à des stress mécaniques importants tandis que le RE est fin, tubulaire et adopte une structure en réseau.

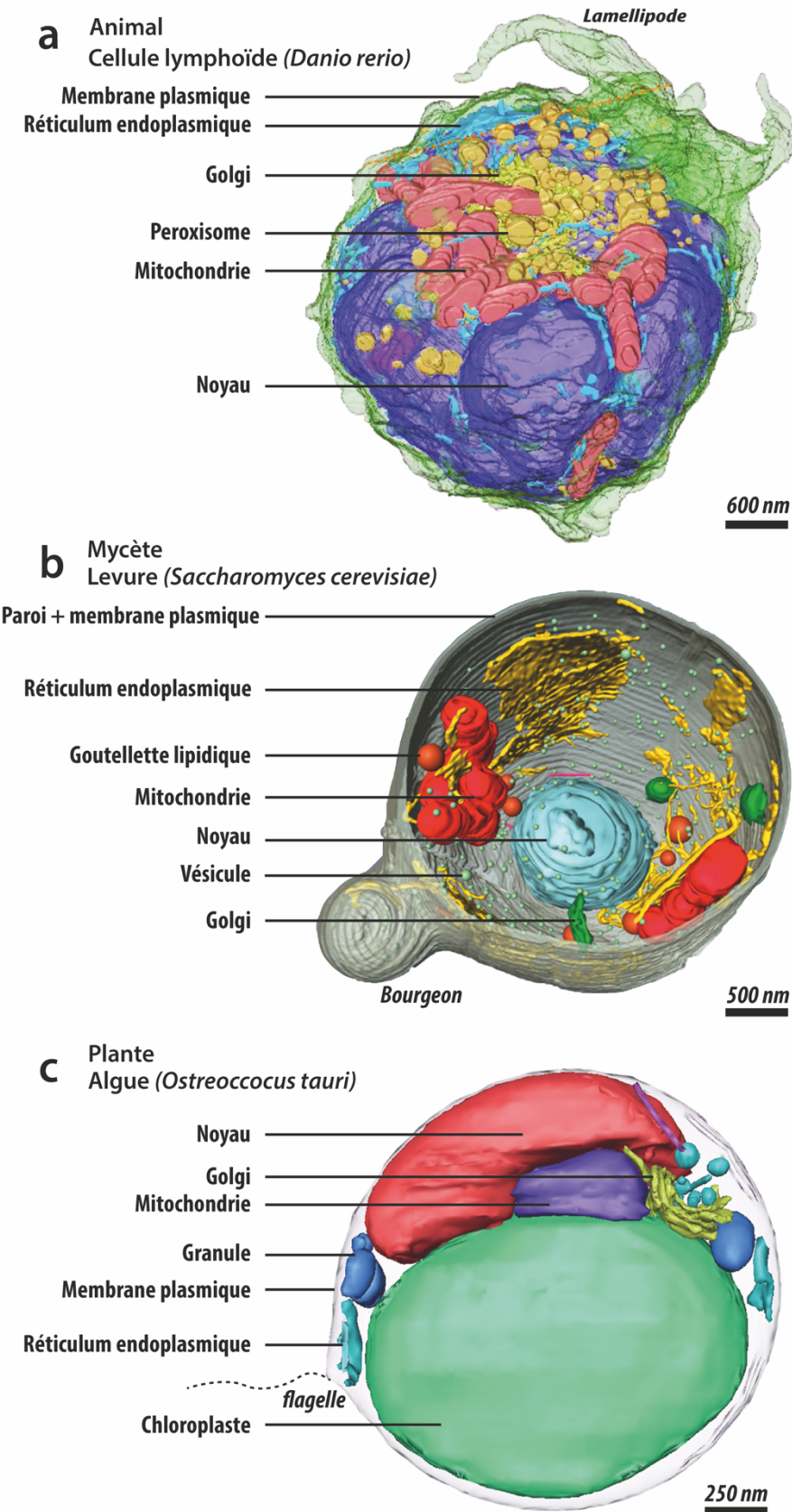


Figure 4 | Structures similaires des organites dans les trois règnes majeurs d'eucaryotes

La structure tridimensionnelle des trois cellules circulantes a été reconstruite par tomographie électronique.

Chaque type de membrane cellulaire est représenté par une couleur distincte. La barre d'échelle est donnée en bas à droite à titre indicatif.

a) Cellule animale : le golgi est peu apparent, caché en jaune clair sous les autres organites. Adaptée de Wacker *et al.*, 2015⁴⁰²

b) Cellule fongique : La vacuole n'est pas représentée par souci de clarté. Adaptée de Wei *et al.*, 2012⁴⁰³

c) Cellule végétale : La vacuole, si elle existe, n'est pas visible dans cette espèce d'algue unicellulaire. Adaptée de Henderson *et al.*, 2007⁴⁰⁴

C. Naissance de la biochimie des lipides et de la biophysique des membranes

C'est dans les années 1850, que Théodore Nicolas Gobley, alors chimiste et pharmacologue, rapporta pour la première fois l'identification de matières grasses communes aux œufs de carpe et de poule⁴. Il décrit qu'un traitement à l'éther ou à l'éthanol de ces œufs permettait d'obtenir différentes phases. D'une part la cholestérine, une huile fixe qui cristallise à température ambiante et qui était déjà connue sous le nom d'huile d'œuf. Le nom cholestérine évoque la technique d'extraction à l'éther de cette substance à partir de calculs biliaires. D'autre part, une seconde substance, molle et de consistance visqueuse, retrouvée en fraction majoritaire dans les œufs de carpe avait la consistance du jaune d'œuf et lui rappela la description déjà faite par ses confrères concernant les graisses blanches du cerveau. Il s'aperçut que cette substance visqueuse était composée de deux fractions non dissociables, l'une riche en phosphore qu'il nomma lécithine (jaune d'œuf), l'autre riche en azote et dépourvu de phosphore qu'il nomma cérébrine en l'honneur des travaux de ses contemporains Couerbe et Frémy sur le cerveau. De plus, il montra que la lécithine pouvait être décomposée en 3 acides : oléique, margarique et phosphoglycérique.

Par la suite, J.L.W Thudichum, médecin et biochimiste allemand, dans son traité sur la constitution chimique du cerveau⁵, rapporte avoir étudié les lécithines cérébrales et autres matières grasses (**Fig. 5**). Il caractérisa la céphaline, une lécithine qui s'avèrera plus tard n'être autre que la phosphatidyléthanolamine (PE), et il ajouta à la classification les sphingolipides dont la sphingosine et la sphingomyéline, comme étant des lipides mystérieux (d'où la racine du mot). Les recherches sur les matières grasses biologiques se diversifient au début du XXème siècle et on voit apparaître dans la littérature de nombreux termes tels que « lipoïde », « lipine » ou « lipide », voire « lipid ».

La nomenclature à ce sujet devenait confuse, les termes précédents n'avaient aucun rapport en termes de constitution chimique, ils avaient plutôt comme seul dénominateur commun la fonction physiologique de corps gras. C'est pourquoi, en 1923, le chimiste Gabriel Bertrand proposa un projet de réforme de la nomenclature de chimie biologique⁶. Il suggéra de regrouper tous les corps gras biologiques tels que les triglycérides, les phosphatides (ou lécithine), les cholestérides et les cérébrines sous le nom de « lipide » issu du grec *lipos* signifiant « graisse, lard, suif » et du suffixe

patronymique -ide qui marque l'appartenance à un même groupe. Cette réforme fut alors acceptée à l'unanimité en séance du 3 juillet 1923 par le comité international de chimie biologique, et la définition du terme lipide devint la suivante :

« *Le terme lipide désigne le groupe de substances qui comprend les matières grasses et les éthers-sels (esters) possédant des propriétés analogues (lécithines, phosphatides, etc.).* »

Figure 5 | Premier essai de lipidomique du cerveau en 1884

Extrait de «*The physiological chemistry of the Brain* » par J.L.W. Thudichum⁵

QUANTATION OF CONSTITUENTS. 257

TABLE SHOWING RESULTS OF THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF A HUMAN BRAIN.
Weights in grammes; third decimals below 5 omitted, above 5 added as 1 to second decimals. Membranes weighed 58 g.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.
	Weights with Membranes.	Weights without Membranes.	Quantities analysed.	Albumen.	White Matter.	W. M. insoluble in Ether.	W. M. soluble in Ether.	Buttery Matter.	Kephalin Total.	Myelin Total.	Lecithin Total.	Cholesterin Total.	Inosite.	Lactic Acid.	Hypoxanthin and Alkaloids.	Indefinite Extractives.	Potassium.	Sodium.
Right hemisphere	589	564	465	35.68	18.60	11.63	6.97	21.66	3.34	5.22	5.90	8.93	0.43	0.64	1.30	2.63	0.25	0.40
Left hemisphere	596	570	463	35.06	21.93	12.28	9.65	21.65	—	5.20	—	6.99	0.38	1.00	1.06	2.78	0.39	0.39
Cerebellum	135	129	124	10.94	1.88	1.66	0.22	3.26	1.29	3.76	2.97	1.95	0.05	0.13	0.67	1.49	0.01	0.02
Mesenkephalon and medulla oblongata	34	33	33	2.48	0.64	0.56	0.03	—	0.45	0.23	0.41	1.01	0.06	0.07	—	0.73	0.01	0.03
White tissue	—	—	66	5.70	6.98	4.56	2.42	5.31	0.06	0.16	0.48	2.15	0.14	0.05	—	0.44	0.03	0.04
White tissue for quantation of water	—	—	9.2	0.80	0.97	0.64	0.33	0.74	0.002	0.02	0.07	0.30	0.02	0.006	—	0.06	0.004	0.006
Grey tissue	—	—	46	3.50	0.30	—	0.30	—	0.15	0.02	0.73	0.90	0.69	0.04	0.10	0.31	0.01	0.09
Grey tissue for quantation of water	—	—	6.2	0.46	0.04	—	0.04	—	0.02	0.003	0.09	0.12	0.09	0.006	0.01	0.04	0.001	0.01
Loss in operations	—	—	86.6	6.58	4.12	2.24	1.88	4.14	0.63	0.69	1.10	1.86	0.08	0.20	0.21	0.52	0.07	0.07
Totals	1354	1296	1296	101.20	55.46	33.57	21.81	56.76	5.94	15.30	11.75	24.21	1.94	2.14	3.35	9.00	0.78	1.06

17

Lors des mêmes années, les physiciens commencèrent à comprendre comment les lipides s'autoassemblent dans l'eau. On savait depuis probablement l'antiquité que l'huile avait pour effet de « calmer » les eaux agitées. Benjamin Franklin donna une première explication physique dans les années 1760 à ce phénomène : les lipides fuient l'eau, l'eau fuit les lipides, cela génère une force, c'est la découverte de l'effet hydrophobe⁷. À l'équilibre thermodynamique, les lipides s'arrangent de manière à minimiser la tension à l'interface entre la phase aqueuse et la phase hydrophobe en maximisant la surface d'interaction. En 1917, le Prix Nobel de chimie Irving Langmuir théorise ce concept en mesurant la tension interfaciale de diverses huiles. En réutilisant l'équation de Gibbs, Langmuir énonce que la tension de surface est une fonction linéaire de la concentration en lipide et que les lipides s'étalent dans l'eau en suivant une force qui dépend de la température, et de l'aire qu'occupe chaque molécule⁸.

Finalement, en 1925, Gorter et Grendel fournissent une explication synthétique sur la nature des membranes cellulaires à partir des connaissances en physique des membranes, en biochimie des lipides et en biologie cellulaire. Après avoir évalué au microscope la surface des globules rouges de différentes espèces animales, ils ont extrait les lipides de ces globules rouges et les ont étalés en monocouche sur l'eau à la manière de Langmuir. Ils remarquent que la surface occupée par les lipides étalés sur l'eau correspond systématiquement au double de la surface des globules rouges. Ils déduisent que la membrane des globules rouges est une bicouche lipidique (**Fig. 6**).

Aujourd'hui, on sait que les membranes cellulaires ne peuvent pas simplement être réduites à des bicouches lipidiques. En plus, de nombreuses protéines sont incorporées dans la membrane ou en interaction étroite avec celle-ci. Pour cette raison, le modèle des membranes est d'abord revu en 1935 par Davson et Danieli⁹ ; et en 1972 Singer et Nicolson¹⁰ proposent le modèle de mosaïque fluide encore d'actualité (**Fig. 6**).

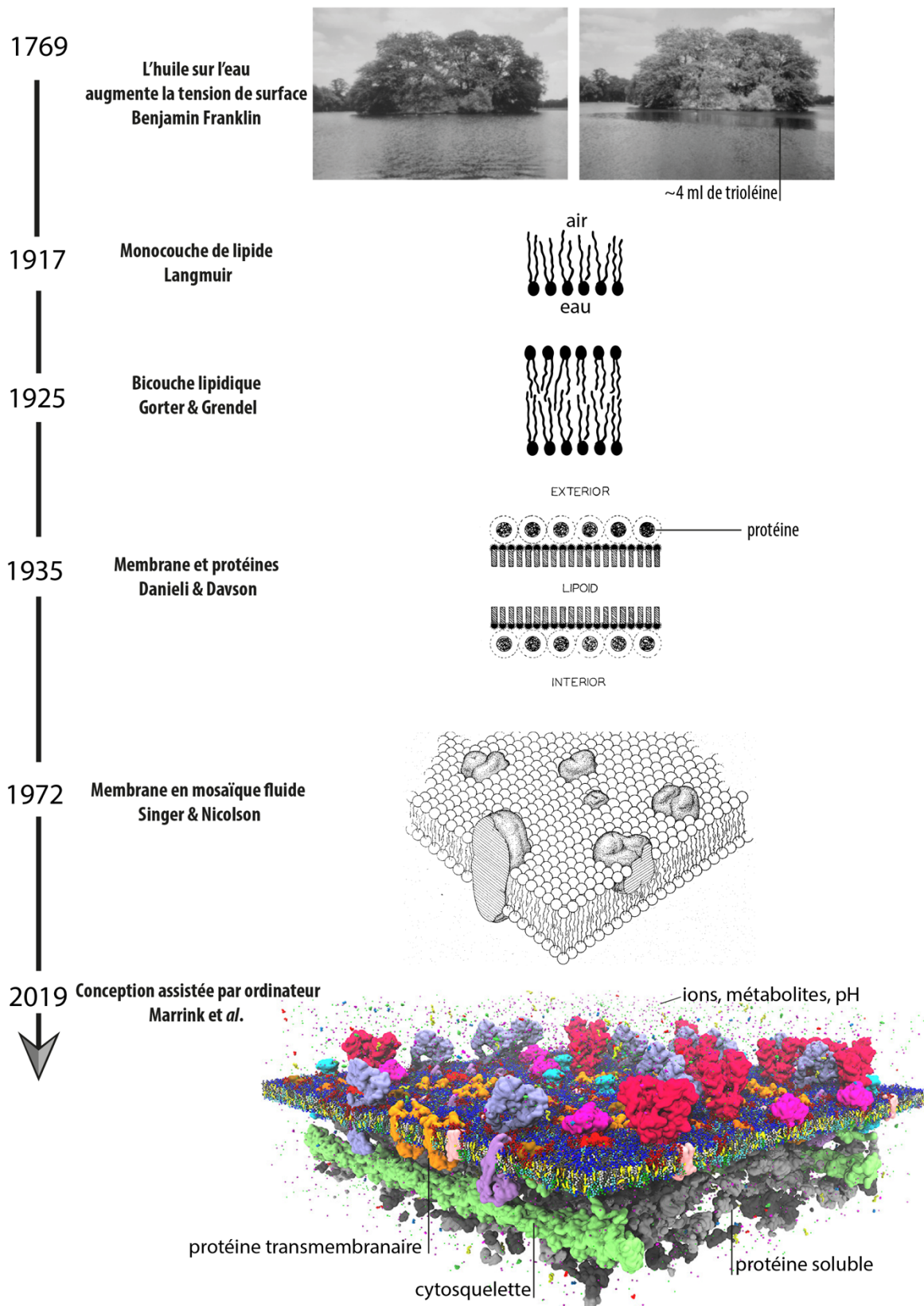


Figure 6 | Évolution de la théorie des membranes

Expérience de Benjamin Franklin reproduite à l'identique par Giles C.H., 1969⁴⁰⁵, (Source : Royal Society of Chemistry); Modèles de membrane tels que présentés par Danieli & Davson, 1935⁹; Singer & Nicolson, 1972¹⁰, Marrink, Corradi, Souza *et al.*, 2019⁴⁰⁶

D. Structure physico-chimique des membranes

1. Diversité des lipides

Tous les lipides ont en commun une nature chimique tout ou partie hydrophobe. La majorité des lipides cellulaires sont amphiphiles : ils sont constitués d'un groupement chimique hydrophile appelé tête polaire et d'une partie hydrophobe. Hormis certains polycétides et certains prényls (*e.g.* hydroquinone) qui sont des composés aromatiques, la partie hydrophobe de la plupart des lipides est composé d'une ou plusieurs chaîne(s) carbonée(s) aliphatiques : c'est-à-dire des hydrocarbures cycliques ou acycliques, saturés ou insaturés.

En juin 2020, on compte plus de 22,000 espèces de lipides d'importance biologique et plus d'un million si nous tenons compte de la bibliothèque de composés dont l'existence est prédite *in silico*. Le développement de la bio-informatique et de la lipidomique a donné naissance à plusieurs bases de données dont l'objectif est de recenser l'ensemble des lipides détectés par spectrométrie de masse. Afin d'homogénéiser les bases de données, en 2009, la nomenclature basée sur la combinatoire moléculaire des lipides a été actualisée de façon consensuelle¹¹. Cette initiative découle de l'importante nécessité de disposer d'une nomenclature pérenne, compréhensible par tous et accessible depuis tous les supports informatiques.

Les lipides peuvent être classés en huit catégories qui appartiennent à deux grands groupes selon leur origine chimique (**Fig. 7**). Le premier groupe est issu de la condensation des thioesters de cétoacyle et il comprend les acides gras, les polycétides, les sphingolipides, les glycérolipides, les glycérophospholipides, et les saccharolipides. Le deuxième groupe est issu de la condensation de sous-unités de type prényle et il comprend les prényls et les stérols. Dans les membranes des cellules eucaryotes, nous retrouvons majoritairement des glycérophospholipides. On rencontre aussi en abondance certains stérols particuliers tels que le cholestérol dans l'espèce humaine et l'ergostérol chez les mycètes *stricto sensu* (appartenant au règne des *Fungi*). Enfin, bien que plus rares que les glycérophospholipides, les sphingolipides se retrouvent en abondance dans certaines membranes. Ces lipides sont les briques élémentaires nécessaires à la constitution des membranes et j'en donne les caractéristiques dans les sections suivantes.

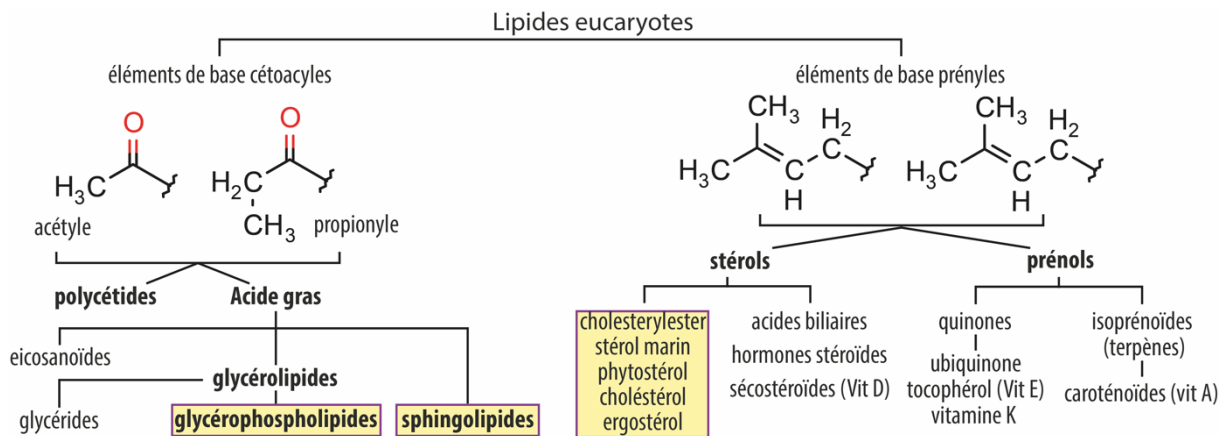


Figure 7 | Classification hiérarchique des lipides

Sept des huit grandes classes de lipides sont indiquées en gras. Les saccharolipides ne sont pas représentés, car ils sont essentiellement issus des bactéries. Les lipides servant de base élémentaire à la constitution des membranes chez les eucaryotes sont encadrés sur fond jaune.

2. Les trois grandes classes de lipides

a. Les glycérophospholipides

Les glycérophospholipides (GPLs) sont les lipides les plus abondants dans les membranes cellulaires. Les GPLs sont caractérisés par un squelette glycérol avec des acides gras estérifiés en position *sn1* et *sn2* et un groupement phosphate (H_2PO_4^-) qui substitue l'hydroxyle en position *sn3* (**Fig. 8a**).

Le GPL le plus simple est l'acide phosphatidique (PA). De manière schématique le PA correspond à un diacylglycérol (DAG) qui est phosphorylé (**Fig. 8a,b**). Le DAG est un glycérolipide avec un groupement hydroxyle (OH) libre. Le DAG est neutre, tandis que la présence du groupement phosphate dans le PA apporte une charge négative dans les conditions physiologiques. Par conséquent, tous les phospholipides contiennent un anion. En plus, le phosphate du PA porte un groupement hydroxyle libre auquel peuvent être attachés différents groupements polaires alcooliques tels que la choline, l'éthanolamine, l'inositol et la sérine. L'ajout d'une de ces têtes polaires donne respectivement la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidylsérine (PS).

La PC et la PE sont les deux lipides majoritaires dans les membranes cellulaires. Avec un ratio PC:PE d'environ 2:1, ensemble, ils constituent environ 65 mol% des GPLs et environ 30 à 40 mol% des lipides totaux¹²⁻¹⁵. La PC et la PE sont zwitterioniques, la charge négative du phosphate est compensée par la charge positive portée par l'amine primaire et l'amine tertiaire de l'éthanolamine et de la choline respectivement (**Fig. 8c,d**). Dans les conditions physiologiques, la PC et la PE sont neutres¹⁶. Néanmoins la nature de leurs chaînes acyles est particulière dans la cellule. En effet, les enzymes responsables de leurs synthèses, produisent sélectivement certaines sous-espèces de PC et de PE qui modifient les propriétés de la membrane. Cette sélectivité peut varier d'une espèce à l'autre, d'un type cellulaire à l'autre ou d'un organite à l'autre.

Le PI est le phosphoinositide le plus simple (**Fig. 8f**). C'est le troisième phospholipide le plus abondant à l'échelle de la cellule. Dans les cellules humaines, les phosphoinositides ne représentent pas plus de 5 mol% des lipides totaux^{14,15,17}, mais dans la levure, ce taux est de l'ordre de 15 à 20 %^{13,18}. Il est formé par la condensation de l'hydroxyle en position 1 du *myo*-inositol sur le phosphate du PA.

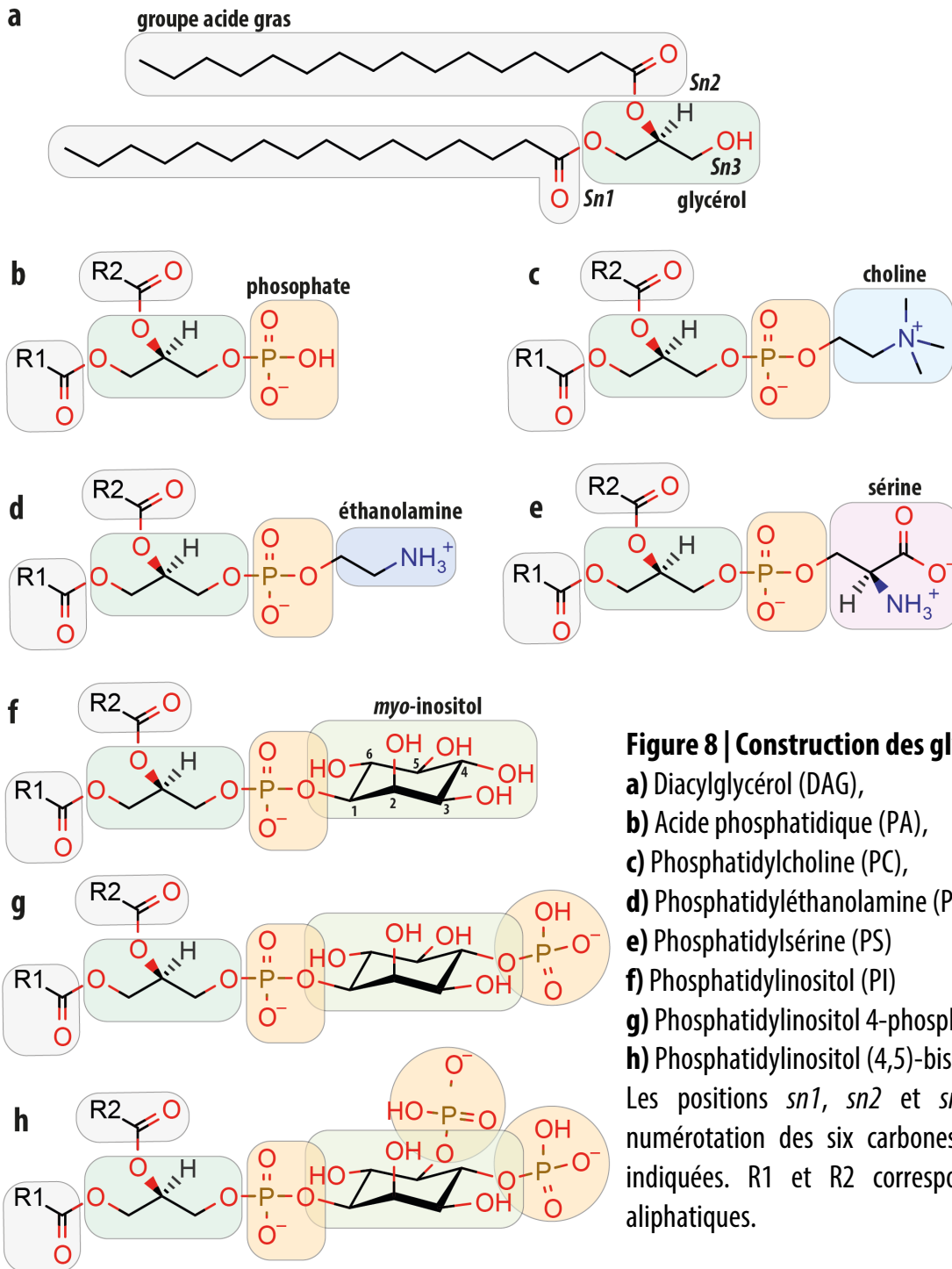


Figure 8 | Construction des glycérophospholipides

a) Diacylglycérol (DAG),

b) Acide phosphatidique (PA),

c) Phosphatidylcholine (PC),

d) Phosphatidyléthanolamine (PE)

e) Phosphatidylsérine (PS)

f) Phosphatidylinositol (PI)

g) Phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P)

h) Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P₂)

Les positions *sn1*, *sn2* et *sn3* du glycérol et la numérotation des six carbones du *myo*-inositol sont indiquées. R1 et R2 correspondent à des chaînes aliphatiques.

Le PI est chargé négativement, l'inositol ne porte pas de charge pour compenser celle du phosphate. Du fait de son abondance, toutes les membranes cellulaires ont un potentiel de surface électronégatif. Comme pour la PC et la PE, certaines sous-espèces de PI sont majoritaires. Le PI est le précurseur des phosphoinositides -phosphates (PIPs) qui ont un rôle très important dans la cellule. Les PIPs sont très rares dans la cellule, ils sont produits par des PI-kinases qui assurent leur phosphorylation de manière dépendante de l'ATP. Le noyau inositol porté par le PI possède cinq groupements hydroxyles libres, mais dans la nature seuls ceux en position 3, 4 et 5 sont susceptibles d'être phosphorylés. Les différents PIPs qui existent sont ceux avec un seul phosphate : PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P ; ceux avec deux phosphates : PI(3,4)P₂, PI(4,5)P₂ , PI(3,5)P₂ et celui à trois phosphate : PI(3,4,5)P₃. Chaque phosphate ajoute une charge négative à la tête polaire, les PIPs sont des espèces lipidiques très chargées négativement (**Fig. 8g,h**). Inversement, les PIPs sont parfois déphosphorylés et reconvertis en PI par les PIP-phosphatases. Le métabolisme des PIPs est très dynamique dans la cellule et la position des phosphorylations est comparable à un code moléculaire qu'une multitude de protéines reconnaissent¹⁹. Les PIPs sont donc cruciaux pour l'identité des membranes et pour signaler ou amorcer à leur surface des événements particuliers.

La PS, est le plus rare des quatre phospholipides majeurs et il compte pour environ 1 à 6% des phospholipides totaux de la cellule^{12-15,20}. La PS est un aminophospholipide et c'est quasiment le seul lipide de cette catégorie chez les eucaryotes bien que la phosphatidylthréonine existe de manière abondante chez certains parasites²¹. La PS est formée par la condensation du phosphate du PA avec l'hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine (**Fig. 8e**). La PS expose au solvant un groupement amine et un groupement carboxylique qui portent respectivement une charge positive et une charge négative. Ainsi, avec le phosphate, la charge nette de la phosphatidylsérine est de -1 dans les conditions physiologiques. Même si la PS est plutôt rare par rapport aux autres phospholipides, dans la cellule, sa distribution est bien organisée, il est très abondant dans le feuillet cytosolique de la membrane plasmique et il contribue majoritairement à la charge électrostatique de ce feuillet lipidique.

b. *Comment nommer les glycérophospholipides ?*

La biologie des lipides a longtemps souffert de problème de nomenclature, on a pu le voir avec les noms triviaux tels que les lécithines ou la céphaline. Aujourd'hui encore, le nom des différentes espèces de glycérophospholipides ne respecte pas la nomenclature chimique IUPAC. Mais par usage et par simplicité, on donne des noms aux phospholipides qui rendent bien compte de leur nature. Par exemple, pour désigner une espèce de lipide de type phosphatide (un glycérolipide) dont la tête polaire contient un résidu sérine, le terme général de phosphatidylsérine est employé. Pour ce même lipide, nous trouvons souvent dans la littérature les abréviations PtdSer, Ptd-L-Ser, ou PS. Dans ce manuscrit, j'utilise l'abréviation à deux lettres.

Lorsqu'il est nécessaire de décrire la chaîne acyle du lipide, là encore la nomenclature varie. Pour nommer les sous-espèces de lipides qui diffèrent par leur chaîne acyle, on ajoute fréquemment le radical qui désigne les acides gras qui servent à former ces lipides. Par exemple, si une molécule de PS contient une chaîne en position *sn1* à 16 carbones saturés et une chaîne en position *sn2* à 18 carbones avec une insaturation, cette molécule peut être nommée palmitoyl-oleyl-PS. Pour simplifier, je nomme ce type de composé POPS et pour éviter les confusions j'indique parfois la composition sous forme de chiffre. POPS correspond à (16:0-18:1)-PS.

Là encore, cette nomenclature est imparfaite, elle ne rend ni compte de la position de l'insaturation dans la chaîne carbonée, ni de sa configuration *cis* ou *trans*. En toute rigueur, il faudrait utiliser la nomenclature des acides gras de type Δ ou ω . Les acides gras *trans* sont rares, voire toxiques, en biologie, je ne les mentionne donc pas. Par ailleurs, la plupart du temps, je mentionne des acides gras mono-insaturés de type ω_9 , ou polyinsaturés de type ω_6 , qui désignent la position du premier carbone insaturé à partir du méthyle terminal. Enfin, le préfixe *lyso-* sert à désigner les phospholipides qui comportent une seule chaîne aliphatique généralement en position *sn1*, par exemple le *lyso*-PS. Je donne la nomenclature de quelques acides gras couramment rencontrés dans les membranes et que je mentionne dans ce manuscrit (**Fig. 9**).

a	n carbone : n insaturation	Groupe ment acyle	Oméga	Delta
Saturé	12:0	Lauryle		
	14:0	Myristoyle		
	16:0	Palmitoyle		
	18:0	Stéaryle		
Monoinsaturé	16:1	Palmitoléyle	$\omega 9$	<i>cis</i> - Δ^9
	18:1	Oléyle	$\omega 9$	<i>cis</i> - Δ^9
Polyinsaturé	18:2	Linoléyle	$\omega 6$	<i>all cis</i> - $\Delta^{9,12}$
	20:4	Arachidonyle	$\omega 6$	<i>all cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14}$
	22:6	Docosahexaénoyle	$\omega 3$	<i>all cis</i> - $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$

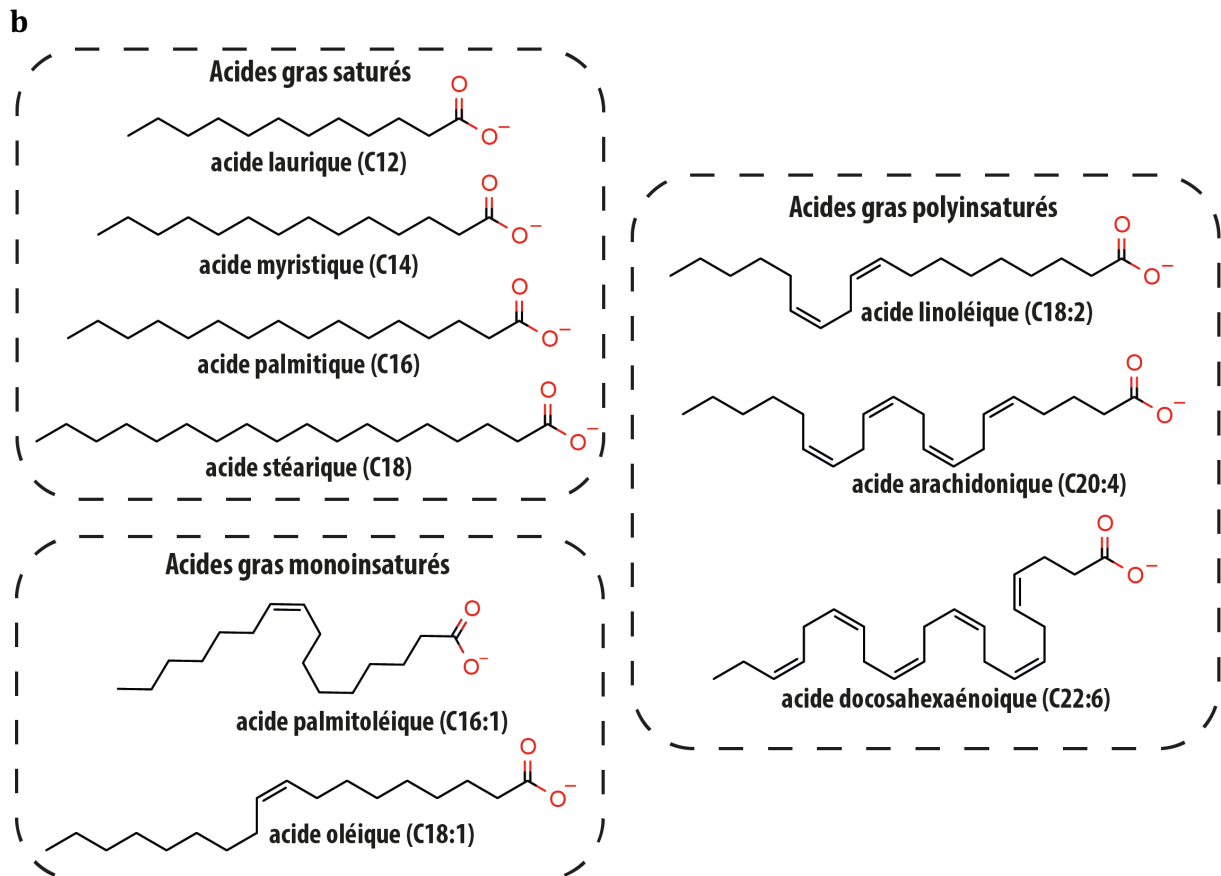


Figure 9 | Nomenclature et structures chimiques des acides gras

a) Table de référence sur la nomenclature des groupements acyles mentionnés dans ce manuscrit

b) Structures chimiques des acides gras formés par les acyles de la table présentée en (a).

c. Les stérols

Les stérols ne ressemblent pas aux autres lipides, ils sont de petites tailles et polycycliques (**Fig. 10**). Ils sont caractérisés par quatre cycles (A, B, C, D). Les cycles A, B, C sont des cyclohexanes et le cycle D est un cyclopentane. La tête polaire des stérols correspond à un groupement hydroxyle en position 3 du cycle A. De plus, les stérols contiennent souvent en position 17 dans le cycle D, une chaîne acyle, parfois ramifiée ou insaturée. En plus, les différents carbones des quatre cycles sont parfois méthylés ou insaturés. Sur la base de ce squelette carboné, il existe toutes sortes possibles de combinaisons. Chez les végétaux, les stérols sont appelés phytostérols, ils sont très diversifiés et l'abondance des sous-espèces de stérols varie d'une plante à l'autre. Dans l'espèce humaine, le stérol majoritaire est le cholestérol. Il est très important comme base constitutive des membranes. On estime que le taux de cholestérol cellulaire se situe autour 15 mol% lipides totaux de la levure^{12,13} et entre 20 et 30 mol% dans les cellules de mammifère^{14,15,17,22}. Du fait de sa taille, il permet de moduler la fluidité des membranes. Il agit tantôt comme un gélifiant - rigidifiant, notamment à faible concentration (<16 mol%), ou lorsque la température augmente ; tantôt comme un fluidifiant, à plus grande concentration, ou à des températures plus basses²³. Chez les mycètes, le stérol majoritaire est l'ergostérol et il a le même rôle constitutif que le cholestérol chez les mammifères.

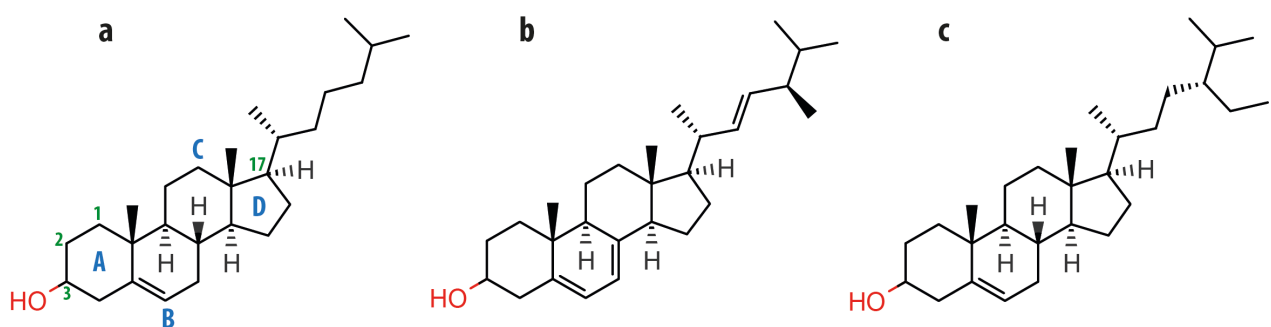


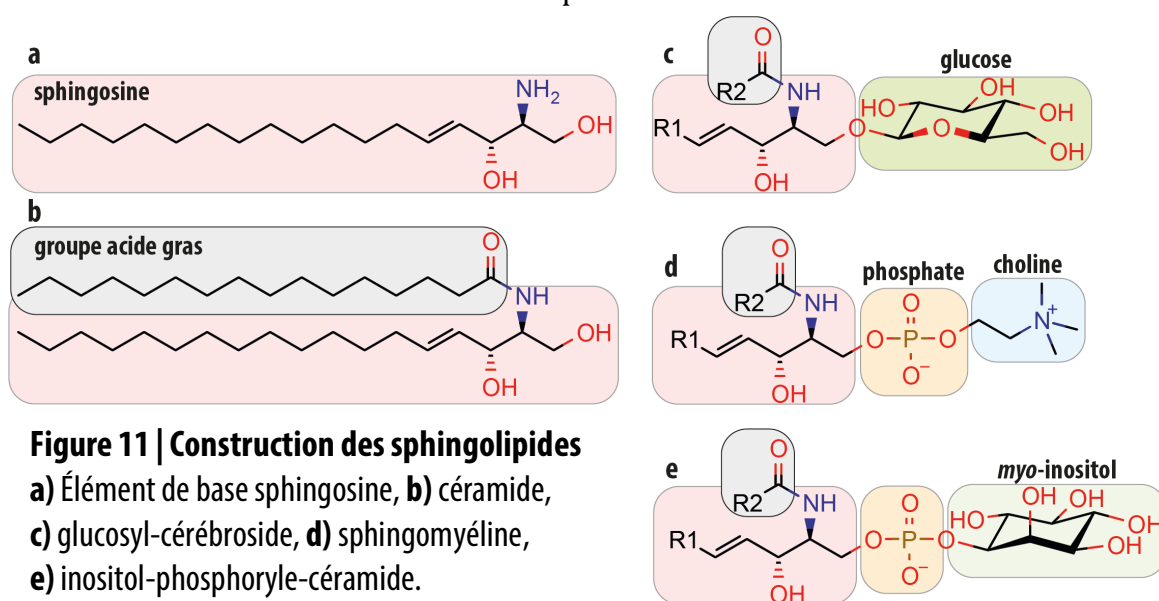
Figure 10 | Espèces majoritaires de stérol dans les membranes eucaryotes

a) Cholestérol chez les mammifères, **b)** ergostérol chez les mycètes, **c)** β -sitostérol chez les plantes terrestres.

La numérotation des trois premiers carbones et la position du carbone 17 sont indiquées en vert, les lettres des quatre cycles sont indiquées en bleu.

d. Les sphingolipides

En termes d'abondance, les sphingolipides (SLs) représentent la troisième grande classe de lipides constitutifs des membranes. Dans les cellules humaines comme dans les levures, les SL représentent environ 10 à 15 mol% des lipides totaux^{13-15,17,20}. Les SLs sont surtout localisés dans feuillet exoplasmique de la membrane plasmique. Les SLs sont très diversifiés, ils ont pour base un dérivé sphingoïde dont le représentant majoritaire est la sphingosine (**Fig. 11a**). Contrairement au glycérol des GPLs, le « squelette » de la sphingosine est généralement une sérine sur laquelle est branchée une chaîne acyle²⁴. Ensuite, la base sphingoïde acquiert un acide gras sur la position amine de la sérine pour donner un céramide (**Fig. 11b**). Le céramide est analogue au DAG avec un groupement hydroxyle libre qui sert de support pour l'ajout d'une tête polaire. La plupart du temps, la tête polaire est une phosphocholine et donne la sphingomyéline : le sphingolipide le plus abondant dans l'espèce humaine (**Fig. 11d**). Mais le groupement hydroxyle libre sert aussi de support à l'ajout d'un saccharide, de polysaccharides et d'inositol phosphate pour donner respectivement les cérébrosides (**Fig. 11c**), les gangliosides, et les inositol-phosphoryl-céramides (IPCs) (**Fig. 11e**). Les IPCs sont les SLs majoritaires de la levure. Comme la sphingomyéline et les IPCs ont un phosphate, ce sont des phospholipides. Les SLs ont deux rôles majeurs : 1) ils sont médiateurs de nombreux événements de signalisation et la régulation de leur métabolisme induit une pléthore de réponses physiologiques²⁴ ; 2) leur structure leur confère une forte affinité pour les stérols. Ensemble, ces lipides s'associeraient pour former des microdomaines membranaires, ce qui favoriserait le recrutement de certaines protéines²⁵.



R1 et R2 correspondent à des chaînes aliphatiques.

3. *La forme et la nature des lipides*

Chaque lipide a une forme géométrique et des propriétés chimiques uniques. D'abord on peut classer les lipides selon leur **volume** (longueur, largeur et diamètre), certains sont très petits comme les stérols ($\sim 1,7$ nm) ou l'acide docosahexaénoïque (DHA) qui se replie facilement en spirale (~ 1 nm). À l'inverse, d'autres lipides sont très grands comme le PI(4)P le plus abondant du cerveau qui porte une chaîne stéaryle et arachidonyle respectivement en *sn1* et *sn2* du glycérol ($\sim 3,5$ nm).

Ensuite, on peut classer les lipides selon les **charges** portées par leur tête polaire. Si la tête polaire est non ionisable dans les conditions physiologiques, le lipide est neutre (**Fig. 12a**). C'est le cas du stérol ou du DAG qui interagissent avec les autres atomes au mieux *via* des liaisons hydrogène. Si la tête polaire est zwitterionique, la charge globale est neutre, c'est le cas des PC et PE. Cependant, la tête polaire de ces lipides est un dipôle caractérisé par un potentiel électrostatique orienté dans l'espace (**Fig. 12b**). Par conséquent, ces lipides augmentent l'intensité des forces de Van de Waals avec les autres molécules polaires et ils peuvent interagir avec les solutés ioniques. Si la tête polaire des lipides contient une charge nette négative, ils sont anioniques, ils attirent les cations à grande distance pour former des liaisons ioniques fortes, c'est le cas des PS, PI et PA (**Fig. 12c**). Enfin, à ma connaissance les lipides cationiques n'existent pas dans la nature, hormis la sphingosine à $\text{pH} > 6,7$ ²⁶; mais ils peuvent être synthétisés à des fins de bio-ingénierie thérapeutique²⁷.

Enfin en fonction de leur composition, les lipides peuvent être **coniques**, **cylindriques** ou **coniques inverse** (**Fig. 12d**). Typiquement, les lysophospholipides ont une forme de cône inverse. La tête polaire des lysophospholipides occupe un volume beaucoup plus important que l'extrémité de la chaîne aliphatique. Les phospholipides à grosse tête polaire, comme le PI(3,4,5)P₃, ont également la forme de cône inversé, mais la plupart des phospholipides saturés occupent un volume cylindrique. Les deux chaînes aliphatiques libres d'effectuer des rotations occupent un volume circulaire identique à la circonférence de la tête polaire. Par contre, si au moins une des chaînes aliphatiques est insaturée, l'insaturation forme un coude dans la chaîne qui augmente le volume occupé par les chaînes devant celui de la tête polaire. Dans ce cas, et plus particulièrement pour les lipides à petite tête polaire comme le DAG, le lipide est caractérisé par une forme conique.

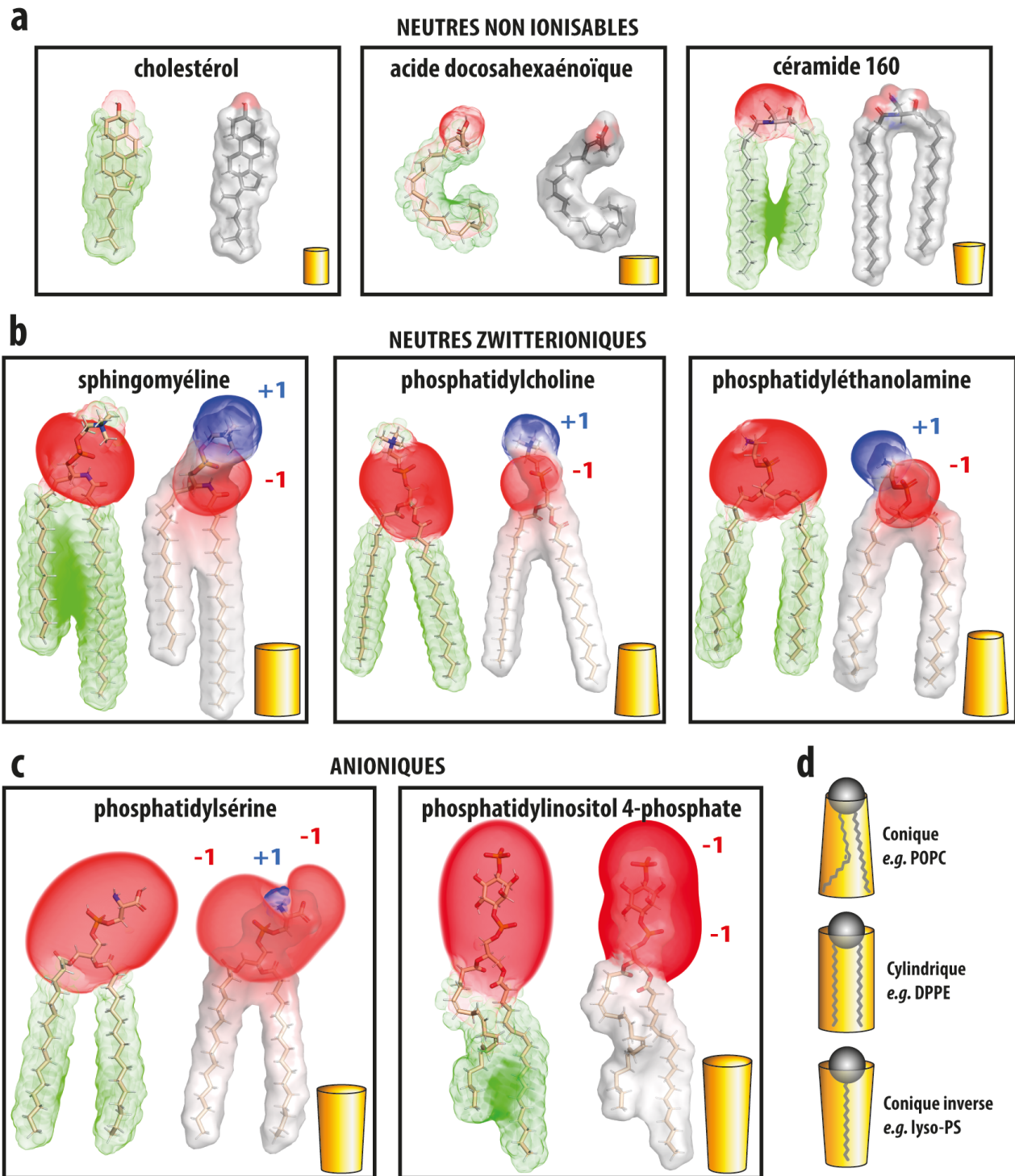


Figure 12 | Propriétés physico-chimiques de quelques lipides

a) Lipides neutres, non ionisables, plutôt de petite taille **b)** Lipides neutres à tête polaire zwitterionique
c) Lipides anioniques **d)** Types de volumes géométriques caractéristiques de certains lipides.

Pour chaque lipide : **à gauche**, la polarité est représentée en rouge par la densité électronique qui reflète l'électronégativité de chaque atome (échelle de Pauling normalisée entre 0 et 1) et l'hydrophobicité en vert (volume de van der Waals) ; **à droite** : le gradient de potentiel électrostatique (Poisson-Boltzmann) est représenté en rouge (négatif) et bleu (positif), et blanc (neutre) sur une échelle $\pm 1 k_B T/e$. Les charges individuelles sont indiquées.

4. *Propriétés physiques des membranes*

a. *La formation spontanée des membranes*

En milieu aqueux, les lipides s'assemblent spontanément pour former des membranes. Cet assemblage est la manifestation de l'effet hydrophobe signifiant littéralement « qui a peur de l'eau ». Il s'agit d'une conséquence de la force cohésive des molécules d'eau qui sont maintenues par un réseau de liaisons hydrogène. Une liaison hydrogène résulte de la délocalisation d'un électron depuis le doublet non liant d'un hétéroatome (*e.g.* l'oxygène) vers l'hydrogène porté par un autre hétéroatome²⁸. Les molécules d'eau forment donc une phase polaire dense dans laquelle la présence d'un corps gras est énergétiquement défavorable, car les chaînes aliphatiques ne permettent pas les liaisons hydrogène. Les corps gras s'étalent dans l'eau de manière à minimiser la tension γ à l'interface entre la phase hydrophile et la phase hydrophobe. D'un point de vue thermodynamique, cette réaction peut s'exprimer de manière simplifiée comme la dérivation de l'énergie libre de Gibbs suivante :

$$\Delta G = \gamma A - T\Delta S$$

Où : γ , A , T et ΔS sont respectivement : la tension interfaciale, l'aire de la membrane, la température, et l'entropie du mélange. La réaction est spontanée pour $\Delta G < 0$, ainsi sans apport de matière, ni de chaleur, la formation spontanée des membranes, est un processus qui dépend majoritairement de l'entropie S .

En fonction de leur quantité et de leur nature, les lipides s'autoassemblent en formant soit des micelles, soit une monocouche qui s'étale sur l'eau (expérience de Langmuir), soit une bicouche lipidique (déduction de Görter et Grendel). Du fait de la forme plutôt cylindrique de la majorité des phospholipides, la bicouche lipidique est la structure la plus commune qui se forme dans le milieu aqueux. Pour minimiser la tension interfaciale des deux feuilletts, la membrane se referme spontanément et forme une vésicule. La membrane est donc un objet sans bord, idéalement semblable à une sphère. L'épaisseur de la membrane est d'environ 6 *nm* et dépend des lipides qui la composent. Les vésicules artificielles sont appelées liposomes. Si l'on compare un petit liposome de quelques dizaines de nanomètres de diamètre avec la membrane plasmique d'une levure par exemple, la membrane plasmique paraît parfaitement plane par rapport au liposome (**Fig. 13**).

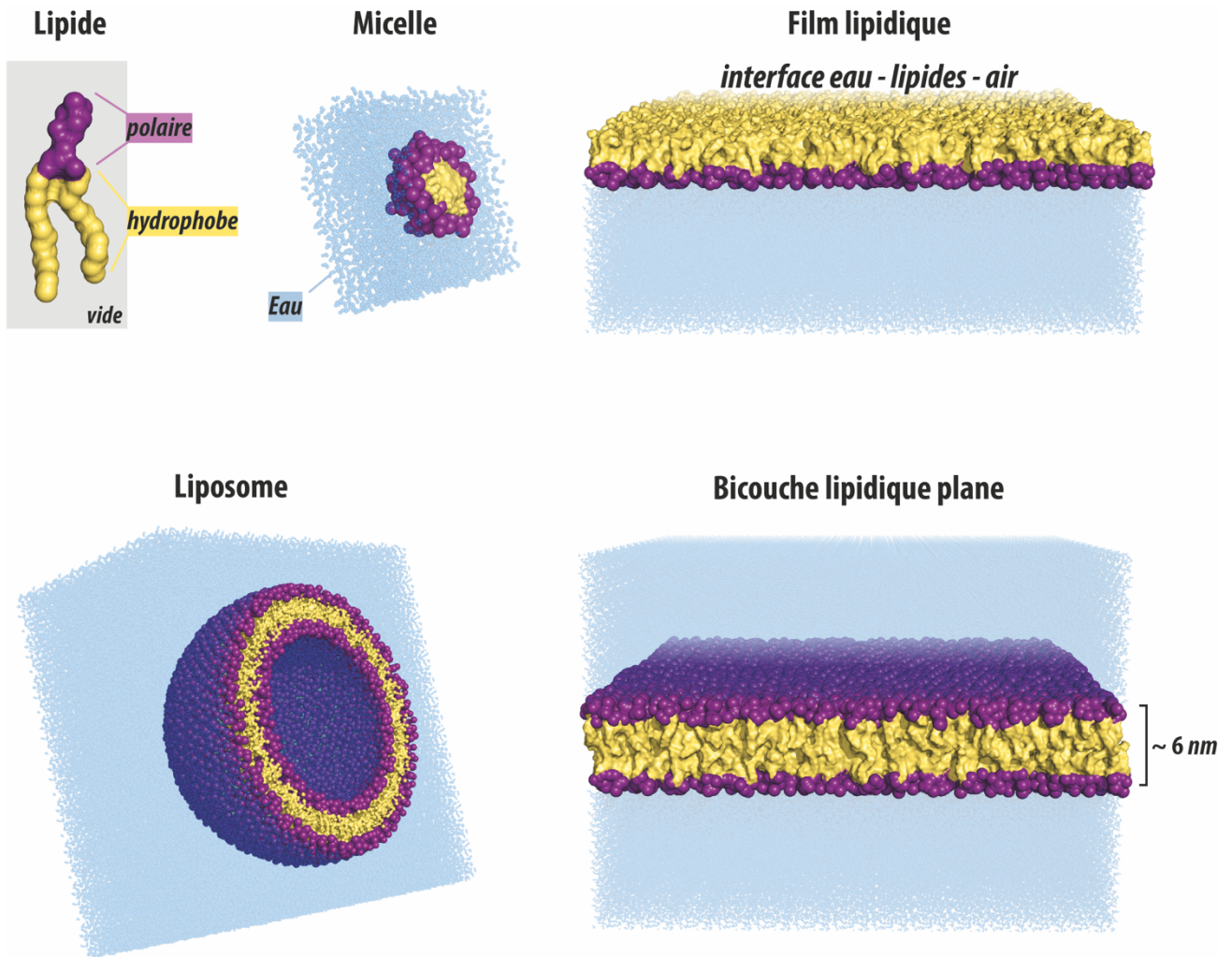


Figure 13 | Comment les lipides forment spontanément des membranes dans l'eau

Les lipides s'assemblent dans l'eau selon un phénomène entraîné par une force entropique : l'effet hydrophobe. Les têtes polaires s'orientent face au solvant aqueux et les chaînes aliphatiques sont repoussées et forment le cœur hydrophobe des membranes. En faible quantité, les lipides s'assemblent en micelles. Idéalement, les lipides forment une monocouche en surface de l'eau. Mais si les lipides sont mélangés dans le solvant, la formation de bicouches lipidiques est favorisée. La bicouche lipidique est une membrane qui se referme sur elle-même pour former une vésicule sphérique. Enfin, si la membrane est infiniment grande, la bicouche lipidique est virtuellement plane.

b. *L'assemblage en phase des lipides*

D'après la relation précédente, le premier paramètre majeur qui intervient sur la partition des lipides est la température. Plus la température augmente, plus l'agitation moléculaire est intense. Chaque lipide est caractérisé par une température de fusion qui dépend de sa structure.

Plus la chaîne hydrocarbonée est longue, plus la température de fusion est élevée (**Fig. 14a**). En dessous de cette température, les lipides s'assemblent en une phase **compacte de type gel** (L_{β}) dans laquelle les chaînes hydrocarbonées sont étendues et parallèles. Au-dessus de la température de fusion, les chaînes s'agitent, la phase est **liquide et désordonnée** (L_D) (**Fig. 14d**). La température de fusion diminue aussi avec le degré d'insaturation qui dépend aussi de la position de l'insaturation. Les insaturations diminuent la compacité et favorisent la fluidité de la membrane (**Fig. 14b**). Un cas concret pour illustrer ce phénomène est la différence entre les beurres riches en graisses saturées et les huiles riches en acide gras insaturé.

Il existe une troisième phase intermédiaire : la phase **liquide et ordonnée** (L_o). Dans cette phase, la température est suffisante pour favoriser le comportement fluide des lipides, par contre certains lipides comme les stérols réduisent le degré de liberté des chaînes aliphatiques ce qui augmente la compacité. In vitro, en fonction de la densité en acide gras saturé, insaturé et stérol dans les membranes (**Fig. 14c**), la tendance qu'ont les lipides à former des phases est à l'origine des séparations de phase liquide - liquide dont la conséquence est l'apparition de microdomaines parfois appelés radeaux lipidiques (*lipid raft*)²⁵ (**Fig. 14e**). Les radeaux lipidiques favoriseraient l'insertion et la ségrégation de certaines protéines transmembranaires et ils donnent une explication au modèle en mosaïque fluide des membranes cellulaires suggéré par Singer et Nicholson en 1972¹⁰. Néanmoins, les mécanismes qui contrôlent et régulent ce phénomène de partition des lipides restent très mal compris²⁵.

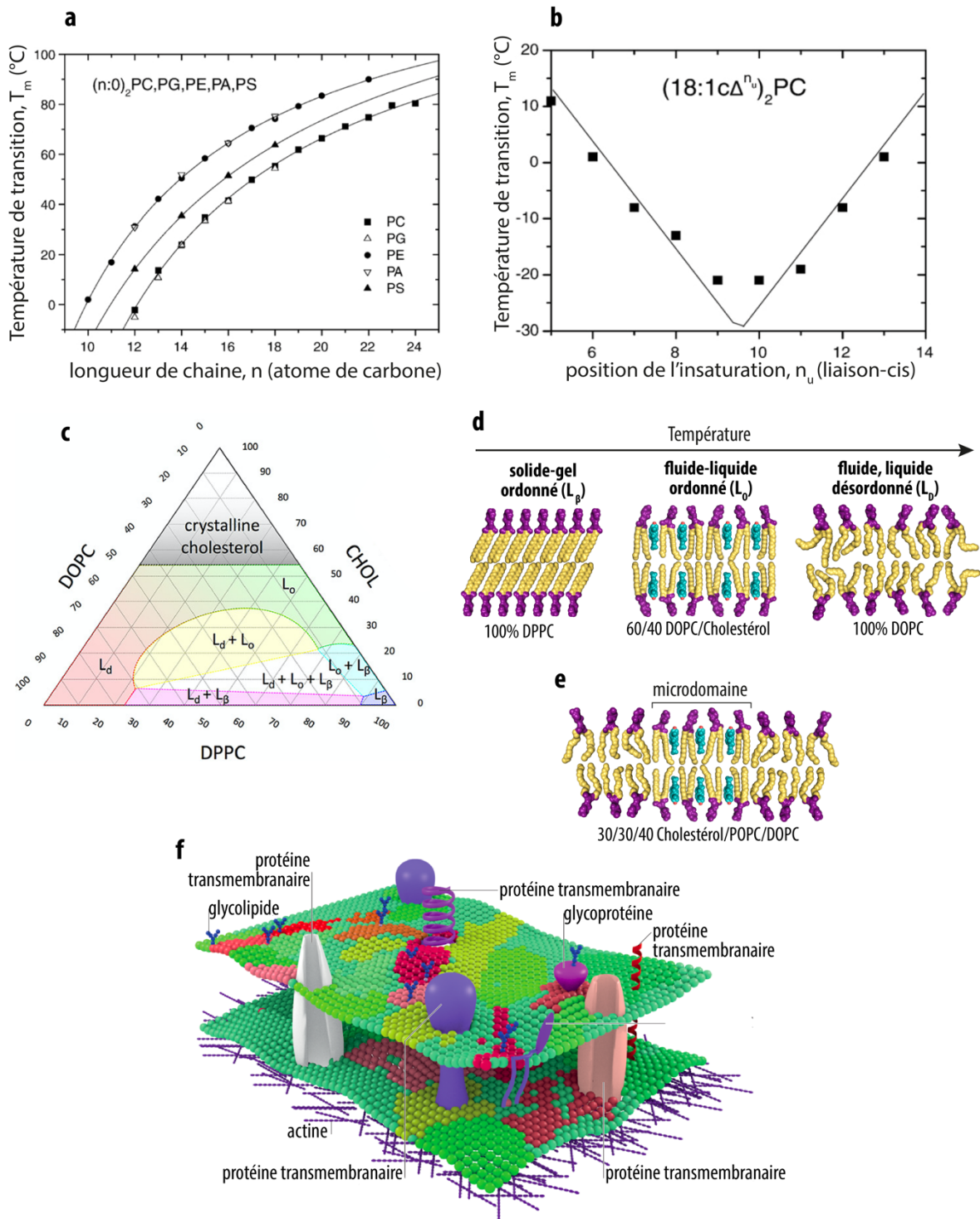


Figure 14 | Comportement d'assemblage en phase des lipides

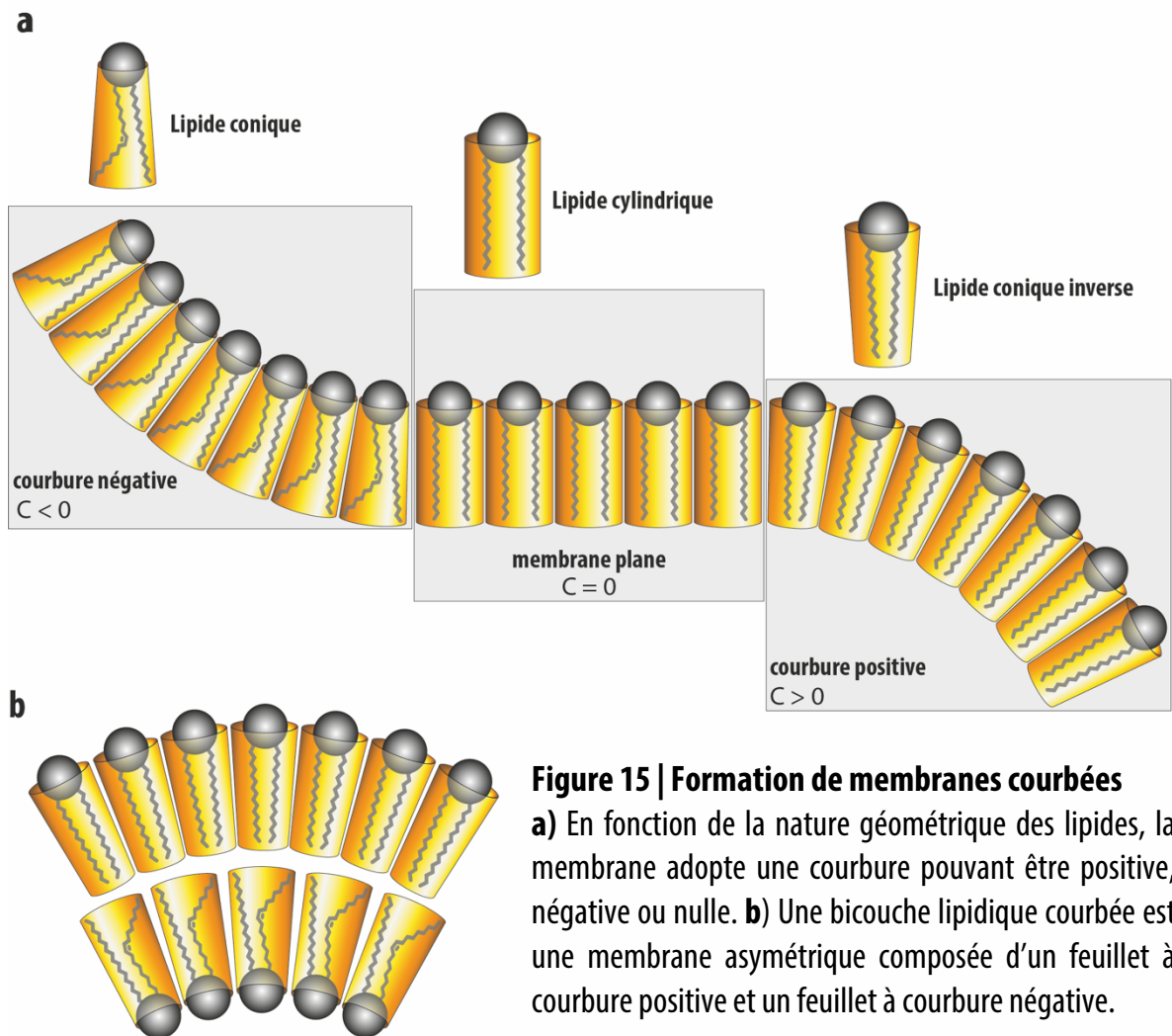
a) Effet de la longueur de chaîne sur la température de fusion de plusieurs phospholipides avec deux chaînes aliphatiques saturées identiques **b)** Effet de la position de l'insaturation sur la température de fusion de la PC avec deux chaînes aliphatiques identiques portant une seule insaturation **c)** Diagramme de phase pour des mélanges ternaires de DOPC (18:1-18:1), DPPC (16:0-16:0) et cholestérol obtenu par simulation de dynamique moléculaire à 37°C. À forte concentration le cholestérol forme un solide cristallin. **d)** Modèles de membrane dans les différentes phases L_β , L_o et L_d **e)** Partition en deux phases différentes dans une même membrane. **f)** Modèle membranaire en mosaïque fluide expliquée par l'assemblage en phase des lipides. **a)** et **b)** adapté de D. Marsh, 2010⁴⁰⁷ ; **c)** adapté de Marrink *et al.*, 2019⁴⁰⁶ ; **f)** adapté de Sezgin, Levental *et al.*, 2018²⁵.

c. Modulation de la courbure membranaire

Plus le diamètre d'une vésicule est grand, plus sa membrane est courbée. Le diamètre des membranes varie considérablement d'un organe à l'autre. La membrane plasmique d'une cellule comme la levure nous apparaît sphérique à notre échelle, mais si on l'observe à l'échelle d'une protéine de quelques nanomètres, elle semble parfaitement plane. Ce n'est pas exactement le cas de la membrane plasmique des cellules animales comme les cellules mésenchymateuses ou les neurones, leur membrane plasmique subit les contraintes du cytosquelette, elles sont localement déformées ce qui génère de la courbure membranaire. Le RE forme un réseau de filaments tubulaire qui présente de très nombreuses courbures. Les citernes du Golgi ont des bords très courbés dans deux dimensions de l'espace alors que la majorité de la surface est plane dans une troisième dimension. Pour permettre toutes ces formes et minimiser les contraintes sur la membrane, la forme des lipides (conique, cylindrique ou conique-inverse) contribue de façon localisée au maintien d'une courbure stable et d'éviter la rupture de la membrane.

Si l'on considère une membrane composée uniquement de lipides cylindriques, les axes de rotation des cylindres sont parallèles entre eux et cela limite la déformabilité de la membrane qui tend à être plane ($C = 0$, **Fig. 15a**). Ensuite, si un des feuillet est enrichi en lipides coniques avec une petite tête polaire comme le DAG, ou le PA les courbures négatives sont favorisées ($C < 0$, **Fig. 12a**). Au contraire, si le feuillet est enrichi en lipides coniques inversés, les courbures positives sont favorisées ($C > 0$, **Fig. 15a**).

Comme les membranes cellulaires sont des bicouches lipidiques, une membrane courbe est caractérisée par deux feuillet dont la courbure est opposée. Dans ce cas, la membrane est asymétrique (**Fig. 15b**). Par exemple, lors de l'endocytose, qui correspond à une invagination de la membrane plasmique pour former une vésicule, le feuillet cytosolique et le feuillet exoplasmique adoptent respectivement une courbure positive et négative. Une étude a montré récemment que les lipides anioniques à grande tête polaire (coniques inversés) s'accumulent localement dans le feuillet cytosolique de la membrane plasmique pour amorcer la formation des vésicules d'endocytose²⁹.



d. *Épaisseur et défaut de compacité*

Les membranes cellulaires sont plus ou moins rigides, compactes et épaisses. Ces trois propriétés dérivent en partie des propriétés évoquées précédemment. Une membrane avec de nombreux phospholipides de grande taille est plus épaisse. Une membrane en phase liquide ordonnée est plus compacte qu'une membrane en phase liquide désordonnée. Une membrane courbée peut contenir un feuillet décompacté et un feuillet plus compact. De plus, si la membrane est composée pour moitié de grands lipides coniques inverses et pour moitié de petits lipides cylindriques, alors la surface de la membrane est parsemée de cavités entre les têtes polaires³⁰. On appelle ces cavités des défauts de compacité. Ce sont des zones où le cœur hydrophobe de la membrane est directement accessible au solvant. Typiquement, les défauts de compacité seront nombreux dans une membrane riche en phospholipides insaturés ou coniques. Les stéroïdes, qui sont petits, permettent de combler ces défauts. À l'inverse, une membrane riche en lipides saturés, où les lipides sont bien ordonnés, présentera des défauts de compacité mineurs (**Fig. 16a**). Le mouvement des lipides dans la membrane est dynamique et rapide, par conséquent, ces petites cavités sont transitoires ; elles se forment et disparaissent en permanence. Les défauts de compacité ne permettent donc pas à l'eau de traverser la membrane. Par contre, ces cavités peuvent être comblées par des acides aminés hydrophobes, ce qui favorise l'insertion des protéines périphériques qui interagissent avec les membranes. Enfin, il existe aujourd'hui des outils bio-informatiques qui permettent de visualiser et de cartographier la densité de ces défauts de compacité en fonction de la composition en lipide d'une membrane plane³¹ (**Fig. 16b**). Ces outils permettent de mieux comprendre le rôle de certains lipides dans la formation des défauts de compacité qui sont détectés par de nombreuses protéines.

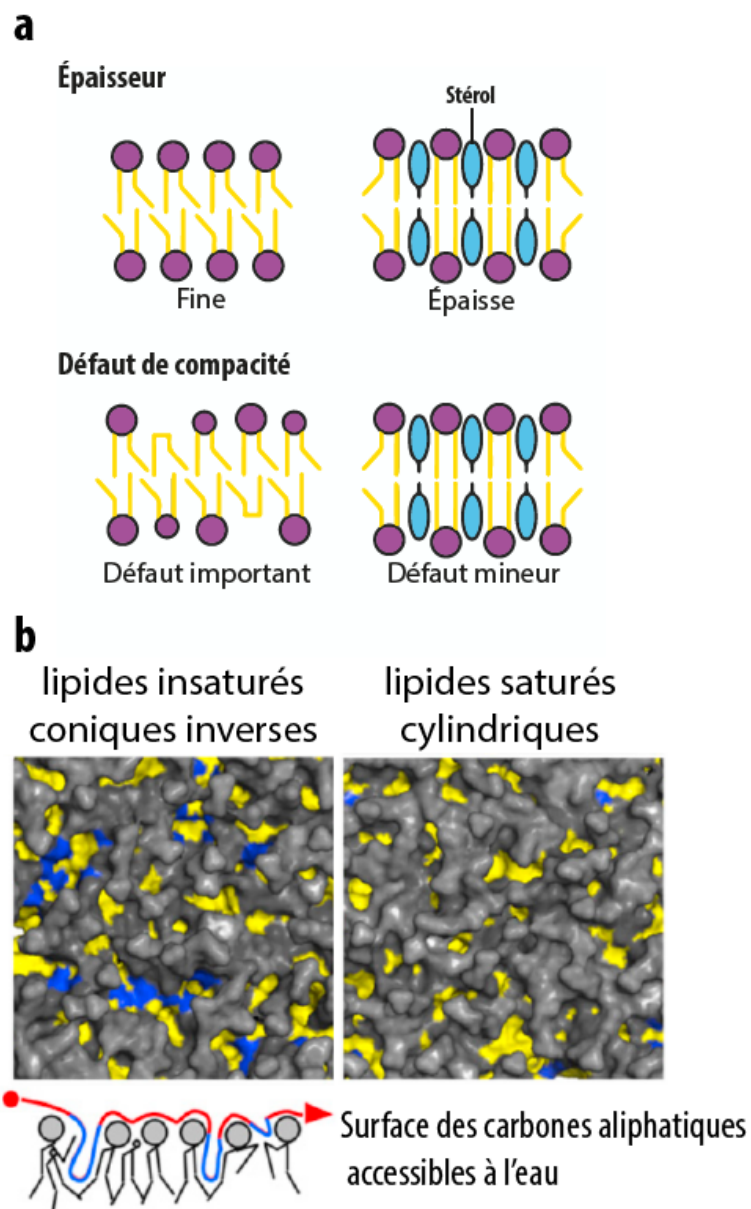


Figure 16 | Les défauts de compacité sont des cavités en surface des membranes

a) Effet de la composition en lipides sur l'épaisseur et la compacité d'une membrane, les stérols ont pour effet d'épaissir les membranes et de combler les défauts de compacité principalement dûs aux insaturations et aux lipides coniques. **b)** Exemple de défauts de compacité visibles en surface de la membrane lors de simulations de dynamique moléculaire. Les atomes polaires sont représentés en gris, les chaînes aliphatiques sont colorées en jaune. La coloration bleue indique les atomes aliphatiques qui sont accessibles aux molécules d'eau. Il y'a beaucoup plus de cavité dans une membrane enrichie en lipide insaturés. **a)** Adapté de Holthuis & Menon, 2014⁴⁰⁸ ; **b)** Adapté de Vamparys, Gautier, Vanni *et al.*, 2013¹⁶⁸.

e. *Le potentiel électrostatique en surface des membranes*

Les phospholipides sont électriquement chargés dans les conditions physiologiques. La PC et la PE sont zwitterioniques, et donc neutres. Toutefois, la majorité des autres phospholipides sont anioniques (PA, PG, IPC, PI, PS et PIPs). Ils portent tous au moins une charge négative du fait du phosphate en position *sn3* du glycérol. Les lipides anioniques confèrent aux membranes une charge de surface négative. Étant donné que les lipides anioniques sont présents dans toutes les membranes cellulaires, les membranes sont intrinsèquement des surfaces plus ou moins chargées négativement³².

La loi de Coulomb nous dit que tout objet chargé électriquement exerce sur un autre objet chargé une force électrostatique attractive ou répulsive dont la magnitude est proportionnelle à la charge des deux objets et inversement proportionnelle au carré de la distance entre eux. Deux charges de même signe se repoussent et deux charges de signes opposés s'attirent. De ce fait, toute charge crée un champ électrique, c'est-à-dire un gradient de potentiel électrique qui s'exprime en *millivolt (mV)*. Les interactions électrostatiques sont des interactions à longue distance ($> 0,5 \text{ nm}$)³³. Comme on peut considérer les membranes comme des surfaces statiques, planes et infiniment grandes devant les solutés cellulaires, le gradient du potentiel électrostatique est perpendiculaire au plan de la membrane (**Fig.17a**). La charge de surface d'une membrane est définie par la densité de charge qu'elle porte en $C.nm^{-2}$. En fonction de cette densité de charge, les cations ont tendance à s'accumuler à la surface de la membrane pour neutraliser les charges négatives. Les ions forment ainsi deux couches, une couche de Stern composée de cations quasiment immobiles et une couche de Gouy-Chapman, diffuse, et plus dense en cations qu'en anions. Le potentiel zêta (ζ) est un paramètre souvent évoqué dans la littérature pour décrire le potentiel électrostatique d'une surface, il correspond au potentiel (en mV) au niveau du plan de cisaillement entre les deux couches d'ions³⁴ (**Fig.17a**).

Stuart McLaughlin *et coll.* montrent comment la densité en lipides anioniques des membranes leur confère leur charge de surface (**Fig.17b**). Par des expériences, *in vitro*, ils remarquent que la théorie de Gouy-Chapman-Stern, décrit effectivement le potentiel électrostatique en surface des membranes comme fonction de la distance, de la concentration en sel, et du pourcentage molaire de lipides anioniques tels que la PS ou le PI³⁵.

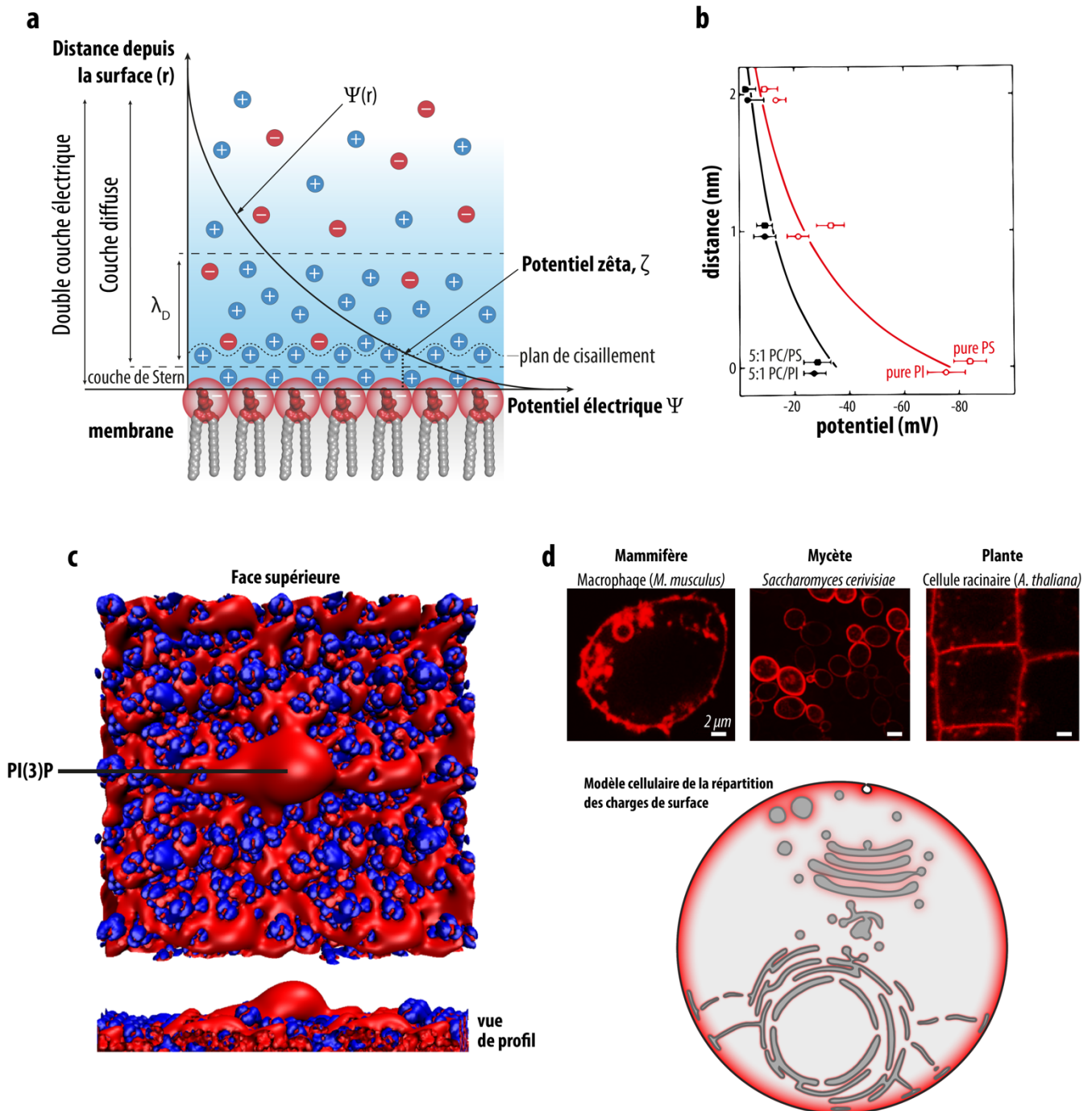


Figure 17 | Effet des phospholipides anioniques sur la charge de surface des membranes

a) Schéma de la répartition en couches des ions causée par la densité de charge en surface de la membrane, le potentiel électrique est dépendant de la distance depuis les têtes polaire anioniques. λ_D : longueur de Debye.

b) Effet de la concentration en PS et PI d'une membrane sur son potentiel électrique, mesuré *in vitro*. adapté de Langner, Cafiso, Marcelja & McLaughlin, 1990³⁵

c) Potentiel électrostatique d'une membrane de POPC contenant un seul PI(3)P. Image capturée lors d'une simulation de dynamique moléculaire. Les surfaces rouge et bleu indiquent les charges portées par les phosphates et l'amine des choline respectivement. D'après Fuller, Martinez & Wade, 2014⁴⁴

d) La localisation de la sonde fluorescente C2_{Lact} rend compte de la présence de PS et plus ou moins de la charge des différentes membranes cellulaires. Macrophages et *S. cerevisiae* : d'après Yeung et al. 2008⁴⁵ ; cellule racinaire : d'après Platre et al, 2018⁴⁷ ; couleurs d'origine modifiées.

Les ions, selon leur valence ou leur électronégativité, ont une influence toute particulière sur les propriétés des membranes³⁶. Par exemple, le Na⁺, dans des concentrations similaires à celle de PS réduit la répulsion des têtes polaires, alors qu'à forte concentration, il neutralise moins bien la PS, augmente l'entropie et génère des défauts de compacité³⁷. Le Ca²⁺ quant à lui réduit fortement l'entropie des membranes anioniques, de manière dépendante de la concentration³⁸. Le Ca²⁺ rend le potentiel zêta de ces membranes positif et il favoriserait la formation de liaisons entre le phosphate de la PC et les deux charges négatives de la PS. Cette configuration expliquerait sans doute pourquoi le Ca²⁺, en forte concentration, a tendance à faire fusionner des membranes riches en PS. Une étude récente indique que le Ca²⁺ augmente la tension de surface de la membrane, en particulier lorsque la membrane contient du PI(4,5)P₂. Le Ca²⁺ favoriserait de manière locale une courbure membranaire négative et ce cation est probablement important dans le remodelage des membranes anioniques dans la cellule³⁹. Plusieurs études indiquent que la densité de charge en surface des membranes est régulée dans la cellule. En effet, nous savons que la PS est utilisée par la cellule pour ses propriétés anioniques afin de remodeler localement les membranes lors des événements d'endocytose, de phagocytose, et de trafic vésiculaire⁴⁰⁻⁴². En plus des ions, cette régulation fait sans doute intervenir des mécanismes de transport et de distribution de la PS⁴³.

Nous n'avons pas encore beaucoup d'informations sur les liens entre les équilibres ioniques cellulaires, la distribution des lipides et le remodelage des membranes. Néanmoins, de plus en plus d'outils sont disponibles pour explorer ces phénomènes. On est désormais capable d'avoir un aperçu à l'échelle du nanomètre du potentiel électrostatique généré par chaque lipide dans une membrane, avec ou sans ions, grâce à la dynamique moléculaire *in silico*⁴⁴ (**Fig.14C**). De plus, grâce au développement de sondes fluorescentes spécifiques de la PS ou des lipides anioniques, on peut évaluer la distribution des charges en surface des membranes dans la cellule⁴⁵⁻⁴⁷ (**Fig. 14d**). En combinant ces techniques à des expériences *in vitro*⁴⁸⁻⁵⁰, et à l'électrophysiologie⁵¹, on devrait pouvoir à terme améliorer notre compréhension de l'éventuel lien qui existerait entre la distribution des lipides anionique et la régulation des flux ioniques dans les cellules. En effet, l'électrophysiologie peut s'avérer utile pour étudier ce lien. Par exemple certaines scramblases à PS de la famille des TMEM16 sont aussi des canaux ioniques^{52,53}.

E. Distribution des lipides et identité des organites

Les lipides ne sont pas distribués aléatoirement dans les différentes membranes cellulaires. Grâce à de nombreuses expériences de fractionnement cellulaire et de lipidomique, on s'aperçoit que la distribution des lipides suit une certaine logique commune aux eucaryotes. Cependant, les proportions des différents lipides dans les organites ne sont pas constantes.

D'une lignée ou d'une souche cellulaire à l'autre ces proportions peuvent varier sensiblement que ce soit chez les mammifères^{15,54}, les végétaux⁵⁵, ou *S. cerevisiae*^{12,56}. De plus, la composition en lipides des organites change dans le temps, elle dépend du cycle cellulaire⁵⁷, dans le foie elle dépend du rythme circadien et de la prise de repas⁵⁸, chez la levure elle dépend du substrat carboné et de la disponibilité en oxygène^{18,56}, et chez les plantes la composition en lipides dépend par exemple de la nature du sol⁵⁹. Néanmoins, de nombreux auteurs ont proposé un aperçu général de la composition particulière en lipide de chacun des organites^{20,55,60-65}. À la suite de ce paragraphe, je décris seulement ce que nous savons de la composition en lipides du RE et de la membrane plasmique (**Fig. 18**).

1. Composition en lipide du RE

La PC dans le RE représente entre 30 et 60 % des phospholipides^{17,54,66-68}. Le PE représente quant à lui environ 20 % des phospholipides avec des variations allant de plus ou moins 15 %^{12,17}. Ensuite, dans le RE des mammifères, les PI sont assez rares, ils représentent moins de 10% des phospholipides (~6 %) ^{17,54,67}. Par contre, pour *S. cerevisiae* ce taux est plus important, entre 10 % et 20 %^{18,66,68}.

La PS est plus rare dans le RE, et vraisemblablement, quel que soit l'organisme ou les conditions de croissance, son taux est constant autour de 6% des phospholipides (± 4 %) ^{17,54,55,66,67}.

Le PA est le plus rare des glycérolipides et compte pour moins de 4 % des phospholipides du RE^{17,54,66}. Les phospho-sphingolipides représentent ~10 % (± 7 %) des phospholipides du RE des mammifères et des levures^{17,54,66,67}. Les autres phospholipides comme les lysophospholipides et le PG représentent ensemble, moins de 5 % des phospholipides.

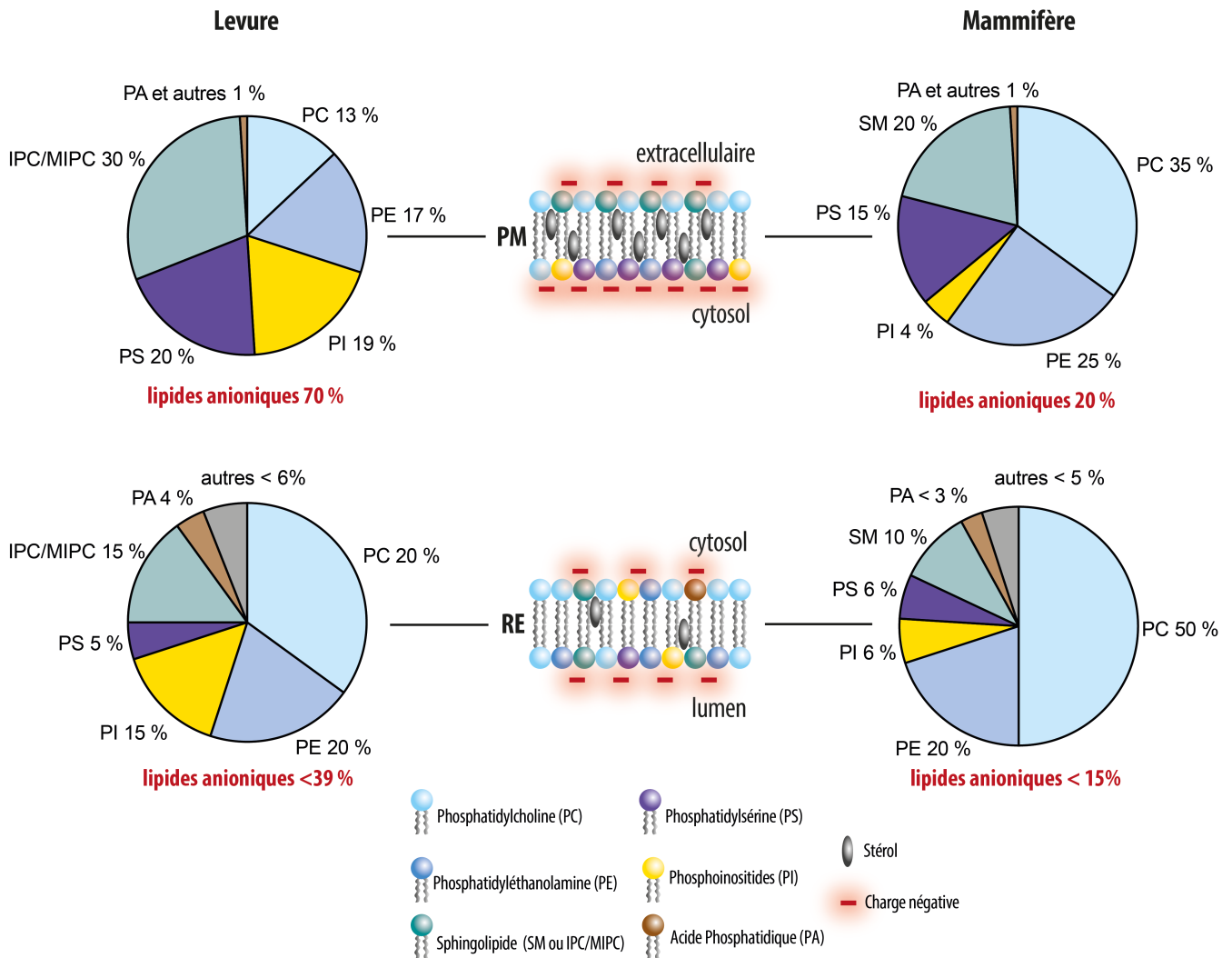


Figure 18 | Composition en lipides du RE et de la membrane plasmique chez la levure et les mammifères
 A partir de plusieurs sources citées dans le texte, il est possible d'obtenir un aperçu général de la composition du réticulum endoplasmique (RE) et de la membrane plasmique (PM) dans la levure et les cellules de mammifère.

Enfin le RE est plutôt riche en lipides mono et polyinsaturés, avec seulement ~20% de lipides saturés^{17,69}. Les quantités de cholestérol ou d'ergostérol sont faibles dans cet organe et représentent entre 5 et 10% des lipides totaux. Ce qui est sans doute nécessaire au maintien de la structure du RE en fin réseau tubulaire.

Par ailleurs, le RE est une membrane dans laquelle, *a priori*, la PS est distribuée asymétriquement, c'est-à-dire de manière non équitable dans les deux feuillets de la membrane. D'anciennes analyses semblent indiquer que certains phospholipides sont plutôt localisés dans le feuillet luminal du RE⁷⁰⁻⁷³. En 2011, Fairn *et al.*, confirment que la PS s'accumule effectivement dans le feuillet interne du RE de *S. cerevisiae*⁷⁴. Mais une étude récente remet en cause ces découvertes. Dans la levure, la PS serait uniformément répartie dans les deux feuillets tandis que dans une lignée cellulaire de souris, la PS serait localisée très majoritairement dans le feuillet cytosolique⁷⁵.

2. Composition en lipide de la membrane plasmique

Dans la membrane plasmique des mammifères, la PC représente entre 20 et 50 % des phospholipides et la PE entre 20 et 30 %^{17,54,67,76}. Dans la levure, la teneur en PC de la membrane plasmique est un peu inférieure (15 % des phospholipides). Tandis que la PE représente un peu moins de 20 % des phospholipides^{18,66}.

Ensuite, la PS est très abondante dans la membrane plasmique. Dans cette membrane elle compte pour 10 à 20 % des phospholipides chez les mammifères ce qui en fait le troisième phospholipide le plus abondant^{17,54,67,76}. Chez la levure, cette densité de PS est encore plus élevée, elle est comprise entre 20 et 30 % des phospholipides^{18,66,77,78}.

Les PI sont rares dans la membrane plasmique des mammifères, ils représentent entre 0,5 et 7 % des phospholipides^{17,54,67,76} ; par contre, dans la levure, ce taux est généralement bien plus élevé, autour 20-30 %^{18,56,66,78,79}. L'absence de glucose ou d'oxygène semble responsable de l'augmentation du taux de PI au détriment du taux de PS^{18,56}.

Chez les mammifères, la teneur en sphingomyéline de la membrane plasmique est comprise entre 15 à 25 % des phospholipides^{17,54,67,76}. Chez la levure, les IPCs représentent environ 30 % des phospholipides de la membrane plasmique^{66,77}. Le PA et les autres phospholipides sont très rares dans les cellules de mammifère (< 3 % des phospholipides). Dans la levure, la proportion de PA de la membrane plasmique s'élève

aux alentours de 4 à 7 % des phospholipides. Par ailleurs, il se pourrait que la quantité de PG soit significative dans la membrane plasmique des mammifères (~10%)¹⁷, mais ce lipide est ignoré dans la plupart des analyses.

Par ailleurs, les stérols représentent environ 40 % des lipides totaux de la membrane plasmique^{64,80}. De plus, la membrane plasmique est plus riche que le RE en lipides saturés (~30 à 40% des chaînes aliphatiques). C'est pourquoi cette composition rend cette membrane à l'interface avec le milieu extracellulaire épaisse et résistante.

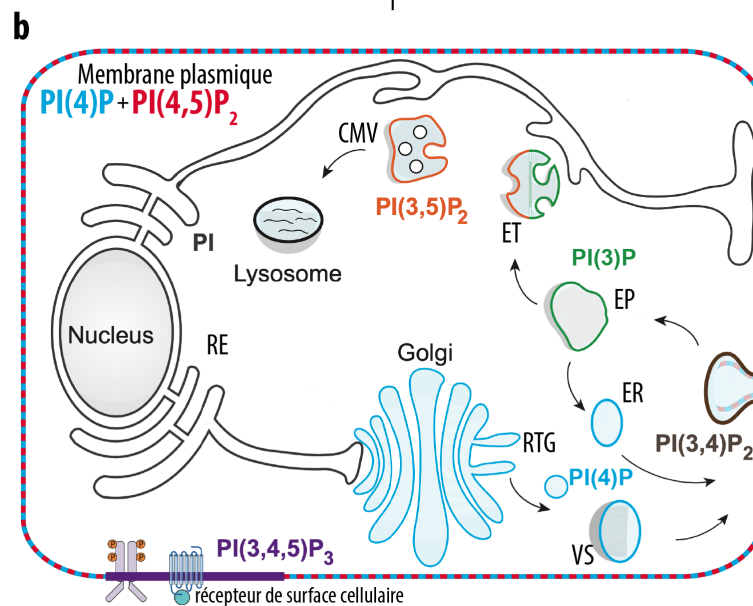
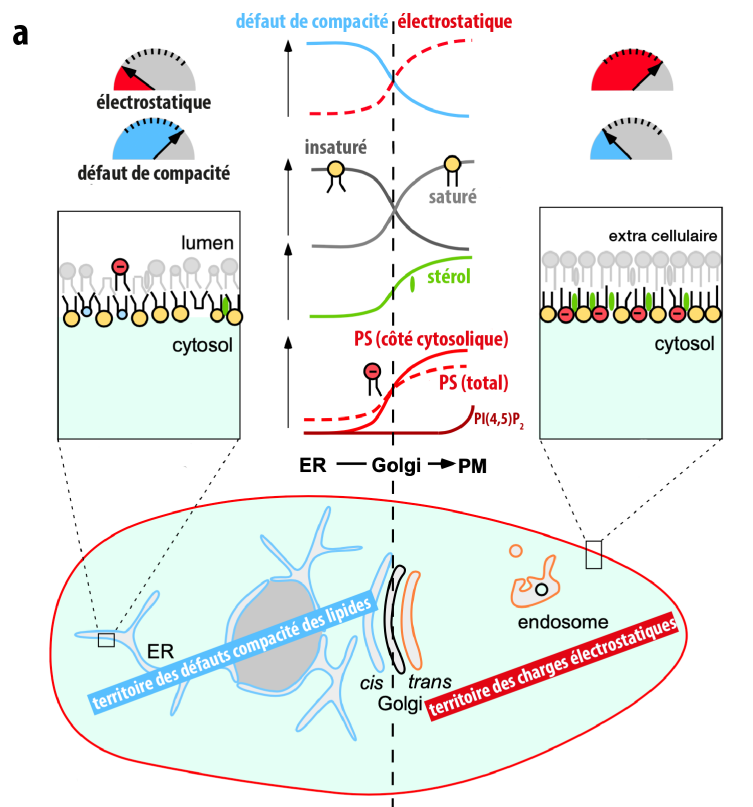
Enfin, l'asymétrie de la membrane plasmique est certaine. Le feuillet extracellulaire est constitué exclusivement de PC et de sphingolipides tandis que les PS, PE et PI sont presque exclusifs du feuillet cytoplasmique. Cette caractéristique est conservée que ce soit chez les mammifères^{73,76,81} ou dans la levure^{43,82,83}. D'ailleurs, la levure semblerait capable de réguler cette asymétrie pour moduler le potentiel électrostatique de sa surface, ce qui lui permettrait de s'adapter à des variations de la concentration des différents ions de part et d'autre de la membrane et de moduler l'activité de certaines protéines membranaires^{43,82,83}.

3. *Le modèle des territoires cellulaires*

Étant donné que la distribution des lipides n'est pas aléatoire, mais qu'elle semble plutôt suivre une logique nécessaire au maintien de l'intégrité des organites, Bigay & Antony proposent en 2012 un modèle qui consiste à dire que les propriétés membranaires intrinsèques des organites définissent des territoires subcellulaires reconnus par des ensembles distincts de protéines⁸⁴. En effet, beaucoup de protéines ciblent spécifiquement certains organites et des études *in vitro* indiquent que leur spécificité dépend souvent de leur capacité à reconnaître des propriétés physico-chimiques particulières des membranes. Ces deux grandes propriétés sont les défauts de compacité associés à la courbure membranaire et le potentiel électrostatique.

Par exemple, le RE forme de nombreuses courbures du fait de sa structure en réseau tubulaire, il est relativement pauvre en lipides anioniques, en stérols et en lipides saturés. Le RE est donc une membrane peu compacte. Au contraire, la membrane plasmique est plane à l'échelle du micromètre, elle est très compactée du fait de sa richesse en stérols et lipides saturés et son feuillet cytosolique est très riche en lipides anioniques (>30% des lipides accessibles). Quant à l'appareil de Golgi, en simplifiant, il s'agit d'un compartiment dont la membrane a des caractéristiques intermédiaires. Sa membrane est moins compacte et moins anionique que la membrane plasmique, mais l'est plus que le RE. C'est pourquoi nous pouvons évoquer l'existence d'un gradient de charge et de compacité le long de la voie sécrétoire (**Fig. 19a**).

L'existence de ces territoires à elle seule ne suffit pas à expliquer comment les protéines ciblent des organites particuliers. Outre le répertoire de protéines membranaires intégrales qui peuvent interagir avec des protéines solubles, les PIPs sont cruciaux pour le recrutement spécifique de plusieurs dizaines de protéines⁸⁵. En plus de participer à la charge de surface des membranes, les PIPs servent à signaler les organites. Leur synthèse et leur dégradation dépendent respectivement des PI-kinases et de PIP-phosphatases. Ces enzymes sont spatialisées dans la cellule et les kinases sont finement régulées⁸⁶. Par exemple, la membrane plasmique est riche en PI(4)P et PI(4,5)P₂, l'appareil de Golgi contient essentiellement du PI(4)P, tandis que le RE ne contient pas de PIPs, car la PIP-phosphatase Sac1 résidente du RE, assurent l'hydrolyse des PIPs en PI (**Fig. 19b**).



RTG = réseau *trans* golgien / VS = vésicule de sécrétion / ER = endosome de recyclage
 EP = endosome précoce / ET = endosome tardif / CMV = corps multivésiculaire /

Figure 19 | La composition en lipides des organites détermine des territoires membranaires particuliers

a) Les défauts de compacité et les propriétés électrostatiques des membranes sont deux paramètres que les protéines peuvent détecter afin de cibler les organites ; adapté de Bigay & Antonny 2012⁸⁴ **b)** La distribution des phosphoinositides est particulière dans la cellule, les différents PIPs sont produits spécifiquement dans certains organites tandis le RE contient seulement du PI. Les PIPs agissent comme des marqueurs membranaires reconnus par un très grand nombre de protéines; adapté de J. E. Burke, 2018⁸⁶

II. Comment les protéines reconnaissent-elles les membranes ?

A. Propriétés chimiques des protéines

Les protéines, comme objet moléculaire, sont caractérisées par un code qui consiste en un enchaînement d'acides aminés. Les acides aminés, comme les lipides, peuvent être classés selon deux caractéristiques : leur polarité et leur hydrophobicité.

Les acides aminés apolaires n'ont pas d'hétéroatome dans leur chaîne latérale, ils ne forment pas de liaison hydrogène ou électrostatique, autrement que par leur fonction aminocarboxylique. Dans cette catégorie, la méthionine fait exception, elle est apolaire malgré la présence d'un soufre. Lorsque les chaînes latérales sont polaires et neutres, les hétéroatomes qu'elles portent interviennent dans la formation de liaisons hydrogène avec les molécules polaires comme l'eau, la tête polaire des lipides ou les autres acides aminés. Enfin, les acides aminés ionisables sont la plupart du temps électriquement chargés, négativement ou positivement, ils interviennent dans la formation des liaisons électrostatiques et ils définissent le potentiel électrostatique des protéines.

De plus, chaque acide aminé est caractérisé par son hydrophobicité. Ceux dont la chaîne latérale est constituée exclusivement de carbones fuient l'eau comme la chaîne aliphatique d'un lipide. Certains sont exclusivement hydrophiles et n'aiment pas les environnements apolaires. D'autres sont amphipathiques, ils sont en partie polaires, mais avec une chaîne aliphatique suffisamment longue pour leur conférer des propriétés hydrophobes, c'est le cas de la tyrosine, du tryptophane, de la lysine, l'histidine, la thréonine et la cystéine⁸⁷.

En outre, les propriétés des protéines sont parfois modulées par des modifications post-traductionnelles. Elles peuvent gagner en hydrophobicité par l'ajout de chaîne aliphatique, par exemple la myristoylation ou la palmitoylation. Elles peuvent aussi gagner en électronégativité par phosphorylation. Les propriétés des protéines en matière de charge et d'hydrophobicité spécifient leur affinité pour les membranes. Comme les protéines sont des structures très dynamiques, ces propriétés varient dans le temps en fonction de l'environnement moléculaire et de leur conformation. Par conséquent une protéine globulaire peut très bien passer d'un état soluble à un état de liaison à une membrane et inversement.

B. Différents types de protéines membranaires

1. *Les protéines membranaires intégrales*

Les protéines qui interagissent avec les membranes sont classées en deux catégories, les protéines membranaires intégrales et les protéines membranaires périphériques.

Les protéines membranaires intégrales correspondent à toutes les protéines qu'on ne peut pas solubiliser sans détergent. Ces protéines sont incluses dans le cœur hydrophobe des bicouches lipidiques. Elles sont classées en trois sous-catégories qui sont les protéines intégrales polytopiques, bitopiques, et monotopiques⁸⁸. Les protéines membranaires polytopiques traversent la membrane plusieurs fois grâce un ensemble d'éléments structuraux : les domaines transmembranaires. Ces domaines peuvent correspondre à des hélices α dont les résidus sont principalement hydrophobes. Dans les hélices transmembranaires, les résidus polaires assurent l'interaction avec les autres hélices, et ils servent aussi à définir un canal hydrophile qui traverse la membrane. L'autre grande catégorie de structure qui forme des protéines transmembranaires polytopiques est le tonneau de feuillet β . Les tonneaux β ont une face externe hydrophobe en contact avec les acides gras de la membrane et une face interne hydrophile qui définit un conduit traversant la membrane. Les protéines transmembranaires bitopiques sont constituées d'un seul élément qui traverse la membrane. Les résidus N-ter et C-ter de ces protéines ne sont donc pas dans le même compartiment. Les protéines monotopiques quant à elles sont ancrées sur un seul des deux feuillets de la membrane. Elles résident donc à l'interface entre le solvant et le cœur de la bicouche lipidiques.

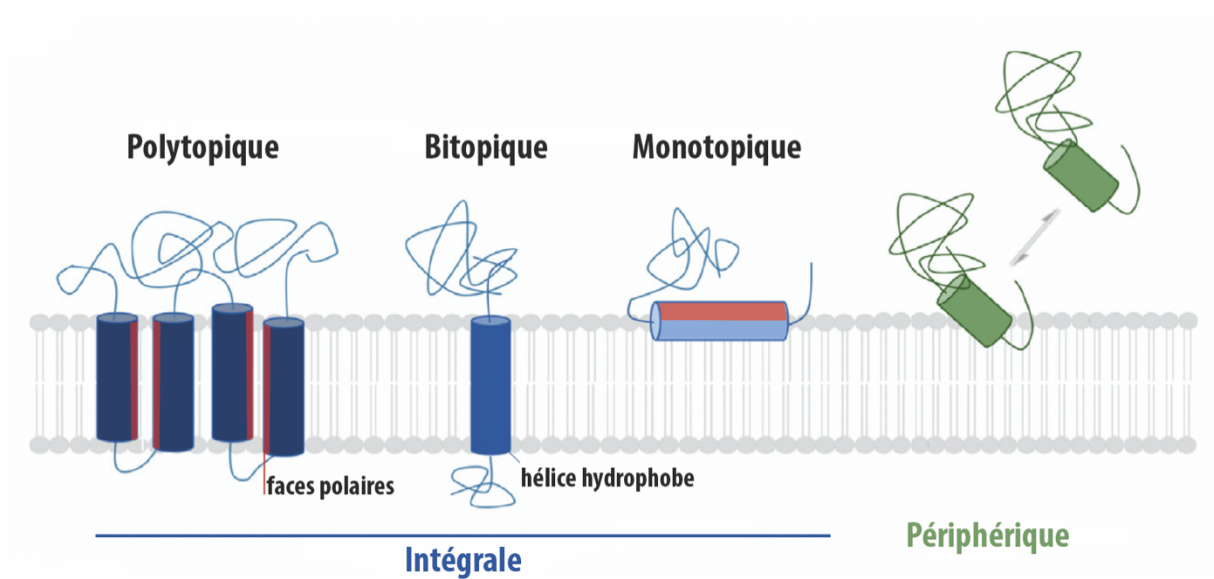


Figure 20 | Les différents types de protéines membranaires.

Les protéines membranaires intégrales ne peuvent pas être solubilisées sans détergent, elles sont classées en trois groupes : polytopique, bitopique et monotopique.

Les protéines membranaires périphériques peuvent être solubilisées avec de fortes concentrations en sels. Les hélices transmembranaires peuvent avoir des faces polaires (colorées en rouge) pour permettre les interactions ou définir un canal qui traverse la membrane.

Adapté de Allen et *al.*, 2019⁸⁸

2. Les protéines membranaires périphériques

La deuxième catégorie de protéines liées aux membranes correspond aux protéines périphériques. Contrairement aux protéines membranaires intégrales, les protéines périphériques peuvent être solubilisées avec de fortes concentrations en sels. Les protéines périphériques sont divisées en deux groupes : celles qui s'attachent à des protéines déjà ancrées dans la membrane ; et celles qui peuvent interagir directement avec la membrane et qui sont appelées protéines périphériques amphitropiques⁸⁹.

Les protéines périphériques amphitropiques sont solubles, mais elles vont avoir une certaine affinité pour des membranes avec une composition lipidique particulière. L'interaction avec la membrane est transitoire, elle dépend de l'environnement moléculaire et d'éléments régulateurs particuliers qui permettent à la protéine de basculer d'un état de liaison à la membrane à un état soluble. De nombreuses protéines contiennent des modules capables de se lier aux membranes afin d'exercer une activité localisée dans la cellule. La particularité des protéines amphitropiques est que leur liaison aux membranes est régulée de manière dépendante de l'environnement moléculaire. Ce sont donc des protéines dynamiques qui contiennent quatre grands types de structure : des modules qui isolent de manière stéréosélective la tête polaire d'un lipide (**Fig. 21a**), des ancres lipidiques qui s'insèrent dans le cœur hydrophobe de la membrane (**Fig. 21b**) ; des hélices amphipathiques qui s'insèrent le long de la ligne de têtes polaires (**Fig. 21c**) ; et des motifs basiques qui reconnaissent la charge des lipides anioniques.

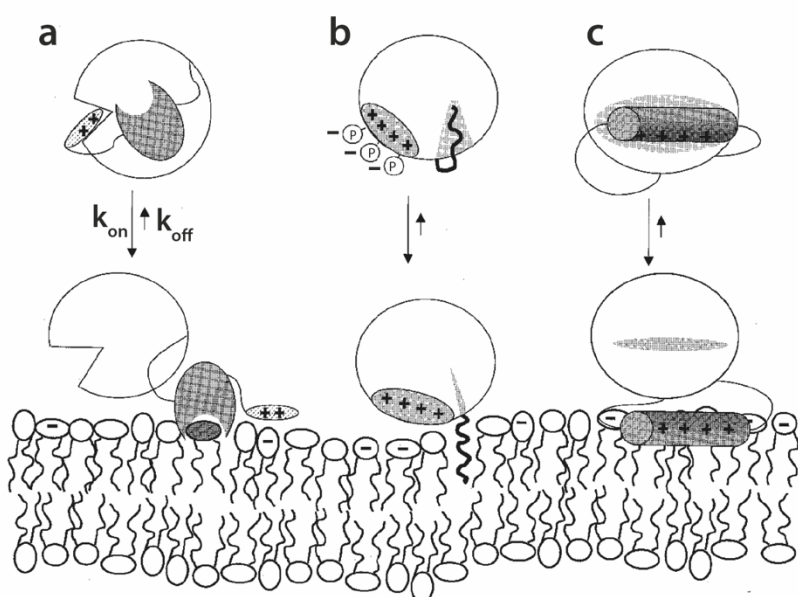


Figure 21 | Stratégies d'interaction des protéines amphitropiques

Les protéines amphitropiques interagissent transitoirement avec la membrane en fonction du contexte moléculaire, souvent grâce à des motifs basiques représentés par les signes (+).

a) Un domaine stéréosélectif pour lier une tête polaire particulière.

b) Une modification lipidique pour s'ancrer dans la membrane.

c) Des modules senseurs pour détecter les propriétés d'une membrane particulière.

Adapté de Johnson & Cornell, 1999⁴⁰⁹

C. Des modules amphitropiques pour reconnaître des lipides

1. Les modules stéréosélectifs des têtes polaires

Pour une protéine, le meilleur moyen de cibler une membrane particulière est de posséder un module spécifique qui reconnaît la tête polaire d'un lipide particulier. Sur le modèle de la clé-serrure, le module doit avoir une poche de liaison, la serrure, qui permet d'accueillir spécifiquement une tête polaire, la clé, et pas une autre. Si nous représentons la tête polaire des lipides comme une sphère, elle peut être séparée en deux hémisphères dont un fait face au milieu aqueux et l'autre se trouve dans l'environnement apolaire de la bicouche lipidique. C'est pourquoi une interaction étroite ($<4 \text{ \AA}$) entre une tête polaire et la cavité d'une protéine fera nécessairement intervenir des acides aminés en contact avec l'hémisphère hydrophobe de la tête polaire, et donc aussi avec les chaînes aliphatiques de la phase apolaire de la membrane. Pour permettre cette insertion, les acides aminés en jeu doivent donc avoir une certaine hydrophobicité. Parmi ces protéines stéréosélectives des lipides, les plus étudiées sont certainement les domaines PH (*pleckstrin homology*), mais d'autres domaines stéréosélectifs fonctionnent selon des modalités similaires (**Fig. 22**). On peut citer les domaines C2 capables de reconnaître la phosphatidylsérine et le PI(4,5)P₂, parfois de manière dépendante du Ca²⁺ ^{63,90}; les domaines ENTH qui reconnaissent le PI(4,5)P₂; ou les domaines FYVE qui sont des domaines à doigts de zinc qui forment des dimères pour reconnaître deux PIPs ^{91,92}.

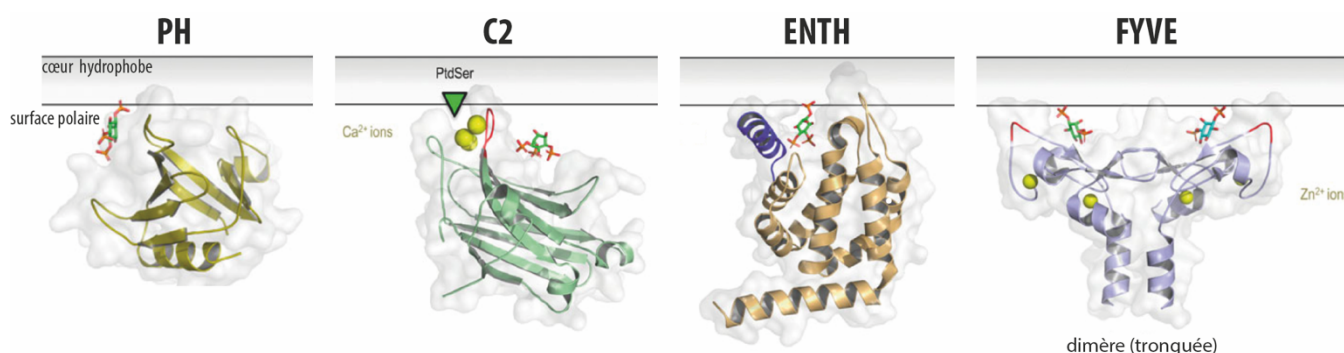


Figure 22 | Modèles de plusieurs modules stéréosélectifs des lipides liés aux membranes

Domaine PH de la Spectrine- β (accès PDB : 1BTN); domaine C2 de la PKC α (accès PDB : 3GPE) ; domaine ENTH de l'Epsine (accès PDB : 1H0A) ; domaine FYVE d'EEA1 (accès PDB : 1JOC) ; Adapté de Pemberton & Balla, 2019 ⁹².

2. *Les domaines PH, des senseurs versatiles de lipides*

Les domaines PH ont été identifiés il y a près de 30 ans, par des analyses de séquences^{93,94}. Ce domaine était connu, car il est répété deux fois dans la pleckstrine qui est la protéine plaquettaire la plus sensible à la phosphorylation par les protéines kinases C⁹⁵. Grâce aux premières bases de données et aux alignements de séquences, la présence de ce domaine est détectée dans de très nombreuses protéines modulaires qui sont le plus souvent des protéines de signalisation. Parmi ces protéines, on peut citer des sérine/thréonine kinases telles qu'Akt, des facteurs d'échange GDP/GTP (rac-GEF et ras-GEF), des activateurs de GTPase (ras-GAP), ou encore des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides et la dynamique des membranes telles que la dynamine (une protéine G), la spectrine β (un composant du cytosquelette), la phospholipase C- γ , ou OSBP (oxysterol binding protein). Finalement, il s'avère que les domaines PH sont présents dans près de 500 protéines humaines et 33 protéines de levures⁹⁶.

Les domaines PH sont constitués d'environ 100 à 120 résidus et les premières structures ont été résolues en 1994^{97,98}. Typiquement, ils sont constitués de sept feuilletts β antiparallèles fermés par une hélice C-terminale caractéristique. Les domaines PH ont fait l'objet d'intenses recherches et de très nombreuses structures ont été résolues⁹⁹⁻¹⁰¹. Malgré de faibles similarités de séquence, la structure des domaines PH est relativement bien conservée¹⁰². Les chercheurs se sont ensuite intéressés à l'avidité des domaines PH pour les lipides, car leur structure en tonneau rappelait celle de la RBP (*retinol binding protein*), et des études avaient montré que la disruption du domaine PH de la PLC δ 1, empêche son interaction avec des membranes anioniques contenant du PI(4,5)P₂^{103,104}. En 1994, une étude confirme la liaison sélective de quelques domaines PH sur des liposomes contenant 5 mol% de PI(4,5)P₂, dont ceux de la pleckstrine et de RasGAP¹⁰⁵. De plus, le domaine PH de la pleckstrine se lie relativement bien au PI(4)P mais avec une moins bonne avidité par rapport au PI(4,5)P₂. En revanche, cette étude n'indique aucune liaison particulière aux autres phospholipides (PS, PE, PA, PI ou Sphingosine). Par la suite, une analyse comparative de la sélectivité des domaines PH pour les différents phosphoinositides montre qu'ils peuvent être classés en quatre groupes qui sont cohérents avec les alignements de séquences¹⁰⁶. Il y aurait le groupe des domaines PH sélectifs du PI(3,4,5)P₃ et il comprend ceux de SOS (ras-GEF) et de la tyrosine kinase

BTK. Ensuite le groupe des domaines PH très affins pour le PI(4,5)P₂ concernent la PLCδ, OSBP, βARK, et la spectrine. Ceux qui reconnaissent le PI(3,4)P₂ sont représentés par le domaine PH d'AKT. Le dernier groupe est représenté par le domaine PH de la dynamine, qui a une faible affinité de liaison, quel que soit le PIP. Cependant, dans cette étude le PI(4)P est dans l'ensemble ignoré. On apprendra plus tard que le domaine PH d'OSBP lie aussi bien le PI(4)P que le PI(4,5)P₂ *in vitro*. Mais, *in vivo*, la protéine est localisée au Golgi. Dans cet organite, le PI(4)P est très prédominant devant le PI(4,5)P₂, c'est pourquoi le domaine PH d'OSBP lui sert essentiellement à reconnaître PI(4)P¹⁰⁷. Cet exemple montre l'importance du contexte dans lequel se trouve un domaine PH pour définir sa fonction. D'autres domaines PH, peuvent reconnaître les PI(3)P ou les PI(5)P qui sont beaucoup plus rares dans la cellule, et certains ne reconnaissent pas les PIPs, c'est le cas du domaine PH de l'evectine-2, localisée sur les endosomes, qui reconnaît spécifiquement la phosphatidylsérine⁴¹, ou d'un nouveau type de domaine PH acylé découvert récemment chez un parasite unicellulaire capable de reconnaître le PA¹⁰⁸.

Les domaines PH n'interagissent pas tous de la même manière avec leur ligand. Une première étude montre comment le domaine PH de la spectrine devrait se lier au PI(4,5)P₂¹⁰⁹. Pour cela, la structure du domaine PH de la spectrine est analysée en présence de différents inositol-phosphates (InsPs). Tout d'abord, le spectre du domaine PH obtenu par dichroïsme circulaire dans les UV proches est décalé uniquement en présence de certains InsPs, dont l'Ins(1,4,5)P₃. Ce qui indique une rotation des acides aminés aromatiques qui interagissent, sans doute, avec l'Ins(1,4,5)P₃. Ensuite, en spectroscopie par RMN, on observe que l'Ins(1,4,5)P₃ et le glycéro-Ins(4,5)P₂ provoque un changement d'orientation des protons situés dans les boucles β1-β2 et β5-β6. Enfin, la structure de la protéine liée à l'Ins(1,4,5)P₃ est résolue par cristallographie et appuie les résultats précédents. La protéine reconnaît et lie les deux phosphates en position (4) et (5) de l'inositol grâce à un groupe de 8 résidus chargés positivement dans les boucles β1-β2 et β5-β6 (**Fig. 23a**). De façon contre intuitive, la tête polaire ne rentre pas dans le tonneau β, elle est juste pincée par deux boucles flexibles. Ce modèle valable pour la spectrine ne l'est pas pour tous les domaines PH. Des analyses similaires portant sur le domaine PH de la PLCδ ou de FAPP1 (*phosphatidylinositol-four-phosphate adapter protein 1*), qui reconnaissent spécifiquement le PI(4,5)P₂ et le PI(4)P respectivement, montrent que le noyau inositol-phosphate s'insère effectivement dans le prolongement du tunnel formé par le tonneau β^{100,110} (**Fig. 23a**).

Pour mieux comprendre comment les domaines PH interagissent avec les membranes, une méthode consiste à étudier leur structure par RMN en présence de micelles. Cette approche a permis de révéler que la boucle $\beta 1$ - $\beta 2$ du domaine PH de FAPP1 s'insèrent entre les têtes polaires des lipides^{111,112}. De plus, les simulations de dynamique moléculaires améliorent notre compréhension de l'attachement des domaines PH aux membranes^{101,113}. Ces analyses révèlent que la plupart des protéines périphériques interagissent avec le cœur aliphatique des membranes grâce à des boucles hydrophobes¹¹³. Néanmoins, ces analyses n'expliquent pas comment les domaines PH sont attirés à grande distance par les membranes avant de lier étroitement leur ligand. Les interactions à grande distance entre les molécules résultent de leur potentiel électrostatique et pour cela, les domaines PH ont une distribution de charge particulière. En effet, une analyse du potentiel électrostatique des domaines PH montre qu'ils sont fortement polarisés¹¹⁴. L'hélice α en C-ter qui surmonte la protéine est anionique et à l'opposé, le site d'interaction avec les lipides est fortement chargé positivement (**Fig. 23b**). C'est une caractéristique commune à la majorité des domaines PH¹¹⁵. Les membranes cellulaires sont chargées négativement et elles le sont d'autant plus qu'elles contiennent des PIPs avec au moins deux charges négatives. Par conséquent, ces membranes exercent une force attractive sur le pôle cationique des domaines PH. Ces forces électrostatiques permettent d'orienter la protéine et de favoriser la liaison à la membrane.

Malgré tout, on ne comprend pas encore précisément comment l'attachement et le détachement des domaines PH sont régulés. Leur liaison dépend surtout de la concentration en ligand lipidique dans la membrane^{106,116}. Mais une fois liés, les domaines PH devraient avoir un mécanisme qui déclenche le détachement lorsque la concentration en ligand chute. Il se peut que la liaison des domaines PH soit régulée de façon allostérique. Plusieurs études indiquent qu'ils ont plusieurs sites d'interactions qui reconnaissent le même ligand. Ainsi, les deux sites d'interaction coopèrent pour favoriser ou non la liaison^{117,118}. Une étude de dynamique moléculaire récente appuie cette hypothèse¹¹⁹. D'autre part, les InsPs entrent en compétition avec la tête polaire des PIPs *in vitro* et le métabolisme des InsPs semble réguler la liaison des domaines PH *in vivo*¹²⁰. Enfin, il est possible que la liaison des domaines PH soit régulée par des interactions protéine-protéine^{112,121,122}.

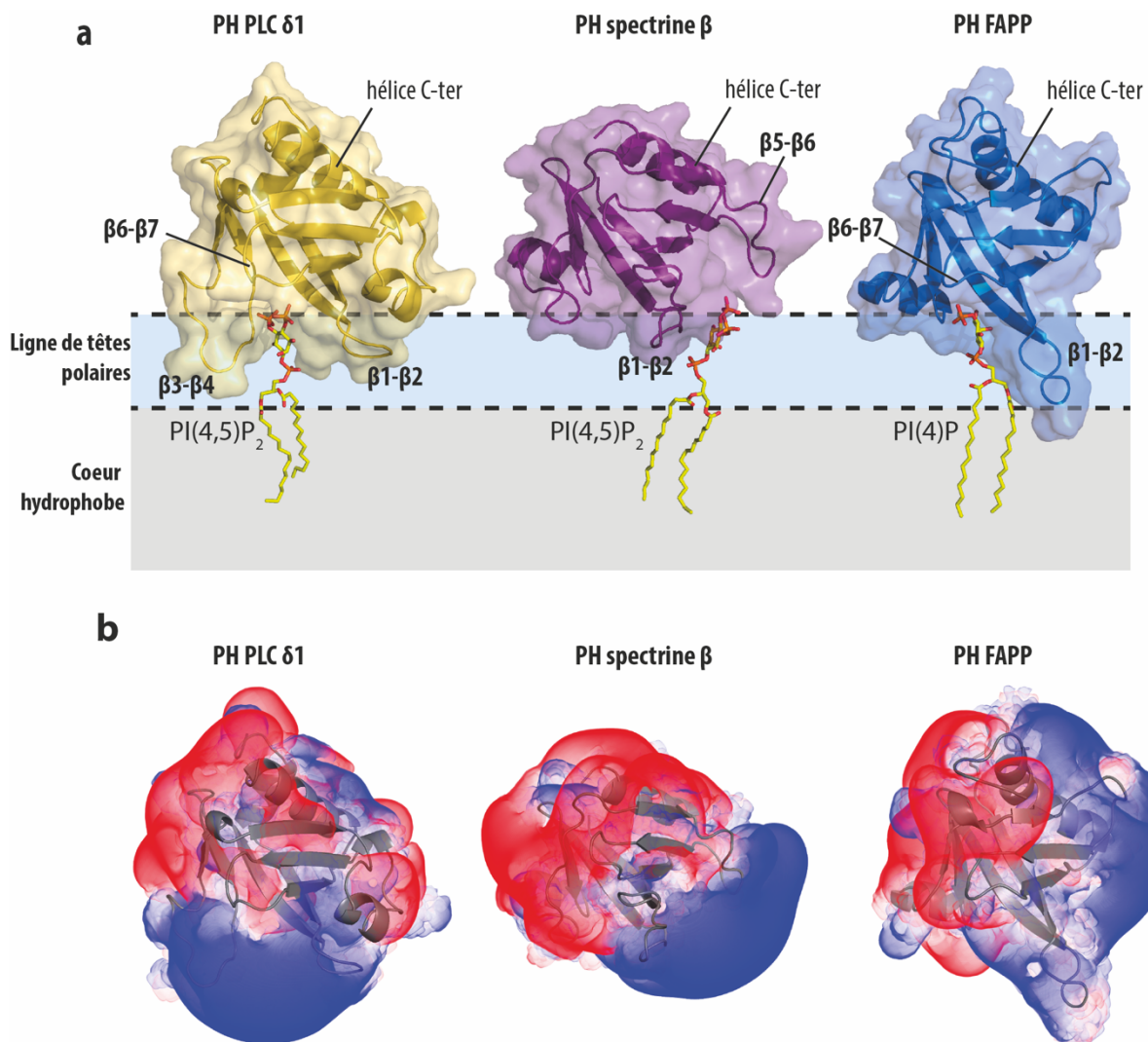


Figure 23 | Reconnaissance stéréosélective des PIPs par les domaines PH et interaction avec la membrane

a) Les domaines PH n'ont pas tous les mêmes modalités d'interaction avec leur ligand. Le site de liaison de la tête polaire du PI(4,5)P₂ dans le domaine PH de la PLC $\delta 1$ est différent de celui du domaine PH de la spectrine β . Les domaines PH ne reconnaissent pas forcément les mêmes ligands. Le domaine PH de la PLC $\delta 1$ reconnaît le PI(4,5)P₂ tandis que le domaine PH de FAPP1 reconnaît le PI(4)P. Lors de ces interactions étroites, les domaine PH s'insèrent partiellement entre les têtes polaires des lipides de la membrane.

b) Les domaines PH sont souvent caractérisés par une forte polarité. Ils exposent une large surface fortement cationique (surface bleu) à proximité du site de liaison aux membranes et une large surface anionique à l'opposé (surface rouge). Cette polarisation favorise l'orientation de la protéine pour s'attacher au membrane et reconnaître leur ligand lipidique.

Domaine PH de la PLC $\delta 1$ (accès PDB : 1MAI); domaine PH de la spectrine β (accès PDB : 1BTN) ; domaine PH de FAPP1 (accès PDB : 2KCJ)

D. Des modules aspécifiques senseurs des propriétés membranaire : Effets de l'électrostatique et de l'hydrophobicité

Une autre modalité de liaison des protéines aux membranes dépend de l'attachement de manière covalente d'un acide gras sur la protéine, c'est la lipoylation. Cet acide gras s'insère dans une membrane à la manière d'une ancre qui maintient la protéine à la surface de la bicouche lipidique en l'empêchant de fuir. Il existe de nombreux cas de lipoylation qui font intervenir diverses chaînes carbonées de longueur différente. Dans cette section, je donne deux exemples de protéines amphitropiques hautement dynamiques, qui s'attachent et se détachent des membranes grâce à des segments peptidiques senseurs des propriétés membranaire, parfois en combinaison avec une ancre lipidique.

1. La protéine MARCKS : un « switch » électrostatique

Dans les années 1980, une protéine appelée « 80 à 87 kDa » était connue pour être le substrat majoritaire de la protéine kinase C (PKC), et qui servait donc de marqueur pour étudier l'activation de cette kinase. Cette protéine a une bonne solubilité, mais elle est fréquemment associée aux membranes^{123,124}. De plus elle est myristoylée, en particulier dans les macrophages murins après exposition à une toxine bactérienne¹²⁵. La myristoylation était supposée permettre à cette protéine de s'associer aux membranes afin de mieux interagir avec la PKC. En effet, peu de doutes subsistaient quant à la nature membranaire de l'activité des PKC, puisque cette activité a souvent besoin de PS et de calcium comme cofacteur et qu'elle est activée par le DAG¹²⁶. En 1989, la protéine « 80 à 87 kDa » est clonée et caractérisée. Il s'avère que son poids moléculaire déduit par électrophorèse était surestimé, en effet sa migration est fortement retardée du fait de sa charge électrique positive. Cette protéine ne fait finalement que 31,9 kDa et les auteurs l'ont baptisée MARCKS pour *Myristoylated alanine-rich C kinase substrate*¹²⁷. La même année, une étude montre le rôle du site de myristoylation de MARCKS¹²⁸. La portion N-ter de sa séquence est identique chez la souris et le bœuf tandis que le reste de la séquence est moins bien conservé. La séquence en N-ter correspond à un motif consensus prédit comme cible pour la myristoylation. En synthétisant un peptide identique à cette séquence, les auteurs confirment *in vitro* la myristoylation par la N-myristoyltransferase. Pour savoir si le site de myristoylation pouvait avoir un effet sur la phosphorylation

induite par la PKC, les chercheurs ont construit un mutant de MARCKS qui ne peut pas être myristoylé et ils l'ont surexprimé dans des fibroblastes. Après incubation des fibroblastes avec du ^{32}P et un agent carcinogène qui active les PKC, les analyses révèlent que MARCKS est phosphorylée exactement de la même manière que la protéine de type sauvage. Enfin, pour connaître l'effet de la phosphorylation sur la capacité de MARCKS à se lier aux membranes la fraction soluble des fibroblastes est extraite et analysée. Environ 40 % des protéines MARCKS phosphorylées constitutivement restent solubles. En revanche, après induction de la PKC, la proportion de MARCKS phosphorylée soluble s'élève à 70 %. Enfin, lorsque le site de myristoylation est absent 100% des protéines phosphorylées sont solubles avec ou sans induction. Cette étude montre deux caractéristiques essentielles : 1) la phosphorylation ne dépend pas de l'ancrage de MARCKS à la membrane ; 2) la solubilisation de MARCKS dépend de sa phosphorylation.

Dans une autre étude, nous apprenons que la calmoduline (CaM) interagit avec MARCKS¹²⁹. CaM est une petite protéine de signalisation qui détecte le taux de Ca^{2+} . En se liant au Ca^{2+} , CaM change de conformation et interagit avec plus d'une centaine d'effecteurs¹³⁰. MARCKS interagit effectivement avec CaM de façon dépendante du Ca^{2+} , par contre, la phosphorylation empêche toute interaction, ce qui confirmait une observation plus ancienne¹³¹. En synthétisant un peptide correspondant à la région de MARCKS sensible à la phosphorylation, les auteurs confirment cette observation. Ils mettent en évidence que le peptide a une excellente affinité pour la calmoduline et que ce peptide est un antagoniste de CaM quasiment aussi puissant qu'un inhibiteur pharmacologique. Ce résultat expliquerait le rôle physiologique de MARCKS : sous sa forme non phosphorylée, elle séquestre CaM et l'inhibe. L'année suivante, le même groupe montre que la liaison du peptide de MARCKS à la calmoduline est interrompue par la phosphorylation induite par la PKC et ils ajoutent que MARCKS entre en compétition avec d'autres effecteurs de CaM¹³².

Par la suite, l'étude d'un nouveau clone de MARCKS issu du rat, montre que 1 *pmol* de MARCKS déposé sur une membrane de nitrocellulose reste lié à de la PS radiomarquée après incubation et lavage¹³³. Cependant, la liaison de la PS est complètement perdue si MARCKS est phosphorylée par la PKC. La liaison de MARCKS aux membranes serait donc dépendante de la PS et de la phosphorylation. L'interaction de MARCKS avec la PS négativement chargée semble logique quand on sait que son pI est très faible ($\sim 4,4$) et

qu'elle contient de très nombreuses lysines qui sont regroupées dans une petite portion.

Le groupe de McLaughlin montre en 1991 que des peptides neutres dans lesquels une à quatre lysines sont introduites se lient très bien à des membranes contenant 33 mol% de PS. Ils remarquent que plus il y a de lysines dans le peptide, plus le potentiel ζ des liposomes anioniques diminue. Ce qui n'est pas le cas avec des membranes exclusivement constituées de PC. La PS anionique exerce une force attractive sur les peptides cationiques et le peptide neutralise les charges en surface du liposome¹³⁴. À la suite de cette étude, McLaughlin *et coll.* s'intéressent au peptide de MARCKS utilisé dans les études précédentes. Ce peptide se lie très spécifiquement à des membranes contenant des lipides anioniques¹³⁵. Des liposomes neutres ne permettent aucune liaison, alors que des liposomes dopés à 8 mol% de PG permettent la liaison de 50% des peptides, et au-delà de 15 mol% de PG la liaison est totale. Cette réponse dépendante de la concentration en lipides anioniques est perdue lorsque les quatre sérines sensibles à la phosphorylation sont remplacées par des aspartates et c'est aussi le cas lorsque le peptide est phosphorylé. Le peptide phosphorylé atteint 50 % de liaison à partir 33 mol% de PS dans les liposomes. Remarquablement, une expérience de spectroscopie de fluorescence montre comment le peptide MARCKS se détache en temps réel des liposomes après ajout d'une PKC purifiée. Un lipide fluorescent, le dansyl-PE, inclus dans les liposomes anioniques permet de détecter la liaison de MARCKS aux liposomes. Lorsque la PKC est ajoutée dans le mélange réactionnel, le peptide se détache rapidement en moins d'une minute.

On peut conclure que MARCKS est très avide des membranes chargées négativement et que les phosphorylations neutralisent MARCKS ce qui la fait basculer d'un état lié à la membrane à un état soluble. À partir de cette étude, le modèle suivant est proposé : MARCKS est un « switch » électrostatique myristoylé ; lorsqu'elle est chargée positivement, elle se lie soit aux membranes soit à la calmoduline. À la membrane, MARCKS est sujette à la phosphorylation par la PKC. Une fois phosphorylée, MARCKS n'est plus attirée par les membranes anioniques et elle ne peut pas non plus se lier à CaM. Ce modèle est ensuite confirmé après avoir réussi à purifier MARCKS dans sa forme entière¹³⁶. Enfin, MARCKS non phosphorylée permet le recrutement de plusieurs protéines, par exemple, sa capacité à séquestrer et inhiber la calmoduline permet de réguler l'activation de nombreuses voies de signalisations dépendantes du calcium, en transmettant l'information de l'activité de la PKC^{137,138}. **(Fig. 24a,b).**

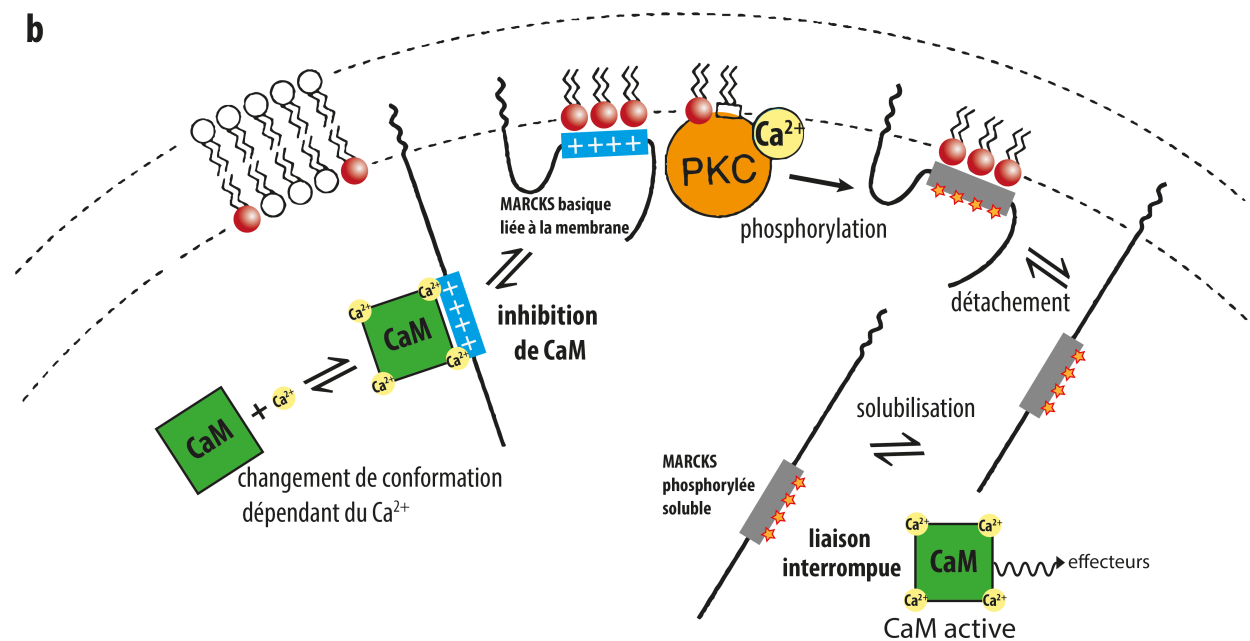
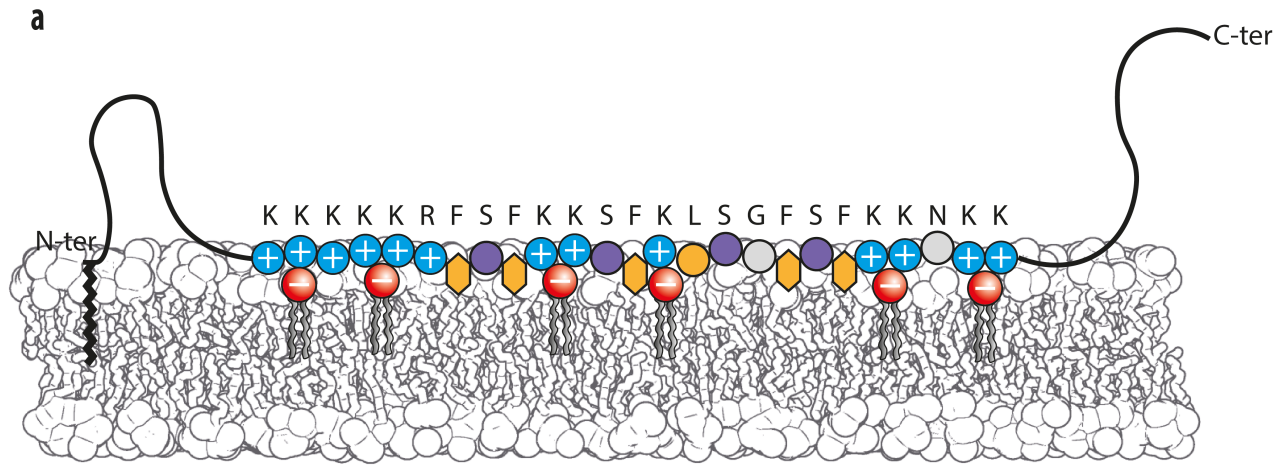


Figure 24 | La protéine MARCKS possède un mécanisme de commutation électrostatique

a) Modèle d'interaction de MARCKS avec une membrane chargée négativement.

b) Schéma expliquant la régulation par la PKC de l'attachement de MARCKS aux membranes et son interaction avec la calmoduline (CaM). L'activation de la calmoduline est dépendante de la concentration en calcium. MARCKS non phosphorylée est un régulateur négatif de CaM et son motif basique est affiné pour la membrane plasmique. Lorsqu'elle est phosphorylée, MARCKS est inactivée et est majoritairement soluble. Dans ce processus, la phosphorylation par la PKC est responsable de la commutation de MARCKS qui bascule d'un état basique à un état soluble. D'après Kim *et al.*, 1994^{135,136}

2. Des hélices amphipathiques pour détecter le remodelage membranaire

L'hélice α est une structure secondaire hélicoïdale des protéines formées par l'enroulement antihoraire de la chaîne polypeptidique. Dans cette structure, chaque tour d'hélice se répète tous les 3,6 résidus et chaque groupement CO d'un résidu (n) forme une liaison hydrogène avec un groupement NH d'un résidu (n+4). Les chaînes latérales sont orientées en rayon vers l'extérieur de l'hélice. Lorsque les chaînes latérales sont positionnées sur un même côté de l'hélice et qu'elles partagent une propriété commune (*e.g.*, hydrophobe), alors l'hélice expose dans la longueur de son axe, une face caractérisée par cette propriété. En étudiant la structure cristalline de l'hémoglobine, Perutz *et al.* observent cette caractéristique en 1965 : la face des hélices qui est tournée vers l'intérieur de la protéine est apolaire, tandis que la face extérieure accessible au solvant est polaire¹³⁹.

Par la suite, des études montrent que plusieurs protéines membranaires périphériques ont des modules qui se lient aux membranes en basculant d'une structure désordonnée à une hélice α caractérisée par une face hydrophobe et une face hydrophile. C'est pourquoi Segrest *et al.* propose une nouvelle théorie en 1974 : les protéines membranaires périphériques contiennent des régions amphipathiques en forme d'hélice α dont les résidus d'une face hydrophobe interagissent avec les chaînes aliphatiques des lipides tandis que la face opposée est au contact de l'eau ou du reste de la protéine¹⁴⁰. Depuis, les hélices amphipathiques ont été largement décrites pour de nombreuses protéines. On connaît assez bien les modes d'interaction de ces modules avec les membranes grâce aux études des polypeptides hormonaux, des venins ou des peptides antimicrobiens telles la motiline¹⁴¹, la mélittine¹⁴² et les magainines¹⁴³ respectivement.

D'un point de vue thermodynamique, l'attachement des hélices amphipathiques s'explique par les étapes suivantes¹⁴⁴. D'abord, le peptide non replié s'accumule à proximité de la membrane en subissant l'attraction électrostatique à grande distance de la membrane. Ensuite, l'entropie générée par cette proximité est minimisée par l'adsorption du peptide à cette surface par effet hydrophobe, les résidus apolaires pénètrent entre les têtes polaires des lipides. Cet état transitoire n'est pas favorable parce que les liaisons peptidiques se trouvent dans un environnement hydrophobe. C'est pourquoi le peptide change de conformation et adopte une structure hélicoïdale. Cette

transition est exothermique et l'énergie de repliement compte pour environ 50% de l'énergie d'interaction. On peut donc dire que l'effet hydrophobe contraint la protéine à adopter une structure rigide et stable dans la membrane. La force potentielle de cette interaction peut être prédite d'après la structure d'un peptide en déterminant son amphipathicité, son hydrophobicité et sa charge nette.

La notion d'amphipathicité a été introduite en 1982 par un descripteur mathématique : le moment hydrophobe hélicoïdale $\langle \mu H \rangle$, qui est la somme vectorielle de l'hydrophobicité individuelle des résidus rapportée au nombre de résidus d'un peptide¹⁴⁵. On peut donc représenter l'amphipathicité d'une hélice sur une représentation en roue hélicoïdale avec le vecteur $\langle \mu H \rangle$ dont l'origine est l'axe de rotation de l'hélice. L'hydrophobicité (H) du peptide correspond à la moyenne de l'hydrophobicité individuelle des résidus, et la charge nette (z) est la moyenne des charges des résidus qui dépend bien sûr du pH.

À partir de ces trois descripteurs ($\langle \mu H \rangle$, H et z), Drin & Antony ont répertorié quatre règles simples pour expliquer comment les hélices amphipathiques interagissent avec les membranes¹⁴⁶. 1) Pour un moment hydrophobe donné, l'avidité d'une hélice amphipathique pour les membranes sera d'autant plus forte que son hydrophobicité totale (H) est élevée¹⁴⁷. 2) Pour même hydrophobicité, un meilleur moment hydrophobe $\langle \mu H \rangle$ favorise le changement de conformation d'un segment peptidique en hélice α , ce qui augmente l'énergie de liaison dans la membrane¹⁴⁸. 3) L'augmentation de la charge nette (z) optimise l'interaction des hélices amphipathiques avec des membranes chargées négativement¹⁴⁹. 4) Si un segment peptidique contient un seul résidu qui a tendance à rompre les structures hélicoïdales on diminue, voire on empêche la liaison^{150,151}.

Grâce à cette combinatoire, les hélices amphipathiques se lient avec plus ou moins de force à une membrane en fonction des propriétés de celle-ci. La contrepartie de ces forces d'interaction, c'est qu'en fonction de leur concentration, les hélices amphipathiques ont tendance à déformer la membrane à laquelle elles sont liées. Comme module, elles permettent donc aux protéines de reconnaître différents types de membranes.

Enfin, les paramètres $\langle \mu H \rangle$, H et z , peuvent être estimés par calcul bio-informatique pour un peptide donné¹⁵². Ceci permet d'évaluer l'éventuelle interaction d'un segment de protéine avec une membrane.

3. *Le couple Arf1 et ArfGAP1 comme un double « Switch » au Golgi*

Lors du processus de formation des vésicules de l'appareil de Golgi, les deux protéines partenaires Arf1 et ArfGAP1 sont capables de détecter le remodelage de la membrane. Pour cela, elles portent chacune une hélice amphipathique qui permet de déclencher l'association ou la dissociation de ces protéines aux membranes.

La protéine Arf1 est une petite protéine G (*guanine binding nucléotide*), de 21 kDa, qui appartient à la famille des ARF (*ADP ribosylation factor*) et la superfamille des petites GTPase Ras (*Rat sarcoma*). Arf1 est activée lorsqu'elle est liée au GTP ce qui provoque sa localisation à l'appareil de Golgi. Lorsque Arf1 est activée, elle change de conformation et cela provoque le recrutement de nombreuses protéines¹⁵³ et en particulier les complexes COPI (*COat Protein complex I*) et les complexes adaptateur AP-1. Le recrutement des complexes COPI ou AP-1 au Golgi permettent la formation des vésicules de transport à destination du RE ou des endosomes respectivement^{154,155}. Pour accomplir et réguler ce processus, Arf1 dispose de plusieurs caractéristiques structurales.

Tout d'abord, une étude montre qu'Arf1 est myristoylée sur une glycine en deuxième position de la séquence. Ce qui suggère que cette modification a un rôle dans sa localisation préférentielle sur le *cis*-Golgi¹⁵⁶. De plus, la localisation au Golgi d'Arf1 coïncide avec la présence de GTP et de la myristoylation et ceci est nécessaire au recrutement du complexe COPI^{157,158}. Étonnamment, Franco *et al.*, montrent en 1993 que la myristoylation de la protéine n'est pas nécessaire pour sa liaison aux membranes dépendante du GTP¹⁵⁹. À la place, la myristoylation favorise la libération du GDP après hydrolyse lorsque la protéine est liée à la membrane¹⁶⁰.

En fait, l'interaction d'Arf1 avec la membrane dépend principalement d'une hélice amphipathique de 11 résidus situés immédiatement après la glycine myristoylée^{161,162}. La structure d'Arf1 indique que l'hélice amphipathique est enfouie dans le cœur de la protéine lorsqu'elle est liée au GDP. Arf1 liée au GDP se lie très mal aux membranes et cette liaison faible requiert la myristoylation et des membranes chargées négativement. Cependant, Arf1 liée au GTP se lie fortement aux membranes et cette interaction est interrompue par la délétion de son hélice amphipathique. Lorsque Arf1 est liée au GTP et déjà associée à des membranes, sa dissociation par compétition pour d'autres membranes est beaucoup plus difficile à mettre en œuvre si celles-ci sont enrichies en lipides

anioniques. Enfin, la substitution de deux résidus très hydrophobes de l'hélice amphipathique (leucine, phénylalanine) par des résidus moins hydrophobes (alanine) diminue la vitesse d'association aux liposomes d'Arf1 liée au GTP. Mais de façon remarquable, ce mutant se dissocie des liposomes cent fois plus rapidement que la forme naturelle. Pris ensemble, ces travaux suggèrent que l'hélice amphipathique est libérée d'Arf1 lorsqu'elle se lie GTP, ce qui lui permet de s'attacher fortement à une membrane. Par conséquent, Arf1 est un « switch » GTP/GDP qui régule sa capacité à se lier au Golgi. En 2009, une analyse structurale vient compléter ce modèle¹⁶³. La myristoylation empêche le changement de conformation nécessaire à l'échange des nucléotides, à moins qu'une membrane soit disponible pour accommoder le groupe myristoylé. Et lorsque Arf1 est liée au GTP, la myristoylation stabilise l'interaction membranaire.

Pour qu'Arf1 se dissocie des membranes, le déclenchement de l'hydrolyse du GTP en GDP est nécessaire. C'est là qu'intervient ArfGAP1, une GAP (GTPase activating protein). Pour réguler cette interaction dans le temps et dans l'espace, ArfGAP1 dispose d'un mode d'interaction particulier avec les membranes. Comme Arf1 liée au GTP se lie au Golgi, l'activité GTPase d'Arf1 induite par ArfGAP1 devrait avoir lieu en surface de ce compartiment. Une première étude nous dit si l'activité GTPase induite par ArfGAP1 est améliorée par des liposomes de composition différentes¹⁶⁴. Il s'avère que la tête polaire des lipides n'agit pas spécifiquement sur cette activité, par contre, la présence dans les liposomes de petits lipides doublement insaturés comme le 18:1/18:1-DAG augmente significativement l'activité GTPase induite par ArfGAP1. De plus, cette activité augmente avec le degré d'insaturation de la PC utilisée pour préparer les liposomes. Ces résultats permirent aux auteurs de postuler qu'ArfGAP1 est sensible au défaut de compacité de la membrane puisque son activité s'améliore avec des lipides coniques.

Par la suite, cette démonstration est renforcée, l'activité GTPase induite par ArfGAP1 est mauvaise avec des liposomes de 150 nm de diamètre, la réaction se déroule sur un temps de l'ordre de la minute, tandis qu'avec des liposomes de 50 nm, une taille similaire aux vésicules de type COPI, la réaction GTPase est rapide avec un temps de réaction de l'ordre de la seconde. ArfGAP1 est donc sensible à la courbure membranaire plus importante des petits liposomes. Cette étude montre également une dissociation plus rapide du complexe COPI de la surface des membranes très courbées du fait de la meilleure activité GTPase¹⁶⁵.

Structurellement, ArfGAP1 possède un domaine en doigt de zinc qui se lie à Arf1 et favorise son activité GTPase. Elle possède aussi un motif d'une quarantaine de résidus conservés chez les animaux et la levure. Il s'avère qu'ArfGAP1 et son homologue en levure Gcs1p se lie préférentiellement à des petits liposomes et le segment de résidus conservé est nécessaire pour cette liaison¹⁶⁶. De plus, la nature de cette interaction est exclusivement hydrophobe et les résidus de ce segment s'insèrent dans la membrane. Une analyse bio-informatique suggère que ce segment peut adopter une structure en hélice avec une bonne amphipathicité, ce qui est confirmé par dichroïsme circulaire : lorsque ce peptide est en présence de liposomes, il adopte une structure en hélice. Cette découverte a conduit à nommer ce motif de reconnaissance de la courbure : ALPS (*Arf1 Lipid Packing Sensor*). Par la suite, des structures similaires à l'ALPS sont découvertes dans d'autres protéines recrutées par le Golgi¹⁶⁷. ALPS est alors renommé *Amphipathic Lipid Packing Sensor*. Des simulations de dynamique moléculaire montrent que les résidus hydrophobes des ALPS profitent des cavités en surface des membranes peu compactes pour s'y insérer¹⁶⁸. Ainsi, plusieurs protéines ont un module amphipathique capable de détecter la déformation des membranes.

Pour conclure, Arf1 et ArfGAP1 sont des « switches » très élaborés dont on peut résumer le mécanisme de la manière suivante : **1)** Le Golgi favorise le recrutement des ArfGEF (Guanine exchange factor), tels que GBF1 et BIG1/2, via des interaction protéines-protéines selon des mécanismes pas encore très clairs, probablement dépendant de l'activité de la PI 4-kinase (PI4KIII α)¹⁶⁹⁻¹⁷². **2)** Les GEF échangent le GDP pour du GTP, Arf1 est activée, elle libère une hélice amphipathique qui s'insère dans la membrane du Golgi, la myristoylation stabilise l'interaction et améliore la capacité d'hydrolyse du GTP d'Arf1 **3)** Arf1 liée au GTP recrute le complexe COPI ou AP-1, ce qui initie la vésiculation. La membrane est intensément remodelée et le défaut de compacité augmente. **4)** La courbure et les défauts de compacité et de la vésicule sont détectés par ArfGAP1 *via* son motif ALPS. Ainsi, ArfGAP1 s'engage sur la vésicule et elle active l'hydrolyse du GTP d'Arf1. **5)** Une fois liée au GDP, Arf1 n'a plus la même conformation, son affinité pour les membranes diminue. Ainsi, Arf1 se détache de la membrane, les complexes COPI ou AP-1 se dissocient et la vésicule est formée. Ce mécanisme est un bon modèle qui explique comment des protéines peuvent se lier et se détacher des membranes de façon très dynamique (**Fig. 25a,b**).

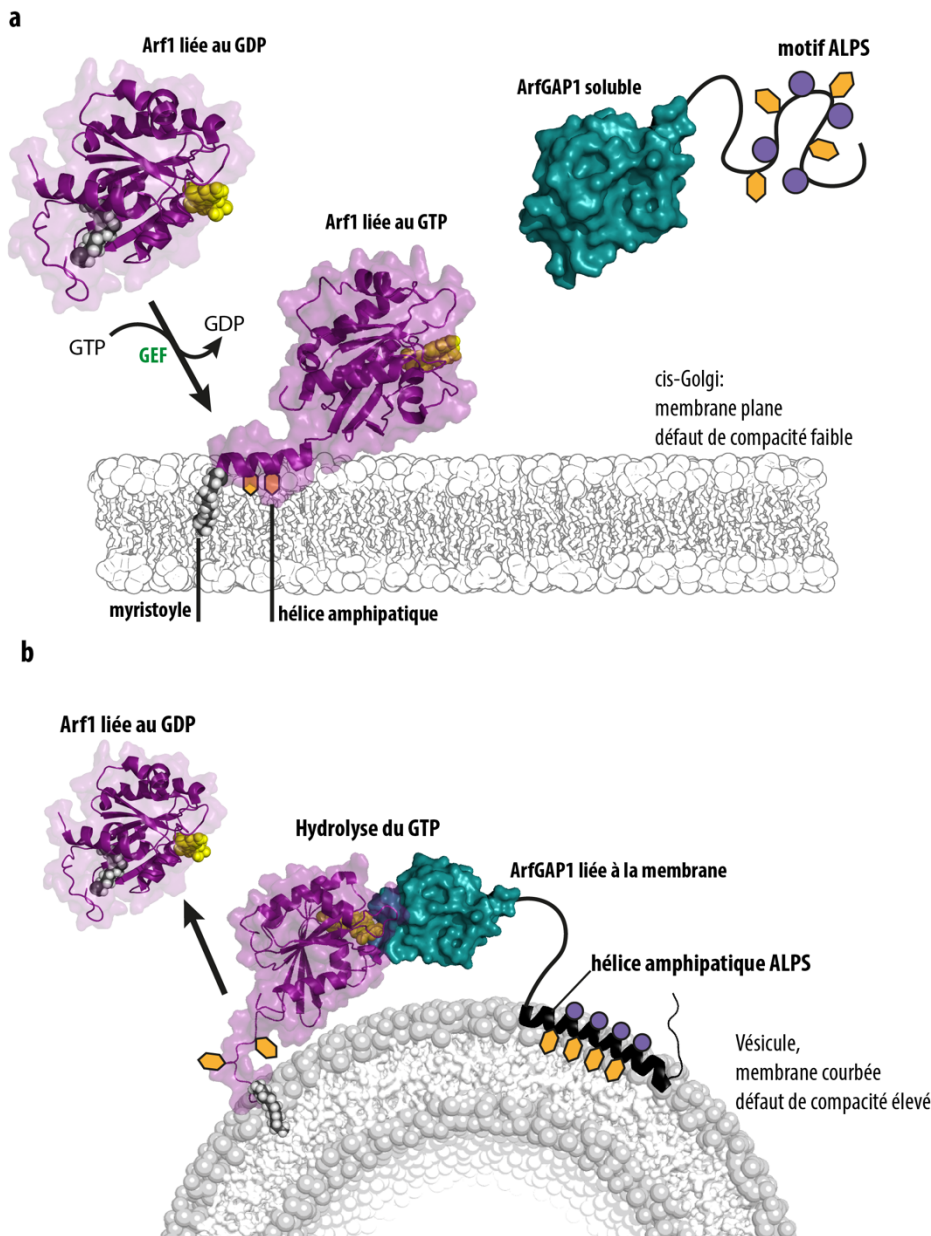


Figure 25 | Modèle de liaison du couple Arf1 et ArfGAP1 aux membranes

a) Une GEF échange le GDP lié à Arf1 par du GTP; Arf1 change de conformation et elle se lie au *cis*-Golgi avec son hélice amphipathique et son groupement myristoyle. ArfGAP1 est soluble, car elle ne détecte pas de défaut de compacité

b) ArfGAP1 détecte les défauts de compacité de la vésicule et se lie à cette membrane avec son motif ALPS. Une fois sur la vésicule, ArfGAP1 induit l'hydrolyse du GTP par Arf1. Ceci provoque la commutation d'Arf1 qui change de conformation. Le myristoyle est enfouie dans la protéine et Arf1 devient alors soluble.

III. Le défi de la logistique des lipides dans la cellule

A. Où et comment sont synthétisés les lipides

1. La formation des acides gras

Les acides gras naturels sont des acides carboxyliques aliphatiques qui possèdent entre 4 et 36 carbones. Les deux éléments de base nécessaire à leur synthèse sont l'acide acétique (2C) et l'acide propionique (3C) qui sont stabilisés sous forme d'ester de coenzyme A (CoA) : l'acétyl-CoA et le propionyl-CoA. Ces deux molécules sont les produits finaux de la β oxydation (**Fig. 26a**), un ensemble de réactions mitochondriales qui décompose les acides gras. Cette voie catabolique requiert l'acylation dans le cytosol du CoA-SH par une acyl-CoA synthétase (acyl-thiokinase). Les acides gras avec un nombre pair ($2n$) ou impair ($2n+1$) de carbones aboutissent respectivement à la formation de (n) acétyl-CoA ou ($n-1$) acétyl-CoA + (1) propionyl-CoA. L'acétyl-CoA est un substrat pour la production de citrate dans le cycle de Krebs et le propionyl-CoA alimente celui-ci en succinyl-CoA après carboxylation dépendante de l'ATP et isomérisation.

L'acétyl-CoA est carboxylé en présence de CO_2 , de biotine et d'ATP pour former du malonyl-CoA. Une molécule d'acétyl-CoA est ensuite condensée au malonyl-CoA et il s'ensuit une succession de réactions appelées condensation de Claisen dont le produit final est un acide palmitique à 16 carbones (**Fig. 26b**). Ces réactions sont catalysées par l'acide gras synthase (*fatty acid synthase*), une protéine multienzymatique retrouvée aussi bien chez les eucaryotes que les procaryotes. Ensuite, l'acide palmitique emprunte différentes voies. La chaîne aliphatique peut être allongée par des protéines Elo (*elongation of fatty acid proteins*), conservées chez les eucaryotes. Il peut aussi subir une désaturation de ses hydrogènes par des désaturases telles que les FADS dans l'espèce humaine ou Ole1p dans la levure. Enfin, l'acide palmitique sert de substrat pour la formation des glycérolipides ou pour la lipoylation des protéines.

L'acétyl-CoA est aussi le précurseur de la voie du mévalonate. Trois molécules d'acétyl-CoA sont condensées pour former du HMG-CoA qui est ensuite réduit en acide mévalonique par l'HMG-CoA réductase. L'acide mévalonique est le substrat essentiel à la synthèse du squalène, des stérols et des prénols. Les acides gras permettent donc d'alimenter toutes les voies de biosynthèse de lipides plus complexes.

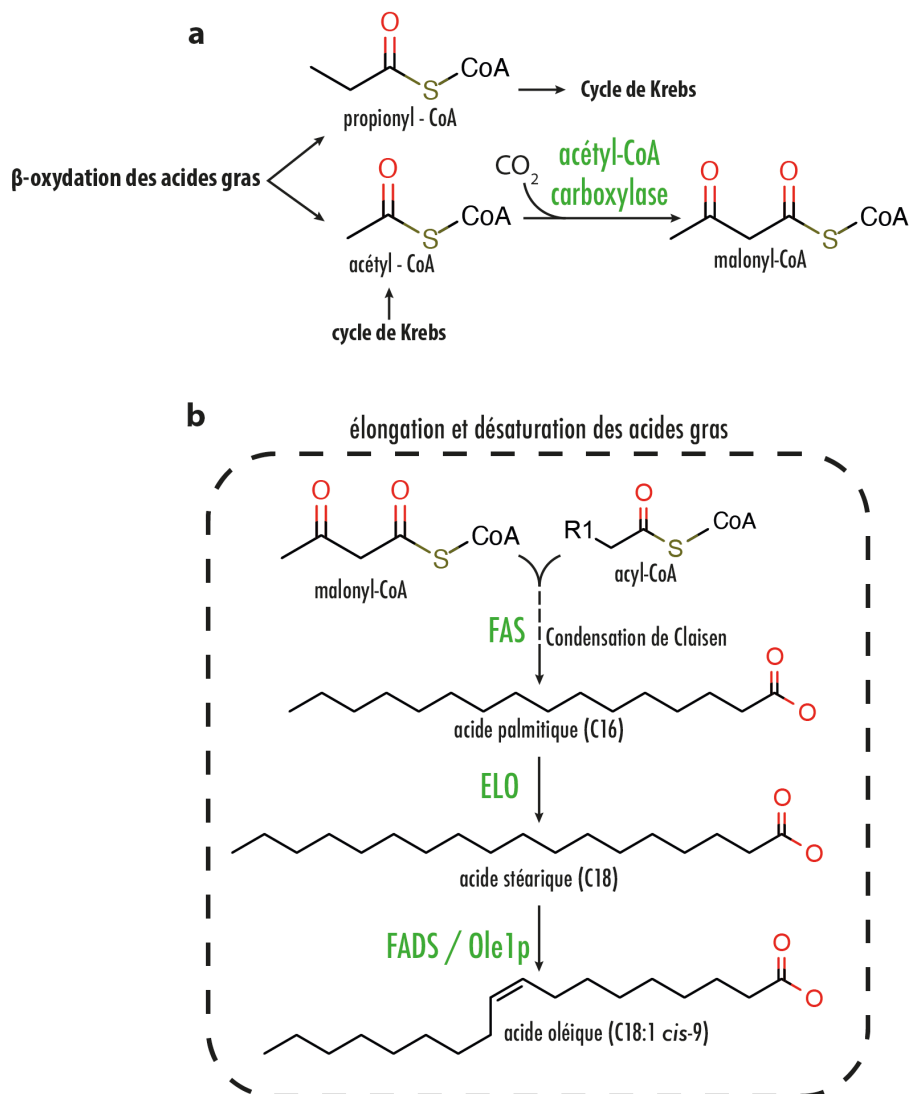


Figure 26 | La voie de biosynthèse des acides gras

a) La β oxydation dégrade les acides gras et permet d'obtenir les précurseurs nécessaires à leur néosynthèse. **b)** Une molécule de malonyl-CoA et une molécule d'acyl-CoA sont nécessaires pour amorcer la production des acides gras par une réaction en chaîne appelée condensation de Claisen. Une fois l'acide palmitique obtenu, il peut être allongé par ajout d'un acétyl-CoA et des désaturases génèrent les acides gras insaturés.

2. La formation des glycérolipides : ajout de glycérol et génération de LPA

Dans la cellule, les acides gras sont principalement estérifiés avec du glycérol pour former les glycérolipides (**Fig. 27**). Le glycérol est une molécule à 3 carbones qui portent chacun une fonction hydroxyle (-OH). C'est un dérivé de sucre qu'on retrouve majoritairement sous sa forme activée par phosphorylation : le L-glycérol-3-phosphate (Gro3P), qui a plusieurs origines.

Le Gro3P est un métabolite connecté à la glycolyse. Une molécule de glucose permet après phosphorylation la production de deux molécules de glyceraldéhyde-3-phosphate (Ga3P). Le Ga3P alimente essentiellement la production du pyruvate pour la production d'énergie mitochondriale. Mais le Ga3P est aussi converti par la triosephosphate isomérase en dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Le DHAP est le substrat de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase qui donne du Gro3P. Inversement, la glycéronéogenèse est également possible lorsque le DHAP est produit à partir de pyruvate lors de la néoglucogenèse. Comme le pyruvate peut être produit à partir de lactate, d'alanine ou de glutamine, la production de Gro3P est rarement limitante.

D'autre part, le glycérol circulant issu des réactions d'hydrolyse des glycérides est incorporé dans les cellules par la glycérol-kinase pour former du Gro3P. Chez les mammifères, la glycérol-kinase est fortement exprimée dans le foie et le rein et prend en charge le glycérol produit par les lipases digestives ou les lipases exprimées dans les tissus adipeux. Outre une fonction d'intermédiaire pour la régénération du NAD⁺ cytosolique par un système de navettes mitochondriales, le Gro3P a pour rôle de permettre la réaction d'estérification des acides gras.

Le glycérol est condensé aux acides gras sous leur forme activée par l'acyl-CoA synthétase en acyl-CoA. La chaîne acyle est transférée en position *sn1* du Gro3P par une glycerol-3-phosphate acyl transférase (GPAT). Cette réaction produit un acide lysophosphatidique (LPA). Du fait, de la présence du groupement phosphate en position *sn3* du glycérol le LPA est un glycérophospholipide. La GPAT est une enzyme ubiquitaire associée au RE dans la plupart des tissus, bien que dans le foie entre 20 et 50% de cette activité est portée par une GPAT mitochondriale. Dans la levure, seuls deux gènes, *GAT1* (*GPT2*) et *GAT2* (*SCP1*) codent pour des GPAT. Ces deux isoformes partagent une

homologie avec la GPAT d'*E.coli* et des mitochondries de mammifère. La spécificité de Gat1p est large, elle utilise des acides gras 16:0, 18:0, 16:1 et 18:1 comme la GPAT du RE chez les mammifères. Tandis que Gat2p présente une spécificité deux à cinq fois plus importante pour les acides gras à 16 carbones que ceux à 18 carbones¹⁷³. La synthèse des glycérolipides dépend majoritairement de la Gat2p mais la Gat1p peut suffire à compléter la fonction de Gat2p. Les GPAT sont donc à l'origine de la formation des glycérolipides via la production d'une réserve de LPA.

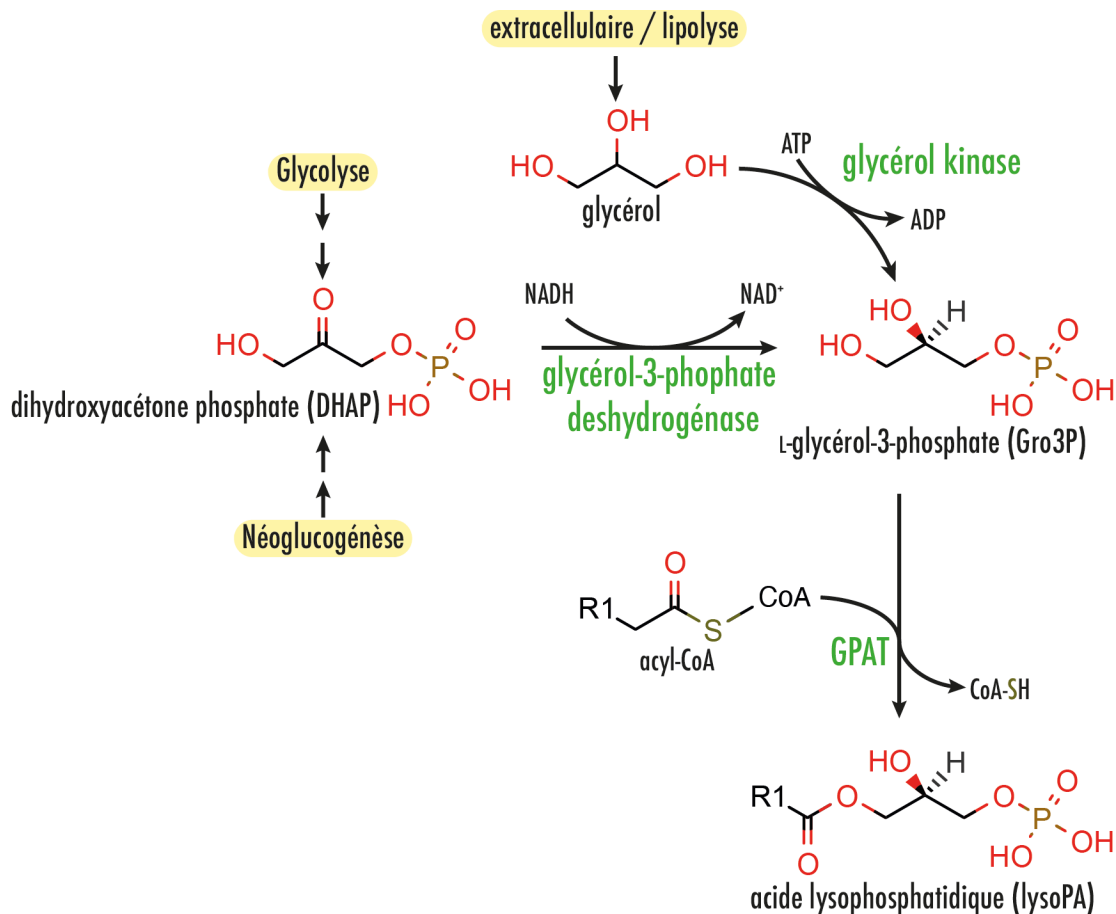


Figure 27 | Formation de lyso-PA

Le glycérol-3-phosphate (Gro3P) est le précurseur essentiel à la synthèse *de novo* des glycérolipides. Il provient soit de la phosphorylation d'un glycérol libre, soit il est produit à partir des intermédiaires de la voie glycolytique. Ensuite, le Gro3P est condensé à un acyl-CoA par une GPAT pour former du lyso-PA

3. La formation de l'acide phosphatidique (PA) : acylation en *sn2* du LPA

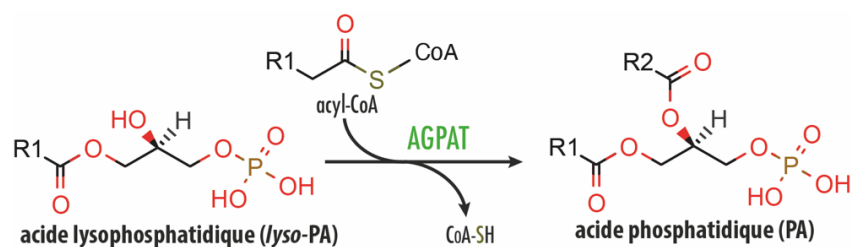
Dans un second temps, le LPA est estérifié en position *sn2* avec un acyl-CoA via l'enzyme acyl-CoA:1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT), parfois appelée lysophosphatidate acyltransférase (LPAAT). Ainsi, on forme de l'acide phosphatidique (PA) qui est un phospholipide. La famille des AGPAT est très diversifiée chez les humains, on compte 11 gènes codant pour les AGPAT, avec des localisations cellulaires, des niveaux d'expression tissulaires et des spécificités de chaîne différentes¹⁷⁴.

Dans la levure *S. cerevisiae* la fonction AGPAT est assurée majoritairement par Slc1p¹⁷⁵. Son activité génère la totalité du PA dans les gouttelettes lipidiques et 50% du PA dans le RE. Des études récentes montrent que Slc4p (alias Lpt1p et Ale1p) est une lysophospholipide acyltransférase dépendante de l'acyl-CoA, capable de catalyser l'acylation du LPA et des autres lysophospholipides¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. L'activité de Slc4p est beaucoup plus spécifique des acides gras insaturés, c'est-à-dire qu'elle préfère transférer le palmitoleyl-CoA (16:1), le l'oleyl-CoA (18:1) et le linoleyl-CoA (18:2) en position *sn2* du glycérol. En 2010 et 2011, une troisième protéine : Cst26p (alias Psi1p) a été caractérisée comme étant une AGPAT. Elle est localisée dans le RE et les gouttelettes lipidiques¹⁷⁹. Alors que Slc1p incorpore majoritairement les acyl-CoA 14:0 et 18:1, Cst26p préfère les acyl-CoA 18:0 et 16:0. Enfin, Loa1p est la dernière AGPAT découverte dans la levure. Sa localisation est semblable à celle de Slc1p mais elle a une préférence pour l'oleyl-CoA (18:1)¹⁷⁹.

L'importante diversité des AGPAT devant les GPAT favorise la grande variabilité des chaînes ajoutées en position *sn2* et une certaine monotonie des chaînes positionnées en position *sn1*. Ces enzymes expliqueraient donc l'asymétrie des chaînes aliphatiques dans les phospholipides eucaryotes. L'asymétrie des chaînes aliphatiques a été détectée dès les années 60¹⁸⁰⁻¹⁸³ et confirmée plus tard par la lipidomique.

Figure 28 | Formation du PA

Les AGPAT fixent une chaîne aliphatique en position *sn2*. Les enzymes de cette classe sont sélectives de certains acyl-CoA et leur diversité explique la variabilité des chaînes aliphatiques en *sn2* des phospholipides.



4. La formation de diacylglycérol (DAG) par déphosphorylation du PA

Une fois formé, le PA a une durée de vie courte dans la cellule et, de fait, c'est un lipide rare. Outre les fonctions particulières de ce glycérophospholipide anionique, il sert avant tout de précurseur à la synthèse du diacylglycérol (DAG). L'acide phosphatidique phosphohydrolase (PAP) permet d'hydrolyser le phosphate en position *sn3*, libérant ainsi un phosphate inorganique (Pi), (**Fig. 29**). Il existe deux types de PAP : le type I aussi connu sous le nom des lipines et les PAP de type II.

Les mammifères possèdent trois lipines qui convertissent le PA en DAG *in vitro*. Leur distribution tissulaire n'est pas uniforme. La lipine 1 est fortement exprimée dans les muscles, la lipine 2 est majoritairement exprimée dans le cerveau et le foie, et la lipine 3 s'exprime le plus dans l'intestin¹⁸⁴. Dans la cellule de mammifère, les lipines exercent leur activité au RE bien que la lipine 3 intervienne sur les lysosomes et à la mitochondrie¹⁸⁵. Dans la levure, la seule PAP responsable de la synthèse des phospholipides dans le RE est Pah1p^{186,187}.

Les PAP de type II, contribuent peu à la synthèse des glycérophospholipides. Elles peuvent hydrolyser des lipides autres que le PA et elles sont impliquées dans des mécanismes d'endocytose ou de signalisation qui font intervenir le PA, le C1P ou la sphingosine¹⁸⁸.

Une fois produit majoritairement dans le RE, le diacylglycérol (DAG) a plusieurs destins : 1) il est reconverti en PA par une diacylglycérol kinase (DGK) de façon dépendante du calcium et à partir de CTP comme cofacteur, 2) le DAG permet la synthèse de phosphatidylcholine et de phosphatidyléthanolamine, 3) le DAG sert de substrat à la synthèse des triacylglycérols (TAG) pour assurer le stockage des lipides.

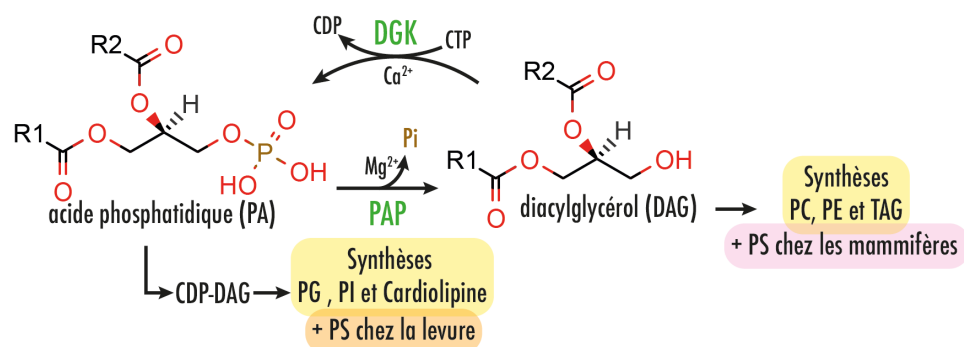


Figure 29 | Formation du DAG et interconversion PA / DAG

Le PA et le DAG sont deux précurseurs de phospholipides différents.

5. *La Formation des glycérophospholipides autres que le PA*

Les glycérophospholipides correspondent à un niveau de complexité supérieur par rapport aux glycérolipides. Leur point commun est la présence d'un groupement phosphate (PO_3^{2-}) estérifié en position *sn3* du glycérol. J'ai décrit dans une section précédente la forme la plus simple des phospholipides : l'acide phosphatidique (PA) et son dérivé mono-acylé : le lysoPA.

La biosynthèse du DAG et du PA relève de voies enzymatiques communes entre les plantes, les mycètes et les animaux, au contraire, les voies de biosynthèse des phospholipides plus complexes entre ces trois groupes sont légèrement différentes malgré une organisation similaire. On retrouve deux types de précurseurs essentiels à la synthèse des phospholipides : le PA et le DAG. Le PA sert à produire du diacylglycérol-cytidine diphosphate (CDP-DAG) afin de synthétiser du phosphatidylglycérol (PG), du phosphatidylinositol (PI), de la cardiolipine (CL) et dans le cas exceptionnel des mycètes, de la phosphatidylsérine (PS). Le DAG permet la synthèse de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidyléthanolamine (PE) en suivant la voie biochimique de Kennedy. Au cours de mes travaux, je me suis intéressé particulièrement à la phosphatidylsérine (PS) et au phosphatidylinositol-4-phosphate. Dans les sections suivantes, je décris essentiellement les voies biochimiques qui conduisent à la formation des quatre phospholipides majeurs de la cellule : la PC, la PE, le PI et la PS.

6. *Formation du CDP-DAG : un précurseur de la synthèse de PI, et de PS chez les mycètes.*

Le CDP-DAG est un liponucléotide correspondant à une forme activée du PA par une molécule de CMP (cytidine monophosphate). Dans les cellules, le CDP-DAG est produit par les CDP-diacylglycérol synthase (CDS) qui permettent la condensation d'une molécule de cytidine triphosphate (CTP) sur le groupement phosphate du PA avec une libération de pyrophosphate (diphosphate ou P-Pi), (**Fig. 30**). Cette réaction enzymatique a été mise en évidence pour la première fois par Carter et Kennedy en 1966 à partir de foie de cochon en étudiant l'incorporation dans les lipides de CTP marquée au tritium¹⁸⁹. La cristallographie d'une CDS bactérienne suggère un modèle pour expliquer cette réaction : le site catalytique fonctionne de manière similaire au site nucléotidyltransferase de l'ADN polymérase¹⁹⁰.

Les CDS sont ubiquitaires, les humains en possèdent deux isoformes, les levures et les insectes n'en possèdent qu'une seule et la plante *Arabidopsis thaliana* possède 5 homologues. Chez les mammifères, les deux isoformes n'ont pas le même profil d'expression dans le temps et dans les différents tissus. CDS2 est largement exprimée dans le système nerveux central et la rétine durant le développement embryonnaire bien qu'à l'âge adulte, CDS2 n'est pas détectée dans la rétine. En revanche, le profil d'expression de CDS1 est plus restreint avec un haut niveau d'expression dans les photorécepteurs dans la rétine¹⁹¹. Ces résultats suggèrent que CDS1 doit avoir un rôle prépondérant dans la phototransduction et le cycle visuel. Dans une autre analyse, la distribution tissulaire de l'expression de CDS1 et CDS2 est décrite plus finement¹⁹². CDS1 est majoritairement exprimée dans le cerveau, les yeux, les muscles lisses et les *testes* et dans une moindre mesure dans le rein. L'expression tissulaire de CDS2 est ubiquitaire avec une surexpression dans le cerveau.

Des analyses biochimiques ont permis d'expliquer dans quelle mesure CDS1 et CDS2 se sont spécialisées. CDS1 et CDS2 ont une spécificité de substrat déterminée et elles ont deux fonctions cellulaires distinctes¹⁹³. CDS1 est généraliste, elle conserve une bonne activité enzymatique, quels que soient les longueurs, le degré d'insaturation et la position *sn1* ou *sn2* des chaînes d'acide gras. Exceptionnellement, le DOPA (18:1/18:1) réduit l'activité de CDS1 significativement de 20% par rapport aux autres substrats. Au contraire, CDS2 est très sélective de certains PA. Le substrat préféré par CDS2 est l'acide

1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-phosphatidique (18:0/20:4 PA). Son activité diminue de 40% et 60% si l'on remplace la chaîne 18:0 en position *sn1* par une chaîne 16:0 et 20:4 respectivement. Par contre, son activité chute de plus de 80% si la chaîne en position *sn2* n'est pas de type 20:4 et cette activité est quasiment nulle pour le DOPA (18:1/18:1). Cette même étude révèle que les lipides produits en aval de la voie CDS-dépendante : les PI et leurs dérivés phosphorylés, ainsi que le PG en concentration plus élevée, exercent une action régulatrice négative sur CDS1 et CDS2. Cette inhibition est plus marquée avec le PI(4)P et d'autant plus avec le PI(4,5)P₂. De plus, CDS2 est plus spécifiquement inhibé par le 18:0/20:4 PI qui est le produit final consécutif à son activité majoritaire.

Ces résultats suggèrent que CDS1 et CDS2 permettent de créer respectivement des réserves distinctes de CDP-DAG. CDS1 génère une réserve de CDP-DAG pour la synthèse *de novo* des phospholipides et CDS2 génère une réserve de CDP-DAG riche en arachidonyle nécessaire pour la synthèse des PI. En effet, chez les mammifères les PI sont naturellement riches (~70%) en arachidonyle (C20:4)¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Cependant, chez la levure l'unique CDS homologue aux protéines humaines est CdsA. Cette protéine a été caractérisée comme permettant 90% de l'activité CDS de la cellule, fonction essentielle à la synthèse du PI, du PG et de la PS¹⁹⁷.

Plus récemment, les protéines d'une autre famille sont décrites avec une activité CDS : Tam41 chez la levure¹⁹⁸ et TAMM41 dans l'espèce humaine¹⁹⁹. Cette activité est nécessaire à la synthèse de la cardiolipine dans les mitochondries où sont localisées ces enzymes¹⁹⁸. Les Tam41 sont bien différentes de CDS1/2 en termes de séquence et de structure^{199,200,201}.

Une fois produit, le CDP-DAG sert majoritairement à alimenter la production de PI, de PG et de cardiolipine. En plus, le CDP-DAG alimente la production de PS chez les mycètes. La cardiolipine est un phospholipide à quatre chaînes aliphatiques exclusif de la mitochondrie. Le substrat nécessaire à sa synthèse est le PG qui est relativement peu abondant chez les eucaryotes. Il représente moins de 1% des phospholipides^{13,20}. Pour ces raisons, je ne détaille pas la synthèse de ces lipides qui se déroule en plusieurs étapes dans la mitochondrie de façon similaire d'un eucaryote à l'autre.

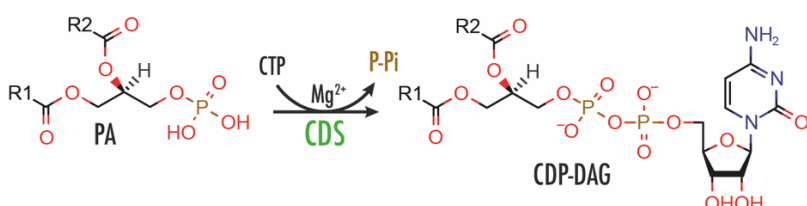


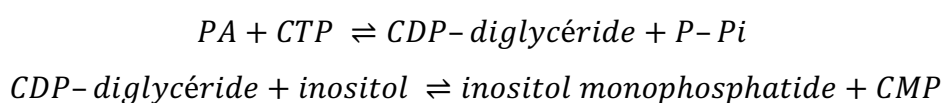
Figure 30 | activation du PA en CDP-DAG

Pour son activité, la CDS requiert du Mg²⁺ et du CTP et du PA comme le substrat.

7. La formation de PI chez les eucaryotes

Le CDP-DAG est le précurseur unique nécessaire à la synthèse des phosphoinositides (PI) chez les mammifères, les levures ou les plantes. Cette synthèse résulte de la condensation d'un des groupements hydroxyyles d'une molécule de *myo*-inositol sur le phosphate du PA activé par le groupement CMP (**Fig. 31**). Cette réaction est catalysée par une CDP-alcool phosphotransférase qu'on nomme plus simplement phosphatidylinositol synthase (PIS). Son substrat, le *myo*-inositol est le stéréo-isomère naturel majoritaire de l'inositol. Il est synthétisé à partir du Glucose-6-phosphate issu de la première étape de la glycolyse via une inositol-3-phosphate isomérase. Ensuite, l'intermédiaire produit, le *myo*-inositol 1-phosphate, est déphosphorylé par une inositol-monophosphatase. Par conséquent, le *myo*-inositol n'est pas une ressource particulièrement limitante pour la cellule. La PIS est une enzyme unique au domaine des eucaryotes, à quelques exceptions près²⁰². La synthèse enzymatique du PI a été identifiée en 1958 par Agranoff *et al.*²⁰³ en incubant de l'inositol [³H] avec un extrait de lipides et un lyophilisat de rein de cochon d'Inde. Ils observèrent que l'inositol était incorporé dans les phospholipides de façon dépendante du Mg²⁺ et de la cytidine. Ils ont également montré que cette incorporation était stimulée par la présence de PA ce qui conduisit les auteurs à suggérer que la voie enzymatique menant au PI nécessitait une activation du PA par des cytidine.

En 1959, Paulus et Kennedy décrivirent que la synthèse *de novo* de PI nécessitaient spécifiquement du CTP et ils suggèrent le schéma réactionnel suivant²⁰⁴ :



En 1982, une souche mutante pour la synthèse de PI de levure a été isolée par Nikawa et Yamashita et ils nommèrent le gène codant pour cette enzyme *pis*. En 1984, les mêmes auteurs ont réussi à cloner ce gène et à le maintenir dans la bactérie *E. coli*. A partir de cette construction génique, ils ont pu compléter la souche mutante de levure *pis* permettant à cette souche de retrouver une activité « CDPdiacylglycérol—inositol 3-phosphatidyltransferase » comparable à l'activité mesurée avec une souche sauvage (WT)²⁰⁵. Pour des raisons d'homogénéisation de la nomenclature, le nom de la protéine *pis* de *S. cerevisiae* correspond désormais à Pis1p.

Ce n'est qu'en 1994 qu'on isola l'enzyme responsable de l'activité PIS chez les mammifères. Bruno Antonsson purifia pour la première fois une protéine de 24 kDa avec une activité PI synthase à partir de placenta humain²⁰⁶. La même année, une enzyme similaire avec un poids moléculaire de 21 kDa fut purifiée à partir de foie de rat²⁰⁷. En 1996, l'ADNc de la PIS du rat est cloné pour la première fois. Ce gène code une protéine de 23,6 kDa dont l'expression permet la complémentation d'un mutant *pis*⁻ chez *S. cerevisiae*. Enfin, en 1997, Lykidis *et al.* montrent une analyse comparative de CDS1 et PIS dans l'espèce humaine²⁰⁸. Ils ont isolé les ADNc de *CDS1* et *PIS1* à partir d'une base de données d'EST (*expression sequence tag*), qu'ils ont cloné dans des lignées cellulaires humaines et ils ont comparé les activités des deux enzymes, vérifié leur expression relative dans différents tissus humains et ils ont montré les relations qui existent entre l'expression des deux enzymes et les niveaux de biosynthèse de PI et de CDP-DAG. Les auteurs concluent que l'expression de *CDS1* et celle de *PIS1* ne déterminent pas la modulation de la synthèse *de novo* de PI et les auteurs émirent l'hypothèse que *CDS2* devait avoir ce rôle régulateur, ce qui est bien le cas d'après les récentes analyses que j'ai expliquées dans la section précédente.

Comme pour *S. cerevisiae*, la nomenclature du gène codant pour PIS1 dans l'espèce humaine a été renommée *CDIPT*. Par la suite, le PI aura une grande diversité de fonction, il servira notamment de précurseur à la synthèse des PI-phosphates (PIPs) qui sont essentiels pour la signalisation cellulaire et pour le transport et la distribution des lipides dans la cellule.

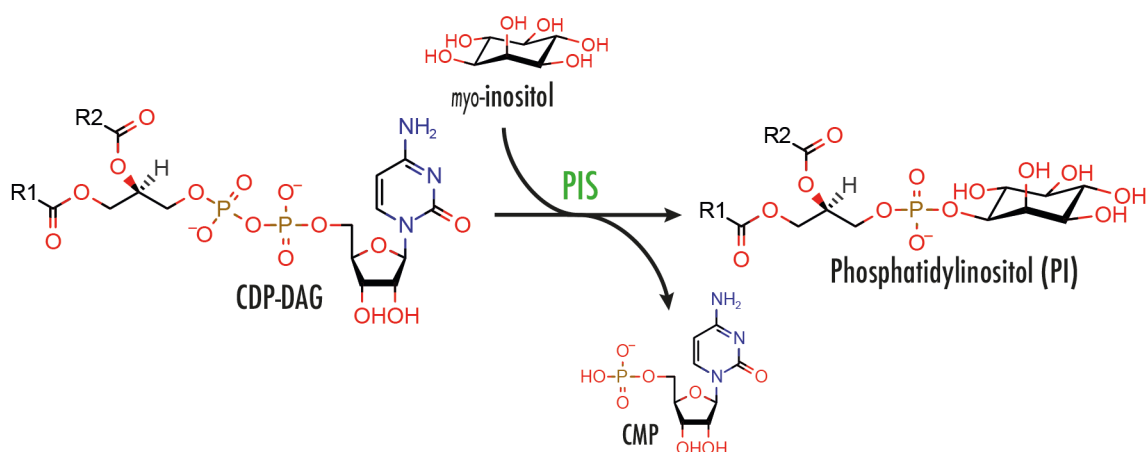


Figure 31 | Formation du PI à partir de CDP-DAG

La PI synthase catalyse l'échange de la CMP portée par le CDP-DAG contre un *myo*-inositol

8. Formation de PS chez les mycètes

Outre la production de PI, PG et de Cardiolipine, le CDP-DAG alimente la voie de biosynthèse de phosphatidylsérine (PS) chez la levure. En effet, chez les mycètes la synthèse de PS résulte uniquement de la réaction d'une enzyme particulière : la CDP-diacylglycérol—sérine O-phosphatidyltransférase (CHO1). Dans cette réaction la sérine est condensée sur le phosphate en position *sn3* du CDP-DAG ce qui libère une molécule de CMP (**Fig. 32**).

Il s'agit là d'un cas *a priori* unique du règne eucaryote. Cette réaction est identique à la réaction de synthèse de PS chez les bactéries. Les analyses phylogénétiques automatisées disponibles sur la base de données EggNOG révèlent que CHO1 est exclusivement présente chez les mycètes et elle dérive probablement d'un transfert horizontal de gène depuis des protéobactéries de classe β ou δ . Il est admis que ce type de transfert entre les bactéries et les mycètes a eu lieu plusieurs fois au cours de l'évolution²⁰⁹.

Pour permettre la synthèse de PS, la sérine n'est pas une ressource rare, c'est un acide aminé protéinogène qui est synthétisé majoritairement à partir d'un intermédiaire de la glycolyse : le 3-phosphoglycérate (3PG). Le 3PG est d'abord oxydé par une phosphoglycérate déhydrogénase et subit ensuite une amination réductive (transamination) depuis le glutamate par la phosphosérine transaminase. Il en résulte une O-phosphosérine qui est hydrolysée par une phosphosérine phosphatase.

Ensuite, la synthèse de PS résulte de la condensation du groupement hydroxyle de la sérine sur le phosphate du PA activé ce qui a pour conséquence la libération de la CMP. Ce sont Kanfer et Kennedy qui furent les premiers, en 1963, à montrer l'occurrence de cette réaction dans *E.coli*²¹⁰. Ils n'ont pas réussi à reproduire cette réaction à partir d'extrait de foie sans pour autant rejeter l'hypothèse de l'existence de cette réaction chez les mammifères.

En 1972, Steiner & Lester étudient *in vitro* la biosynthèse des phospholipides chez *S. cerevisiae* et ils montrent que la PS, la PE et la PC ont pour précurseur majoritaire un diglycéride intermédiaire activé par la CMP²¹¹. Ensuite, à partir d'une collection de mutants de levures mise au point par mutagenèse chimique²¹², le groupe de Susan Henry détecte la déficience en phosphatidylsérine dans un mutant auxotrophe pour

l'éthanolamine et la choline^{213,214} ; ce mutant incapable de croître sur un milieu qui ne contient pas ces métabolites est nommé *cho1*.

En 1981, Nikawa & Yamashita découvrent l'activité PS-synthase (PSS) chez la levure²¹⁵. Cette activité a d'abord été mesurée dans la fraction membranaire des cellules. Ensuite, ils ont purifié une fraction enzymatique responsable de cette activité après solubilisation par un détergent (Triton X-100). Puis ils ont caractérisé l'activité enzymatique PSS *in vitro*. La réaction semble lente, elle produit au maximum 0,3 PS/min/protéine, mais on sait aujourd'hui qu'une cellule de levure contient entre 6000 et 7000 copies de Cho1p²¹⁶. Les auteurs montrent que cette activité est dépendante du Magnésium (Mg²⁺) et qu'elle est spécifique de la L-Sérine, l'enzyme n'accepte pas la D-sérine, la L-thréonine ou la L-cystéine, qui sont chimiquement proches de la L-sérine. Enfin, ils ont isolé une souche mutante pour cette réaction à partir d'une collection de levures auxotrophes pour l'éthanolamine confirmant les observations faites par le groupe de Henry.

Deux ans après cette découverte, le gène codant pour Cho1p est isolé et cloné à la suite d'une collaboration des équipes de Carman et Henry. Le gène est baptisé CHO1 du fait de l'auxotrophie pour la choline des levures déficientes en Cho1p. Ce gène est bien responsable de la synthèse de PS dans la levure et la perte de cette activité réduit la synthèse d'autres phospholipides^{217,218}.

Pour expliquer l'auxotrophie particulière de ce mutant, on sait aujourd'hui que dans la levure, la phosphatidylsérine peut être un précurseur pour la synthèse de phosphatidyléthanolamine (PE) par décarboxylation de la PS et aussi de phosphatidylcholine (PC) par tri-méthylation de la PE. Mais cette voie n'est pas essentielle et la PC et la PE peuvent être produites *de novo* à partir respectivement de choline et d'éthanolamine en suivant la voie de Kennedy. Cette hypothèse de voie alternative à la synthèse de PC et de PE a été retenue très tôt par Atkinson *et al.* lors de l'identification du mutant *cho1*^{213,214}. De plus, Waechter, Steiner et Lester avait décrit que la régulation de biosynthèse de la PC passait par une voie de méthylation de la PE via des N-méthyl-transférases^{219,220}.

Par la suite, le groupe de Henry montre que la PC est le lipide essentiel qui manque dans les levures *cho1* non supplémentée en choline. Ils identifient que la voie de méthylation de la PE est interrompue dans un mutant *cho2*. Ce mutant présente un

enrichissement de la teneur en PE des membranes au détriment de la teneur en PC qui chute drastiquement d'un facteur 4 à 5 par rapport à une souche sauvage²²¹. De plus, cette étude révèle que seul le double mutant *cho2* (*Pme1p*) et *opi3* (*Pme2p*) est auxotrophe pour la choline. En parallèle, Kodaki et Yamashita montrent que *Pme1p* et *Pme2p* appartiennent à un même groupe de complémentation et que les deux gènes ensemble sont complémentaires et nécessaires pour permettre la production de PC²²². Concernant l'auxotrophie en éthanolamine du mutant déficient *cho1*, Trotter et Voelker mettent en évidence que deux PS décarboxylases : *Psd1p* dans la mitochondrie et *Psd2p* dans le RE, sont ensemble essentielles pour une production efficace de PE. En effet, les mutants individuels pour *Psd1p* et *Psd2p* continuent de produire de la PE, mais le double mutant est auxotrophe pour l'éthanolamine²²³.

Pour conclure, la levure est un cas unique où la synthèse de PS est essentielle pour produire la PE et consécutivement la PC. *Cho1p* favorise la croissance cellulaire en maintenant les réserves de PC et de PE malgré l'existence de la voie de Kennedy dans la levure qui est très coûteuse en précurseurs éthanolamine et choline. Enfin, si la délétion du gène *cho1* n'est pas létale, elle ralentit la croissance des levures, elle perturbe le métabolisme et elle limite la croissance polarisée et la formation de bourgeon²²⁴.

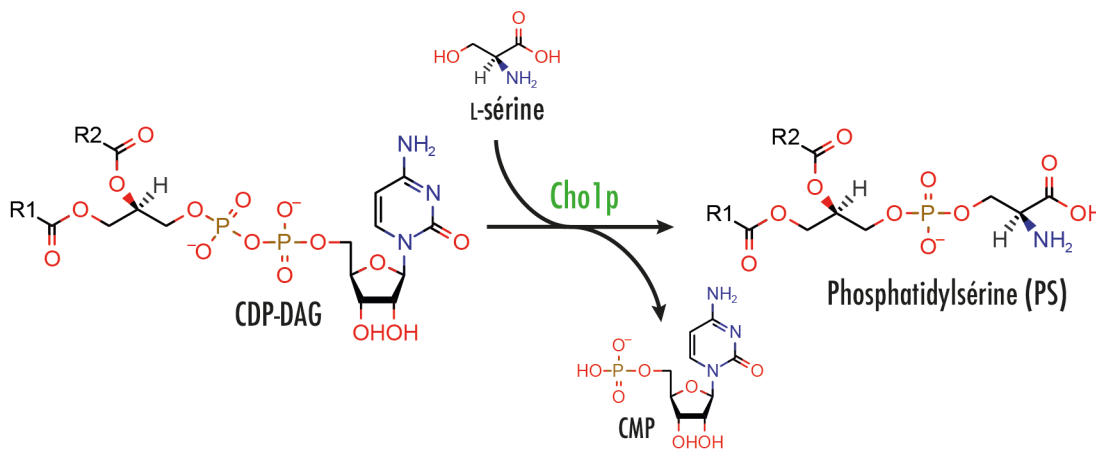


Figure 32 | Formation de PS dans la levure à partir de CDP-DAG

Cho1p catalyse l'échange de la CMP portée par le CDP-DAG contre une L-sérine formant ainsi la PS

9. La formation de PC et de PE par la voie de Kennedy et la synthèse de PS chez les mammifères.

La voie Kennedy est le seul moyen chez les mammifères de produire de la PS. Cette voie correspond à la synthèse de PC et de PE à partir de DAG et respectivement de choline et d'éthanolamine. La choline et l'éthanolamine sont des métabolites présents dans le cytosol ou le milieu extracellulaire. La choline et l'éthanolamine sont d'abord phosphorylées respectivement par une choline kinase (CK) ou une éthanolamine kinase (EKI). Ensuite ces formes sont activées avec une molécule de CTP ce qui aboutit à la formation de CDP-choline et de CDP-éthanolamine. L'enzyme qui permet la production de CDP-choline est une CTP-phospho-choline-cytidyl transférase (PCT) et la production de CDP-éthanolamine est assurée par la CTP-phospho-éthanolamine-cytidyl-transférase (ECT). Ensuite ces deux composés sont condensés sur le DAG pour former de la PC ou de la PE par des choline ou éthanolamine phosphotransférases (CPT ou EPT) respectivement (**Fig. 33**). Les CPT et EPT sont localisées au RE. Par conséquent, les productions de PC et de PE sont dépendantes de la disponibilité en choline et en éthanolamine et elles se déroulent dans le RE. Enfin ce mécanisme est valable chez les mammifères et la levure.

Ensuite, les mammifères possèdent deux isoformes de phosphatidylsérine synthase (PSS). La PSS1 effectue l'échange du groupement éthanolamine de la PE par une L-sérine tandis que la PSS2 effectue l'échange du groupement choline par une L-sérine. Ces enzymes sont localisées dans le RE et les levures ne les possèdent.

Une fois formée, la PS est transportée dans la mitochondrie par un mécanisme encore inconnu. La PS sert de substrat à la production de PE dans la mitochondrie par une PS-décarboxylase (PSD), qui existe aussi bien chez les levures que les mammifères. La PE produit dans la mitochondrie serait transportée en retour dans la RE toujours selon un mécanisme qui demeure énigmatique. Enfin, la PE est suffisante pour maintenir une production de PC même en cas de carence en choline. En effet, chez les levures comme chez les mammifères, des PE-méthyltransférases assurent la tri-méthylation de l'éthanolamine portée par la PE, ce qui génère de la PC.

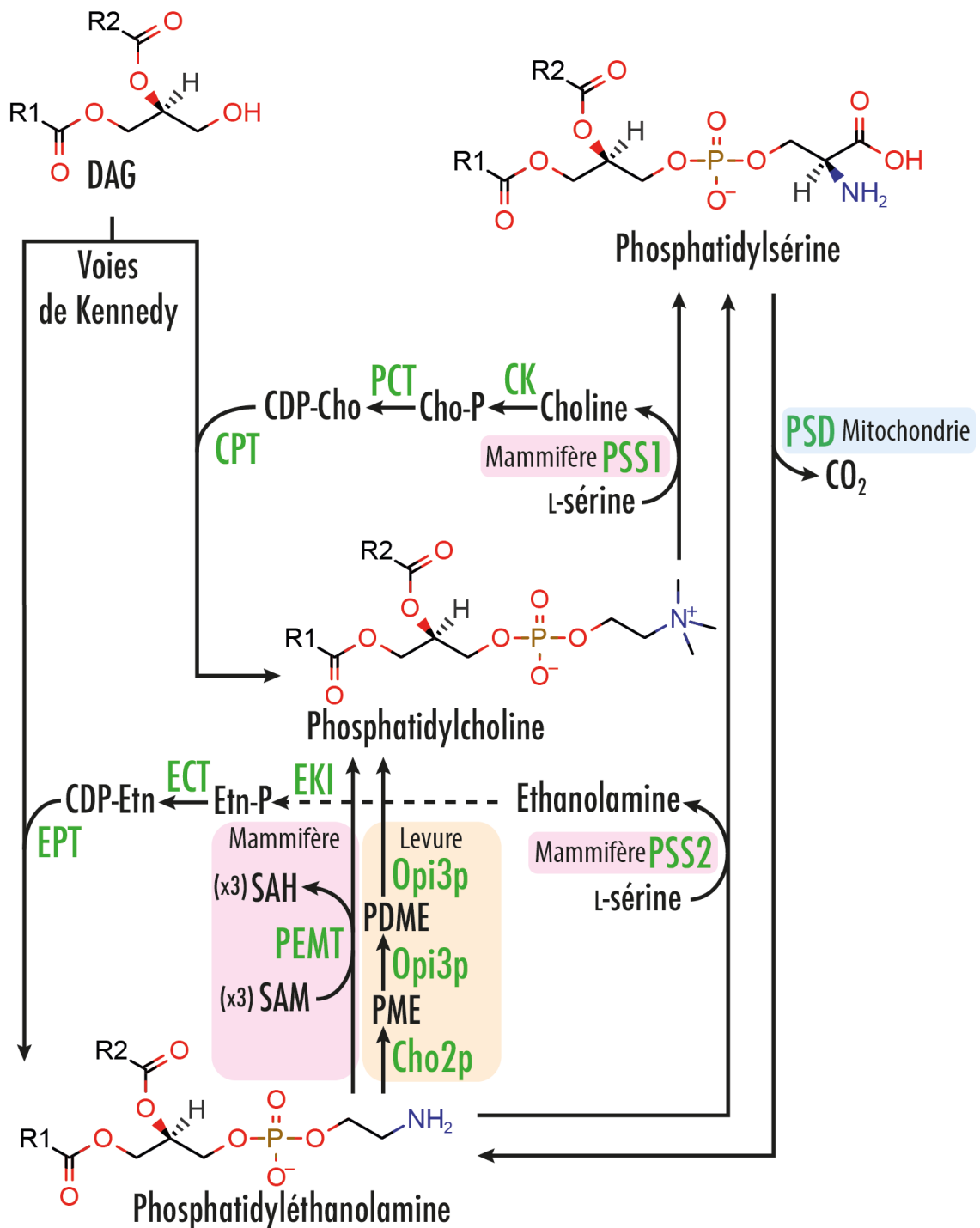


Figure 33 | La voie de Kennedy : Synthèse de PC et de PE

Également appelée voie CDP-choline ou CDP-éthanolamine, les levures comme les mammifères produisent la PC et la PE à partir de DAG. Chez les mammifères uniquement, la production de PS dépend de la production de PC et de PE car les Phosphatidylsérine Synthases (PSS1/2) accomplissent l'échange de la tête polaire de la PC ou de la PE contre la L-sérine. De plus, la PS peut être convertie en PE par la mitochondrie. Enfin la PC est aussi produite à partir de PE par la PE-méthyl-transférase (PEMT). Cette activité est due à un seul gène dans l'espèce humaine et à deux gènes dans la levure (CHO2 et OPI3). Ce schéma explique aussi pourquoi des levures $\Delta cho1$ sont auxotrophes pour la choline et l'éthanolamine car ces mutants ne peuvent pas produire de la PC ou de la PE à partir de PS.

10. *La formation des triacylglycérol (TAG): acylation en sn3 du glycérol des DAG*

La synthèse des TAG est catalysée par l'enzyme DGAT. Chez les mammifères, on compte 2 familles géniques de diacylglycérol acyltransférase : DGAT1 et DGAT2 (**Fig. 34**). En fait, ces deux familles ont évolué séparément et une analyse phylogénétique a montré que la famille DGAT1 est étroitement liée aux Acyl-CoA:cholesterol acyltransférases (ACAT)²²⁵. Les levures n'ont pas d'homologue directe à DGAT1. Elles possèdent à la place deux protéines : ARE1 et ARE2, qui ont une activité ACAT majeure et une activité DGAT mineure^{226,227}. La famille DGAT2 est présente dans la plupart des eucaryotes avec parfois de nombreuses isoformes. Dans la levure, la seule protéine de cette famille est Dga1p. Elle produit la majorité de la réserve de triacylglycérol de façon dépendante des acyl-CoA. L'activité de Dga1p est maximale dans les gouttelettes lipidiques, mais se produit aussi dans le RE²²⁸. Une dernière famille d'enzyme permet la production des TAG, ce sont les phospholipides:DAG acyltransférase (PDAT). Leur représentante dans la levure est Lro1p qui intervient dans le transfert du groupement acyle en position *sn2* de la PC et de la PE vers la position *sn3* du DAG²²⁷. Lro1p est principalement localisée dans le RE et a une préférence pour la PE devant la PC et sa spécificité est deux fois plus importante pour les acyles insaturés.

Les acides gras sont donc mis en réserve sous la forme de TAG. L'avantage de la production de triglycérides réside dans la condensation des 3 acides gras sur une seule molécule de glycérol. La cellule puise dans ces réserves grâce à diverses lipases pour constituer de nouveaux lipides ou pour alimenter le cycle de Krebs via la β -oxydation en cas de carence en carbone. Les TAG sont stockés dans les gouttelettes lipidiques et dans les organismes pluricellulaires, les TAG peuvent être transportés d'un tissu à l'autre via les fluides extracellulaires, sous formes par exemple dans le plasma des mammifères de VLDL (*very low-density lipoprotein*) LDL (*low-density lipoprotein*) ou d'HDL (*high-density lipoprotein*).

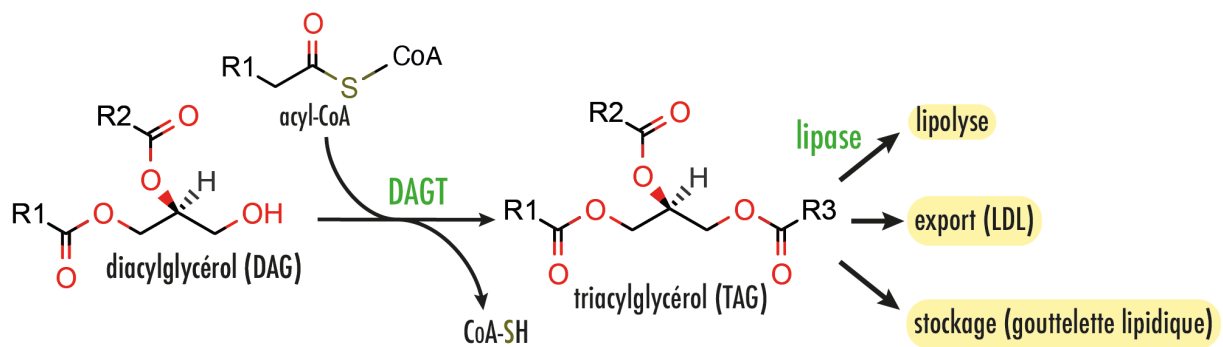


Figure 34 | Production de triacylglycérol (TAG)

Les TAG forment une étape finale qui consiste à stocker les acides gras. Une molécule de glycérol porte trois acides gras. Les TAG seront soit stockés dans des gouttelettes lipidiques, soit exportés dans la circulation sanguine chez les mammifères, soit une lipase assure leur dégradation pour produire de l'énergie.

B. Les *Lipid Transfer Proteins* (LTPs) pour distribuer les lipides

La majorité des phospholipides sont synthétisés dans le RE. Le trafic vésiculaire de la cellule n'est pas l'unique moyen de déplacer des lipides et il ne permet pas d'ajuster finement leur distribution entre les différents organites. Cette distribution doit en effet répondre à des contraintes externes et à des changements du métabolisme qui en résulte. De plus, certains organites sont déconnectés des flux de lipides assurés par le trafic vésiculaire. Par conséquent, il doit exister d'autres mécanismes qui permettent le transfert de lipides entre les organites.

1. *Comment les lipides franchissent-ils le cytosol ?*

On sait depuis longtemps que les cellules ont recours à des protéines appelées *Lipid Transfer Proteins* (LTPs), qui permettent de solubiliser les lipides et de les convoier d'une membrane à une autre.

Le transport de lipides entre membranes a pu être constaté *in vitro* dès 1968, grâce à une expérience éthiquement contestable, mais ingénieuse. Deux chercheurs, Wirtz et Zilversmit, ont isolé des mitochondries et des microsomes extraits de foie de rats auxquels on a administré des éléments radioactifs (^{14}C , ^{32}P et ^3H)²²⁹. Ce traitement permet un marquage isotopique des lipides. Les lipides sont ensuite extraits, séparés par chromatographie, et leur niveau de radioactivité est mesuré. Les mitochondries ou les microsomes marqués ont été incubés avec des mitochondries ou des microsomes provenant de rats non traités. Le milieu d'incubation utilisé correspond soit à une solution de sucrose-EDTA, soit à un surnageant d'extrait de foie de rat non marqué. Les auteurs avaient mesuré que plus d'un tiers des lipides des organites non marqués étaient radioactifs. Ils ont mis en évidence que cette activité spécifique est attribuable au contenu en protéines du surnageant extrait. Il ne s'agit ni d'un effet du sucrose-EDTA, ni d'un transfert passif de radioactivité puisqu'une température de 0°C produit un fort ralentissement de la réaction. Bien que les auteurs aient affirmé que cette expérience ne prouvait pas l'échange de lipides *in vivo*, ils ont montré que des protéines, peut-être des lipoprotéines extracellulaires, favorisaient cet échange qui n'avait jamais été décrit auparavant. Ceci avait du sens, car Wilgram & Kennedy avaient montré que les microsomes contenaient des enzymes nécessaires à la synthèse des lipides de la mitochondrie.

Depuis, l'étude des transporteurs de lipides s'est fortement développée notamment grâce à de nouvelles techniques de préparation du matériel biologique et de quantification de l'activité de transfert de lipides entre membranes.

D'abord, plutôt que d'utiliser des membranes extraites d'organismes vivants, on utilise des membranes artificielles. Bangham *et al.* montrent en 1965 que de telles membranes, en forme de vésicules, peuvent être aisément préparées à partir de lipides purs et que ces membranes partagent les propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires : ce sont des bicouches qui séparent deux compartiments aqueux et elles sont relativement imperméables aux flux ioniques²³⁰. Leur forme et leur perméabilité dépendent de la composition lipidique et des concentrations ioniques à l'intérieur et à l'extérieur de ces vésicules. Ces vésicules ou liposomes sont donc devenus des outils idéaux pour étudier le transport de lipides entre membranes avec un minimum de contraintes puisqu'on peut contrôler leur composition en lipides.

Différentes techniques de préparation sont possibles afin d'aboutir à différents types de liposomes. Classiquement, la suspension des lipides dans un tampon engendre spontanément la formation de vésicules multilamellaires (*multilamellar vesicles* ou MLVs). Pour former des vésicules unilamellaires, il faut rompre les membranes des MLVs en leur apportant de l'énergie et les laisser se reformer après un temps de relaxation. Pour cela, une méthode introduite en 1962 consiste à appliquer des ultrasons à une suspension de liposomes²³¹. En fonction de la fréquence, l'intensité et le temps d'exposition aux ultrasons, on obtient une suspension de petits liposomes unilamellaires d'une taille assez homogène (~50 nm de diamètre), ce sont des SUVs (*small unilamellar vesicles*). Ensuite, si l'on souhaite préparer des liposomes unilamellaires larges ou LUV (*large unilamellar vesicles*, ≥ 100 nm de diamètre), il est possible de faire fusionner des SUVs contenant des phospholipides anioniques par un traitement avec du calcium suivi d'un traitement à l'EDTA. Il existe, bien d'autres méthodes de préparation des MLVs, LUVs et SUVs. Chacune de ces méthodes a ses avantages et ses inconvénients qui ont été bien résumés par Szoka & Papahadjopoulos en 1980²³².

Parallèlement, en plus des méthodes de préparation des membranes, les méthodes de détection des lipides ont aussi connu un essor dans les années 1970, notamment grâce à différentes approches de spectroscopie qui ont conduit à des progrès importants pour la compréhension du transfert de lipides entre membranes. Une revue méthodologique

parue en 1984 décrit les différentes protéines qui ont été purifiées depuis la découverte de Wirtz et Zilversmit et cette revue présente les différentes méthodes de quantification des lipides qui ont été mises au point à l'époque²³³.

En plus du radio-marquage, les lipides peuvent être suivis en spectroscopie par résonance paramagnétique électronique (ESR). Cette technique consiste à fixer sur la chaîne carbonée des lipides un groupement nitroxy radicalaire. Les espèces radicalaires portent un électron libre, elles sont paramagnétiques, c'est-à-dire qu'elles peuvent absorber et réémettre l'énergie électromagnétique lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique. Cette méthode a été employée en 1974 pour évaluer le transfert spontané de PC entre les membranes sans avoir besoin d'extraire les lipides pour effectuer une analyse²³⁴. En effet, lorsque les molécules de PC marquées sont transférées dans une membrane non marquée, on observe sur le spectre ESR, une disparition de l'élargissement de raies attribuables aux échanges spin-spin entre les radicaux. En 1978, la même technique sert à évaluer l'effet des lipides anioniques tel que la PS sur la cinétique de transport de la PC par une protéine de foie de bœuf²³⁵. Remarquablement, cette étude montre que les lipides anioniques ont un effet inhibiteur sur la vitesse de transfert de PC. L'effet étant réversible par l'ajout de cations divalents, les auteurs ont émis l'hypothèse que la protéine de transfert de PC devait rester liée aux charges négatives portées par la PS et que cette liaison était interrompue du fait de la neutralisation des charges négatives par les cations.

Bien qu'elles permettent de mesurer le transport de lipides en temps réel, les analyses ESR sont assez complexes à réaliser, c'est pourquoi la spectroscopie de fluorescence s'est montrée être une alternative plus pratique. Somerhaju, Brockerhoff et Wirtz introduisent en 1981 l'utilisation de la fluorescence adaptée à l'étude du transfert de lipides²³⁶. Par une succession de réactions chimiques, ils remplacent la chaîne en *sn2* de la PC par un acide parinarique qui est naturellement fluorescent²³⁷. Ensuite, ils préparent des liposomes donneurs constitués uniquement de Parinaroyl-PC et des liposomes accepteurs constitués de PC. La fluorescence est éteinte par un processus de *quenching* dans les membranes constituées uniquement de Parinaroyl-PC. Par contre, le signal fluorescent apparaît lorsque le Parinaroyl-PC est dilué avec de la PC après transfert. Cette étude révèle que les charges négatives peuvent avoir un effet stimulateur ou inhibiteur sur la cinétique de transfert de PC. Les charges n'affectent pas toutes les LTPs

de la même manière et l'effet des charges dépend du ratio entre la quantité de liposomes donneurs et accepteurs. Par la suite, d'autres lipides fluorescents offrant une meilleure précision sont développés. Par exemple, des dérivés pyrènes des acides gras ont été synthétisés pour étudier le transfert spontané de la PC entre les membranes. L'avantage des dérivés pyrènes est leur spectre d'émission qui dépend de leur concentration dans la membrane²³⁸. Lorsqu'un dérivé pyrène est à faible concentration dans la membrane, on peut mesurer sa fluorescence maximale à une longueur d'onde inférieure à 400 nm. À l'inverse, lorsque sa concentration est élevée, les monomères pyrénoides qui sont excités s'associent à des monomères qui se trouvent dans leur état fondamental pour former des dimères appelés excimères, il en résulte une émission lumineuse d'une longueur d'onde plus grande, autrement appelée décalage vers le rouge (*red shift*). Puisque la formation des excimères correspond à une interaction bimoléculaire, l'intensité lumineuse est directement proportionnelle au ratio excimères / monomères ce qui permet de déduire la concentration relative en lipides et de déterminer leur vitesse de transfert plus précisément et avec une meilleure reproductibilité.

L'autre avantage des lipides fluorescents est que l'on peut suivre leur distribution *in vivo* par microscopie et corrélérer ces données avec les résultats de biochimie *in vitro*²³⁹. La fluorescence de ces lipides peut être portée soit par la tête polaire (*e.g.* N-rhodamine-PE), soit par une des chaînes aliphatiques (*e.g.* C6-NBD-PE), la rhodamine et le NBD étant des molécules polycycliques fluorescentes. Ces deux catégories de lipides fluorescents permettent d'étudier l'effet de deux paramètres sur le transport de lipides : la nature de la tête polaire ou bien la nature des chaînes aliphatiques. Un autre avantage vient du fait que le NBD et la rhodamine forment un excellent couple donneur-accepteur pour le transfert d'énergie par résonance (FRET), ce qui laisse entrevoir des expériences de mesure directe de l'interaction entre des lipides marqués à la rhodamine et ceux marqués au NBD. Cependant, ces lipides fluorescents ont un inconvénient : ce ne sont pas des molécules biologiques, les fluorochromes modifient sensiblement leurs structures et une protéine peut être moins spécifique pour ces lipides que pour leur analogue naturel. C'est pourquoi l'utilisation des lipides fluorescents est complémentaire des autres méthodes, comme l'ESR, la radioactivité ou même la résonance magnétique nucléaire (RMN) que je ne détaille pas ici.

Toutes ces techniques ont permis d'isoler et de caractériser l'activité de nombreuses LTPs. Ces LTPs ont été décrites aussi bien chez les animaux, les mycètes et les plantes. Dans une revue, Wirtz détaille en 1991 l'état des connaissances sur ces protéines²⁴⁰. Il conclut que les preuves définitives du transfert de lipides *in vivo* sont encore insuffisantes, néanmoins, il suggère avec raison que les LTPs sont impliquées dans la translocation rapide de lipides entre les membranes cellulaires.

À ce moment, on peut classer les LTPs selon trois catégories : les PC-TP qui sont spécifiques du transfert de PC, les PI-TP qui sont spécifiques du PI et dans une moindre mesure de la PC ou du PG et les nsLTPs (*non specific LTPs*) qui transportent la plupart des phospholipides, mais aussi les glycolipides et les stérols. Cette classification est étonnante, car elle ne résout pas le problème de la distribution précise et non aléatoire des lipides autre que la PC ou le PI dans les différents organites à moins qu'il y ait des mécanismes qui permettent d'augmenter la spécificité des nsLTP. Malheureusement, il est difficile d'en savoir plus sur la nature des LTP sans les outils modernes de génie génétique.

Jusqu'à-là, les LTPs sont caractérisées seulement d'après leur poids moléculaire apparent, leur point isoélectrique, leur activité et parfois par une partie de leur séquence peptidique. La première description génétique fonctionnelle d'une LTP vient de Bankaitis et ses collaborateurs lorsqu'ils identifient le gène à l'origine de l'activité PI-TP dans la levure²⁴¹. Cette activité initialement attribuée à une protéine de 35 kDa nommée PIT1, correspond au produit du gène SEC14 dont la mutation était connue pour provoquer un défaut dans le trafic vésiculaire et la voie de sécrétion de la levure. En utilisant des mutants thermosensibles de Sec14p, les chercheurs ont montré que cette protéine porte spécifiquement l'activité PI-TP détectée dans le cytosol de levure. Un an auparavant, l'ADNc d'une PI-TP de rat avait bien été isolé et séquencée par la méthode de Sanger, mais l'identification du gène avait été fondée sur la liaison d'un anticorps monoclonal dirigé contre la PI-TP et non sur l'activité de celle-ci²⁴².

Par ailleurs, on n'avait qu'un aperçu partiel de la structure des LTPs avec leurs ligands. Grâce aux analyses par ESR on savait pour les PC-TP bovines que la chaîne aliphatique *sn2* de la PC est enfouie dans une cavité hydrophobe inaccessible au solvant^{235,243}. De plus, des travaux basés sur des mesures de fluorescence polarisée, en statique et en temps résolu sur sa durée de vie, révélaient que les deux chaînes aliphatiques de la PC sont immobilisées dans la PC-TP bovine²⁴⁴. En obtenant les temps

de corrélation rotationnelle du parinaroyole positionné soit en *sn1*, soit en *sn2*, soit aux deux positions, les auteurs montrent que les chaînes *sn1*, et *sn2* sont fixées dans deux sites distincts de la protéine. Ces analyses indiquent que la PC-TP a une forme ellipsoïde allongée, que la chaîne *sn1* est parallèle à l'axe de symétrie de la protéine et que la chaîne *sn2* est plus ou moins perpendiculaire à cet axe. Par ailleurs, grâce à d'autres résultats, on savait que la protéine préfère accommoder une chaîne saturée en position *sn1* et une chaîne insaturée en position *sn2* indiquant que les sites de liaison étaient bien adaptés aux espèces naturelles et majoritaires de PC²⁴⁵. D'autres études avaient fourni des résultats similaires concernant les PI-TP²⁴⁶. Prises ensemble, ces études permettaient de dire que les LTPs peuvent discriminer les différentes espèces de lipide, que ce soit pour leur tête polaire ou la nature de leurs chaînes carbonées.

Avec l'essor du séquençage à haut débit, de la lipidomique, de la biologie synthétique, de la biochimie structurale, de la biologie computationnelle et des bases de données, les trente dernières années ont permis l'acquisition de connaissances importantes sur les LTPs et leur mode d'action. Contrairement à ce que l'on pensait, elles sont bien plus nombreuses que les trois groupes initiaux PC-TP, PI-TP et nsLTPs.

2. Des navettes spécialisées pour transporter les lipides

Les LTPs assurent le déplacement d'un lipide à travers le milieu aqueux entre deux membranes. Pour appréhender comment les LTPs parviennent à abaisser l'énergie d'activation de ce phénomène rare et énergétiquement défavorable, on peut s'intéresser à leur structure. Dans les années 1990, grâce à la cristallographie et dans une moindre mesure la RMN, la structure des LTPs, avec ou sans leur ligand lipidique se précise. Les premières LTPs dont la structure a été résolue sont de petites LTPs végétales non spécifiques d'environ 9kDa^{247,248,249}. Il est à noter que ces LTPs ont une importance particulière en science végétale, leurs gènes sont candidats pour l'amélioration des rendements agricoles, elles servent dans l'industrie agroalimentaire comme émulsifiant et agent moussant, en particulier pour la bière, et elles sont fréquemment responsables d'allergies dans l'espèce humaine²⁵⁰. Plus tard, en 1998, Bankaitis et ses collaborateurs résolvent la structure de la forme vide de Sec14p, sans ligand lipidique²⁵¹. Par la suite, de nombreux travaux ont permis de mieux connaître la structure des différentes LTPs avec ou sans leurs ligands.

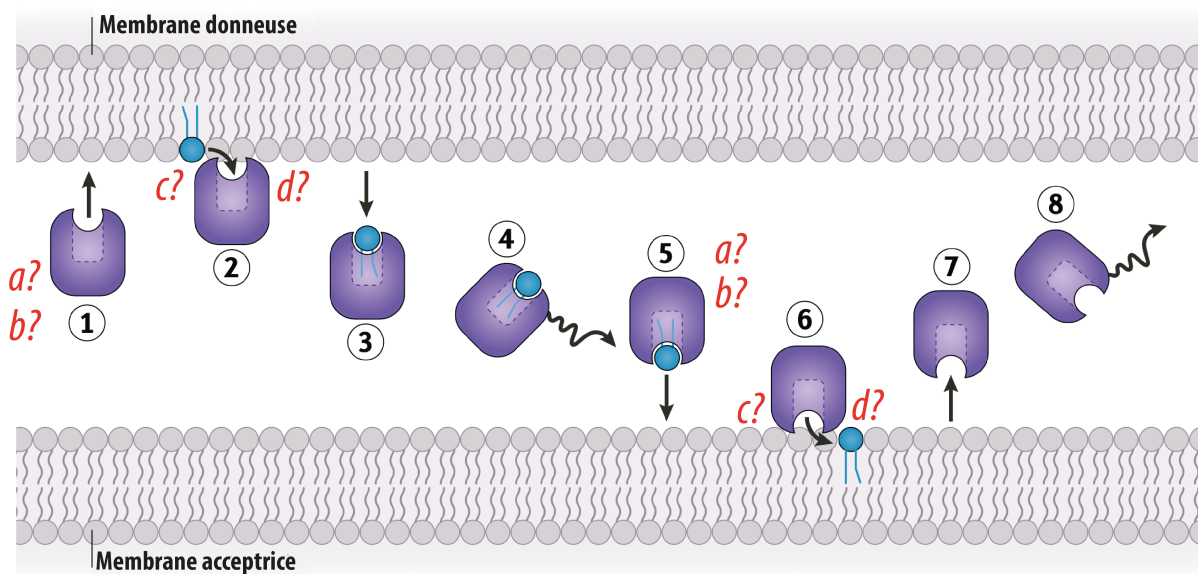
On sait aujourd'hui que les LTPs ont une structure type : une cavité hydrophobe enfouie au sein d'une carapace hydrophile. Cette configuration permettrait de diminuer l'énergie d'activation nécessaire au mouvement de désorption des lipides²⁵². La cavité hydrophobe offre un environnement favorable dans lequel les lipides ont des niveaux d'énergie libre plus bas que s'ils étaient entourés d'eau. Les LTPs favorisent donc la diffusion des lipides à travers le cytosol et les paramètres de cette diffusion dépendent de la nature même des LTPs et de leur modalité de transport. Les LTPs sont très diverses et chacune possède des caractéristiques particulières. Dans une revue récente, Louise Wong et Tim Levine rapportent que les LTPs appartiennent à au moins 27 familles de protéines qui se distinguent par des domaines, des séquences et des structures secondaires et tertiaires différentes²⁵³. Malgré cette diversité, on peut séparer les LTPs en deux grands groupes : les LTPs en forme de « capsule » et les LTPs en forme de « pont ».

3. Le transport de lipides entre membranes : un cycle en plusieurs étapes

La majorité des LTPs ont une forme de capsule et partagent un mode de fonctionnement que l'on peut simplifier en huit étapes (**Fig. 35**).

1) Une LTP soluble, s'attache à la surface d'une membrane. **2)** Un lipide est extrait de la membrane et encapsulé par la protéine. **3)** La protéine liée au ligand se détache de la membrane. **4)** La protéine diffuse dans le milieu aqueux. **5)** La protéine s'attache à une autre membrane. **6)** Le lipide est déchargé depuis la cavité hydrophobe dans la membrane acceptrice. **7)** La protéine se détache de la membrane acceptrice. **8)** La protéine diffuse librement et peut entamer un nouveau cycle

Ce modèle a été proposé dès les années 90 par Wirtz pour expliquer la cinétique de transfert de lipides entre les membranes, *in vitro*²⁵⁴. Mais ce modèle est incomplet, d'une part, il faudrait que l'on considère une LTP parfaitement soluble qui ne possède aucun élément l'empêchant de diffuser librement dans la cellule. Une telle protéine devrait donc avoir tous les moyens de s'affranchir des interactions protéine-protéine, protéine-lipide et protéine-membrane ce qui n'est pas complètement pertinent d'un point de vue biologique. De plus, pour rendre ce modèle plausible, il faut que les lipides soient transportés par les LTPs avec une stœchiométrie d'un lipide pour une protéine ce qui n'est pas forcément le cas avec toutes les LTPs. Enfin, ce modèle ne prend pas en compte d'autres étapes. Par exemple, en décrivant le modèle en 8 étapes, la phase d'attachement à la membrane pourrait être décomposée en deux réactions : la reconnaissance de la membrane cible, et le positionnement de la protéine pour favoriser l'extraction ou la libération d'un lipide. Par ailleurs, les LTPs en forme de capsule sont souvent équipées d'un couvercle qui scelle la cavité hydrophobe, empêchant tout contact du lipide, tête polaire comprise, avec les molécules d'eau. Dans ce cas, aux étapes d'attachement et d'extraction du lipide à proprement parler, nous devrions rajouter des étapes d'ouverture et de fermeture de ce couvercle. Ces étapes sont sans doute cinétiquement déterminantes, car elles nécessitent un changement de conformation de la LTP afin d'exécuter le processus d'extraction.



*a : reconnaissance ? c : ouverture de la protéine ?
 b : positionnement ? d : fermeture de la protéine ?*

Figure 35 | Modèle de transport des LTPs en huit étapes minimales

Les numéros indiquent les différentes étapes nécessaires pour effectuer un cycle de transport d'une membrane donneuse à une membrane acceptrice. Les lettres rouges indiquent les étapes supplémentaires qui pourraient être déterminantes pour l'efficacité de transport. Schéma adapté de Wong, Gatta & Levine (2019)²⁵³

4. *Les Starkins et le modèle STARD*

Parmi les LTPs en forme de « capsule » une classe importante est la superfamille des StARkins. Les protéines de cette superfamille sont constituées d'un domaine avec une structure semblable à la protéine StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*). Le domaine StART à proprement parler définit la famille des StART (StAR-related lipid transfer family) qui comprend 15 protéines chez les mammifères. Parmi elles, on peut citer STARD3 aussi connu sous le nom de MLN64 (Metastatic Lymph Node clone 64) qui est surexprimée dans 20 à 30 % des cancers du sein²⁵⁵ et qui permet le transport de cholestérol entre les endosomes tardifs et le RE²⁵⁶. STARD3, comme au moins 7 membres de la famille STARD, contient non seulement le domaine START mais également d'autres modules (**Fig. 36**). Pour de nombreuses LTPs, les domaines de transfert de lipides sont fréquemment associés à des domaines particuliers ce qui permet d'augmenter le niveau de spécialisation de ces protéines. Ceci explique sans doute pourquoi les approches préliminaires sur les LTPs, qui consistaient à étudier l'effet d'un surnageant cytosolique sur le transfert de lipides, n'étaient pas suffisantes pour caractériser d'autres protéines impliquées dans les processus de transport. Par exemple, StARD3 contient un domaine MENTAL (*MLN64 NH₂-Terminal domain*), transmembranaire, ancré dans la membrane qui délimite les endosomes tardifs²⁵⁷. Comme ce domaine interagit avec le stérol et induit l'homodimérisation de StARD3, en plus de servir de point d'attache pour la protéine, il pourrait agir comme un senseur de stérol ou bien comme un réservoir à stérol qui agit comme un régulateur positif ou négatif de l'activité transfert du domaine StAR²⁵⁸. En outre, pour comprendre le mode de fonctionnement du domaine StAR, il faut s'intéresser à la relation entre la conservation de séquence et la structure du domaine. Contrairement à des protéines extrêmement bien conservées comme les histones (>80% de similarités), les domaines START le sont beaucoup moins. Par exemple, si l'on considère les domaines START de STARD1 et STARD3, ils partagent seulement 38% d'identité et 59% de similarité, bien qu'elles soient les homologues les plus proches dans la famille des START humaines. D'après des analyses de séquences et des prédictions structurales²⁵⁹, il se trouve que le domaine StAR de l'allergène de bouleau Bet v 1 cristallographié en 1996²⁶⁰ est homologue du domaine StAR de StARD3. Alors même que ces protéines n'ont rien à voir en matière de séquence d'acides aminés, l'homologie entre les deux protéines dépend

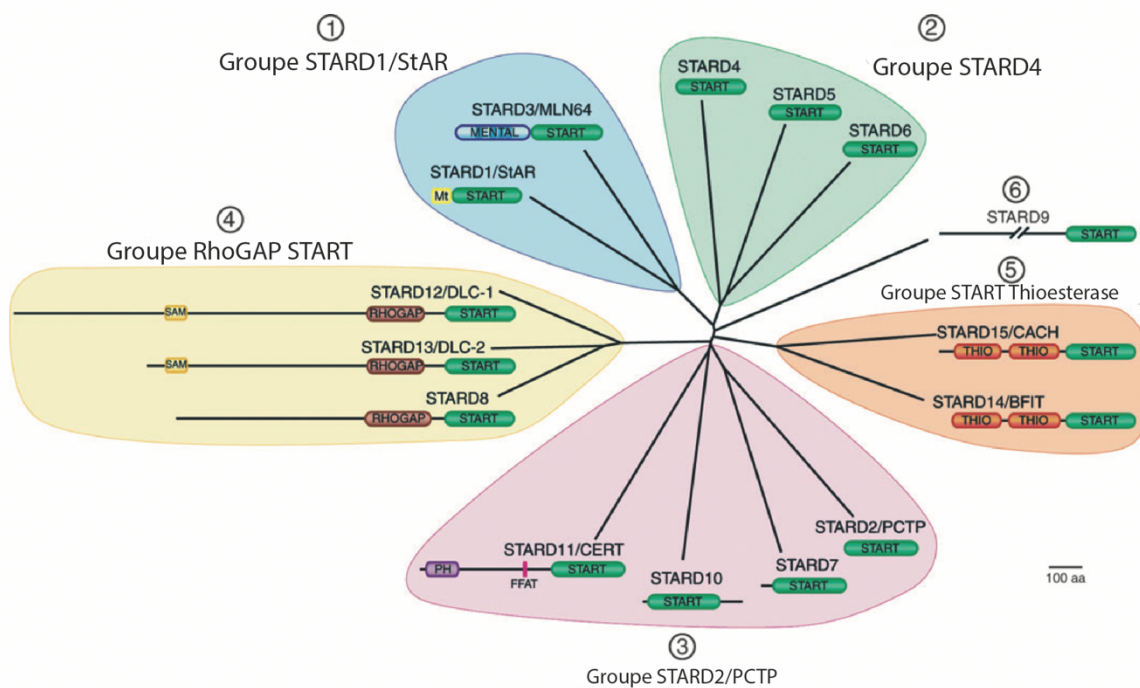


Figure 36 | Le domaine START conservé dans 15 protéines humaines

Le domaine START est un module de transport de lipide qui est conservé dans de nombreux groupes de protéines différentes. Souvent le domaine START est accompagné d'autres domaines. De plus, les domaines START n'ont pas tous les mêmes ligands lipidiques. Adapté de Alpy & Tomasetto, 2005⁴¹⁰.

seulement de quelques résidus très conservés et essentiels au maintien de la structure globale de la protéine²⁶¹. Cette structure particulière est caractérisée par une cavité hydrophobe définie par sept feuillets β incurvés avec une longue hélice α amphipathique C-terminale presque parallèle aux feuillets et une hélice rompue en deux située entre les feuillets $\beta 1$ et $\beta 2$ en position transverse ; le tout ressemble à une main en position de préhension (*helix grip-fold*) (**Fig. 37a**). Une étude récente explore la manière avec laquelle StARD4 interagit avec la membrane et se lie au stérol²⁶². Tout d'abord, à proximité de l'entrée de la cavité hydrophobe de STARD4 qui est close par l'hélice amphipathique, on trouve un élément de surface chargé positivement qui interagit avec les lipides anioniques de la membrane. En effet, lorsqu'on substitue des lysines qui constituent cet élément par des alanines, l'activité de la protéine n'est plus aussi efficace *in vivo* et *in vitro*²⁶³. Cet élément de surface positif favoriserait l'amarrage de l'hélice amphipathique qui effectue une rotation pour présenter sa face hydrophobe à la membrane. Cette rotation induit le relâchement d'une boucle de type Ω située entre les feuillets $\beta 5$ et $\beta 6$ qui ferme la cavité. Comme cette étude est basée sur un mutant en particulier, elle permet seulement de proposer un modèle qui reste à confirmer (**Fig. 37 b,c**) : STARD4 se positionne sur une membrane chargée négativement au moyen de son hélice amphipathique C-ter et des résidus cationiques à proximité. Cela déclenche l'ouverture de la boucle Ω pour permettre l'extraction ou la libération du cholestérol. Néanmoins, malgré cette élégante démonstration, permise notamment par des analyses de RMN, rien n'indique comment la protéine se détache de la membrane.

Finalement, la structure en forme de main qui permet d'agripper les lipides est conservée et il est remarquable d'observer que l'évolution a permis la sélection de ce module à de multiples reprises, diversifiant ainsi les possibilités de transport de divers lipides entre différentes membranes cellulaires. Puisque cette structure existe dans au moins six familles de protéines bien distinctes, Louise Wong et Tim Levine ont donc proposé de regrouper ces protéines dans une superfamille appelée StARkin²⁶⁴.

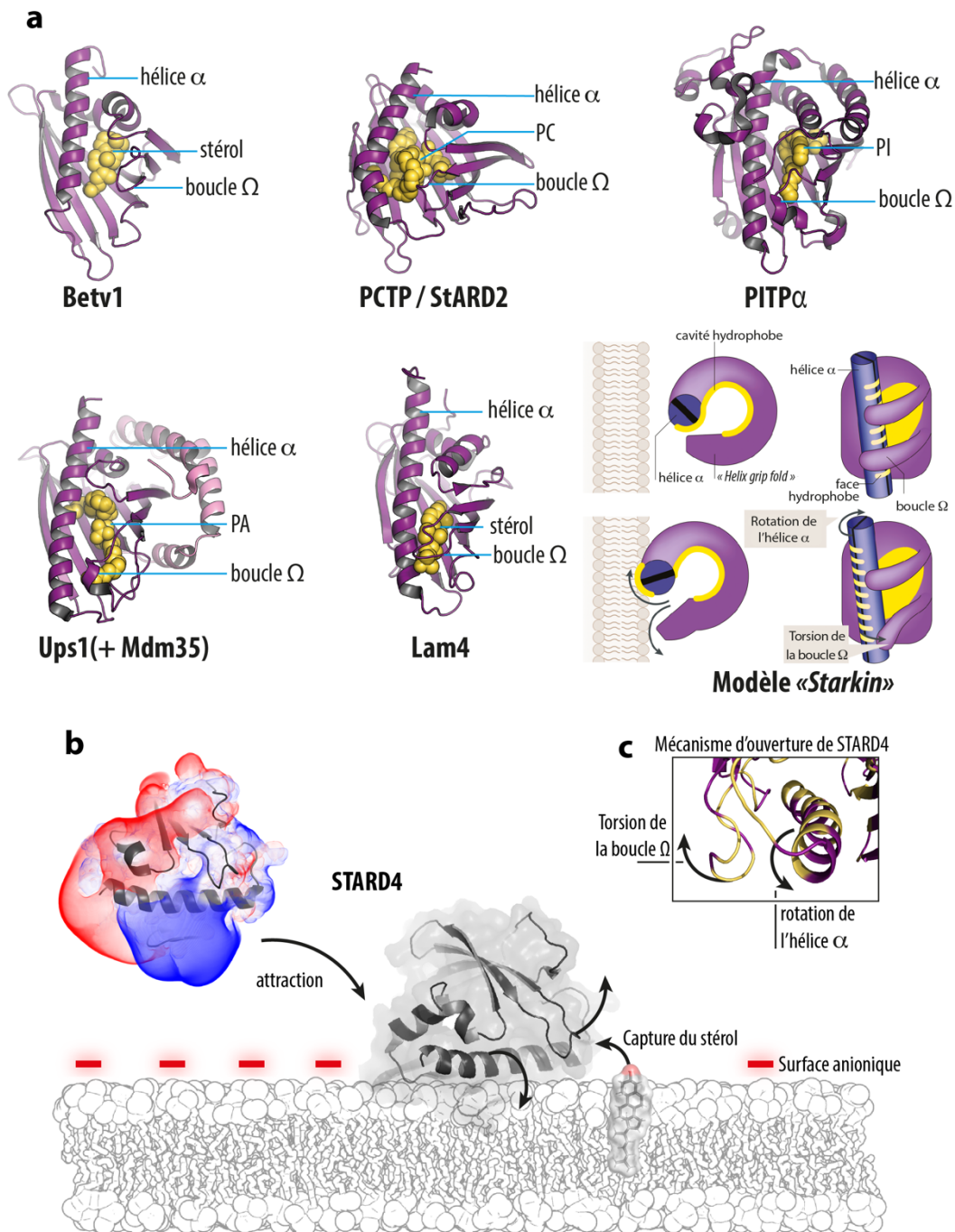


Figure 37 | Ressemblance entre les protéines « Starkins » et fonctionnement de STARD4

a) Comparaison de différentes protéines appelées « Starkin » avec un domaine semblable à la structure de STARD4. Malgré une structure commune ces protéines partagent très peu d'homologie de séquence et elles n'ont pas toutes le même ligand lipidique. Leurs homologies de structure a permis de suggérer un modèle de fonctionnement commun (adapté de Wong, Gatta & Levine, 2019²⁵³). Elles ont une forme de capsule avec une cavité hydrophobe de liaison aux lipides ; une boucle Ω qui se referme sur le lipide ; et une hélice α qui interagit avec cette boucle.

Betv1 (PBD : 1FM4), StARD2 (PBD : 1LN2), PITP α (PDB : 1UW5), Ups1/Mdm35 (PDB : 4XIZ), Lam4 (PDB : 6BYM).

b) Des expériences ont suggéré un modèle qui explique comment STARD4 (PDB : 1JSS) interagit avec une membrane pour extraire un stérol²⁶². Une large région cationique (en bleu) est attirée par les charges négatives en surface de la membrane, ce qui permet à la protéine de s'y attacher. Ensuite, un réarrangement conformationnel de l'hélice α et de la boucle Ω permet l'ouverture de la protéine et la capture du stérol **c)** L'hélice α de STARD4 est amphipathique, les résidus hydrophobe (jaune), sont en regard de la cavité. Lorsque la protéine se lie à une membrane, l'hélice effectue une rotation pour s'ancrer dans la membrane, ce qui libère la boucle Ω .

5. Les PITP : des Starkins bispécifiques

Une des six familles appartenant aux Starkins correspond aux PITPs. Comme mentionné précédemment la découverte de ces protéines est attribuable à Wirtz, Helmkamp et leurs collaborateurs²⁶⁵. Elles ont été caractérisées comme étant des LTPs bispécifiques de PI et de PC d'un poids moléculaire de 35 kDa. On sait aujourd'hui que les mammifères possèdent cinq PITPs caractérisées par un domaine conservé nommé PITD (*PI-transfer domain*) (**Fig. 38**). Trois sont de petites LTPs solubles limitées presque exclusivement au seul domaine PITD (PITP α , PITP β et RdgB β), tandis que les deux autres sont des LTPs multidomaines associées aux membranes (Nir2 et Nir3 codées respectivement par PITPNM1 et PITPNM2). D'un point de vue phylogénétique, les PITPs sont séparés en deux classes distinctes qui ont divergé très tôt au cours de l'évolution^{266,267}. La classe I comprend PITP α et PITP β tandis que la classe II regroupe Nir2, Nir3 et RdgB β . La protéine Nir1 (PITPNM3) quant à elle est inclassable, elle est semblable à Nir2 et Nir3 mais elle est dépourvue de domaine PITD.

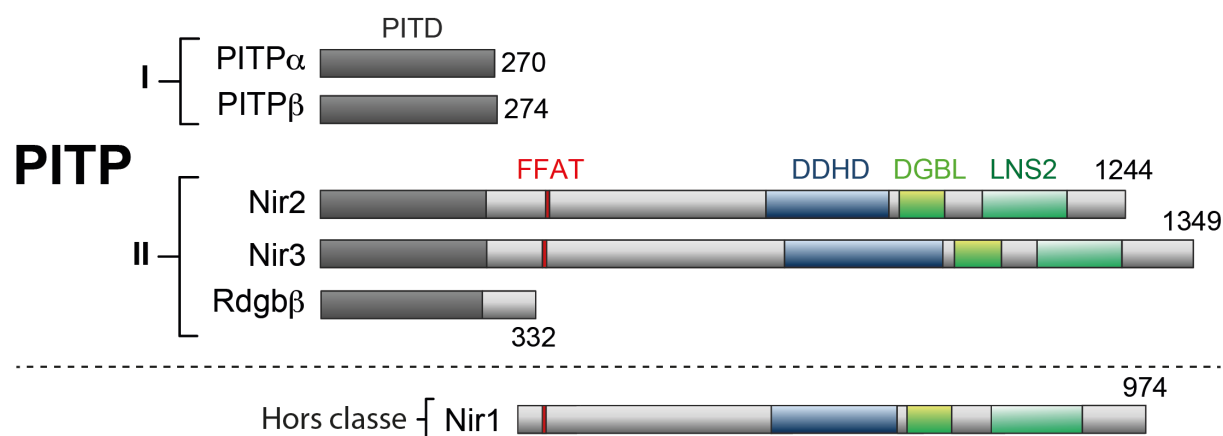


Figure 38 | Classification des PITPs

Les mammifères contiennent cinq PITPs réparties en deux classes, elles ont en commun un domaine de transfert du PI (PITD). Les PITP α et β font partie de la classe I. Elles sont constituées uniquement de leur domaine PITD. Les protéine Nir2, Nir3 et Rdg β font partie de la classe II. Dans cette classe, la particularité de Nir2 et Nir3 réside dans leurs longues séquences qui contiennent un motif FFAT (deux phénylalanines dans un tractus acide), un domaine DDHD (caractérisé par ces quatre résidus), un domaine DGBL semblable un domaine de liaison au DAG (*DAG binding-like*), et un domaine LNS2 (Lipin Ned1 Smp2). Quant à la protéine Nir1, elle est hors classe, car elle n'a pas de domaine PITD malgré sa ressemblance avec Nir2 et Nir3.

a. *Les PITPs de la classe I*

Les activités de transfert de PI et de PC détectées dans le cytosol étaient majoritairement attribuables à la classe I. Les structures cristallines des PITP α/β humaines ou murines ont été résolues dans les années 2000 sous forme vide ou bien liée au PI ou au PC^{268,269,270,271}. Ces analyses indiquent que le PITD est constitué de 8 feuillets β antiparallèles encadrés par des hélices α plus ou moins parallèles aux feuillets. Entre les feuillets $\beta 2$ et $\beta 3$ se trouve une boucle, similaire à la boucle Ω du domaine StART, qui vient obstruer, en partie, la cavité hydrophobe. En plus, une hélice α appelée hélice « G » et une dizaine d'acides aminés complètent la fermeture de la cavité ce qui permet de bien isoler le phospholipide à l'intérieur. Lorsque la protéine encapsule le ligand, la tête polaire du PI ou de la PC est complètement enfouie dans la cavité, les chaînes carbonées sont relativement bien parallèles et elles font face au feuillet β . Le noyau inositol du PI interagit par des liaisons hydrogène avec quatre résidus clés qui sont extrêmement bien conservés, même dans les PITP de la classe II. Par ailleurs, le groupement phosphate est coordonné par un pont salin et une liaison hydrogène permis respectivement par une lysine et une thréonine. Pour le PI comme pour la PC, les mêmes acides aminés interviennent dans cette coordination du phosphate. En revanche, la manière avec laquelle la protéine interagit spécifiquement avec la choline de la PC n'est pas claire, celle-ci ne forme aucune liaison inférieure à 4 Å avec la protéine et elle est entourée de molécules d'eau qui ont pénétré la cavité (**Fig. 39a**). Cette différence de liaison entre la PC et le PI explique pourquoi la protéine a 16 fois plus d'affinité pour le PI que pour la PC^{272,273}.

À propos du mécanisme d'ouverture de la protéine, nécessaire à l'extraction et au relargage d'un phospholipide, l'analyse du cristal de la PITP α sans ligand suggère que la boucle $\beta 2$ - $\beta 3$ effectue un mouvement de torsion libérant l'entrée de la cavité et que l'hélice « G » en position C-terminale se déplie partiellement²⁶⁹. Des expériences supplémentaires sur la forme ouverte de la protéine ont été menées, consistant à bloquer la protéine dans cet état *in vivo* et *in vitro*. Ce blocage est permis en modifiant chimiquement une cystéine localisée dans la cavité de PITP α avec un composé, le N-éthyle-maleimide. Lorsque la protéine est dans sa forme ouverte, la cystéine est accessible et le maleimide peut se lier à son groupement thiol (**Fig. 39b**).

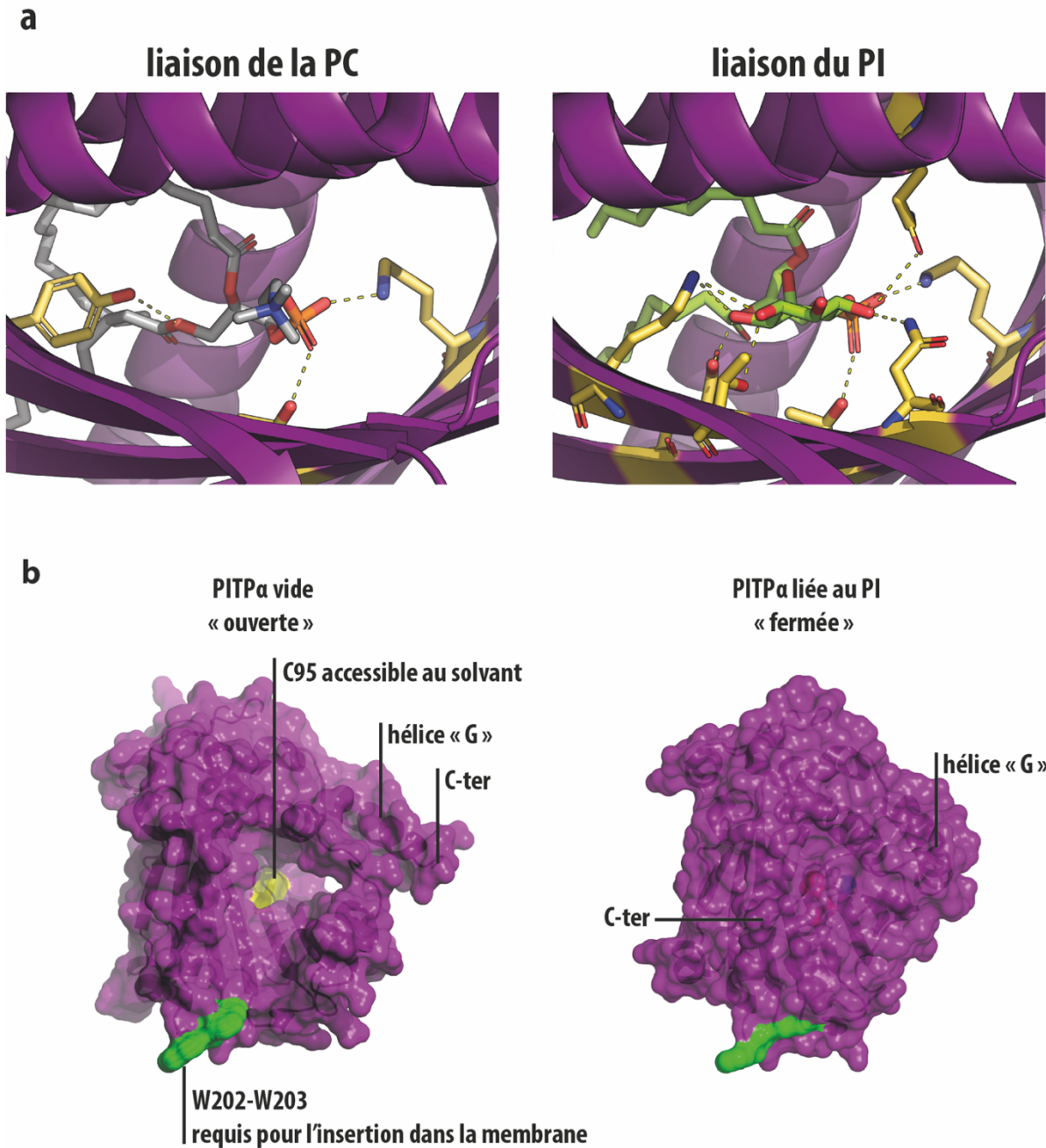


Figure 39 | Modalités de capture de la PC et du PI dans la protéine PITPa

a) Représentation du site de liaison à la tête polaire de la PC ou du PI dans la cavité de PITPa (structure en ruban). Le phosphate de la PC est coordonné par trois résidus, (représentés en bâtons colorés en jaune), tandis que le groupement choline n'entre pas en interaction avec la protéine. Le groupement choline est stabilisé par des molécules d'eau (non représentées). Le phosphate et le noyaux inositol du PI sont coordonnés par sept résidus, ce qui explique sa plus forte affinité pour le PI que pour la PC, mesurée *in vitro*. **b)** Comparaison de la structure de PITPa vide et avec ligand. Sous sa forme vide une hélice « G » est dépliée et la cavité est accessible au solvant et notamment une cystéine qui s'y trouve, peut être conjuguée avec un fluorophore. Sous sa forme liée au PI (similaire avec la PC), le lipide est complètement isolé du solvant. L'hélice « G » et la portion C-ter masquent la cavité de liaison. En vert sont représentés deux tryptophanes requis pour l'insertion dans la membrane. PITPa vide (accès PDB : 1KCM) ; PITPa liée au PI (accès PDB : 1UW5)

La conjugaison du maleimide à la cystéine rend la protéine non fonctionnelle, incapable de lier la PC ou le PI du fait de l'encombrement stérique induit par le maleimide. Ainsi la protéine devient figée dans un état ouvert.

Grâce à cette méthode, *in vitro*, nous apprenons que la PITP α purifiée s'ouvre de façon dépendante de la concentration en liposomes dans la solution. L'ouverture de la protéine est un état transitoire qui résulte de l'adsorption de la protéine sur la surface des membranes. En effet, sans liposomes, après incubation au maleimide et après dialyse, la protéine demeure active. Par contre, en présence de liposomes, la protéine est irréversiblement inactivée par le maleimide²⁷⁴.

In vivo, le blocage de la protéine en forme ouverte a permis de confirmer un mécanisme d'échange PI/PC entre les membranes cellulaires²⁷⁵. En incubant des cellules COS-7 avec le dérivé maleimide, l'utilisation d'un anticorps fluorescent dirigé contre PITP β indique que la protéine s'accumule sur l'appareil de Golgi et le RE. De plus, ce traitement inhibe complètement les PITP α et PITP β et aucune activité de transfert de PI ou de PC n'est détectée entre des membranes microsomales et des liposomes.

De plus, les PITP α et β contiennent deux tryptophanes situés à proximité de l'ouverture de la cavité hydrophobe, en regard de la boucle $\beta 2$ - $\beta 3$; lorsque ces deux tryptophanes sont remplacés par des alanines, cette mutation provoque l'inhibition du transfert de PI. Également, de façon surprenante, l'absence des deux tryptophanes inhibe aussi la rétention des PITP α/β aux membranes cellulaires après traitement au maleimide. En d'autres termes, les auteurs ont découvert que ces deux tryptophanes permettraient aux PITPs de se lier à la membrane et d'induire l'ouverture de la protéine afin de permettre le relargage et la capture des lipides.

Cette étude basée sur l'utilisation du maleimide comme inhibiteur de la fermeture des PITP est donc remarquable, car elle offre un aperçu mécanistique nouveau pour la compréhension du transport de lipides, elle permet de proposer un modèle d'échange PI/PC à la surface d'une membrane (**Fig. 40**). En plus, cette étude indique que les PITP de classe I, fonctionnent entre le Golgi et le RE. Enfin, cette dernière étude permet de renforcer l'hypothèse basée sur les anciennes analyses cinétiques²⁷² ; ces PITP bispécifiques sont effectivement des protéines qui échangent le PI et PC lorsqu'elle se lie aux membranes, puisque la protéine vide de tout lipide est un état transitoire rare dans la cellule.

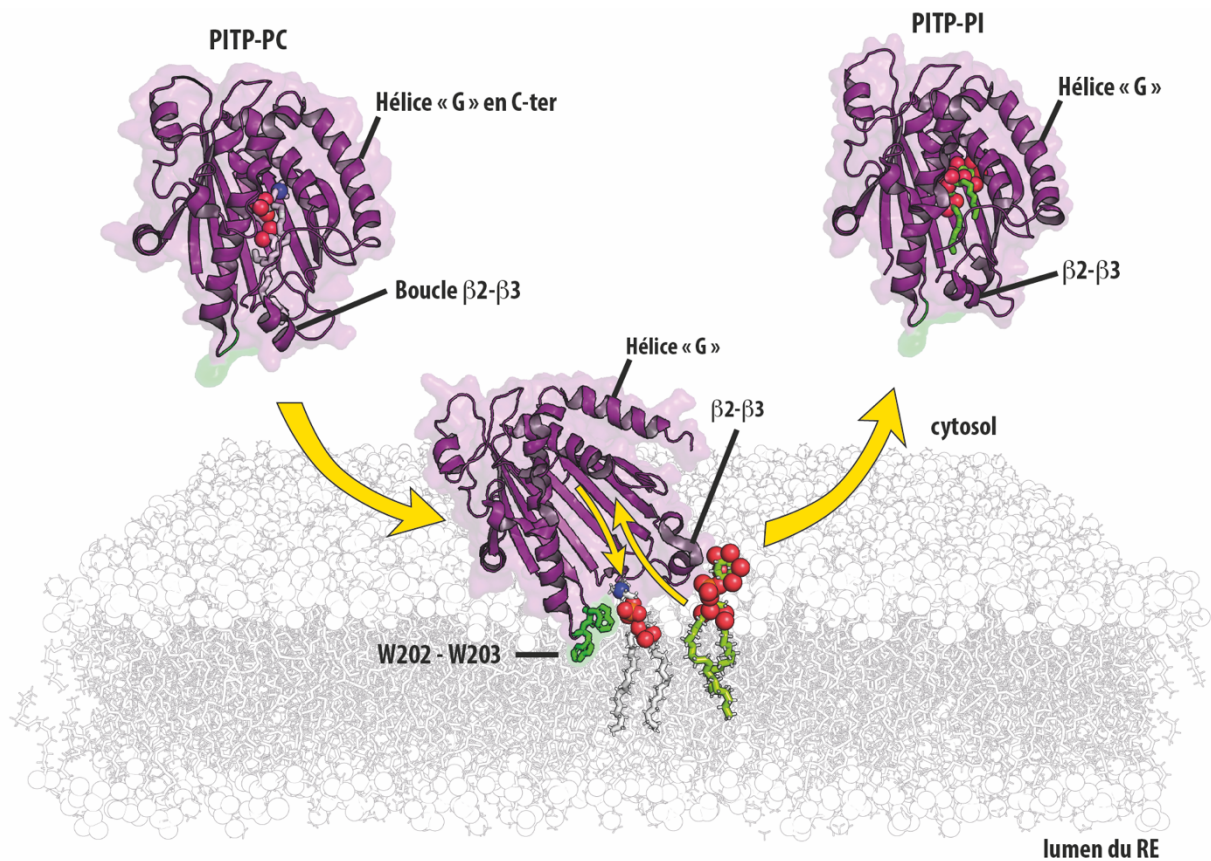


Figure 40 | Modèle d'interaction de la PITPα avec la membrane lors de l'échange de lipides

La protéine s'attache à la membrane grâce à deux tryptophanes ce qui favorise la rotation d'une boucle β2-β3 et la libération de l'hélice « G ». Dans sa position ouverte, la protéine libère la PC en échange de PI. La protéine avec son second ligand lipidique se détache, selon un mécanisme peu clair et la protéine redevient soluble. Sur cette représentation, l'échange de PC pour du PI a lieu sur le RE, mais le mécanisme inverse serait valable en surface du Golgi où le PI est échangé contre de la PC.

PITPα vide (PDB : 1KCM) ; PITPα liée au PI (PDB : 1UW5) ; PITPα liée à la PC (PDB : 2A1L).

b. *Les PITPs de la classe II*

Les PITPs de la classe II sont des LTPs avec une spécificité lipidique différente de celle de la classe I. La découverte de leur fonction est le résultat des recherches autour d'un ancien problème qui se posait pour expliquer la spatialisation cellulaire du cycle métabolique des phosphoinositides²⁷⁶ (**Fig. 41**). Le PI est produit par les PI-synthases localisées dans le RE²⁰⁴. De même, le précurseur du PI qu'est le CDP-DAG est synthétisé par CDS1/2 dans le RE^{189,277}. En parallèle, le PA, bien que rare dans la cellule, car il est très réactif, est régulièrement produit par les DAG-kinases dont il existe de nombreuses isoformes dans les différentes membranes cellulaires²⁷⁸. Le DAG est le produit de la synthèse *de novo* des lipides, mais également de l'hydrolyse du PI(4,5)P₂ par les phospholipase C dans la membrane plasmique. Les cellules possèdent de nombreux types de phospholipase C (PLC) et elles sont régulièrement activées par des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) comme les récepteurs de type EGFR. L'activation de ces récepteurs a pour conséquence l'induction de différentes cascades de signalisation. Les PLC régulent la disponibilité en PI(4,5)P₂. Ce phosphoinositide assure le recrutement de nombreuses protéines membranaires périphériques régulatrices. De plus, le PI(4,5)P₂ est le substrat des PI 3-kinases pour la synthèse de PI(3,4,5)P₂ qui sert d'activateur allostérique de certaines protéines de signalisation telle qu'Akt²⁷⁹. Enfin, le clivage du PI(4,5)P₂ par les PLC génère la production d'IP₃ (inositol 3-phosphate), un composé soluble dont la concentration cytosolique est détectée par les récepteurs IP₃, des canaux calciques qui favorisent la libération dans le cytosol du calcium contenu dans le RE. Le niveau de calcium cytosolique est lui-même un signal important pour le déclenchement de nombreux processus cellulaires. Ainsi le PI(4,5)P₂ est un lipide pivot pour la cellule, il est produit majoritairement dans la membrane plasmique, de manière ATP dépendante, à partir de PI(4)P par les PI(4)P 5-Kinases (PIP5K). Le PI(4)P de la membrane plasmique est quant à lui synthétisé par les PI 4-kinases (PI4K) à partir de PI, également de façon ATP dépendante. Puisque les PLC sont génératrices de DAG et par voie de conséquence de PA dans la membrane plasmique et que le PI est synthétisé dans le RE, la cellule doit avoir un moyen efficace de renouveler le PI(4,5)P₂ et donc de convoier le PA dans le RE pour alimenter la PI-synthase. Inversement, le PI doit être transporté dans la membrane plasmique afin d'alimenter les PI4K et PIP5K pour maintenir la réserve de PI(4,5)P₂ nécessaire aux fonctions cellulaires.

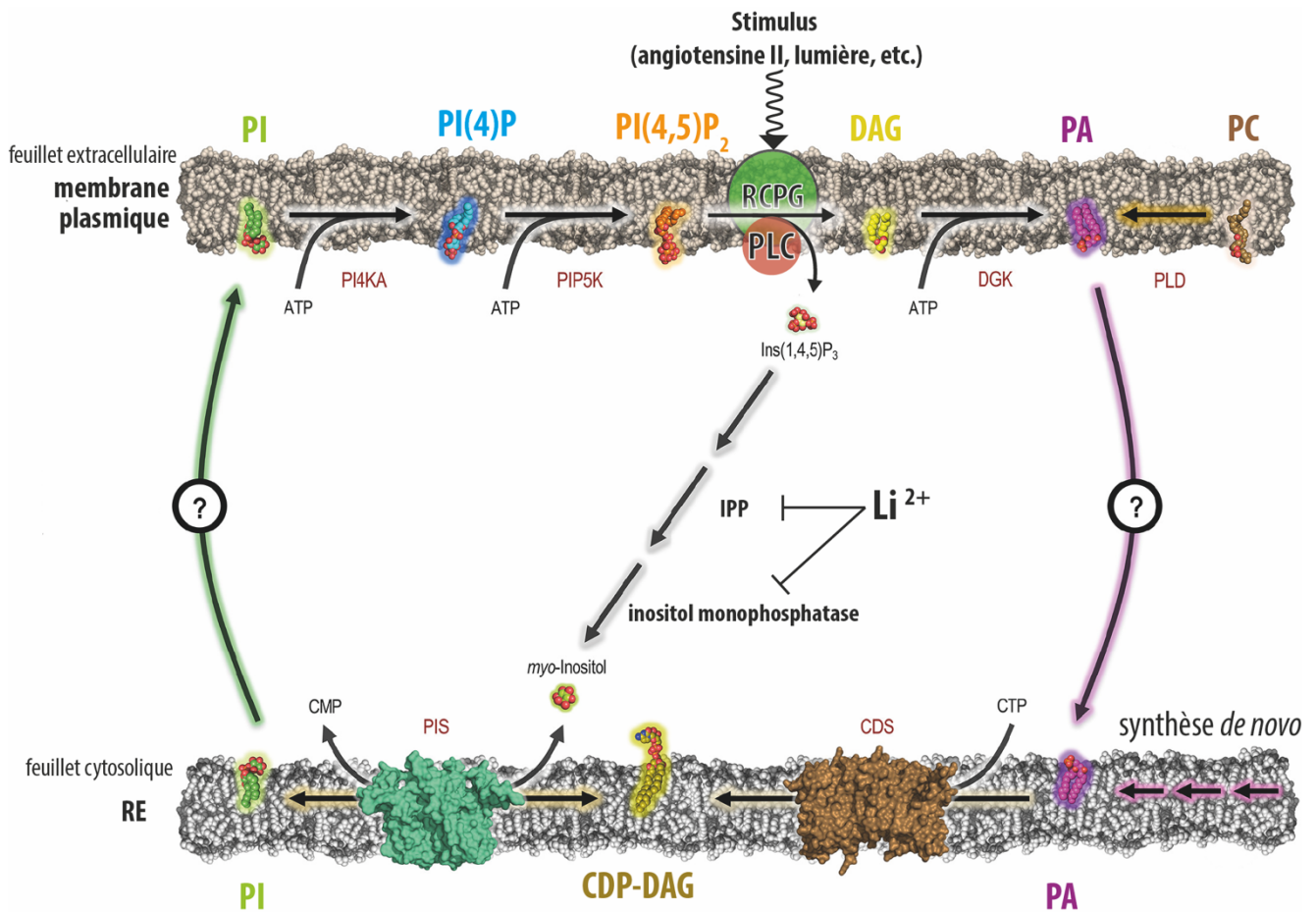


Figure 41 | Le cycle des phosphoinositides : séparation entre le RE et la membrane plasmique

Dans le RE, le PA est un précurseur des autres phospholipides, il est activé par une molécule de CTP par la CDP-DAG synthase, ce qui produit du CDP-DAG. Le CDP-DAG est substrat de la PI synthase (PIS) qui échange le CMP contre un *myo*-inositol ce qui aboutit à la formation de PI. Dans la membrane plasmique, le PI est requis pour la production de PI(4)P et par suite pour la production de PI(4,5)P₂. Lorsque qu'un stimulus tel que l'angiotensine II active les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), une phospholipase C est recrutée et activée. La phospholipase C hydrolyse le groupement Ins(1,4,5)P₃ ce qui génère du DAG. Le DAG est ensuite phosphorylé en PA. Ainsi, le PA devrait s'accumuler dans la membrane plasmique au détriment de la réserve de PI du fait de l'activation des RCPG. L'Ins(1,4,5)P₃ est soluble, il est hydrolysé par des inositol polyphosphate phosphatases (IPP) et une inositol monophosphatase régénère le *myo*-inositol nécessaire à la production de PI. La régénération du *myo*-inositol peut être inhibé avec du lithium (Li²⁺). Un modèle similaire à celui-ci fut proposé par Michell dès 1975²⁷⁶. La spatialisation particulière des étapes de ce cycle soulève deux questions : comment le PI franchit le cytosol pour alimenter la production des PIPs nécessaires à l'activité des PLC et comment se fait-il que le PA ne s'accumule pas dans la membrane plasmique d'autant plus qu'il est nécessaire pour la régénération de PI. Il devrait donc y avoir des protéines de transport de PI et PA à l'interface entre ces deux membranes pour maintenir le recyclage des PIPs nécessaires à la transduction intracellulaire des signaux extracellulaires.

Adapté de Pemberton, Kim & Balla (2020)⁴¹¹.

En 1993, une étude du groupe de Cockcroft a permis de commencer à répondre au problème de l'approvisionnement en PI(4,5)P₂ nécessaire à l'activité des PLC²⁸⁰. En essayant de reconstituer *in vitro* l'activité phospholipase d'une isoforme de PLC β, le groupe a mis en évidence qu'un facteur cytosolique, une PI-TP de 35 kDa, probablement la PITPα, permettait d'induire cette activité. Ce résultat a donc permis de renforcer l'idée selon laquelle il existe une LTPs nécessaire au fonctionnement du cycle des phosphoinositides entre le RE et la membrane plasmique. Cependant, ce résultat n'est pas satisfaisant pour expliquer comment la cellule maintient le cycle des phosphoinositides entre le RE et la membrane plasmique. La PITPα caractérisée par son activité d'échange PI/PC, ne permet pas le transport de PA pour alimenter la PI-synthase au RE. La même année, une étude montre l'effet d'un traitement au lithium (Li⁺) couplé à la stimulation par l'agoniste d'un RCPG. Le Li⁺ est un inhibiteur de la production d'inositol par l'inositol monophosphatase, et limite la production de PI (**Fig. 41**). Ce double traitement induit une accumulation de CDP-DAG alors que la même stimulation sans Li⁺ n'a pas d'effet²⁸¹.

Ce résultat appuyait donc fortement l'idée que le CDP-DAG, produit par l'activation des PLC à la membrane plasmique, est nécessairement recyclé par la PI-synthase dans le RE. C'est en s'intéressant aux PITP de classe II, moins étudiées que celles de la classe I, que fut compris comment le cycle des phosphoinositides était maintenu efficacement.

Le premier membre de cette classe, DmRdgBα, a été découvert dans les années 1990 chez la drosophile. La mutation de RdgB (*Drosophila retinal degeneration B*) empêche le maintien du cycle visuel et provoque la dégénération des photorécepteurs après exposition à la lumière. En fait, le cycle visuel est consommateur de PI. En effet, la rhodopsine est un RCPG activé par la lumière qui induit la consommation de PI(4,5)P₂ par les phospholipase C. De façon remarquable, la mutation de la DAG-kinase RdgA induit aussi la dégénérescence des photorécepteurs indiquant l'importance du cycle des phosphoinositides pour le maintien du cycle visuel. RdgBα (116 kDa) est une protéine associée aux membranes. Dans les cellules photoréceptrices, elle est localisée dans les citernes subrhabdomériques qui sont des prolongements du RE en contact avec la membrane rhabdomérique des photorécepteurs. La membrane rhabdomérique correspond à la partie de la membrane plasmique qui forme les microvillosités des cellules de la rétine. De plus, RdgBα contient un domaine homologue aux PITPα/β qui est suffisant pour induire le transfert de PI entre des membranes *in vitro*²⁸². Il s'avère que la

substitution du domaine PITP de RdgB α par le domaine PITP α ne permet le maintien ni de la réponse à la lumière ni de l'intégrité des photorécepteurs dans les drosophiles KO pour RdgB²⁸³. Ceci indique que le domaine PITP de RdgB α est unique et il semble que sa fonction ne relève pas simplement de sa capacité à transférer le PI à la membrane plasmique.

Il faut attendre jusqu'en 2012, pour mieux comprendre la fonction des PITP de classe II. Cette fois, l'équipe de Cockcroft s'intéresse à RdgB β dans l'espèce humaine. RdgB β est la forme soluble homologue au domaine PITP de RdgB α . Dans cette étude, les auteurs montrent que cette PITP transporte bien le PI. Par contre, elle transporte très mal la PC *in vitro* voire pas du tout *in vivo*. Ensuite, après incubation de RdgB β fusionnée à une étiquette histidine avec des cellules perméabilisées, puis purification, l'analyse du contenu lipidique de la protéine par chromatographie sur couche mince indique que la protéine est remplie de PI et de PA, mais pas de PC. Ce résultat est confirmé par une analyse en spectrométrie de masse qui révèle aussi que la RdgB β n'a pas la même préférence que la PITP α pour des sous-espèces de PI avec de chaînes aliphatiques différentes. En plus, en activant les phospholipase D, afin de générer beaucoup de PA par clivage de la liaison entre la choline et le phosphate de la PC, les auteurs remarquent une élévation de la quantité de RdgB β liée au PA, ce qui indique que la liaison est sélective pour le PA. Enfin, cette analyse est menée sur les domaines PITP de DmRdgB α et hRdgB α 1 (Nir2/PITCNM1), et révèle que celles-ci se lient également au PA et ne transportent pas la PC. Cette étude est vraiment remarquable, car elle permet d'identifier enfin l'élément manquant du cycle des phosphoinositides. Mais, elle ne permet pas de dire entre quels organites ces protéines fonctionnent, ni d'indiquer si ces transporteurs bispécifiques permettent l'échange PI/PA qui suffirait à lui seul pour relier les réactions de la membrane plasmique et celle du RE pour le cycle du PI.

Si nous reprenons ce qu'on connaissait de Nir2, Nir3 et DmRdgB β : ce sont des protéines multi-domaines associées aux membranes. Pour cela, elles sont munies d'un motif FFAT (Two Phenylalanines (FF) in an Acidic Tract) qui interagit directement avec VAP (*Vesicle associated membrane protein (Vamp) associated protein*), une protéine ancrée dans RE²⁸⁴. En plus, en position N-terminale, elles ont un domaine LNS2 (*Lipin/Ned1/Smp2 domain*). Les Lipines interconvertissent le PA et le DAG. Il ne serait donc pas étonnant que le domaine LNS2 permette aux PITP de reconnaître le PA. Le

groupe de Sima Lev a confirmé cette hypothèse²⁸⁵. L'accumulation de PA dans la membrane plasmique après stimulation avec des facteurs de croissance induit la translocation de Nir2 depuis le Golgi vers la membrane plasmique grâce à son domaine LNS2 dépourvu d'activité PA-phosphatase. Ce recrutement est essentiel pour la régulation positive de deux voies de signalisations, MAPK et PI3K/Akt, qui sont dépendantes de la disponibilité en PI(4,5)P₂ à la membrane plasmique. De plus, l'expression d'un mutant de Nir2 incapable de transporter le PI ne permet pas de compenser l'absence de Nir2 endogène et il en est de même lorsque Nir2 est dépourvu de son domaine LNS2. La protéine mutée n'est plus recrutée à la membrane plasmique, que ce soit en traitant les cellules avec des facteurs de croissance ou avec du PA exogène ; Nir2 reste cloîtrée dans l'appareil de Golgi et on observe une réduction drastique du niveau de PI(4,5)P₂ de la membrane plasmique. Ces résultats montrent en parallèle que la liaison au PA via LNS2 et l'activité de transfert de PI sont requises pour maintenir les réserves de PI(4,5)P₂. La même année, une étude montre un résultat similaire concernant cette fonctionnalité de Nir2 en précisant que l'établissement de sites de contact entre le RE et la membrane plasmique améliore la translocation de Nir2 dans ces sites de contact²⁸⁶.

Nir2 est donc une protéine qui attache le RE ; par l'interaction de son motif FFAT avec VAP ; à la membrane plasmique au moyen de son domaine LNS2.

Enfin, en 2015, Tamas Balla et son équipe viennent à résoudre presque complètement l'énigme du recyclage du PI(4,5)P₂ à l'interface RE/membrane plasmique. Ils montrent que la déplétion de Nir2 affecte les quantités de chaque intermédiaire lipidique dans le cycle des phosphoinositides : la synthèse de PI, de PI(4)P et de PI(4,5)P₂ est ralentie, tandis que lorsque les cellules sont traitées à l'angiotensine II, un autre activateur de RCPG couplé aux PLC, le PA s'accumule au détriment du PI. Ce résultat est confirmé par des mesures *in vivo* de la cinétique d'accumulation du DAG et du PA dans la membrane plasmique après induction à l'angiotensine II. Pour cela, les auteurs ont mesuré le transfert d'énergie par résonance entre un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur porté chacun par un senseur reconnaissant le même lipide. Lorsque la densité de ce lipide augmente dans la membrane, la distance moyenne entre ces lipides diminue et les deux senseurs deviennent suffisamment proches pour permettre l'émission d'un signal fluorescent après excitation du fluorophore donneur d'énergie. Pour quantifier le DAG, le senseur exprimé dans la cellule correspond au

domaine C1ab de la protéine kinase D (PKD1), tandis que pour le PA, il correspond à une courte séquence de Spo20 de levure. Après traitement à l'angiotensine II, cette méthode élégante permet d'observer dès les premières secondes un pic de production de DAG, qui revient ensuite à un niveau basal en une quinzaine de minutes. De plus, il y a une accumulation continue de PA dans ce même intervalle de temps. Lorsque l'expression de Nir2 est inhibée dans la cellule, après le pic induit par l'angiotensine II, la disparition du DAG est moins rapide et, surtout, le PA s'accumule beaucoup plus rapidement. C'est comme si le PA, dans la membrane plasmique, se retrouvait dans une impasse métabolique du fait de la déplétion en protéine Nir2. En ajoutant un inhibiteur de DG-kinase (DGKi) qui permet de ralentir fortement la production de PA, les auteurs confirment que Nir2 favorise la déplétion de PA dans la membrane plasmique et que cela est dépendant du domaine PITP, de la capacité de la protéine à transporter le PI et du motif FFAT. En observant la localisation de Nir2, le traitement à l'angiotensine II confirme que Nir2 s'accumule dans les sites de contact RE/membrane plasmique lorsque le PA devient abondant. De façon plus précise, Nir2 se concentre dans une multitude de points qui tapissent le RE. Nir2 et VAP-B sont bien co-localisées et elles révèlent parfaitement la structure du RE. L'aspect punctiforme de la répartition de Nir2 après traitement dépend de l'interaction entre VAP-B et le motif FFAT sans lequel Nir2 tapissent uniformément la membrane plasmique. La présence de ces points semble corrélée à celle de la CDP-DAG synthase (CDS2), localisé dans le RE. Enfin, les auteurs montrent que le recrutement de Nir2 à la membrane plasmique dépend non seulement du domaine LNS2 qui reconnaît le PA mais aussi d'un domaine de liaison au diacylglycérol (DGBL).

En conclusion, cette étude remarquable montre comment Nir2 intervient dans le recyclage rapide des phosphoinositides en échangeant spécifiquement le PA et le PI entre la membrane plasmique et le RE, après son recrutement à l'interface entre ces deux membranes (**Fig. 42**). Cette étude suggère que pour favoriser un mécanisme efficace d'échange de lipides entre deux membranes particulières, les LTPs contiennent des domaines pour connecter les membranes et les rapprocher de manière très étroite (~10 à 20nm). Comme le recrutement de Nir2 dépend directement de la concentration de PA et de DAG dans la membrane plasmique, on peut dire que c'est une protéine régulatrice qui favorise le maintien de l'intégrité membranaire et de l'homéostasie lipidique. La même année, les groupes de Cockcroft et Raghu montrent que RdgB α chez la drosophile agit de la même manière : c'est un échangeur PI/PA dont l'attachement dans les sites de

contact RE/membrane plasmique est nécessaire pour assurer la régénération du PI(4,5)P₂ après une stimulation par la lumière des opsines couplées aux protéines G, qui active les PLC génératrices de PA. RdgB α est donc cruciale pour le recyclage du PA en PI et maintenir l'intégrité des photorécepteurs²⁸⁷. Concernant Nir3, son activité d'échange PI/PA reste encore flou, par contre, une étude montre qu'elle permettrait de maintenir le niveau basal de PI(4,5)P₂, alors que Nir2 serait dédiée à la régénération du PI(4,5)P₂ lors de la stimulation intense des RCPG qui par voie de conséquence, épuise le PI(4,5)P₂ et génère beaucoup de PA²⁸⁸.

Pour résumer, toutes ces démonstrations montrent que les LTPs de la superfamille des Starkin ont évolué en tirant parti de la capacité d'un domaine similaire à StART à encapsuler les lipides afin de réguler des flux de lipides particuliers entre des organites différents, avec parfois des caractéristiques supplémentaires pour assurer un échange hétérotypique de lipides précis à l'interface entre certaines membranes. Ces machineries nécessaires au maintien de l'homéostasie des membranes ont une grande importance physiologique.²⁸⁹

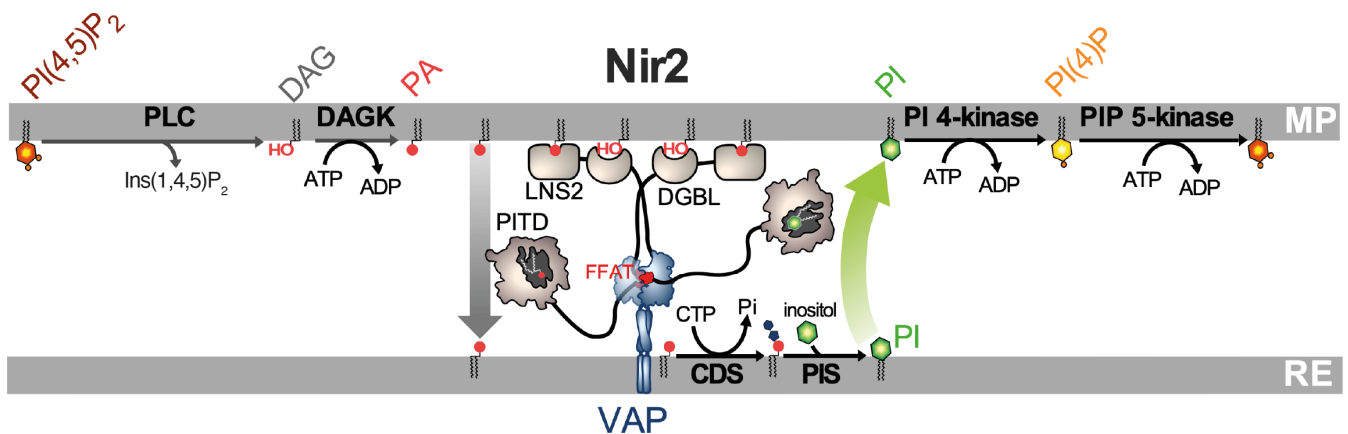


Figure 42 | Modèle d'échange PI / PA de Nir2 à l'interface entre le RE et la membrane plasmique

La protéine Nir2 est une LTP qui complète le cycle des phosphoinositides. Au moyen de son domaine PITD, elle assure le transport de PI requis pour la production de PIP dans la membrane plasmique (MP) ; et le transport dans le RE du PA néoformé en conséquence de l'activité des PLC, ce qui maintient la régénération du PI. Son activité est spécifiée à l'interface entre ces deux membranes par plusieurs domaines. Son motif FFAT interagit avec VAP ancrée dans le RE. Ses domaines LNS2 et DGBL reconnaissent respectivement le PA et DAG, ce qui assure son attachement à la membrane plasmique en fonction de la concentration de ces lipides. Adapté de Lipp, Ikhlef, Milanini & Drin 2020

6. *Sec14p un nanoracteur pour maintenir la sécrétion ?*

Une autre classe de LTPs en forme de capsule et dont certaines permettent aussi des échanges hétérotypiques de lipides entre les membranes a été beaucoup étudiée au cours des trente dernières années. Cette classe correspond à la superfamille des protéines contenant un domaine homologue à Sec14p dans la levure autrement appelé domaine CRAL-TRIO (d'après *cellular retinaldehyde-binding protein* et du facteur d'échange de guanine Trio pour *triple functional domain*). Comme je l'ai décrit précédemment, Sec14p, est la première LTP dont la fonction a été caractérisée *in vitro* et dont le gène était identifié. Elle est capable d'exécuter le transport de PI et de PC²⁴¹. Dans la levure, il a été observé à la fin des années 1980 que l'interruption du gène *SEC14* est létale. L'expression d'un mutant thermosensible *sec14^{ts}*, permet la croissance de la levure à 30°C, mais pas à une température non permissive de 37°C. À cette température, des protéines telles que l'invertase ne sont plus sécrétées et le transport vésiculaire est interrompu, ce qui est délétère pour la bonne croissance²⁹⁰. Par la suite, une série d'études génétiques a montré que des levures *sec14^{ts}* survivent à une température non permissive si d'autres protéines sont soit absentes ou soit surexprimées, et ceci a permis de mieux comprendre la fonction cellulaire de Sec14p.

Premièrement, la rupture du gène *SAC1* permet de supprimer la létalité associée à la déficience en Sec14p²⁹¹. Sac1p est une protéine membranaire intégrale localisée dans le RE et la perte de la fonction de *SAC1* rend la levure auxotrophe pour l'inositol, ce qui indique une perturbation du métabolisme des phosphoinositides²⁹². Sac1p est une PI(4)P-phosphatase et son absence induit une accumulation du PI(4)P, et une accélération de la synthèse de PC²⁹³. Par ailleurs, une étude a rapporté que la surexpression de *PIK1* portée par un plasmide permet de contourner la sensibilité des levures *sec14^{ts}* à une température non permissive²⁹⁴. Pik1p est en fait l'une des deux PI 4-kinases de la levure et elle assure la production de PI(4)P à l'appareil de Golgi. Ceci a suggéré que l'absence de Sec14p fonctionnelle entraîne un déficit en PI(4)P dans la membrane du Golgi qui s'avère létale pour la levure.

Par ailleurs, il a été observé que des mutations perte-de-fonction dans les gènes structuraux de la voie de biosynthèse de PC dépendante de la CDP-choline, permettent également d'assurer la survie des levures *sec14^{ts}* à une température non permissive²⁹⁵. Il a alors été proposé que l'abondance de PC est toxique pour la fonction sécrétoire du Golgi.

La PC empêcherait la formation des vésicules du Golgi lorsque Sec14p ne fonctionne pas. Ceci a conduit à suggérer que Sec14p régule la teneur de la membrane du Golgi en en PC²⁹⁶.

D'autres résultats ont indiqué que la perte de la fonction de Sac1p dans des levures *sec14^{ts}* à température non permissive, qui maintient l'activité de sécrétion de la levure, peut être contrecarrée par l'expression d'une DAG-kinase exogène²⁹³ ou par délétion de la phospholipase D (PLD) Spo14p²⁹⁷ qui tend à provoquer une accumulation de PC. Comment expliquer ces observations ? La formation de vésicules de transport qui assurent les processus de sécrétion, à partir du Golgi, requiert la présence de DAG. La surexpression de la DAG-kinase épuise ce lipide pour synthétiser du PA. Cette réaction entre en compétition avec la synthèse de PC par la voie CDP-choline qui dépend aussi de la réserve en DAG. L'inactivation de la PLD empêche l'approvisionnement en PA et donc la production consécutive de DAG par la PA-phosphatase (PAP) et ceci bloque la sécrétion restaurée par la perte Sac1p en absence de Sec14p fonctionnelle.

Ainsi la perte de fonction de Sac1p induit une accumulation de PI(4)P, mais cette accumulation semble à peine suffisante pour limiter l'effet toxique lié à l'accumulation de PC dans la membrane du Golgi résultant de l'inactivation de Sec14p²⁹³. Il est aussi possible que l'accumulation de PI(4)P due à l'absence de Sac1p, a un effet pléiotropique sur le métabolisme d'autres lipides au Golgi sans doute parce que la PLD est recrutée par le PI(4,5)P₂ lui-même synthétisé à partir de PI(4)P. **(Fig. 43)**

Une dernière observation montre le lien étroit qui existe entre le métabolisme des PI, PIPs et PC au Golgi. La délétion du gène *OSH4* permet de compenser l'inactivation de Sec14p²⁹⁸. On sait aujourd'hui que la protéine Osh4p est un transporteur de PI(4)P qui limite l'abondance de ce lipide dans le Golgi et ses fonctions de sécrétion. De plus, il est probable que l'absence d'Osh4p empêche le recrutement de la PLD, limitant la production de PA et de DAG. Inversement, la surexpression d'Osh4p annule la compensation de *sec14^{ts}* induite par la suppression des gènes structuraux de la voie CDP-choline²⁹⁸.

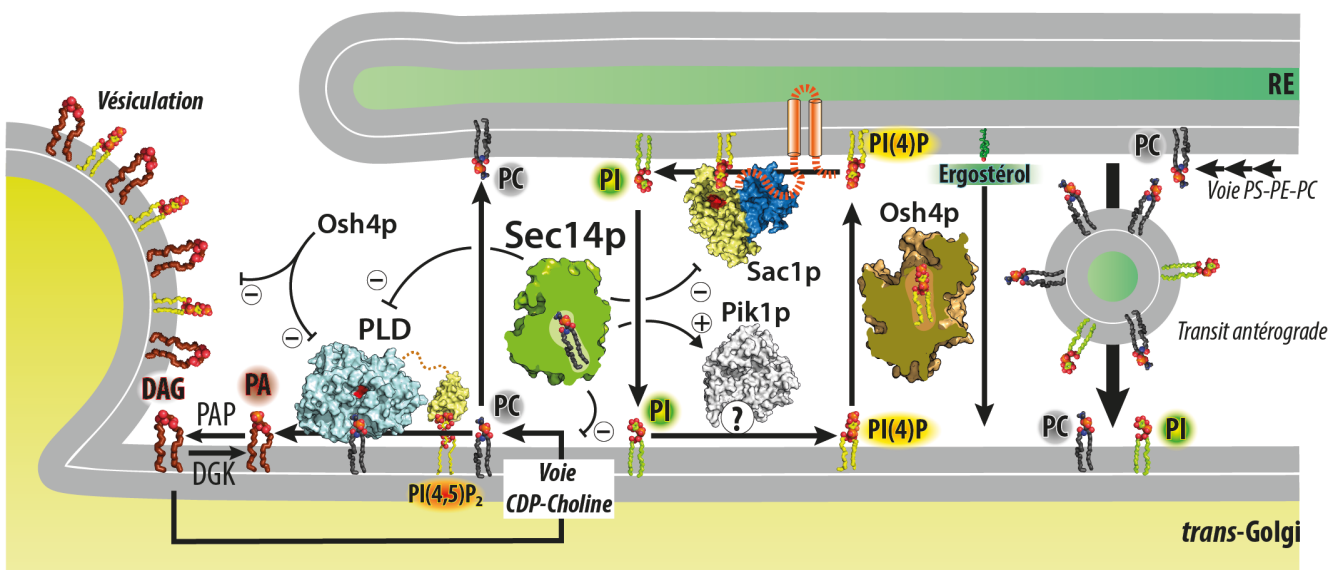


Figure 43 | Pléiotropie de Sec14p sur le métabolisme des lipides entre le Golgi et le RE

La protéine Sec14p est une LTP essentielle pour la vésiculation du Golgi, un processus qui requiert du DAG et du PI(4)P. Sec14p inhibe la voie CDP-choline, la production de PA par une PLD et Sac1p. En contrepartie, elle active Pik1p qui assure la production de PI(4)P. Sa capacité de transport de PC limite l'effet toxique qu'a ce lipide sur la vésiculation. Sa capacité de transport du PI favorise la production de PI(4)P afin de contrecarrer l'effet négatif d'Osh4p sur la vésiculation. Le transit antérograde assure le maintien d'une concentration à peu près homogène de PC et de PI entre le RE et le Golgi.

En résumé, les capacités sécrétoires du Golgi semblent liées à une régulation fine des niveaux de PI(4)P dans la membrane de cet organelle ainsi que du ratio DAG/PC qui dépendent, entre autres, de Sec14p. Il est admis aujourd'hui que cette régulation permet de maintenir un contexte membranaire permissif assurant le recrutement des protéines nécessaire à la formation de vésicules de transport. Le DAG, par sa forme conique favorise la courbure membranaire et la fission des membranes et intervient aussi dans le recrutement de la protéine kinase D nécessaire à l'initiation de la vésiculation. En parallèle, le PI(4)P est crucial pour le recrutement des protéines adaptatrices de la clathrine tels que le complexe AP-1 ou Gga2²⁹⁹⁻³⁰¹. Toutes ces données montrent que Sec14p peut être au cœur d'une logistique finement régulée et nécessaire à des événements de remodelage membranaire intenses.

Cette capacité de Sec14p à réguler la composition en lipides du Golgi semble dépendre de sa capacité à transporter des lipides. En effet, il n'y a pas d'activité de transport mesurable dans un extrait de cytosol de levure *sec14^{ts}* à 37°C mais celle-ci est présente à 25 °C²⁴¹. Par ailleurs l'expression d'un mutant de Sec14p incapable de transporter la PC *in vitro* ne parvient pas à compenser l'absence d'activité de *sec14^{ts}* à température non permissive³⁰². On peut donc penser que l'échangeur PI/PC qu'est Sec14p favorise l'apport de PI dans la membrane du Golgi et alimente Pik1p pour la synthèse de PI(4)P ; cette réaction régule négativement la réserve de PC et ajuste le niveau de DAG nécessaire à la sécrétion.

À l'échelle moléculaire, le fonctionnement exact de ce mécanisme régulateur n'est pas complètement élucidé. On connaît la structure de Sec14p : elle a été cristallographiée dans sa configuration ouverte, maintenue par deux octyl-pyranosides de structure semblable au PI²⁵¹. Sec14 est majoritairement composé d'une douzaine d'hélices α , entourant une cavité hydrophobe dont une des faces est définie par quatre feuillets β parallèles. En plus, la protéine contient huit hélices 3_{10} qui participent à la cohésion de la structure tout en permettant un certain degré de flexibilité et de relaxation. Cette analyse cristallographique montre aussi que la protéine peut être découpée en deux sous-domaines : un domaine N-ter constitué principalement par trois hélices α agencées en tripode et un domaine C-ter qui définissent le module en forme de capsule de transport de lipide.

Par la suite, la protéine Sfh1p, qui est la plus proche paralogue de Sec14p, a été cristallographié dans sa forme liée au PI et sa forme liée à la PC³⁰³. La résolution de ces structures permet de mieux se représenter comment les lipides s'insèrent dans la cavité hydrophobe de cette famille de protéine (**Fig. 44**). D'abord Sfh1p a une structure générale identique à Sec14p, avec les mêmes domaines N-ter en forme de tripode et C-ter caractéristiques. Les feuillets β servent effectivement de support aux lipides enfouis dans la cavité. Les chaînes acyles du PI ou de la PC, dans une conformation étendue, occupent le même espace dans la cavité mais la tête polaire de chaque lipide est reconnue par un sous-ensemble distinct de résidus. Par rapport au PC, l'inositol-phosphate du PI est stabilisé par davantage de liaisons hydrogène. Cette observation donne du sens à des mesures qui montrent que l'affinité de Sec14p pour le PI est 7 à 16 fois supérieure que son affinité pour la PC^{304,305}. De plus, nous nous apercevons qu'une hélice α en épingle, rompue par une proline, immédiatement suivie par le quatrième feuillet β , est refermée sur les lipides. En comparant ceci avec la structure sans ligand de Sec14p, cet élément effectuerait un mouvement de rotation de manière semblable à une porte.

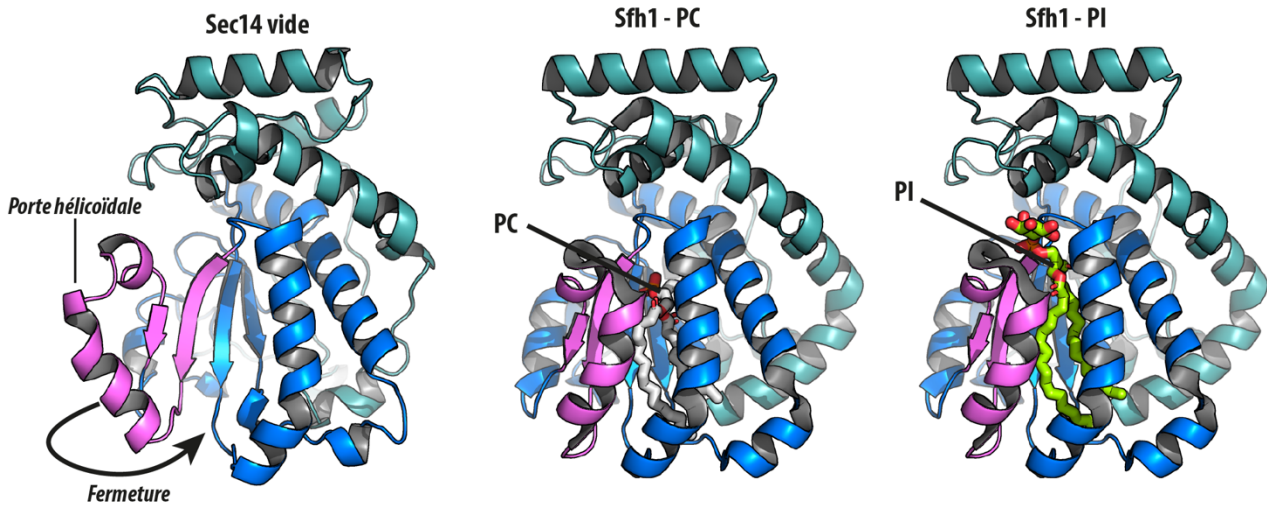


Figure 44 | Structure du domaine de liaison aux lipides de Sec14p et ses homologues

La protéine Sec14 est constituée d'un domaine principal (bleu) qui sert à enfermer la PC ou le PI dans une cavité. La structure de la protéine est maintenue par un domaine de trois hélices agencées en tripode en N-ter (turquoise). La comparaison de la forme vide de Sec14 et la forme liée aux lipides de Sfh1 indique un troisième domaine (rose) constitué de deux feuillets β et d'une hélice rompue, semblable à une porte qui se referme sur le lipide. Cette porte hélicoïdale isole bien la PC dans sa totalité, et isole les chaînes aliphatiques du PI.

Malgré tous ces résultats, on ne sait toujours pas comment la capacité de Sec14p à manipuler la PC et le PI se traduit en une fonction biologique. Les premières recherches, utilisant des méthodes basées sur la fluorescence et la radioactivité, ont montré que Sec14p transfère la PC ou le PI d'une membrane à l'autre^{306,307}. Une approche plus récente confirme que Sec14p effectue un contre-échange de PI et de PC entre les membranes. Nous ignorons si le contre-échange offre des avantages cinétiques, c'est-à-dire si l'équilibration de chaque ligand entre les membranes est plus rapide lorsque les deux lipides sont présents. Cela dit, l'inclusion de PI dans les membranes accélérerait le relargage de la PC préalablement chargée dans la protéine Sec14p³⁰⁵, mais nous ne savons pas si l'inverse est vrai. Finalement, il se pourrait que Sec14p transporte le PI depuis le RE, où il est synthétisé, vers le Golgi où il est requis pour la production de PI(4)P. En effectuant un échange PI/PC, cela permettrait d'éliminer la PC du Golgi en l'apportant en retour dans le RE. Ceci préviendrait donc l'effet toxique de la PC dans le Golgi^{295,296}.

Il semble certain que la double capacité de Sec14 à reconnaître le PI et la PC est essentielle pour sa fonction *in vivo*³⁰³, même si une première étude avait indiqué que l'expression d'un mutant incapable de transporter le PI suffisait à compenser la létalité de *sec14^{ts}* à température non permissive. Pour expliquer la fonction *in vivo* de Sec14, un concept appelé « modèle du nanoréacteur » a été proposé³⁰⁸⁻³¹⁰. Ce concept postule que Sec14 effectue l'échange PI/PC sur la membrane du Golgi pour stimuler l'activité de la PI 4-kinase : Pik1p (**Fig. 45**). Ce nanoréacteur pourrait fonctionner selon deux modalités : **1)** lors d'un cycle d'échange, la PC provoque la libération du PI hors de la cavité de Sec14p et cela forme un état intermédiaire dans lequel Sec14 présente la tête polaire du PI sous une configuration qui favorise la phosphorylation par Pik1p. Ensuite, Sec14p peut piéger une nouvelle molécule de PI et la molécule de PC est expulsée. **2)** La seconde modalité correspondrait à un cas où l'éjection de la PC hors de la cavité favorise la désorption du PI de la membrane de manière à le présenter sous une configuration qui permet sa phosphorylation par Pik1p.

Il est intéressant de noter que le modèle de nanoréacteur attribue un double rôle à Sec14p : c'est un senseur de PC et un moyen de présentation du PI qui transmet l'information sur l'état du métabolisme de la PC à la machinerie de production du PI(4)P. Si la réserve de DAG, qui est cruciale pour la vésiculation du Golgi, est épuisée par la voie CDP-choline pour générer de la PC, un pool de PC est créé, ce qui stimule l'activité

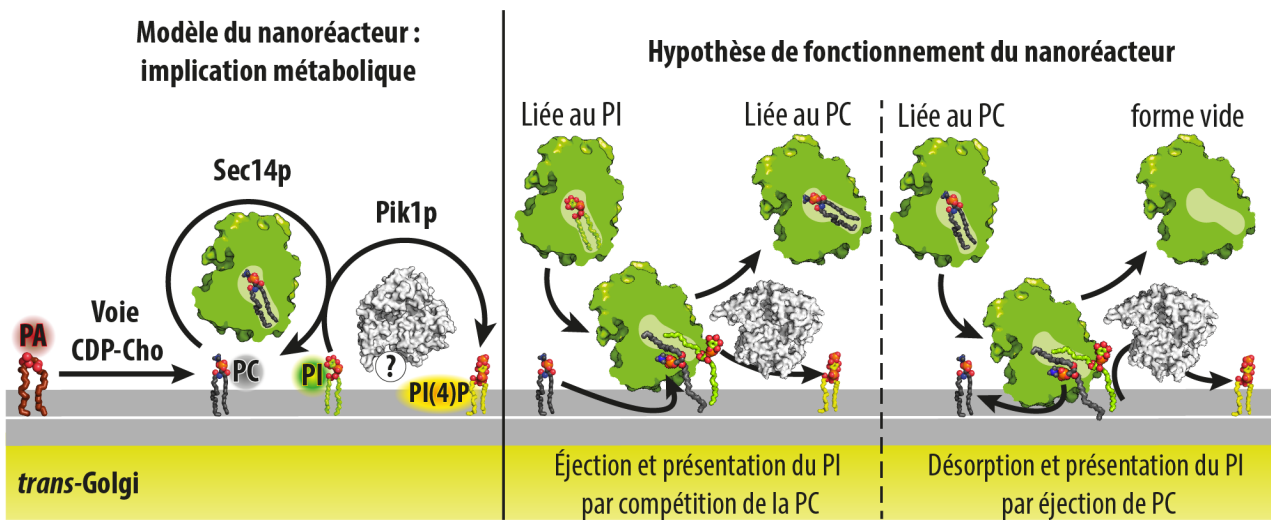


Figure 45 | Modèle du nanoréacteur Sec14p

La protéine Sec14p servirait à transmettre à Pik1p l'information sur l'état du métabolisme de la PC, pour déclencher la production de PI(4)P. Pour cela, Sec14p présenterait le PI dans une conformation favorable à la phosphorylation par Pik1p en effectuant des cycles d'échange PC/PI sur le Golgi. Il y a deux modèles possibles, soit la protéine capture le PI et il est présenté à Pik1p en échange de PC. Soit lorsque la PC est libérée dans le Golgi, le PI est présenté à Pik1p. Le point d'interrogation signifie que nous ne connaissons pas les modalités de fonctionnement des PI 4-kinase.

d'échange de la protéine Sec14p et la synthèse de PI(4)P. Ensuite, des niveaux plus élevés de PI(4)P remplacent la pénurie de DAG pour préserver le trafic vésiculaire. Ce modèle est difficile à tester et les premiers essais ont montré qu'un mutant de Sec14 incapable de lier la PC continue de stimuler la production de PI(4)P *in vitro* ; ce qu'un mutant qui ne lie pas le PI est incapable de faire³⁰³. De plus, il n'y a pas de preuve que Sec14p interagisse physiquement avec la Pik1p³¹⁰. Bien que la structure de son homologue humain PI4KIIIβ soit connue³¹¹, nous ne savons toujours pas précisément comment Pik1p reconnaît et phosphoryle le PI.

Enfin, il existe quatre autres homologues à Sec14p et Sfh1p : Sfh2-5p. Comme Sfh1, elles sont toutes capables de transporter le PI mais pas la PC³¹². Nous ne savons pas encore précisément quels sont les organites sur lesquels elles exercent leur activité, bien que leur localisation ait été décrite³¹³. Certaines sont capables de transporter d'autres ligands lipidiques. C'est le cas de Sfh2p qui transporte le squalène *in vitro* et probablement *in vivo*³¹⁴. Ou bien, Sfh1p qui transporte la PS *in vivo* et un dérivé fluorescent *in vitro*³¹⁵. De plus, Sfh1p est localisée sur les endosomes, l'appareil de Golgi et la vacuole. Enfin, Sfh1p favorise l'activité PS décarboxylase de Psd2p localisée dans ces trois organites.

Il serait tout particulièrement intéressant de savoir, si toutes les homologues à Sec14 sont effectivement des échangeurs de lipides, si elles ont un rôle de senseur de lipides, ou si plutôt elles servent à présenter des lipides à diverses enzymes membranaires, et enfin, dans quelle mesure leur capacité à lier le PI leur permettrait de participer au métabolisme des phosphoinositides.

7. Les ORPs pour transporter en masse les lipides

Parmi les LTPs avec un domaine de capture de lipide en forme de capsule, une importante famille est constituée par les *Oxysterol-binding protein-Related Proteins* (ORPs) et les *oxysterol-binding homologs* (Osh). La protéine prototypique de cette famille est l'*Oxysterol Binding Protein* (OSBP) et toutes les protéines de cette famille contiennent un domaine ORD (*OSBP Related Domain*). On retrouve les ORP/Osh dans tous les groupes d'eucaryotes, en revanche, rien ne permet de dire que ces protéines sont apparues chez les bactéries et les archaea. En effet, il est facile de retracer la phylogénie des ORPs dans les bases de données, car la particularité de cette famille est la présence d'un motif d'acides aminés, presque invariant, de type EQVSHHPP référencé sur Prosite (PS01013)³¹⁶. La diversité des ORPs, leur conservation et le motif particulier ont été mis au jour en 2001 par deux études portant sur les séquences de levure et les séquences humaines^{317,318}. Enfin, les ORP/Osh peuvent être réduite à leur seul ORD qui ne se lie pas forcément aux mêmes lipides, et souvent elles contiennent de nombreux domaines et motifs particuliers à l'origine d'une grande diversité d'interactions protéine-protéine et protéine-membrane ainsi que des localisations subcellulaires différentes (**Fig. 46**).

La découverte d'OSBP remonte aux années 1970. À cette époque, on se demandait comment les dérivés de stérol oxydés appelés oxystérols parvenaient à inhiber *in vivo*, mais pas *in vitro*, la HMG-CoA réductase, une enzyme de la voie de biosynthèse du cholestérol. Pour étudier cette question, une première étude a mis évidence qu'une protéine cytosolique se lie au 25-hydroxycholestérol (25-HC) avec une meilleure affinité par rapport au cholestérol³¹⁹. En fait, plusieurs stérols oxygénés entrent en compétition pour se lier à OSBP, et ce sont les mêmes qui inhibent l'activité HMG-CoA réductase *in vivo*, tandis que ceux qui ne se lient pas n'ont pas d'effet inhibiteur³²⁰. Ces observations ont permis de suggérer qu'en détectant les stérols oxydés, OSBP est un régulateur négatif de la voie de biosynthèse du cholestérol. Cette hypothèse a été renforcée par la publication d'une étroite corrélation entre l'inhibition de la HMG-CoA réductase par divers oxystérols ajoutés au milieu de culture cellulaire et leur affinité de liaison relative pour cette *oxysterol-binding protein*³²¹. Par la suite, OSBP a été purifiée une première fois à partir de cytosol de foie de hamster. La protéine est éluee avec un poids moléculaire apparent de 280 kDa et l'analyse sur gel dénaturant révèle deux isoformes avec un poids moléculaire de 96 kDa et 101 kDa. Les deux isoformes sont identifiables avec le même anticorps³²².

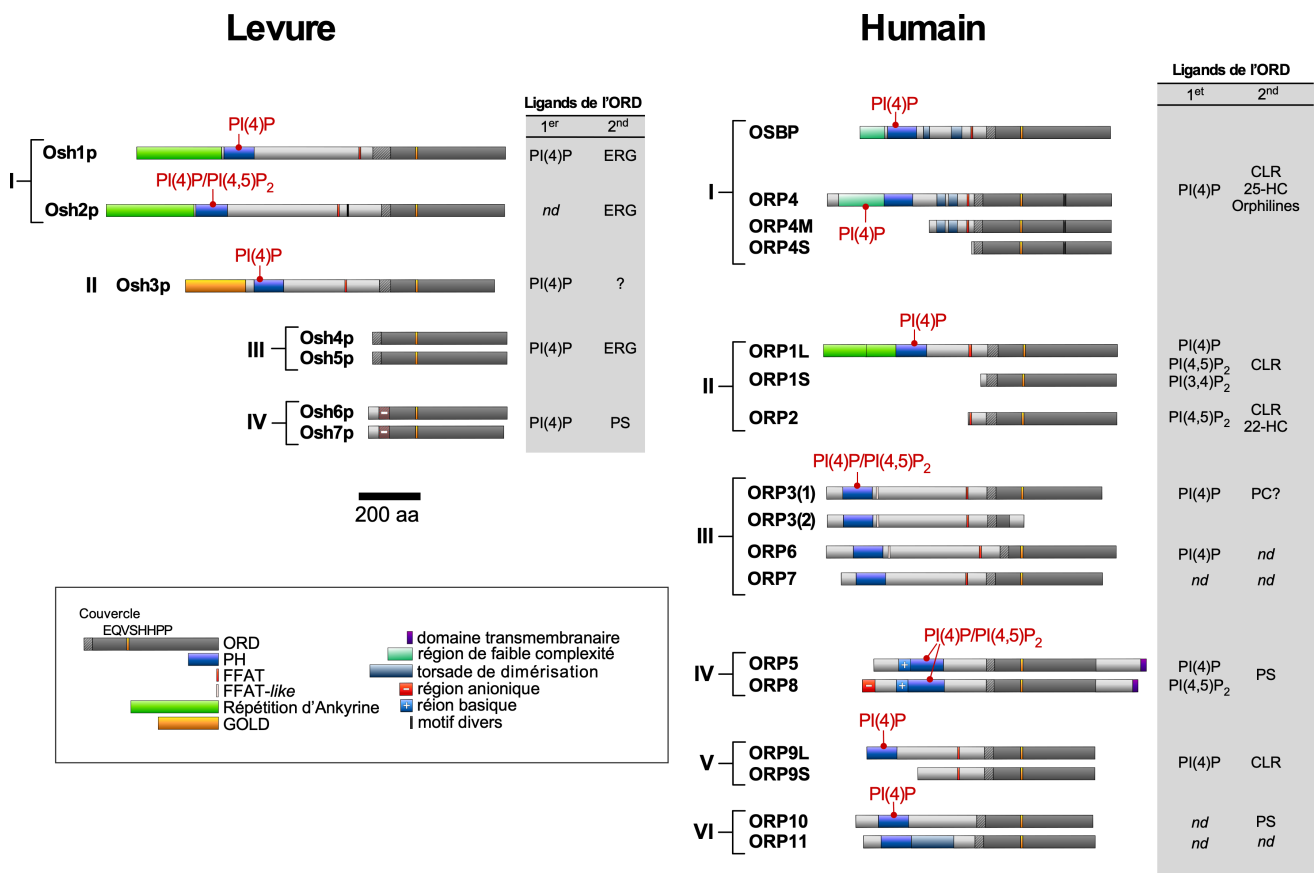


Figure 46 | Diversité de la famille des ORP / Osh

Les ORP/Osh sont caractérisées par un domaine ORD dans lequel se trouve un motif unique. Certaines sont réduites au seul domaine ORD (Osh4/5p ; Osh6/7p ; le variant d'épissage ORP1S et ORP2). Elles ont été regroupées en différentes classes d'après leurs structures. Beaucoup d'entre elles ont un domaine PH qui ne reconnaît forcément les mêmes PIPs (indiqués par un pointeur rouge). Les ligands connus de ces protéines sont indiqués dans le cadre gris. Abréviations : Ergostérol (ERG) ; Cholestérol (CLR) ; Hydroxycholestérol (HC). Les Orphilines sont des composés pharmacologiques. Adapté de Delfosse, Bourguet & Drin 2020⁴¹²

Avec l'émergence des banques d'ADNc, Ridgway, Goldstein, Brown *et al.*, ont cloné la protéine à partir du lapin, la souris et l'être humain. L'OSBP humaine est alors caractérisée comme une protéine de 809 acides aminés, et elle partage avec les orthologues des autres mammifères entre 94 et 98% d'identité^{322,323}. Ces analyses ont révélé que la protéine contient un motif de type *leucine zipper*, potentiellement impliqué dans la formation des dimères observés lors des purifications. En plus, les auteurs remarquent que les 80 résidus N-ter sont essentiellement des alanines et des glycines ce qui est inhabituel. Plus tard, ces chercheurs s'intéressent à la localisation d'OSBP dans la cellule et tentent de définir les différents domaines fonctionnels de la protéine³²⁴. D'abord, de manière étonnante, le motif *leucine zipper* n'est absolument pas suffisant, ni même nécessaire pour la dimérisation qui résulte en fait d'une région étendue qui comprend le motif de leucine et 50 acides aminés situés en aval. De plus, le domaine de liaison à l'oxystérol se situe dans la partie C-ter de la protéine, entre les résidus 455 et 809. *In vivo*, OSBP est distribuée le long du RE de manière punctiforme. Cependant, lorsque les cellules sont traitées au 25-HC, la protéine est très nettement localisée à l'appareil de Golgi, même en l'absence du domaine de liaison à l'oxystérol. En complément, l'absence du domaine de dimérisation rend la protéine cytosolique, mais sous induction au 25-HC, la translocation de la protéine au Golgi persiste. Enfin, lorsque seule la portion N-ter est exprimée dans les cellules, la localisation de la protéine reste parfaitement cytosolique dans tous les cas.

L'ensemble de ces résultats conduisent les auteurs à formuler les hypothèses suivantes : 1) OSBP effectue des cycles entre le RE, le cytosol, et l'appareil de Golgi en absence d'oxystérol. 2) Les oxystérols bloquent OSBP au Golgi et son absence du RE régule négativement la voie de biosynthèse du cholestérol qui a lieu dans cet organite. 3) Les auteurs n'excluent pas que la OSBP transporte l'oxystérol vers Golgi, mais plusieurs arguments laissent penser qu'il s'agit d'un senseur, notamment parce qu'OSBP reste bloqué au Golgi plusieurs heures, même lorsque le 25-HC est éliminé par le lavage du milieu de culture.

Par la suite, comme je l'ai expliqué, OSBP a été identifiée parmi les protéines qui contiennent un domaine PH⁹⁴ et l'année suivante on apprit qu'il en était de même de l'homologue Osh1p dans la levure³²⁵. Le domaine PH est situé juste après le motif en N-ter, riche en alanine/glycine. D'après les résultats précédents, il était supposé que le domaine

PH avait un rôle dans la localisation de la protéine au Golgi. Cette hypothèse est confirmée par la suite, le domaine PH est bien l'élément qui permet le recrutement d'OSBP au Golgi après induction au 25-HC. De plus la délétion du domaine PH permet de supprimer l'altération par OSBP de la voie de biosynthèse du cholestérol. Le domaine PH d'OSBP reconnaît aussi bien le PI(4)P et le PI(4,5)P₂ *in vitro*¹⁰⁷. Par contre, *in vivo*, lorsque que le domaine PH d'OSBP est exprimé dans la levure, seule la délétion de la PI 4-kinase Pik1p induit une mauvaise localisation d'OSBP, ce qui n'est pas le cas de la délétion de Mss4p qui synthétise le PI(4,5)P₂. Par ailleurs, le PI(4)P n'est pas le seul déterminant pour la relocalisation d'OSBP au Golgi, la protéine interagit aussi directement avec la protéine G Arf1 sous sa forme liée au GTP^{107,326}. Mais le mécanisme d'interaction entre OSBP et Arf1 est encore indéterminé et mérite des études plus approfondies. En supplément des éléments de structure évoqués jusque-là, OSBP contient un module qui lui permet de se lier à la protéine VAP-A résidente du RE³²⁷. L'interaction avec VAP dépend d'un motif situé dans la région minimale nécessaire à la dimérisation. En fait, OSBP interagit avec VAP avec une portion de séquence située juste après le motif *leucine zipper*. Il s'avère que cette portion de séquence est caractérisée par un motif FFAT similaire au motif présent dans Nir2 et Nir3 ; c'est-à-dire deux phénylalanines dans un tractus acide³²⁸. Par conséquent, l'ensemble de ces travaux permettent de constater que de façon semblable à Nir et Nir3 qui connectent le RE et la membrane plasmique, OSBP est une protéine multi-domaines qui connecte le RE avec le Golgi.

Néanmoins, toutes ces découvertes ne permettent pas d'expliquer le lien entre OSBP, le 25-HC, et l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol. Ridgway et ses collaborateurs proposent qu'OSBP soit un senseur ou bien un transporteur de 25-HC, mais aucune étude n'avait montré l'implication directe d'OSBP sur la régulation de la HMG-CoA réductase. Tout ce qu'on savait, c'est qu'OSBP se lie indiscutablement au 25-HC. Il faut attendre 2005, pour qu'une équipe explore cette question³²⁹. L'expression d'OSBP est réduite de 90% avec un ARN interférent et ceci n'affecte pas l'inhibition de la transcription de l'HMG-CoA réductase induite par le 25-HC. De plus, l'exposition des cellules au *lyso*-PC, connu pour augmenter la synthèse de cholestérol, supprime l'effet inhibiteur du 25-HC sur cette synthèse sans empêcher OSBP de se lier au Golgi. Les auteurs concluent donc que l'altération de la voie de biosynthèse du cholestérol après traitement au 25-HC est complètement indépendante d'OSBP.

Finalement, la découverte des ORPs comme étant des LTPs vient des études sur la levure. On savait dans les années 2000 que les cellules devaient posséder des protéines spécifiques de transport des stérols entre les membranes. En effet, les stérols sont rares dans le RE où ils sont synthétisés, mais ils sont très abondants dans la membrane plasmique. Des études avaient mis en évidence que la Brefeldine A, qui interrompt le trafic vésiculaire, n'empêche pas l'accumulation de cholestérol dans la membrane plasmique chez les mammifères ; et similairement, l'accumulation d'ergostérol dans la membrane plasmique persiste chez des levures déficientes en protéines impliquée dans le trafic vésiculaire comme Sec18p³³⁰⁻³³². Les protéines Osh, homologues d'OSBP, étaient une piste intéressante pour expliquer le transport de stérol dans la cellule. Une étude parue en 2004 révèle que les protéines Osh sont cruciales pour maintenir les niveaux de stérol dans les organites, maintenir l'intégrité de la vacuole, empêcher l'accumulation de gouttelettes lipidiques, limiter l'accumulation anarchique de chitine et maintenir l'endocytose³³³. La délétion des sept gènes qui codent pour les Osh de la levure est létale. Néanmoins, l'expression d'une seule des protéines Osh est suffisante pour restaurer la viabilité de la cellule. C'est pourquoi il est possible d'étudier le rôle unitaire de chaque protéine Osh avec une souche où les sept gènes sont supprimés (*oshΔ*) mais qui exprime un variant thermosensible, par exemple *Osh4^{ts}*. Paradoxalement, cette étude révèle que l'absence des protéines Osh n'affecte pas le trafic vésiculaire, les protéines sont normalement excrétées par les cellules, ce qui renforce l'idée que le transport de stérol dans la cellule est indépendant du trafic vésiculaire.

En 2005, Im *et al.*, résolvent la structure cristalline d'Osh4p ce qui permet d'éclaircir une ancienne question : Comment les ORP interagissent-elles avec le cholestérol et ses dérivés oxydés ?³³⁴. Aussi connue sous le nom de Kes1p, on savait déjà qu'Osh4p partagent environ 25% d'identité avec OSBP et qu'elle correspond à une séquence limitée au seul domaine ORD sans module supplémentaire. Osh4p est la seule Osh dont la délétion permet de supprimer la létalité du mutant *Sec14^{ts}* à température non permissive²⁹⁸. De plus, Osh4p est localisée dans une certaine mesure au Golgi de manière dépendante de la réserve de PI(4)P de cet organite. Cette localisation particulière disparaît lorsque le motif EQVSHHPP est mutée³³⁵. On pensait donc qu'Osh4p avait peut-être la même fonction qu'OSBP. La cristallographie a permis de révéler qu'Osh4p pouvait se lier au 7-, 20-, et 25-HC, mais aussi au cholestérol et à l'ergostérol qui est le stérol majoritaire de la levure.

Osh4p est caractérisée par 19 feuillets β antiparallèles formant presque un tonneau β complet dont la paroi externe est hydrophile et au centre duquel se trouve une cavité hydrophobe. Les 29 premiers résidus N-ter définissent un couvercle qui recouvre l'entrée de la cavité. Dans la longueur du tonneau, un ensemble de trois hélices α et deux feuillets β complète la paroi de la cavité et ferme l'extrémité du tonneau à l'opposé du couvercle. Enfin, une large portion C-ter d'environ 125 résidus est semblable à une armature qui encadre et maintient une partie du tonneau. Cette portion contient notablement une longue hélice $\alpha 7$ qui surmonte transversalement l'ouverture de la cavité et qui complète le couvercle pour isoler un stérol. Les différents stérols capturés dans la structure ont une position similaire : ils sont enfouis dans la cavité hydrophobe et isolée du solvant, la tête polaire 3-hydroxyle est orientée vers le fond de la cavité, tandis que la chaîne carbonée à l'opposé est en contact avec le couvercle. Concernant les acides aminés du motif signature EQVSHHPP, les deux histidines suivies des deux prolines constituent une structure de type épingle à cheveux β qui borde l'entrée de la cavité. En observant cette structure, il est difficile de comprendre pourquoi ces résidus sont extrêmement bien conservés parmi les ORP/Osh, en effet, ils n'interagissent pas avec le stérol. Dans l'ensemble, la structure rappelle celle des domaines *Starkin* et *Sec14*. Il s'agit d'une protéine en forme de capsule munie d'un couvercle, qui isole complètement du solvant le lipide capturé. Cette structure a donc conduit les auteurs à proposer le modèle selon lequel Osh4p est un transporteur de stérols. Dans ce modèle, Osh4p effectue des cycles de transport de stérol entre deux membranes et pour permettre ce transport, une étape d'ouverture du couvercle doit nécessairement avoir lieu pour extraire ou libérer un lipide.

L'année suivante, la même équipe confirme qu'Osh4p facilite le transport de cholestérol entre les membranes *in vivo* et *in vitro*³³⁶. Plus particulièrement, en approvisionnant la membrane plasmique des levures avec du cholestérol ajouté dans le milieu de culture, ils déterminent son transport dans le RE en mesurant la production de cholestéryl-esters dans ce compartiment. Pour cela, ils comparent une souche qui exprime uniquement Osh4p avec une souche qui exprime les sept protéines Osh. Le taux de production de cholestéryl-ester est réduit de moitié dans les souches qui expriment Osh4p seule. Et cette production est sept fois plus lente à 37 °C avec le mutant *Osh4^{ts}*. Ensuite, les auteurs montrent qu'Osh4p extrait bien le cholestérol ou l'ergostérol contenu dans des liposomes et l'activité de transfert de ces lipides radiomarqués entre membranes est confirmée *in vitro*. Tandis qu'un mutant d'Osh4p sans couvercle est non fonctionnel.

Enfin, des expériences suggèrent qu'Osh4p soit sensible aux PI(4,5)P₂ et PS qui amélioreraient l'activité de transport de stérols entre membranes. L'inactivation conditionnelle de Pik1p ou Msst4p induit un ralentissement du transport de stérol de la membrane plasmique au RE. Pik1p et Mss4p produisent respectivement le PI(4)P dans l'appareil de Golgi et le PI(4,5)P₂ dans la membrane plasmique.

En 2011, de Saint-Jean *et al.*, font une découverte majeure pour notre compréhension du rôle et du fonctionnement des ORP/Osh chez les eucaryotes³³⁷. Les résultats précédents qui suggèrent un rôle du PI(4,5)P₂ pour le transport de stérol d'Osh4p *a priori* à l'interface RE/membrane plasmique étaient étonnants. En effet, Osh4p était plutôt connue pour son lien avec le métabolisme du PI(4)P dans l'appareil de Golgi car sa délétion compense la thermosensibilité du mutant *Sec14^{ts}*. Pour évaluer le lien entre le PI(4)P et la dynamique de transport de stérol, l'équipe a eu recours à un type d'ergostérol naturel qui est fluorescent : le déhydroergostérol (DHE).

Tout d'abord, les auteurs montrent qu'Osh4p extrait du DHE rapidement. Lorsqu'Osh4p est en présence de liposomes contenant du DHE, l'émission de fluorescence de ses tryptophanes est éteinte, ce qui indique l'extraction du DHE. En effet, lorsque le DHE est lié dans la cavité d'Osh4p, l'énergie de fluorescence des tryptophanes est transférée par FRET vers le DHE. Dans une autre expérience, l'extraction du DHE est confirmée. Un groupe Dansyl est conjugué à Osh4p et sert d'accepteur d'énergie de fluorescence par FRET et son émission de fluorescence est mesurée après excitation du DHE. Ensuite les auteurs montrent l'effet qu'ont les lipides anioniques sur la solubilisation du DHE par Osh4p. En présence de liposomes qui contiennent une petite quantité de DHE (0,5 mol%), Osh4p reste bien soluble. Cependant, lorsque les liposomes contiennent 30 mol% de PS, Osh4p reste fortement liée aux membranes, ce qui ne l'empêche pas d'extraire la totalité du DHE inclus dans ces liposomes. Lorsque les liposomes contiennent 2 mol% de PI(4)P ou PI(4,5)P₂, Osh4p se lie légèrement mieux à ces membranes qu'à une membrane neutre. Osh4p reste parfaitement capable d'extraire la totalité du DHE des liposomes contenant du PI(4,5)P₂, mais elle n'en est plus capable en présence de PI(4)P. Ensuite, de façon ingénieuse, la liaison d'Osh4p aux liposomes est suivie en temps réel. Le motif ALPS d'Osh4p est conjugué au NBD afin de révéler son interaction avec la membrane. Avec cet outil, nous apprenons qu'Osh4p se lie aux membranes de façon dépendante de la concentration en PI(4)P ou en PI(4,5)P. En parallèle, le suivi de la

fluorescence des tryptophanes indique que l'extraction du DHE est inhibée de manière dépendante de la concentration en PI(4)P, ce qui n'est pas le cas avec le PI(4,5)P₂. Ces résultats suggèrent que le PI(4)P entre en compétition avec l'extraction du DHE. Pour vérifier cette hypothèse, une analyse d'extraction de lipides radiomarqués montre qu'Osh4p extrait spécifiquement et sélectivement le cholestérol et le PI(4)P. Une autre expérience appuie cette observation, lorsqu'Osh4p est préchargée avec du DHE, l'ajout de liposomes contenant du PI(4)P induit une augmentation de l'intensité de fluorescence des tryptophanes ce qui indique la libération du DHE. Ces résultats suggèrent que le DHE est échangé contre du PI(4)P.

Dans cette étude, la structure cristalline d'Osh4p liée au PI(4)P est résolue. Les chaînes aliphatiques du PI(4)P sont enfouies dans sa cavité hydrophobe, elles occupent le site de liaison des stérols, mais avec une moins bonne spécificité. À l'opposé, la tête polaire est au cœur d'un site de reconnaissance spécifique. La tête polaire est partiellement exposée au solvant. Le groupement 4-phosphate est coordonné par trois liaisons hydrogène avec les deux histidines du motif EQVSHHPP et une arginine conservée située dans l'hélice $\alpha 7$. De plus, le couvercle interagit avec le phosphate en position *sn1* et les oxygènes du noyau inositol.

Ensuite, les auteurs examinent la capacité d'Osh4p à transporter le DHE entre liposomes. Pour cela, des liposomes donneurs contiennent du DHE et un lipide fluorescent : le dansyl-PE. Lorsque ces liposomes sont excités à la longueur d'onde d'excitation du DHE, du fait du transfert d'énergie par FRET, le Dansyl-PE émet un signal fluorescent qui est mesuré. L'ajout de liposomes accepteurs ne change pas le signal fluorescent, mais dès que la protéine Osh4p est ajoutée, on observe une diminution du FRET entre le DHE et le dansyl, ce qui révèle qu'Osh4p transporte le DHE depuis les liposomes donneurs vers les liposomes accepteurs. La densité en lipides anioniques des liposomes accepteurs ne change pas beaucoup la vitesse de transport du DHE, elle reste faible autour de 2 nmol de DHE /Osh4p, mais de façon surprenante, ce transport est dix fois plus rapide lorsque les liposomes accepteurs contiennent 2 mol% de PI(4)P. De plus, des mutations des résidus qui interagissent avec la tête polaire du PI(4)P suppriment l'effet accélérateur du PI(4)P sur le transport de DHE. Ces résultats suggèrent que l'extraction du PI(4)P favorise le transport de stérol et que le PI(4)P est sans doute transporté en retour dans les liposomes donneurs de DHE.

Enfin, les auteurs montrent qu'Osh4p transporte effectivement le PI(4)P. Dans une expérience en temps réel, le transport de DHE d'Osh4p dans des liposomes accepteurs est accéléré si ces liposomes préparés sans PI(4)P, ont été incubés, lors d'une première étape, avec Osh4p et des liposomes contenant du PI(4)P. L'accélération du transport observé dans cette condition suggère indirectement que le PI(4)P est transporté lors de la première étape d'incubation. Dans une seconde expérience, le transport de PI(4)P marqué au ³²P est confirmé. L'analyse des quantités de DHE et de PI(4)P transportés indique que les deux lipides sont échangés selon un ratio 1:1 par la protéine Osh4p.

Cette étude montre pour la première fois que des ORP/Osh sont capables d'échanger un lipide pour un autre. De plus, les LTPs permettraient de transporter en masse un ligand lipidique de façon dépendante de la disponibilité d'un autre ligand lipidique. Les auteurs de cette étude proposent un modèle : Osh4p transporte le stérol depuis le RE vers le *trans*-Golgi. Le stérol est libéré dans le *trans*-Golgi en échange de PI(4)P qui est transporté en retour dans le RE. Le transport de stérol dans le Golgi aurait donc pour effet de consommer le PI(4)P contenu dans cet organite et dont la production est assurée par Pik1p. Dans le RE, le PI(4)P est hydrolysé par la phosphatase Sac1p. Le stérol étant synthétisé dans le RE, ce métabolisme favoriserait le transport de stérol contre son gradient de concentration (**Fig. 47a,b**).

En 2013, Mesmin et al., montrent qu'OSBP aussi est capable d'échanger le cholestérol et le PI(4)P à l'interface entre le RE et l'appareil de Golgi³³⁸. Pour permettre cet échange, OSBP doit nécessairement être attaché à VAP dans le RE avec son motif FFAT et connecter le Golgi via son domaine PH qui détecte le PI(4)P. De plus, cette étude montre que l'hydrolyse du PI(4)P par Sac1p favorise le transport de DHE (**Fig. 47a,c**).

En 2015, Moser von Filseck et al, démontrent qu'Osh4p parvient à créer un gradient de stérol entre des liposomes en dissipant un gradient de PI(4)P préexistant entre ces deux membranes³³⁹. Ce gradient est généré par l'activité kinase de pik1p dans l'appareil Golgi et l'activité phosphatase perpétuelle de sac1p dans le RE. Osh4p extrait une molécule d'ergostérol dans le RE, puis l'évacue dans l'appareil de Golgi en échange d'une molécule de PI(4)P. Le PI(4)P est rétrotransporté dans le RE où il est consommé. Ainsi, en puisant dans l'énergie potentielle accumulée par le déséquilibre de PI(4)P entre les deux membranes, Osh4p déplace l'équilibre de répartition du stérol en faveur d'une accumulation dans l'appareil de Golgi au détriment du RE.

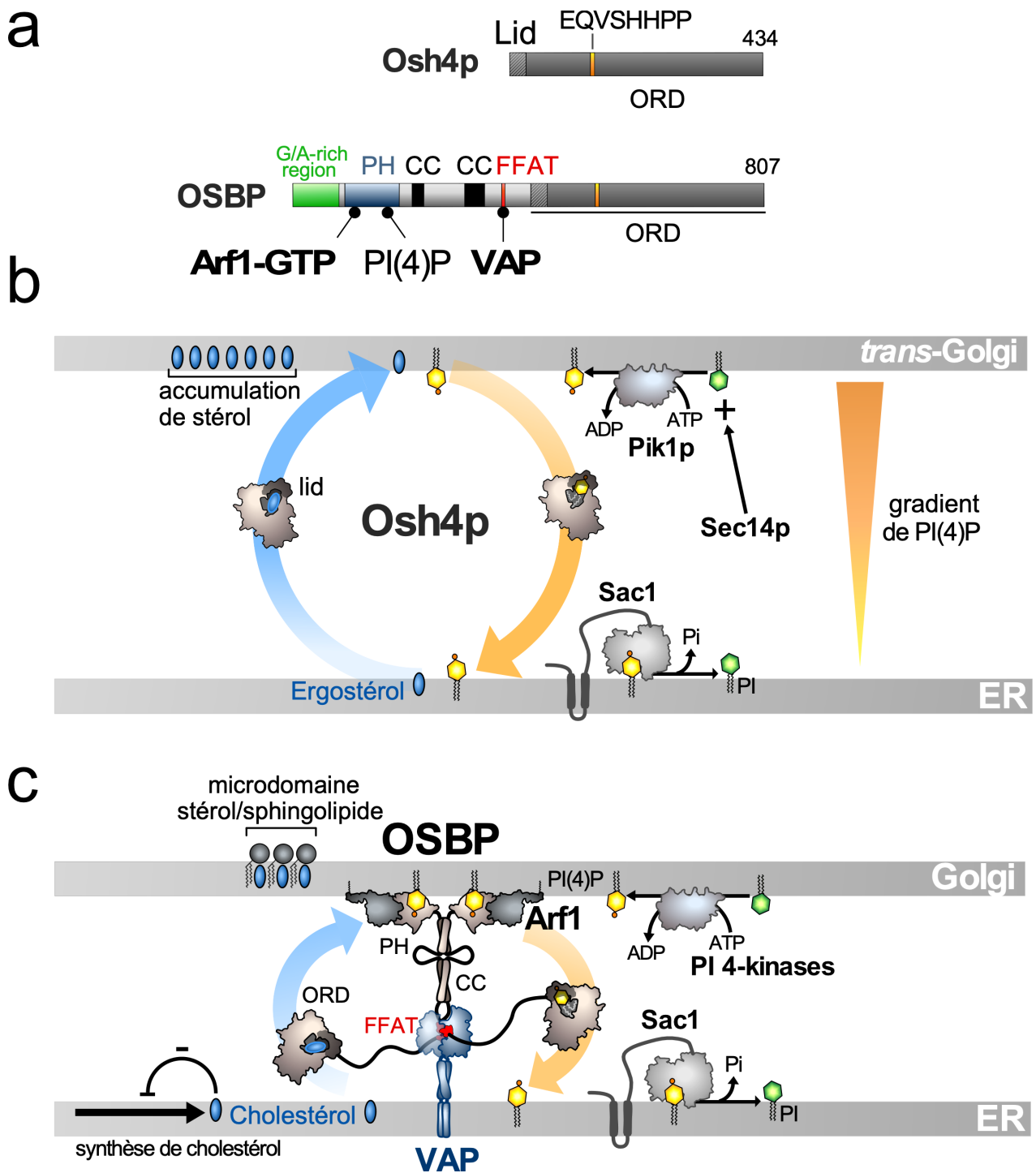


Figure 47 | Modèle d'échange stérol / PI(4)P d'Osh4p et OSBP

a) Organisation en domaines des séquences d'Osh4p et d'OSBP **b)** Modèle d'échange ergostérol / PI(4)P d'Osh4p dans la levure. **c)** modèle d'échange cholestérol / PI(4)P d'OSBP dans l'espèce humaine. OSBP connecte le RE au Golgi avec son motif FFAT qui s'attache à VAP dans le RE et son domaine PH qui reconnaît le PI(4)P du Golgi, probablement en synergie avec Arf1. Adapté de Lipp, Ikhlef, Milanini & Drin 2020

8. Le mécanisme d'échange PS/PI(4)P pour maintenir le gradient de PS ?

Un des problèmes qui se pose depuis les années 70 est de comprendre comment la phosphatidylsérine peut transiter depuis son site de synthèse, le RE vers les autres organites³⁴⁰. Par exemple, la phosphatidylsérine est un substrat nécessaire pour la synthèse de PE par la phosphatidylsérine décarboxylase mitochondriale, or la mitochondrie est incapable de synthétiser la PS. En étudiant cette question, dès 1975, Butler & Thompson ont identifié dans le foie de rat un facteur cytosolique capable d'effectuer ce transfert de PS depuis le RE ou des liposomes vers la mitochondrie³⁴¹. Une autre énigme provient du fait que la membrane plasmique est particulièrement riche en phosphatidylsérine comparativement au RE. La PS est très abondante dans la membrane plasmique (30 % des phospholipides totaux) dans une moindre mesure dans l'appareil de Golgi (24 %), tandis qu'il n'y a que des traces de PS dans les autres organites (entre 3 et 8 % des phospholipides)⁶⁶. Ceci suggère qu'un mécanisme actif et spécifique existe pour assurer une telle accumulation de PS dans la membrane plasmique. De plus, au sein d'une même membrane cellulaire, la PS n'est pas distribuée symétriquement entre les deux feuilletts. Ceci est particulièrement vrai pour la membrane plasmique où la PS est presque exclusivement localisée dans le feuillet cytosolique⁷⁶. Malgré sa contribution à la distribution des lipides dans la cellule, le transport vésiculaire n'est sans doute pas responsable de l'accumulation en masse de PS dans le feuillet interne de la membrane plasmique³³². Au contraire, le trafic vésiculaire, rétrograde et antérograde, dédié principalement au transport des protéines a plutôt pour conséquence d'induire une distribution aléatoire de lipides. Par ailleurs, l'appareil de Golgi et la membrane plasmique sont dépourvus de PS synthase. Et au contraire, le Golgi contient une PS décarboxylase chez la levure^{223,315}.

Le deuxième argument en faveur d'un transport de PS indépendant du trafic vésiculaire vient du fait que les organites qui sont déconnectés du trafic vésiculaire contiennent, eux aussi, de la phosphatidylsérine. C'est notamment le cas de la mitochondrie pour laquelle la PS est essentielle à la synthèse de PE.

Ces arguments sont confortés par des expériences basées sur la mutation de protéines impliquées dans le trafic vésiculaire ou l'utilisation de drogues bloquant ces protéines.

Par exemple, Mioka *et al.* (2014)³⁴² ont exploré la distribution d'une sonde fluorescente spécifique de la phosphatidylsérine (mRFP1-Lact-C2) dans des levures dont le trafic vésiculaire est bloqué à différentes étapes. Ils ont observé que la distribution de PS reste dans l'ensemble identique, quelle que soit l'étape qui est bloquée. La PS s'accumule toujours dans la membrane plasmique, elle reste rare dans le RE, et il est possible d'observer un gradient de concentration de PS le long de la voie de sécrétion. Les auteurs ont émis l'hypothèse suivante : soit une phospholipide translocase s'active dans les vésicules de sécrétion qui quittent le réseau *trans*-golgien pour la membrane plasmique ; soit une protéine de transport de PS permet directement d'enrichir le feuillet cytosolique des vésicules de sécrétion et de la membrane plasmique en puisant dans la réserve de PS du RE.

Les modalités de transport de PS dans la cellule eucaryote sont restées longtemps sans réponse depuis l'étude de Butler & Thompson en 1975³⁴¹. Il faut attendre 1991 pour qu'on redécouvre ce mécanisme lorsque des chercheurs isolent dans la levure un nouveau type de LTP spécifique de la phosphatidylsérine. Il s'agit d'une protéine cytosolique avec une activité de transport spécifique de la phosphatidylsérine³⁴³. Cette protéine de transfert de PS a été décrite avec un poids moléculaire apparent après purification de 35 kDa. Aucune étude n'a permis d'identifier le gène responsable de cette activité *in vitro*, cependant les auteurs ont montré que cette protéine était hautement spécifique pour la PS, qu'elle n'était pas capable de transporter la PC ou le PI contrairement à d'autres LTPs classées à cette époque dans les nsLTP (non spécifiques). Cette protéine catalyse le transfert de PE, de cardiolipine, de PA et d'ergostérol mais avec des taux de transfert de l'ordre de 70 à 90% inférieur au transfert de PS. De façon intéressante, il a été montré que l'activité de transfert de cette protéine est sensible à la charge des membranes et à la concentration en cation divalent. En effet, l'activité de transfert augmente en présence d'EDTA et la protéine est inhibée par l'ajout de magnésium. De plus l'activité de transfert diminue de 50% lorsqu'une membrane acceptrice artificielle contient une petite proportion de lipides anioniques tels que le PA, la PS ou le PI, respectivement, 23 %, 17 % et 14 %. Enfin, l'activité a été mesurée en utilisant comme membrane acceptrice différents organites extraits de la levure. Il s'avère que le traitement de ces organites avec des protéases provoque une diminution des taux de transfert de PS³⁴⁴. Ces résultats suggèrent que les protéines qui recouvrent ces membranes masquent les charges négatives en surface de la membrane acceptrice, ce qui favorise l'activité de transfert de PS. Cette étude

est intéressante, car elle montre comment une protéine de transport de lipides peut être régulée par la nature anionique d'une membrane acceptrice.

Alors que les études moléculaires sur les transporteurs de lipides se développent dans les années 2000 et 2010, notamment avec les échangeurs PI/PC, on identifie enfin la protéine à l'origine de la distribution remarquable de la PS cellulaire.

En 2009, le groupe de William Prinz a montré que deux des protéines Osh parmi les 7 homologues de levure sont en fait des paralogues avec une capacité de transport de stérol quasiment nulle³⁴⁵. Il s'agit d'Osh6p et Osh7p, deux protéines de 448 et 437 acides aminés respectivement qui sont très proches évolutivement³⁴⁶. Cette même étude révèle qu'Osh6p et Osh7p ont une forte avidité pour des membranes artificielle excessivement chargée en PS (50% et 100% des lipides totaux). De plus les auteurs décrivent la localisation d'Osh6p et Osh7p. Bien que partiellement solubles dans le cytosol, elles sont particulièrement enrichies à l'interface entre le RE et la membrane plasmique. Ce sont les sites de contact ER-membrane plasmique (**Fig. 48**).

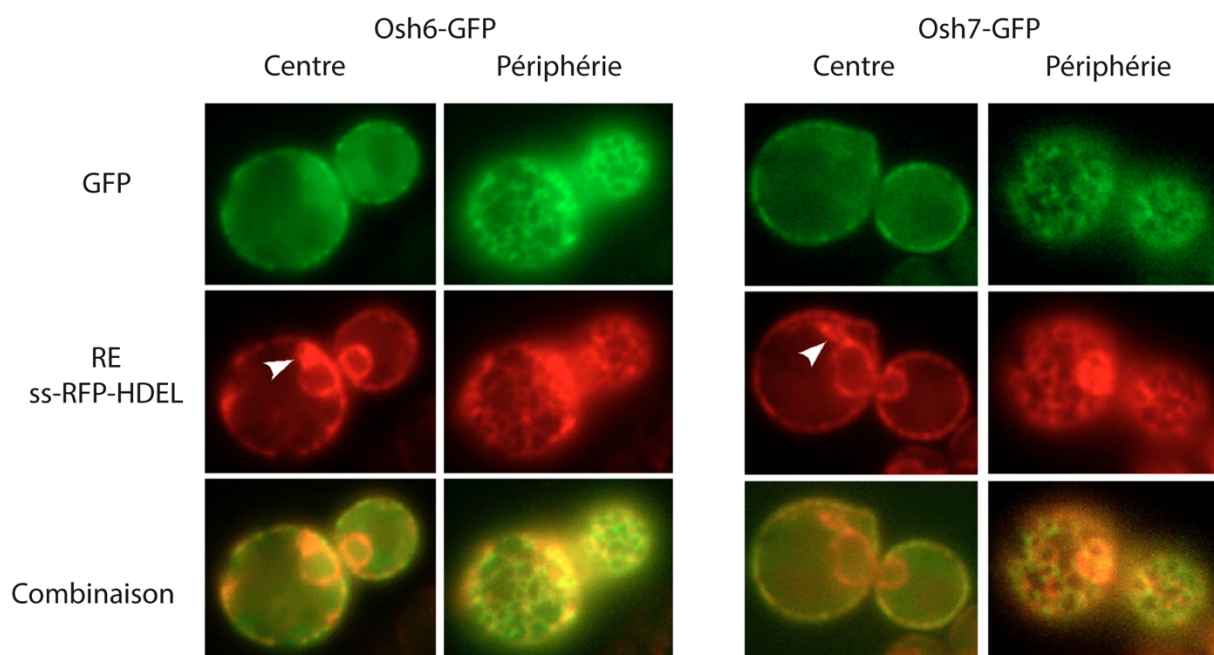


Figure 48 | Localisation d'Osh6p et d'Osh7p dans la levure

Osh6p et Osh7p sont solubles dans le cytosol, cependant elles sont aussi concentrées en périphérie de la cellule de façon colocalisée avec le RE qui est marqué par la sonde ss-RFP-HDEL. Cette colocalisation particulière suggère qu'Osh6p et Osh7p sont en partie situées dans des sites de contact entre le RE et la membrane plasmique. Les flèches indiquent la partie du RE qui n'est pas en contact avec la membrane plasmique. Adapté de Schulz et al. 2009³⁴⁵

En 2013, Maeda *et al.* rapportent dans, une lettre à l'éditeur Nature, la découverte de la première protéine capable d'extraire la PS des membranes pour la transporter chez les eucaryotes³⁴⁷.

Pour le montrer, ils ont identifié par chromatographie et spectrométrie de masse différents complexes lipide-protéine formés par treize LTPs de levure, comprenant des homologues de Sec14p (Sfh) et les homologues aux ORP humaines (Osh). De plus, l'analyse chromatographique des liposomes incubés avec ces complexes a permis de confirmer que les protéines Osh6p et Osh7p sont capables de transporter de la PS entre liposomes *in vitro*.

Ensuite, les auteurs ont confirmé ces résultats *in vivo* en utilisant une sonde Lact C2-GFP spécifique de la PS dans des levures mutantes pour la synthèse de PS ($\Delta Cho1$). Après avoir incubé des levures WT avec du *lyso*-PS, ils observent une accumulation rapide (~20 secondes) de PS dans la membrane plasmique au détriment du RE ou le *lyso*-PS est rapidement converti en PS probablement par l'acyltransférase ale1p¹⁷⁸. Par contre, dans le double mutant « Osh6⁻/Osh7⁻ », la phosphatidylsérine stagne majoritairement dans le RE et atteint très lentement la membrane plasmique (> 5 minutes). Pour confirmer que ce mécanisme de transport rapide de PS est indépendant du trafic vésiculaire, ces expériences ont été répétées à 4°C.

Remarquablement, les auteurs ont pu obtenir une structure cristalline de la protéine Osh6p en complexe avec une seule molécule de PS (**Fig. 50a,c,e**). L'obtention de cette structure est précieuse pour mieux comprendre le fonctionnement de cette protéine. Tout d'abord, Osh6p présentent des ressemblances structurales avec la protéine Osh4p qui avait déjà été cristallographiée^{334,337}. Osh6p est semblable à une capsule qui consiste en un tonneau β imparfait qui forme une cavité dans laquelle la PS est logée de façon un peu semblable au PI(4)P dans Osh4p. Le col supérieur de ce tonneau est surmonté d'une hélice α transverse (hélice $\alpha 7$). De plus, la cavité est complètement refermée par un couvercle qui consiste en un élément de structure semblable à un clapet parallèle à l'hélice $\alpha 7$. Le couvercle fait suite à la portion N-terminale désordonnée et non résolue. Il est composé d'une charnière, suivi d'une hélice α d'une douzaine de résidus, et il est terminé par une longue boucle structurée qui relie le premier feuillet β . Dans la cavité, la tête polaire de la PS fait face au couvercle, elle est coordonnée par six résidus,

dont trois dans le couvercle en interaction avec le groupement sérine. De plus, la chaîne d'acide gras en position *sn1* du glycérol suit la longueur de la cavité, tandis que la chaîne en position *sn2* est repliée en regard du couvercle. En parallèle, une analyse phylogénétique des ORP/Osh indique qu'Osh6p et Osh7p appartiennent un même groupe monophylétique qui inclut les protéines ORP5, ORP8, ORP9, ORP10 et ORP11 (**Fig. 49 a,b**). En effet, toutes les protéines de ce groupe partagent un motif particulier « LPTFILE » dont l'amine de la première leucine (L69 chez Osh6p) interagit avec le groupement carboxyle de la PS dans la structure. Cette leucine est située dans le couvercle d'Osh6p. Enfin, cette étude nous apprend qu'ORP5 et ORP10 sont toutes deux capables d'extraire spécifiquement la phosphatidylsérine, mais de façon moins efficace qu'Osh6p dans ces conditions expérimentales.

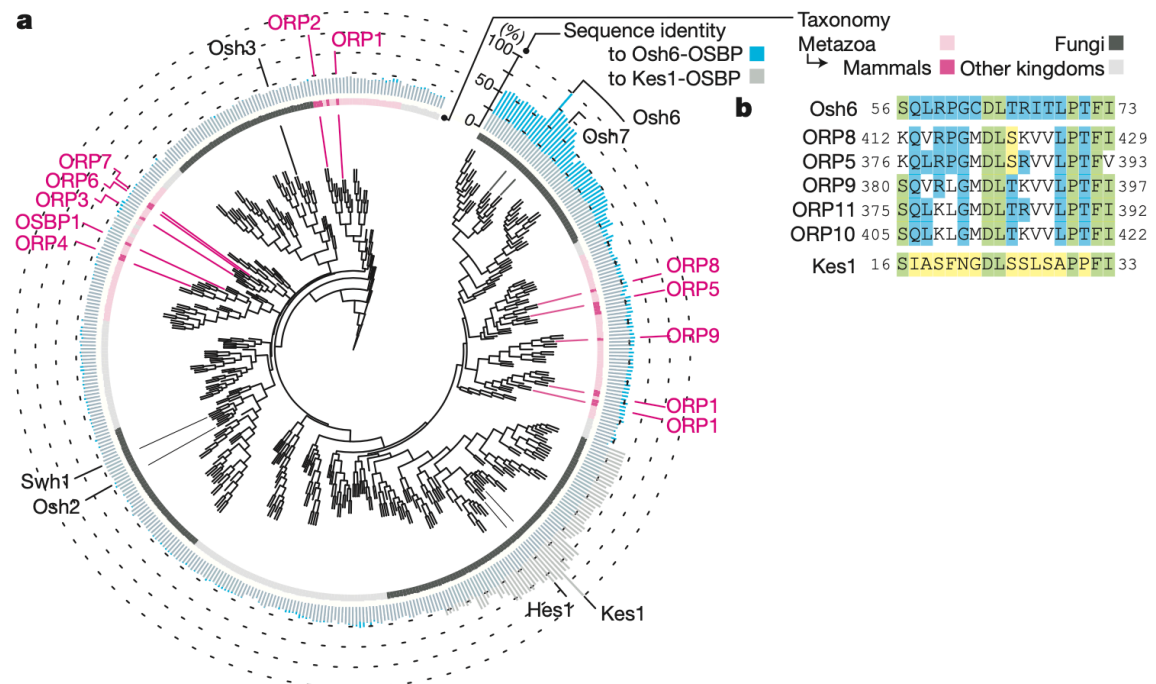


Figure 49 | Appartenance d'Osh6/7 et ORP5/8/9/10/11 à un même groupe monophylétique

a) Arbre phylogénétique des ORP/Osh. ORP5/8/9/10/11 font partie d'un sous-groupe dont l'ORD pourrait servir à liaison de la PS comme cela a été montré pour Osh6/7 et ORP5/8/10. **b)** Les ORP/Osh de ce sous-groupe sont caractérisées par un motif commun (LPTFILE) que les autres ORP/Osh ne possèdent pas et qui serait spécifique de la reconnaissance de la PS. Adapté de Maeda *et al.* 2013³⁴⁷

Plusieurs études avaient montré qu'Osh4p et OSBP transportent les stérols contre leur gradient de concentration en exploitant le gradient de PI(4)P maintenu par les PI-4 kinases et par Sac1 respectivement dans l'appareil de Golgi et le RE. Sur la base de ces découvertes, on pouvait alors se demander si Osh6p ne serait pas en fait un échangeur PS / PI(4)P.

Cette hypothèse a été examinée par Moser von Filseck *et al.* en 2015⁴⁸. Premièrement, l'équipe a montré qu'Osh6p extrait le PI(4)P depuis des membranes de DOPC enrichi avec ce phosphoinositide. Dans cette expérience, près de 95% du PI(4)P accessible à la surface des liposomes est extrait par une quantité d'Osh6p équimolaire à la quantité de PI(4)P. La quantité de PI(4)P extrait est détecté par la perte de fluorescence d'une sonde NDB-PH_{FAPP} qui reconnaît spécifiquement le PI(4)P. La sonde est en quantité 12 fois moindre à celle d'Osh6p ce qui évite une compétition entre Osh6p et la sonde pour le PI(4)P. Par ailleurs, lorsque les liposomes sont enrichis par 2,5 fois plus de PS que PI(4)P, l'extraction du PI(4)P est inhibée à près de 80%, ce qui indique qu'Osh6p lie la PS et le PI(4)P de façon mutuellement exclusive.

Ensuite, la cinétique de transport de PS et de PI(4)P est suivie à l'aide des sondes fluorescentes NBD-C2_{Lact} et NBD-PH_{FAPP} respectivement. Ces sondes permettent de détecter le déplacement des lipides d'une membrane à une autre. En termes de vitesse initiale, le transport mesuré *in vitro* est d'environ 0,9 POPS/min/Osh6p lorsque la membrane donneuse contient 5 mol% de PS et que la membrane acceptrice ne contient pas de PI(4)P. En revanche, lorsque la membrane acceptrice contient 4 mol% de PI(4)P, la vitesse de transport de PS est 10 fois plus élevée. En parallèle, la vitesse de transport de PI(4)P est d'environ 8 PI(4)P/min/Osh6p et lorsque la membrane acceptrice de PI(4)P contient 5 mol% de PS, cette vitesse est doublée. Contrairement à Osh4p, lors de ces cycles d'échange, le bilan de l'échange dans les premières secondes de réaction n'est pas d'un PS pour un PI(4)P mais se rapproche de 0,56 PS/PI(4)P. Ces résultats semblent indiquer dans ces conditions que des cycles futiles épuisent le PI(4)P, au moins lors de la mise en route du mécanisme.

De façon notable, cette étude a permis d'obtenir les cristaux de la protéine Osh6p avec une seule molécule de PI(4)P à l'intérieur de la cavité hydrophobe de la protéine (**Fig. 50b,d,f**). Il est intéressant d'observer que la molécule de PI(4)P adopte une position semblable à celle de la phosphatidylsérine dans le cristal de Maeda *et al.* : la tête polaire

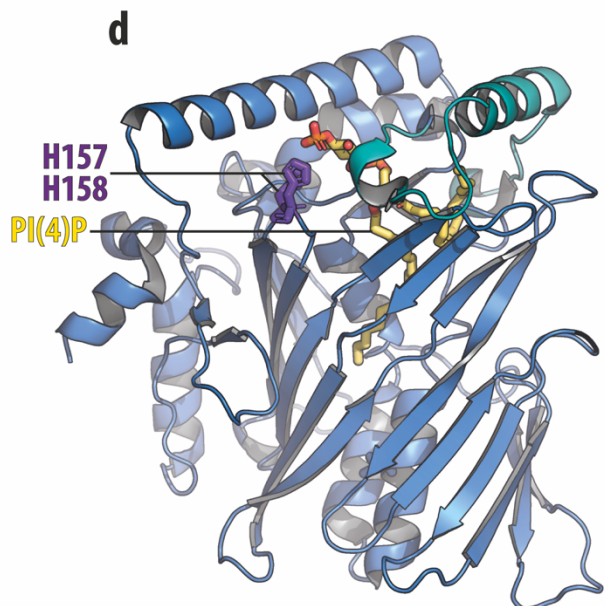
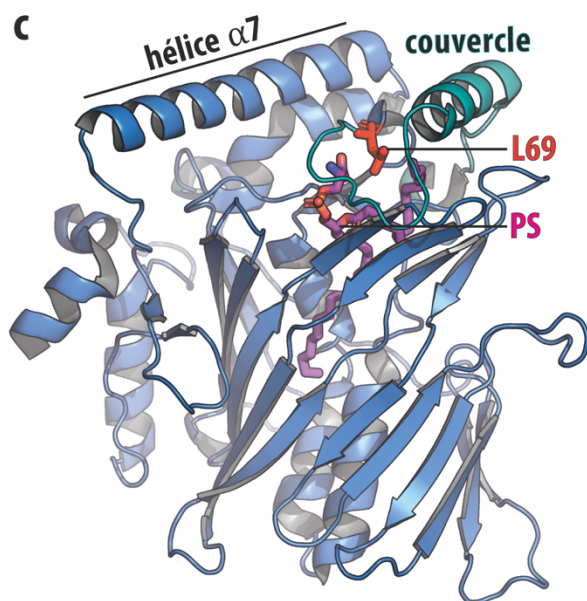
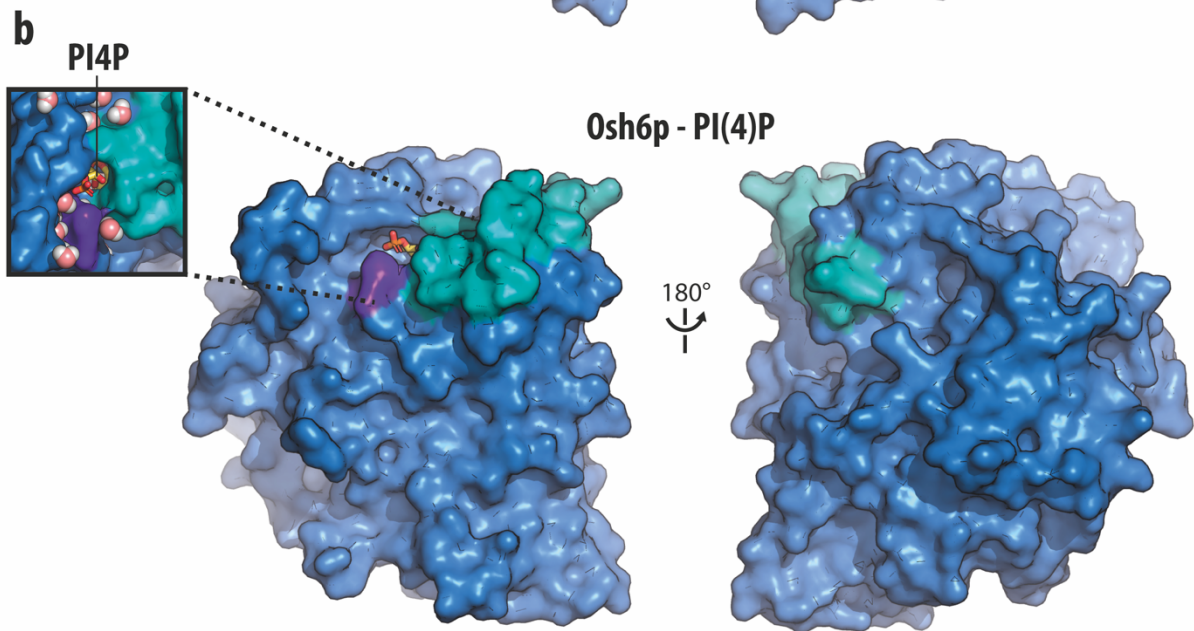
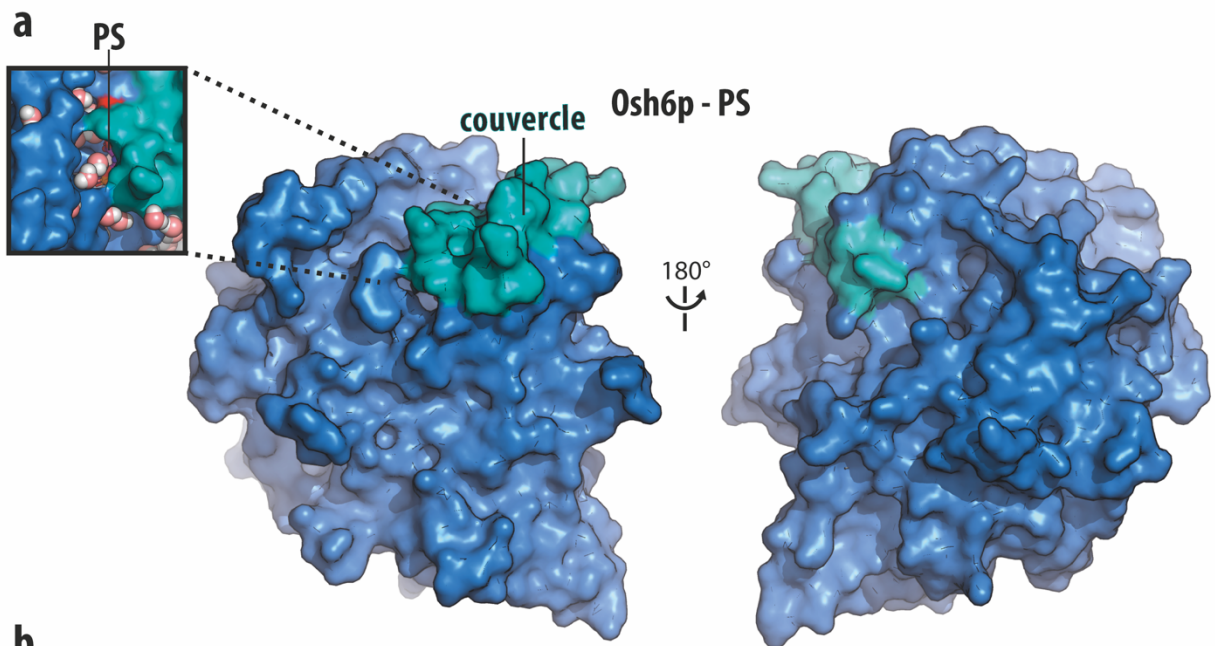
est maintenue par le couvercle, la chaîne en position *sn1* suit le conduit du tonneau β et la chaîne en position *sn2* subit un repliement en regard du couvercle. De plus, la tête polaire du PI(4)P interagit avec Osh6p de façon similaire à ce qui a été trouvé pour Osh4p. La tête polaire est coordonnée par quatorze liaisons avec neuf résidus. Il apparaît que les histidines H157 et H158 du motif EQVSHHPP qui définit la famille des ORP/Osh interagissent avec la tête polaire. Les azotes des noyaux imidazoles stabilisent deux des oxygènes hypervalents du groupement phosphate en position 4 du noyau inositol. De plus, une arginine (R359) coordonne le troisième oxygène hypervalent de ce groupement phosphate. Cette arginine est située dans l'hélice $\alpha 7$ transverse au corps de la protéine. Osh4p possède aussi une telle arginine (R341), dans une hélice semblable qui semble être une caractéristique des Osh/ORP. Enfin, le noyau inositol et le groupement phosphate en position *sn3* du glycérol interagissent avec des résidus du couvercle et d'autres résidus de l'hélice $\alpha 7$. Cet agencement particulier observé dans le cristal explique la bonne affinité de la protéine pour le PI(4)P. De plus, l'énergie de liaison d'Osh6p et ses ligands a été calculé à partir des structures. Ce calcul indique que la liaison du PI(4)P à Osh6p est deux fois plus forte (-1029,6 kJ/mol) que celle de la PS (-628 kJ/mol). En tenant compte uniquement de ce résultat *in silico*, Osh6p aurait une meilleure affinité pour le PI(4)P que pour la PS, bien qu'aucune expérience à ce jour n'ait permis définir les constantes d'association et de dissociation des ligands lipidiques de la protéine Osh6p.

De plus, cette dernière étude a permis d'aller plus loin pour comprendre l'importance de différents éléments structurels de la protéine : d'une part, les résidus H157/H158, qui interagissent avec le PI(4)P, sont essentiels pour permettre le transport de PI(4)P similairement à Osh4p. Ces résidus sont donc requis pour permettre l'accélération du transport de PS qui dépend de la présence de PI(4)P. La leucine 69, décrite par Maeda *et al.* (2013), est essentielle pour assurer une fonction normale de transport de PS. En effet, la vitesse de transfert de PS chute drastiquement, même en présence de PI(4)P, lorsque cette leucine est substituée par un aspartate (Osh6p(L69D)).

Enfin, la délétion du couvercle qui enferme le PI(4)P ou la PS à l'intérieur de la cavité (Osh6p Δ 69) entraîne une diminution considérable de la capacité de la protéine à transporter le PI(4)P et un arrêt total de toute capacité de la protéine à transporter la PS. Ces résultats sur les cinétiques de transport de PS et de PI(4)P *in vitro* par Osh6p et ses différents mutants ont été également démontré par des expériences de cinétique de

transport de PS entre le RE et la membrane plasmique *in vivo*. Pour cela, l'équipe d'Alenka Čopič a adapté l'expérience de transport de PS en levure de Maeda *et al.* (2013). Les expressions des différents mutants d'Osh6p fournissent des résultats en accord avec les mesures *in vitro*. L'expression du mutant Osh6p(L69D), défectueux pour le transport de PS et de PI(4)P, a pour effet de ralentir l'accumulation de PS dans la membrane plasmique après ajout du lyso-PS. L'expression d'autres mutants (H157A/H158A et K351E) incapables de lier correctement le PI(4)P, ont le même effet voire abolissent complètement le transport de PS ce qui confirme que le transport de PS dépend bien de la capacité d'échange PS/PI(4)P d'Osh6p.

Enfin, pour confirmer que le gradient de PI(4)P entre le RE et la membrane plasmique est important pour exécuter le transport vectoriel de PS, des mutants thermosensibles *sac1^{ts}* ont été produits en levures et les expériences de transfert de PS *in vivo* montrent que Sac1p est essentielle pour permettre une accumulation rapide de PS dans la membrane plasmique. De plus, c'est bien le gradient de PI(4)P et non pas la simple présence de PI(4)P dans la membrane acceptrice de PS qui favorise un transport rapide de PS. En effet une expérience de transport *in vitro* révèle que si, à l'état initial, le PI(4)P est déjà réparti de façon équilibrée entre les membranes donneuses et les membranes receveuses de PS, alors le transport de PS est aussi lent qu'en absence de PI(4)P.



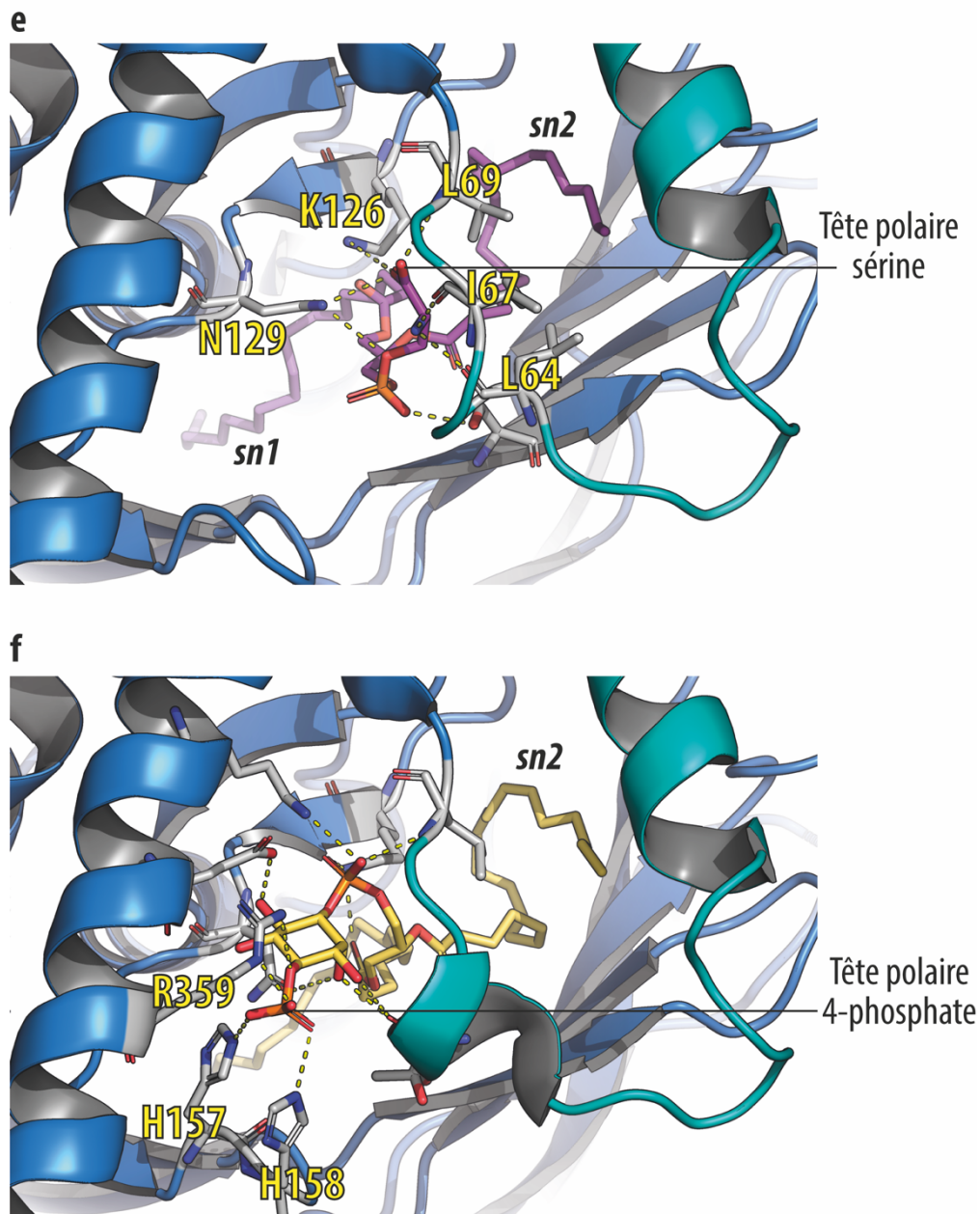


Figure 50 | Comparaison des structures d'Osh6p liés à la PS et au PI(4)P

a) Représentation de surface d'Osh6p liée à la PS. La PS est enfouie dans la cavité et elle est peu accessible au solvant comme le montre l'insert où les molécules d'eau sont représentée en sphère (rose). Un élément de structure semblable à un couvercle représenté en turquoise permet d'isoler le ligand lipidique. **b)** Représentation de surface d'Osh6p liée au PI(4)P. La tête polaire du PI(4)P est plus exposée au solvant, le groupement 4-phosphate est apparent en surface de la protéine. **c)** Représentation en ruban d'Osh6p liée à la PS, le couvercle et l'hélice $\alpha 7$ caractéristiques des ORP/Osh sont indiqués, la leucine 69 contenue dans le motif « LPTFILE » est représentée en bâtons épais, en rouge. **d)** Osh6p liée au PI(4)P, les deux histidine H157 et H158 caractéristiques du motif EQVSHHPP sont représentées (bâtons épais violet). **e)** Site de liaison de la tête polaire de la PS, les numéros des résidus qui interagissent spécifiquement avec le groupement sérine de la PS sont indiqués. **f)** Site de liaison de la tête polaire du PI(4)P, les numéros des résidus qui interagissent spécifiquement avec le groupement 4-phosphate de l'inositol du PI(4)P sont indiqués. En **e)** et **f)** Tous les résidus impliqués dans des interactions avec le ligand lipidique sont représentés en bâton. Le PI(4)P fait intervenir plus de liaisons que la PS. De plus on remarque l'agencement particulier des chaînes aliphatiques, la chaîne *sn1* suit la longueur du tonneau β tandis que la chaîne *sn2* forme un coude et est repliée en regard du couvercle.

En parallèle à cette étude sur Osh6p, dans un article conjoint, le groupe de De Camilli montre que ce mécanisme d'échange PS/PI(4)P a lieu aussi entre le RE et la membrane plasmique des cellules humaines³⁴⁸. ORP5 et ORP8 sont les plus proches homologues humaine d'Osh6p. Elles partagent avec cette dernière le domaine *Oxysterol Related Domain* (ORD) qui contient le motif EQVSHHPP. Mais différemment, ORP5 et ORP8 contiennent environ 500 acides aminés supplémentaires avec notamment un domaine PH dans la portion N-terminale en amont de l'ORD et un domaine transmembranaire (TM) en position C-terminale. De plus, contrairement à ORP5, ORP8 peut être transcrite entièrement (ORP8L) ou sous la forme de son variant d'épissage (ORP8S) dont il manque les 42 premiers acides aminés de la séquence et dont la fonction est incertaine.

En s'intéressant à la localisation des deux protéines et du variant d'épissage dans la cellule, les auteurs observent que les deux protéines décorent la membrane plasmique selon un motif fait de petits patchs distribués uniformément et qui rappelle la distribution des sites de contact membranaire. En revanche, la localisation d'ORP8L est distincte de celle d'ORP5 car elle a une large distribution réticulaire. Cette distribution suit effectivement le RE et avec ORP8S cet aspect réticulaire est atténué. Lorsque les auteurs surexpriment la phosphatidylinositol 4-kinase (PI4KIII α), ils observent une accumulation des patchs en périphérie de la cellule, et une légère perte de l'aspect réticulaire de la distribution d'ORP8. À l'inverse, en utilisant un inhibiteur de PI4KIII α , ORP5 comme ORP8 se dispersent complètement tout au long du RE. Enfin, on savait que les domaines PH ont généralement la caractéristique de se lier aux phosphoinositides, il n'est donc pas surprenant d'observer que la délétion des domaines PH d'ORP8 et ORP5 provoque la perte de la distribution en patchs, dépendante de la PI 4-kinase le long de la membrane plasmique. Par ailleurs, lorsque le domaine transmembranaire est supprimé, ORP5 tapisse la totalité de la membrane plasmique et ORP8 est distribuée uniformément à travers le cytosol. La surexpression de la PI 4-kinase permet d'obtenir avec ORP8- Δ TM la même localisation qu'ORP5- Δ TM. Pris ensemble, ces premiers résultats suggèrent qu'ORP5 et ORP8 connectent le RE et la membrane plasmique dans des sites de contacts et que le domaine PH permet le recrutement de la protéine par le PI(4)P ou bien d'un autre phosphoinositide dépendant de la production de PI(4)P tel que le PI(4,5)P₂.

Dans un second temps, une expérience montre que la délétion de PI4KIII α induit un défaut d'accumulation de PS dans la membrane plasmique tout en réduisant la quantité de PS totale de la cellule, sans impacter les niveaux de PC et de PE. La cellule tenterait de compenser ces pertes en augmentant les niveaux d'expression d'ORP5 et d'ORP8. De plus, une analyse lipidomique révèle que la protéine ORP8 purifiée contient soit une molécule de PS, soit une molécule de PI(4)P avec majoritairement la 36:1 PS et le 36:2 PI(4)P ce qui correspond probablement au 18:0-18:1 PS et au 18:1 – 18:1 PI(4)P respectivement. Enfin, par une construction ingénieuse qui permet d'induire à la rapamycine le recrutement de Δ PH-ORP5 et Δ PH-ORP8 à la membrane plasmique, les auteurs montrent en microscopie par réflexion totale de la fluorescence interne (TIRF), qu'après induction, la PS s'accumule dans la membrane plasmique au détriment du RE et inversement, le PI(4)P quitte la membrane plasmique pour le RE. Ici, la distribution de la PS et du PI(4)P est révélée respectivement par la distribution des sondes spécifiques GFP-Evectine-2-2xPH et P4M. Ces sondes sont exprimées constitutivement dans les cellules et le TIRF permet de mesurer précisément la cinétique de redistribution de ces sondes. Par cette technique, on observe une perte significative du transport de PI(4)P d'ORP5 et ORP8 lorsque qu'elles portent des mutations ponctuelles des résidus conservés et identifiés chez Osh6p comme intervenants dans la coordination de la tête polaire du PI(4)P ou de la PS. Par ailleurs, cette étude ajoute que le domaine transmembranaire est bien nécessaire à l'accumulation de PS à la membrane plasmique, le transport se déroule nécessairement à l'interface ER/membrane plasmique et enfin, ce transport est bien dépendant du gradient de PI(4)P qui existe entre le RE et la membrane plasmique comme l'indique une répression de l'expression d'un ARN interférant de la PI(4)P-phosphatase Sac1 localisé dans le RE.

En conclusion, les études conjointes de Chung *et al.*, et Moser von Filseck *et al.*, indiquent que l'accumulation de la PS dans la membrane plasmique est un mécanisme conservé de la levure à l'être humain grâce à domaine ORD qu'on retrouve dans une sous famille des ORPs qui comprend ORP5/8/10/11/12 et Osh6/7 ; et que ce mécanisme dépend directement du gradient de PI(4)P préexistant entre le RE et la membrane plasmique (**Fig. 51 et 52**). Le maintien de ce gradient de PI(4)P est sans doute coûteux en énergie pour la cellule parce que la synthèse de PI(4)P dépend directement de la production d'ATP. En conséquence, l'accumulation de PS dans la membrane plasmique est un mécanisme actif qui doit forcément est optimisé pour limiter les pertes énergétiques.

Pour résumer, en considérant le seul domaine ORD représenté par le prototype Osh6p, le mécanisme d'échange PS/PI(4)P peut se décomposer en plusieurs étapes : Osh6p se lie au RE, puis extrait la PS et se détache. La protéine traverse l'espace intermembranaire, se lie à la membrane plasmique et libère la PS en échange d'une molécule de PI(4)P produit par les kinases de façon dépendante de l'ATP. Une fois le PI(4)P extrait, Osh6p se décolle de la membrane plasmique, traverse l'espace intermembranaire et libère le PI(4)P qui est hydrolysé par la phosphatase Sac1 dans le RE. La protéine Sac1 consomme en continu le PI(4)P en produisant du PI, ce qui entretient un gradient de PI(4)P entre le RE et la membrane plasmique. Ainsi, Osh6p effectue de multiples cycles d'échanges PS/PI(4)P rapidement et elle permet l'accumulation indispensable de la PS à la membrane plasmique jusqu'à épuisement du gradient de PI(4)P.

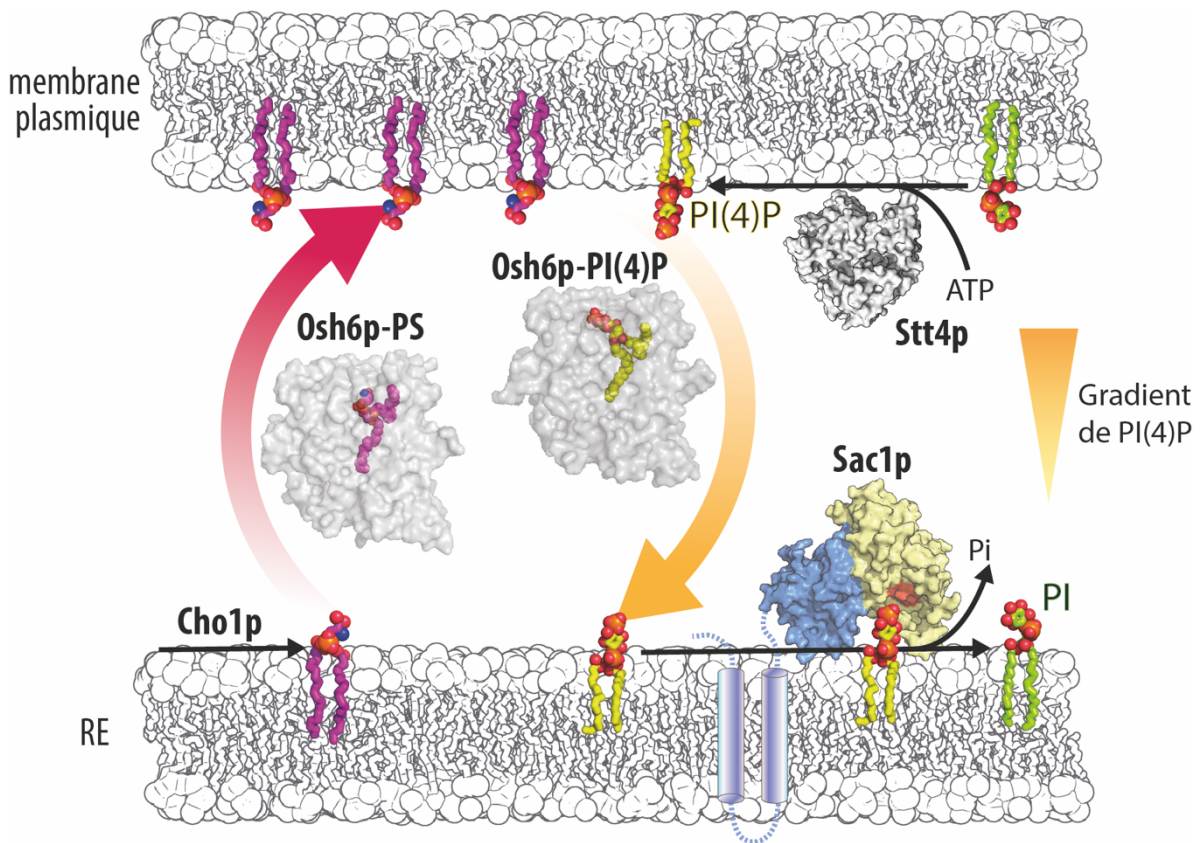


Figure 51 | Osh6p effectue des cycles d'échange PS/PI(4)P entre le RE et la membrane plasmique

La PS est produite majoritairement par Cho1p dans le RE de la levure. Osh6p transporte la PS depuis ce site de production vers la membrane plasmique où elle est échangée pour du PI(4)P. Le PI(4)P est transporté en retour dans le RE où il est déphosphorylé par la PI-phosphatase Sac1p. L'activité phosphatase génère du PI et du phosphate inorganique (Pi). Le PI(4)P est produit par la kinase Stt4p à partir d'ATP et de PI dans la membrane plasmique. Les activités de Sac1p et Stt4p génèrent un gradient de concentration de PI(4)P entre le RE et la membrane plasmique ce qui favorise les cycles d'échange PS/PI(4)P d'Osh6p.

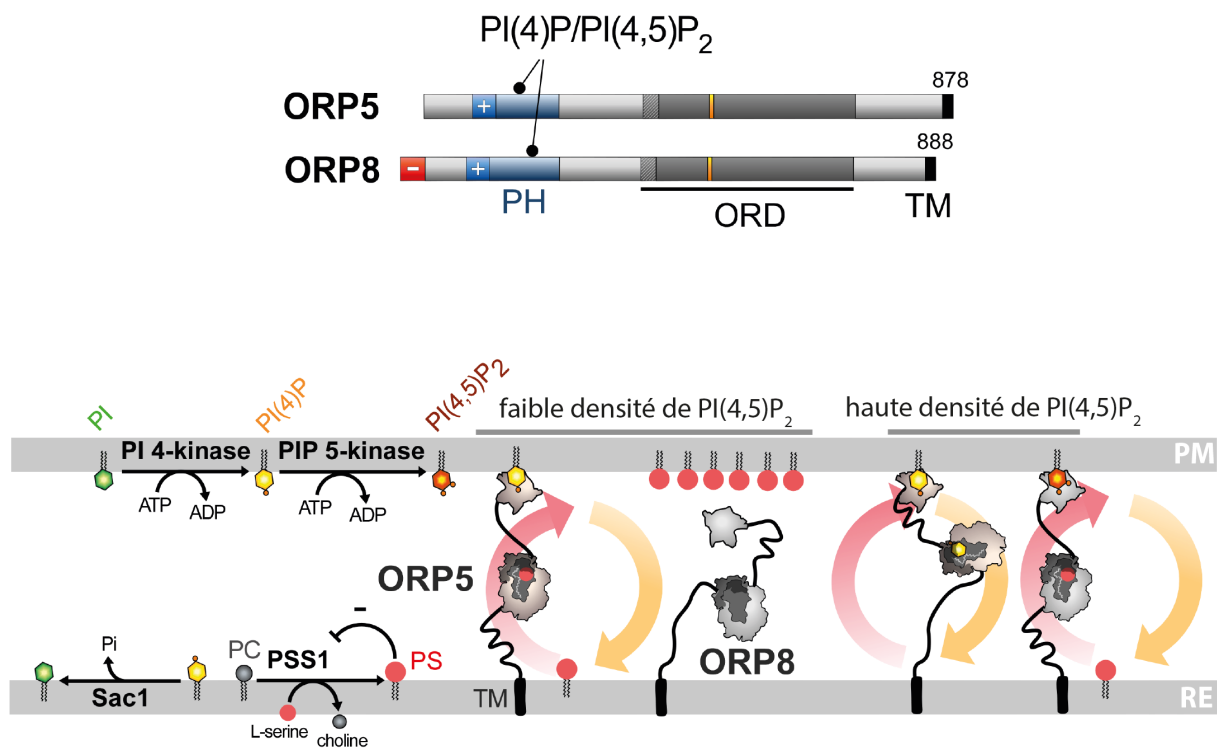


Figure 52 | ORP5 et ORP8 échangent la PS et PI(4)P entre le RE et la membrane plasmique

La PS est synthétisé par la PSS1 dans le RE, de manière similaire à Osh6p, ORP5 et ORP8 échange la PS et le PI(4)P ce qui permet l'accumulation de la PS dans la membrane plasmique. Le PI(4)P est produit par des PI 4-kinase localisés à la membrane plasmique. ORP5 et ORP8 sont ancrées dans le RE par un domaine transmembranaire en C-ter (TM). Au moyen de leur domaine PH en N-ter elle connecte le RE et la membrane plasmique en fonction de la disponibilité en PI(4)P ou PI(4,5)P₂. Le domaine PH d'ORP5 est recruté par le PI(4)P tandis que le domaine PH d'ORP8 est plus sensible au PI(4,5)P₂. Ce couple de protéines permettrait donc d'améliorer le transport en fonction de l'activité métabolique de synthèse des PIPs.

IV. L'échange PS/PI(4)P : un mécanisme efficace ? Pourquoi ?

L'objectif de mes travaux de thèse fait suite à plusieurs problèmes biologiques : L'échange de PS contre PI(4)P est essentiel pour permettre l'accumulation de PS dans la membrane plasmique. Le transport de PS est très rapide *in vivo*. Dans la levure, Osh6p et Osh7p sont capables de transporter la totalité de la PS depuis le RE vers la membrane plasmique très rapidement (< 30 secondes). De plus, *in vitro*, ce transport est très rapide, Osh6p peut transporter au moins 15 PS/min/protéine à condition que le PI(4)P ne soit pas limitant.

La vitesse de transport de PS mesurée *in vivo* est cohérente avec les mesures d'activité *in vitro*. J'ai pu faire l'observation suivante : une levure contient environ 4×10^3 copies d'Osh6p et 6×10^3 copies d'Osh7p²¹⁶. Si l'on considère uniquement Osh6p, avec un taux de transport d'au moins 15 PS/protéine/minute, et un temps de division cellulaire moyen de 90 minutes, Osh6p peut transporter jusqu'à $5,4 \times 10^6$ molécules de PS par cycle cellulaire. Si l'on considère qu'un lipide exposé à la surface d'une membrane occupe une aire de $0,7 \text{ nm}^2$ alors on peut déduire que le feuillet interne de la membrane plasmique d'une cellule sphérique de $4 \mu\text{m}$ de diamètre compte $\sim 7 \times 10^7$ lipides. Ainsi, Osh6p serait suffisante pour permettre, en un cycle cellulaire, une accumulation de PS à hauteur de $\sim 7 \%$ des lipides accessibles, à condition que la production de PI(4)P ne soit pas limitante. De plus, sachant que la membrane plasmique contient environ 175 mol de phospholipides pour 230 mol de sphingolipides⁶⁶, ce mécanisme extrêmement rapide, permettrait à lui seul d'expliquer comment la cellule parvient à maintenir l'enrichissement de la membrane plasmique dans des proportions similaires à ce qui a déjà été mesuré : entre 10 et 30 molécules de PS pour cent phospholipides.

Pour permettre ce mécanisme très efficace, il faut d'une part que la cellule puisse produire rapidement le PI(4)P de façon dépendante de l'ATP. De plus, la cellule doit avoir un moyen de dédier l'activité de transport de PS du RE vers la membrane plasmique en évitant les autres organites qui contiennent du PI(4)P. Par exemple, ORP5 et ORP8 sont munies de plusieurs domaines qui permettent de connecter le RE à la membrane plasmique de façon dépendante du métabolisme des phosphoinositides-phosphates³⁴⁹. Or, Osh6p et Osh7p sont réduites à leur seul domaine ORD.

De plus, ce mécanisme rapide de transport est surprenant lorsque l'on sait que la membrane plasmique est caractérisée par un fort potentiel électrostatique négatif, de même que le RE qui l'est un peu moins. Ainsi, la membrane plasmique et le RE, ne sont pas des interfaces propices à des cycles rapides d'attachement et de détachement d'une protéine. Osh6p doit donc avoir un moyen de limiter son temps de résidence aux membranes lors de son chargement et déchargement de lipide en s'affranchissant de l'effet des charges négatives de surface.

C'est pourquoi, afin d'apporter une perspective mécanistique au phénomène de transport intermembranaire de lipides, qui est rapide à l'échelle cellulaire et coûteux en énergie, mes travaux de thèse se sont donc concentrés autour de ces deux questions :

1) Comment Osh6p et Osh7p échappent-elles à l'attraction des membranes anioniques pour assurer son activité d'échange PS/PI(4)P ?

2) Comment Osh6p et Osh7p ciblent-elles l'interface RE / membrane plasmique pour enrichir spécifiquement la membrane plasmique en phosphatidylsérine ?

A. Méthodologie

1. *Description structurelle des protéine in silico*

a. *Analyse de séquence et phylogénie*

Au cours des vingt dernières années, nous avons connu une évolution rapide des techniques de séquençage, des technologies « omiques » et de la puissance de calcul des ordinateurs. Notamment, plusieurs milliers de génomes ont été séquencés, le NCBI a annoté plus de 600 génomes eucaryotes, et le génome humain comme celui de *S. cerevisiae* sont des génomes de références de haute qualité et comportent respectivement ~25000 et 6275 gènes. Pour stocker toutes ces informations, les bases de données pour la biologie sont très nombreuses, elles nous renseignent sur de nombreux aspects de la biologie moléculaire et elles ont l'avantage d'être libre d'accès. De plus, beaucoup d'algorithmes également libres d'accès ont été développés pour étudier les caractéristiques des séquences. Un portail de qualité qui permet d'accéder à un grand nombre de ces ressources est ExPASy³⁵⁰. Ce portail propose quelques outils dont : **ProtParam** qui m'a permis de connaître le poids moléculaire moyen, le pI et le coefficient d'extinction des protéines que j'ai étudiée ; **PeptideMass** et **FindPept** qui m'ont permis d'analyser les résultats de spectrométrie de masse des protéines que j'ai purifiées ; et **ProSite** qui référence les motifs des protéines identifiées expérimentalement. Ensuite, j'ai beaucoup utilisé la base donnée **UniProt**³⁵¹, une ressource indispensable pour obtenir un maximum d'informations sur la séquence d'une protéine. Pour classer rapidement les protéines selon leurs familles et leurs architectures en domaines, je me suis servi de la base de données **Interpro** qui combine notamment les données de PFAM, PANTHER, SuperFam et ProSite. La base de données du **NCBI** et l'outil **BLAST** m'ont servi à retrouver des séquences, à explorer les génomes et vérifier les annotations de séquençage. La base de données **EggNOG** m'a beaucoup servi à mieux comprendre l'évolution des protéines que j'ai étudiée, et plus particulièrement la version 4.5 qui permet d'avoir un excellent aperçu de la phylogénie des protéines chez les eucaryotes. Ensuite j'ai effectué des alignements multiples de séquences principalement avec les algorithmes **ClustalO** et **MAFFT** et en comparant l'effet de différents paramétrages. Pour représenter et analyser les alignements multiples, j'ai utilisé essentiellement le programme **Jalview** que j'ai comparé aux programmes **MEGAX** et **UNIPRO**. À partir des alignements multiples obtenus, j'ai pu

inférer les arbres phylogénétiques des protéines que j'ai étudiées. Pour cela, j'ai d'une part utilisé les méthodes **UPGMA** et **Neighbour Joining** pour évaluer la pertinence phylogénétique des alignements. Ensuite j'ai utilisé la méthode du maximum de vraisemblance (*Maximum Likelihood*) disponible sur le serveur **PhyML** afin de construire les arbres définitifs. J'ai utilisé et le logiciel **FigTree** pour représenter et annoter les arbres obtenus.

b. *Visualisation en 3D des protéines*

Il existe de nombreuses applications qui permettent de représenter les protéines et l'une des plus flexibles est **PyMOL**, une application codée en « Python », qui permet de lire les fichiers « .pdb » (**protein data bank**) et les cartes de densité électronique qui leur sont attachées. De plus, il existe pour PyMOL de nombreuses extensions permettant d'effectuer des calculs simples. Dans le cas des LTPs, PyMOL m'a beaucoup servi pour définir les interactions intramoléculaires, les interactions protéine-lipide, les résidus de la protéine qui sont accessibles au solvant, ou pour mieux définir les caractéristiques des sites de liaison aux ligands. Aussi, il a été possible sur PyMOL de visualiser la conservation des résidus d'Osh6p à partir d'un fichier PDB généré par le serveur **ConSurf** à partir de mes alignements de séquence. Enfin, sur PyMOL, on peut représenter les protéines à façon, effectuer des mutations dans la séquence, greffer une molécule fluorescente ou représenter des membranes.

c. *Outils de résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann*

Une des extensions disponibles sur PyMOL est APBS (*Adaptative Poisson Boltzmann Solver*). L'équation de Poisson-Boltzmann permet de décrire, dans un espace à 3 dimensions, le potentiel électrochimique d'une particule électriquement chargée en solution, en tenant compte des interactions possibles entre cette particule et les ions présents dans la solution. Cette équation combine la relation entre le potentiel électrique et la densité de charge (équation de Poisson) avec la relation qui permet de déterminer la répartition des ions en solutions qui suivent une distribution statistique de Maxwell-Boltzmann dépendante de l'agitation thermique :

Équations de Poisson dans un espace euclidien :

$$\nabla^2\psi = \frac{\partial^2\psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2\psi}{\partial z^2} = -\frac{\rho_e}{\epsilon_r\epsilon_0}$$

Où ρ_e ; ϵ_r ; ϵ_0 correspondent respectivement à la densité de charge électrique locale (en C/m³) ; la constante diélectrique de l'eau ; et la permittivité du vide. La fonction ψ est le potentiel électrique.

Équation de Boltzmann :

$$c_i(x, y, z) = c_i^0 \cdot e^{-\frac{q_i \psi(x, y, z)}{k_B T}}$$

Où c_i ; c_i^0 ; q_i ; k_B et T correspondent respectivement à la concentration locale en ion positif ou négatif ; la concentration en ion dans la solution indépendamment de tout champ électrique ; la charge de cet ion qui peut être négative ou positive ($\pm 1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$) ; la constante de Boltzmann ($\sim 1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$) et la température (fixée par défaut à 310 K).

Nous pouvons remplacer la densité de charge ρ_e dans l'équation de Poisson par la somme, en tout point, de la concentration en cation et de la concentration en anions :

$$\rho_e = \sum_{i=1}^n q_i c_i(x, y, z) = \sum_{i=1}^n q_i c_i^0 \cdot e^{-\frac{q_i \psi(x, y, z)}{k_B T}}$$

En d'autres termes, à partir de la position des acides aminés polaires et surtout des acides aminés chargés d'une protéine, la résolution de cette équation permet de fournir une carte spatiale du champ électrique qui s'applique par unité de charge dans l'espace et en tenant compte de l'agitation thermique $k_B T$. Ainsi, on obtient le potentiel électrostatique en surface de la protéine. Cette représentation nous indique la propension d'une protéine à exercer une force de Coulomb attractive ou répulsive envers une surface chargée.

2. Méthodes de bio-ingénierie

a. Production des protéines

Au cours de ma thèse, les protéines ont été à la fois les outils et les objets d'étude. En tant qu'outils, j'ai été amené à produire des sondes fluorescentes permettant la détection de la PS et du PI(4)P et en tant qu'objet d'étude, j'ai été amené à produire Osh6p, l'ORD d'ORP8, et le domaine cytosolique de la protéine Ist2p, parfois avec des mutations ponctuelles ou des délétions afin de déterminer respectivement l'importance de certains acides aminés et de certains modules. Pour permettre l'étude *in vitro* des protéines, il est donc nécessaire de produire et de purifier les protéines. Le protocole de production et de purification de protéines que j'ai suivi est précisément détaillé dans un manuscrit méthodologique que nous avons publié (Lipp & Drin, 2018³⁵², disponible en annexe).

Pour produire le matériel protéique, nous utilisons une stratégie d'expression induite en système hétérologue bactérien. L'avantage de cette stratégie réside dans la flexibilité, la rapidité et le rendement de production. Nous utilisons la souche bactérienne E.coli BL21 Gold (DE3) comme des usines de production des protéines. Ces souches particulières sont déficientes en protéases LonA et OmpT afin d'éviter la dégradation de la protéine au cours du processus de production. Pour produire les protéines d'intérêt, nous utilisons un plasmide type pGEX-4T-3 pour Osh6p, Ist2p, les domaines PH_{FAPP} et C2_{Lact} et pGEX-6P-1 pour ORP8. Les vecteurs pGEX permettent l'expression de la séquence codante de la protéine d'intérêt fusionnée à la glutathione S-transferase (GST). La séquence de la GST est séparée de celle de la protéine d'intérêt par la courte séquence codante d'un peptide clivable : soit par la thrombine (LVPR/GS pour pGEX-4T-3), ou la *Precision Protease* (LFQ/GP pour pGEX-6P-1). La *Precision protease* résulte de la fusion de la protéase du rhinovirus humain (HRV) et de la GST. Dans le vecteur pGEX, la séquence codante de la protéine recombinante est sous contrôle d'un promoteur *tac*, un hybride entre le promoteur de l'opéron tryptophane et le promoteur de l'opéron lactose. Il s'agit d'un promoteur fort, permettant un haut niveau d'expression. Le promoteur *tac* est réprimé par l'expression constitutive du gène *lacI* porté par le vecteur pGEX. Pour induire l'expression de la protéine recombinante, on utilise l'IPTG qui est un inhibiteur de la protéine LacI.

Avant de lancer la production des protéines, on réalise les éventuelles mutations souhaitées. Pour cela, on utilise le kit de mutagenèse : Quickchange Lightning, qui permet d'introduire des mutations par PCR en utilisant un couple d'amorce qui contenant la mutation souhaitée (substitutions, courte insertion, ou courte délétion). Ensuite 20 μ L les bactéries électro-compétentes sont transformées par électroporation avec environ 2 ng d'ADN plasmidique.

Pour lancer la production de protéines, on part d'un inoculum de 5 mL de pré-culture fraîchement transformée qu'on ajoute à 500 mL de milieu LB de Lennox contenant 50 μ g/mL d'ampicilline. Ensuite les suspensions de bactéries, généralement 1 L de culture répartie en 2 flasques, sont incubées à 37°C sous agitation jusqu'à ce que la densité optique de la suspension atteigne des valeurs comprises entre 0,6 et 0.7 à une longueur d'onde de 600 nm. Lorsqu'on atteint cette densité, on ajoute dans la suspension 1 mM ou 0,1 mM d'IPTG pour induire l'expression de la protéine codée respectivement par les vecteurs pGEX-4T-3 ou pGEX-6P-1. Les suspensions sont ensuite incubées pendant 3 à 4 heures à 37°C pour les protéines PH_{FAPP} et C2_{Lact}, ou pendant une nuit à 18°C pour l'ORD d'ORP8 et à 30°C pour les protéines Osh6p et Ist2p. Ensuite, on sédimente les bactéries par centrifugation à 3 000 $\times g$, à 4 °C, pendant 30 minutes et on récolte les culots de 500 mL de culture dans 50 mL de tampon PBS froid. La suspension est centrifugée 30 minutes à 3 500 $\times g$, à 4 °C. Le surnageant est éliminé et les culots sont congelés et réservés au congélateur à 20 °C jusqu'à utilisation pour purification. L'efficacité de l'induction est contrôlée en prélevant un échantillon de 1 mL de culture juste avant l'induction à l'IPTG et un échantillon juste avant la première centrifugation. Immédiatement après le prélèvement, les échantillons sont centrifugés à 21 000 $\times g$ et le culot est repris dans 120 μ L d'eau milli-Q et 120 μ L d'une solution dénaturante appelée Bleu de Laemmli³⁵³. Ensuite les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes et les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS dénaturant (SDS-PAGE). Après migration, le gel est lavé à l'acide acétique pendant 5 minutes et les protéines sont révélées par une coloration au « Sypro Orange » qui est fluorescent aux UV. Les protéines marquées sur le gel sont ensuite révélées avec un imageur sous une lumière UV (maximum d'excitation à 300 nm)

b. Purification de protéines

La purification de protéines consiste à isoler les protéines d'intérêt du reste des molécules cellulaires. Au cours de ce processus, toutes les précautions sont prises éviter la dénaturation de la protéine. Pour cela, l'échantillon de départ est maintenu constamment à 4°C, dans un tampon réducteur. Le laboratoire, a retenu une approche en trois étapes de purification, qui permet d'obtenir un très bon de degré de pureté. La première étape correspond à l'extraction des protéines solubles contenues dans les bactéries. La deuxième étape consiste à isoler par affinité une quantité maximale de protéine d'intérêt. La troisième étape sert à augmenter le degré de pureté par chromatographie d'exclusion stérique en phase liquide, en utilisant un dispositif de filtration sur gel à débit rapide (HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*).

- **Extraction des protéines totales :**

Un culot bactérien est resuspendu énergétiquement dans 30 mL de tampon de lyse avec un vortex et une spatule jusqu'à l'obtention d'une suspension bien homogène. Le tampon de lyse est un tampon TND (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4 ; ou exceptionnellement pour l'ORD_{ORP8} : 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8) auquel on ajoute un agent réducteur (2 mM DTT) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (une pastille de Complete EDTA-free cocktail inhibitor, 1 µM bestatine, 1 µM phosphoramidon, 1 µg/mL de pepstatine et 1 mM de PMSF). Ensuite, on utilise un broyeur cellulaire. Ce dispositif, maintenu à 4 °C, applique une pression de 1,6 kbar sur la suspension contrainte de passer à débit rapide dans une chambre microfluidique. Les contraintes de cisaillement fracturent les membranes bactériennes et on obtient un lysat visqueux et clarifié. Ensuite, on incube le lysat pendant 30 minutes avec une pincée de DNase I et 2 mM de MgCl₂ pour dégrader l'ADN, ce qui rend le lysat plus fluide.

- **Séparation des protéines solubles :**

La solution est un homogénat des protéines totales dont on récupère un échantillon de 30 µL noté « T » pour les analyses. L'homogénat est centrifugé à 186 000 × *g* pendant 1 heure à 4 °C, puis on récupère le surnageant, noté « S » dans les analyses et le culot est resuspendu dans un même volume de tampon pour préparer l'échantillon « C ».

- **Rétention des protéines d'intérêt fusionnées à la GST**

Le surnageant est mélangé doucement avec 1,4 mL d'une pâte homogène de billes de sépharose-gluthatione 4B, pendant 4 h à 4°C. Les protéines fusionnées à la GST restent spécifiquement liées aux billes. Cette suspension est ensuite concentrée sur une colonne munie d'un filtre fritté. Les billes sont retenues par le filtre et la fraction qui traverse le filtre est notée « FT ». Cette fraction est analysée (30 µL) pour évaluer l'efficacité de liaison de la GST. Les billes sont ensuite lavées deux fois sur cette même colonne avec 20 mL de tampon TND. La fraction d'élution au cours de ces lavage est notée « W ». Enfin les billes sont resuspendues pour obtenir une pâte d'un volume de 2mL notée « B1 » dans les analyses. À cette étape les billes sont recouvertes de protéines fusionnées à la GST liée par la glutathione en surface des billes.

- **Séparation de la GST et isolement des protéines d'intérêt**

Pour cliver la liaison peptidique entre la protéine d'intérêt et la GST la suspension de billes est incubée pendant une nuit à 4 °C avec 0,5 unités enzymatiques de thrombine humaine ou 80 unités enzymatiques de *Prescission Protease* pour l'ORD_{ORP8}.

Après clivage, la suspension est centrifugée à $700 \times g$ et on réserve le surnageant dans lequel la protéine d'intérêt est isolée, il s'agit de la fraction d'élution notée « E1 ». On recommence cette étape 3 fois et on obtient 3 autres fractions d'élution notées « E2 », « E3 » et « E4 » qui sont toutes analysées. Le culot « B2 » contenant les billes liées à la GST est aussi conservé pour analyse. Les fractions « E1 », « E2 », « E3 » et « E4 », sont regroupées et concentrées à 2mL par centrifugation avec un tube concentrateur qui retient les protéines de taille supérieure à 10 kDa. Ce concentrât contient la protéine purifiée par affinité et il est utilisé dans les 24 h pour l'étape de chromatographie par exclusion de taille.

À chaque étape, 30 µL des fractions T, S, C, FT, W, B1, E1 à E4 et B2, sont prélevés pour en analyser le contenu protéique par SDS-PAGE. Ce contrôle permet d'apprécier la validité de chacune des différentes étapes de purification.

- **Chromatographie par exclusion de taille**

Après clivage, l'échantillon n'est pas pur, il contient encore beaucoup de contaminants comme des acides nucléiques. Une colonne de Séphacryl S200HR connectée à un circuit de chromatographie, est équilibrée avec du tampon TND. Ensuite la protéine

est injectée dans le circuit. L'échantillon traverse le gel à un débit de 1 mL/min et est dilué dans le volume de la colonne de 120 mL. Les molécules de haut poids moléculaire traversent facilement le gel et sont éluées rapidement, tandis que les protéines avec un plus petit poids moléculaires sont éluées plus tardivement car elles sont mieux retenues dans la matrice du gel. On mesure en temps réel l'absorbance des molécules qui sont éluées. À la sortie de la colonne, des fractions d'éluion de 2,5 mL sont collectées séquentiellement. L'absorbance à trois longueurs d'onde, nous indique la concentration en protéines de l'éluât. Le chromatogramme obtenu permet d'estimer les fractions qui contiennent la protéine d'intérêt. Ces fractions sont analysées par SDS-PAGE et celles qui contiennent effectivement la protéine d'intérêt pure sont collectées, rassemblées et concentrées entre 1 mL et 2 mL. On ajoute ensuite 10 % de glycérol qui est cryoprotecteur puis l'échantillon est fractionné, congelé en N₂ liquide et stocké à -80°C.

La concentration de la protéine est évaluée systématiquement par son absorbance à 280 nm ; par dosage à l'acide bicinchronique en comparaison à une gamme d'albumine sérique bovine (BSA) ; ainsi que par quantification relative à une gamme de BSA après dépôt sur gel SDS-PAGE.

c. Préparation des liposomes

Pour préparer des liposomes, nous utilisons des lipides purs en suspension dans du chloroforme (CHCl_3) parfois avec une petite quantité de méthanol pour les lipides à forte polarité comme le PI(4)P. Les quantités molaires de lipides désirés sont mélangées dans un ballon en verre. Les solutions stocks sont prélevées à l'aide de seringues en verre Hamilton. Lorsque les liposomes sont préparés avec des lipides fluorescents, le ballon est protégé de la lumière pour éviter tout phénomène de blanchissement (*photobleaching*). Le solvant est ensuite évaporé, pour cela le ballon est connecté à un évaporateur rotatif dont le bain-marie est thermostaté. La température choisie se situe entre 25 °C et 37 °C et tient compte de la température de fusion des lipides pour éviter la formation de différentes phases. Au cours de l'évaporation, la rotation du ballon permet, la formation d'un film lipidique qui recouvre la surface du verre. Les solvants sont éliminés de cette façon pendant au moins 1 heure sous vide. Ensuite, le film de lipides est hydraté avec 2 mL de tampon HK (50 mM Hepes/ 120 mM K-acétate, pH 7,4). Les lipides sont resuspendus énergétiquement par vortex avec une demi-douzaine de billes de verres. Le mélange obtenu est une suspension de vésicules multi lamellaires (MLVs) de tailles hétérogènes.

L'étape suivante consiste à obtenir des liposomes unilamellaires. Des tubes contenant le mélange de MLVs sont congelés en azote liquide. Ce traitement permet de rompre les membranes. La suspension est ensuite liquéfiée à 37 °C, ce qui forme spontanément des membranes unilamellaires. Cette étape de congélation / décongélation est répétée cinq fois pour diminuer la taille des MLVs et leur nombre de feuillet. Ensuite, la suspension peut être congelée en azote liquide et stockée à -20°C ou utilisée immédiatement.

Les liposomes unilamellaires sont ensuite extrudés à travers un filtre en polycarbonate avec des pores calibrés à 200 nm de diamètre. Pour cela nous disposons d'un mini-extrudeur. C'est un dispositif constitué de deux supports cylindriques en téflon percés au centre par un canal. Chacun de ces supports sont surmontés de joints toriques qui forment une enceinte dans lesquelles on place des préfiltres. Ensuite la membrane de polycarbonate est positionnée entre les deux supports. L'enceinte est séparée en deux compartiments par la membrane. Les cylindres en téflon sont fermement serrés l'un contre l'autre avec les joints toriques qui se font face, grâce à une enceinte en acier inoxydable munie d'un écrou. La suspension de liposomes est prélevée avec une seringue

en verre de 250 μL . L'aiguille de la seringue est connectée au dispositif sur un côté. Une deuxième seringue vide, identique, est connectée à la sortie du canal sur le côté opposé. En pressant sur les pistons, la suspension de liposomes est déplacée d'une seringue à l'autre. On effectue 21 passages du liquide à travers l'extrudeur pour obtenir une population homogène de liposomes calibrés à 200 nm de diamètre³⁵⁴. La suspension de liposomes extrudés est ensuite versée dans un tube à hémolyse et est prête à l'emploi.

d. *Marquage fluorescent par conjugaison de fluorophore*

Pour détecter l'interaction des protéines avec les membranes, on peut avoir recours à la spectroscopie de fluorescence. Pour cela, au laboratoire, nous employons une méthode de chimie utilisant un fluorophore pré-activé qui permet de lier de façon covalente le fluorophore NBD sur les cystéines des protéines. Le marquage au NBD est une substitution nucléophile. À un pH égal à 7,4, le IANBD réagit avec le soufre des cystéines mais pas celui des méthionines. Il ne réagit pas non plus avec les amines. Le pKa de la cystéine est de 8,5, mais il est bien inférieur lorsque celle-ci se trouve dans une protéine à cause du moment dipolaire induit par les autres acides aminés³⁵⁵. Pour cette raison, l'équilibre des thiols est déplacé vers la formation d'ions thiolates qui favorisent les substitutions nucléophiles et la réactivité avec le IANBD (**Fig. 53a**).

Pour permettre une conjugaison équimolaire du NBD avec une protéine, il est nécessaire que cette protéine contienne au moins une cystéine mais pas plus et cette cystéine doit être accessible au solvant. De plus, la position du fluorophore sur la protéine ne doit pas être trop éloignée d'une zone que l'on présuppose interagir avec la membrane. Au cours de ma thèse, j'ai pu employer cette méthode pour trois protéines : PH_{FAPP}, le domaine PH de la protéine FAPP1 (*four phosphate adaptor protéine 1* alias PLEKHA3) ; C2_{Lact}, le domaine C2 de la lactadherine (MFGE8), et la protéine Osh6p (**Fig. 53b**).

La liaison du domaine PH_{FAPP} est spécifique et sélective du PI(4)P. Grâce aux analyses structurales disponibles, nous savons que le domaine PH_{FAPP} interagit avec les membranes via une boucle β 1- β 2 en épingle qui s'insère dans des micelles, l'insertion étant stabilisée spécifiquement par la tête polaire du PI(4)P³⁵⁶. Pour cette raison, le laboratoire a conçu le domaine PH_{FAPP}(C37S, C94S, T13C), les cystéines endogènes sont remplacées par des sérines et l'unique cystéine vient remplacer une thréonine dans la boucle β 1- β 2³³⁹.

Le domaine C2_{Lact} est spécifique et sélectif de la PS. La structure du domaine C2_{Lact} est résolue et des analyses des différents mutants nous renseignent sur le fait que deux boucles à la base d'un tonneau β interagissent avec la membrane lors de la liaison à la tête polaire de la PS. L'interaction de la protéine avec la membrane dépend directement de la concentration en PS^{357,358}. De plus, une étude supplémentaire indique que les autres lipides chargés négativement ne permettent pas la liaison de ce domaine⁴⁰. L'avantage du

domaine C2_{Lact} est que son interaction avec la PS est indépendante du calcium, contrairement à d'autres domaines C2 comme celui de l'Annexine V ou des PKC α et β ⁶³. Le laboratoire a conçu le domaine C2_{Lact} (C270A, C427A, H352C), où l'histidine est située dans la boucle β 5- β 6 à la base du tonneau β ⁴⁸.

Afin d'étudier, *in vitro*, l'interaction d'Osh6p avec des membranes de composition différente, nous avons eu l'idée de conjuguer Osh6p au NBD en suivant la même méthodologie que celle développée pour les sondes de lipides. D'après sa structure, Osh6p possède en surface trois boucles flexibles distribuées dans sa longueur, en regard du couvercle. Ces boucles ne sont pas impliquées dans la liaison des ligands lipidiques. La boucle β 14- β 15 contient une thréonine dont la mutation en cystéine ne devrait pas gêner l'activité de la protéine. Nous avons donc cloné la protéine Osh6p(C62S, C162S, C389S, T262C), (**Fig. 53b,c**).

L'étape de marquage est introduite après la purification par affinité et avant la filtration sur gel à débit rapide. Après avoir concentré un échantillon de protéine d'intérêt à 1 mL, le DTT est éliminé en procédant à un échange de tampon par gravité sur une colonne de gel filtration Sephadex G25. L'élimination du DTT est cruciale car cet agent réducteur inhibe la réaction du IANBD avec la cystéine et il forme un adduit insoluble non désiré en se conjuguant avec le NBD.

Pour déterminer la quantité de IANBD nécessaire au marquage, l'absorbance à 280 nm de la protéine est mesurée et sa concentration est déterminée d'après son coefficient d'extinction molaire. Ensuite, nous suivons une règle stricte : Nous marquons la protéine avec un excès molaire exactement dix fois supérieur à la quantité de protéine dans l'échantillon. Initialement, le IANBD est sous forme de poudre qui doit être dissoute dans un solvant polaire aprotique : le diméthylformamide (DMF). Pour éviter la précipitation de la protéine, le volume de DMF ajouté au mélange ne doit pas excéder 5% du volume de l'échantillon de protéine.

Afin de gagner du temps lors de la préparation, j'ai mis au point le calcul suivant qui permet, de déterminer le volume V_{DMF} requis pour dissoudre 1 mg de IANBD déshydraté, en respectant les contraintes citées précédemment :

$$V_{DMF} = 0.05 \times \frac{m_0}{10 \times C \times MW_{IANBD}}$$

Où, V : est le volume de l'échantillon protéique (L), m_0 : correspond à la masse de NBD en poudre (0,001 g), C : est la concentration en protéines de l'échantillon (mol.L^{-1}), MW_{IANBD} : est la masse molaire du IANBD (420 g.mol^{-1}).

Ensuite, cette solution de IANBD dissout est ajoutée à l'échantillon de protéine, à hauteur de 5% du volume total de l'échantillon. Puis, le mélange est incubé sous agitation pendant 30 minutes, à 25°C, dans l'obscurité. Ensuite on laisse la réaction se poursuivre pendant 90 minutes, sur glace, toujours à l'abri de l'obscurité.

À la fin de la réaction, on ajoute à ce mélange un excès molaire de L-cystéine dix fois supérieur à la concentration de IANBD afin de bloquer le IANBD qui n'a pas réagi. La solution est gel filtrée par chromatographie en phase liquide à haute performance afin de d'éliminer les adduits qui ne nous intéressent pas.

Une fois la protéine marquée et purifiée, nous vérifions l'absorbance du NBD et celle du tryptophane des protéines afin de contrôler le ratio molaire de marquage, idéalement 1 NBD pour 1 protéine. De plus, la protéine est analysée par SDS-PAGE. Après migration, la fluorescence du NDB révèle les protéines marquées sur le gel sous UV.

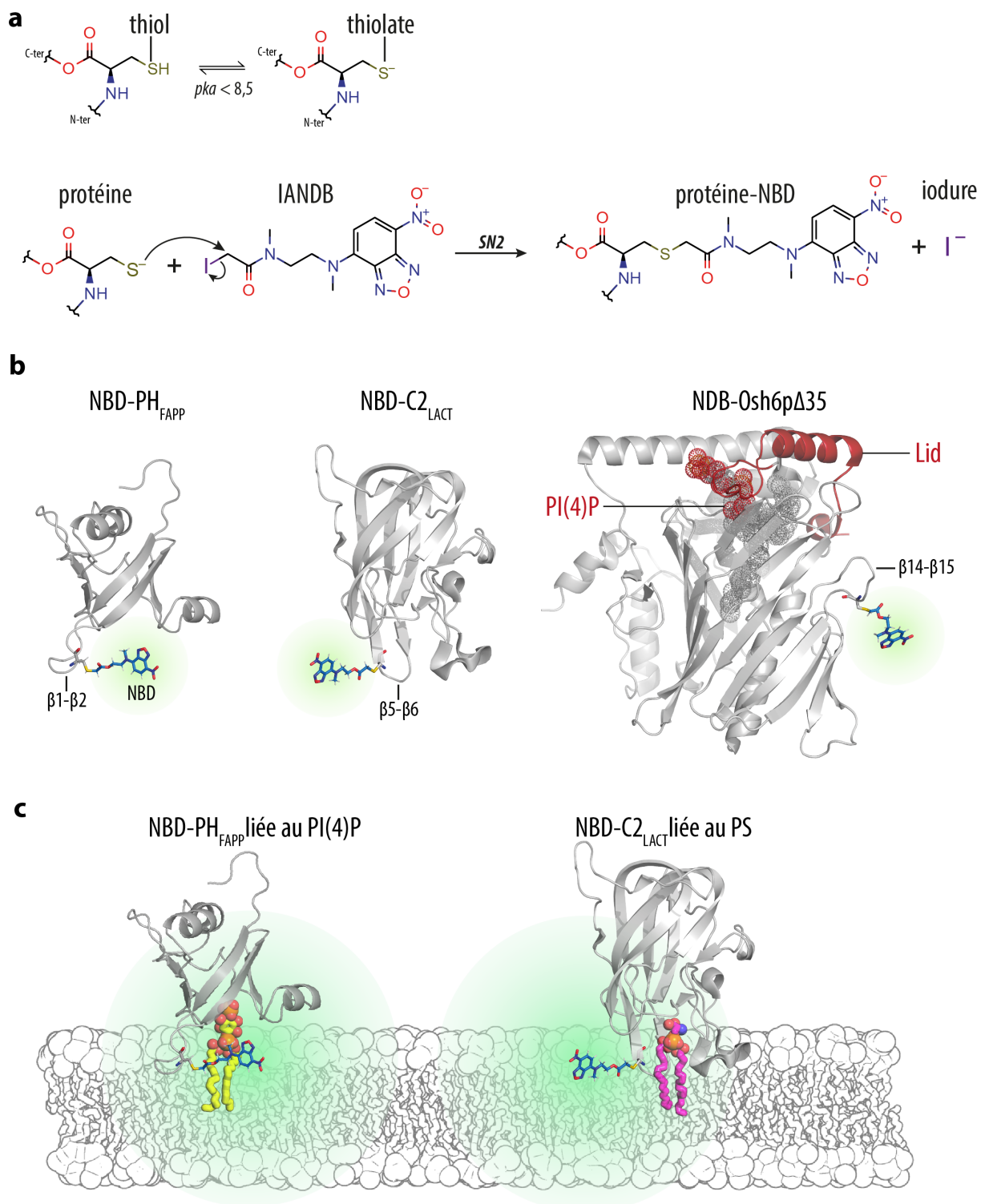


Figure 53 | Marquage fluorescent des protéines pour détecter leurs interactions avec les membranes

a) Réaction de conjugaison du IANDB avec le soufre des cystéines. **b)** Modèle structural des sondes NBD-C2_{Lact}, NBD-PH_{FAPP}, et de la protéine NBD-Osh6p marquée. **c)** Modèle d'interaction des sonde NBD-C2_{Lact} et NBD-PH_{FAPP} avec leur ligand respectif la PS et le PI(4)P. Pour ces deux protéines, lors de l'interaction avec la membrane, la boucle qui porte le NDB se trouve dans un environnement moins polaire que le solvant, ce qui se traduit en une émission de fluorescence du NDB.

3. Analyses des interactions moléculaires par spectroscopie en lumière UV - visible

a. Principes généraux de fluorescence, d'absorption et de diffusion de la lumière

La spectroscopie de fluorescence est une méthode d'analyse non destructive qui est particulièrement bien adaptée à la description et la quantification des phénomènes d'interaction moléculaire en biologie. Lorsque le fluorophore conjugué à une protéine passe d'un environnement polaire aqueux à un environnement moins polaire à la surface d'une membrane, son spectre d'émission de fluorescence est décalé vers le bleu et son intensité augmente. C'est ainsi que fonctionnent les sondes NBD-PH_{FAPP} et NBD-C2_{Lact} développées par le laboratoire^{48,339}.

La fluorescence permet d'évaluer une interaction protéine-membrane. Une autre méthode tel que la flottaison permet aussi de mesurer ce type d'interaction, mais son inconvénient est le manque de résolution temporelle. De plus, la flottaison nécessite parfois de nombreuses répliques tant elle est délicate à réaliser et il n'est pas encore possible d'automatiser ce procédé de mesure. Ainsi, la spectroscopie de fluorescence vient en complément. Grâce à la mutagenèse dirigée et à la conjugaison de fluorophores, cette méthode de mesure est flexible, répétable et résolutive à l'échelle de la seconde. La fluorescence offre donc de nouvelles perspectives concernant l'étude des protéines de transfert lipidique.

La photoluminescence est le résultat de la restitution d'un photon ayant perdu de l'énergie après avoir été absorbé par une particule. La photoluminescence peut correspondre à deux phénomènes : la fluorescence et la phosphorescence, qui se distingue par l'intervalle de temps, appelé temps de relaxation, qui s'écoule entre l'absorption du photon et l'émission du photon. La fluorescence est quasiment immédiate, avec un temps de relaxation de l'ordre de la femtoseconde à la nanoseconde, alors que la phosphorescence résulte d'un temps plus long (\geq ms).

Le phénomène de fluorescence est décrit dans les années 1850 par Herschel et Stokes. Ils s'étaient aperçus que les fluorophores émettaient toujours une lumière de plus haute longueur d'onde que celle qui ayant servi à les illuminer. Ce phénomène est appelé

décalage de Stokes ou décalage dans le rouge (*redshift*) (**Fig. 54**). L'explication de ce phénomène s'explique par un mécanisme à l'échelle atomique. Dans un atome, chaque électron lié possède un état fondamental qui correspond à une énergie minimum (ou fréquence fondamentale) nécessaire pour sa liaison avec le noyau. L'électron peut aussi adopter un état excité dans lequel il porte un multiple entier de son énergie à l'état fondamental. Pour chacun de ces niveaux d'énergie, l'électron décrit une orbitale atomique dans laquelle il est probable de l'observer. Une orbitale ne peut théoriquement pas être occupé par deux électrons de même spin. Enfin, si un électron reçoit exactement la quantité d'énergie qui le sépare d'un état plus haut en énergie, il acquiert ce nouvel état quantique, il change d'orbitale, c'est la transition électronique.

Lorsqu'un photon entre en collision avec un électron porté par une molécule on observe deux types de phénomènes (Fig. 55a, b)

1) Si l'énergie du photon n'est pas égale à une énergie de transition électronique, alors le photon est réfléchi : c'est le phénomène de **réflexion diffuse**. Dans la majorité des cas, cette diffusion est élastique, le photon ne perd pas d'énergie et seule sa direction change, elle est appelée diffusion de Rayleigh. Dans de rare cas, la diffusion peut être inélastique, le photon est diffusé avec une longueur d'onde plus grande, l'électron intercepte une partie de son énergie qui se dissipe ensuite sous forme d'énergie vibrationnel et de chaleur. La diffusion inélastique est étudiée en spectroscopie Raman.

2) Si l'énergie du photon incident est égale à une énergie de transition électronique, alors le photon disparaît, son énergie est captée par l'électron qui bascule dans un état excité et change d'orbitale. C'est le phénomène d'**absorption de la lumière**. Dans un état excité, la molécule est instable, elle retourne à l'état fondamental au cours du processus de relaxation. Idéalement, dans le vide, la relaxation s'accompagne immédiatement de l'émission d'un photon dont l'énergie est identique à celui qui a été absorbé, c'est le principe d'émission spontanée de la lumière : la luminescence.

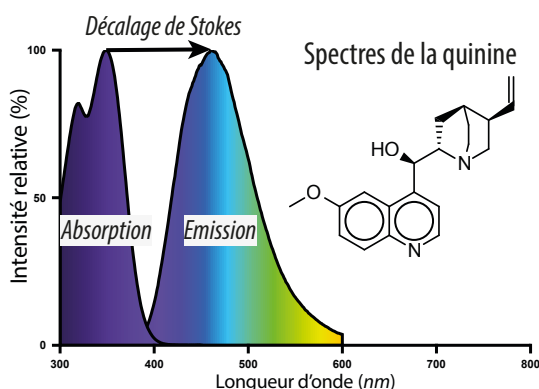


Figure 54 | Le décalage de Stokes

Stokes avait étudié la fluorescence de la quinine, c'est une molécule complexe, avec deux cycles aromatiques qui lui confère ses propriétés fluorescentes. Lorsqu'elle est éclairée avec des UV, elle émet une lumière de plus basse énergie, c'est à dire de plus grande longueur d'onde. Le décalage entre le spectre d'absorption et le spectre d'émission est appelé décalage de Stokes.

La luminescence d'une molécule est la conséquence de la nature de ses liaisons chimiques

Beaucoup de molécules organiques sont fluorescentes car elles ont une structure chimique particulière. Pour former une liaison chimique deux électrons de même nombre quantique mais de spin opposé s'apparient, leurs orbitales atomiques se recouvrent et définissent une orbitale moléculaire. Dans les molécules organiques, les deux orbitales atomiques courantes sont de types « s » et « p » (p_z, p_y, p_x). Le recouvrement de ces orbitales donne des orbitales moléculaires de type « σ », « π » ou « n ». Une orbitale « σ » est la combinaison de deux orbitales « s » ou deux orbitales « p_z ». Une orbitales π est la combinaison de deux orbitales « p_x » ou « p_y ». Une orbitale « n » est la combinaison des orbitales atomiques de deux électrons appartenant au même atome. L'orbitale « n » correspondent aux doublets non-liants de la structure de Lewis (**Fig. 55c**).

La stabilité des liaisons chimiques dépend du niveau d'énergie des orbitales moléculaire

Les orbitales « σ » et « π » peuvent être de deux natures. Elles sont **orbitales liantes** lorsque les fonctions d'onde des deux électrons appariés sont en phase. Dans ce cas, la liaison chimique est extrêmement stable, le niveau d'énergie est minimisé. Elles sont **orbitales anti-liantes** lorsque les fonctions d'onde des deux électrons sont en opposition de phase, la probabilité de trouver les deux électrons appariés ensemble autour la liaison est nulle. Ainsi, les orbitales anti-liantes sont scindées symétriquement de part et d'autre du centre interatomique. Dans ce cas, les deux électrons appariés sont moins bien liés, les noyaux ont tendance à se repousser, la liaison chimique est moins stable et le niveau d'énergie est maximisé. Lorsqu'une molécule est dans son état fondamental, les orbitales anti-liantes sont inoccupées, c'est-à-dire vide de tout électron. Mais, lorsqu'un photon est absorbé par un électron, celui-ci est excité et il occupe une orbitale anti-liante. Les orbitales anti-liantes occupées par des électrons sont notées « σ^* » et « π^* » pour décrire l'état d'excitation. Quant aux orbitales « n » elles sont dites **orbitales non-liantes**. En général, les orbitales non-liantes ont une énergie supérieure à celle des orbitales liantes mais inférieure aux orbitale anti-liantes (**Fig. 55d**).

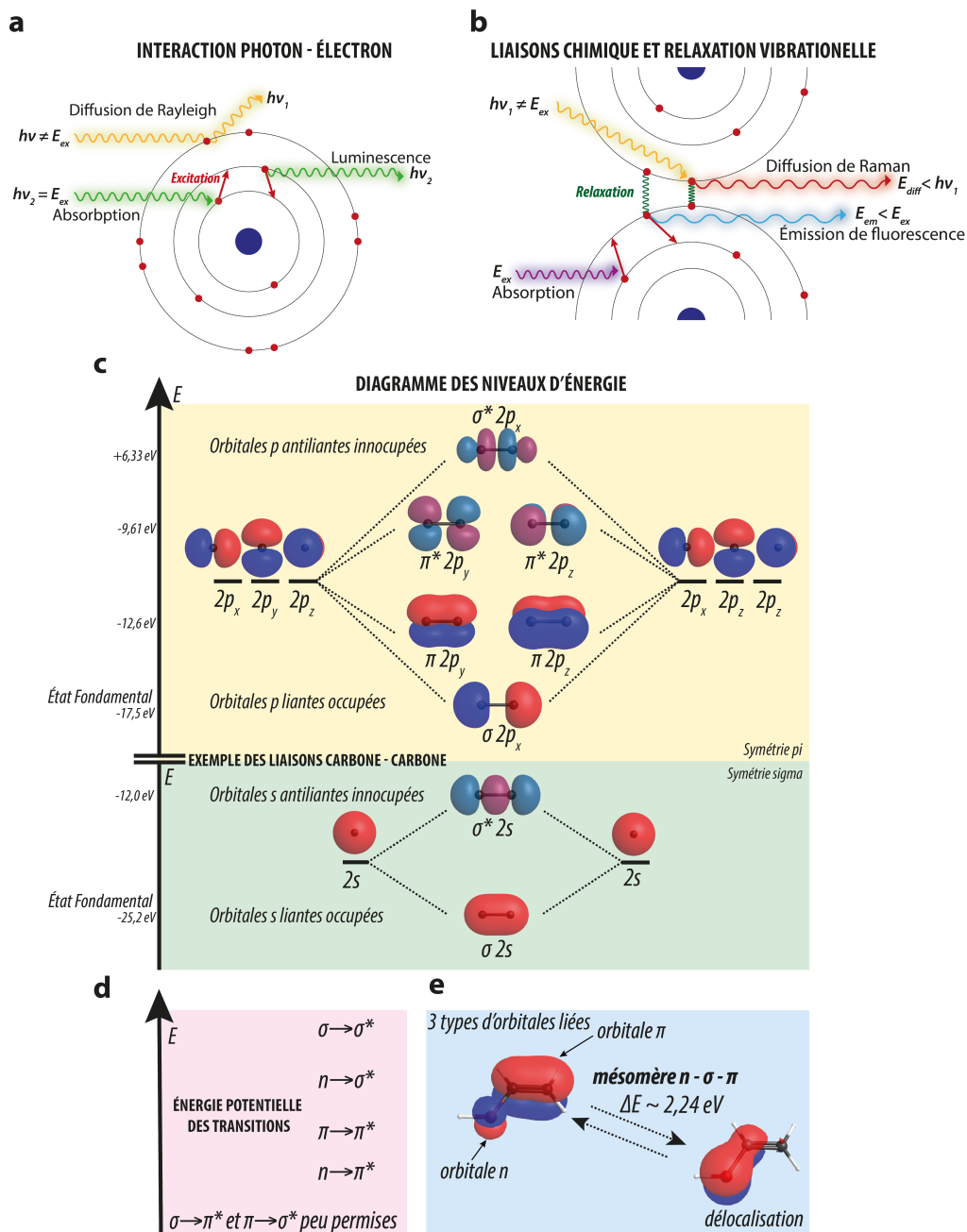


Figure 55 | Le niveau d'énergie des électrons définit les interactions lumière-matière

a) Idéalement, dans le vide, la collision d'un photon sur un électron génère deux phénomènes : soit le photon est diffusé si son énergie n'est pas égale à celle requise pour que l'électron change d'orbitale, soit cette énergie est égale : le photon est absorbé, l'électron est excité, il change d'orbitale. Ensuite l'électron retourne dans son état fondamental et émet un photon de luminescence. **b)** Les liaisons chimiques entre les électrons occasionnent des pertes d'énergie par relaxation. Ceci conduit soit à la diffusion de Raman, soit à une émission de fluorescence. **c)** Diagramme de niveaux d'énergie d'une liaison carbone-carbone. La combinaison des orbitales atomiques « s » ou « p » forme des orbitales moléculaires dites orbitales liantes « σ » ou « π ». Huit orbitales moléculaires sont possibles avec des niveaux d'énergie distincts. Lorsque deux électrons liants d'une orbitale σ ou π emmagasinent de l'énergie, ils passent dans un état excité et ils décrivent des orbitales anti-liantes « σ^* » ou « π^* ». Les niveaux d'énergie en eV sont donnés à titre indicatif. **d)** Les transitions d'état électronique peuvent être classées selon leurs niveaux d'énergie. Une liaison σ absorbe plutôt des longueurs d'onde dans les UV (haut en énergie), tandis que qu'une liaison π absorbe plutôt dans la gamme de la lumière visible (plus faible en énergie). **e)** Les orbitales non-liantes participent au processus de délocalisation électronique et favorise des transitions d'état de faible énergie.

Le nombre et la nature des orbitales moléculaires définissent les niveaux d'énergie d'une molécule

Plus il y a de liaisons dans une molécule, plus le nombre de niveaux d'énergie est élevé. Une liaison simple est caractérisée par deux niveaux d'énergie : « σ » et « σ^* ». Une liaison double est caractérisée par 6 niveaux d'énergie : deux orbitales liantes « π », deux orbitales anti-liantes « π^* », une orbitale « σ » la plus basse en énergie et une orbitale anti-liante « σ^* » la plus haute en énergie. De plus, chaque orbitale « n » ajoute à la molécule un niveau d'énergie supplémentaire. Enfin, l'alternance des types d'orbitales au sein d'une molécule est à l'origine de la délocalisation des électrons, ce qui augmente le nombre de niveaux d'énergie possibles. Par exemple, la présence d'une alternance de liaisons « π - σ - n », provoque l'oscillation la molécule entre deux niveaux d'énergie très proches par effet mésomère. Les électrons « π » sont soit localisés normalement, soit, et c'est l'état le plus stable, ils interagissent avec ceux de l'orbitale « n » autour de la liaison « σ ». L'effet mésomère s'applique également à l'alternance « π - σ - π » (**Fig. 55e**).

Dans une molécule la délocalisation forme un système conjugué, ce qui est le cas des molécules aromatiques et des hétérocycles carbone-azote comme le tryptophane. Les systèmes conjugués possèdent donc un très grand nombre de niveau d'énergie très proches et ils absorbent donc particulièrement bien la lumière autour d'une longueur d'onde donnée. Comme une molécule possède de nombreux niveaux d'énergie, les spectres d'absorption et d'émission des molécules définissent des bandes spectrales caractéristiques de l'ensemble des transitions d'état possibles.

Finalement, les propriétés quantiques des molécules rendent compte de leur effet sur une lumière incidente et explique pourquoi les molécules absorbent et réémettent les photons s'ils correspondent à des paquets d'énergie compatibles avec les transitions d'état. Par ailleurs, ces propriétés expliquent pourquoi les molécules contenant de nombreuses liaisons conjuguées sont de bons chromophores.

L'énergie moléculaire peut se dissiper autrement que par l'émission d'un photon

Les transitions électroniques suffisent à expliquer les propriétés qu'ont les molécules à absorber et réémettre la lumière dans le vide. Mais elles ne suffisent pas à expliquer pourquoi les molécules fluorescentes émettent une lumière de plus faible énergie décalée vers le rouge par rapport à la lumière d'excitation.

L'énergie interne d'une molécule est composée de plusieurs termes d'énergie. En plus de l'énergie cinétique des électrons qui est responsable des émissions radiatives (lumière), la molécule absorbe de l'énergie qui est à l'origine d'émissions non-radiatives (chaleur). L'énergie moléculaire se décompose comme suit :

$$E_{\text{Moléculaire}} = E_{\text{électronique}} + E_{\text{vibrationnelle}} + E_{\text{rotationnelle}} + E_{\text{nucléaire}} + E_{\text{translationnelle}}$$

Dans cette égalité, l'énergie cinétique translationnelle des molécules peut être ignorée, car les mouvements des molécules se déroulent sur des temps extrêmement longs par rapport aux autres phénomènes. L'énergie nucléaire aussi peut être ignorée car son ordre de grandeur est très inférieur aux autres énergies. Ainsi, les énergies cinétiques des électrons individuels, leur vibration et leur rotation suffisent pour expliquer les phénomènes d'interaction lumière-matière mis en jeu lors de la fluorescence :

$$E_{\text{Moléculaire}} \approx E_{\text{électronique}} + E_{\text{vibrationnelle}} + E_{\text{rotationnelle}}$$

L'énergie électronique décrit le niveau d'énergie de la molécule qui peut être dans son état fondamental ou dans un des états excités. L'énergie vibrationnelle décrit le mode d'oscillation des atomes autour des liaisons qui les relient. L'ordre de grandeur des variations d'énergie vibrationnelle appartient au domaine des infrarouges. L'énergie rotationnelle correspond au moment angulaire de l'ensemble des électrons de la molécule. Le moment angulaire dépend des nombres quantiques qui décrivent les électrons. L'ordre de grandeur de l'énergie rotationnelle est du domaine des micro-ondes.

Les composantes d'énergie vibrationnelle et rotationnelle sont à l'origine du décalage observé par Stokes. Une molécule qui absorbe un photon ne réémet pas systématiquement un photon avec la même énergie. Une partie de l'énergie se dissipe sous forme de chaleur par relaxation vibrationnelle ou rotationnelle. De plus, ces énergies sont minimes par rapport à l'énergie de la lumière UV/visible, c'est pourquoi les spectres d'émission et d'absorption des molécules apparaissent comme un continuum dans lequel on ne peut pas distinguer les différentes raies d'absorption ou d'émission.

Les transitions d'état sont représentées sur un diagramme de Jablonski

Les états électroniques d'une molécule sont représentés par un diagramme de Jablonski (**Fig. 56**). Chaque niveau d'énergie est représenté par une ligne horizontale et les changements d'état possibles sont représentés par des flèches qui relient deux niveaux d'énergie. Sur ce diagramme, pour simplifier, les sous-niveaux d'énergie rotationnelle ne sont pas représentés. Ce diagramme permet d'expliquer tous les mécanismes de photoluminescence.

L'état fondamental de la molécule est noté S_0 , et ses états excités sont notés S_1, S_2, \dots, S_n . La lettre S désigne l'état *singulet*, c'est-à-dire que tous les électrons sont appariés.

Tout d'abord, la lumière excite une molécule, la molécule passe de l'état S_0 , à un état excité. Typiquement, le photon doit avoir une énergie exactement égale à l'énergie de transition de S_0 à S_1 , de S_0 à S_2, \dots , de S_0 à S_n . Ces transitions sont les plus fréquentes et elles correspondent chacune aux différents pics d'absorption d'une molécule. Par exemple, le tryptophane et le NBD ont deux pics d'absorption dans le domaine UV proche-visible qui indiquent ces transitions d'état. Le pic d'absorption à la longueur d'onde la plus grande, correspond à la transition la plus faible en énergie ($S_0 \rightarrow S_1$)

Néanmoins, l'énergie du photon peut être légèrement supérieure de l'ordre de l'énergie de transition d'un mode vibratoire à un autre. Ce type de transition explique la plage d'absorption à gauche (vers le violet) d'un pic d'absorption. Mais l'énergie du photon peut aussi correspondre à l'énergie de transition depuis un des modes vibrationnels de l'état fondamental à un mode vibratoire de l'état excité. Cela explique la plage d'absorption à droite (vers le rouge) du pic d'absorption.

En termes de temps, la transition d'un électron qui absorbe un photon est considérée comme immédiate, elle se déroule en moins de 10^{-15} secondes, et est peut-être de l'ordre 10^{-18} secondes, la limite de nos capacités de mesure actuelles³⁵⁹.

La règle de Kasha postule que l'émission de fluorescence a toujours lieu à partir du niveau S_1 . Toutes les molécules excitées qui ont atteint un niveau d'énergie supérieur à S_1 vont rapidement se relaxer vers cet état qui correspond à un puit d'énergie. Pour cela, l'énergie se dissipe par relaxation vibrationnelle, représentée par des flèches ondulées sur le diagramme de Jablonski.

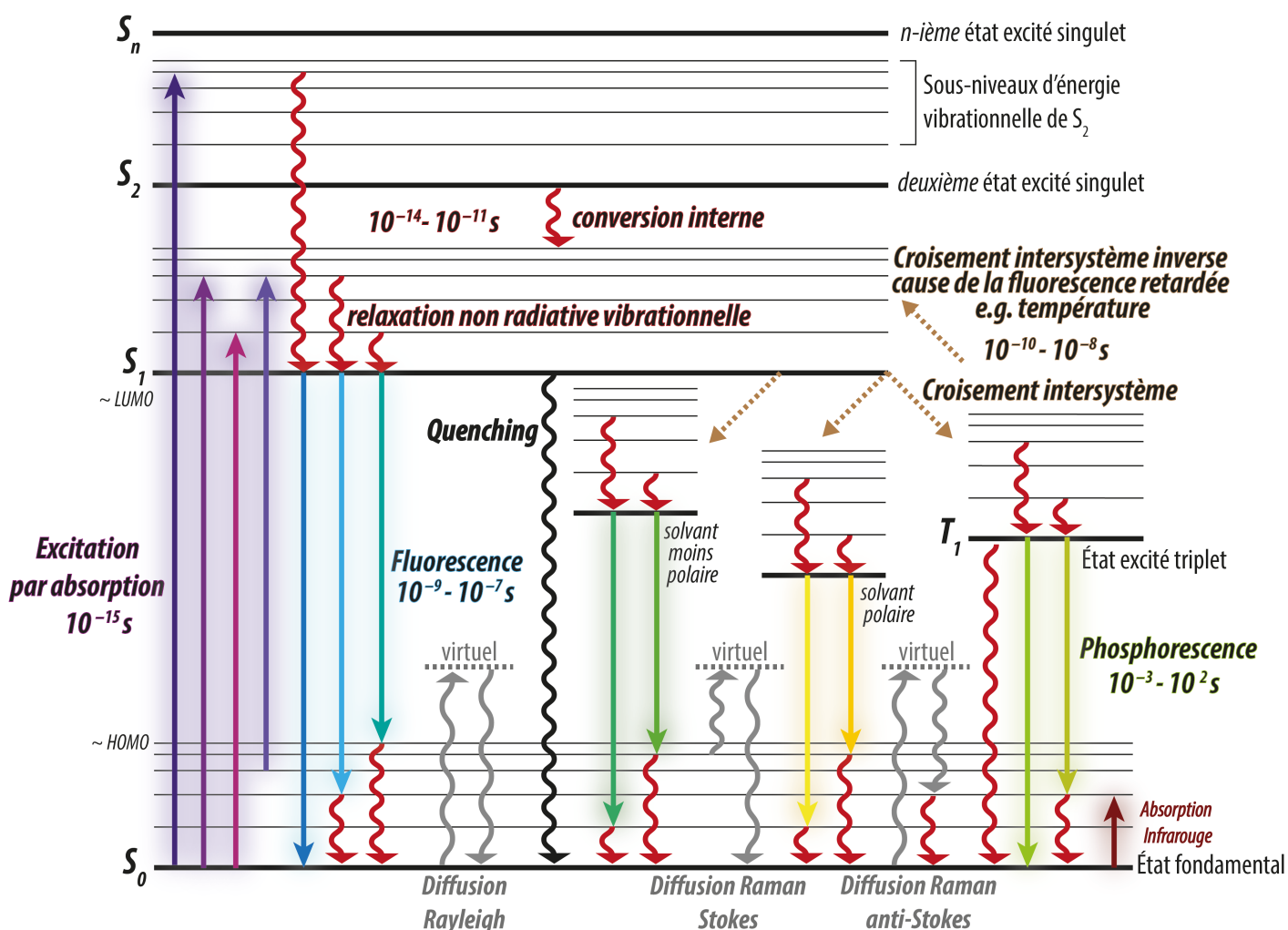


Figure 56 | Le diagramme de Jablonski explique le phénomène de fluorescence

Pour chaque événement de transition, la durée de vie moyenne est indiquée en seconde. Les phénomènes de diffusion sont indiqués en gris, mais ils ne correspondent à aucune transition électronique. Les termes HOMO et LUMO désignent respectivement la plus haute orbitale moléculaire occupée (liante) et la plus basse orbitale moléculaire inoccupée (anti-liante).

Les relaxations vibrationnelles sont possibles parce que la différence d'énergie entre deux modes vibratoires adjacents est petite et leurs fonctions d'onde se chevauchent. Il s'agit du principe de Franck-Condon qui postule que : « la probabilité de transition d'un mode vibratoire à un autre est proportionnelle au carré de l'intégrale de recouvrement entre les fonctions d'onde de ces modes vibratoires ». Ce principe explique pourquoi l'intensité des transitions électroniques est maximale pour un mode vibratoire particulier qui n'est pas forcément le niveau le plus bas en énergie. De plus, ce principe est valable aussi bien lors de l'absorption que lors de l'émission. C'est pourquoi, dans la majorité des cas, le spectre d'émission est l'image miroir du spectre d'absorption de part et d'autre de la longueur d'onde qui correspond à l'énergie de la transition majoritairement favorisée dans une molécule.

Les transitions vibrationnelles sont à l'origine du phénomène de conversion interne, c'est-à-dire le passage d'un état électronique à un autre, sans apport, ni émission de photon. Au cours de la relaxation vibrationnelle, l'énergie est perdue par la molécule sous forme de vibration (phonon) qui se propage dans le milieu en générant de la chaleur. Enfin, le temps de relaxation vibrationnelle est rapide, il est de l'ordre de 10^{-14} à 10^{-11} secondes³⁶⁰ et ce phénomène s'étudie en spectroscopie infrarouge.

Pour illustrer la règle de Kasha et le principe de Franck Condon, on peut prendre l'exemple du tryptophane (**Fig. 57**). En milieu aqueux à pH 7, il absorbe de façon maximale à 219 nm et 278 nm mais n'émet qu'un seul pic autour à 354 nm, même lorsqu'il est excité uniquement à 219 nm³⁶¹. Le pic à 219 nm correspond à une transition $S_0 \rightarrow S_2$, ce pic est attribuable aux transitions de haute énergie $\sigma \rightarrow \sigma^*$ et $n \rightarrow \sigma^*$ du groupement acide amino-carboxylique. Quant au pic à 278 nm qui est reflété lors de l'émission de fluorescence à 354 nm, correspond à la transition $S_0 \rightarrow S_1$ la plus faible en énergie, elle est attribuable au cycle indole qui favorise des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \pi^*$.

Enfin, dès que la molécule est dans l'état S_1 , elle peut émettre un photon de fluorescence. Lors d'une transition $S_1 \rightarrow S_0$, un électron perd un paquet d'énergie exactement égal à la différence d'énergie entre ces deux états et il en résulte l'émission instantanée d'un photon qui porte cette énergie. L'émission de fluorescence est symbolisée par les flèches rectilignes décroissantes sur le diagramme de Jablonski.

La transition $S_1 \rightarrow S_0$ est favorisée en théorie, mais le principe de Franck-Condon s'applique aussi lors de ce processus. La molécule peut passer de S_1 à un sous niveau

vibratoire de S_0 et cela explique pourquoi la bande d'émission de fluorescence est souvent étalée à droite (vers le rouge) du maximum d'émission de fluorescence.

Le diagramme de Jablonski aide ainsi à mieux comprendre les principes à l'origine du décalage de Stokes. Lors des transitions d'état $S_0 \rightarrow S_n \rightarrow S_1$, il y a systématiquement une perte d'énergie sous forme de vibration et par conséquent, les photons émis, lors de la transition $S_1 \rightarrow S_0$, portent une énergie plus faible que les photons d'excitation. Le décalage de Stokes sera d'autant plus grand qu'il y aura d'étapes dans le diagramme de Jablonski. Par conséquent, plus la molécule est longue, plus le nombre d'états excités possibles est grand et plus il y aura d'effets mésomères dans la molécule, alors plus le décalage de Stokes sera grand. En outre, la nature du milieu aura aussi une incidence toute particulière sur ce décalage.

La durée de vie de la fluorescence

L'émission de fluorescence est un processus beaucoup plus lent que l'absorption et la relaxation vibrationnelle. La fluorescence se produit sur des périodes allant de 10^{-9} à 10^{-7} secondes. Ce retard s'explique principalement parce que les états excités sont métastables, ils correspondent à des puits d'énergie. Une transition $S_1 \rightarrow S_0$ est conditionnée par le franchissement d'une barrière d'énergie virtuelle. Pour franchir cette barrière, il n'y a pas besoin d'apport d'énergie. Il s'agit d'un événement dont la probabilité de survenue dépend uniquement du nombre de particules excitées.

La probabilité de particules excitées N^* à l'instant t peut s'exprimer par une équation différentielle de ce type :

$$-\frac{\partial N^*(t)}{\partial t} = \Gamma_{rad} N^*(t)$$

Qui a pour solution :

$$N^*(t) = N_0^* e^{-\Gamma_{rad} t}$$

Où Γ_{rad} est un coefficient d'Einstein qui décrit la probabilité par unité de temps d'une transition d'état $S_1 \rightarrow S_0$, c'est une constante de vitesse radiative en s^{-1} ; et N_0^* est le nombre de molécules en S_1 à t_0 .

La durée de vie moyenne de fluorescence intrinsèque d'un fluorophore : $\tau_{rad} = \frac{1}{\Gamma_{rad}}$, est de l'ordre de 10^{-9} secondes. Mais cette durée ne suffit pas à expliquer la durée vie totale de la fluorescence. En effet, un fluorophore n'est jamais dans le vide, le retard peut être d'autant plus important qu'il y a de possibilités de relaxation non radiative. C'est pourquoi, dans un système donné, on décrit le coefficient d'émission de fluorescence d'un fluorophore Γ tel que :

$$\Gamma = \Gamma_{rad} + k_{nr} ,$$

Où k_{nr} est la constante de désexcitation non radiative

À partir des relations précédentes, il est déduit que la durée de vie totale de fluorescence : $\tau = \frac{1}{\Gamma_{rad} + k_{nr}}$, est toujours inférieure à la durée de vie de fluorescence intrinsèque τ_{rad} . La constante k_{nr} dépend directement des paramètres du solvant : concentration, pH, température, viscosité, etc. Le milieu a pour effet de retarder la fluorescence et ce retard est d'autant plus important qu'il y a de possibilités pour la

molécule de perdre de l'énergie de façon non radiative. Si bien que plus la molécule met du temps à émettre un rayonnement, plus elle perd de l'énergie et donc plus le décalage de Stokes est grand.

Les pertes de fluorescence qui sont dues à l'environnement moléculaire sont représentées sur le diagramme par les croisements intersystèmes. Les croisements intersystèmes correspondent soit à la transition vers un état électronique particulier (état triplet), soit à des transitions vibrationnelles supplémentaires partagées avec le solvant représentées sur le diagramme par des flèches en pointillé. Les croisements intersystèmes sont un peu plus lents que les croisements internes, mais plus rapide que l'émission de fluorescence, avec une durée de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-8} secondes.

Les croisements intersystèmes causés par les interactions intermoléculaires sont à l'origine de l'atténuation de de la fluorescence des fluorophores en milieu aqueux. L'eau est diamagnétique, elle a un moment dipolaire du fait de ses charges électriques distribuées de façon asymétrique. Lorsqu'un fluorophore est dans un état excité, que son moment magnétique change, l'orientation des molécules d'eau qui l'entourent vont aussi se réorienter. En changeant d'orientation, les molécules interceptent mieux l'énergie vibrationnelle du fluorophore, le fluorophore résonne mieux avec les molécules qui l'entoure. Dans un solvant, il y aura donc une perte d'énergie et un léger retard du temps d'émission de fluorescence, proportionnellement à la polarité de l'environnement moléculaire qui entoure le fluorophore.

Extinction de fluorescence et photoblanchiment

Le passage dans un état triplet peut être irréversible et induire une extinction complète de la fluorescence. Les émissions radiatives sont rarement permises sauf en cas de phosphorescence car la molécule se relaxe de manière vibrationnelle et rotationnelle avec le solvant sans émettre de photon. C'est ce qu'on appelle le *quenching* d'émission. En parallèle, on peut aussi observer un *quenching* d'absorption qui se produit lorsque les molécules autour d'un fluorophore dans son état fondamental forment avec lui un complexe qui défavorise l'absorption des photons, mais cela ne fait intervenir l'état triplet.

Une autre possibilité est le photoblanchiment (*photobleaching*), plus la molécule est excitée longtemps, plus on accroît la probabilité qu'elle se retrouve dans un état triplet. L'état triplet est très réactif et peut provoquer des réactions chimiques irréversibles. Dans

cet état, un électron de la molécule s'apparie avec des électrons libres présent dans le solvant. L'oxygène, étant un oxydant puissant qui capte les électrons, il accroît cette probabilité. L'oxygène favorise donc le photoblanchiment.

Le rendement quantique de fluorescence

Comme la fluorescence est proportionnelle à la quantité exacte de particules excitées par un nombre déterminé de photons, on peut pour une molécule dans un milieu donné, définir un rendement quantique de fluorescence ϕ_F par l'égalité suivante :

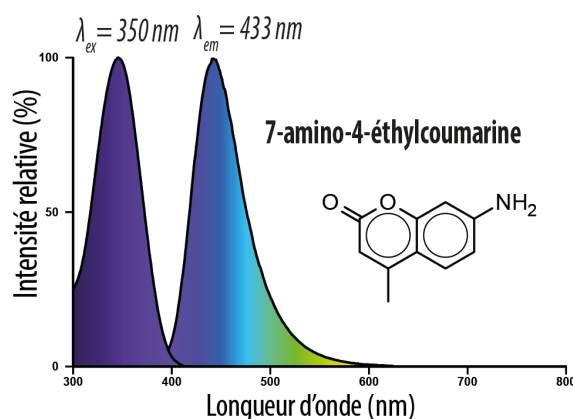
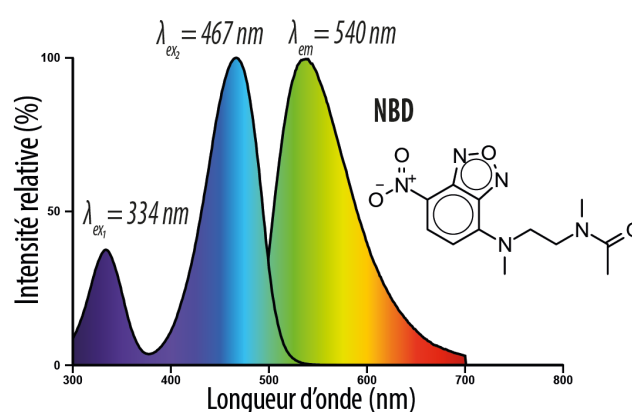
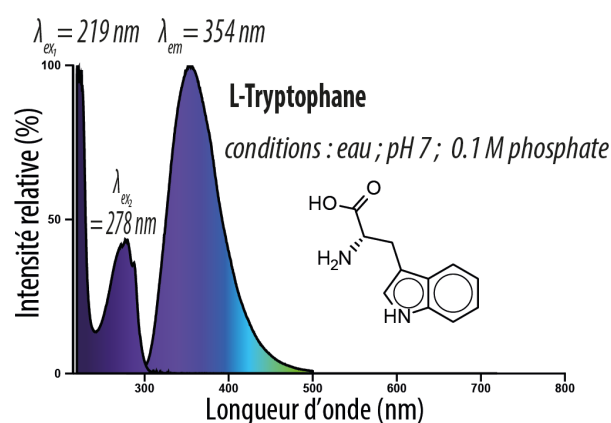
$$\phi_F = \frac{\# \text{ photons émis}}{\# \text{ photons absorbés}} = \frac{\Gamma_{rad}}{\Gamma} = \frac{\Gamma_{rad}}{\Gamma_{rad} + k_{nrad}}$$

Ce principe est central dans mes travaux de thèse qui étudient l'interaction protéine/membrane. En 1981, l'effet de la dynamique de l'interface eau-membrane sur les fluorophores a été mis au jour par spectroscopie de fluorescence résolue sur sa durée de vie³⁶². Si une membrane porte un fluorophore, plus la membrane est fluide, notamment par la présence de lipides polyinsaturés, plus le temps de vie de fluorescence du fluorophore est raccourci, et donc plus le décalage vers le bleu est important, le rendement de fluorescence est meilleur, il y'a moins de perte d'énergie dans le solvant.

Dans notre modèle d'étude, lorsque les domaines C2_{Lact} et PH_{FAPP}, ou Osh6p sont conjugués avec le NBD, nous détectons leur liaison à des liposomes en mesurant l'émission de fluorescence du NBD. L'augmentation de l'intensité de fluorescence du NBD indique que celui-ci se trouve dans un environnement moins polaire.

Finalement, ce qu'il faut retenir des principes d'interaction lumière-matière, c'est qu'ils permettent de mettre au point des outils versatiles particulièrement adapté à l'étude des molécules biologiques. La fluorescence permet de révéler des molécules qui sont invisibles à notre échelle et de décrire leur comportement. Chaque molécule aura un profil spectrale particulier qui sera influencé par le solvant. Étant donné que ces mécanismes font intervenir des mécanismes quantiques, l'intensité de lumière absorbée ou émise est proportionnelle à la quantité de molécule dans un système donné.

Spectres d'absorption et d'émission étudiés



Spectres du tryptophane : R.-C. A. Fuh 1995
in photochemCAD, (Du 1998, Dixon 2005)
Autres spectres : SigmaAldrich

Figure 57 | Spectres d'absorption et d'émission des molécules fluorescentes utilisées dans l'étude d'Osh6p

L'absorbance des tryptophanes d'Osh6p permet de mesurer sa concentration. Le NBD, lorsqu'il est conjugué à une protéine permet de mesurer la liaison de celle-ci à une membrane. Le groupement coumarine est responsable de la fluorescence du CPM (7-Diethylamino-3-(4'-Maleimidylphenyl)-4-Methylcoumarin). Le CPM permet de mesurer l'accessibilité des cystéines d'une protéine. Lorsque qu'une cystéine est exposée au solvant et se conjugue au CPM, cela se traduit par l'émission d'un signal fluorescent.

Paramètres de mesure dans la gamme UV – visible du spectre électromagnétique

Pour décrire un fluorophore, en spectroscopie on peut acquérir les paramètres mesurables suivants :

- **Les longueurs d'onde d'absorption et d'émission maximales :**

$$\lambda_{absorption\ max} = \frac{hc}{E_{excitation}} \rightarrow \text{excitation moléculaire}$$

$$\lambda_{fluorescence\ max} = \frac{hc}{E_{relaxation}} \rightarrow \text{relaxation moléculaire}$$

Où : $E = \Delta E_{\text{électronique}} + \Delta E_{\text{vibrationnelle}} + \Delta E_{\text{rotationnelle}}$ et λ la plupart du temps en nanomètre (nm).

- **L'absorbance (loi de Beer-Lambert) :**

$$A_{\lambda_{abs}} = \log_{10} \frac{\phi_{incidente}}{\phi_{transmise}} = \varepsilon_{\lambda_{abs}} \times C \times l$$

Où : $\frac{\phi_{incidente}}{\phi_{transmise}}$ est l'inverse de la transmittance

Avec C la concentration en solution (mol.L^{-1}), $\varepsilon_{\lambda_{abs}}$ est coefficient d'extinction molaire de la molécule pour une longueur d'onde donnée (M.cm^{-1}), et l est le trajet optique de la lumière (en cm^{-1}).

- **L'intensité de fluorescence :**

$$Fluorescence_{\lambda_{em}} \cong 2,3k\phi_F I_{0\lambda_{em}} \times Absorbance_{\lambda_{em}}$$

Où : $k, \phi_F, I_{0\lambda_{em}}$; correspondent respectivement à un facteur expérimental qui dépend de l'appareil de mesure (bande passante de la source lumineuse, angle des faisceaux avec le collecteur de la lumière, etc.), au rendement de fluorescence $\left(\frac{\Gamma_{rad}}{\Gamma_{rad} + k_{nrad}}\right)$, et à l'intensité de la lumière incidente à la longueur d'onde d'émission (en photons. $\text{L}^{-1} \cdot \text{seconde}^{-1}$).

On notera toutefois que cette dernière relation entre intensité de fluorescence et concentration n'est pas parfaitement linéaire, on observera une déviation de l'intensité de 0,1 % par tranche de 10^{-3} unités d'absorbance et de 5,5 % par tranche de 0,05 unité d'absorbance³⁶³. En d'autres termes, contrairement à la spectrophotométrie, la fluorimétrie n'est pas une méthode quantitative suffisamment précise pour évaluer une

concentration. C'est pourquoi, il est préférable de travailler avec des concentrations sub-millimolaires de fluorophore et la linéarité d'un signal fluorescent par rapport à une concentration connue de fluorophore actif doit être établie pour confirmer une interaction moléculaire.

Dans les sections suivantes, j'illustre plusieurs types d'application des principes d'interaction lumière-matière adaptés à l'étude des interactions entre les transporteurs de lipides et les membranes.

b. Application de la spectroscopie de fluorescence à la détection d'interactions protéines/membranes

Pour illustrer comment la spectroscopie m'a permis d'étudier Osh6p, je montre d'une part un exemple de spectre d'absorption de NBD-Osh6p qui permet d'évaluer l'efficacité de marquage de la protéine après purification (**Fig. 58a**). Et d'autre part, je montre le résultat d'une expérience dans laquelle nous avons détecté la liaison d'Osh6p à une membrane particulière (**Fig. 58b**).

En mesurant l'absorbance d'un échantillon de NBD-Osh6p à toutes les longueurs d'onde par incrément d'un nanomètre entre 230nm et 650 nm, j'ai obtenu un spectre caractérisé par : un pic très intense en dessous de 230 nm qui révèle les liaisons peptidiques ; un pic à 278~280 nm qui reflète la présence des cinq tryptophanes d'Osh6p et dans une moindre mesure ses tyrosines et phénylalanines ; et deux pics à 350 nm et à 495nm qui révèlent la présence du NBD (**Fig. 58a**). À partir de l'absorbance maximale du NBD à 495 nm et celle d'Osh6p à 280 nm, j'ai déduit le ratio NBD/Osh6p de cet échantillon. Le coefficient d'extinction molaire d'Osh6p ($\epsilon_{\lambda_{280\text{nm}}} = 55810 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$) est déduit par la méthode de Gill ³⁶⁴, ce qui permet déterminer la concentration d'Osh6p. La concentration du NBD est déterminée à partir de son coefficient d'extinction molaire qui est connu ($\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} = 25000 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$). Lors de l'acquisition du spectre présenté, j'ai ainsi mesuré que 95% des protéines Osh6p étaient conjuguées au NBD.

Ensuite, j'ai pu déterminer la fluorescence de NBD-Osh6p, sous plusieurs conditions (**Fig. 58b**). Une première condition où NBD-Osh6p est incubée seule à une concentration de 200 pmol/mL dans le solvant : un tampon Hepes/K-acétate. Sa fluorescence semble faible, le spectre est étalé. Une deuxième condition identique, dans laquelle j'ai rajouté des liposomes. Les liposomes sont mélangés à une concentration finale de 400 μM de lipides. Ces liposomes contiennent un lipide particulier qui permet de recruter de façon irréversible Osh6p aux membranes. L'intensité de fluorescence est beaucoup plus forte et l'on observe un décalage vers le bleu du maximum d'émission de fluorescence du NBD, ce qui indique la liaison d'Osh6p aux liposomes. Une troisième condition correspond à un contrôle dans les mêmes conditions en présence de liposomes, mais où le lipide particulier qui permet de retenir Osh6p est absent. Le spectre est quasiment identique à la condition sans liposomes, indiquant qu'Osh6p est soluble.

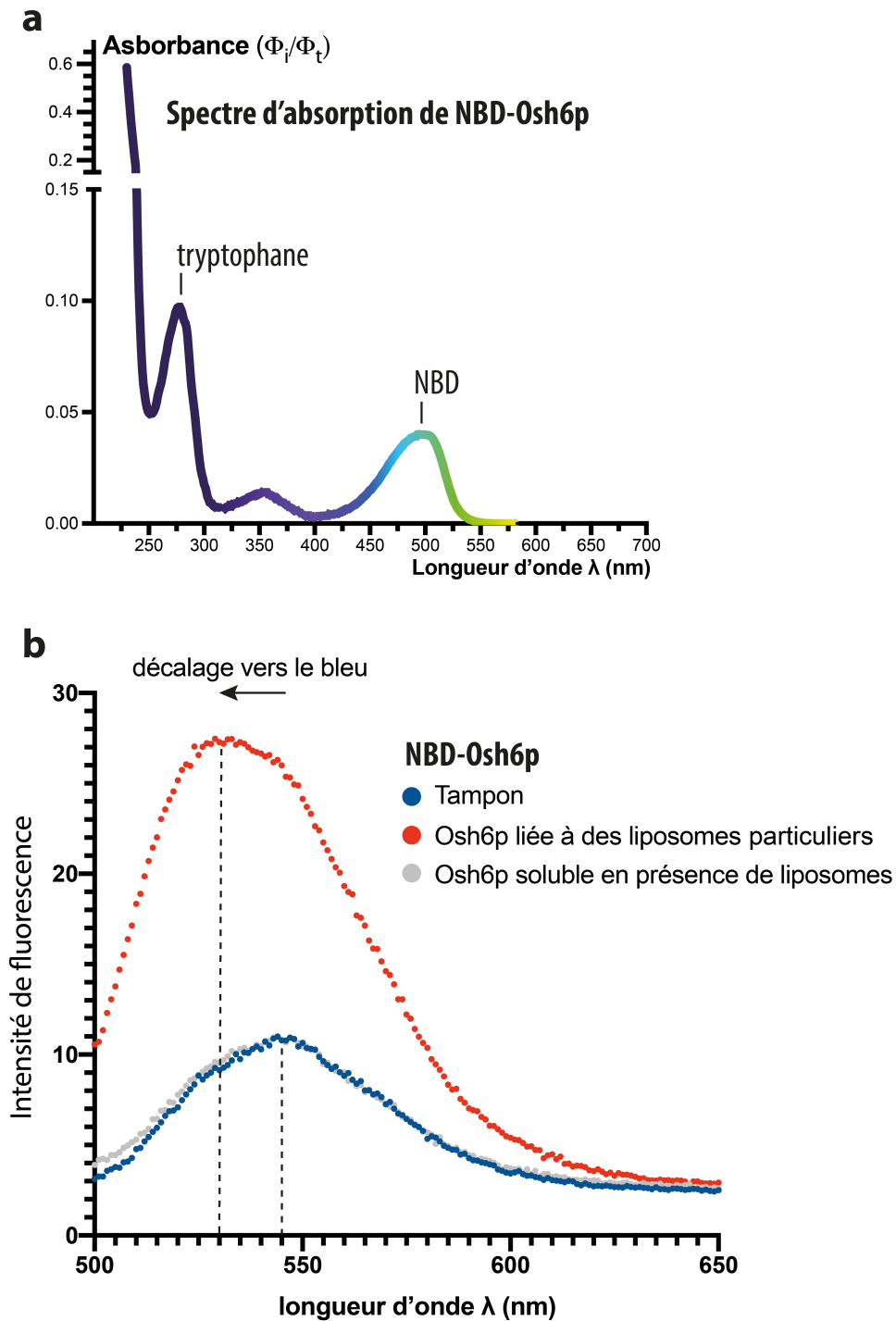


Figure 58 | Spectre d'absorption et spectres d'émission de fluorescence de NBD-Osh6p

a) Absorbance de NBD-Osh6p mesurée à toutes les longueurs d'onde par incrément de 1 nm

b) Spectre d'émission de fluorescence de NBD-Osh6p. L'intensité d'émission de fluorescence est mesurée sur l'intervalle 500 à 650 nm, à toutes les longueurs d'onde par incrément de 1 nm (bande passante 5 nm) sous une longueur d'onde d'excitation de 460 nm (bande passante 5 nm). Trois conditions sont présentées. Si le NBD interagit avec un environnement apolaire, son intensité de fluorescence est plus élevée et son spectre est décalé vers le bleu, ce qui révèle l'interaction d'Osh6p avec une membrane

c. Exemple du transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET) adapté à la mesure cinétique de transfert de lipides entre membranes

Un autre exemple d'application de la spectroscopie de fluorescence est la méthode développée par le laboratoire pour suivre en temps réel, à l'échelle de la seconde, le transport de phospholipides entre deux membranes. Grâce aux sondes NBD-C2_{Lact} ou NBD-PH_{FAPP}, on peut respectivement estimer à tout instant la quantité de PS ou de PI(4)P présent dans des liposomes, et ce, de façon relative à des liposomes témoins dont la concentration en PS ou en PI(4)P est connue.

Cette estimation est impossible dans un système où les populations de liposomes donneurs et accepteurs contiennent toutes les deux le lipide dont la présence est mesurée. C'est pourquoi il est nécessaire de pouvoir discriminer la présence de ce lipide dans une des deux populations de liposomes. Pour contourner ce problème, nous incorporons une petite quantité de lipide fluorescent dans une de ces populations. Ce lipide fluorescent est la rhodamine-phosphatidyléthanolamine (Rhod-PE) et elle nous sert à éteindre le signal fluorescent du NBD en surface des liposomes par un transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET).

Le principe du FRET correspond au couplage des transitions électroniques de deux fluorophores. Dans ce processus, l'énergie des électrons d'un fluorophore donneur excité est transférée par résonance aux électrons d'un fluorophore accepteur qui devient à son tour excité. Ensuite, après un temps de relaxation, le fluorophore accepteur émet un photon de fluorescence. Le FRET peut être représenté sur un diagramme de Jablonski (**Fig. 59a**). Pour que le FRET ait lieu, il faut que les deux molécules soient suffisamment proches pour permettre un couplage dipôle-dipôle des deux molécules (en général entre 1 et 10 nm). Ensuite, la part d'énergie de fluorescence du fluorophore donneur qui correspond à l'énergie d'excitation du fluorophore accepteur est transmise d'un fluorophore à l'autre. Autrement dit, pour que le FRET ait lieu, le spectre d'émission du fluorophore donneur doit chevaucher le spectre d'absorption du fluorophore accepteur. Ce qui est bien le cas pour le couple NBD – Rhodamine. La contrepartie de ce mécanisme est donc une disparition de l'émission de fluorescence du fluorophore donneur. Ainsi, la rhodamine permet d'éteindre la fluorescence du NBD (**Fig. 59b, c, d**).

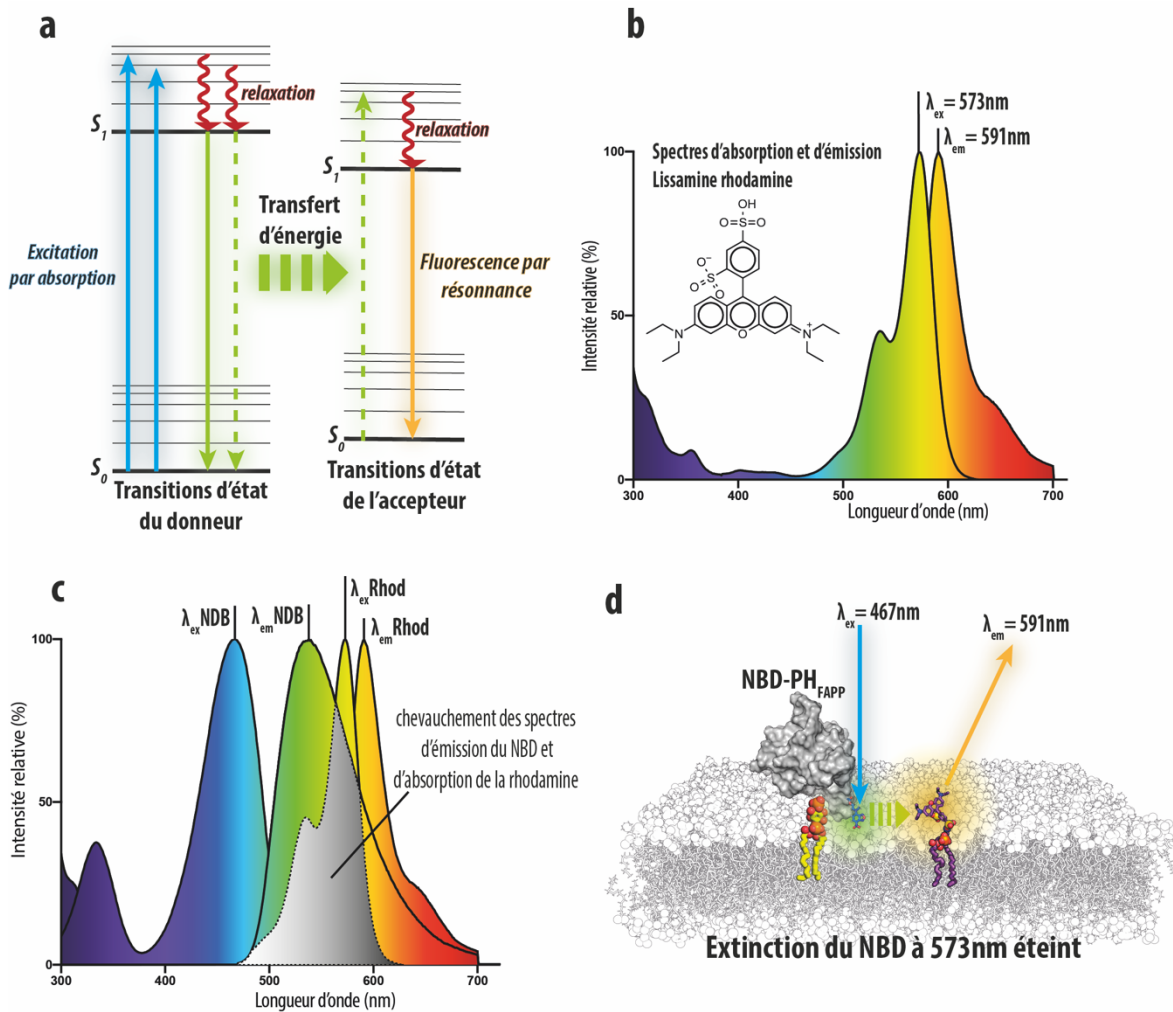


Figure 59 | Principe du FRET appliqué à l'extinction d'un fluorophore sur une membrane

a) Diagramme de Jablonski adapté au transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET).

b) Structure chimique et spectres d'émission et d'absorption de la Lissamine-Rhodamine qui est le fluorophore porté par la Rhodamine-PE.

c) Chevauchement des spectres d'émission du NBD et d'absorption de la rhodamine, représenté en gris. Le chevauchement des spectres décrit une intégrale qui correspond à la quantité d'énergie transmise par FRET à toutes les longueurs d'onde de l'intervalle.

d) Modèle d'interaction de la sonde NBD-PH_{FAPP} avec le PI(4)P sur une membrane en présence de Rhodamine-PE à proximité. La fluorescence du NBD est perdue par FRET avec la Rhodamine-PE. Cette méthode permet d'ignorer la présence de PI(4)P dans des liposomes qui contiennent de la Rhodamine-PE.

Au cours de ma thèse, j'ai effectué des mesures de transport de PS et de PI(4)P. Ce protocole est similaire pour les deux lipides, à part que la sonde NBD n'est pas la même. J'explique ici comment j'ai mesuré le transport de PI(4)P (**Fig. 60**).

La fluorescence est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre Shimadzu RF 5301-PC. L'échantillon (volume 600 μL) a été placé dans une cuvette cylindrique en quartz, sous agitation continue avec un petit barreau magnétique et thermostaté à 30 °C. Les échantillons sont injectés à partir des solutions mères avec des seringues Hamilton grâce à un guide qui traverse le couvercle du fluorimètre. Au temps zéro, une suspension (570 μL) contenait des liposomes L_B (200 μM de lipides totaux) contenant 2 mol% de Rhod-PE et 5 mol% de PI(4)P, mélangés avec 250 nM de sonde NBD-PH_{FAPP} dans un tampon Hepes/K-acétate. La concentration molaire de PI4P accessible était de 5 μM . Après 2 min, 30 μL d'une suspension de liposomes L_A (200 μM de lipide), contenant 5 mol% de POPS, ont été injectés. Après deux minutes supplémentaires, Osh6p (200 nM) est injectée. Le transport de PI4P est suivi par la mesure du signal NBD à 530 nm (bande passante de 10 nm) sous une excitation à 460 nm (bande passante de 1,5 nm). Ce signal fluorescent reflète la répartition de la sonde NBD-PH_{FAPP} entre les liposomes L_B et L_A .

La quantité de PI(4)P transporté par Osh6p peut être déterminée en normalisant le signal du NBD (F) de la manière suivante. D'abord, on mesure le signal du NBD (F_{max}) correspondant à une situation où le PI(4)P est entièrement transféré aux liposomes L_A . Pour cela, la sonde NBD-PH_{FAPP} (250 nM) est mélangée avec des liposomes L_A et L_B (200 μM de lipides totaux chacun) dont la nature lipidique est similaire à celle des liposomes utilisés dans l'essai de transport, mais où les liposomes L_A contiennent 5% de PI4P tandis que les liposomes L_B en sont dépourvus. La fraction (F_{Norm}) de PI4P transporté dans les liposomes L_A , $PI(4)P_A/PI(4)P_T$, est directement égale à la fraction de NBD-PH_{FAPP} liée aux liposomes L_A et elle est calculée en considérant $F_{Norm} = \frac{F - F_0}{F_{max} - F_0}$, avec F_0 correspondant au signal NBD juste avant l'ajout de la protéine Osh6p lors de l'expérience de transport. La quantité de PI(4)P (en μM) transféré des liposomes L_B aux liposomes L_A correspond à une valeur de $5 \times F_{Norm}$. La vitesse initiale de transport est déterminée en ajustant la courbe normalisée obtenue avec une fonction linéaire sur les huit premiers points acquis juste après l'injection d'Osh6p, ce qui correspond à une période de 4 secondes.

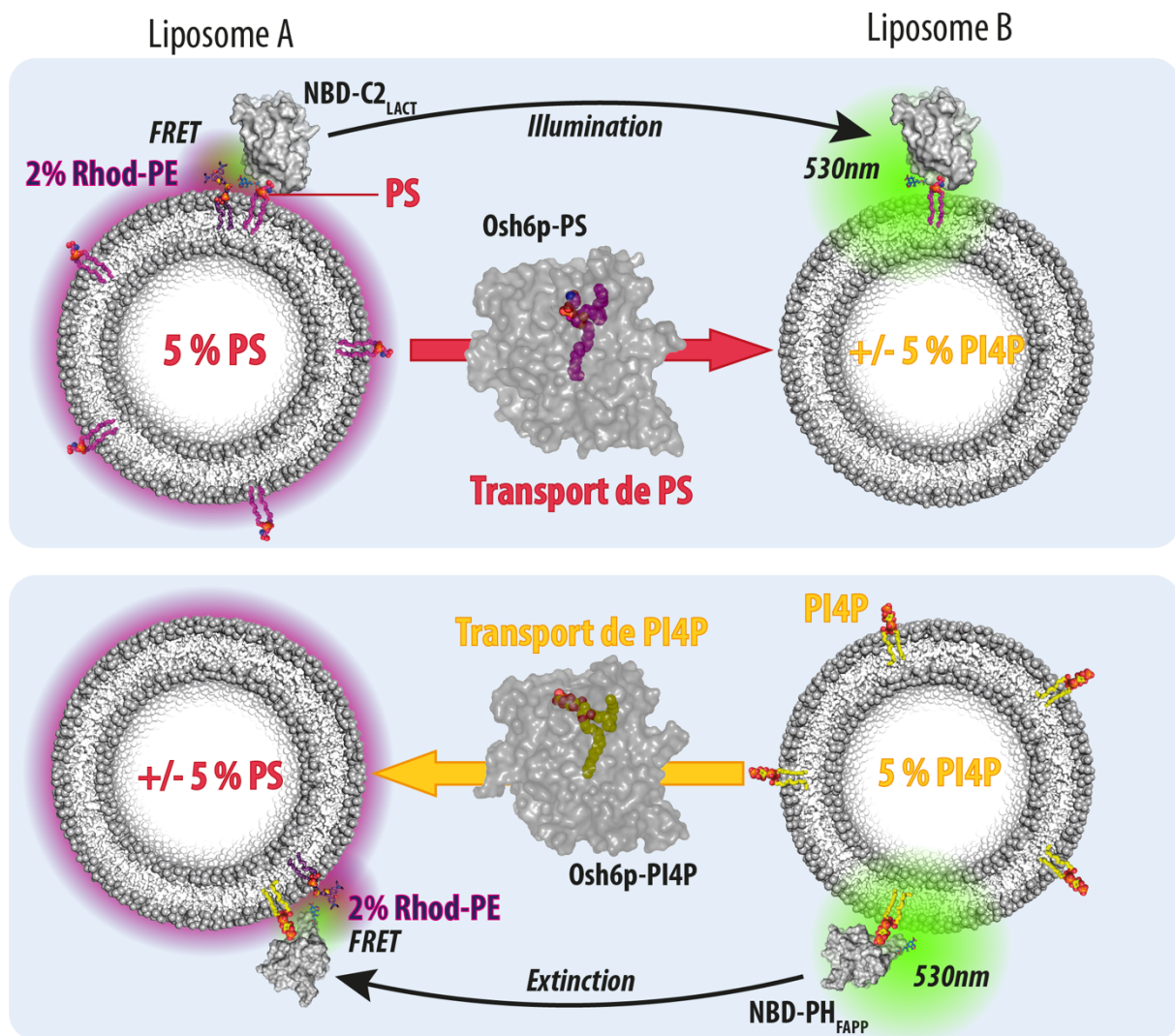


Figure 60 | Principe de mesure du transport de PS ou de PI(4)P entre liposomes

Le panneau supérieur illustre ce qui se passe à l'échelle moléculaire lors de la mesure de transport de PS. La sonde NBD-C2_{Lact} est initialement éteinte par la rhodamine PE dans les liposomes donneurs de PS (L_A). Lorsqu'Osh6p transporte la PS dans les liposomes L_B la sonde se déplace vers ces liposomes et émet un signal fluorescent qui est mesurée.

Le panneau inférieur illustre le même mécanisme avec la sonde NBD-PH_{FAPP} pour mesurer le transport de PI(4)P entre les liposomes. Dans ce modèle-ci, lorsqu'Osh6p transporte le PI(4)P, le signal fluorescent s'éteint au fur et à mesure du transport de PI(4)P dans les liposomes L_A. Il est toutefois possible d'inclure la rhodamine-PE dans les liposomes L_B à la place des liposomes L_A afin de mesurer à la place une apparition de signal fluorescent.

d. Exemple de la détection de l'accessibilité au solvant d'un acide aminé dans une protéine

Pour mesurer l'accessibilité d'un résidu dans une protéine, il est possible d'effectuer une réaction de type « chimie click » avec un fluorophore réactif pour ce résidu et de suivre en temps réel cette réaction de conjugaison en mesurant la fluorescence de ce fluorophore. Au cours de ma thèse j'ai pu mettre au point cette méthode au laboratoire en utilisant le CPM (7-Diethylamino-3-(4'-Maleimidylphenyl)-4-Methylcoumarin). Le CPM est fluorophore qui réagit avec les cystéines et qui devient fluorescent à 450 nm uniquement lorsqu'il est conjugué à celles-ci. Pour mettre en place ce protocole je me suis inspiré d'une précédente publication qui montre avec cette technique comment il est possible de suivre le dépliement d'une protéine en fonction de la température³⁶⁵. Pour cela, j'ai préparé une solution de CPM à 4 mg/mL en diluant 1 mg de CPM en poudre dans 250 μ L de DMSO. Puis, cette solution est ajoutée dans un volume final de 10 mL de tampon HK et le mélange est laissé au repos pendant 5 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière.

Ensuite la solution est utilisée immédiatement pour suivre l'accessibilité d'une unique cystéine placée dans un mutant d'Osh6p, en présence de liposomes de diverses compositions. Pour cela, la protéine (400 nM) et les liposomes (400 μ M de lipides totaux) sont mélangés dans 196,8 μ L de tampon HK à 30°C. Ensuite, un volume de 3,2 μ L de la solution diluée de CPM est ajouté dans le mélange pour obtenir une concentration finale en CPM de 4 μ M. Les spectres d'émission de fluorescence sont ensuite immédiatement mesurés de 400 à 550 nm avec une largeur de bande de 5 nm, sous une lumière d'excitation à 387 nm (largeur de bande 5 nm). Ces mesures sont effectuées dans une plaque 96 puits en utilisant un fluorimètre lecteur de plaque (TECAN M1000 Pro).

Ensuite la valeur du pic spectral comprise entre 450nm et 470nm est retenue pour les analyses. De plus, les conditions de contrôle : CPM seul, et CPM en présence de liposome sans protéine, ont été enregistrées.

4. *Mesure d'avidité des protéines pour les membranes par flottaison*

L'avidité d'une protéine pour les membranes peut être mesurée par une expérience de flottaison de liposomes sur gradient de sucrose^{166,366}.

Pour cela, dans un tube en polycarbonate, une population de liposomes (0.75 mM de lipides) est mélangée avec la protéine d'intérêt (0,75 μ M) dans 150 μ L de tampon HK (50 mM Hepes/ 120 mM K-acétate, pH 7,4). Ensuite le mélange est incubé sous agitation pendant 10 minutes à 25°C). Le mélange est ensuite complété avec 100 μ L d'une solution HK contenant 75% w/v de sucrose ce qui permet d'obtenir une suspension de 250 μ L à 30% de sucrose. La suspension est bien homogénéisée puis elle est recouverte délicatement par couche de 200 μ L de solution HK à 25% w/v de sucrose. Enfin, cette deuxième couche, est recouverte par 50 μ L de tampon HK.

L'échantillon est ensuite centrifugé à $240\,000 \times g$ dans un rotor à godets mobiles pendant 1 heure à température ambiante. Après centrifugation, 250 μ L de la phase la plus dense au fond du tube, sont prélevés avec une seringue en verre de 250 μ L. La seringue est munie d'une aiguille fine dont le diamètre interne est inférieur à 200 μ m pour éviter les turbulences dans la suspension lors du prélèvement. Le premier échantillon obtenu constitue la fraction appelée « *Bottom* ». Ensuite, un échantillon 150 μ L est prélevé depuis le fond du tube pour obtenir la deuxième fraction, moins dense, appelée « *Middle* ». Enfin, les 50 μ L restants sont prélevés et constitue l'échantillon « *Top* ». Ce dernier échantillon correspond à la fraction la moins dense en sucrose. Au cours de la centrifugation, les liposomes migrent dans cette fraction « *Top* » car ils sont moins denses que la solution de sucrose. Si une protéine a de l'avidité pour ces liposomes, elles migrent avec eux.

Ensuite, les trois échantillons sont dénaturés à 95°C dans une solution de tampon d'échantillonnage de Laemmli. Puis les protéines de ces échantillons sont séparé par SDS-PAGE et révélées avec le marqueur fluorescent *Sypro Orange*. Les fractions « *Top* » et « *Bottom* » sont analysées dans un imageur sous une lumière UV, puis l'intensité des bandes sur le gel est quantifiée. On peut ainsi déterminer la proportion de protéine liée aux liposomes présente dans la fraction « *Top* » par rapport à la quantité de protéine totale présente dans les fractions « *Bottom* » et « *Top* ».

B. Résultats

1. *Un mécanisme de commutation électrostatique pour contrôler l'activité de transport de lipides de la protéine Osh6p*

La membrane plasmique des cellules eucaryotes est caractérisée par un enrichissement en phosphatidylsérine (PS) dans son feuillet cytosolique³². Comme indiqué en introduction, dans l'espèce humaine et dans la levure *S. cerevisiae*, la phosphatidylsérine (PS) est un lipide anionique qui constitue entre 15 et 30 % des phospholipides de ce feuillet. Cette densité en PS maintient en surface de la membrane un haut potentiel électrostatique nécessaire au recrutement de nombreuses protéines de signalisation. Entre autres exemples, MARCKS et K-ras contiennent un segment de résidus chargés positivement qui leur permettent de se lier à la membrane plasmique chargée négativement. La liaison de MARCKS et K-ras est régulée par des phosphorylations qui neutralisent leurs charges positives et provoquent leur commutation d'un état lié à la membrane à un état soluble^{135,367}.

Pourtant, la PS est synthétisée avec la plupart des lipides dans le RE et malgré cette activité, la PS est rare dans cet organelle. Pour parvenir à enrichir efficacement la membrane plasmique en PS, la levure contient quelques milliers de copies des protéines Osh6p et Osh7p. Ces deux protéines sont des LTPs de la famille des ORP/Osh, qui possèdent une activité d'échange de PS et de PI(4)P à l'interface entre le RE et la membrane plasmique⁴⁸. Osh6p et Osh7p extraient une molécule de PS dans le RE, puis la transportent vers la membrane plasmique. La PS est libérée dans la membrane plasmique en échange d'une molécule de PI(4)P qui est capturée à son tour. Le PI(4)P est transporté dans le RE où il est échangé contre une molécule de PS. Ce cycle d'échange recommence tant que le PI(4)P continue d'être produit par la PI 4-kinase Stt4p dans la membrane plasmique et qu'il est hydrolysé par la phosphatase Sac1p dans le RE.

Il y a plusieurs exemples de LTPs dont l'activité est plus faible en présence de membranes chargées négativement^{254,306,343}. Au cours du cycle d'échange de lipides, Osh6p et Osh7p doivent s'attacher et se détacher rapidement des membranes anioniques comme le RE et surtout la membrane plasmique. Ces protéines devraient donc avoir un moyen efficace d'échapper à l'attraction électrostatique de ces membranes.

Nous savions qu'un mutant Osh6p(L69D) transporte lentement la PS *in vitro* et *in vivo* ⁴⁸. Dans Osh6p(L69D) un résidu anionique remplace un résidu hydrophobe situé dans le couvercle de la protéine, ce qui empêche la capture de la PS³⁴⁷.

Dans l'étude présentée ici, contrairement à Osh6p qui est majoritairement soluble dans le cytosol, Osh6p(L69D) est peu soluble et reste liée aux membranes internes de la levure dont le RE. De plus, nous montrons qu'un mutant sans couvercle Osh6pΔ69 possède une localisation similaire à celle d'Osh6p(L69D) (**Fig. 1a-d, S1a**). Ces résultats suggèrent qu'une mutation ponctuelle dans le couvercle, comme la délétion de celui-ci, favorise l'accumulation d'Osh6p sur les membranes internes de la levure.

Pour évaluer la capacité de liaison d'Osh6p aux membranes, j'ai mesuré son avidité pour des liposomes neutres ou anioniques, par des expériences de flottaison sur gradient de sucrose. Osh6p se lie faiblement aux membranes, quelle que soit la densité de PS (0 à 30 mol%) (**Fig. 1e**). Ensuite, l'addition de liposomes incluant 30 mol% de PS et 4 mol% de PI(4)P ne permettent pas d'obtenir une meilleure liaison d'Osh6p (**Fig. 1f**). Le résultat est le même avec un mutant, Osh6p(HH/AA), incapable de reconnaître le PI(4)P et d'effectuer l'échange PS/PI(4)P (**Fig. 1d,f**). Dans ce mutant les histidines, H157/H158 sont remplacées par des alanines qui empêchent la liaison de la tête polaire du PI(4)P. Par contre, les mutants Osh6p(L69D) et Osh6pΔ69 sont significativement plus avides pour des membranes chargées contenant 30 mol% de PS, avec ou sans PI(4)P (**Fig. 1f**). De plus la fraction liée d'Osh6p(L69D) et Osh6pΔ69 augmente de manière dépendante de la densité en PS contenue dans les liposomes (**Fig. 1g**). Ces résultats suggèrent que les mutants qui n'ont pas de couvercle ou qui comportent une mutation dans celui-ci, ont une avidité pour les membranes qui dépend de leur densité en lipide anionique.

Ensuite, nous avons étudié si Osh6p et les différents mutants étaient capables d'extraire de la PS ou du PI(4)P. Pour cela, j'ai mesuré les spectres d'émission de fluorescence des sondes NBD-PH_{FAPP} et NBD-C2_{Lact} qui servent respectivement à mesurer la présence de PS et de PI(4)P dans les membranes après incubation avec Osh6p. L'incubation de la protéine Osh6p (3 μM) avec des liposomes (80 μM) contenant 2 mol% de PS, provoque une diminution de l'intensité de fluorescence émise par la sonde NBD-C2_{Lact}, ce qui indique après normalisation du signal, que la protéine parvient à extraire plus de 80 % des PS accessibles dans le feuillet externe des liposomes (**Fig. 2a,b**). Avec la sonde NBD-PH_{FAPP}, nous observons qu'Osh6p extrait près de 100 % des PI(4)P

accessibles (**Fig. 2c,d**). Le mutant Osh6p(HHAA) parvient aussi à extraire la PS efficacement, mais comme attendu, il n'extrait quasiment pas le PI(4)P comme l'indique l'absence de diminution significative de l'intensité de fluorescence de la sonde NBD-PH_{FAPP} (**Fig. 2d**). Enfin, les mutants Osh6pΔ69 et Osh6p(L69D), ne sont ni capables d'extraire la PS, ni le PI(4)P (**Fig. 2**). Ce résultat suggère que ces mutants ont une plus grande avidité pour les membranes anioniques parce qu'ils restent sous une forme dépourvue de tout lipide.

L'impossibilité d'Osh6pΔ69 et Osh6p(L69D) à extraire un ligand lipidique pouvait résulter de l'impossibilité du couvercle à se fermer. Pour examiner cela, nous avons mis au point une méthode qui permet de détecter l'accessibilité des résidus qui sont masqués par le couvercle lorsque la protéine est liée à un ligand. Le 7-Diethylamino-3-(4'-Maleimidylphenyl)-4-Methylcoumarin (CPM) est un composé qui réagit avec les cystéines et qui devient fluorescent une fois conjugué à ce type de résidu. Nous avons donc remplacé une sérine localisée sous le couvercle de la protéine par une cystéine dans des variants d'Osh6p WT et Osh6p(L69D) qui n'ont pas de cystéine endogène. Ensuite j'ai testé la réactivité du CPM avec ces mutants dans différentes conditions (**Fig. 3a**). En absence de liposomes, la cavité de liaison de la protéine est partiellement accessible au CPM, comme l'indique l'émission de fluorescence. La présence de liposomes neutres maximise la fluorescence du CPM, suggérant que l'accessibilité du résidu C190 est meilleure. Par contre, la présence de 2 mol% de PS ou de PI(4)P dans les liposomes empêche fortement le CPM de réagir avec la forme WT alors que dans ces mêmes conditions la cavité de liaison de la forme L69D reste parfaitement accessible au fluorophore. Ces expériences suggèrent qu'en présence de ses ligands, Osh6p reste dans un état où le couvercle est fermé.

Nous avons ensuite étudié si l'affinité d'Osh6p pour les membranes anioniques dépendait de son changement de conformation. Pour cela, nous avons mesuré l'accessibilité de la cavité en présence de liposomes contenant un analogue de PS : le diphytanoyl-PS (diphyt-PS). Ce lipide anionique mime la PS par sa tête polaire, mais ses chaînes aliphatiques portent huit méthyles qui empêchent son extraction par Osh6p (**Fig. 3,c**). Lorsque Osh6p est incubée avec des liposomes contenant 2 mol% de diphyt-PS, la cavité reste accessible au CPM (**Fig. 3d**). Enfin, nous avons observé qu'Osh6p reste fortement liée à des membranes qui contiennent 30% de diphyt-PS (**Fig. 3 e,f**). Ensemble, ces résultats suggèrent que lorsque Osh6p reste dans une conformation avec un couvercle

ouvert, elle se lie fortement à des membranes anioniques dépourvues de lipide extractible.

Pour définir si Osh6p perd sa capacité de liaison aux membranes anioniques après extraction d'un lipide et fermeture du couvercle, nous avons d'abord vérifié si les 35 résidus N-ter en amont du couvercle participaient ou non à la liaison aux membranes anioniques avec un mutant Osh6p Δ 35. Nous avons remarqué que ces résidus n'interviennent pas significativement dans la capacité d'extraction d'Osh6p et qu'ils n'empêchent pas la solubilité d'Osh6p face à des membranes contenant 30 mol% de PS. Enfin, ces résidus ne sont pas responsables de la liaison de la protéine à des membranes enrichies par 30 mol% de diphyt-PS (**Fig. 4a,b,c**). Ces résultats indiquent que le couvercle est le seul élément de la région N-ter d'Osh6p nécessaire à l'extraction de ses ligands et au contrôle de sa liaison aux membranes anioniques.

Ensuite nous montrons que la capacité d'Osh6p à se détacher des membranes contenant 30 mol% de lipides anioniques dépend de la disponibilité en ligand. Dans une expérience, j'ai mesuré l'intensité de fluorescence d'Osh6p et Osh6p Δ 35 conjuguées au NBD pour suivre en temps réel leur liaison à des liposomes anioniques. Lorsque ces liposomes contiennent 30 mol% de diphyt-PS, l'intensité de fluorescence est stable comme ce qui est mesuré avec la sonde NBD-C2_{Lact}. Par contre, l'ajout d'une petite quantité de 12:0-12:0-PS provoque une diminution rapide de l'intensité de fluorescence de NBD-Osh6p et -Osh6p Δ 35, tandis que ce lipide n'a pas d'effet sur la liaison de la sonde NBD-C2_{Lact} (**Fig. 4d**). Ce résultat suggère qu'Osh6p se détache rapidement d'une membrane anionique lorsqu'elle capture un ligand. Nous montrons aussi par des expériences de flottaison que la liaison à des membranes composées de 30 mol% de lipides anioniques dépend d'une part de la présence d'un couvercle fonctionnel et d'autre part que cette association devient plus faible dès lors qu'il y a des concentrations croissantes en 16:0-18:1-PS ou en PI(4)P dans les membranes (**Fig. 4e**). L'ensemble de ces résultats indiquent que l'extraction d'un ligand est à l'origine du détachement d'Osh6p des membranes anioniques du fait de la présence d'un couvercle fonctionnel.

Ensuite nous avons examiné si l'enrichissement de membrane en lipides anioniques avait un effet sur l'activité de transport d'Osh6p. La cinétique de transport du PI(4)P est mesurée en utilisant une stratégie basée le processus de FRET entre la sonde NBD-PH_{FAPP} et la Rhodamine-PE. Le signal de la sonde NBD-PH_{FAPP} est éteint lorsque celle-

ci est liée à des liposomes donneurs qui contiennent 5 mol% de PI(4)P et 2 mol% de Rhodamine-PE. L'ajout de liposomes accepteurs sans PI(4)P et contenant 5 mol% de PS ne change pas le signal fluorescent. Dès que la protéine est ajoutée, on observe une augmentation de la fluorescence du NBD qui indique le déplacement de la sonde NBD-PH_{FAPP} vers les liposomes accepteurs. Cette augmentation indique qu'il y a un transport de PI(4)P vers les liposomes accepteurs. Avec cette stratégie j'ai étudié les activités d'Osh6p, Osh6pΔ35 et Δ69 avec deux types de liposomes donneurs : des membranes neutres contenant 25 mol% de diphytanoyl-PC (diphyt-PC) et des membranes anioniques contenant 25 mol% de diphyt-PS. Il s'avère qu'en présence de membranes anioniques, l'activité d'Osh6p et Osh6pΔ35 est réduite de moitié par rapport à l'activité mesurée avec des membranes neutres. Mais les deux protéines restent fonctionnelles avec une vitesse de transport élevée autour de 10 à 15 PI(4)P/min/protéine. Par contre, Osh6pΔ69, qui transporte plus lentement le PI(4)P avec des liposomes donneurs neutres, a une activité complètement abolie lorsque que ces liposomes contiennent 30 mol% de lipides anioniques (**Fig. 5a,b**). Dans une autre expérience en temps réel, j'ai étudié la solubilité d'Osh6p au cours du processus d'échange de lipides. Pour cela, j'ai mesuré le signal du NBD de NBD-Osh6p lorsqu'elle est incubée avec les mêmes types de liposomes donneurs et accepteurs utilisés pour mesurer le transport. Lorsque les liposomes sont neutres ou qu'ils sont chargés et contiennent de la PS ou du PI(4)P, Osh6p reste majoritairement soluble pendant le transport. En revanche, sans ligand, la protéine est fortement retenue aux liposomes anioniques (**Fig. 5c**). Ces résultats indiquent que, pour son activité, Osh6p a besoin d'un couvercle fonctionnel pour : 1) extraire les lipides ; et 2) rester faiblement liée aux membranes anioniques.

Par une analyse phylogénétique, j'ai constaté que les protéines Osh6p et Osh7p contiennent un motif anionique riche en aspartate et glutamate qui semble conservé dans les protéines ORP9, -10 et -11 (**Fig. S5a,b**). Ce motif est situé dans le couvercle d'Osh6p et en étudiant la structure d'Osh6pΔ35 et Osh6pΔ69, nous nous sommes aperçus que le couvercle expose une surface anionique et qu'il masque une surface chargée positivement à l'entrée de la cavité de liaison lipidique (**Fig. 6a**). Grâce à des simulations de dynamique moléculaire, Romain Gautier a montré que le couvercle réduit l'attraction d'Osh6p par des membranes anioniques. Pour cela Osh6pΔ35 est placée dans un système virtuel en tout atome, à distance d'une bicouche de lipides plane et anionique (30 mol% de POPS). La trajectoire de la protéine est calculée sur 500 ns. Dans ces conditions, la trajectoire

d'Osh6p Δ 35 ne prend pas forcément la direction de la membrane et Osh6p ne se lie pas systématiquement aux membranes anioniques. À l'inverse, dans toutes les simulations, Osh6p Δ 69 se lie de manière stable aux membranes anioniques (**Fig. 6b**). De plus, ces simulations révèlent que l'attachement est favorisé par des boucles situées sur un côté d'Osh6p et qui contiennent des résidus hydrophobes qui s'insèrent dans la membrane (**Fig. 6c,d**). Ces résultats suggèrent que la charge négative conférée par le motif anionique situé dans le couvercle permet à la protéine d'échapper à l'attraction de la membrane négativement chargée. En fait, le retrait du couvercle favorise la réorientation d'Osh6p lorsqu'elle est en contact avec une membrane (**Fig. 7**).

Afin de déterminer le rôle du motif anionique dans l'activité de transport d'Osh6p, nous avons atténué le caractère anionique du couvercle en substituant partiellement ou complètement les résidus anioniques du motif par des résidus neutres, ce qui donne respectivement les mutants Osh6p(4A) et Osh6p(5A2G) (**Fig. 8a**). Les potentiels électrostatiques de surface calculés pour Osh6p(4A) et Osh6p(5A2G) montrent une réduction de la surface anionique exposée par le couvercle. Ces mutants extraient moins efficacement la PS des membranes qu'Osh6p WT. Néanmoins, ils extraient le PI(4)P tout aussi bien qu'Osh6p WT (**Fig. 8c**). Ensuite, par flottaison, Osh6p(4A) et Osh6p(5A2G) sont plus avides pour des membranes chargées négativement (**Fig. 8d**). Ce résultat indique que la solubilité d'Osh6p dépend de la quantité de charges négatives présentes dans le couvercle. De plus, si Osh6p(4A) et Osh6p (5A2G) conservent une bonne activité de transport de PI(4)P entre des liposomes faiblement anioniques, à l'inverse, leur activité est réduite en présence de liposomes donneurs fortement anioniques et contenant 30 mol% de diphyt-PS (**Fig. 8e**). L'effet inhibiteur paraît meilleur lorsque le nombre de charges neutralisées dans le couvercle augmente. Ensuite, nous avons examiné si les effets observés étaient liés à des interactions électrostatiques non spécifiques avec les membranes. Pour cela nous avons mesuré les activités d'Osh6p, Osh6p(4A) et -(5A2G) avec des liposomes dont la teneur en différents lipides anioniques mime celle du RE et de la membrane plasmique. Les liposomes donneurs qui contiennent 5 mol% de PI(4)P sont dopés avec 25% de diphyt-PS, 10% de PI et 4% de PA pour mimer la membrane plasmique. Les liposomes accepteurs de PI(4)P miment le RE avec 5% de POPS, 15% de PI et 4% de PA. L'activité de transport des trois protéines dans ces conditions est comparée à leur activité de transport entre des liposomes faiblement anioniques : seulement 5 mol% de PI(4)P et 5 mol% de PS dans les liposomes donneurs et accepteurs

respectivement. Cette analyse indique que l'activité d'Osh6p ne change pas beaucoup en présence de liposomes qui miment le RE et la membrane plasmique (**Fig. 8f**). Au contraire, la vitesse de transport de PI(4)P entre ces liposomes très anioniques est réduite d'environ 20 et 40 fois pour Osh6p(4A) et -(5A2G) respectivement par rapport à la vitesse de transport mesurée en présence de membranes faiblement anioniques. Ces résultats indiquent que l'effet atténuateur des liposomes qui miment le RE et la membrane plasmique sur le transport de PI(4)P est d'autant plus accentué qu'il y a de charges neutralisées dans le couvercle.

In vivo, l'expression des mutants Osh6p(L69D) et -(HH/AA) ne permet pas de compenser l'effet létal de l'absence de toute protéine Osh fonctionnelle. Mais remarquablement, la seule expression d'Osh6p-(5A2G) est suffisante pour assurer la viabilité des levures malgré un léger défaut de croissance (**Fig. 8g**). Cependant, lorsque les cellules expriment Osh6p(5A2G), nous observons que le transport de PS depuis le RE vers la membrane plasmique est fortement ralenti par rapport à des cellules qui expriment la forme Osh6p-WT. Ces données suggèrent donc que la neutralisation du couvercle limite la capacité d'Osh6p à échapper aux membranes chargées négativement et à transporter efficacement les lipides.

Pour conclure, dans cet article nous montrons qu'Osh6p a évolué avec un motif contenant des résidus anioniques qui sont présents à la surface de son couvercle. Le couvercle est un élément structural qui permet à Osh6p d'échapper à l'attraction des membranes chargée négativement. En effet, *in vivo*, *in vitro* et *in silico* un mutant sans couvercle, qui expose une surface chargée positivement, se lie fortement à des membranes anioniques. En fait, lorsque Osh6p extrait un ligand lipidique, le couvercle se ferme, il masque des résidus chargés positivement, et expose une surface anionique qui provoque le détachement de la protéine par répulsion électrostatique. Si la charge du motif anionique porté par le couvercle est atténuée, alors l'activité d'Osh6p est fortement limitée par l'augmentation de son temps de résidence sur des membranes anioniques. Finalement, nous proposons un modèle dans lequel Osh6p disposerait d'un mécanisme de commutation électrostatique lui permettant de basculer rapidement d'un état lié aux membranes sous sa forme vide à un état soluble sous sa forme liée à l'un de ses ligands : la PS et le PI(4)P. Ce mécanisme permet à Osh6p d'effectuer de nombreux cycles d'échange PS/PI(4)P entre les membranes anioniques que sont le RE et la membrane plasmique.

Article I

An electrostatic switching mechanism to control the lipid transfer activity of Osh6p

N.-F. LIPP, R. GAUTIER, M. MAGDELEINE, M. RENARD,
V. ALBANÈSE, A. ČOPIČ




2019

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11780-y>

OPEN

An electrostatic switching mechanism to control the lipid transfer activity of Osh6p

Nicolas-Frédéric Lipp ¹, Romain Gautier ¹, Maud Magdeleine¹, Maxime Renard¹, Véronique Albanèse ², Alenka Čopič ² & Guillaume Drin ¹

A central assumption is that lipid transfer proteins (LTPs) bind transiently to organelle membranes to distribute lipids in the eukaryotic cell. Osh6p and Osh7p are yeast LTPs that transfer phosphatidylserine (PS) from the endoplasmic reticulum (ER) to the plasma membrane (PM) via PS/phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) exchange cycles. It is unknown how, at each cycle, they escape from the electrostatic attraction of the PM, highly anionic, to return to the ER. Using cellular and in vitro approaches, we show that Osh6p reduces its avidity for anionic membranes once it captures PS or PI4P, due to a molecular lid closing its lipid-binding pocket. Thus, Osh6p maintains its transport activity between ER- and PM-like membranes. Further investigations reveal that the lid governs the membrane docking and activity of Osh6p because it is anionic. Our study unveils how an LTP self-limits its residency time on membranes, via an electrostatic switching mechanism, to transfer lipids efficiently.

¹Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France. ²Institut Jacques Monod, CNRS, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75205 Paris, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to G.D. (email: drin@ipmc.cnrs.fr)

Lipids are accurately distributed in the eukaryotic cell to confer to organelles their physical features and molecular identity^{1,2}. Phosphatidylserine (PS), representing 2–10% of total membrane lipids^{3–6}, is a negatively-charged glycerophospholipid that is spread along a gradient in the cell. Its concentration increases between the endoplasmic reticulum (ER), where it accounts for 5–7% of glycerophospholipids, and the plasma membrane (PM) where its proportion can rise up to 30%^{7–9}. It mostly accumulates in the cytosolic leaflet of this membrane. This build-up and asymmetric distribution of PS in the PM are critical for signaling pathways, mediated by cytosolic proteins that are recruited and/or activated by this lipid⁹. Like other lipids predominantly found in the PM^{10–13}, PS is synthesized in the ER¹⁴, meaning that it must be exported to the PM. How this is accomplished was unknown⁹ until the demonstration that in *Saccharomyces cerevisiae*, Osh6p and its homolog Osh7p mediate ER-to-PM PS transport¹⁵.

Osh6p and Osh7p belong to the oxysterol-binding protein-related proteins (ORPs)/oxysterol-binding homologues (Osh) family which is a major group of lipid transfer proteins (LTPs) and/or lipid sensors in eukaryotes¹⁶. All members of this family have a domain—called ORD (OxySterol Binding Protein (OSBP)-Related Domain)—to encapsulate specific lipid species. A few of them, including Osh6p and Osh7p, consist only of an ORD^{15,17}, whereas others contain additional modules¹⁶. The ORD of Osh6p/Osh7p has a cavity to host one PS molecule; this pocket is closed by an N-terminal lid that shields the lipid from the aqueous environment¹⁵. Remarkably, Osh6p can alternately trap phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P)¹⁸. PI4P is made at the PM, as well as in other compartments of the secretory pathway, and is hydrolysed into phosphatidylinositol at the ER¹⁹. Thus a PI4P gradient exists at the ER/PM interface and Osh6p/Osh7p use this gradient to transfer PS from the ER to the PM by PS/PI4P exchange cycles. During each cycle, they would extract a PS molecule from the ER, exchange it for PI4P at the PM, and deliver PI4P to the ER where PI4P is hydrolyzed¹⁸. In human, ORP5/ORP8 act similarly at ER-PM contact sites²⁰. Several ORP/Osh proteins likely use PI4P gradients to move other lipids, as demonstrated for Osh4p and OSBP, which are sterol/PI4P exchangers²¹.

Due to the abundance of PS, the cytosolic side of the PM is highly negatively-charged compared to that of other organelles^{9,22,23}. This generates high electrostatic forces that are exploited by signaling proteins targeting this region: MARCKS²⁴, Src²⁵, K-Ras²⁶ or Rac1²⁷ bind to the PM via a stretch of positively-charged amino-acids and a lipidic tail; conventional PKC²⁸ recognizes PS using a C2 domain. These binding reactions are regulated: MARCK or K-Ras are displaced from the PM through phosphorylation^{26,29}, whereas the binding of the PKC C2 domain depends on Ca²⁺ levels²⁸. What about Osh6p and Osh7p? During one PS/PI4P exchange cycle, they must interact with the PM and then escape from the electrostatic field of the PM to return to the ER, whose surface is less anionic^{1,8,9,22}. It is often implicitly assumed that LTPs must bind transiently to donor and acceptor organelle membranes to be efficient^{30–33}. Because structural analyses suggest that several LTPs change their conformation when encapsulating a ligand^{17,34,35}, it is also often speculated that the status of an LTP, empty or loaded, influences its membrane-binding capacities^{17,33}. This has been demonstrated for the phosphatidylinositol transfer protein PITPa³⁶ whose exchange dynamics depend on its ability to undergo a conformational change upon capturing lipid. Apart from this example, the dynamic changes during transport reactions are poorly documented. Furthermore, there are many examples of LTPs (Sec14p, nsLTP, GLTP) whose activity is impeded in the presence of negatively-charged membranes due to their high

retention on such membranes^{37–39}. How can Osh6p/Osh7p work efficiently at the ER/PM interface?

Here, we address this issue via cellular observations combined with in vitro and in silico analyses. We find that Osh6p has a reduced binding to anionic membranes, once it extracts PS or PI4P, because its N-terminal lid closes. Consequently, Osh6p maintains a fast transport activity between membranes resembling the ER-membrane and PM. Molecular dynamics (MD) simulations suggest that the attraction forces between the closed form of Osh6p and membranes are weak, because the lid is anionic and masks some membrane-interacting regions. Charge-neutralizing mutations in an aspartate(D)/glutamate(E)-rich motif in the lid impair Osh6p's activity. We demonstrate that a LTP uses an electrostatic switching mechanism to self-limit its residency time on membranes and thereby, be efficient.

Results

Osh6p firmly binds to membranes if its lid region is mutated.

When Osh6p is chromosomally tagged with GFP, it can be observed in patches at the cell cortex, confirming its enrichment at ER-PM contact sites^{15,40}. In addition, diffuse fluorescence throughout the cell suggests a significant soluble pool of Osh6p-GFP (Fig. 1a). Similar localization is observed when Osh6p-GFP is expressed from a CEN plasmid under the control of the pADH1 promoter in an *osh6Δosh7Δ* strain in the case of weakly expressing cells (Fig. 1b). In contrast, cells with higher fluorescent levels, likely harboring multiple copies of the plasmid, display only cytoplasmic fluorescence, suggesting that there are a limited number of Osh6p-binding sites at the cortical ER. We next compared localization of Osh6p (termed WT), fused to mCherry, to that of two mutants, L69D and H157A/H158A (thereafter called HH/AA), which are deficient for PS transport¹⁸. Osh6p (L69D), in which an anionic residue replaces a hydrophobic one in the lid (Fig. 1c), cannot bind or trap PS¹⁵. Osh6p(HH/AA) does not recognize PI4P and is therefore unable to convey PS via PS/PI4P exchange¹⁸. Despite their similar defects in PS transport, these mutants have different intracellular distribution (Fig. 1d): Osh6p(HH/AA) is cytosolic and enriched at the cortex like Osh6p, whereas Osh6p(L69D) is less cytosolic and instead bound to membranes in highly-expressing cells. Notably, it colocalizes with the ER-marker Sec63p, but is also seen in other intracellular structures and enriched at the cell surface (Fig. 1d and Supplementary Fig. 1a). Besides, some bright internal spots may represent Osh6p(L69D) aggregates (Fig. 1d). The localization of a deletion mutant Osh6pΔ69 that lacks the lid (residues 36 to 69) and an upstream low-complexity region [1–35], is similar to that of Osh6p(L69D) (Fig. 1d and Supplementary Fig. 1a). This mutant does not transfer PS in vitro¹⁸ or in cells (Supplementary Fig. 1b). Thus, a mutation within the lid, or the deletion of the N-terminal region that includes the lid, increases the propensity of Osh6p to interact with membranes.

We next analyzed the membrane-binding capacity of Osh6p in vitro by measuring its association with neutral or anionic liposomes in flotation assays. Recombinant wild-type protein was mixed with liposomes made of 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and increasing levels (0, 5, 10 or 30% mol/mol) of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserine (POPS). These liposomes were then recovered from the top of a sucrose gradient following centrifugation, and the percentage of Osh6p bound to liposomes was quantified. Osh6p has a low avidity for membranes; <15% of protein was recruited onto liposomes irrespective of their PS density (Fig. 1e). We then evaluated how Δ69, L69D and HH/AA mutants interacted with membranes containing 30% PS, or additionally 4% PI4P, compared to Osh6p(WT). Remarkably, Δ69 and L69D mutants

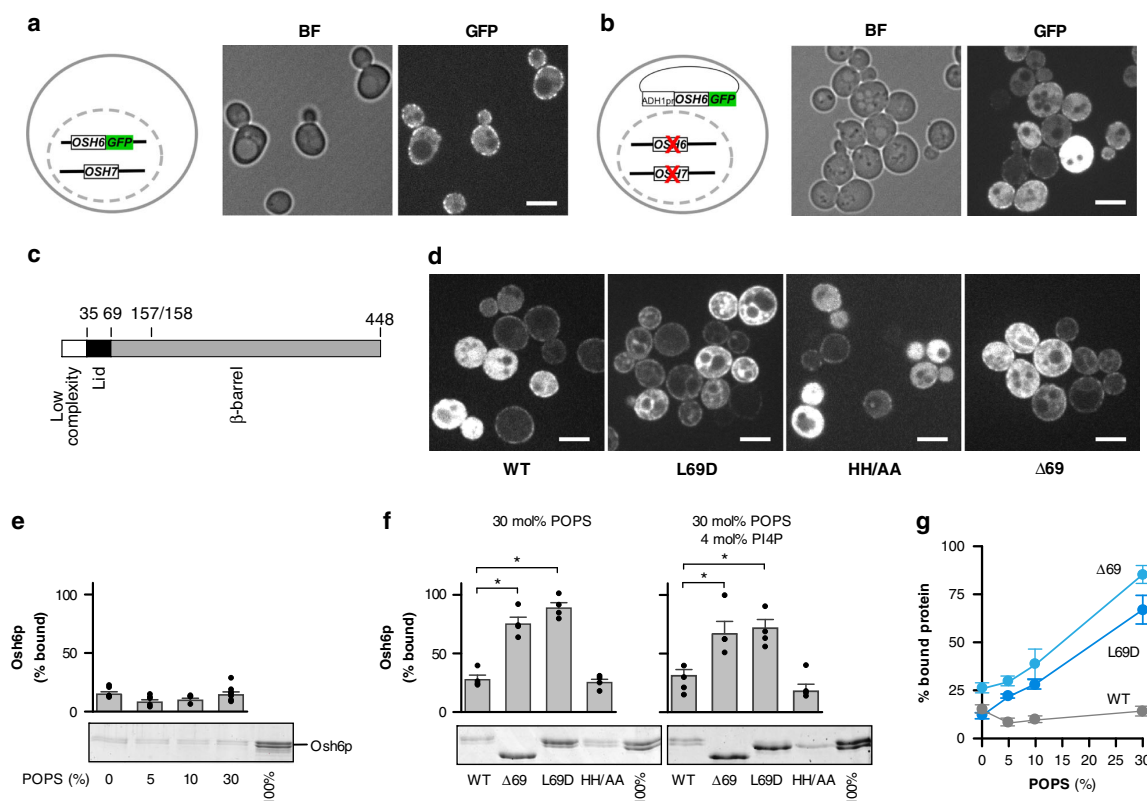


Fig. 1 Osh6p weakly binds to membranes due to its lid region. **a** Localization of chromosomally-tagged Osh6p-GFP in wild-type yeast, as depicted in the scheme. Brightfield (BF) and GFP fluorescence images are shown. Scale bar: 5 μ m. **b** Localization of Osh6p-GFP, under the control of an pADH1 promoter expressed from a low-copy plasmid in *osh6 Δ osh7 Δ* cells, as depicted in the scheme. Level of Osh6-GFP expression varies due to variability in plasmid copy number per cell. Scale bar: 5 μ m. **c** Representation of the different sub-regions of Osh6p showing the position of mutations and deletions in Osh6p mutants. **d** Localization of Osh6p WT and mutants fused to mCherry expressed from a plasmid in *osh6 Δ osh7 Δ* cells as in (**b**). Scale bar: 5 μ m. **e** Flotation assay. Osh6p (750 nM) was incubated in HK buffer at 25 $^{\circ}$ C for 10 min with DOPC liposomes (750 μ M lipids) containing 0, 5, 10 or 30% POPS at the expense of DOPC. 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 to 4) was quantified and the fraction of liposome-bound Osh6p was determined using the content of lane 5 (100%) as a reference. Experiments were repeated ($n = 4-7$) using different batches of extruded liposomes. **f** Osh6p, Osh6p Δ 69, Osh6p(L69D) or Osh6p(HH/AA) was added to DOPC liposomes doped with 30% POPS or to DOPC/POPS/diC16:0-PI4P (66/30/4 mol/mol) liposomes ($n = 4$, $*P < 0.05$, Mann-Whitney test). **g** Percentage of membrane-bound Osh6p, Osh6p Δ 69 or Osh6p(L69D) as a function of the density of POPS in liposomes ($n = 4-7$ for Osh6p WT, $n = 5-6$ for Osh6p Δ 69, $n = 5-7$ for Osh6p(L69D)). Error bars correspond to s.e.m. Source data are provided as a Source Data file

have a high avidity for these membranes ($\sim 75\%$ of bound protein, Fig. 1f) whereas Osh6p(HH/AA) remains mostly soluble, like Osh6p. The fraction of membrane-bound Osh6p Δ 69 and Osh6p(L69D) increases with the density of PS in the liposomes, contrary to Osh6p (Fig. 1g), suggesting that electrostatic forces drive the interaction of these mutants with membranes. We conclude that the increased localization of L69D and Δ 69 mutants to cellular membranes might be due to their stronger avidity for lipid bilayers.

High membrane-binding Osh6p's mutants do not extract lipids. To explain these data, we looked for functional differences between Osh6p and its mutants, first by quantifying their ability to remove PS from liposomes using a PS-sensor NBD-C2_{Lact}¹⁸. This sensor bears an NBD fluorophore whose emission intensity depends on whether it is bound or not to membrane. When incubated with liposomes containing 2% POPS, the fluorescence of NBD-C2_{Lact} was high (Fig. 2a), indicating that it was membrane-bound. In the presence of Osh6p, the fluorescence was low and comparable to that measured with PS-free liposomes.

This indicated, after signal normalization, that 75–80% of accessible PS was extracted (Fig. 2b). Osh6p(HH/AA) exhibited a similar extraction efficiency. In contrast, Osh6p Δ 69 and Osh6p(L69D) did not provoke any substantial dissociation of the probe, indicative of their inability to extract PS. A related assay based on a PI4P-sensor, NBD-PH_{FAPP}⁴¹, revealed that Δ 69, L69D and HH/AA mutants fail to extract PI4P (Fig. 2c, d, $< 20\%$ extraction), contrary to Osh6p (100%). Jointly these data indicated that Osh6p Δ 69 and Osh6p(L69D) extract neither PS nor PI4P, whereas Osh6p(HH/AA) is still able to encapsulate PS. We conclude that the higher avidity of Osh6p Δ 69 and Osh6p(L69D) for membranes, in yeast or in vitro, might be because they remain empty, although these membranes contain PS and PI4P.

Osh6p strongly binds to anionic membranes as its lid is open. Osh6p Δ 69 remains empty probably because, without a lid, it cannot secure PS or PI4P inside its pocket, as suggested by previous structural and in silico analyses^{15,18}. For the L69D mutant, we assumed that it behaved like Osh6p Δ 69 because its lid was unable to close. To investigate this point, we devised an assay for

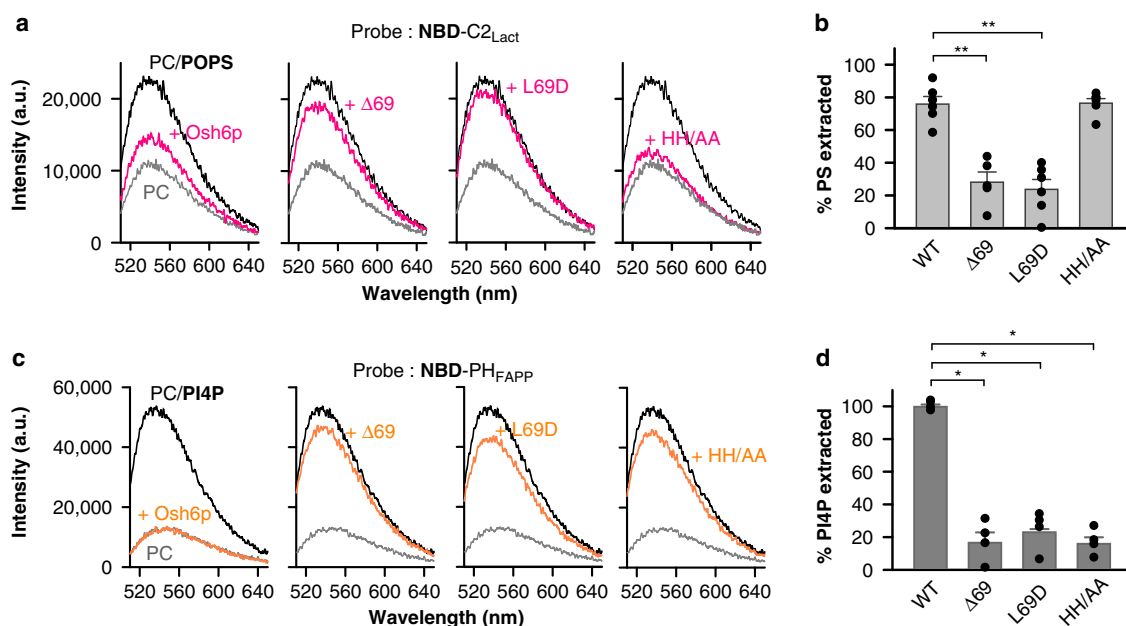


Fig. 2 Osh6p mutants extract differently PS and PI4P. **a** PS extraction assay. Fluorescence spectra of NBD-C2_{Lact} (250 nM) measured upon excitation at 460 nm in the presence of liposomes (80 μM, 2% POPS) before (black spectrum) and after (pink spectrum) adding Osh6p or mutants (3 μM). A reference spectrum (in gray) was recorded with pure DOPC liposomes incubated with NBD-C2_{Lact}. **b** Percentage of accessible PS extracted by each construct based on signal normalization at 536 nm. ($n = 5-6$, $**P < 0.01$, Mann-Whitney test). **c** PI4P extraction assay. Fluorescence spectra of NBD-PH_{FAPP} (250 nM) ($\lambda_{ex} = 460$ nm) mixed with liposomes (80 μM, 2% diC16:0-PI4P) before (black spectrum) and after (orange spectrum) adding 3 μM Osh6p WT or mutants. A reference spectrum of NBD-PH_{FAPP} (in grey) was recorded with PI4P-free liposomes. **d** Percentage of accessible PI4P extracted by each construct based on signal normalization at 536 nm ($n = 4$, $*P < 0.05$, Mann-Whitney test). Error bars correspond to s.e.m. Source data are provided as a Source Data file

evaluating the conformational state of Osh6p. We purified an Osh6p(noC/S190C) construct including a single cysteine at position 190, predicted to be solvent-exposed only if the lid is open (Fig. 3a). This protein was mixed with 7-diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin (CPM), which becomes fluorescent when forming a covalent bond with a thiol group. After a 30-min incubation with the protein alone in buffer, we measured a high fluorescence indicative of the accessibility of the cysteine. This suggested that Osh6p could regularly adopt an open state (Fig. 3a, Supplementary Fig. 2a, b). A higher signal was obtained when Osh6p(noC/S190C) was mixed with pure DOPC liposomes, indicating that the protein was more frequently open in that context (Fig. 3a, Supplementary Fig. 2b). In contrast, when Osh6p(noC/S190C) was added to liposomes with 2% POPS or PI4P, we recorded an extremely low signal, suggesting that the protein, in the presence of its ligands, remained essentially closed.

We repeated these measurements with an Osh6p(noC/S190C) construct bearing the L69D mutation. We measured in solution a CPM signal similar to that obtained with the previous construct and obtained higher signals with liposomes, but even if they contained PS or PI4P. This was not due to a denaturation process since the two noC/S190C constructs are properly folded (Supplementary Fig. 2c). We conclude that the L-to-D substitution prevents the lid from closing in the presence of a ligand and that the L69D mutant binds more to PS and PI4P-containing membranes because it corresponds to a constitutively open form of Osh6p.

Therefore, we hypothesized that the affinity of Osh6p for membranes was dependant on its conformational state. To investigate this, we performed assays with Osh6p and liposomes incorporating diphytanoyl-PS instead of POPS. Diphytanoyl-PS is a synthetic PS species whose C16:0 acyl-chains bear branched methyl groups (Fig. 3b). Consequently, it would be too bulky to

be accommodated by Osh6p. Our PS-extraction assay confirmed this, showing no change in the signal of NBD-C2_{Lact} when Osh6p was mixed with liposomes containing 2% diphytanoyl-PS (Fig. 3c). We mixed Osh6p(noC/S190C) with these liposomes and found using our CPM assay that the protein was unable to properly close because the final CPM intensity was similar to that measured with DOPC liposomes and much higher than in the presence of membranes with POPS (Fig. 3d). In flotation assays, Osh6p weakly bound to neutral membranes exclusively made of DOPC or containing 30% diphytanoyl-PC, or to anionic membranes with 30% POPS (<25% of membrane-bound protein). In contrast, it tightly associated with anionic liposomes with 30% diphytanoyl-PS ($72.6 \pm 3.1\%$). We confirmed this using a second assay and a fluorescent Osh6p in which a unique cysteine (C262) within the $\beta 14$ - $\beta 15$ loop, is labeled with NBD (Supplementary Fig. 3a-c). Adding DOPC/diphytanoyl-PS (70/30 mol/mol) liposomes to NBD-Osh6p elicited a blue-shift of its fluorescence with an increase in intensity, indicative of its recruitment onto membrane (Fig. 3f). In contrast, no change was seen with liposomes solely made of DOPC or enriched with 30% diphytanoyl-PC or POPS. Last, we found that Osh6p strongly bound to liposomes enriched with other anionic lipids, either 30% phosphatidic acid (PA) or phosphatidylinositol (PI) (Supplementary Fig. 4a). They are not ligands for Osh6p as, unlike PS, they do not prevent the protein from extracting PI4P (Supplementary Fig. 4b) when they are in excess in the same membrane. We conclude that Osh6p binds in a non-specific electrostatic manner to anionic membranes, if they are devoid of extractable lipid, because it remains empty and open.

Osh6p dissociates from membranes upon trapping its ligands. Our data suggested that Osh6p loses its ability to associate with a

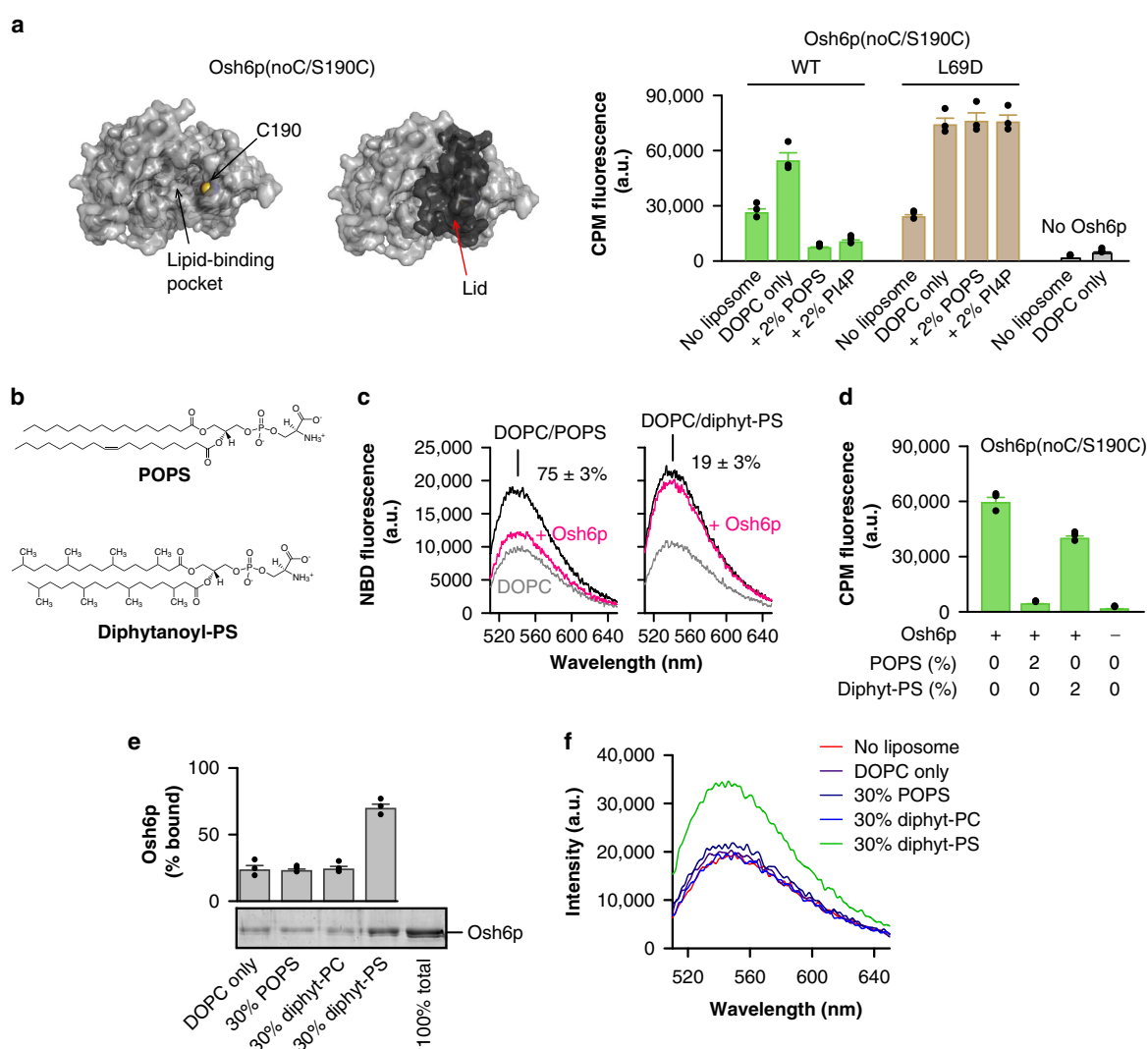


Fig. 3 The binding of Osh6p to anionic membranes depends on its conformational state. **a** Accessibility CPM assay. Osh6p(noC/S190C) has a unique cysteine which is solvent-accessible only if the lid is open. Osh6p(noC/S190C) or its L69D counterpart (400 nM) was incubated in HK buffer at 30 °C with DOPC liposomes (400 μ M lipids) including or not 2% POPS or diC16:0-PI4P. CPM (4 μ M) was added and the apparition of fluorescence was measured over time. Bars correspond to the fluorescence (measured at λ = 470 nm) 30 min after adding CPM (n = 3). **b** Chemical structure of POPS and diphytanoyl-PS. **c** PS extraction assay. Fluorescence spectra of NBD-C2_{lact} (250 nM) (λ_{ex} = 460 nm), mixed with DOPC liposomes (80 μ M lipid) incorporating 2% POPS or 2% diphytanoyl-PS, were recorded before and after adding Osh6p (3 μ M). A control experiment was done with pure DOPC liposomes. Normalized signal provides the fraction (in percentage) of extracted PS (n = 4 with POPS, n = 3 with diphytanoyl-PS). **d** Accessibility assay. Osh6p(noC/S190C) (400 nM) was incubated with DOPC liposomes doped or not with 2% POPS or diphytanoyl-PS and mixed with CPM (4 μ M). Intensity bars correspond to the fluorescence measured 30 min after adding CPM (n = 3). **e** Flotation assay. Osh6p (750 nM) was incubated with pure DOPC liposomes (750 μ M lipids) or liposomes containing 30% POPS, diphytanoyl-PC or diphytanoyl-PS at the expense of DOPC. The bars represent the fraction of protein bound to each type of liposomes (n = 3-4). **f** Emission spectra of NBD-labeled Osh6p (200 nM, excitation at 460 nm) in HK buffer measured in the absence (red spectrum) or presence of liposomes (400 μ M total lipids) made only of DOPC or including 30% POPS, diphytanoyl-PC or diphytanoyl-PS (at the expense of DOPC). The contribution of buffer alone or of light scattering from liposomes to the fluorescence signal was subtracted. Error bars correspond to s.e.m. Source data are provided as a Source Data file

membrane once it extracts a lipid ligand and closes. To explore this, we first examined whether the lid was the sole structural element of the N-terminus of Osh6p to mediate this process. We purified a Δ 35 deletion mutant, devoid of the low-complexity region upstream of the lid, and found that it behaved similarly as Osh6p. First, it efficiently extracts PS or PI4P, except if it bears the L69D mutation (Fig. 4a). Second, compared to Δ 69 and L69D mutants, it weakly interacts with anionic membranes

containing PS or both PS and PI4P (Fig. 4b, Supplementary Fig. 4c). Third, fluorescence assays showed that an Osh6p Δ 35 construct, labeled with NBD, binds to diphytanoyl-PS-rich membranes but not to neutral or POPS-rich membranes (Fig. 4c). This suggests that in the N-terminal region of Osh6p, the lid is the unique element that guarantees the extraction efficiency of the protein and controls its membrane-binding properties.

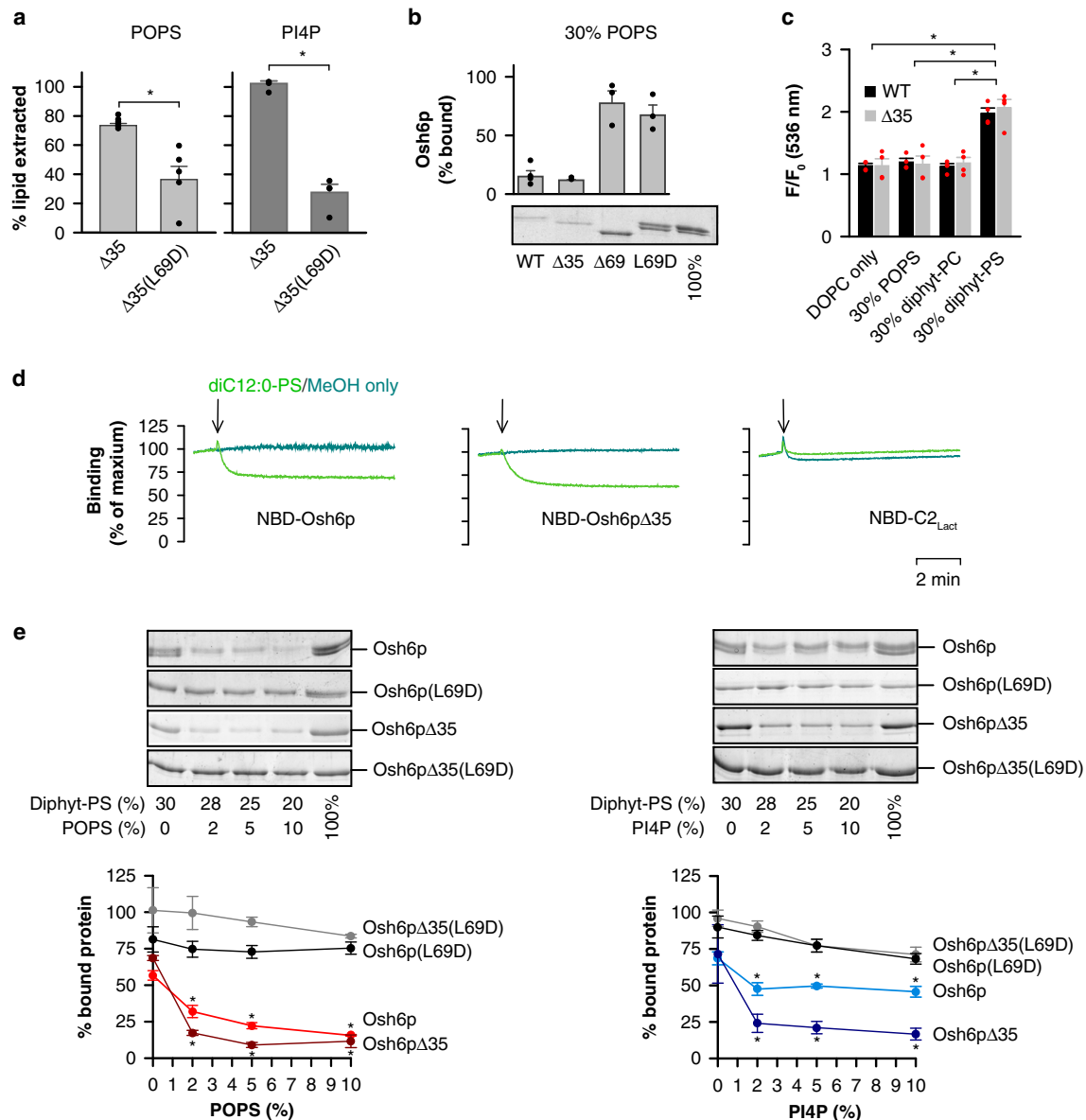


Fig. 4 Osh6p dissociates from anionic membranes when it extracts a lipid ligand. **a** PS and PI4P extraction assay. Percentage of accessible PS or PI4P extracted by 3 μM Osh6p $\Delta 35$ or Osh6p $\Delta 35$ (L69D) from liposomes (80 μM lipids, with 2% POPS or diC16:0-PI4P) using NBD-C2_{Lact} or NBD-PH_{FAPP}, respectively. Values are obtained by normalizing the signal at 536 nm ($n = 5-6$ for PS extraction assays, $n = 4$ for PI4P extraction assays, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$, Mann-Whitney test). **b** Flotation assay. Osh6p, Osh6p $\Delta 35$, Osh6p $\Delta 69$ or Osh6p(L69D) (750 nM) was added to liposomes (750 μM lipids) with 70 mol% DOPC and 30 mol% POPS ($n = 3-4$). **c** Binding ability of NBD-labeled wild-type Osh6p (black bar) or $\Delta 35$ mutant (grey bar) to liposomes, as function of their composition, was given by the ratio of the NBD fluorescence intensity, F and F_0 , measured at 536 nm in the presence or absence of liposomes, respectively ($n = 4$, $*P < 0.05$, Mann-Whitney test). **d** Dissociation of NBD-labeled Osh6p WT or $\Delta 35$ from anionic liposomes (DOPC/diphytanoyl-PS 7/3 mol/mol) upon adding extractable PS. Each protein (100 nM) was pre-mixed with liposomes (400 μM lipids) in HK buffer at 30 $^{\circ}\text{C}$. Then, a small volume (1 μL) of a stock solution of diC12:0-PS in methanol or of pure methanol was injected. NBD fluorescence was followed at 535 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$) over 10 min and normalized. Each trace is representative of several experiments. Control measurements were performed with NBD-C2_{Lact} (250 nM) instead of NBD-labeled Osh6p. **e** Flotation assay. Osh6p, Osh6p $\Delta 35$, Osh6p(L69D) or Osh6p $\Delta 35$ (L69D) at 750 nM was incubated with DOPC/diphytanoyl-PS (7/3 mol/mol) liposomes (750 μM lipids) containing increasing amount of POPS (0, 2, 5 or 10%). Alternatively, each protein was incubated with DOPC/diphytanoyl-PS (7/3 mol/mol) membranes with 0, 2, 5 or 10% diC16:0-PI4P ($n = 4$, $*P < 0.05$, Mann-Whitney test, comparison with the data measured with no PS or PI4P). Error bars correspond to s.e.m. Source data are provided as a Source Data file

Then, we examined in real-time whether the membrane-binding capacity of Osh6p changed in the presence of a ligand. Osh6p or the $\Delta 35$ mutant, labeled with NBD, was mixed with liposomes containing 30% diphytanoyl-PS, resulting in a maximal NBD signal, indicative of their association to membranes. The addition of short-chained PS (diC12:0) stored in methanol provoked a fast decrease in fluorescence, whereas pure methanol did not (Fig. 4d). This effect was specific to Osh6p since no drop in signal was seen when adding PS to NBD-C₂L_{act} bound to diphytanoyl-PS-rich liposomes. Thus, Osh6p dissociates from an anionic membrane once an extractable lipid is available.

To quantify this, we performed flotation assays by incubating Osh6p or Osh6p $\Delta 35$ with liposomes containing 70% DOPC and 30% diphytanoyl-PS, and no or increasing amount of POPS (2, 5 or 10%, Fig. 4e). Remarkably, whereas these proteins efficiently bind to membranes devoid of POPS, they bind two-time less to membranes doped with 2% POPS and are essentially soluble at higher POPS concentration (Fig. 4e). Comparable results were obtained with diphytanoyl-PS-rich liposomes doped with PI4P, yet at a lesser extent with Osh6p. In contrast, Osh6p(L69D) and Osh6p $\Delta 35$ (L69D) remained attached, whatever the POPS or PI4P level. Last, Osh6p and Osh6p $\Delta 35$ associate with anionic liposomes rich in PA or PI but, overall, less if these liposomes contain 5% PS or PI4P (Supplementary Fig. 4d). Jointly, these data suggest that trace amounts of ligand reduce the retention of Osh6p on anionic membranes, if its lid is functional.

Osh6p retains its solubility and activity as it can close. We further explored whether the low affinity of the lipid-loaded form of Osh6p for membranes might be important for its exchange activity at the ER/PM interface. To this end, we tested the ability of Osh6p, Osh6p $\Delta 35$ or Osh6p $\Delta 69$ to transport PI4P from L_B (PM-like) liposomes doped with 5% PI4P and Rhodamine-phosphatidylethanolamine (Rhod-PE), to L_A liposomes (ER-like) containing 5% PS, under conditions where PS/PI4P exchange occur¹⁸. Two conditions were tested for each protein: with L_B liposomes incorporating 25% diphytanoyl-PC or 25% diphytanoyl-PS, thus either weakly or highly anionic. In each measurement, the PI4P-sensor NBD-PH_{FAPP}⁴¹ was pre-mixed with L_B liposomes: it associates with these vesicles resulting in the quenching of the NBD signal by FRET to Rhod-PE. Then, L_A liposomes and an Osh6p variant were injected (Fig. 5a). With weakly anionic L_B liposomes, the addition of Osh6p or Osh6p $\Delta 35$ provoked a fast fluorescence dequenching, corresponding to the transfer of PI4P from L_B to L_A membranes. According to the normalized signals, PI4P is rapidly equilibrated between liposomes. The initial transport rates for Osh6p and its $\Delta 35$ counterpart were 31.2 ± 4 and 30.2 ± 1.8 PI4P min⁻¹ per protein, respectively (mean \pm s.e.m., Fig. 5b). Osh6p $\Delta 69$ transports PI4P to some extent, despite the absence of the lid (3.3 ± 1.2 PI4P min⁻¹), as found previously¹⁸. With very anionic L_B liposomes, Osh6p WT and $\Delta 35$ remained efficient as PI4P was almost completely transferred within 2 min. The transport rate was reduced by ~70% with Osh6p but only by ~30% with Osh6p $\Delta 35$. In comparison, the activity of Osh6p $\Delta 69$ was abrogated. In view of our binding measurements, we conclude that Osh6p and Osh6p $\Delta 35$, contrary to Osh6p $\Delta 69$, might minimize their retention onto anionic L_B liposomes owing to the lid and the presence of PI4P. Consequently, they can efficiently shuttle PI4P to L_A liposomes in the context of PS/PI4P exchange.

We then investigated whether Osh6p or Osh6p $\Delta 35$ remained soluble during transport by measuring to what extent their NBD-labeled forms bound to L_A and L_B liposomes, respectively doped with 5% PS and 5% PI4P (as in the transport assays), or not. With L_B liposomes containing 25% diphytanoyl-PC, each protein

remained mostly in solution regardless of the presence or absence of ligand, as we observed only a slight increase in NBD fluorescence above its minimal value in the two cases (Fig. 5c). In comparison, a major difference was seen with L_B liposomes rich in diphytanoyl-PS. If PS and PI4P were present, proteins were weakly membrane-bound, as previously seen. In contrast, if both ligands were absent, proteins were fully bound, as indicated by a high signal, which became noisy due to liposomes aggregation. We conclude that, when lipid ligands are present, Osh6p remains free to circulate between membranes to exchange them.

The lid is anionic and weakens the membrane binding of Osh6p. We next examined how the lid, when closing, could change the membrane-binding ability of Osh6p. Looking at the Osh6p structure, which corresponds to Osh6p $\Delta 35$ ¹⁵, we identified a motif, rich in aspartate and glutamate at the N-terminal end of the lid. Analyses of ORP/Osh sequences with a PS-recognizing motif LPTFILE¹⁵ indicated that the D/E-rich stretch is conserved in Osh6p and Osh7p homologs (Supplementary Fig. 5), but also in ORP9, -10 and -11, suggesting a functional role. A comparison of the electrostatic potential surface of Osh6p $\Delta 35$, in complex with PS, and that of Osh6p $\Delta 69$, in a ligand-free state, revealed that the lid exposes a negative surface (Fig. 6a) and hides a positively-charged area around the entry of the lipid-binding pocket. Thus, the closing of the lid might modulate the avidity of Osh6p for membrane by altering the electrostatic features of its surface.

To explore this possibility, we analyzed by MD simulations how Osh6p $\Delta 35$ or $\Delta 69$ docked onto an anionic membrane made of 70% DOPC and 30% POPS (four simulations of 500 ns per protein, Supplementary Movie 1 to 4). Each construct was placed, with diverse initial orientations, ~54 Å away from the membrane plane (Supplementary Fig. 6a). Root-Mean-Square-Deviation calculation and secondary structure analysis showed that Osh6p remained folded during all trajectories except at the end of the $\Delta 69-4$ trajectory (the C-terminal part of Osh6p $\Delta 69$ displaced from the core structure, Supplementary Figs. 6b, 7). In each Osh6p variant, the N and C-termini, several loops and the $\alpha 7$ -helix are slightly mobile, as indicated by the Root-Mean-Square Fluctuations per residue; in Osh6p $\Delta 35$, the lid displayed some motions (Supplementary Fig. 6c). Key differences were found when analyzing how Osh6p $\Delta 35$ and $\Delta 69$ bound to the membrane. In all trajectories, Osh6p $\Delta 69$ associates with the membrane, as reflected over time by a shorter height (*h*) of its center of mass relative to the membrane plane (shortest *h* = 16.1 Å, Fig. 6b). In contrast, Osh6p $\Delta 35$ binds to the membrane during two trajectories ($\Delta 35-1$ and -4 , shortest *h* = 29 Å) but remains in solution during the two others ($\Delta 35-2$ and -3 , *h* \geq 41.7 Å). Calculating Coulomb and VDW interaction energy between each protein and the membrane revealed a major role of electrostatic attraction in the binding process (Supplementary Fig. 8). Remarkably, the Coulomb and VDW interaction between Osh6p $\Delta 69$ and the membrane were more than twice stronger (lowest *E* = -2,454 and -687 kcal mol⁻¹, respectively) compared to Osh6p $\Delta 35$ (lowest *E* = -1,173 and -352 kcal mol⁻¹). These results support the idea that Osh6p is more prone to bind to a membrane when its lid is open.

Osh6p $\Delta 35$ and $\Delta 69$ are differently positioned on the membrane at the end of simulations, as indicated by the angle measured between the $\alpha 7$ -helix of the protein and the normal to the membrane plane (Fig. 6b). To better analyze this, we counted during trajectories how many times each of their residues was less than 5 Å away from lipid headgroups, considering there was a contact with membrane below this threshold. Osh6p $\Delta 35$ docks

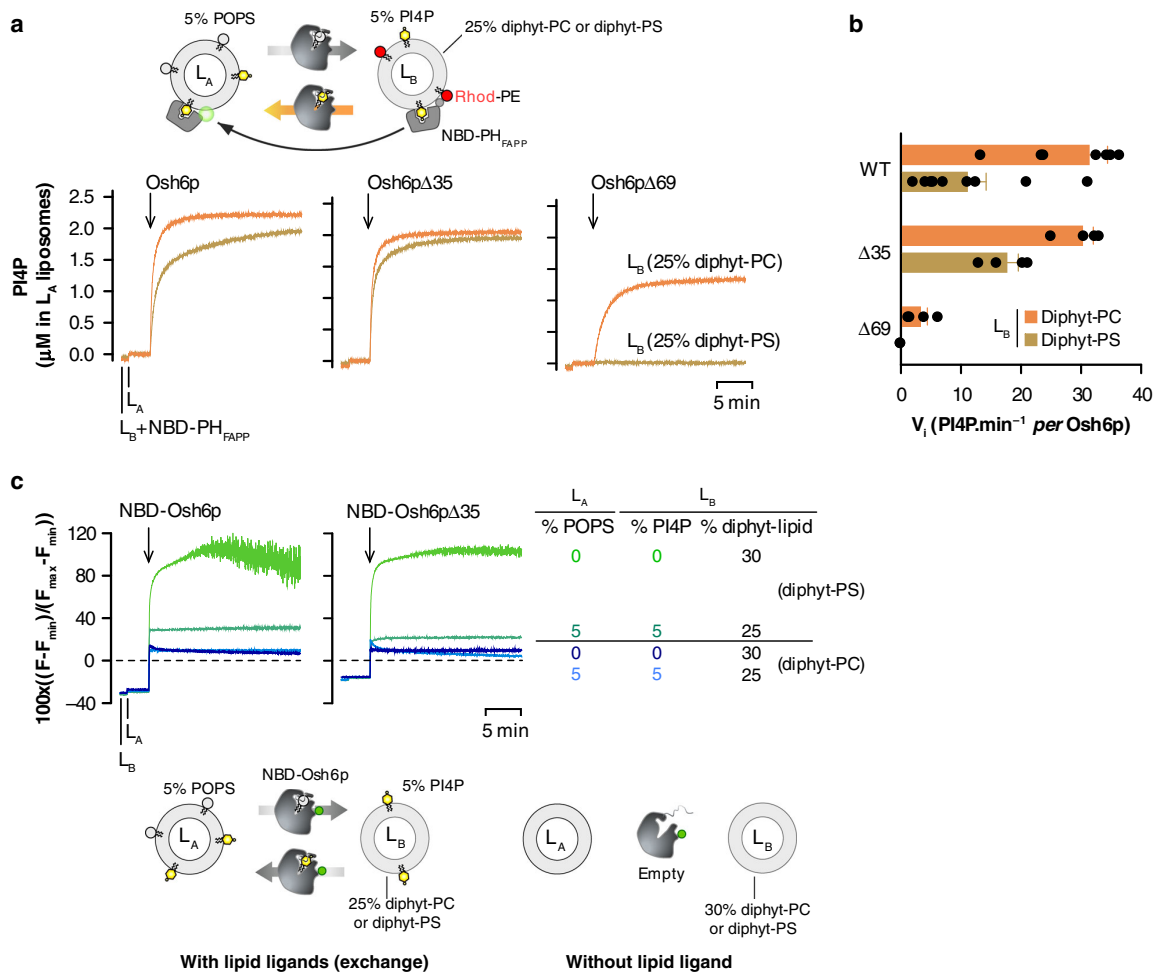
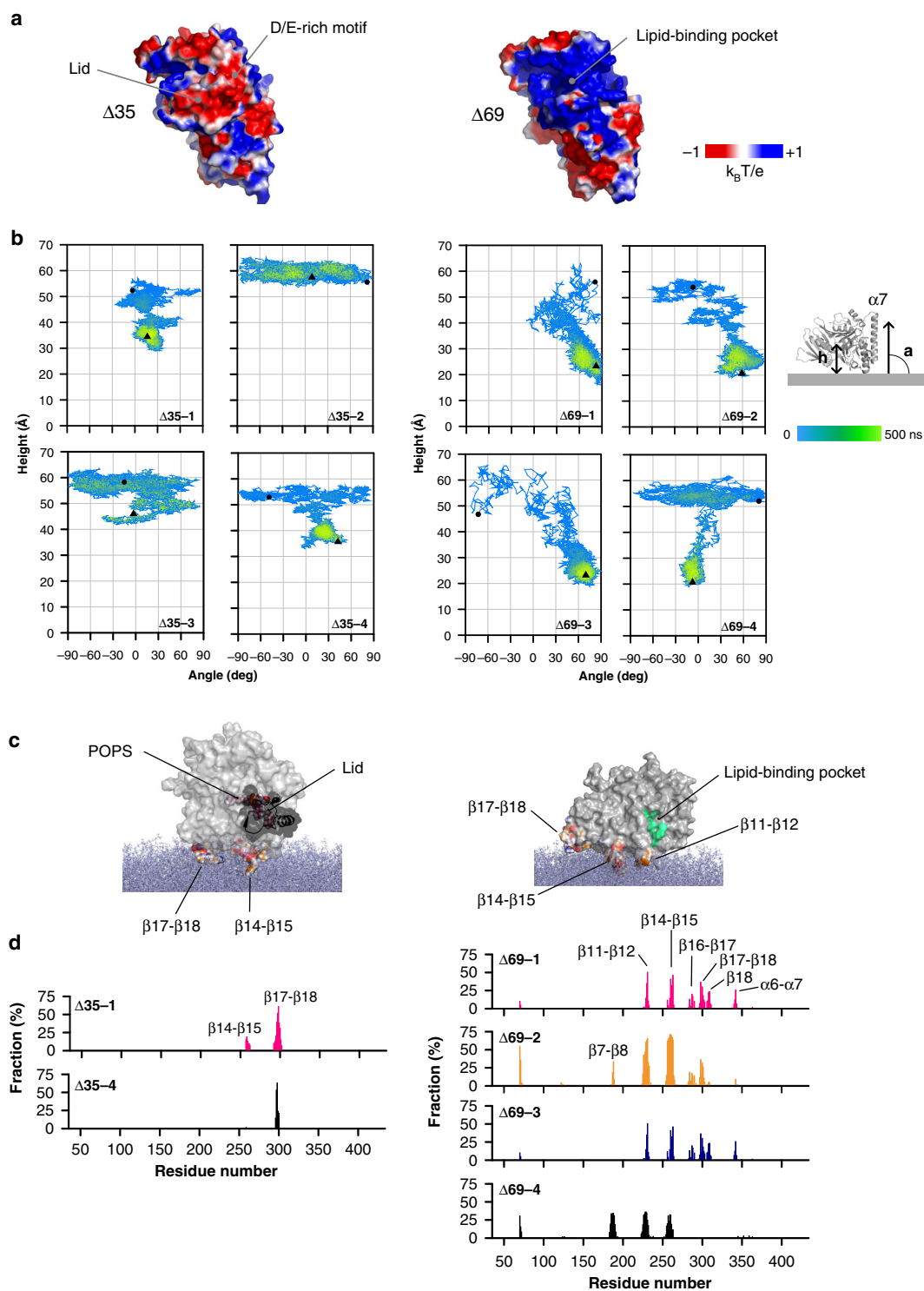


Fig. 5 Osh6p remains mostly soluble during PS/PI4P exchange between anionic membranes. **a** PI4P transport assay. L_B liposomes (200 μM total lipids), consisting of DOPC, diphytanoyl-PC, diC16:0-PI4P and Rhod-PE (68/25/5/2 mol/mol) or DOPC, diphytanoyl-PS, diC16:0-PI4P and Rhod-PE (68/25/5/2 mol/mol) were incubated with NBD-PH_{FAPP} (250 nM) in HK buffer at 30 °C. Then DOPC liposomes (200 μM lipids, L_A) doped with 5% POPS were added. After 2 min, Osh6p, Osh6pΔ35 or Osh6pΔ69 (200 nM) was injected. The dequenching of the NBD signal mirrors the translocation of NBD-PH_{FAPP} from L_B to L_A liposomes due to the transport of PI4P. The signal is normalized in term of amount of PI4P delivered into L_A liposomes. **b** Initial PI4P transport rates of each Osh6p construct measured with L_B liposomes containing diphytanoyl-PC (orange bar) or -PS (brown bar). The rates, represented as mean (n = 4–9), were determined from experiments as shown in (a). **c** Time evolution of the binding of NBD-labeled wild-type Osh6p or its Δ35 counterpart to L_A and L_B liposomes. L_A liposomes, incorporating or not 5% POPS were added to L_B liposomes, comprising 25% of either diphytanoyl-PS or -PC, doped or not with 4% diC16:0-PI4P, in HK buffer at 30 °C. Then, NBD-Osh6p WT or Δ35 was added (200 nM). The fluorescence was followed at 535 nm (λ_{ex} = 460 nm) over 20 min and normalized. Each trace is representative of several experiments. The dashed line corresponds to the NBD signal measured from the protein in buffer alone and which corresponds to zero after normalization. Error bars correspond to s.e.m. Source data are provided as a Source Data file

onto the membrane via residues of the β17–β18 loop and, transiently, of the β14–β15 loop (Fig. 6c, d; Supplementary Fig. 9a) during a short period (244–365 ns) of the Δ35-1 trajectory (Supplementary Movie 1). The entry of the pocket remains far from the membrane (shortest $h_{\text{entry}} = 20.22 \text{ \AA}$, Supplementary Fig. 9c). For Osh6pΔ69, the β11–β12 and β14–β15 loops systematically make contacts with the membrane during a significant time fraction of each simulation (f = 25–50%). During the Δ69-1, -2 and -3 trajectories, the β7–β8, β16–β17 and β17–β18 loops and β18-sheet also frequently insert between lipids (Fig. 6c, d). In the fourth trajectory, Osh6pΔ69 adopts another docking geometry, due to a combined insertion of strands (β7, β8) and loops (β7–β8, β11–β12, β14–β15) in the membrane (Supplementary Fig. 9b). At the end of all simulations, the entry of the pocket is near to the bilayer surface

(shortest $h_{\text{entry}} = 4.38 \text{ \AA}$, Supplementary Fig. 9c). Interestingly, during the Δ69-4 trajectory, the entry is in the membrane plane, (h_{entry} between -0.55 and 1 \AA), thus in a configuration maybe compatible with an extraction process (Supplementary Fig. 9b, c).

The difference in accessible surface area between Δ35 and Δ69 structures indicates that a part of the lid covers the β7 sheet and β11–β12 loop, which can anchor Osh6pΔ69 in the bilayer (Supplementary Fig. 9d). If Osh6pΔ35 was positioned on membrane surface like Osh6pΔ69, the lid would insert between the lipids (Supplementary Fig. 9e), which is unlikely as it is anionic. This suggests that the lid forbids some docking modes. We examined this by performing a simulation in which Osh6pΔ35 was already anchored to the membrane (final configuration of the Δ35-1 trajectory) but from which the lid was deleted. Remarkably, it comes closer to the membrane plane



while changing its orientation (Fig. 7a–c), and adopts a configuration akin to that of Osh6p $\Delta 69$ at the end of $\Delta 69-1$, 2, and 3 trajectories, as indicated by the analysis of the last 100 ns of each simulation (Fig. 7c, d). In summary, our simulations suggest that the lid, when closing, prevents Osh6p from interacting with

membrane because it is anionic and masks some membrane-binding regions.

Osh6p loses its activity if its lid is less anionic. We then analyzed to what extent the D/E-rich motif in the lid might play a

Fig. 6 The lid of Osh6p prevents the protein from binding to PS-rich membranes. **a** Electrostatic features of the molecular surface of Osh6p Δ 35 and Osh6p Δ 69. **b** Co-evolution of the height and orientation of the protein relative to the membrane surface during each trajectory. The height is calculated between the mass center of Osh6p Δ 35 (residue 35–434, trace Δ 35-1 to -4) or Osh6p Δ 69 (residue 70–434, trace Δ 69-1 to 4) and the plane of the DOPC/POPS bilayer during each 500 ns simulation. The orientation is given by the angle between the 346–356 segment of the α 7 helix and the plane of the membrane. The time evolution is shown with colors going from blue (beginning of the MD trajectory) to green (end of the trajectory). Dark circles and triangles correspond to the distance and angle values associated to the initial and final configuration ($t = 500$ ns) of each protein, respectively. **c** Configuration of Osh6p Δ 35 and Osh6p Δ 69, bound to the surface of the lipid bilayer at 300 ns of the Δ 35-1 trajectory and at the end of the Δ 69-2 trajectory, respectively. The surface of the protein is shown except for residues of the β 11– β 12, β 14– β 15, and β 17– β 18 loops, which are in contact with the membrane: the atoms are represented as sphere with carbon in orange, oxygen in red, nitrogen in blue and hydrogen in gray. The lid with the D/E-rich motif is drawn in a ribbon mode. The molecule of POPS inside the binding cavity of Osh6p Δ 35 is represented in a stick mode. Lipids of the membrane are shown in blue grey as stick. The walls of the binding site are colored in green. **d** Percentage of time Osh6p's residues are in close contact with the membrane. The identities of loops and others structural elements that insert in the membrane, are indicated. Source data are provided as a Source Data file

role in Osh6p's activity. To this end, we purified two mutants, Osh6p-4A and Osh6p-5A2G, in which respectively four or seven aspartate and glutamate residues within this motif were substituted by alanine or glycine for neutralizing anionic charges (Fig. 8a). Electrostatic potential calculations show that in the 4A and 5A2G structures, compared to the native one, a part of the lid exposes a positively-charged surface whose area increases with the number of substitutions (Fig. 8b). Both mutants significantly extracted PS or PI4P from liposomes, suggesting that the lid was functional (Fig. 8c). Flotation assays indicated that they interacted more with membrane containing 30% PS and 4% PI4P than Osh6p, suggestive of a tendency to remain adsorbed onto anionic membranes despite the presence of ligands (Fig. 8d). Next, we measured using ER-like (L_A) and PM-like (L_B) liposomes how the negative charge of membranes affected the activity of these mutants, compared to Osh6p (Fig. 8e). The rate of PI4P transfer mediated by 4A and 5A2G mutants is divided by ~ 7 and 22, respectively, when L_B liposomes contain 25% diphytanoyl-PS instead of diphytanoyl-PC, more than for Osh6p (~ 3 , Fig. 8f). We obtained similar results (Fig. 8f) with L_A and L_B liposomes that additionally contained PI and PA to better mimic the ER-membrane and the PM⁸. We tested the functionality of the more strongly affected 5A2G mutant in yeast. First we examined how it supported growth of a strain lacking all seven *OSH* genes and only expressing a temperature-sensitive allele of *osh4*. These cells cannot survive at the non-permissive temperature of 37 °C, but grow at 25 °C, where the *osh4-1^{ts}* allele is functional⁴². The growth at 37 °C was rescued by expression of Osh6p (Fig. 8g), likely as it substitutes for Osh4p to remove PI4P from post-Golgi vesicles and thereby restore exocytosis⁴³. We also confirmed that the L69D and HH/AA mutants fail to restore growth⁴³, possibly as they cannot extract and transport PI4P (Fig. 2d and ref. 18). In contrast, the 5A2G as well as the Δ 35 and Δ 69 mutants rescue growth. Corroborating in vitro data, this suggests that in yeast Osh6p-5A2G recognizes PI4P, like the deletion mutants. However, whereas Osh6p transfers PS from the ER to the cell surface (Fig. 8h and refs. 15,18), the expression of Osh6p-5A2G produces an intermediate phenotype: some PS reaches the surface and some remains at the ER during the time-course (Fig. 8h). All these data suggest that attenuating the anionic nature of the lid limits Osh6p in its capacity to escape from negatively-charged membranes and to displace lipids.

Discussion

Deciphering the mode of action of LTPs, at the core of lipid distribution, is an important issue in cell biology^{1,2}. Many models implicitly assume that LTPs bind transiently to organelles to quickly transfer lipids^{30,32,33}, yet almost nothing is known about these association/dissociation steps. We found that Osh6p, a PS/PI4P exchanger of the ORP/Osh family, has no propensity to

associate with the lipid surface of the ER and the PM and a weak avidity for neutral or negatively-charged liposomes in vitro. In contrast, Osh6p strongly associates with yeast membranes, including the ER, and with anionic liposomes, if the lid that controls the entry of its lipid-binding pocket is absent or unable to close. It also binds to anionic membranes if they are devoid of extractable ligands, PS or PI4P. If these lipids are available, Osh6p dissociates because its lid closes upon lipid extraction. These data supports the idea that the occupancy of a LTP by its ligand can modulate its conformational state and therefore its membrane-binding capacity^{17,33}. Interestingly, this resembles the mechanism that controls the recruitment of small G-proteins onto membranes depending on their ligand status (GDP or GTP-bound)^{44,45}. Using a model system mimicking the ER/PM interface, we established that a high density of anionic lipids in PM-like membrane weakly impacts the transport activity of Osh6p and its Δ 35 counterpart, because both have a functional lid. During this process, they remain largely soluble. The lid is thus a structural element that allows Osh6p to stay very briefly on the membrane, and thereby to ensure lipid exchange, regardless of the density of anionic lipids.

To understand why, we performed in silico analyses on the structure of Osh6p, i.e., Osh6p Δ 35¹⁵, and of the lidless Osh6p Δ 69, taking into account several points. First, Osh6p Δ 35 behaves like Osh6p: the 1–35 region upstream of the lid plays no role in the coupling between lipid extraction and membrane dissociation. Second, Osh6p Δ 69 is equivalent to Osh6p(L69D), thus to a constitutively open form of Osh6p. Third, modeling a structure of Osh6p with an open lid was problematic. These analyses indicated that the lid is anionic, due to a D/E-rich motif, and that it changes the electrostatic features of Osh6p's surface when closed. In MD simulations, Osh6p Δ 35 binds less to an anionic membrane than Osh6p Δ 69, due to weaker non-covalent interactions. Osh6p Δ 35 inserts in the bilayer via its β 17– β 18 loop and, sometimes, its β 14– β 15 loop. Interestingly, a corresponding loop seems critical for anchoring Osh4p to membrane⁴⁶. In comparison, the insertion of Osh6p Δ 69 relies on these loops but also on extra regions, including a positively-charged surface surrounding the entry of the pocket that is exposed when the lid is absent. This entry can localize at the water/membrane interface, suggesting that Osh6p, once open, adopts a configuration compatible with an extraction/delivery process. Finally we showed that charge-neutralizing mutations of the D/E-rich motif increase the ability of Osh6p to bind to anionic membranes and can lower its transfer activity in vitro and at the ER/PM interface.

We propose that the lid supports an electrostatic switching mechanism that helps Osh6p to transiently associate with the ER and the PM. Thus Osh6p can freely circulate between these compartments to ensure continuous lipid exchange. This would explain why a large fraction of this LTP is cytosolic at steady-state and why the L69D and Δ 69 mutants, with no functional lid and a

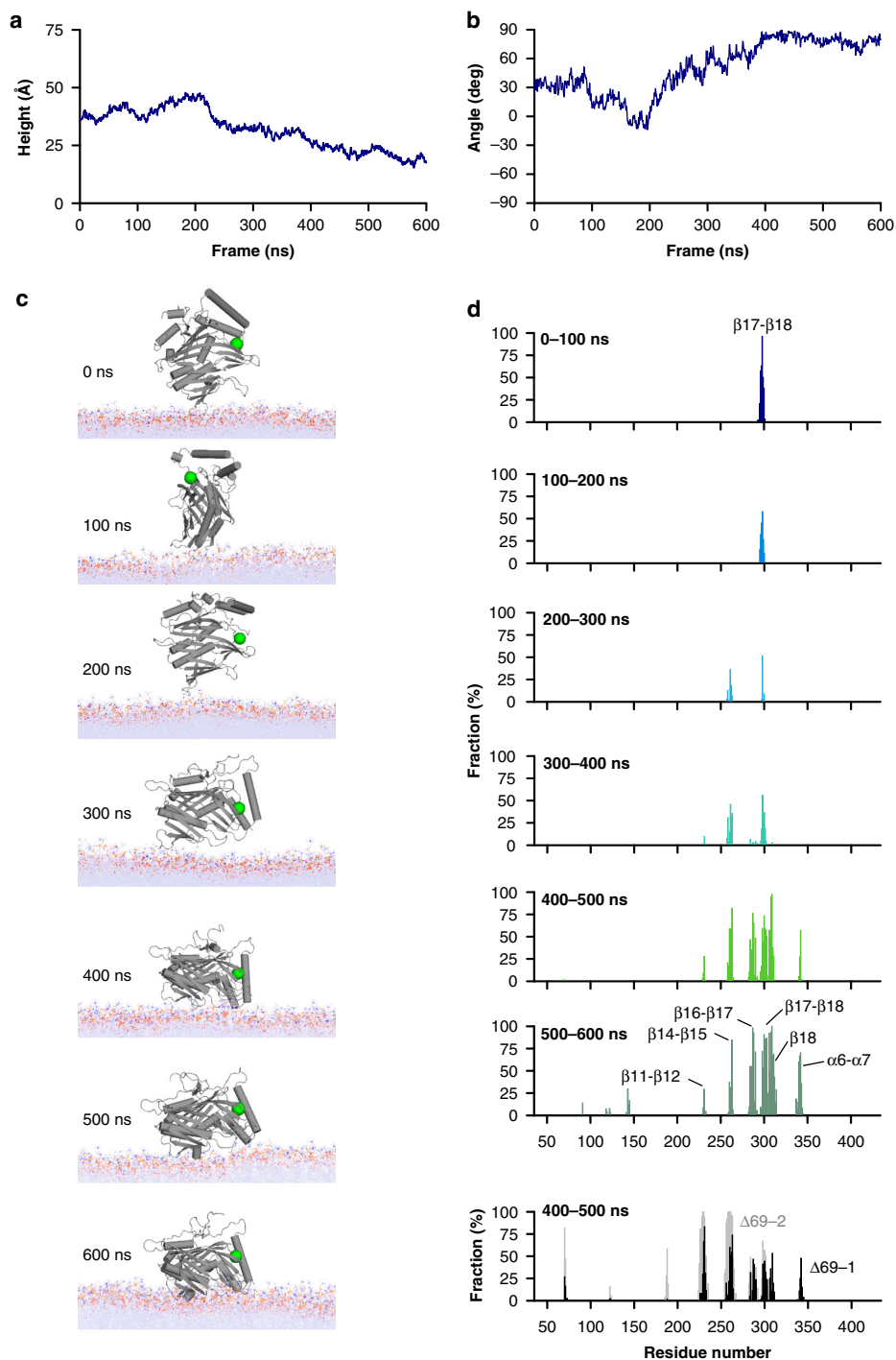
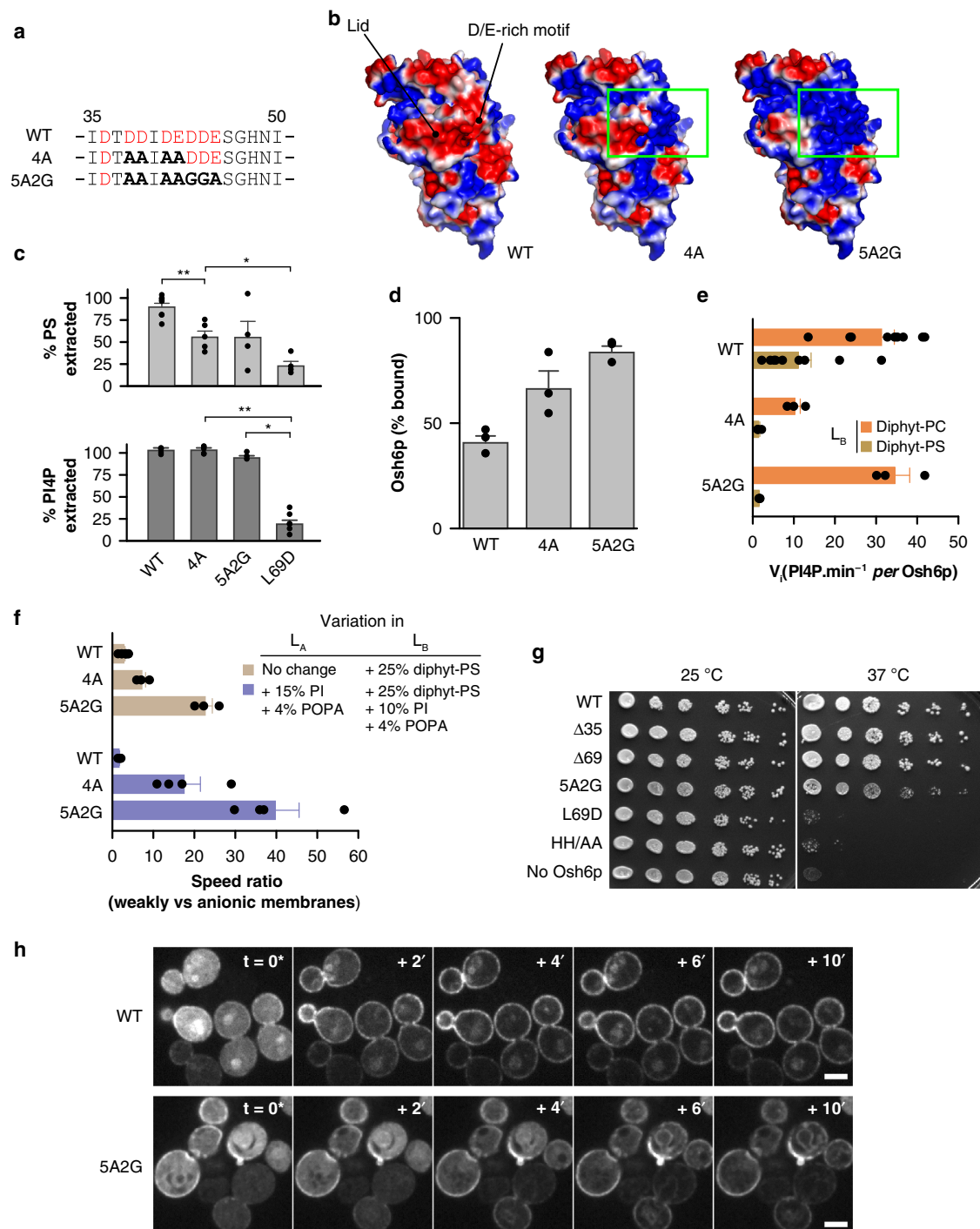


Fig. 7 Removal of the lid elicits the reorientation of Osh6p on a bilayer surface. **a** Evolution of the height between the center of mass of the protein relative to the plane of the bilayer during 600 ns. **b** Evolution of the angle between the $\alpha 7$ -helix and the plane of the membrane during the trajectory. **c** Snapshot at time zero and every 100 ns of the trajectory showing the reorientation of the protein relative to the lipid bilayer. **d** Percentage of time Osh6p's residues (*f* values) are in contact with membrane during six successive periods (100 ns each) of the trajectory. The loops corresponding to residues in contact with membrane are indicated. As a comparison, the *f* values are indicated for the last 100 ns of the $\Delta 69-1$ and $\Delta 69-2$ trajectories, during which Osh6p $\Delta 69$ is membrane-bound. The *f* values of the last 100 ns of the $\Delta 69-3$ trajectory, similar to those of the $\Delta 69-2$ trajectory, were omitted for clarity. Source data are provided as a Source Data file



higher propensity to interact with anionic surfaces, display an increased localization to intracellular membranes. The precision in PS/PI4P exchange mediated by Osh6p can be therefore assured by continuous PS synthesis at the ER and the maintenance of a PI4P gradient at the ER/PM interface¹⁸. Presumably, additional factors contribute to the targeting of Osh6-mediated lipid transport, including protein–protein interactions. However, the accuracy of transport likely does not rely on the ability of Osh6p to

differentially bind organelle surfaces according to their bulk lipid composition. When its ligands are present, the avidity of Osh6p for membranes and its activity remain largely insensitive to the density (up to 45%) and nature of anionic lipids. Nevertheless, the 1–35 region, upstream of the lid, might have targeting properties. We noted subtle differences between Osh6p and Osh6p $\Delta 35$ in vitro: Osh6p keeps some avidity for anionic membranes containing PI4P and its PI4P transport activity is slightly more

Fig. 8 Mutations in the D/E-rich motif impact Osh6p activity. **a** Sequence of the D/E-rich motif with the anionic residues colored in red. Substitutions by alanines or glycines in the 4A and 5A2G mutant are in bold. **b** Electrostatic features of the surface of Osh6p and mutants. **c** Percentage of accessible PS or PI4P extracted by Osh6p, Osh6p-4A or Osh6p-5A2G (3 μ M) from liposomes (80 μ M lipids) with 2% POPS or diC16:0-PI4P ($n = 3-8$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, Mann-Whitney test). **d** Flotation assay. Osh6p, Osh6p-4A or Osh6p-5A2G was mixed with DOPC/POPS/diC16:0-PI4P (66/30/4 mol/mol) liposomes ($n = 3$). **e** Initial PI4P transport rates of Osh6p and of 4A and 5A2G mutants (200 nM) determined with L_B liposomes containing 5% diC16:0-PI4P and either 25% diphytanoyl-PC (orange bar) or -PS (brown bar) and L_A liposomes containing 5% POPS ($n = 3-9$). **f** Ratio between the initial PI4P transport rate, measured for Osh6p and mutants when L_A and L_B liposomes are weakly anionic (with 5% POPS and 5% PI4P, respectively) and the transport rate measured with L_B liposomes that are more anionic (with 25% of diphytanoyl-PS instead of diphytanoyl-PC (as in **e**), brown bar, $n = 3-9$) or the rate measured with L_A and L_B liposomes that are both more anionic, doped respectively with 15% PI and 4% POPA (at the expense of DOPC), and 10% PI, 4% POPA and 25% diphytanoyl-PS instead of diphytanoyl-PC (purple bars, $n = 4$). **g** Growth of *osh1 Δ -7 Δ* yeast, containing a plasmid-borne copy of a temperature-sensitive allele of *OSH4* and the indicated version of *OSH6*, at permissive (25 $^{\circ}$ C) or non-permissive (37 $^{\circ}$ C) temperature for *osh4-1 Δ* . **h** Redistribution of $C2_{Lact}$ -GFP in PS-depleted yeast cells (*cho1 Δ osh6 Δ osh7 Δ*) expressing Osh6p-mCherry or the 5A2G mutant after adding 18:1 lyso-PS. Images were taken every 2 min, with the first panel ($t = 0^*$) showing the last time-point before the onset of $C2_{Lact}$ -GFP signal transition. The absolute timing of this time-point varied between experiments (15–25 min after lyso-PS injection) due to instability of the lyso-PS suspension¹⁸. Scale bar: 5 μ m. Error bars correspond to s.e.m. Source data are provided as a Source Data file

sensitive to the presence of anionic lipids, compared to Osh6p Δ 35. The 1–35 region, with a net charge of +4, might allow Osh6p to target phosphoinositides; unfolded positively-charged motifs, used by proteins like MARCK to interact with anionic bilayers, can recognize PI(4,5)P₂⁴⁷.

It is unknown whether other ORP/Osh proteins utilize a switching mechanism like Osh6p. The membrane-binding capacity of Osh6p depends on whether or not the lid occludes a basic surface at the entry of the binding pocket, which is well-conserved among ORP/Osh proteins. One might speculate that in Osh4p, whose lid has no D/E-rich motif^{17,48}, this occlusion alone modulates its association with the ER and Golgi/post-Golgi membranes, which are less anionic than the PM and between which this protein operates^{49–51}. ORP5 and ORP8 are PS/PI4P exchangers at ER-PM contact sites²⁰, but their ORD has no D/E-rich motif (Supplementary Fig. 5), in contrast to ORP10, which exchanges PS and PI4P at ER-Golgi contacts⁵². These proteins are more complex as they reside in the ER and bind to the Golgi or PM via a PH domain²⁰. Possibly, in that configuration, the ORD targets sequentially the membranes through weak interactions and a D/E-rich motif is not critical. In contrast, Osh6p is unique among the PS/PI4P exchangers because its ORD must both target membrane and exchange lipids. Consequently, the anionic nature of the lid would be necessary to break the interaction of the ORD with the membrane, once lipids are exchanged. This might be even critical in a cellular context. Indeed, if Osh6p remains empty, it aggregates membranes. This is partially reminiscent of a previous study showing that Osh6p strongly bound to and aggregated liposomes although they contained PS⁴⁰. However, in this study, the liposomes were not representative of cellular membranes because they were very anionic (50–100% DOPS) with a loose lipid packing; likely, these combined features artificially promoted protein-membrane interactions²². Interestingly, like Osh6p, the membrane-binding capacity of PITPa, a member of a distinct LTP family, depends on whether or not it hosts its ligands³⁶. It is possible that several ORP/Osh proteins and many other types of LTPs have a switching mechanism whose nature remains to be defined.

Methods

Protein expression and purification. Osh6p was cloned in pGEX-4T-3 vector to code for a GST-fused construct¹⁸. The different site-specific mutations or deletions in Osh6p were obtained by the Quickchange kit (Agilent). The oligonucleotides are listed in the Supplementary Table 1. For the truncated [70–448]Osh6p mutant (Osh6p Δ 69), a short GGGG linker was introduced between the protein and GST to facilitate the cleavage by thrombin¹⁸. To build the Osh6p(noC/S190C), the sequence of the protein was mutated to replace three endogenous cysteine residues (C62, C162, C389) by serine and to substitute a serine located under the lid by a cysteine (S190C mutation). To prepare NBD-labeled Osh6p WT and NBD-labeled Osh6p Δ 35, the endogenous cysteines were replaced by serines and a cysteine was

introduced into the β 14– β 15 loop by mutating a threonine (T262C substitution). To build the mutant Osh6p-4A, four anionic residues in Osh6p WT (D38, D39, D41, and E42) were replaced each by an alanine residue. In Osh6p-5A2G, three additional mutations were performed (D43G, D44G, E45A). Glycine residues were used instead of alanine residues to limit the propensity of the mutated segment to fold into a continuous α -helix. The design of the $C2_{Lact}$ and PH_{FAPP} constructs and the expression system have been previously described^{18,41}. All the mutations or deletions were checked by DNA sequencing.

GST-Osh6p and mutants were expressed in *E. coli* (BL21-Gold(DE3) competent cells, Stratagene) at 30 $^{\circ}$ C overnight whereas the GST-PH_{FAPP} and GST- $C2_{Lact}$ were expressed at 37 $^{\circ}$ C for 3 h upon induction with 1 mM IPTG (when the optical density (OD) of the bacterial suspension, measured at 600 nm, reached a value of 0.6). All purification steps were conducted in a buffer with 50 mM Tris, pH 7.4, 120 mM NaCl, 2 mM DTT, supplemented during the first purification steps with 1 mM PMSF, 1 μ M bestatine, 10 μ M pepstatin, 10 μ M phosphoramidon and protease inhibitor tablets (Roche). Cells were lysed by a French press and the lysate was centrifuged at 200,000 \times g for 1 h. The supernatant was applied to Glutathione Sepharose 4B beads. After three washing steps, the beads were incubated with thrombin at 4 $^{\circ}$ C overnight to cleave off the GST tag and release the protein. Afterward, they were purified by gel filtration on a Sephacryl S200 HR XK16-70 column. All constructs contain an N-terminal GS sequence from the thrombin cleavage site.

For NBD labeling of Osh6p, PH_{FAPP} or $C2_{Lact}$, the crude eluate obtained after thrombin treatment was concentrated and mixed (after DTT removal by gel filtration on illustra NAP-10 columns (GE Healthcare)) with a 10-fold excess of N, N'-dimethyl-N-(iodoacetyl)-N'-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) ethylenediamine (IANBD-amide, Molecular Probes). After 90 min on ice, the reaction was stopped by adding a 10-fold excess of L-cysteine over the probe. The free probe was removed by gel filtration on a Sephacryl S200 HR XK16-70 column. The labeled protein was analyzed by SDS-PAGE and UV-visible spectroscopy. The gel was directly visualized in a fluorescence imaging system (FUSION FX fluorescence imaging system) to detect NBD-labeled protein excited in near-UV and then stained with Sypro Orange to determine the purity of NBD-labeled protein. The labeling yield ($\approx 100\%$) was estimated from the ratio of the OD of tyrosine and tryptophan at 280 nm ($\epsilon = 29,450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for PH_{FAPP}, $\epsilon = 45,045 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for $C2_{Lact}$) and NBD at 495 nm ($\epsilon = 25,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). For all purified proteins, the concentration was determined by a BCA assay, by SDS-PAGE analysis using a BSA standard curve and UV spectrometry.

Liposomes preparation. DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), diphytanoyl-PC (1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), diC12:0-PS (1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine), POPS (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserine), diphytanoyl-PS (1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine), POPA (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate), liver PI (L- α -phosphatidylinositol), NBD-PE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)), Rhod-PE (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonate)) were purchased from Avanti Polar Lipids. diC16:0-PI4P (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoinositol-4-phosphate) was from Echelon Lipids Inc.

Lipids in stock solutions in CHCl_3 were mixed at the desired molar ratio. The solvent was removed in a rotary evaporator. For lipid films doped with diC16:0-PI4P the mix was pre-warmed to 33 $^{\circ}$ C for 5 min prior to drying under vacuum. The films were then hydrated in 50 mM HEPES, pH 7.2, 120 mM K-acetate (HK buffer) to obtain a suspension of multilamellar liposomes. After five thawing-freezing cycles, the suspensions were extruded through polycarbonate filters of 0.2 μ m pore size using a mini-extruder (Avanti Polar Lipids). Mean hydrodynamic radius and polydispersity of liposomes were determined by dynamic light scattering at 25 $^{\circ}$ C using a Dynapro apparatus (Protein Solutions). Each sample of extruded

liposomes was diluted at 50 μM in HK buffer in a 20 μL quartz cell. A set of 12 autocorrelation curves was acquired and analyzed using a regularization algorithm. Representative mean radius and polydispersity of liposomes, used in this study, according to their lipid composition, are listed in the Supplementary Table 2. Liposomes were stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ and in the dark when containing fluorescent lipids and used within 2 days.

Flotation experiment. The protocol has been described in detail⁵³. Briefly, wild-type Osh6p or each mutant (0.75 μM) was mixed with NBD-PE containing liposomes (750 μM total lipids) in 150 μL of HK buffer at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min under agitation. The suspension was adjusted to 28% (w/w) sucrose by mixing 100 μL of 60% (w/w) sucrose solution in HK buffer and overlaid with 200 μL of HK buffer containing 24% (w/w) sucrose and 50 μL of sucrose-free HK. The sample was centrifuged at 240,000 $\times g$ in a swing rotor (TLS 55) 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 using Sypro-Orange staining and a FUSION FX fluorescence imaging system.

PS and PI4P extraction assay. Measurements were done in a 96-well black plate using a TECAN M1000 Pro. For PS extraction assays, DOPC liposomes (80 μM total lipids) doped with 2% POPS (0.8 μM accessible concentration) were mixed with NBD-C₂Lact (250 nM) at 25 $^{\circ}\text{C}$ in the presence or absence of 3 μM Osh6p or mutants in individual well (100 μL final volume). NBD spectra were recorded from 505 to 650 nm (bandwidth 5 nm) upon excitation at 490 nm (bandwidth 5 nm). The contribution of buffer or liposomes alone was subtracted from the NBD signal. A control spectrum was measured with the NBD-C₂Lact mixed with DOPC liposomes devoid of PS. The intensity at 536 nm measured with PS-containing liposomes in the absence or presence of the protein corresponds to F_{max} and F , respectively, whereas the intensity measured at the same wavelength with pure DOPC liposomes corresponds to F_0 . The percentage of PS extraction is given by using the formula $100 \times (1 - ((F - F_0)/(F_{\text{max}} - F_0)))$.

For PI4P extraction assays, liposomes doped with 2% diC16:0-PI4P were prepared and measurements were done with the NBD-PH_{FAPP} probe. Liposome and protein concentrations were identical to those used in the PS extraction assays. Control experiments and determination of extraction percentage were performed similarly.

CPM accessibility assay. A stock solution of CPM (7-Diethylamino-3-(4-maleimidophenyl)-4-methylcoumarin, Sigma-Aldrich) at 4 mg mL⁻¹ was prepared as in ref. ⁵⁴ by mixing 1 mg of CPM powder in 250 μL of DMSO. Thereafter, this solution was diluted in a final volume of 10 mL of HK buffer and incubated for 5 min at room temperature. The solution was protected from light and used immediately. Osh6p(noC/S190C) or its L69D counterpart (400 nM) was mixed at 30 $^{\circ}\text{C}$ with liposomes of various composition (400 μM total lipids) in 200 μL of HK buffer. A small volume of the CPM stock solution was added to obtain a final concentration of 4 μM . Emission fluorescence spectra were measured from 400 to 550 nm (bandwidth 5 nm) upon excitation at 387 nm (bandwidth 5 nm) in a 96-well plate using a TECAN M1000 Pro. The intensity value at 450–470 nm corresponds to the spectral peak. Control spectra were recorded in the absence of protein.

NBD-based membrane binding assay. NBD-labeled Osh6p WT or $\Delta 35$ (200 nM) was incubated with liposomes of various composition (400 μM total lipids) in HK buffer for 10 min at 25 $^{\circ}\text{C}$. Emission fluorescence spectra were recorded from 500 to 650 nm (bandwidth 5 nm) upon excitation at 460 nm (bandwidth 5 nm) in a 96-well plate using a TECAN M1000 Pro. Control spectra were measured in the absence of protein to subtract light scattering from liposomes.

Real-time membrane dissociation assay. NBD-labeled Osh6p WT or $\Delta 35$ (100 nM) was mixed with DOPC/diphytanoyl-PS liposomes (70/30 mol/mol, 400 μM lipid concentration) at 30 $^{\circ}\text{C}$ in a cuvette under constant stirring in HK buffer. Then, 1 μL of a stock solution of diC12:0-PS in methanol (12 mM) was injected to obtain a final concentration of 20 μM . Emission fluorescence over time was measured at 535 nm (bandwidth 5 nm) upon excitation at 460 nm (bandwidth 5 nm). A control measurement was done by injecting methanol alone. As a comparison, the experiment was repeated with NBD-C₂Lact (250 nM) incubated with liposomes. These experiments were performed with a Shimadzu RF 5301-PC spectrofluorometer.

PI4P transport assay. This assay was carried out in a Shimadzu RF 5301-PC spectrofluorometer. The sample (volume 600 μL) was placed in a cylindrical quartz cell, continuously stirred with a small magnetic bar and thermostated at 30 $^{\circ}\text{C}$. At the indicated time, samples were injected from stock solutions with Hamilton syringes through a guide in the cover of the fluorometer. A time zero, a suspension (570 μL) of L_B liposomes (200 μM total lipids, final concentration) containing 2% Rhod-PE and 5% PI4P was mixed with 250 nM NBD-PH_{FAPP} in HK buffer. The volume concentration of accessible PI4P (in the outer leaflet) was 5 μM . After 2 min, 30 μL of a suspension of L_A liposomes (200 μM lipids), incorporating 5%

POPS, were injected. After two additional minutes, Osh6p (200 nM) was injected. PI4P transport was followed by measuring the NBD signal at 530 nm (bandwidth 10 nm) upon excitation at 460 nm (bandwidth 1.5 nm). This signal reflects the repartition of NBD-PH_{FAPP} between L_B and L_A liposomes. The amount of PI4P transported by Osh6p can be determined by a normalization of the NBD signal through the following procedure. First we measured the NBD signal (F_{max}) corresponding to a situation where PI4P is fully transferred to L_A liposomes. NBD-PH_{FAPP} (250 nM) was mixed with L_A and L_B liposomes (200 μM total lipid each) with a lipid composition similar to that of the liposomes used in the transport assay, except that L_A liposomes initially contained 5% PI4P whereas L_B liposomes were devoid of PI4P. The fraction (F_{Norm}) of PI4P in L_A liposomes, $\text{PI4P}_A/\text{PI4P}_T$, is directly equal to the fraction of PH_{FAPP} bound to L_A liposomes and is calculated by considering $F_{\text{Norm}} = (F - F_0)/(F_{\text{max}} - F_0)$ with F_0 corresponding to the NBD signal prior to the addition of Osh protein. The amount of PI4P (in μM) transferred from L_B to L_A liposomes corresponds to $5 \times F_{\text{Norm}}$. The initial transport rates were determined from normalized curves by fitting with a linear function the first eight data points, corresponding to a period of 4 s, measured just after Osh6p injection.

To examine whether Osh6p or its $\Delta 35$ counterpart was bound or not to L_A and L_B liposomes during PI4P transport assays, we performed the same experiments as described above but in the absence of NBD-PH_{FAPP} and by injecting the NBD-labeled form of Osh6p and Osh6p $\Delta 35$ (200 nM) instead of the unlabeled forms. Additional experiments were done with L_A and L_B liposomes devoid of PS and PI4P, respectively. The percentage of Osh6p bound to liposomes corresponds to $100 \times (F - F_{\text{min}})/(F_{\text{max}} - F_{\text{min}})$ with F_{min} and F_{max} corresponding respectively to the signal of the NBD-labeled Osh6p proteins in HK buffer only or in the presence of liposome (400 μM total liposomes) containing 30 mol% diphytanoyl-PS.

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. Osh6p was dialysed against a buffer with 20 mM Tris, pH 7.4, 120 mM NaF to remove glycerol. Each spectrum is the average of several scans recorded from 185 to 260 nm with a bandwidth of 1 nm, a step size of 0.5 nm and a scan speed of 50 nm min⁻¹. A control spectrum of buffer was subtracted from each protein spectrum. The spectra were analyzed in the 185–240 nm range using the SELCON3 method provided online by the DICROWEB server⁵⁵.

Yeast strains and plasmids and manipulations. Yeast manipulations were done using standard methods and growth conditions. Strain Osh6-GFP, with the genotype *MATA his3 Δ leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 OSH6-GFP::HIS3MX6*, was from the GFP collection⁵⁶ supplied by S. Léon. All other strains were in the BY4741 background, except for the *osh1 Δ -7 Δ osh4-1^{ts}* strain: strains *osh6 Δ osh7 Δ* and *cho1 Δ osh6 Δ osh7 Δ* were a gift from AC Gavin, with genotypes *MATA can1 Δ ::STE2pr-LEU2 lyp1 Δ his3 Δ leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 osh6 Δ ::HYGMX osh7 Δ ::NATMX*, and *MATA can1 Δ ::STE2pr-LEU2 lyp1 Δ his3 Δ leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 cho1 Δ ::KANMX osh6 Δ ::HYGMX osh7 Δ ::NATMX* (15). The *osh1 Δ -7 Δ osh4-1^{ts}* strain, CBY926, which is in the SEY6210 background, with the genotype *MATA ura3-52 leu2-3,112 his3 Δ 200 trp1- Δ 901 lys2-801 suc2 Δ 9 osh1 Δ ::KANMX osh2 Δ ::KANMX osh3 Δ ::LYS2 osh4 Δ ::HIS3 osh5 Δ ::LEU2 osh6 Δ ::LEU2 osh7 Δ ::HIS3 posh4-1^{ts} TRP1 CEN*, was a gift from C. Beh, supplied by CL Jackson⁴². Yeast plasmids used in this study are listed in Supplementary Table 3. The plasmid pRS315-Osh6-mCherry was a gift from AC Gavin, the Sec63-sGFP plasmid was obtained from Addgene (#8854) and the plasmid pRS416-C₂Lact-GFP was from Hematologic technologies. Plasmid pRS315-Osh6-GFP was generated by replacing mCherry with PCR-amplified GFP coding sequence. Plasmids expressing N-terminal truncations of Osh6p were generated by PCR amplification of the corresponding *OSH6* fragments and ligation into the pRS315-Osh6-mCherry plasmid digested SpeI-BamHI. Osh6p-expressing plasmids with the URA3 marker (for growth complementation assay in the *osh1 Δ -7 Δ osh4-1^{ts}* strain) were generated by swapping LEU2 with the URA3 marker in the pOsh6-mCherry plasmids. The plasmid pOsh6(5A2G)-U was generated by PCR-amplification of the Osh6p(5A2G) coding sequence from the bacterial expression plasmid, and ligation into pOsh6-mCherry-U digested by SpeI and BamHI. The plasmid pC₂Lact-GFP-L was generated by swapping URA3 with the LEU2 marker in pC₂Lact-GFP. All plasmid sequences were verified by sequencing.

Yeast growth assay. The *osh1 Δ -7 Δ osh4-1^{ts}* strain was transformed with the indicated Osh6-mCherry-URA plasmid and the resulting transformants were grown overnight in SC without uracil and tryptophan liquid cultures to stationary phase. They were spotted in 10-fold serial dilutions onto synthetic media plates without uracil and tryptophan and the plates were incubated for 3–4 days at 25 $^{\circ}\text{C}$ and at 37 $^{\circ}\text{C}$.

Fluorescence microscopy. Yeast strains were grown overnight at 30 $^{\circ}\text{C}$ in appropriate SD medium to maintain plasmid selection. For strains carrying the *cho1 Δ* mutation, SD medium was supplemented with 1 mM ethanolamine. Cells were harvested in mid-logarithmic phase ($\text{OD}_{600} = 0.6\text{--}0.8$) and prepared for viewing on glass slides when assessing protein localization at steady state, or in a microfluidics chamber in the case of time-course experiments using lyso-PS (see below).

The cellular localization of PS was monitored in *cho1Δ osh6Δ osh7Δ* strains after the addition of exogenous 18:1 lyso-PS (1-oleoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine, Avanti Polar Lipids) as was previously described¹⁸. For lyso-PS time course experiments, cells were injected into a YO4C microfluidics chamber using the Microfluidic Perfusion Platform (ONIX), driven by the interface software ONIX-FG-SW (CellASIC Corp.). Cells were trapped and maintained in a uniform focal plane. Normal growth conditions were maintained by flowing cells with SD medium or SD medium containing lyso-PS at 3 psi. The microfluidics device was coupled to a DMI6000 (Leica) microscope, equipped with an oil immersion plan apochromat 100x objective NA 1.4, a sCMOS PRIME 95 (Photometrics), and a spinning-disk confocal system CSU22 (Yokogawa). GFP-tagged proteins and mCherry-tagged proteins were visualized with a GFP Filter 535AF45, and RFP Filter 590DF35, respectively. Images were acquired with MetaMorph 7 software (Molecular Devices). For the lyso-PS time-course assays, we imaged cells every 2 min over a total time of 30–40 min, starting with the time when lyso-PS-containing medium was injected into the system. We always imaged cells in 5 z-sections separated by 0.7 μm, afterwards manually selecting for the best focal plane, in order to correct for any focal drift during the experiment. Usually we imaged cells in four different fields of 512 × 512 pixels. Images were processed with ImageJ (NIH) and with Canvas Draw (canvas X) for levels.

MD simulation. All MD simulations were performed using the CHARMM36 force field^{57,58} and the GROMACS 5.0 MD simulation engine⁵⁹. Bonds involving hydrogen atoms were constrained using the LINCS algorithm⁶⁰ and the integration time step was set to 2 fs. The Nose-Hoover thermostat⁶¹ was used to keep a temperature at 303 °K with a coupling time constant of 1 ps in order to preserve the fluidity of the membrane. For simulations with constant pressure, the Parrinello-Rahman barostat⁶² was used to maintain a pressure of 1 bar with a compressibility of 4.5×10^{-5} and a coupling time constant of 5 ps. The cell box size was allowed to vary semi-isotropically (X = Y but not Z) in all membrane simulations whereas an isotropic pressure coupling was used in the simulation with the protein only. Van der Waals (VDW) interactions were switched to zero over 10 to 12 Å and electrostatic interactions were evaluated using the Particle Mesh Ewald⁶³. A bilayer of 1000 lipids with a binary mix of DOPC and POPS (70 and 30%, respectively) was assembled using the CHARMM-GUI membrane builder^{64,65} and the CHARMM36 lipid force field⁵⁸. Both leaflets of the membrane were solvated with a 10 nm layer of TIP3P water containing sodium counterions (300 in total considering the two layers)⁶⁶. The final cell box contains 745,971 atoms and its dimensions were ~18.1 × 18.1 × 22.4 nm. The box was relaxed and equilibrated for 50 ns using the equilibration procedure⁶⁵ designed for the CHARMM-GUI and using the GROMACS simulation engine. X-ray structure of Osh6p (PDB entry: 4B2Z¹⁵; since the 1–35 residues are not solved in that structure, this latter was named Osh6pΔ35 in the text), encapsulating a POPS molecule, was placed in one water layer, with a given orientation, at least 50 Å away from the membrane surface, using Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.) TIP3P molecules and salt ions that overlap spatially with the protein structure, or were close, (within 5 Å in distance) were removed. The system was thereafter minimized with GROMACS and equilibrated with 120 mM NaCl using the CHARMM-GUI procedure. Four distinct protein-membrane systems (approximately 737,820 atoms), in which Osh6pΔ35 has a distinct orientation with respect to the membrane surface, were built, in order to launch four independent 500 ns trajectories (Δ35-1 to 4). Four systems were also built with Osh6pΔ69 structure (~737,350 atoms), which was obtained by deleting the 35–69 region and the POPS molecule from the structure of Osh6pΔ35 and after an equilibration by MD for 40 ns in water. Corresponding trajectories are called Δ69-1 to 4.

MD analysis. Classical data analysis Root Mean Square Deviation (RMSD), Root Mean Square Fluctuation (RMSF), and secondary structure analysis were done using GROMACS 5⁵⁹ utilities. All molecular pictures and movies were made with Pymol (<http://pymol.org/>)⁶⁷ and Visual Molecular Dynamics (VMD)⁶⁸ softwares. Several non-standard analyses were performed to analyze the interaction between Osh6p and the lipid membrane using scripts based on Python language and dedicated functions in the MDAnalysis package⁶⁹. Distance and angle measurements were carried out on the different MD trajectories every 100 ps, resulting in 5000 data values for each parameter and each MD run. For each frame, we calculated and stored the height of Osh6p relative to the membrane, considering the center of mass (COM) of the protein (Osh6pΔ35 or Osh6pΔ69) and the z plane of the membrane (z average value of the nitrogen atoms (named N) of upper lipids). For calculating the height of the entry of the lipid-pocket relative to the z plane of the membrane, we determined a mass center considering the N129, F185 and S190 residues of Osh6p. To calculate the orientation of the protein relative to the membrane, we computed the angle between the 346–356 segment of the α7 helix and the plane of the lipid patch. We also determined the percentage of time Osh6p's residues were in contact with the membrane, by calculating the z distance between the center of mass of each residue and the z plane of membrane (Natoms). For each frame, if the distance was less than a threshold value of 5 Å, we counted it as a contact and added it in the residues matrix. The percentage of contact was calculated for each residue by dividing the number of positive count by the total number of frames. Electrostatic and VDW energies interaction were computed

between accessible and solvent-exposed residues of Osh6p and lipids using the rerun GROMACS tool.

Structural analysis. Accessible surface area (ASA) was evaluated on Osh6p's structures with the program NACCESS⁷⁰ using a probe radius of 1.5 Å. The electrostatic surfaces of Osh6pΔ35 and all mutants were calculated with the APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) plugin of PyMOL software⁶⁷.

Sequence alignment. A first complete set of protein sequences belonging to the Oxysterol-Binding Protein family was retrieved either from the Pfam (PF01237) or Interpro (IPR000648) database, considering eukaryotic species only^{71,72}. Fragments coming from incomplete genome assembly were ignored and protein sequences that do not contain the EQTSHHPP signature motif (Prosite pattern PS01013) of the ORP/Osh family were rejected⁷³. In the case of hypothetical splicing variants, only the full-length coding sequence was considered for the analysis. Furthermore, redundancy amongst the sequences was eliminated by checking available annotations and genomic data. This procedure allowed generating a set of 462 sequences belonging to 83 eukaryotic species. A first multiple sequence alignment with ClustalO⁷³ was done and sequences that contained the LPTFILE pattern, i.e., the PS-recognizing motif initially identified in the lid of Osh6p¹⁵, were selected. Then, a second alignment was performed (two iterations, without mbed-like clustering) using this subset, which contains 111 sequences belonging to 73 species. Alignments were subsequently analyzed with Jalview⁷⁴. Amino-acid evolution rate was calculated using ConSurf upon 4PH7_A PDB structure with maximum likelihood model -LG Matrix⁷⁵. ConSurf results are displayed with Pymol software⁶⁷.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

Data supporting the findings of this manuscript are available from the corresponding author upon reasonable request. A reporting summary for this Article is available as a Supplementary Information file. The source data underlying Figs. 1e–g, 2, 3a, c–f, 4, 5, 6b, d, 7a, b, d, 8c–f and Supplementary Figs. 2, 3b, c, 4, 5, 6b, c, 8, 9c, d are provided as a Source Data file. The raw data that support the findings of this study are available in FigShare with the identifier <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.8217824>.

Received: 25 February 2019 Accepted: 1 August 2019

Published online: 02 September 2019

References

1. Drin, G. Topological regulation of lipid balance in cells. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 51–77 (2014).
2. Holthuis, J. C. M. & Menon, A. K. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* **510**, 48–57 (2014).
3. Daum, G. et al. Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. *Yeast* **15**, 601–614 (1999).
4. Ejsing, C. S. et al. Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 2136–2141 (2009).
5. Leidl, K., Liebisch, G., Richter, D. & Schmitz, G. Mass spectrometric analysis of lipid species of human circulating blood cells. *Biochim Biophys. Acta* **1781**, 655–664 (2008).
6. Sampaio, J. L. et al. Membrane lipidome of an epithelial cell line. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 1903–1907 (2011).
7. Vance, J. E. & Steenbergen, R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog. Lipid Res.* **44**, 207–234 (2005).
8. Zinser, E. et al. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**, 2026–2034 (1991).
9. Leventis, P. A. & Grinstein, S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 407–427 (2010).
10. Henry, S. A., Kohlwein, S. D. & Carman, G. M. Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**, 317–349 (2012).
11. Espenshade, P. J. & Hughes, A. L. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **41**, 401–427 (2007).
12. Breslow, D. K. & Weissman, J. S. Membranes in balance: mechanisms of sphingolipid homeostasis. *Mol. Cell* **40**, 267–279 (2010).
13. Holthuis, J. C., Pomorski, T., Raggars, R. J., Sprong, H. & Van Meer, G. The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol. Rev.* **81**, 1689–1723 (2001).
14. Vance, J. E. & Tasseva, G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 543–554 (2013).

15. Maeda, K. et al. Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins. *Nature* **501**, 257–261 (2013).
16. Raychaudhuri, S. & Prinz, W. A. The diverse functions of oxysterol-binding proteins. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 157–177 (2010).
17. Im, Y. J., Raychaudhuri, S., Prinz, W. A. & Hurlley, J. H. Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins. *Nature* **437**, 154–158 (2005).
18. Moser von Filseck, J. et al. INTRACELLULAR TRANSPORT. Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science* **349**, 432–436 (2015).
19. Foti, M., Audhya, A. & Emr, S. D. Sac1 lipid phosphatase and Stt4 phosphatidylinositol 4-kinase regulate a pool of phosphatidylinositol 4-phosphate that functions in the control of the actin cytoskeleton and vacuole morphology. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2396–2411 (2001).
20. Chung, J. et al. INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science* **349**, 428–432 (2015).
21. Moser von Filseck, J., Mesmin, B., Bigay, J., Antonny, B. & Drin, G. Building lipid ‘PIPelines’ throughout the cell by ORP/Osh proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1465–1470 (2014).
22. Bigay, J. & Antonny, B. Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Dev. Cell* **23**, 886–895 (2012).
23. Yeung, T. et al. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* **319**, 210–213 (2008).
24. Kim, J., Shishido, T., Jiang, X., Aderem, A. & McLaughlin, S. Phosphorylation, high ionic strength, and calmodulin reverse the binding of MARCKS to phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* **269**, 28214–28219 (1994).
25. Sigal, C. T., Zhou, W., Buser, C. A., McLaughlin, S. & Resh, M. D. Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 12253–12257 (1994).
26. Bivona, T. G. et al. PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol. Cell* **21**, 481–493 (2006).
27. Finkielstein, C. V., Overduin, M. & Capelluto, D. G. Cell migration and signaling specificity is determined by the phosphatidylserine recognition motif of Rac1. *J. Biol. Chem.* **281**, 27317–27326 (2006).
28. Bolsover, S. R., Gomez-Fernandez, J. C. & Corbalan-Garcia, S. Role of the Ca²⁺/phosphatidylserine binding region of the C2 domain in the translocation of protein kinase C α to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **278**, 10282–10290 (2003).
29. Thelen, M., Rosen, A., Nairn, A. C. & Aderem, A. Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* **351**, 320–322 (1991).
30. Dittman, J. S. & Menon, A. K. Speed limits for nonvesicular intracellular sterol transport. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 90–97 (2017).
31. Wong, L. H., Gatta, A. T. & Levine, T. P. Lipid transfer proteins: the lipid commute via shuttles, bridges and tubes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 85–101 (2018).
32. Lev, S. Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 739–750 (2010).
33. Wong, L. H., Copic, A. & Levine, T. P. Advances on the transfer of lipids by lipid transfer proteins. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 516–530 (2017).
34. Schaaf, G. et al. Functional anatomy of phospholipid binding and regulation of phosphoinositide homeostasis by proteins of the sec14 superfamily. *Mol. Cell* **29**, 191–206 (2008).
35. Schouten, A. et al. Structure of apo-phosphatidylinositol transfer protein alpha provides insight into membrane association. *EMBO J.* **21**, 2117–2121 (2002).
36. Shadan, S. et al. Dynamics of lipid transfer by phosphatidylinositol transfer proteins in cells. *Traffic* **9**, 1743–1756 (2008).
37. Szolderits, G., Hermetter, A., Paltauf, F. & Daum, G. Membrane properties modulate the activity of a phosphatidylinositol transfer protein from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **986**, 301–309 (1989).
38. Gadella, T. W. Jr. & Wirtz, K. W. Phospholipid binding and transfer by the nonspecific lipid-transfer protein (sterol carrier protein 2). A kinetic model. *Eur. J. Biochem.* **220**, 1019–1028 (1994).
39. Mattjus, P., Pike, H. M., Molotkovsky, J. G. & Brown, R. E. Charged membrane surfaces impede the protein-mediated transfer of glycosphingolipids between phospholipid bilayers. *Biochemistry* **39**, 1067–1075 (2000).
40. Schulz, T. A. et al. Lipid-regulated sterol transfer between closely apposed membranes by oxysterol-binding protein homologues. *J. Cell Biol.* **187**, 889–903 (2009).
41. Moser von Filseck, J., Vanni, S., Mesmin, B., Antonny, B. & Drin, G. A phosphatidylinositol 4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes. *Nat. Commun.* **6**, 6671 (2015).
42. Beh, C. T. & Rine, J. A role for yeast oxysterol-binding protein homologs in endocytosis and in the maintenance of intracellular sterol-lipid distribution. *J. Cell Sci.* **117**, 2983–2996 (2004).
43. Smindak, R. J. et al. Lipid-dependent regulation of exocytosis in *S. cerevisiae* by OSBP homolog (Osh) 4. *J. Cell Sci.* **130**, 3891–3906 (2017).
44. Behnia, R. & Munro, S. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**, 597–604 (2005).
45. Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. & Chabre, M. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* **36**, 4675–4684 (1997).
46. Rogaski, B. & Klauda, J. B. Membrane-binding mechanism of a peripheral membrane protein through microsecond molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* **423**, 847–861 (2012).
47. Wang, J. et al. Lateral sequestration of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by the basic effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate is due to nonspecific electrostatic interactions. *J. Biol. Chem.* **277**, 34401–34412 (2002).
48. de Saint-Jean, M. et al. Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J. Cell Biol.* **195**, 965–978 (2011).
49. Fairn, G. D., Curwin, A. J., Stefan, C. J. & McMaster, C. R. The oxysterol binding protein Kes1p regulates Golgi apparatus phosphatidylinositol-4-phosphate function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 15352–15357 (2007).
50. Alfaro, G. et al. The sterol-binding protein Kes1/Osh4p is a regulator of polarized exocytosis. *Traffic* **12**, 1521–1536 (2011).
51. Ling, Y., Hayano, S. & Novick, P. Osh4p is needed to reduce the level of phosphatidylinositol-4-phosphate on secretory vesicles as they mature. *Mol. Biol. Cell* **25**, 3389–3400 (2014).
52. Venditti, R. et al. Molecular determinants of ER-Golgi contacts identified through a new FRET-FLIM system. *J. Cell Biol.* **218**, 1055–1065 (2019).
53. Manneville, J. B., Leduc, C., Sorre, B. & Drin, G. Studying in vitro membrane curvature recognition by proteins and its role in vesicular trafficking. *Methods Cell Biol.* **108**, 47–71 (2012).
54. Alexandrov, A. I., Mileni, M., Chien, E. Y., Hanson, M. A. & Stevens, R. C. Microscale fluorescent thermal stability assay for membrane proteins. *Structure* **16**, 351–359 (2008).
55. Whitmore, L. & Wallace, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392–400 (2008).
56. Huh, W. K. et al. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686–691 (2003).
57. Best, R. B. et al. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ 1 and χ 2 dihedral angles. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3257–3273 (2012).
58. Klauda, J. B. et al. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *J. Phys. Chem. B* **114**, 7830–7843 (2010).
59. Abraham, M. J. et al. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1–2**, 19–25 (2015).
60. Hess, B. P-LINCS: a parallel linear constraint solver for molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 116–122 (2008).
61. Evans, D. J. & Holian, B. L. The Nose–Hoover thermostat. *J. Chem. Phys.* **83**, 4069–4074 (1985).
62. Parrinello, M. & Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **52**, 7182–7190 (1981).
63. Essmann, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 8577–8593 (1995).
64. Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. & Im, W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **29**, 1859–1865 (2008).
65. Wu, E. L. et al. CHARMM-GUI membrane builder toward realistic biological membrane simulations. *J. Comput. Chem.* **35**, 1997–2004 (2014).
66. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935 (1983).
67. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 10037–10041 (2001).
68. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
69. Michaud-Agrawal, N., Denning, E. J., Woolf, T. B. & Beckstein, O. MDAAnalysis: a toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* **32**, 2319–2327 (2011).
70. Richmond, T. J. Solvent accessible surface area and excluded volume in proteins. Analytical equations for overlapping spheres and implications for the hydrophobic effect. *J. Mol. Biol.* **178**, 63–89 (1984).
71. Finn, R. D. et al. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res.* **45**, D190–D199 (2017).

72. Finn, R. D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* **44**, D279–D285 (2016).
73. Sigrist, C. J. A. et al. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief. Bioinforma.* **3**, 265–274 (2002).
74. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M. & Barton, G. J. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189–1191 (2009).
75. Ashkenazy, H. et al. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.* **44**, W344–W350 (2016).

Acknowledgements

We would like to thank J-M D'Ambrosio for help with plasmid construction, AC Gavin and C Beh for yeast strains and plasmids, and the ImagoSeine facility at the Institut Jacques Monod, member of IBISA and the France-BioImaging (ANR-10-INBS-04) infrastructure. This work was supported by the CNRS, by the Agence Nationale de la Recherche Grant (ANR-16-CE13-0006), GENCI (DARI A0010710136 and A0030710136) and Marie Curie CIG grant (631997) to A.C. NFL was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation.

Author contributions

G.D. designed and supervised research. N.-F.L., M.M., and G.D. carried out site-directed mutagenesis, produced, purified and labeled all the recombinant proteins of this study. N.-F.L. and G.D. performed the in vitro experiments. R.G. performed MD simulations as well as electrostatic potential calculations. M.R. contributed tools for the analysis of MD simulations. A.C. and V.A. designed and performed the cell biology experiments. N.-F.L. performed sequence analysis. G.D., N.-F.L., R.G., A.C. and V.A. analyzed the data. A.C. participated in the refinement of the project and assisted with the manuscript. G.D. wrote the manuscript. All of the authors discussed the results and commented on the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11780-y>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Peer review information: *Nature Communications* thanks Kentaro Hanada and the other anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



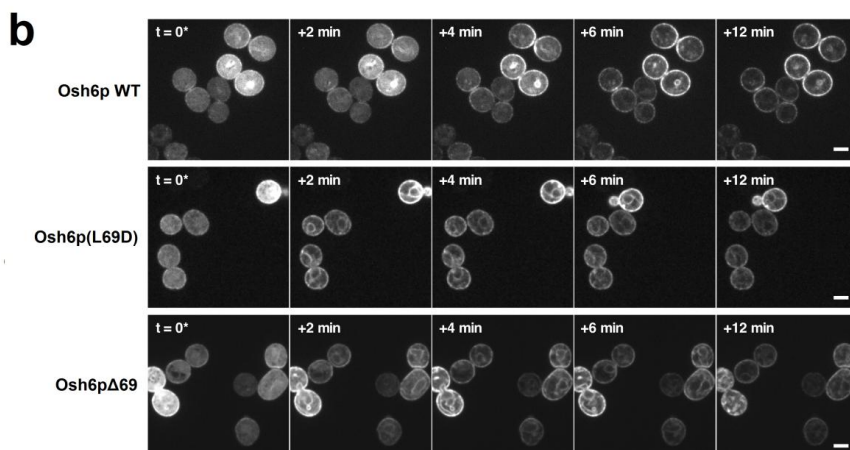
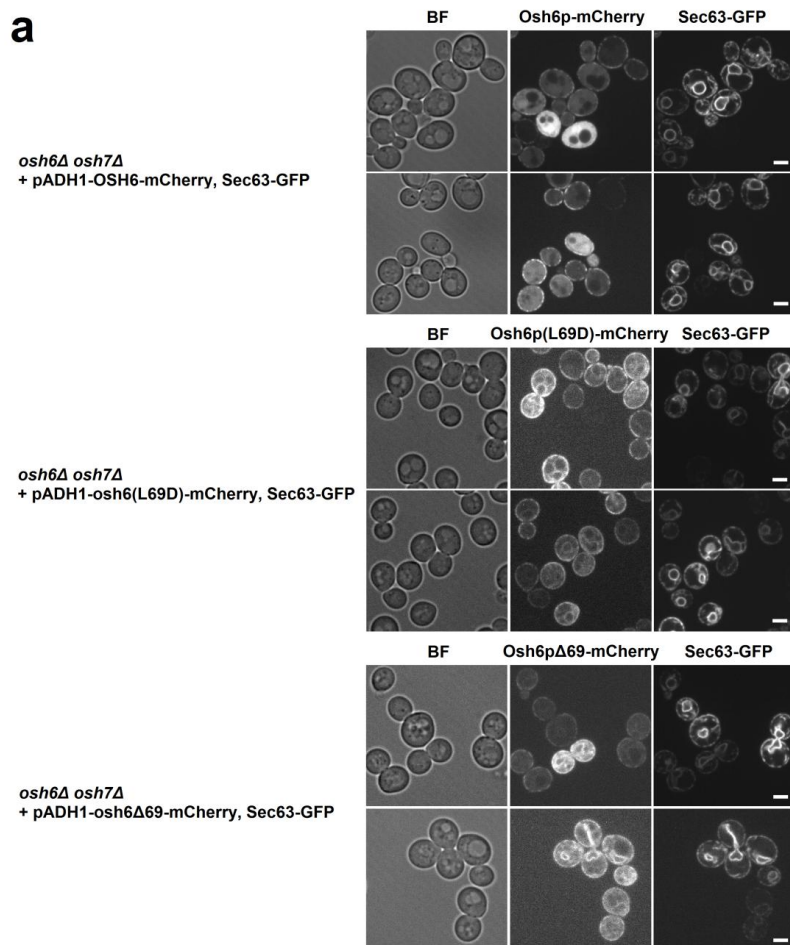
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Supplementary Information

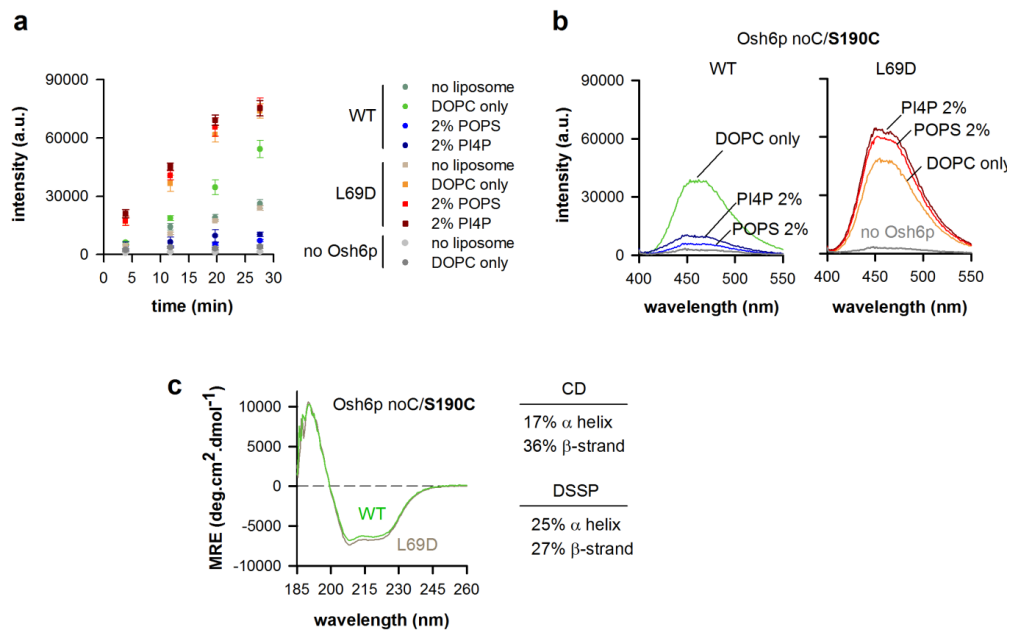
An electrostatic switching mechanism to control the lipid transfer activity of Osh6p

Lipp et al.



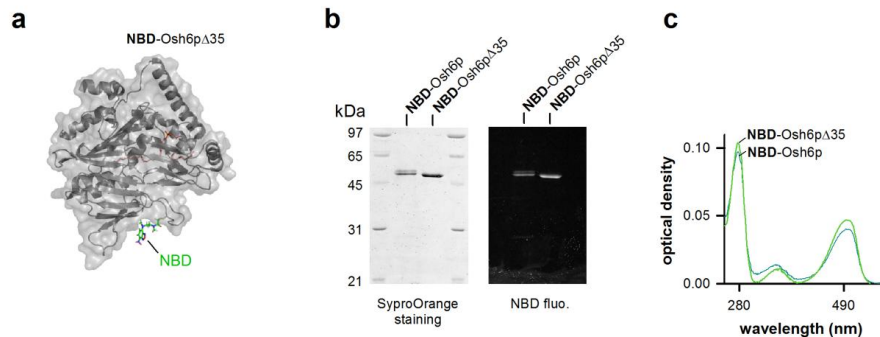
Supplementary Figure 1. Cellular localization and PS transport activity of Osh6p wild-type and N-terminal mutants

(a) Colocalization between Osh6p variants (WT, L69D or $\Delta 69$ truncation mutant), fused to mCherry, and the ER marker Sec63-GFP in *osh6 Δ osh7 Δ* cells. Two fields of cells are shown for each strain, with left panels showing bright-field (BF) images. **(b)** Redistribution of the PS reporter C2_{Lact}-GFP in PS-depleted yeast cells (*cho1 Δ osh6 Δ osh7 Δ*) expressing Osh6p-mCherry WT, L69D or $\Delta 69$ mutant after exogenous addition of 18:1 lyso-PS. Images were taken every 2 min as indicated, with the first panel ($t = 0^*$) showing the last time-point before the onset of C2_{Lact}-GFP signal transition. The absolute timing of this time-point varied between experiments (between 15 and 25 min after lyso-PS injection) due to instability of the lyso-PS suspension¹. Scale bar: 5 μ m.



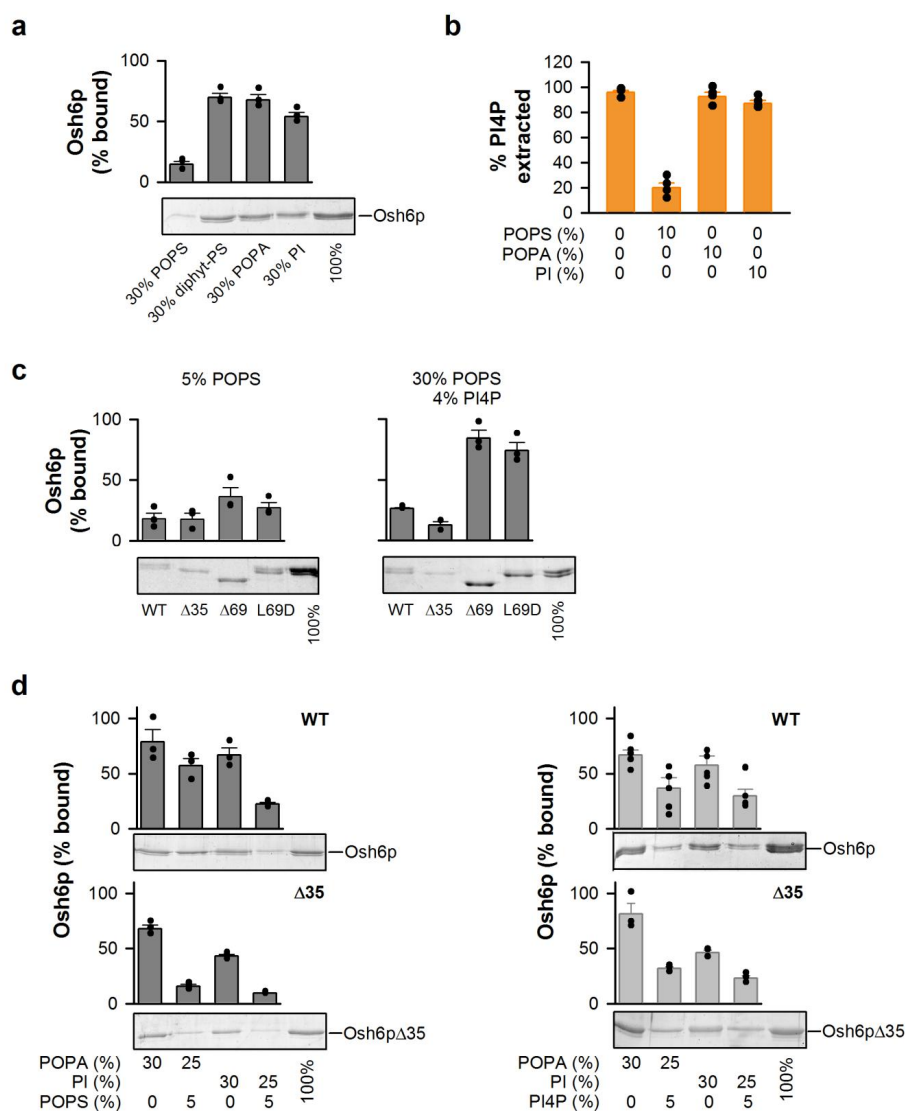
Supplementary Figure 2. Measure of the conformational state of Osh6p with an accessibility assay using CPM

(a) Time evolution of the CPM signal ($\lambda_{\text{ex}}=387$ nm) after adding the fluorophore (4 μM) to Osh6p noC/S190C or its L69D variant (400 nM) in HK buffer alone or in the presence of liposomes only made of DOPC (400 μM total lipids) or containing either 2 mol% POPS or PI4P. Control experiments are done without Osh6p protein. **(b)** Typical emission spectra of Osh6p noC/S190C and its L69D counterpart (400 nM) after an incubation of 30 min with 4 μM CPM in the presence of pure DOPC liposomes or liposomes doped with either 2 mol% POPS or PI4P. A control experiment is done without Osh6p protein (gray spectrum). **(c)** Far-UV CD spectrum of Osh6p noC/S190C and its L69D variant (10 μM) in 20 mM Tris, pH 7.4, 120 mM NaF buffer. The percentage of α -helix, β -sheet and turn, deriving from the analysis of the spectrum are given as well as the values deriving from the crystal structure (PDB ID: 4B2Z) using the DSSP algorithm. Source data are provided as a Source Data file.



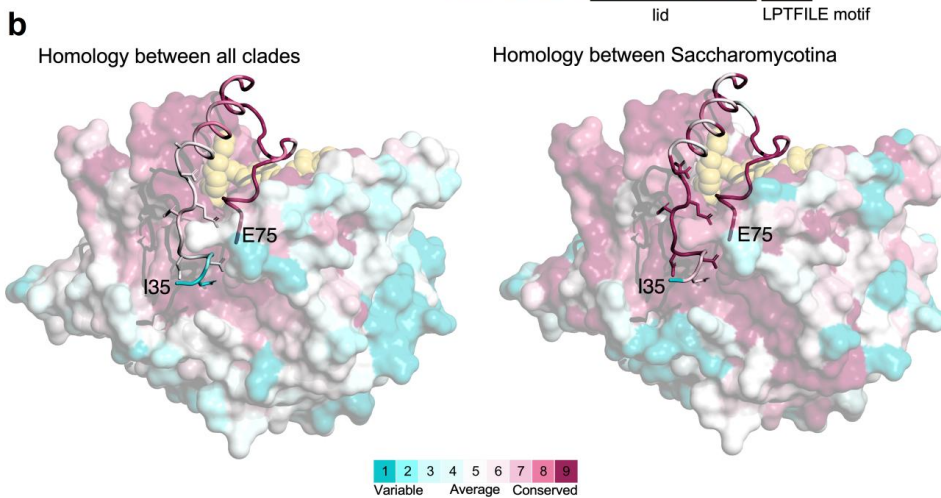
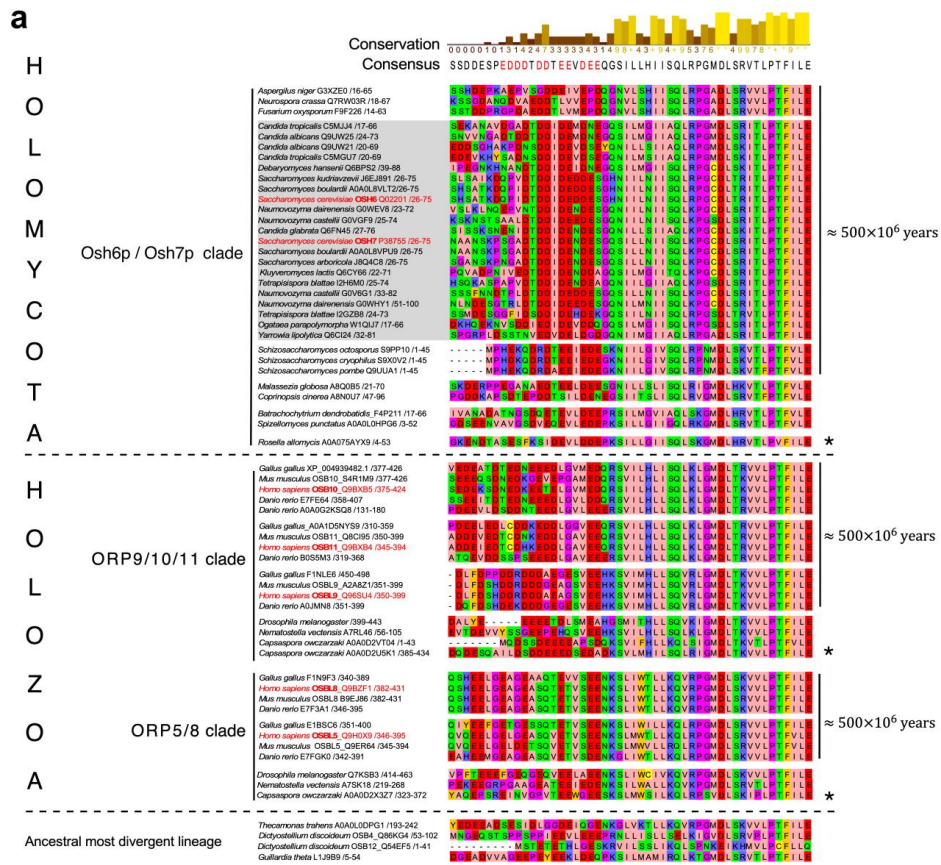
Supplementary Figure 3. Biochemical characterization of the NBD-Osh6p constructs

(a) Tridimensional model of the NBD-labeled Osh6p Δ 35 based on the crystal structure of the protein (PDB ID: 4B2Z). Several cysteines (C62, C162 and C389) are mutated into serine; the threonine 262 in the β 14- β 15 loop is substituted into a cysteine. An N,N'-dimethyl-N-(acetyl)-N'-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)ethylenediamine moiety (in stick, with carbon in green, nitrogen in blue and oxygen in red), manually built and energetically minimized, is grafted to the thiol function of the C262 residue. (b) SDS-PAGE of purified NBD-Osh6p WT and Δ 35. The gel was directly visualized in a fluorescence imaging system to identify labeled proteins (right picture) and then stained with Sypro Orange to visualize the protein and molecular weight markers (left picture). (c) UV-visible absorption spectrum of the wild-type Osh6p and the Δ 35 mutant labeled with NBD. Considering a purity grade of 100% for the protein, the analysis of the optical density at 280 nm (Trp) and 495 nm (IANBD) indicated that each construct was labeled with the probe in a 1:1 ratio. Source data are provided as a Source Data file.



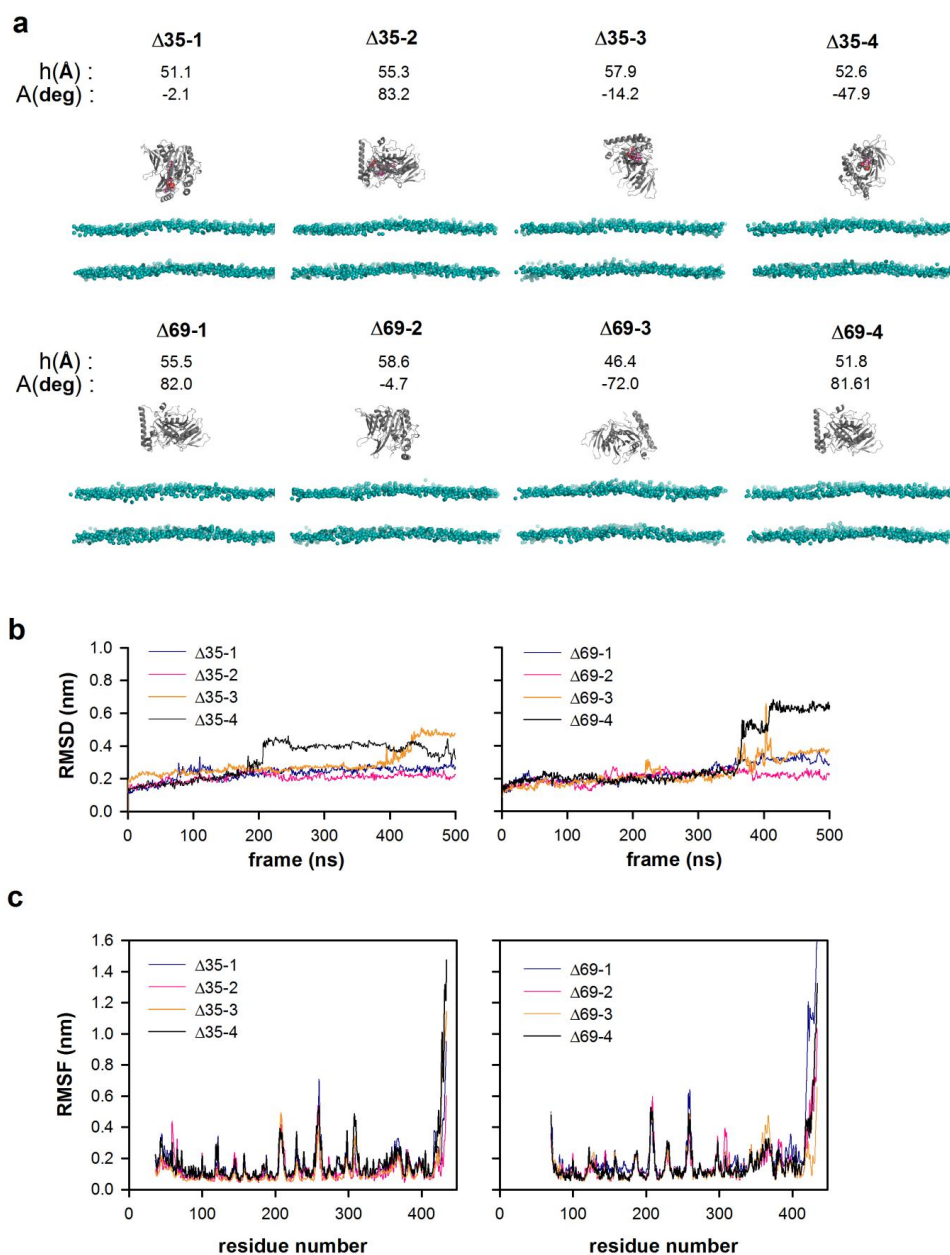
Supplementary Figure 4. Ligand-dependent binding of Osh6p to anionic membranes

(a) Flotation assay. Osh6p (750 nM) was incubated with DOPC liposomes (750 μ M total lipids) enriched with 30 mol% of POPS, diphytanyl-PS, POPA or liver PI (at the expense of DOPC). The bars correspond to the mean of three independent experiments. **(b)** PI4P extraction assay. NBD-PH_{FAPP} (250 nM) was incubated with DOPC liposomes (80 μ M lipids) containing 2 mol% diC16:0-PI4P or, additionally, 10 mol% of POPS, POPA or liver PI. The fluorescence spectra of the probe were measured (λ_{ex} = 460 nm) before and after adding Osh6p WT (3 μ M). Reference spectra were recorded with liposomes devoid of PI4P. The percentage of extracted PI4P was calculated based on the fluorescence signal at 536 nm measured with and without Osh6p and with PI4P-free liposomes (n=4). **(c)** Flotation assay. Osh6p, Osh6p Δ 35, Osh6p Δ 69 or Osh6p(L69D) (750 nM) was mixed with DOPC liposomes (750 μ M lipids) doped with 5 mol% of POPS or 30 mol% of POPS and 4 mol% of PI4P (n=3). **(d)** Flotation assay. Osh6p or Osh6p Δ 35 (750 nM) was incubated with DOPC/POPA (7/3 mol/mol) or DOPC/PI (7/3) liposomes (750 μ M lipids) containing or not 5 mol% of POPS or diC16:0-PI4P, at the expense of POPA or PI (n=3). Error bars correspond to s.e.m. Source data are provided as a Source Data file.



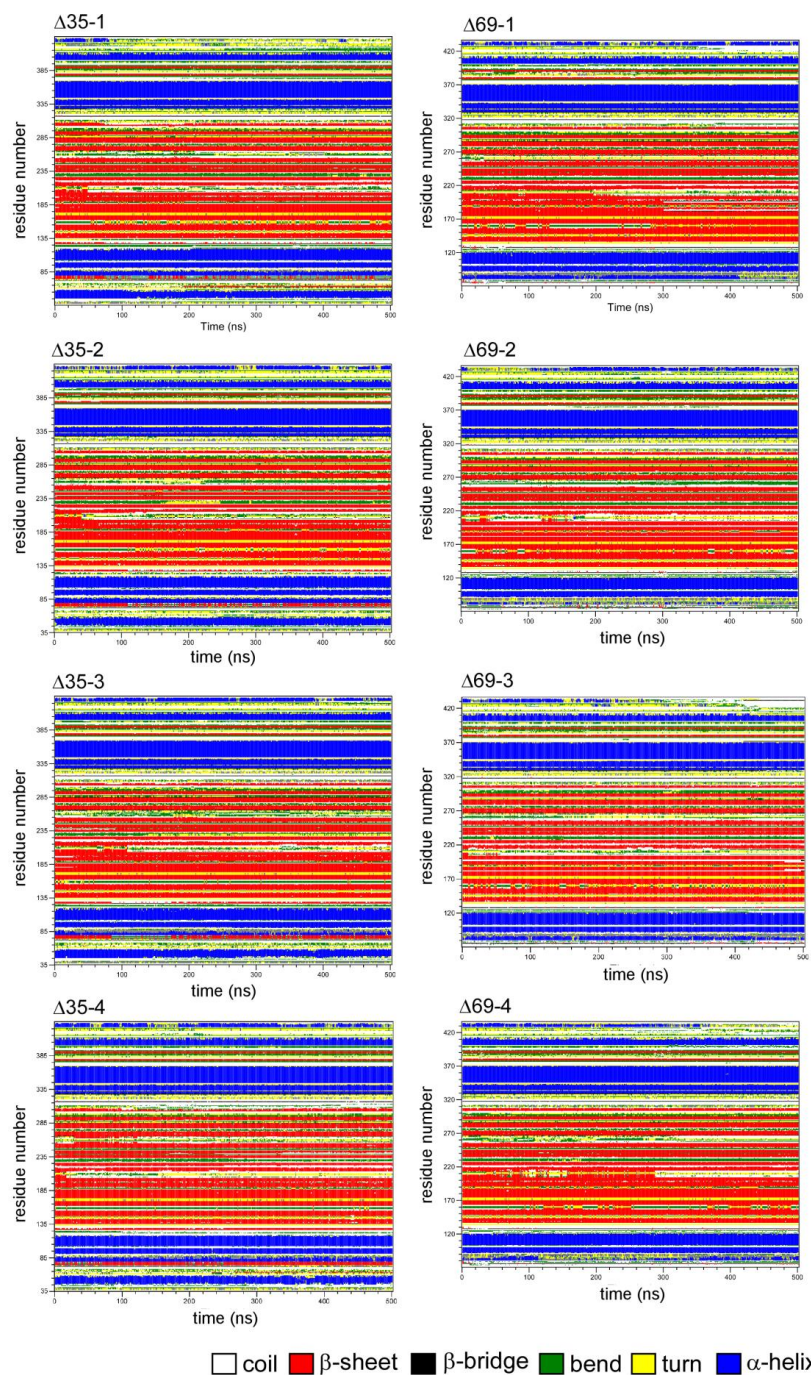
Supplementary Figure 5. Conservation of an acidic stretch at the N-terminal end of the lid of putative PS/ PI4P exchangers

(a) Sequence alignment of putative PS/PI4P counter-exchangers containing the LPTFILE motif. The alignment procedure was performed on a set of 104 eukaryotes sequences from 73 eukaryotes species but for clarity, only 35 sequences of representative species are shown. Genera, species, UniprotKB accession number and the residue position are given for each sequence. Residues are colored according to their physicochemical properties (aliphatic, salmon; aromatic, orange; positively-charged, blue ; negatively-charged, red ; hydrophilic, green ; proline and glycine residues, magenta ; cysteine residues, yellow). The sequences are ordered following the evolutionary timeline of species and the divergence time is given following molecular clock phylogenetics studies². This phylogenetic analysis identifies three distinct subgroups called Osh6p/Osh7p, ORP5/8 and ORP9/10/11 clade, which would have evolved independently from an ancestral sequence common to Holomycota and Holozoa one billion years ago. A star indicates the most basal lineage of each clade. A Jalview analysis, showing consensus and conservation score at the top of the figure, indicates that an acidic motif (consensus EDDDTDDTEEVDEE) localized at the N-terminus of the lid is well-conserved in the Osh6p/Osh7p clade, in particular in Saccharomycotina (highlighted in grey), and also in ORP9/10/11 clade. **(b)** Surface of the Osh6p's structure (PDB ID: 4PH7) showing the degree of conservation of amino acids in the ORD considering all sequence with the PS-recognizing motif LPTFILE (left) identified in our sequence analysis, or only the Saccharomycotina (right). Cyan-to-purple color scale indicates the degree of conservation. The acidic track and the lid are represented in ribbon and the anionic residues of the D/E-rich motif are shown in a stick mode. Source data are provided as a Source Data file.

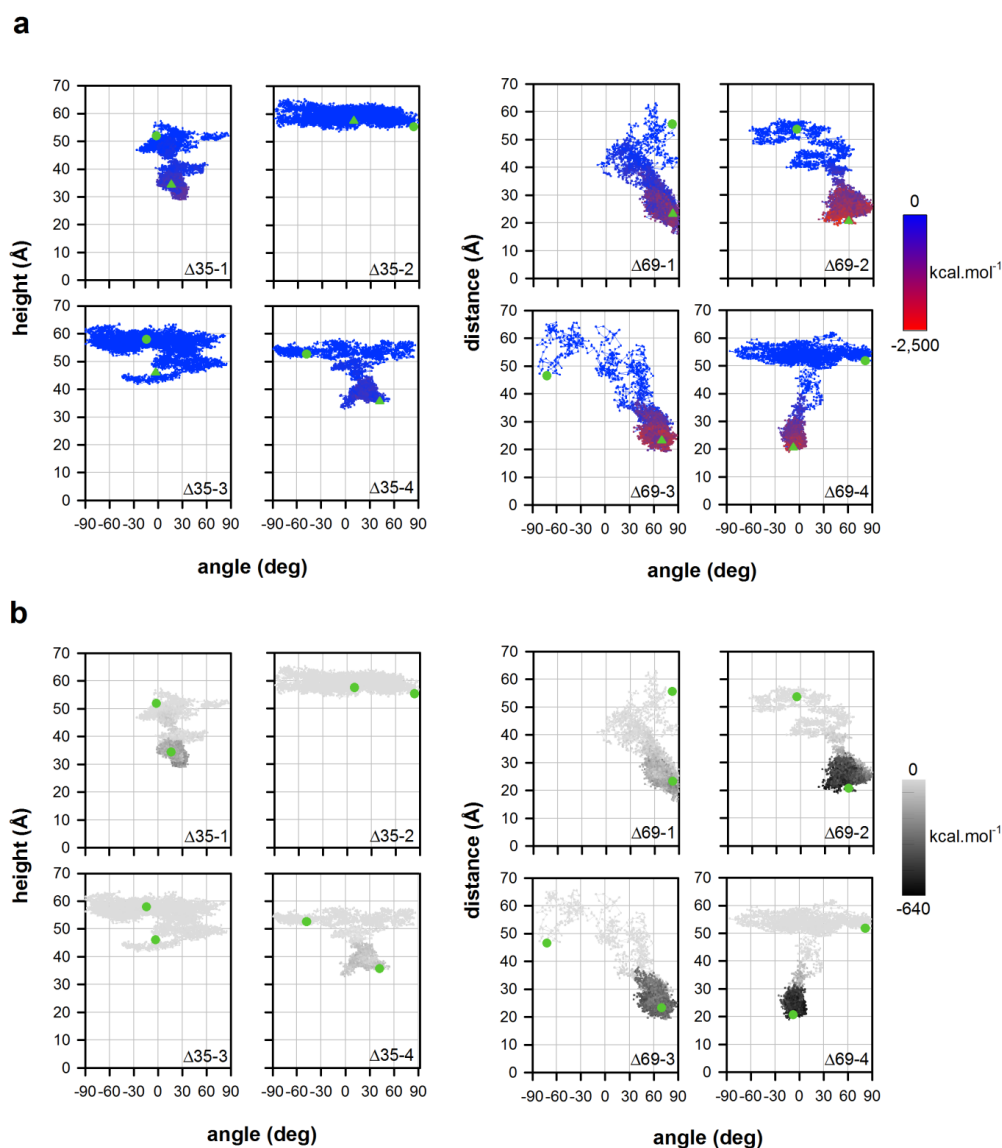


Supplementary Figure 6. RMSD and RMSF profile for Osh6p $\Delta 35$ and Osh6p $\Delta 69$

(a) Configuration of Osh6p $\Delta 35$ and Osh6p $\Delta 69$ at the beginning of each trajectory. The initial height (h) between the mass center of each form of Osh6p relative to the plane of the DOPC/POPS bilayer is indicated. The initial angle between the 346-356 segment of the $\alpha 7$ helix and the plane of the membrane is also reported. (b) Control plots representing the stability of Osh6p $\Delta 35$ (residues 35-432) or Osh6p $\Delta 69$ structure (residues 70-432) during four independent 500-ns MD run. The root mean square deviation (RMSD) of the backbone atoms from the equilibrated conformation (0 ns) is presented as a function of time for each trajectory. (c) Root mean square fluctuation (RMSF) values of atomic positions computed for the backbone atoms, indicative of the internal protein motion during each MD, are shown as a function of residue number. Source data are provided as a Source Data file.

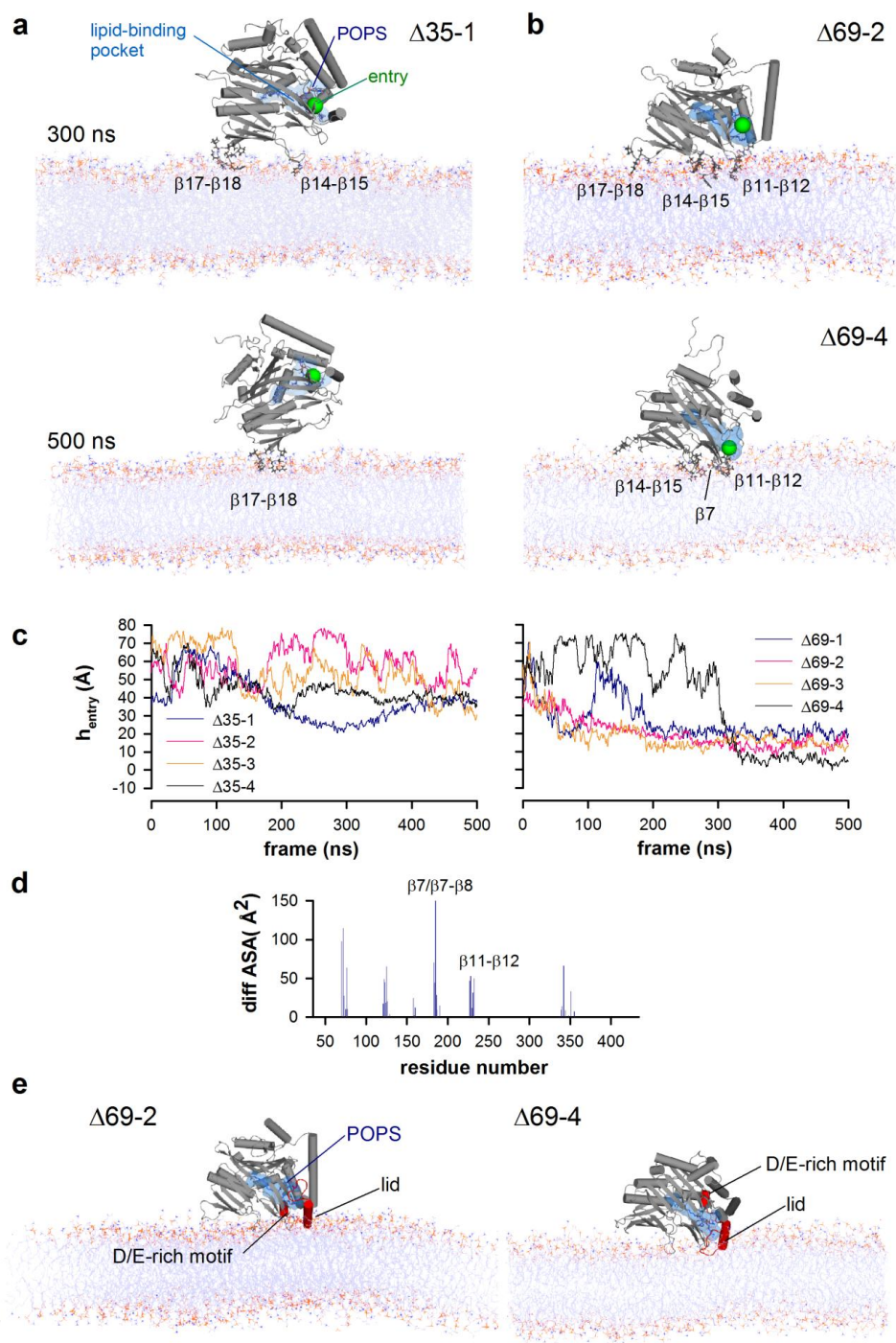


Supplementary Figure 7. Time evolution of the secondary structural elements of Osh6pΔ35 and Osh6pΔ69 along each MD simulation. Osh6pΔ35 (left panel); Osh6pΔ69 (right panel). The x-axis represents the MD trajectory time (in ns), while the residue numbers are shown on the y-axis.



Supplementary Figure 8. Evolution of the protein-membrane interaction energy over time for each trajectory

(a) Co-evolution of the height and orientation of the Osh6p Δ 35 or Δ 69 structure relative to the membrane during each trajectory is represented as in Figure 5. Each point of the trajectory is coloured according to a code, ranging from blue to red, which is function of the Coulomb energy (from 0 to -2,500 kcal.mol⁻¹). Green circles and triangles correspond to the height and angle values associated to the initial and final configuration ($t=500$ ns) of each protein, respectively. (b) VDW interaction between the protein and the membrane (colour code from light gray to black corresponding to a range of value between 0 and -640 kcal mol⁻¹). Source data are provided as a Source Data file.



Supplementary Figure 9. The lid prevents the lipid-binding pocket from being close to the membrane surface

(a) Configuration of Osh6p Δ 35, bound to the surface of the DOPC/POPS (7/3) bilayer at 300 ns (top) and at the end of the Δ 35-1 trajectory (bottom). The protein is shown in a cartoon mode and colored in light grey. The side chains of the residues of the β 14- β 15 and β 17- β 18 loops are represented in a stick mode and colored in dark grey. The contour of the lipid-binding pocket is represented by a transparent blue surface whereas the center of the pocket entry is represented by a solid green sphere. Atoms of the membrane lipids are shown in a wireframe representation with carbon in light blue, oxygen in red, nitrogen in blue, hydrogen in grey and phosphorus in orange. **(b)** Configuration of Osh6p Δ 69, bound to the surface of the lipid bilayer at the end of the Δ 69-2 (top) and Δ 69-4 trajectories (bottom). The side chains of the residues of the β 11- β 12, β 14- β 15 and β 17- β 18 loops as well as the β 7-strand are represented in a stick mode and colored in dark grey. **(c)** Evolution of the height of the pocket entry relative to the plane of the bilayer during 500 ns. **(d)** Difference in accessible surface area (ASA) *per* residue between the Δ 35 and Δ 69 structures. The position of the residues belonging to the β 7-strand, the β 7- β 8 and the β 11- β 12 loops, which are unmasked in the absence of the 35-69 region, are indicated. **(e)** The structure of Osh6p Δ 35 has been superposed to that of Osh6p Δ 69 when bound to the membrane at the end of the Δ 69-2 (left) and Δ 69-4 trajectories (right). This indicates what would be the theoretical localisation of the lid and the D/E-rich motif if Osh6p Δ 35 adopted such a docking geometry on membrane. Likewise, the POPS molecule is represented in a sphere mode to show its position relative to the surface of the bilayer surface. Atoms of the membrane lipids are shown in a wireframe representation with carbon in light blue, oxygen in red, nitrogen in blue, hydrogen in grey and phosphorus in orange. Source data are provided as a Source Data file.

Supplementary Table 1. Primers used to delete region or insert mutations in Osh6p

Deletion/Mutation Designation	Primer name	Sequence
Δ35	Osh6_Δ35_For	CGTGGATCCATGGGCTCCATTGATACCGACGATATTGATGAAGACG
	Osh6_Δ35_Rev	CGTCTTCATCAATATCGTCGGTATCAATGGAGCCCATGGATCCACG
C62S	Osh6_C62S_For	CAATTGAGACCAGGCAGTGATTTGACCAGGATCACC
	Osh6_C62S_Rev	GGTGATCCTGGTCAAATCACTGCCTGGTCTCAATTG
C162S	Osh6_C162S_For	GTCACCATCCTCCAGAAAGTCATATTTTTACATG
	Osh6_C162S_Rev	CATGTAAAAATATGCACTTTCTGGAGGATGGTGAC
C389S	Osh6_C389S_For	GGCGAAGATCTTGACTATCTATTTATAAAAAATATCCC
	Osh6_C389S_Rev	GGGATATTTTTATAAAATAGAAATAGTCAAGATCTTCGCC
S190C	Osh6_S190C_For	GATTTTTAGGTAATTCATGTGCGGCCATGATGGATGG
	Osh6_S190C_Rev	CCATCCATCATGGCCGCACATGAATTACCTAAAAATC
T262C	Osh6_T262C_For	GGATATGTTTTGGATGTTACGATGCAATCGAAGGG
	Osh6_T262C_Rev	CCCTTCGATTGCATCGTAACATCCAAAAACATATCC
L69D ^(a)	Osh6_L69D*_For	GTGATTTGACCAGGATCACCGATCCTACTTTTATTTTAGGG
	Osh6_L69D*_Rev	CCCTAAAAATAAAAGTAGGATCGGTGATCCTGGTCAAATCAC
4A	Osh6_4A_For	GCCAATTGATACCGCCGCTATTGCTGCAGACGATGAATCTGG
	Osh6_4A_Rev	CCAGATTCATCGTCTGCAGCAATAGCGGCGGTATCAATTGGC
5A2G	Osh6_5A2G_For	CCGCCGCTATTGCTGCAGGCGGTGCATCTGGTCATAATATTATC
	Osh6_5A2G_Rev	GATAATATTATGACCAGATGCACCGCCTGCAGCAATAGCGGCGG
Δ69	see Moser von Filseck, 2015 ¹	
L69D	see Moser von Filseck, 2015 ¹	
H157A/H158A	see Moser von Filseck, 2015 ¹	

^(a) These oligonucleotides were designed to introduce the L69D substitution in Osh6p(noC/S190C) bearing the C62S mutation

Supplementary Table 2. Radius vs lipid composition of the main liposomes used in the study

Lipid composition (mol/mol)	Hydrodynamic radius (R_H , nm)			
	batch 1	batch 2	batch 3	batch 4
DOPC (100)	99.9 ± 28.1	118.8 ± 48.4	114.2 ± 39.5 ^(N)	105.7 ± 40.3
DOPC/POPS (95/5)	82.4 ± 29.8 ^(N)	81.4 ± 28.0 ^(N)	93.0 ± 32.0 ^(N)	
DOPC/POPS (90/10)	85.4 ± 47.4 ^(N)	83.0 ± 25.7 ^(N)		
DOPC/POPS (70/30)	100.0 ± 27.0	93.0 ± 32.0	96.4 ± 31.0	
DOPC/POPS (50/50)	95.7 ± 37.3 ^(N)			
POPS (100)	96.9 ± 27.2 ^(N)			
DOPC/POPS/diC16:0-PI4P (66/30/4)	92.0 ± 28.5 ^(N)			
DOPC/POPS (98/2)	108.0 ± 40.3			
DOPC/ diC16:0-PI4P (98/2)	100 ± 21.47			
DOPC/diphytanoyl-PS (98/2)	106.8 ± 44.4	93.6 ± 46.7 ^(N)	97.6 ± 45.1	
DOPC/diphytanoyl-PS (70/30)	93.6 ± 46.7 ^(N)	97.6 ± 45.1 ^(N)	89.8 ± 35.9	108.0 ± 44.5
DOPC/diphytanoyl-PS/POPS (70/28/2)	94.6 ± 43.1 ^(N)			
DOPC/diphytanoyl-PS/POPS (70/25/5)	83.3 ± 34.6 ^(N)			
DOPC/diphytanoyl-PS/POPS (70/25/10)	100.4 ± 35.6 ^(N)			
DOPC/diphytanoyl-PS/ diC16:0-PI4P (70/28/2)	99.56 ± 37.8 ^(N)			
DOPC/diphytanoyl-PS/ diC16:0-PI4P (70/25/5)	99.9 ± 34.6 ^(N)			
DOPC/diphytanoyl-PS/ diC16:0-PI4P (70/25/10)	97.7 ± 26.6 ^(N)			
DOPC/diphytanoyl-PC (70/30)	145.0 ± 76.0	107.7 ± 46.5 ^(N)		
DOPC/diphytanoyl-PC/diC16:0-PI4P (70/25/5)	95.34 ± 39.38			
DOPC/POPA (70/30)	95.7 ± 27.8 ^(N)	97.5 ± 40.3 ^(N)		
DOPC/POPA/POPS (70/25/5)	98.2 ± 35.2 ^(N)			
DOPC/POPA/diC16:0-PI4P (70/25/5)	97.3 ± 41.7 ^(N)			
DOPC/PI (70/30)	110.5 ± 45.0 ^(N)	97.9 ± 25.7 ^(N)		
DOPC/PI/POPS (70/25/5)	96.1 ± 39.3 ^(N)			
DOPC/PI/diC16:0-PI4P (70/25/5)	116.0 ± 35.6 ^(N)			
DOPC/PI/POPA/POPS (76/15/4/5)	98.3 ± 45.0			
DOPC/ diphyt-PS/PI/POPA/ diC16:0-PI4P (56/25/10/4/5)	98.3 ± 27.8 ^(R)			

^(N) liposomes contain trace amount of NBD-PE (0.3 mol%)

^(R) liposomes contain 2 mol% of Rhod-PE at the expense of DOPC

Supplementary Table 3. Yeast plasmids used in this study.

Name/Alias	Description	Origin/Reference
pRS315-Osh6-mCh	<i>ADH1pr:OSH6-mCherry</i> , CEN, <i>LEU2</i> (pRS315-based)	Maeda et al, 2013 ³
pRS315-Osh6-GFP	<i>ADH1pr:OSH6-GFP</i> , CEN, <i>LEU2</i> (pRS315-based)	This study
pAC89 pOsh6(L69D)	<i>ADH1pr:osh6[L69D]-mCherry</i> , CEN, <i>LEU2</i> (pRS315-based)	Moser von Filseck, 2015 ¹
pAC91 pOsh6(HHAA)	<i>ADH1pr:osh6[H157A,H158A]-mCherry</i> , CEN, <i>LEU2</i> (pRS315-based)	Moser von Filseck, 2015 ¹
pAC95 pOsh6Δ69	<i>ADH1pr:osh6[70-448]-mCherry</i> , CEN, <i>LEU2</i> (pRS315-based)	This study
pSec63-sGFP	<i>SEC63-sGFP</i> , CEN, <i>URA3</i> (pRS316-based)	Prinz et al, 2000 ⁴
pC2_{Lact}-GFP	<i>GPDpr:C2_{Lact}-GFP</i> , CEN, <i>URA3</i> (pRS416-based)	Yeung et al, 2008 ⁵
pAC100 pOsh6-mCh-U	<i>ADH1pr:OSH6-mCherry</i> , CEN, <i>URA3</i> (pRS315-based)	This study
pAC101 pOsh6(L69D)-U	<i>ADH1pr:osh6[L69D]-mCherry</i> , CEN, <i>URA3</i> (pRS315-based)	This study
pAC102 pOsh6(HHAA)-U	<i>ADH1pr:osh6[H157A,H158A]-mCherry</i> , CEN, <i>URA3</i> (pRS315-based)	This study
pAC103 pOsh6Δ69-U	<i>ADH1pr:osh6[70-448]-mCherry</i> , CEN, <i>URA3</i> (pRS315-based)	This study
pAC104 pOsh6Δ35-U	<i>ADH1pr:osh6[36-448]-mCherry</i> , CEN, <i>URA3</i> (pRS315-based)	This study
pAC106 pOsh6(SA2G)-U	<i>ADH1pr:osh6[D38A,D39A,D41A,E42A,D43G,D44G,E45A]-mCherry</i> , CEN, <i>URA3</i> (pRS315-based)	This study
pAC107 pC2_{Lact}-GFP-L	<i>GPDpr:C2_{Lact}-GFP</i> , CEN, <i>LEU2</i> (pRS416-based)	This study

Supplementary references

1. Moser von Filseck, J. et al. INTRACELLULAR TRANSPORT. Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science* **349**, 432-436 (2015).
2. Berbee, M.L. & Taylor, J.W. Dating the molecular clock in fungi – how close are we? *Fungal Biology Reviews* **24**, 1-16 (2010).
3. Maeda, K. et al. Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins. *Nature* **501**, 257–261 (2013).
4. Prinz, W.A. et al. Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **150**, 461-74 (2000).
5. Yeung, T. et al. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* **319**, 210-213 (2008).

2. Osh6p requiert Ist2p pour sa localisation dans les contacts RE-membrane plasmique et assurer un transport efficace de PS chez la levure

Les sites de contact membranaire sont des appositions étroites (< 20 nm) entre deux membranes cellulaires. De nombreuses LTPs résident dans ces sites de contact. Pour assurer cette localisation, les LTPs contiennent souvent plusieurs modules de liaison aux membranes. Par exemple, ORP5 et ORP8 qui échangent la PS et le PI(4)P dans l'espèce humaine, possèdent un domaine transmembranaire en C-ter qui est ancré dans le RE et un domaine PH en N-ter qui reconnaît le PI(4)P ou le PI(4,5)P₂³⁴⁹. Ainsi, ORP5 et ORP8 connectent le RE à la membrane plasmique ce qui permet de favoriser l'échange de lipides à l'interface entre ces deux membranes. Des analyses indiquaient qu'Osh6p se concentre dans des sites de contact entre le RE et la membrane plasmique³⁴⁵. Cependant, Osh6p ne possède aucun domaine autre que l'ORD qui lui permettrait de relier le RE à la membrane plasmique. De plus, nous avons vu qu'Osh6p ne se lie que transitoirement aux membranes pour échanger les lipides et la régulation de son avidité pour le RE et la membrane plasmique ne permet pas d'expliquer sa localisation particulière dans des sites de contact.

L'étude présentée ici révèle qu'Osh6p et Osh7p interagissent physiquement avec la protéine Ist2p pour permettre un transport efficace de PS depuis le RE vers la membrane plasmique. La protéine Ist2p comporte huit domaines transmembranaires ancrés dans le RE et elle appartient à la famille des TMEM16 (alias anoctamine). Ist2p est la seule protéine de cette famille dans la levure. De nombreuses protéines de cette famille sont décrites comme des canaux ioniques ou des scramblases à PS et certaines assureraient les deux types d'activité⁵¹.

À la différence des autres membres de la famille des TMEM16, chez les mycètes, les homologues d'Ist2p contiennent souvent, en N-ter ou C-ter, une longue chaîne d'acides aminés cytosolique. Pour Ist2p, cette chaîne, constituée d'environ 350 acides aminés, est essentiellement intrinsèquement désordonnée³⁶⁸. Cette région cytosolique contient en C-ter un segment d'une cinquantaine de résidus, riche en leucine, lysine et sérine. Ce segment est nécessaire pour l'attachement de la membrane plasmique^{369,370}. Ce segment se lie probablement de manière synergique au PI(4,5)P₂ et à la PS (non publié). La région cytosolique d'Ist2p lui permet d'attacher la membrane plasmique au RE et contribue à la

formation des sites de contact entre ces deux membranes³⁷¹.

Dans une première expérience menée par l'équipe d'Alenka Čopič, les protéines de *S. cerevisiae* qui sont co-purifiées par affinité avec Osh6p ont été analysées en spectrométrie de masse. Parmi ces protéines co-purifiées, la protéine d'attache du RE et de la membrane plasmique Ist2p est détectée (**Fig. S1**).

Mon objectif dans ces travaux a été de définir si Osh6p et Ist2p avaient des éléments de structures conservés qui leur permettraient d'interagir. Pour répondre à cette question, j'ai employé une approche phylogénétique en supposant que les deux protéines devaient posséder des résidus qui ont co-évolué pour maintenir durablement l'interaction.

Alignement des séquences homologues d'Osh6/7p et d'Ist2p chez les levures bourgeonnantes :

Les LTPs peuvent généralement être classées selon leur séquence primaire. En effet, les techniques d'alignement de séquences permettent de révéler d'éventuelles homologies fonctionnelles entre les protéines et d'inférer le lien évolutif qui peut exister entre ces protéines. Le principe consiste à essayer d'aligner deux séquences et d'établir un score qui permet d'affirmer ou de rejeter une hypothèse d'homologie. Ce score se décompose en deux indicateurs : le pourcentage d'identité qui correspond à la proportion de résidus identiques sur toute la longueur de l'alignement et le pourcentage de similarité qui correspond à la proportion de résidus qui ont les mêmes propriétés chimiques à une position donnée. Deux acides aminés sont dits similaires si d'après une matrice de substitution donnée (généralement Blosum62), le coût de la substitution n'est pas négatif. Autrement dit, deux résidus similaires, par exemple la substitution d'une arginine par une lysine, toutes deux cationiques, donnera un score positif, tandis que la substitution d'une arginine en aspartate (anionique) ajoute une pénalité. Généralement, pour aligner deux séquences de façon optimale, il peut être nécessaire d'ajouter des « *gaps* » ou trous qui correspondent à des événements d'insertion ou de délétion qui ont eu lieu au cours de l'évolution. Sur la base de ces principes, l'alignement de deux séquences peut se faire selon deux types d'algorithmes. L'alignement local, mis au point par Smith et Waterman, tend à optimiser l'alignement sur des régions qui partagent le maximum de similarités indépendamment de la longueur des deux séquences. Cet algorithme a tendance à ajouter de longs « *gaps* » entre les régions très conservées. À l'inverse, l'alignement global, mis au

point par Needleman et Wunsch, tient compte de la longueur des séquences, il optimise l'alignement de manière à respecter la longueur globale. On l'utilise lorsqu'on présuppose que les deux séquences ont un nombre de résidus comparable.

Pour trouver des séquences homologues, dans les bases de données, j'ai eu recours au BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) qui est une adaptation heuristique (méthode partielle) de l'alignement local. Le BLAST permet de retrouver très rapidement des centaines de séquences similaires, toujours selon une matrice de substitution donnée. Cet outil m'a aidé à retrouver les séquences nécessaires à la construction de deux ensembles de données. J'ai obtenu un premier échantillon de séquences ORP/Osh caractérisées par le motif signature EQVSHHPP référencé sur la base de données Prosite (PS01013), cet échantillon est représentatif de l'ensemble des eucaryotes. Dans un second temps, j'ai obtenu un échantillon qui correspond aux séquences homologues à Ist2p référencées par la base de données Interpro comme appartenant à la famille des anoctamines (IPR007632), caractérisées par huit domaines transmembranaires bien conservés. Les séquences homologues à Ist2p sont récupérées uniquement dans le subphylum Saccharomycotina (« levures bourgeonnantes »)

Pour construire ces ensembles de données, chaque séquence a été vérifiée manuellement. D'une part, les séquences redondantes sont éliminées lorsqu'elles partagent un même locus chromosomique. Certains génomes ont été séquencés plusieurs fois, ce qui est à l'origine des redondances dans les bases de données. D'autre part, les séquences fragmentaires provenant de génomes qui n'ont pas été entièrement assemblés sont également éliminées.

Une fois les échantillons obtenus, les séquences ont été soumises à des algorithmes d'alignement multiple. L'alignement multiple est une généralisation de l'alignement global sur plus de deux séquences. Pour cela, l'algorithme procède progressivement, d'abord il identifie et aligne les deux séquences qui ont le meilleur score d'alignement entre elles. Ensuite, les autres séquences sont alignées une à une en maximisant toujours le score d'alignement. Pour que de tels algorithmes soient pertinents, il faut que les séquences soient malgré tout suffisamment proches, ce qui est bien le cas, puisque lors de la constitution des échantillons, les séquences retenues ont été choisies d'après des caractéristiques communes.

Au cours de ma thèse, j'ai sélectionné deux algorithmes d'alignement multiples différents. Pour les ORP/Osh, j'ai d'abord choisi l'algorithme Clustal Omega, qui est rapide pour un très grand nombre de séquences. Pour cela, il classe les séquences en grappes (*cluster*) en identifiant dans des sous-parties de séquence des « mots » similaires. Le défaut de cet algorithme est qu'il procède de façon heuristique. Ceci n'est pas forcément gênant pour les ORP/Osh qui contiennent un domaine très bien conservé. Cet algorithme a permis facilement de rendre compte de la conservation du motif anionique d'Osh6p. Le problème de l'algorithme Clustal est que j'ai remarqué qu'il était peu adapté à de très longues séquences à plusieurs domaines reliés par de longues régions désordonnées. En effet, la nature désordonnée d'une région peut être conservée, mais les résidus qui la composent peuvent muter facilement.

Pour analyser les séquences homologues d'Ist2p et étudier la co-évolution entre Ist2p et les Osh, j'ai utilisé un algorithme plus lent, mais plus précis. Il s'agit du MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform), cet algorithme est plus versatile, il m'a permis notamment de paramétrer une méthode itérative (G-INS-i ou E-INS-i)³⁷². Cet algorithme produit d'abord tous les alignements deux à deux possibles, il en tire une matrice de distance permettant de générer un arbre guide qui sert de base à la construction de l'alignement selon une méthode classique progressive. Ensuite, l'alignement multiple est réitéré, jusqu'à 1000 fois. À chaque itération, la précision de l'alignement est évaluée en combinant deux scores : 1) le score pondéré de la somme des sites appariés qui tient compte des « *gaps* »³⁷³ et 2) le score basé sur l'algorithme COFFEE qui évalue la cohérence entre l'alignement multiple et tous les alignements deux à deux possibles³⁷⁴. Lorsqu'il n'est plus possible d'améliorer la combinaison de ces deux scores, les réitérations s'arrêtent et fournissent ce qu'on suppose être le meilleur alignement.

La méthode « G-INS-i » permet de définir que les séquences peuvent être alignées sur toute leur longueur et donc l'algorithme essaiera d'aligner les séquences globalement en suivant la méthode de Needleman-Wunsch. Cette méthode est donc particulièrement bien adaptée pour les homologues d'Osh6/7p chez les levures bourgeonnantes.

À l'inverse, la méthode « E-INS-i » permet une analyse plus approfondie. Cette méthode permet de détecter les domaines séparés par de longues séquences non conservées et elle permet de s'affranchir du coût négatif de grandes insertions ou délétions. La méthode « E-INS-i » est particulièrement adaptée pour la protéine Ist2p qui

contient une longue séquence intrinsèquement désordonnée, dont les résidus ne sont pas spécifiquement conservés. La méthode MAFFT est reconnue comme étant l'une des méthodes les plus précises³⁷⁵ et elle permet de tenir compte des séquences désordonnées, ce que ne permet pas la méthode Clustal.

Enfin, pour construire l'alignement des homologues d'Osh6/7p, j'ai choisi une matrice de substitution *Blosum80* qui augmente les pénalités en cas de mutation, cette matrice est préférable pour des séquences qui ont plus de 80% de similarité. Pour l'alignement des homologues d'Ist2p, j'ai gardé la matrice de substitution par défaut *Blosum62*.

Une fois les alignements obtenus, on peut identifier les régions d'Ist2p qui sont conservées et détecter des motifs ou de nouveaux domaines qui sont restés inaperçus auparavant. Afin de rendre cette analyse plus claire, les séquences sont ordonnées d'après la classification taxonomique³⁷⁶, en plaçant *S. cerevisiae* en première ligne et l'espèce la plus distante : *Lipomyces starkeyi*, en dernière ligne. On peut ainsi détecter si un clade est caractérisé par l'apparition de nouvelles séquences.

On remarque que la région cytosolique C-ter d'Ist2p est globalement peu conservée, les résidus qui la composent sont aléatoires, ce qui est en accord avec la structure désordonnée de cette région. En revanche, dans cette région, on repère deux segments très conservés : le motif basique/hydrophobe de reconnaissance de la membrane plasmique, et un segment qui n'avait jamais été repéré jusqu'alors (**Fig. 3**). Ce segment d'Ist2p contient 36 résidus très conservés chez presque la moitié des levures qui ont été étudiées (**Fig. S7**). Ce segment est défini par deux petits motifs qui ne varient presque pas : « AGATLP » et « IPTSKNY ». Ce résultat suggère que ces résidus sont très importants pour la fonction d'Ist2p.

In vivo, il s'avère que la substitution dans ce segment de deux thréonines par des alanines suffit à interrompre le recrutement d'Osh6p dans les sites de contact RE/membrane plasmique (T736A/T743A) (**Fig. 2D**). De plus, ce segment est nécessaire et suffisant pour le recrutement d'Osh6p. En effet, si la région cytosolique d'Ist2p située entre le domaine transmembranaire et le motif de liaison à la membrane plasmique est remplacée par une séquence de résidus aléatoires, Osh6p n'est plus recrutée dans les sites de contact. Cependant, l'insertion du seul segment conservé d'Ist2p dans cette séquence aléatoire synthétique est suffisante pour restaurer la localisation d'Osh6p (**Fig. 4**).

Arbre phylogénétique des TMEM16 chez les levures bourgeonnantes :

Ensuite, il est possible de construire un arbre phylogénétique qui permet de connaître les relations évolutives qui existent entre les séquences d'Ist2p et d'Osh6p et de déterminer si les séquences homologues sont orthologues, c'est-à-dire des séquences homologues identifiées dans deux espèces sœurs, ou paralogues, c'est-à-dire deux séquences homologues issues d'un événement de duplication dans un même clade. Il existe plusieurs façons d'obtenir un arbre phylogénétique, la méthode que j'ai choisie est le maximum de vraisemblance (*Maximum likelihood*) dont le résultat est le plus long à calculer, mais qui est le meilleur dans le sens où il permet d'inférer l'arbre phylogénétique qui a la meilleure probabilité de refléter la réalité évolutive. Cette méthode suit un modèle donné de substitution. Le modèle de substitution que j'ai choisi est celui de Le & Gascuel (*-LG matrix*)³⁷⁷, qui est un des modèles les plus robustes à ce jour pour des approches sans *a priori*. Cette matrice est adaptée à des analyses générales et tient compte de la vitesse d'évolution de certains sites, tout en étant faiblement dépendante de l'échelle de temps d'évolution. Enfin, une fois l'arbre obtenu, j'ai sélectionné *Lipomyces starkeyi* comme racine (*root*), qui correspond à l'espèce ayant divergé le plus tôt dans l'histoire évolutive par rapport aux autres espèces.

L'arbre que j'ai obtenu à partir d'Ist2p retrace plutôt bien la phylogénie des levures bourgeonnantes³⁷⁶. Mais de façon étonnante, le clade des Phaffomycetaceae est mal placé. Ce clade est paraphylétique, normalement, ces espèces partagent un ancêtre commun avec les Saccharomycodaceae et les Saccharomycetaceae qui n'est pas partagé avec les autres levures (**Fig. 7c**). Si l'on se réfère à l'alignement des séquences homologues d'Ist2p, on s'aperçoit que le motif semble apparaître dans ce clade, mais la région cytosolique est extrêmement variable dans ces espèces et peut même être complètement manquante. D'autre part, toutes les homologues d'Ist2p qui possèdent le motif de recrutement d'Osh6p forment un groupe monophylétique : ces homologues ont un ancêtre commun qui possédait le motif de recrutement d'Osh6p. D'après la phylogénie des levures bourgeonnantes, ce motif aurait été sélectionné il y a environ 130 millions d'années. Ces résultats indiquent qu'Ist2p contient un motif de recrutement d'Osh6p qui a certainement un rôle physiologique essentiel pour la survie *S. cerevisiae* et d'autres levures semblables.

Cartographie des résidus conservés en surface d'Osh6p :

Ensuite je me suis intéressé aux résidus d'Osh6p qui ont été sélectionnés et qui n'ont pas variés depuis que le segment d'Ist2p est apparu. Initialement, l'idéal aurait été de réussir à construire une matrice de co-évolution entre Osh6p et Ist2p afin de corrélérer l'évolution des résidus d'Osh6p à ceux d'Ist2p. En effet, j'avais envisager d'utiliser un outil tel que BIS2Analyzer³⁷⁸ qui permet d'identifier la coévolution de plusieurs des résidus dans une protéine ou dans plusieurs protéines, mais ce type d'algorithme est trop demandeur en ressource de calcul pour des protéines aussi différentes qu'Osh6p et Ist2p et le calcul n'a pas pu être poursuivi. À la place, j'ai utilisé une méthode visuelle que j'avais pu expérimenter pour identifier le motif anionique en surface du couvercle d'Osh6p.

Mon hypothèse était la suivante : si des résidus en surface d'Osh6p ont été sélectionnés depuis l'apparition du segment d'interaction d'Ist2p, alors, ces résidus devraient avoir un plus haut score de conservation chez les Osh6/7p issues des sous-embancements de levures qui possèdent effectivement ce segment d'interaction.

Pour vérifier cette hypothèse, j'ai donc cherché à cartographier en surface d'Osh6p les scores de conservation de chaque résidu : soit avec les homologues à Osh6/7p chez toutes les levures ; soit uniquement celles qui sont issus des espèces de Saccharomycodaceae et de Saccharomycetaceae chez lesquelles le segment d'interaction d'Ist2p est stable et conservé. Pour effectuer cette analyse, j'ai utilisé les algorithmes du serveur Confsurf³⁷⁹. Cette méthode consiste à inférer un arbre phylogénétique par maximum de vraisemblance ou par méthode bayésienne à partir d'un alignement de séquence. Comme pour la phylogénie d'Ist2p, j'ai sélectionné le maximum de vraisemblance avec la matrice de substitution « LG ». Ensuite le serveur renvoi comme résultat le score de conservation de chaque résidu de la protéine cible (Osh6p). Pour ce calcul, l'algorithme tient compte de la topologie, de la longueur des branches de l'arbre phylogénétique et de la position de la protéine cible dans cet arbre. Finalement, cet outil permet de colorier la structure 3D de la protéine selon un dégradé de couleur qui indique le degré de conservation. On peut ainsi représenter les résidus de surface qui sont conservés dans Osh6p.

Analyse comparative de l'évolution des résidus d'Osh6p chez les levures

Tout d'abord, si on s'intéresse à la conservation des résidus en tenant compte de l'ensemble des homologues Osh6/7p issus de toutes les levures, on s'aperçoit que la cavité de liaison des lipides et le couvercle ont un bon score de conservation. Ceci suggère que ces éléments de structure sont restés extrêmement stables au cours de l'évolution depuis environ 400 millions d'années³⁷⁶. Ensuite, on observe que le segment C-ter et de nombreuses boucles d'Osh6p ont un score de conservation quasiment nulle (**Fig. 7d**). Ce qui suggère que ces éléments ont connu une forte variabilité au cours de l'évolution par rapport au reste de la protéine.

Ensuite, j'ai répété l'analyse à partir du même alignement mais en supprimant les séquences qui appartiennent à des espèces qui n'ont pas le motif d'interaction d'Ist2p. Dans l'ensemble, nous observons que le score de conservation des résidus ne change pas tellement, le domaine de liaison aux lipides est conservé, tandis que la région C-ter et de nombreuses boucles sont restées très variables. Cependant, on s'aperçoit qu'une région conservée d'Osh6p est apparue avec cette nouvelle analyse (**Fig. 7d**). Cette région possède le même score de conservation que le domaine de liaison aux lipides ce qui suggère qu'elle est restée tout aussi stable que celui-ci depuis la séparation des Saccharomycodaceae et de Saccharomycetaceae il y a environ 130 millions d'années. Cette région correspondrait à un sous-domaine qui n'avait jamais été identifié jusque-là. Ce sous-domaine est accolé à la face externe du tonneau β d'Osh6p. Il est constitué par les hélices $\alpha 8$ et $\alpha 9$, par la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ et par une hélice 3_{10} située entre les feuillets $\beta 5$ et $\beta 6$. Cette région n'intervient pas dans la liaison des ligands lipidiques et elle est symétriquement opposée à l'entrée de la cavité par rapport à l'hélice $\alpha 7$.

Finalement, dans cette région conservée depuis que le motif d'interaction d'Ist2p est apparu, on repère les résidus D141 et L142 en surface de la protéine. Ces deux résidus sont nécessaires pour l'interaction d'Osh6p avec Ist2p *in vivo*. Leur substitution par des alanines supprime la localisation dans les sites de contact RE/membrane plasmique (**Fig. 7b**). De plus, une expérience de co-immunoprécipitation révèle que ces résidus sont nécessaires pour qu'Osh6p interagisse avec Ist2p (**Fig. 8a**). Enfin, ces résidus sont essentiels pour permettre un transport de PS efficace dans la membrane plasmique (**Fig. 8b,c**), sans lequel la levure n'est pas viable (**Fig. S5**).

Pour résumer, cette étude a permis de révéler qu'Ist2p permet le recrutement d'Osh6p dans les sites de contact formés par le RE et la membrane plasmique. Pour cela, Ist2p contient une région désordonnée cytosolique qui connecte la membrane plasmique au RE dans laquelle se trouve un segment conservé dans un clade de levure bourgeonnante ayant divergé il y a 130 millions d'année. Ensuite les résidus D141 et L142 d'Osh6p sont nécessaires pour assurer l'interaction avec Ist2p. Ces résidus sont situés en surface de la protéine dans un domaine structural conservé depuis l'apparition du motif d'interaction d'Ist2p. Enfin, l'ensemble des résultats montrent la corrélation entre le recrutement d'Osh6p par Ist2p et l'efficacité de transport de PS depuis le RE vers la membrane plasmique. Le motif d'interaction d'Ist2p est nécessaire pour ce transport (**Fig. 6b,d**), tout comme les résidus D141 et L142 (**Fig. 8c**). Ces résultats sont également appuyés par une analyse de lipidomique qui montre que l'interruption de l'interaction entre Osh6p et Ist2p a pour effet de réduire de plus de 50 % le niveau normal de PS totale dans les levures (**Fig. 5**). Ce résultat indique que la perte de l'interaction est aussi délétère que la perte d'Osh6p et Osh7p.

Finalement, l'ensemble de ces résultats suggèrent qu'Osh6p et Osh7p sont recrutés par Ist2p pour permettre un transport efficace de PS dans un grand groupe de levures bourgeonnantes et révèle une interaction physique et fonctionnelle inédite entre une LTP et une protéine impliquée dans la formation de sites de contact membranaires.

Article II

Osh6 requires Ist2 for localization to ER-PM contacts and efficient phosphatidylserine transport in budding yeast

J.M. D'AMBROSIO, V. ALBANÈSE, N.-F. LIPP, L. FLEURIOT,
D. DEBAYLE, G. DRIN, A. ČOPIČ

2020

RESEARCH ARTICLE

Osh6 requires Ist2 for localization to ER–PM contacts and efficient phosphatidylserine transport in budding yeast

Juan Martín D'Ambrosio¹, Véronique Albanèse^{1,*}, Nicolas-Frédéric Lipp², Lucile Fleuriot², Delphine Debayle², Guillaume Drin² and Alenka Čopič^{1,*}

ABSTRACT

Osh6 and Osh7 are lipid transfer proteins (LTPs) that move phosphatidylserine (PS) from the endoplasmic reticulum (ER) to the plasma membrane (PM). High PS levels at the PM are key for many cellular functions. Intriguingly, Osh6 and Osh7 localize to ER–PM contact sites, although they lack membrane-targeting motifs, in contrast to multidomain LTPs that both bridge membranes and convey lipids. We show that Osh6 localization to contact sites depends on its interaction with the cytosolic tail of the ER–PM tether Ist2, a homolog of TMEM16 proteins. We identify a motif in the Ist2 tail, conserved in yeasts, as the Osh6-binding region, and we map an Ist2-binding surface on Osh6. Mutations in the Ist2 tail phenocopy *osh6Δ osh7Δ* deletion: they decrease cellular PS levels and block PS transport to the PM. Our study unveils an unexpected partnership between a TMEM16-like protein and a soluble LTP, which together mediate lipid transport at contact sites.

This article has an associated First Person interview with the first author of the paper.

KEY WORDS: Lipid transfer protein, Membrane contact sites, Phosphatidylserine, Lipid homeostasis, TMEM16, Budding yeast

INTRODUCTION

Many lipids are non-uniformly distributed between the membranes of eukaryotic cells, thus conferring to organelle membranes their distinct properties and identities (Harayama and Riezman, 2018). Lipid transfer proteins (LTPs) contribute to this uneven distribution by transporting specific lipid species between compartments. A prominent eukaryotic LTP family are the oxysterol-binding protein-related proteins (ORP) and the related Osh proteins, which are characterized by a conserved lipid-binding domain (the oxysterol-binding protein-related domain, also known as ORD) (Raychaudhuri and Prinz, 2010). Crystal structures revealed that ORDs can accommodate one lipid molecule within their binding pocket, either sterol or phosphatidylserine (PS) (Im et al., 2005; Maeda et al., 2013). Importantly, many ORDs have been shown to alternately encapsulate phosphatidylinositol (4)-phosphate (PI4P) and phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P₂), and sequence analyses suggest that PI4P is the common ligand for all

ORP/Osh proteins. This dual lipid specificity allows ORP/Osh proteins to operate lipid exchange between compartments and use phosphoinositide metabolism to transport the second lipid species against its concentration gradient (Chung et al., 2015; de Saint-Jean et al., 2011; Ghai et al., 2017; Mesmin et al., 2013; Moser Von Filseck et al., 2015a,b).

We have previously studied Osh6, which, together with its close paralog Osh7, transports PS from the endoplasmic reticulum (ER) to the plasma membrane (PM) in yeast (Maeda et al., 2013). PS is synthesized at the ER, but its concentration is much higher at the PM, specifically in the cytosolic leaflet, where it mediates recruitment of proteins involved in signaling and establishment of cell polarity, and is important for initiation of endocytosis (Kay and Fairn, 2019). We have shown that Osh6 exchanges PS with PI4P, which is synthesized at the PM and then hydrolyzed at the ER by the PI4P phosphatase Sac1, and that PI4P transport and degradation are required for efficient PS transport in yeast (Moser Von Filseck et al., 2015b). This is also true for the closest Osh6 homologs in mammalian cells, ORP5 and ORP8 (also known as OSBPL5 and OSBPL8, respectively) (Chung et al., 2015).

In agreement with their proposed function, Osh6 and Osh7 can be observed at the cortical ER, which represents sites of close apposition between the ER and the PM (Schulz et al., 2009). These ER–PM contact sites are maintained by tethering proteins that are able to simultaneously bind to both compartments. A number of such proteins have been shown to maintain the ER–PM contacts in yeast (Manford et al., 2012). LTPs themselves often contain additional tethering domains or motifs that mediate their localization to contact sites (Wong et al., 2017). For example, ORP5 and ORP8 contain a transmembrane (TM) region that is embedded in the ER, and a pleckstrin homology (PH) domain that binds the PM (Olkkonen and Li, 2013). Many other LTPs, including several ORP/Osh proteins, bind to the ER via ER-resident VAP proteins using a short FFAT (two phenylalanines in an acidic tract) motif upstream of their ORD domain (Loewen et al., 2003; Murphy and Levine, 2016). In contrast, Osh6 consists only of an ORD and how it targets the ER and PM is not known. We have previously demonstrated that, to some extent, the cellular localization of Osh6 is regulated by its intrinsic avidity for lipid membranes (Lipp et al., 2019). However, this does not explain how Osh6 specifically targets its donor and acceptor compartments and how it maintains accuracy in PS transport.

Here, we show that the localization of Osh6 to cortical ER depends on its binding to the ER–PM tether Ist2. Ist2 is an intriguing tether that contains a long and disordered cytosolic tail and a TM region embedded in the ER, which shares homology with the TMEM16 proteins, a family of Ca²⁺-activated lipid scramblases (Brunner et al., 2014; Kralt et al., 2015; Manford et al., 2012; Wolf et al., 2012). We show that a short segment of the disordered tail is required for Osh6 binding and localization, and that this interaction

¹Université de Paris, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75006, Paris, France.

²Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS and Université Côte d'Azur, 06560 Valbonne, France.

*Authors for correspondence (veronique.albanese@ijm.fr; alenka.copico@ijm.fr)

© J.M.D., 0000-0003-2834-1838; V.A., 0000-0002-5947-7415; N.-F.L., 0000-0001-7963-7415; G.D., 0000-0002-3484-4581; A.C., 0000-0003-0166-7731

Handling Editor: David Stephens

Received 8 January 2020; Accepted 6 April 2020

is necessary for Osh6-mediated PS transport to the PM. Finally, we identify residues in a conserved region of Osh6, distal from the entrance to the lipid-binding pocket, that are involved in binding to Ist2. Our results unveil an unexpected partnership between a TMEM16-like protein and a cytosolic LTP, which enables lipid flux at contact sites, and is important for PS homeostasis in yeast.

RESULTS

Ist2 is required for Osh6 localization to the cortical ER

Many LTPs localize to the ER using a short FFAT motif that binds to the VAP proteins (Murphy and Levine, 2016). No such motif can be identified in the ORD of Osh6. We therefore speculated that another protein was responsible for Osh6 localization to the ER–PM contacts. To identify such protein(s), we endogenously tagged Osh6 with a TAP tag and performed affinity chromatography followed by proteomic analysis using mass spectrometry (Fig. S1). Among the proteins that co-purified with Osh6 (Table S1), we identified Ist2, an important yeast ER–PM tether (Collado et al., 2019; Hoffmann et al., 2019; Manford et al., 2012; Wolf et al., 2012). Due to their overlapping localization, Ist2 seemed a good candidate for mediating Osh6 targeting to the cortical ER. An interaction between these two proteins was also detected, but not further confirmed, in a previous high-throughput proteomics study (Babu et al., 2012). In agreement with these results, we found that deletion of *IST2* rendered Osh6 completely cytosolic (Fig. 1A). In contrast, Osh6 remained cortical in *scs2Δ scs22Δ* cells, which lack the two yeast VAP proteins that recruit multi-domain Osh proteins to contact sites, namely Osh1, Osh2 and Osh3 (Weber-Boyvat et al., 2015). Furthermore, when we tagged Osh6 and Ist2 at their carboxyl termini with Venus N-terminal (VN) and C-terminal (VC) halves to perform bimolecular fluorescence complementation (BiFC), we could observe fluorescent signal at the cell cortex (Fig. 1B). This was not the case when we expressed Osh6–VN or Ist2–VC alone, or when we co-expressed Osh6–VN with a Ist2 truncated at amino acid residue 590, fused to VC. Importantly, the ratio between cortical and soluble Osh6 depended on the level of expression of Ist2 (Fig. 1C,D). We conclude that Ist2 is the limiting factor for Osh6 localization to ER–PM contacts and that the two proteins may directly interact.

Osh6 interacts with the disordered cytosolic tail of Ist2

Ist2 is an intriguing ER–PM tether. It is embedded in the ER membrane via a domain containing eight predicted TM helices, which bears structural homology to a large mammalian family of Ca²⁺-activated lipid scramblases and/or ion channels, called TMEM16 proteins (Brunner et al., 2014) (Fig. 2A). This domain contains a C-terminal appendage of about 300 amino acids that is specific to fungi and is predicted to be largely disordered, followed by a polybasic motif that binds to the PM (Kralt et al., 2015; Maass et al., 2009). Interestingly, it was shown that the cytosolic tail of Ist2 could be significantly truncated (by more than half of its original length) without an effect on Ist2 localization (Kralt et al., 2015). In contrast, we observed that a longer part of the tail (from amino acid 696 to the C-terminus) was required for cortical localization of Osh6, in accordance with our BiFC data, suggesting that Osh6 may bind to a region in this portion (Figs 1B,2B). We tested this hypothesis using a yeast two-hybrid assay, in which we expressed full-length Osh6 as prey and different fragments of Ist2 as bait (Fig. 2C; Fig. S2A). We observed a strong interaction between Osh6 and the C-terminal Ist2 fragment, as well as with shorter fragments of the C-terminal tail, down to 19 amino acids in length (residues 729–747), but did not observe a strong interaction between Osh6 and the N-terminal cytosolic fragment of Ist2. Similar results were

obtained with Osh7, whereas Osh4 (also known as Kes1), another soluble Osh protein, did not show any interaction with Ist2 (Fig. 2C; Fig. S2B). We could also detect interaction between Osh7 and full-length Ist2 using the BiFC assay (Fig. S2C). We then mutated selected residues within the Ist2[729–747] region, specifically the ones that may be phosphorylated. Replacement of T736 and T743 with alanine was sufficient to block interaction with Osh6 and to render it cytosolic (Fig. 2C,D), whereas mutation of other residues had a smaller or no effect on Osh6 binding (Fig. S2D). Alignment of homologous TMEM16 sequences from budding yeasts (*Saccharomycotina*) shows that the [729–747] region is highly conserved in the monophyletic clade containing *Saccharomycodaceae* and *Saccharomycetacea* (Shen et al., 2018) (Fig. 3). Especially well conserved are the residues T736 and T743; in contrast, the sequence of the rest of the tail is not conserved.

We next asked whether this conserved Osh6-interacting fragment of the Ist2 tail was sufficient for localizing Osh6 to the cortical ER. For this, we used a previously described Ist2 mutant Ist2-RL, in which the whole disordered tail sequence was randomized (Kralt et al., 2015). When co-expressed with Osh6 as fluorescent fusions in *ist2Δ* yeast, Ist2-RL still localized to the cortical ER, whereas Osh6 did not. However, insertion of the Ist2[729–747] fragment into Ist2-RL partially rescued Osh6 cortical localization (Fig. 4A). Rescue was even more efficient with a slightly longer fragment (amino acids 718–751), mirroring the strong interaction detected in the yeast two-hybrid assay (Figs 2C, 4B). Taken together, these results suggest that Osh6 localizes to ER–PM contact sites by binding to a short region within the disordered tail of Ist2. A more quantitative analysis where we compared the ratio of cortical to cytosolic Osh6 signal in a cell as a function of total Osh6 signal showed only a small difference between BFP–Ist2-RL^{718–751WT} and BFP–Ist2-expressing cells, suggesting that the rest of the tail at best has a small effect on Osh6 localization (Fig. 4C).

Ist2 is required for Osh6-mediated PS transport to the PM

Because Osh6 and Osh7 require Ist2 for their localization to ER–PM contacts, we tested whether this interaction was important for PS transport. We first evaluated the effect of *ist2* mutations on general lipid homeostasis in the cell. Lipidomic analysis of whole cell extracts showed that both *osh6Δ osh7Δ* and *ist2Δ* cells had a strong (about two-fold) decrease in PS levels compared to levels in wild type, similar to the decrease in PS observed in a strain lacking all ER–PM tethers (Quon et al., 2018). In contrast, the levels of phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) or phosphatidylinositol (PI) were not significantly affected (Fig. 5; Fig. S3). Interestingly, two point mutations in the Ist2 tail that disrupt the Osh6/7 binding site but do not affect Ist2 localization or ER–PM tethering, T736A/T743A substitution and Δ [736–743] deletion, led to a similar decrease in PS levels as *ist2Δ* (Figs 2D and 5). These results suggest that the decrease in PS levels in *ist2* mutants, like in the *osh6Δ osh7Δ* mutant, is directly due to a block in PS export from the ER, and may result from a repression of PS synthesis due to elevated PS levels at the ER (Sohn et al., 2016; Tani and Kuge, 2014).

To assess the influence of *ist2* mutation on PS transport from the ER, we analyzed the cellular PS distribution using the fluorescent PS reporter C2_{Lact}–GFP (Fair et al., 2011). We usually observed a decrease in the level of C2_{Lact}–GFP at the PM in *osh6Δ osh7Δ* cells compared to the level observed in wild type, as previously reported (Maeda et al., 2013), as well as an effect of the deletion of *IST2*. However, there was variability between experiments and the difference was not always significant (Fig. S4). The absence of a

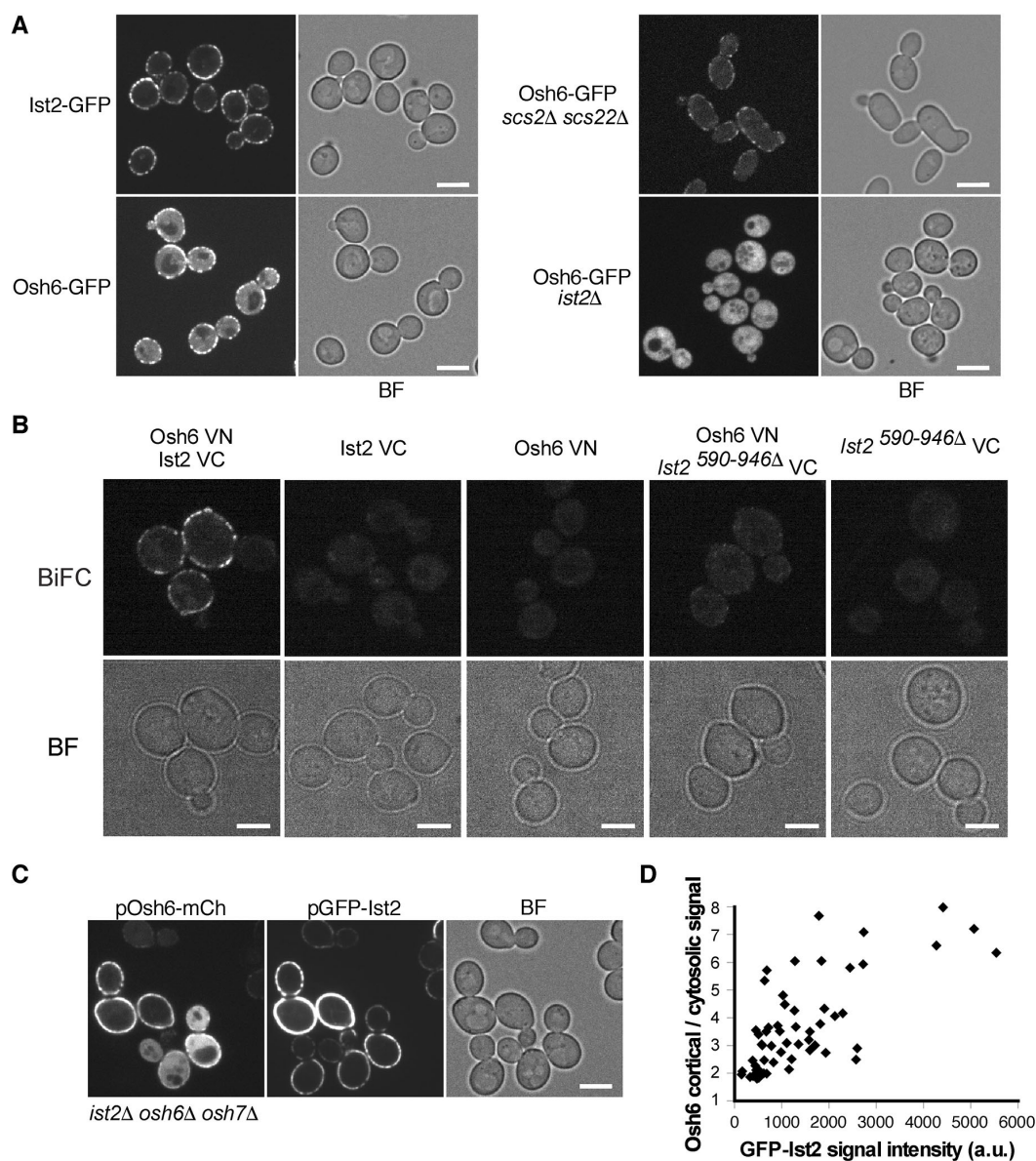


Fig. 1. Ist2 is required for Osh6 localization to the cortical ER. (A) Localization of chromosomally-tagged Ist2-GFP and Osh6-GFP in wild-type (left), *scs2Δ scs22Δ*, or *ist2Δ* cells. (B) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) in diploid cells expressing endogenously tagged Osh6-VN and Ist2-VC or Ist2^{590-946Δ}-VC (Ist2 truncated at amino acid 590), as indicated. (C) Localization of Osh6-mCherry and GFP-Ist2 expressed from low-copy plasmids in *ist2Δ osh6Δ osh7Δ* cells. (D) The ratio of Osh6-mCherry peripheral versus cytosolic signal in C was quantified as a function of GFP-Ist2 fluorescence (a.u.=arbitrary units). Each symbol represents one cell from the same experiment; two independent experiments were quantified, yielding similar results. All strains were imaged at least three times. Scale bars: 5 μ m. Bright field (BF).

strong effect on PS distribution at steady state is not surprising because it is known that the lack of Osh6 and Osh7 can be compensated by other, poorly understood mechanisms (Kay and Fair, 2019; Ma et al., 2018).

To more precisely assess the involvement of the Ist2 tail region in PS transport, we used a cellular PS transport assay. For this, we used *cho1Δ* cells, which lack the PS synthase Cho1 and contain no PS, resulting in a cytosolic distribution of C2_{Lact}-GFP (Fair et al., 2011). Exogenous addition of lyso-PS, which is taken up by the cell (Riekhof et al., 2007; Spira et al., 2012), leads to PS synthesis via

acylation at the ER and transport of PS to the PM over a time-course of 10–20 min when Osh6/7 are functional (Maeda et al., 2013; Moser Von Filseck et al., 2015b) (Fig. 6A,B). However, this was not the case in *cho1Δ ist2^{736-743Δ}* cells, in which PS accumulated at the ER, as demonstrated by the distribution of C2_{Lact}-GFP, similar to the distribution observed in *cho1Δ osh6Δ osh7Δ* cells. The small deletion in the Ist2 cytosolic tail therefore functionally phenocopied the absence of Osh6 and Osh7 for transport of newly-synthesized PS. We could fully rescue the PS transport defect in these cells by adding a plasmid-borne copy of *IST2* or of the chimeric construct

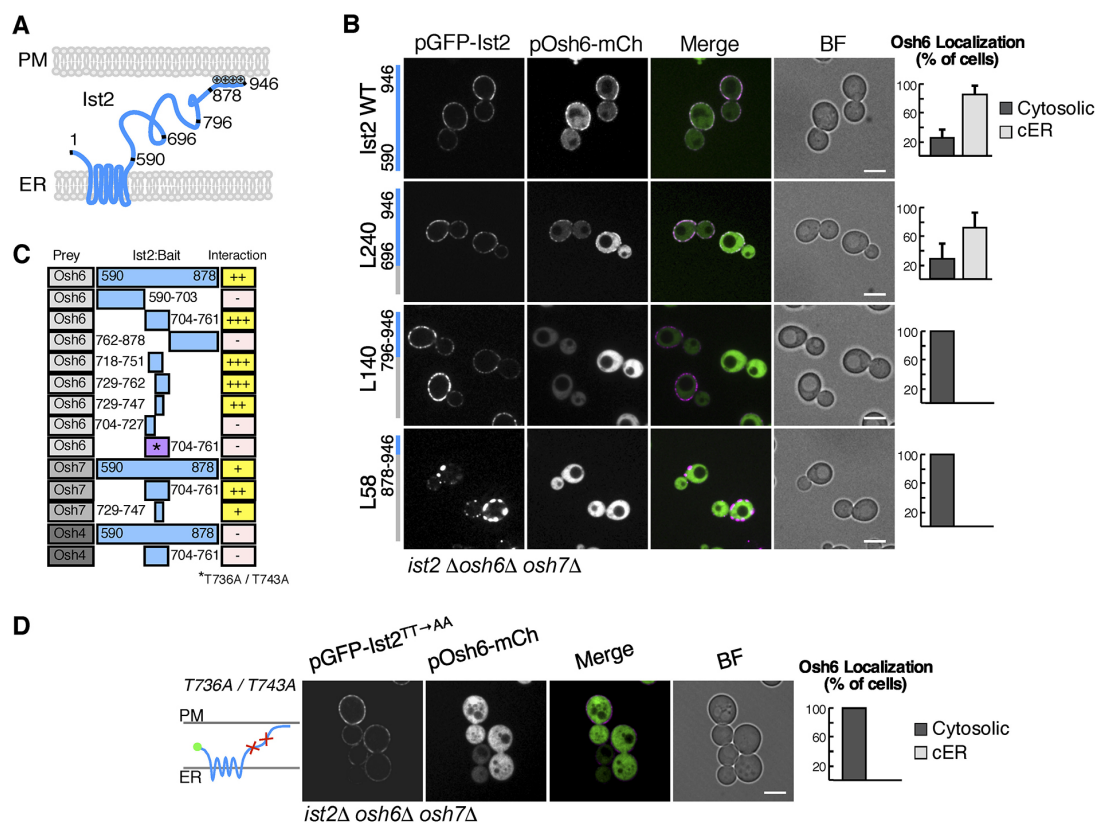


Fig. 2. Osh6 interacts with the disordered cytosolic tail of Ist2. (A) Schematic representation of Ist2 predicted topology. Positions of amino acids in the disordered cytosolic tail are indicated, as well as the C-terminal polybasic domain (+). (B) Localization of Osh6-mCherry and wild-type GFP-Ist2 (Ist2 WT) or GFP-Ist2 deletion mutants (L240, Ist2^{590–696Δ}, L140, Ist2^{590–796Δ} and L58, Ist2^{590–878Δ}), expressed from plasmids in *ist2Δ osh6Δ osh7Δ* cells. Graphs show the fraction of cells with visible cortical ER (cER) Osh6 signal vs cytosolic only. The bars show mean±s.e.m. from three independent experiments ($n=60$ cells for each experiment). (C) Mapping of the Osh6 interaction site on Ist2 by yeast two-hybrid assay. Osh6, Osh7 and Osh4 were used as prey, and full length Ist2 cytosolic tail (amino acids 590–878) and shorter fragments, as indicated, were used as bait; relative interaction was scored (–, no interaction; +, weak interaction; ++, moderate interaction; +++, strong interaction) from growth on reporter plates in three independent assays. Asterisk indicates T736A and T743A mutations. (D) Localization of GFP-Ist2^{T736A/T743A} and Osh6-mCherry, expressed from plasmids in *ist2Δ osh6Δ osh7Δ*. In the schematic representation, X indicates the location of the mutated amino acids. Quantification as in B ($n=60$ cells for each of three independent experiments). Scale bars: 5 μm. Bright field (BF).

IST2-RL^{718–751WT}, which encodes Ist2 with randomized linker region except for the Osh6-interacting sequence at amino acids 718–751 (Fig. 6C,D). In contrast, expression of Ist2-RL or of a short soluble peptide Ist2[705–762], which contains the Osh6-interacting region, did not rescue the PS transport defect of *cho1Δ ist2*^{736–743Δ} cells. We conclude that localization of Osh6 to the ER–PM contact sites via its binding to the conserved region in the Ist2 tail is required for PS transport from the ER to the PM. This is likely also true for the closely related Osh7.

Mapping the Ist2 interaction site on Osh6

Our experiments suggest that Osh6 interacts with the cytosolic tail of Ist2, probably in a direct manner, although we cannot exclude the existence of an intermediate adaptor. We wanted to map the site on Osh6 that is responsible for the interaction with Ist2. Previous work revealed key residues (H157/H158 and L69) that coordinate the lipid ligand inside the binding pocket, and the importance of the N-terminal region (amino acids 1–69), which forms a lid over the binding pocket and regulates Osh6 interaction with lipid membranes (Lipp et al., 2019; Maeda et al., 2013; Moser Von Filseck et al., 2015b). Mutation or deletion of these residues did not affect Osh6–

Ist2 interaction (Fig. S5A,B). Using the yeast two-hybrid assay, we screened 29 new mutants of Osh6 with substitutions in surface-exposed and/or more highly conserved residues (Fig. 7A). Among these mutants, one with substitution of two adjacent amino acids located on the opposite side to the entry of the lipid-binding pocket (D141 and L142) for alanine showed no interaction with Ist2 and rendered Osh6-mCherry cytosolic (Fig. 7B; Fig. S5C). The same was true for Osh6(D141A/L142D), whereas mutation of only one residue (D141A, D141K or L142A), or a weaker substitution (D141K/L142I) were not sufficient to block the Ist2–Osh6 interaction (Fig. S5D). We analyzed the evolution of the Ist2 tail sequence and found that the Osh6-interacting region appears in a monophyletic subgroup of budding yeasts that includes Saccharomycodacea and Saccharomycetaceae (Fig. 7C). Interestingly, comparison with evolutionary conservation of Osh6 sequences reveals what appears to be a conserved region at the surface of the protein that includes D141 and L142 in this yeast subgroup (Fig. 7D). We found an even higher conservation in this region between Osh6 homologs in the whole genome duplication clade, after the Osh6/Osh7 duplication event, in line with our observation that Osh6 and Osh7 both interact with Ist2.

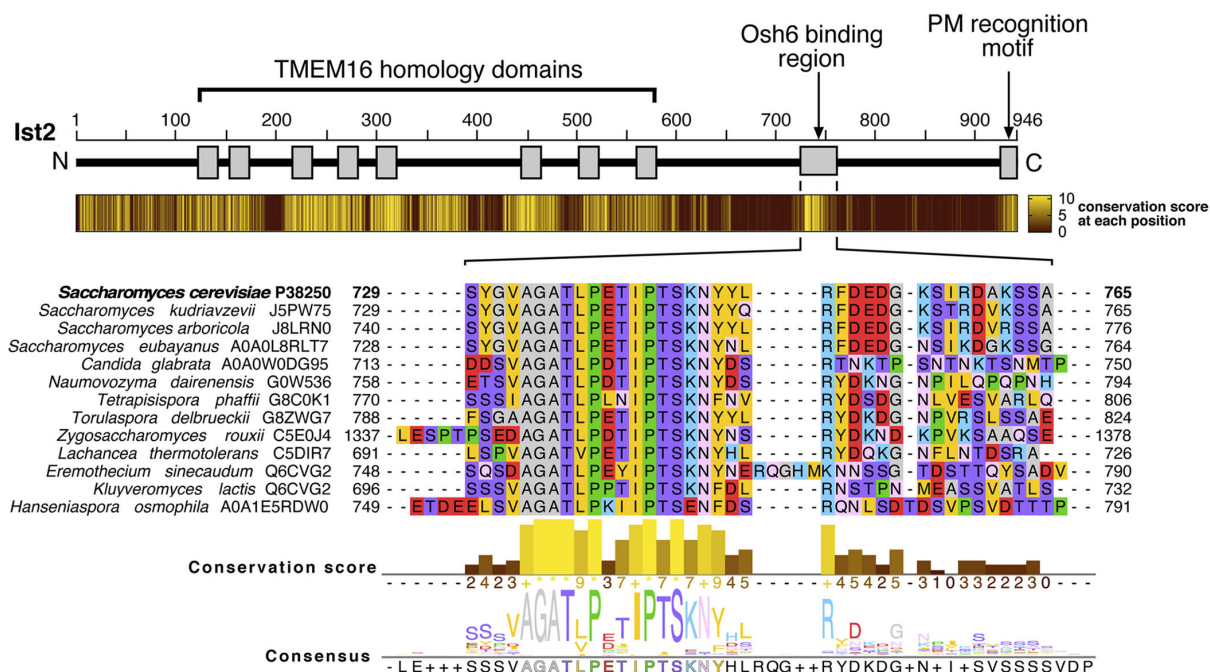


Fig. 3. Detection of a conserved motif in the intrinsically disordered tether of TMEM16 orthologs in budding yeasts. Sequences of TMEM16 orthologs from 62 Saccharomycotina species were aligned. Conservation score from a subset of 34 sequences, which correspond to a monophyletic clade that includes Saccharomycodaceae and Saccharomycetaceae (Shen et al., 2018), is shown on a heatmap as a brown to yellow scale (0 to 11), aligned to a schematic showing the domain structure of Ist2. Thirteen sequences of the conserved Osh6-binding region from the subset of species are shown below, as well as their conservation scores and the consensus Osh6-binding sequence from the whole subset. See Fig. S7 for the full alignment.

Osh6(D141A/L142A), fused to mCherry, was expressed at a similar level as wild-type Osh6–mCherry and was not thermally unstable (Fig. S6A). Full-length GFP–Ist2 extracted from yeast membranes co-immunoprecipitated wild-type Osh6–mCherry but not Osh6(D141A/L142A)–mCherry (Fig. 8A). Co-immunoprecipitation of Osh6–mCherry with Ist2 was specific because we could not detect any mCherry signal when an Ist2 mutant with randomized linker (GFP–Ist2-RL) was used in the pull-down experiment under the same conditions. These results suggest that D141 and L142 residues of Osh6 comprise at least a part of the Ist2-binding site. However, analysis of protein localization suggested that the D141A/L142A substitution did not completely block the interaction between Osh6 and Ist2, as we could still detect some cortical Osh6(D141A/L142A)–mCherry in cells with a higher level of GFP–Ist2 when both proteins were expressed from a plasmid (Fig. S6B). In agreement with this, PS transport was blocked in yeast cells expressing Osh6(D141A/L142A) or Osh6(D141A/L142D) from a low-strength *CYC1* promoter, but PS was still transported to the PM when this mutant was expressed from the intermediate-strength *ADH1* promoter – the promoter used in previous PS transport experiments (Fig. 8B,C; Fig. S6C).

DISCUSSION

High PS concentration is a hallmark of the cytosolic leaflet of the PM and is important for diverse cellular processes, from establishment of cell polarity, signaling and cytoskeleton organization to control of endocytosis and formation of caveolae (Fair et al., 2011; Hiram et al., 2017; Nishimura et al., 2019; Sun and Drubin, 2013; Takano et al., 2008). Identification of proteins that specifically transport PS to the PM in yeast and in mammalian

cells represented an important step towards understanding how this PS enrichment is achieved (Chung et al., 2015; Maeda et al., 2013; Moser Von Filseck et al., 2015b). We now show that in yeast, the TMEM16 homolog Ist2, which acts as an ER–PM tether, is an obligatory partner for efficient transport of PS to the PM by Osh6, and likely also for transport by its close paralog Osh7. Our analysis of fungal sequences suggests a co-evolution of Ist2 and Osh6 binding sites. Importantly, we demonstrate that point mutations in the tail of Ist2 that block the interaction with Osh6 lead to a strong decrease in cellular PS levels, similar to the effects of *osh6Δ osh7Δ* deletion, deletion of all tethering proteins in yeast or deletion of PI4-kinase III α in mammalian cells (Chung et al., 2015; Quon et al., 2018). These results suggest that the transport of PS from the ER to the PM by Osh6/7 is also important for preventing a build-up of PS in the ER membrane and therefore likely represents a major route for PS out of the ER.

In humans, the majority of ORP proteins contain additional targeting domains besides the ORD, with the exception of two truncated isoforms of ORP1 and ORP4, ORP1S and ORP4S (Raychaudhuri and Prinz, 2010). Few studies have looked at the function of these soluble isoforms (Charman et al., 2014; Jansen et al., 2011; Wang et al., 2019). In yeast, members of the family containing only an ORD are more common; besides Osh6 and Osh7, the related sterol/PI4P transporter Osh4 and its close paralog Osh5 (also known as Hes1) also consist only of an ORD. Crystal structures of Osh4 and Osh6 show that these ORDs are quite large and, in addition to the core β -barrel that encapsulates a lipid molecule, contain segments that could perform other functions (de Saint-Jean et al., 2011; Im et al., 2005; Maeda et al., 2013; Moser Von Filseck et al., 2015b). We have identified a patch on the surface

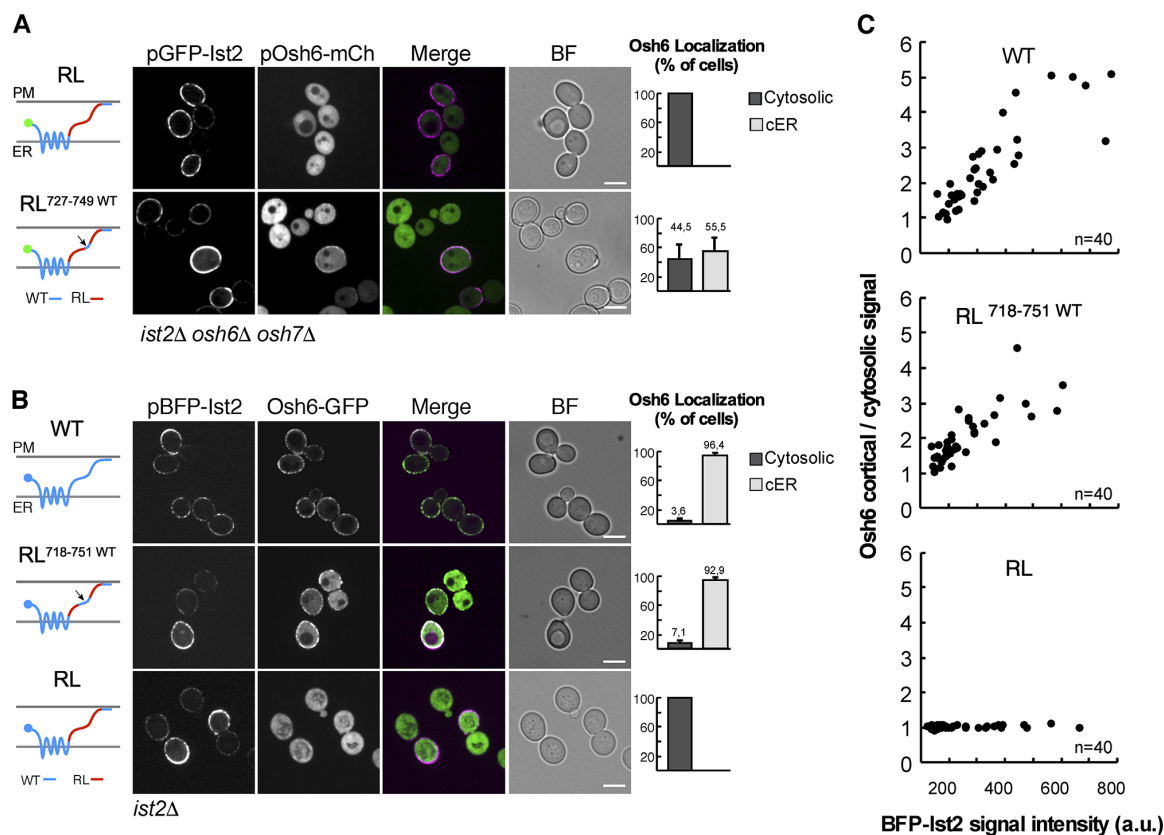


Fig. 4. An Osh6 binding site in the Ist2 tail is sufficient for localizing Osh6 to ER-PM contact sites. (A) Localization of GFP-Ist2-RL (randomized linker, amino acids 596–917) or GFP-RL^{727–749}WT (amino acids 727–749 in RL replaced with the corresponding wild-type Ist2 sequence) and Osh6-mCherry, expressed from plasmids in *ist2Δ osh6Δ osh7Δ* cells. (B) Localization of plasmid-borne blue fluorescent protein (BFP) fusions BFP-Ist2, BFP-Ist2-RL^{718–751}WT (amino acids 718–751 from wild-type Ist2 in RL) or BFP-Ist2-RL and chromosomally-tagged Osh6-GFP in *ist2Δ* cells. Graphs in A and B show fraction of cells with visible cortical ER (cER) Osh6 signal versus only cytosolic signal. The bars show mean±s.e.m. from three independent experiments ($n=60$ cells for each experiment). Diagrams in A and B show schematics of fusion protein mutants. (C) Quantification of Osh6 peripheral/cytosolic signal as a function of BFP-Ist2 fluorescence in BFP-Ist2-, BFP-Ist2-RL^{718–751}WT-, and BFP-Ist2-RL-expressing cells shown in B. Each symbol represents one cell ($n=40$). Graph shows a representative of three independent experiments. Scale bars: 5 μ m. Bright field (BF).

of Osh6 that participates in interaction with Ist2. This is the first time that an interaction between an ORD and another protein has been clearly demonstrated. We predict that many more such interactions should exist in the cell to regulate the localization or function of ORP/Osh proteins. For example, a recent study has identified a phosphorylated loop in the ORD of ORP4 that regulates the association of ORP4 with intermediate filaments (Pietrangelo and Ridgway, 2019).

Why is it important to localize Osh6 to contact sites? Endogenously-tagged Osh6 can be observed both in the cytosol

as well as at the cortical ER; however, our results show that cortical localization of Osh6, albeit at a low level, is necessary for lipid transport between the ER and the PM. Interestingly, we observed an accumulation of the PS reporter C2_{Lact}-GFP at the ER when Osh6 was cytosolic due to disruption of its binding site on Ist2, suggesting that PS was not being extracted from the ER. It has been proposed that the main advantage of localizing LTPs to membrane contact sites is to increase the fidelity of lipid targeting (Hanada, 2018). However, our results point to the importance of LTP localization for efficient lipid transfer.

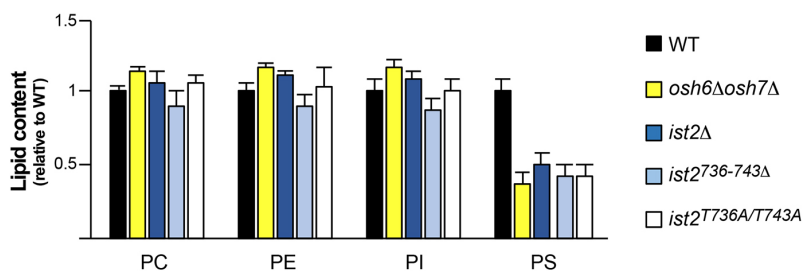


Fig. 5. Mutations in the Ist2 tail decrease steady-state levels of PS. Lipidomic analysis of wild-type (WT), *osh6Δ osh7Δ*, *ist2Δ*, *ist2^{736-743Δ}* (chromosomal deletion of 8 codons) and *ist2^{T736A/T743A}* (chromosomal substitutions) cells. Lipid content is expressed relative to WT levels. Data are mean±s.d. from three independent samples. The experiment was repeated two or three times, depending on strain, with similar results.

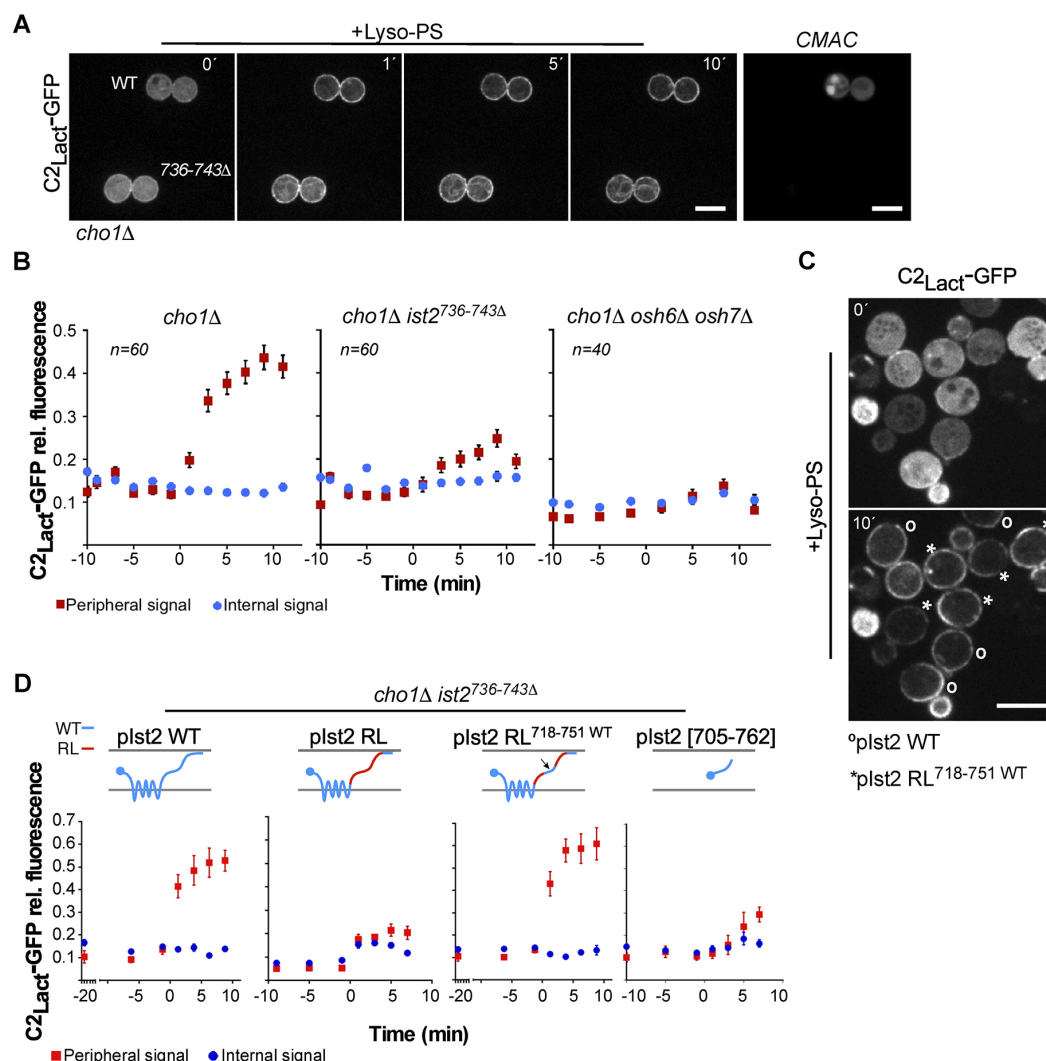


Fig. 6. Binding of Osh6 to the disordered tail of Ist2 is required for PS transport to the PM. (A) Redistribution of $C2_{Lact}$ -GFP in $cho1\Delta ist2^{736-743\Delta}$ yeast, which lacks endogenous PS, after addition of 18:1 lyso-PS, compared to a $cho1\Delta IST2$ -WT control, imaged simultaneously. The control strain was labeled with the vacuolar dye CMAC (right panel) prior to imaging. Images were taken every 2 min. The first panel ($t=0'$) shows the last time-point before $C2_{Lact}$ -GFP signal transition. The absolute timing of this event varied between experiments (10–20 min) due to instability of the lyso-PS suspension. (B) Quantification of $C2_{Lact}$ -GFP fluorescence over time from experiments as described in A, with control and a mutant strain imaged simultaneously, in $cho1\Delta, cho1\Delta ist2^{736-743\Delta}$ and $cho1\Delta osh6\Delta osh7\Delta$. Peripheral signal (red) consists of signal from the ER and PM; internal signal (blue) consists mostly of ER signal. Data are mean \pm s.e.m. from three independent experiments (20 cells per experiment). (C) $C2_{Lact}$ -GFP fluorescence in $cho1\Delta ist2^{736-743\Delta}$ cells with plasmid-borne BFP-Ist2 wild type ($^{\circ}$) or pBFP-Ist2 RL^{718-751WT} (*) after addition of lyso-PS at the indicated time points (as defined in A). BFP-Ist2 wild-type cells were labeled with CMAC (not shown). (D) Quantification of $C2_{Lact}$ -GFP fluorescence, as in B, in $cho1\Delta ist2^{736-743\Delta}$ cells expressing Ist2 wild type (WT), Ist2-RL, Ist2-RL^{718-751WT} or an Ist2 fragment consisting of amino acids 705–762. Diagrams show positions of the Ist2 mutations. Data are mean \pm s.e.m. ($n=15$ cells) from a representative of three independent experiments. Scale bars: 5 μ m.

Only a small portion of the Ist2 tail is involved in binding to Osh6; what then is the function of the rest of the tail? Although the Ist2 tail sequence is not conserved between fungal species, its length is generally high, far surpassing the length of an unfolded sequence that would be needed to traverse the width of ER–PM contacts. Such a long tail could provide flexibility for the different steps of lipid transfer. The Ist2-interaction region on the surface of Osh6 lies on the opposite side of the molecule than the entrance to the lipid binding pocket, suggesting that, even when bound to Ist2, Osh6 could transiently interact with the ER and the PM to extract/deliver

its lipid ligands. The disordered Ist2 sequence could be important for regulating the dynamics of Osh6/7 within the crowded space of a membrane contact site, as has been recently shown for disordered sequences upstream of the ORDs of some mammalian ORPs (Jamecna et al., 2019).

Finally, it is intriguing that the membrane-embedded portion of Ist2 bears structural homology to the mammalian TMEM16 family of proteins, many of which have been shown to function as Ca^{2+} -activated lipid scramblases and/or ion channels in the PM or possibly in the ER (Bushell et al., 2019; Falzone et al., 2018; Jha

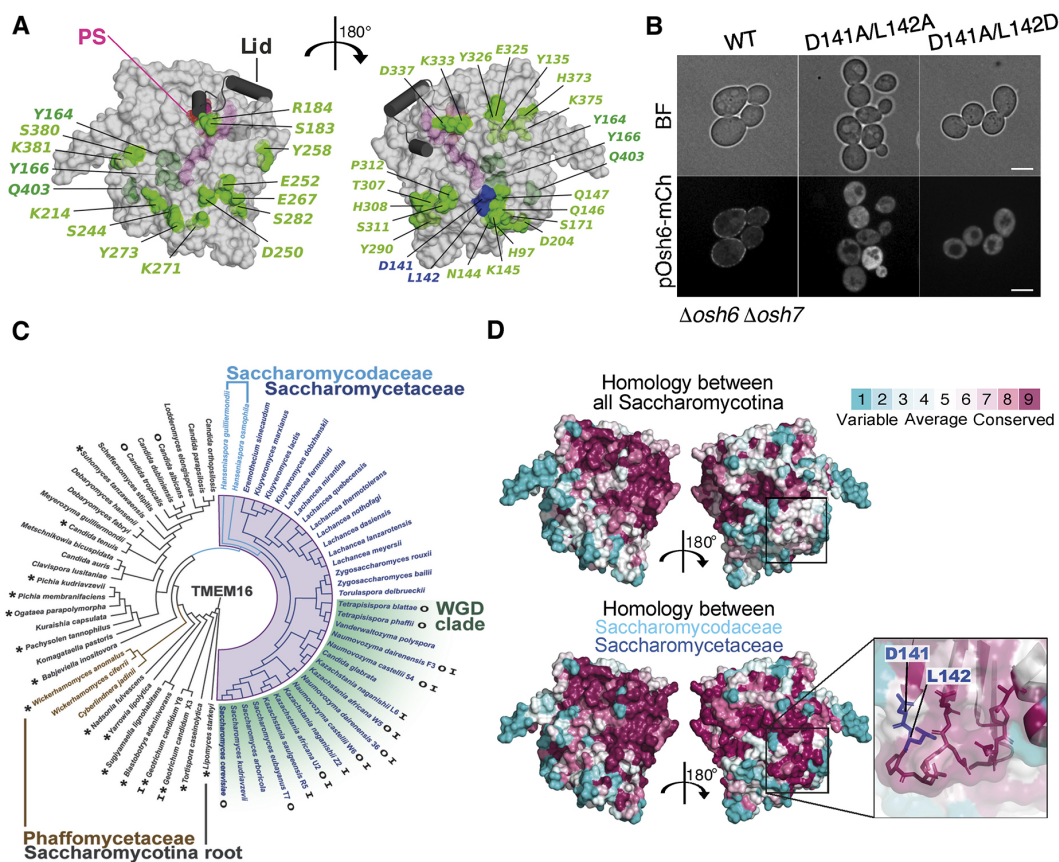


Fig. 7. Identification of a conserved patch on Osh6 that interacts with the Ist2 tail region. (A) Structure of Osh6 (PDB:4B2Z) showing the positions of amino acids that were mutated (one or two at a time) in the yeast two-hybrid assay with Ist2 (amino acids 590–878) as bait. Substitution of amino acids highlighted in green did not affect the interaction, amino acids highlighted in blue affected the interaction. The PS binding site is indicated (PS). (B) Localization of Osh6–mCherry wild type (WT), Osh6^{L141A/D142A} and Osh6^{L141A/D142D} expressed from a plasmid in *osh6Δ osh7Δ* cells; representative images from three or more independent experiments are shown. Scale bars: 5 μm. (C) Evolutionary tree of TMEM16 homologs in Saccharomycotina. Species in blue (Saccharomycodaceae and Saccharomycetaceae monophyletic clades) contain orthologs with the conserved Osh6-binding region. The Osh6-binding motif first appears in the Phaffomycetaceae paraphyletic group (brown color). Species in dark gray lack this motif. Asterisks indicate species with TMEM16 proteins that have a short cytosolic tail (<80 amino acids). A clade that has undergone whole genome duplication (WGD) is highlighted in green and species with two *OSH6* genes (O) or two *IST2* genes (I) are indicated. See Fig. S7 for details of alignment. (D) Osh6 surface representation showing the degree of amino acid conservation considering all sequences shown in C or only sequences from the Saccharomycetaceae and Saccharomycodaceae clades. The expanded inset shows the position of the aspartate and leucine residue (in blue) required for interaction with Ist2.

et al., 2019). PS is synthesized exclusively on the cytosolic side of the ER (Chauhan et al., 2016), but was proposed to be enriched in the luminal leaflet at steady state, although this was recently put under question (Fair et al., 2011; Tsuji et al., 2019). Lipid scrambling would be another way to regulate the size of the PS pool available for transport by a cytosolic LTP. When reconstituted into liposomes, Ist2 did not display any lipid scrambling activity (Malvezzi et al., 2013). Nevertheless, it is tempting to speculate that there might be functional coupling between the ER-embedded portion of Ist2 and its tail that anchors Osh6 and enables PS transport.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and manipulations

Yeast manipulations were performed using standard methods and growth conditions (Dunham et al., 2015). Yeast strains are listed in Table S2. Gene deletion and tagging were performed by homologous recombination and confirmed by PCR on genomic DNA. Yeast strains MdPY04 (*ist2*^{736–743Δ}),

MdPY07 (*cho1Δ ist2*^{736–743Δ}), and MdPY06 (*ist2*^{T736A/T743A}), were generated by CRISPR/Cpf1-mediated genomic editing (Świat et al., 2017). Briefly, BY4742 or *cho1Δ* cells were transformed with pUDC175 coding the bacterial DNA-endonuclease fnCpf1 that mediates RNA-guided DNA cleavage at targeted genomic sites (Table S3). Then, fnCpf1-carrying cells were transformed with pJMD_26 encoding a specific crRNA targeting the *IST2* gene (CTTTACCAGAAACAATTCCAACATC), and a 100 bp homologous DNA fragment surrounding the target sequence for deletion of codons 736 to 743 (MdPY04 and MdPY07) or to introduce mutations T736A and T743A (MdPY06). Cells were plated in synthetic dropout (SD) selective medium (Dunham et al., 2015) lacking uracil and colonies were checked by PCR and sequencing. Before experiments, cells were grown in YPD until both plasmids (pJMD_26 and pUDC175) were lost.

Plasmid construction

All plasmids used in this study are listed in Tables S3 and S4. A QuikChange site-directed mutagenesis kit (Agilent) was used for generating point mutations in plasmids. Briefly, PCR amplification of plasmids using overlapping oligonucleotides carrying the desired mutation was performed

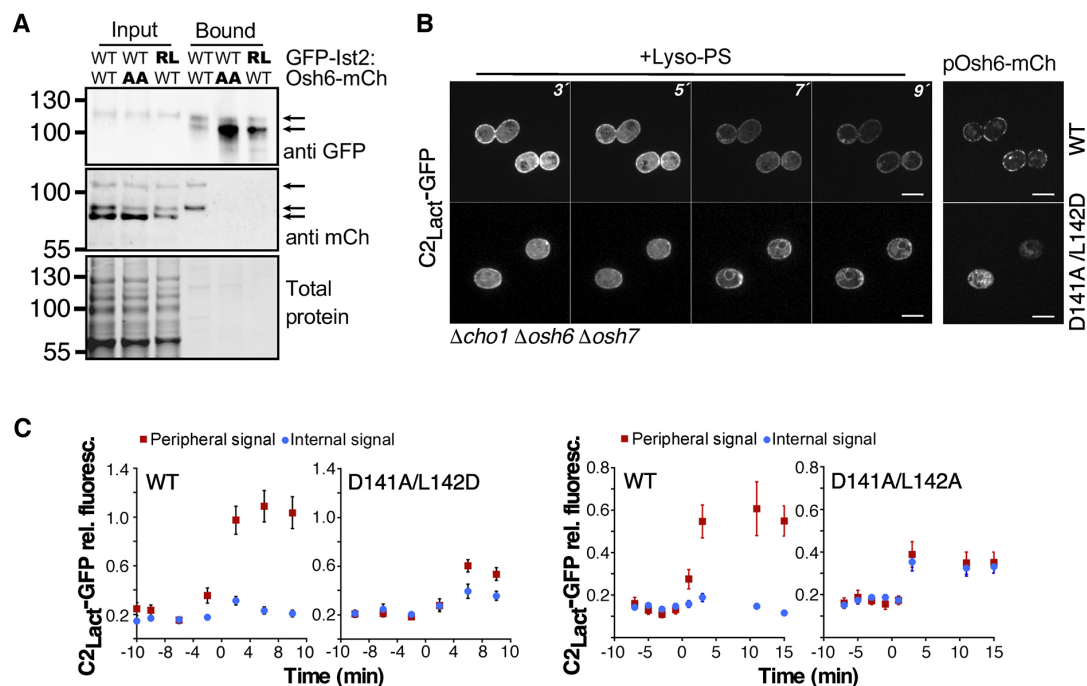


Fig. 8. Osh6 D141/L142 mutants have decreased interaction with Ist2 and PS transport. (A) Co-immunoprecipitation of GFP-Ist2 and Osh6-mCherry variants from *osh6Δ osh7Δ ist2Δ* cells. Lysates of cells expressing wild-type GFP-Ist2 (WT) or GFP-Ist2-RL (randomized linker) and wild-type Osh6-mCherry (WT) or D141A/L142A mutant (AA) were incubated with anti-GFP-magnetic beads, and analyzed by western blotting. For input, 0.3 OD₆₀₀ equivalents were loaded for each sample. The bound fractions are ~35 times more concentrated than input for mCherry detection and ~5 times more concentrated for GFP detection. GFP-Ist2 and Osh6-mCherry-specific bands are indicated with arrows. Note that some degradation of GFP-Ist2 (predicted size 135 kDa) likely occurred during purification. The predicted size of Osh6-mCherry is ~80 kDa; the two faster-migrating bands may differ in post-translational modification. The experiment was repeated more than three times. (B) Imaging of C2_{Lact}-GFP over time in *cho1Δ osh6Δ osh7Δ* cells (depleted for PS) expressing Osh6-mCherry WT or D141A/L142D from the low-level *CYC1* promoter, after addition of lyso-PS. (C) Quantification of C2_{Lact}-GFP fluorescence peaks (peripheral and internal signals) over time in experiments with cells expressing Osh6-WT or D141A/L142D, or Osh6-WT or D141A/L142A, as shown in B. Data are mean±s.e.m. (*n*=15 cells) from one of two independent experiments. Scale bars: 5 μm.

according to the manufacturer's instructions. An *In-Fusion* HD Cloning Plus kit (Takara Bio) was used, according to the supplier instructions, to generate the following plasmids: BFP-tagged Ist2-expressing plasmids pJMD_07, pJMD_08 and pJMD_21; pJMD_01 (GFP-Ist2RL^{729-747wt}), made by replacement of codons 729 to 747 in the randomized linker of pAK76 (a gift from Liesbeth Veenhof, University of Groningen, The Netherlands) with the corresponding *IST2* wild-type sequence; similarly, pJMD_12 (BFP-IstRL^{718-751wt}) was generated by replacing codons 718 to 751 in the randomized linker of pJMD_21 with the corresponding *IST2* wild-type sequence. To generate plasmids used in the yeast two-hybrid assay (Table S4), *OSH4*, *OSH6* and *OSH7* ORFs and parts of the *IST2* coding sequence were cloned into the BamHI and XhoI restriction sites of pGADT7 or pGBKT7 (Clontech) using a Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Fisher Scientific). All plasmids were checked by DNA sequencing.

Yeast two-hybrid assay

For testing protein-protein interactions, the Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 was used according to the manufacturer's instructions (Clontech). Briefly, yeast strain AH109 (James et al., 1996) was transformed with plasmids pGBKT7(*TRP1*) and pGADT7(*LEU2*) encoding the two proteins of interest fused to GAL4 DNA-binding domain (bait) or GAL4 activation domain (prey) (Table S4). Interaction between bait and prey initiates transcription of *HIS3* and *ADE2* (controlled by *GAL1* and *GAL2* promoters, respectively), allowing growth in restrictive media. Yeast cells were grown for 14–18 h at 30°C, and 10-fold serial dilutions were plated on SD agar plates lacking leucine and tryptophan (control), leucine, tryptophan

and histidine (No His), and leucine, tryptophan, histidine and adenine (No His/Ade). Cells were incubated for 3–5 days at 30°C before growth evaluation.

BiFc

Osh6 and Osh7 were tagged with VN at their chromosomal loci in the BY4741 background using pFa6-VN::His3, and Ist2 was tagged in BY4742 with VC using pFa6-VC::kanMX (Sung et al., 2008). After mating and selection of the diploids on plates -Met -Lys, cells were grown to mid-logarithmic phase in SD medium at 30°C. Cells were mounted in the appropriate culture medium and imaged at room temperature with a motorized BX-61 fluorescence microscope (Olympus) equipped with a PlanApo 100× oil-immersion objective (1.40 NA; Olympus), a QiClick cooled monochrome camera (QImaging) and the MetaVue acquisition software (Molecular Devices). BiFc signals were visualized using a GFP filter set (41020 from Chroma Technology Corp.; excitation HQ480/20×, dichroic Q505LP, emission HQ535/50 nm). Alternatively (for images shown in Fig. 1), cells were imaged using a spinning-disk confocal system, as described below.

Fluorescence microscopy

Yeast cells were grown for 14–18 h at 30°C in appropriate SD medium to maintain plasmid selection. When *cho1Δ*, *cho1Δ osh6Δ osh7Δ*, *cho1Δ ist2^{736-743Δ}* strains were grown, SD medium was supplemented with 1 mM ethanolamine. Cells were harvested by centrifugation in mid-logarithmic phase (OD₆₀₀=0.5–0.8) and prepared for viewing on glass slides when assessing protein localization at steady state. In the case of time-course

experiments, visualization of C2_{Lact}-GFP was performed using a microfluidics chamber (see below). When indicated, vacuolar staining was obtained by incubating cells with 100 μ M CMAC (Life Technologies) for 10 min, after which the cells were washed twice before observation. Imaging was performed at room temperature, all images in this study (except BiFC shown in Fig. S2C, see above) were taken with an Axio Observer Z1 microscope (Zeiss), equipped with an oil immersion plan apochromat 100 \times objective NA 1.4, an sCMOS PRIME 95 camera (Photometrics) and a spinning-disk confocal system CSU-X1 (Yokogawa). GFP-tagged proteins, mCherry-tagged proteins and CMAC/BFP-tagged proteins were visualized with a GFP Filter 535AF45, RFP Filter 590DF35 and DAPI Filter 450QM60, respectively. BiFC signals were also visualized with the GFP filter. Images were acquired with MetaMorph 7 software (Molecular Devices). Images were processed with ImageJ (NIH, MD) and with Canvas Draw (canvas X) for levels.

Cellular PS transport assay

The cellular distribution of PS in cells lacking *CHO1* after the addition of exogenous lyso-PS was performed as described previously (D'Ambrosio et al., 2019; Moser Von Filseck et al., 2015b). Briefly, 18:1 lyso-PS (1-oleoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine, Avanti Polar Lipids), was dried under argon and resuspended in SD medium to 54 μ M lyso-PS by vortexing and heating to 37°C. The lyso-PS suspension was always prepared fresh, maintained at room temperature and used within 1–3 h after preparation. The PS transport assay was carried out using a Microfluidic Perfusion Platform (ONIX) driven by the interface software ONIX-FG-SW (Millipore). Strains *cho1 Δ* , *cho1 Δ osh6 Δ osh7 Δ* (a gift from A.-C. Gavin, EMBL) and *cho1 Δ ist2^{736–743 Δ}* , transformed with pC2_{Lact}-GFP and other plasmids, as indicated, were injected into a YO4C microfluidics chamber and maintained in a uniform focal plane. We always imaged two strains simultaneously to control for small differences between experiments due to variability in the stability of the lyso-PS suspension, which is difficult to control (D'Ambrosio et al., 2019). For this, we stained one of the two strains with CMAC as described above just before imaging, then mixed the strains at a ratio 1:1 before injecting them in the chamber. Normal growth conditions were maintained by flowing cells with SD medium or SD medium containing lyso-PS at 3 psi. Cells were imaged every 2 min over a total time of 30–40 min, starting when lyso-PS-containing medium was injected into the system. Cells were imaged in five *z*-sections separated by 0.7 μ m, afterwards manually selecting for the best focal plane, in order to correct for any focal drift during the experiment. Usually we imaged cells in four different fields of 840 \times 1140 pixels.

Image analysis

All image analysis was done using ImageJ (NIH, MD). Quantification of Osh6 distribution between cortical and cytosolic localization was performed manually, by counting the cells in which some enrichment of cortical Osh6 fluorescence could be observed, versus cells where Osh6 signal was uniformly cytosolic. Quantification of Osh6-mCherry distribution as a function of GFP-Ist2 or BFP-Ist2 fluorescent signal was performed by profiling cell signal intensity across two transverse lines that were manually placed on a single *z*-section of each cell in the Ist2 fluorescence channel. Ist2 fluorescence was calculated as the mean of four peripheral fluorescence peaks. The same lines were used to measure peripheral fluorescence of Osh6-mCherry in the red channel, divided by the average internal (cytosolic) fluorescence after subtraction of background fluorescence.

Steady-state distribution of C2_{Lact}-GFP was analyzed on a single *z*-section of each cell. Using the wand (tracing) tool, the external limit of the cell (perimeter) was selected and total cell fluorescence was measured. Subsequently, internal fluorescence was measured after reducing the cell perimeter using the enlarge function of ImageJ with pixel parameter set to -7 . Peripheral fluorescence (difference between total and internal fluorescence) was normalized to total fluorescence and plotted as 'peripheral signal'.

Quantification of peripheral peaks (mostly PM and cortical ER signal) and internal (mostly perinuclear ER) was performed by profiling cell signal intensity across a transversal line drawn in the cell. Intensities of the peaks were quantified and normalized relative to the total signal. The cell profile

(peripheral and internal peaks) was followed and quantified over time of the experiment. Time=0 was set as the point in which C2_{Lact}-GFP distribution in wild-type cells starts changing (moving from cytosolic to internal and peripheral localization).

Data were processed in Excel and plotted using KaleidaGraph 4.5 (Synergy Software). We carried out statistical analysis using KaleidaGraph. To compare the means of multiple groups, we used one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons.

Preparation of yeast protein extracts

Yeast cultures used were grown overnight in appropriate SD medium to mid-logarithmic phase. One OD₆₀₀ equivalent of yeast cells was mixed with TCA (10% final concentration) for 10 min on ice to precipitate proteins, centrifuged at 16,000 *g* for 10 min at 4°C, and mechanically disrupted with glass beads using a vortex for 10 min at 4°C. Lysates were transferred to a fresh tube and centrifuged again. The protein pellets were washed twice with ice-cold acetone, dried and resuspended in 50 μ l of sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% Bromophenol Blue and 10% glycerol), complemented with 50 mM Tris base. Protein samples were heated at 55°C for 10 min and 10 μ l was loaded on SDS-PAGE (4–20% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free, Bio-Rad) and analyzed by western blotting.

Immunoprecipitation of Ist2-GFP

To check interaction between Osh6-mCherry and GFP-Ist2 in cells, we immunoprecipitated GFP-Ist2 from strain ACY406 (*ist2 Δ osh6 Δ osh7 Δ*) transformed with pAK75 (GFP-Ist2) and pOsh6-mCherry, or plasmids expressing GFP-Ist2 and Osh6-mCherry mutants. A total of 60 OD₆₀₀ equivalents of yeast cells were grown to mid-logarithmic phase in SD medium at 30°C, washed with distilled water and snap-frozen in liquid nitrogen. Yeast pellets were resuspended in 2 \times 500 μ l of ice-cold lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% NP-40 and 1 mM EDTA) containing protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche Life Sciences), 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich) and phosphatase inhibitors (PhosSTOP, Roche). Cells were mechanically disrupted with glass beads using a vortex for 8 min at 4°C. The lysates were centrifuged at 3000 *g* for 5 min at 4°C and the supernatants were collected. For each supernatant, 50 μ l was diluted to 1 ml and precipitated with 10% TCA (for Input); the rest was incubated with 15 μ l of GFP-Trap_MA magnetic agarose beads (ChromoTek GmbH, Planegg-Martinsried, Germany), prewashed with lysis buffer, for 2.5 h at 4°C. The beads were collected using a magnetic rack and washed three times in 1 ml of lysis buffer. Finally, they were resuspended in 50 μ l of sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6% SDS and 0.01% Bromophenol Blue) and then incubated for 10 min at 37°C. TCA-precipitated samples were incubated on ice for >10 min and centrifuged at 16,000 *g* for 10 min at 4°C. The pellets were washed twice with 500 μ l of ice-cold acetone, resuspended in 50 μ l of sample buffer with urea (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM DTT, 3% SDS, 3 M urea, 0.1% Bromophenol Blue and 10% glycerol) complemented with 50 mM Tris base, vortexed and incubated for 10 min at 37°C. Samples (10 μ l for input and bound fractions for mCherry detection, 1.5 μ l for bound fraction for GFP detection) were loaded on SDS-PAGE (4–20% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free, Bio-Rad) and analyzed by western blotting.

Western blot analysis

After electrophoresis, total proteins were visualized in the TGX Stain-Free gels (Bio-Rad) after 1 min UV-induced photoactivation with a Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad). Proteins were then transferred onto a nitrocellulose membrane. GFP-Ist2 was detected with a rabbit polyclonal anti-GFP antibody (Thermo Fisher Scientific, A11122, 1:5000 dilution), and Osh6-mCherry was detected with a rabbit polyclonal anti-RFP antibody (Thermo Fisher Scientific, 10041338, 1:1500 dilution). Horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies were from Sigma-Aldrich (anti-mouse, A5278; anti-rabbit, A6154; both used at 1:5000 dilution). Chemiluminescence signals were acquired using a Gel Doc EZ Imager.

Osh6-TAP purification

Osh6 was tagged with a TAP epitope at its chromosomal locus in the BY4741 background using the plasmid pYM13 (Janke et al., 2004). Two

liters of BY4741 and Osh6–TAP cells were grown overnight at 30°C to an OD₆₀₀ of 0.7. The cultures were centrifuged at 2500 g for 5 min. Cell pellets were washed once with cold sterile water and resuspended in 4.5 ml of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF and Complete protease inhibitor cocktail; Roche) and lysed twice with high pressure (1200 psi) at –80°C using a cell breaker (Carver, Inc.). Lysates were cleared by centrifugation and the cleared lysates were incubated with 30 µl of IgG-coupled magnetic beads (Dynabeads; Thermo Fisher Scientific) for 1 h at 4°C. Beads were collected with a magnetic rack and washed three times in 1 ml lysis buffer containing 0.5% Triton X-100 and then twice in the same buffer without detergent. Beads were then resuspended in 400 µl of lysis buffer and 10 µl of ActEV (Invitrogen) was added and incubated at 18°C overnight. Beads were discarded using a magnet, eluted proteins were divided into two tubes and precipitated using chloroform/methanol. One pellet was resuspended in 15 µl sample buffer, heated at 95°C for 5 min and loaded on a NuPAGE 4–12% gradient polyacrylamide gel. The other pellet was used for mass spectrometry.

Proteomic analysis by mass spectrometry

Proteins were digested overnight at 37°C in 20 ml of 25 mM NH₄HCO₃ containing sequencing-grade trypsin (12.5 mg/ml, Promega). The resulting peptides were sequentially extracted with 70% acetonitrile and 0.1% formic acid. Digested samples were acidified with 0.1% formic acid. All digests were analyzed using an Orbitrap Fusion equipped with an EASY-Spray nano-electrospray ion source and coupled to an Easy nano-LC Proxeon 1000 system (all from Thermo Fisher Scientific). Chromatographic separation of peptides was performed with the following parameters: Acclaim PepMap100 C18 precolumn [2 cm, 75 mm inner diameter (i.d.), 3 mm, 100 Å], Pepmap-RSLC Proxeon C18 column [50 cm, 75 mm i.d., 2 mm, 100 Å], 300 nl/min flow, using a gradient rising from 95% solvent A (water, 0.1% formic acid) to 40% B (80% acetonitrile, 0.1% formic acid) in 120 min, followed by a column regeneration of 20 min, for a total run of 140 min. Peptides were analyzed in the Orbitrap in full-ion scan mode at a resolution of 120,000 [at *m/z* (mass/charge ratio) 200] and with a mass range of *m/z* 350 to 1550 and an AGC target of 2×10⁵. Fragments were obtained by higher-energy C-trap dissociation activation with a collisional energy of 30% and a quadrupole isolation window of 1.6 Da. Tandem mass spectrometry (MS/MS) data were acquired in the linear ion trap in a data-dependent mode, in top-speed mode with a total cycle of 3 s, with a dynamic exclusion of 50 s and an exclusion duration of 60 s. The maximum ion accumulation times were set to 250 ms for MS acquisition and 30 ms for MS/MS acquisition in parallelization mode. Data were processed with Proteome Discoverer 1.4 software (Thermo Fisher Scientific) coupled to an in-house Mascot search server (Matrix Science; version 2.4). The mass tolerance of fragment ions was set to 7 ppm for precursor ions and 0.5 Da for fragments. Identification of tryptic peptides related to proteins were performed on *Saccharomyces cerevisiae* taxonomy from the Swissprot database. Q-values of peptides were calculated using the percolator algorithm, and a 1% filter was applied as a false-discovery rate threshold.

Lipidomic analysis by mass spectrometry

Sample preparation was carried out according to Klose et al. (2012). In short, BY4247, *osh6Δosh7Δ*, *ist2Δ*, *ist2^{736-743A}*, *ist2^{T736A/T743A}* cells were grown in triplicates in Erlenmeyer flasks (180 rpm, 30°C) until OD₆₀₀ ~0.5 was reached. The equivalent of ten OD₆₀₀ units of cells were centrifuged (3 min, 5000 g) and washed twice with 155 mM ammonium bicarbonate. The supernatant was discarded and pellets were snap-frozen in liquid nitrogen and kept at –80°C until lipid extraction.

Lipids were extracted according to a modified Bligh and Dyer protocol (Bligh and Dyer, 1959). The yeast pellet was collected in a 1.5 ml Eppendorf tube and 200 µl of water was added. After vortexing (30 s), the sample was transferred to a glass tube containing 500 µl of methanol and 250 µl of chloroform. The mixture was vortexed for 30 s and centrifuged (1000 g, 4°C, 10 min). Then 300 µl of the organic phase was collected in a new glass tube and dried under a stream of nitrogen. The dried extract was resuspended in 60 µl of methanol/chloroform 1:1 (v/v) and transferred in an injection vial.

Reverse phase liquid chromatography was selected for separation with an UPLC system (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific). Lipid extracts were separated on an Accucore C18 150×2.1, 2.5 µm column (Thermo Fisher Scientific) operated at 400 µl/min flow rate. The injection volume was 3 µl. Eluent solutions were acetonitrile/H₂O 50/50 (v/v) containing 10 mM ammonium formate and 0.1% formic acid (solvent A) and isopropanol/acetonitrile/H₂O 88/10/2 (v/v) containing 2 mM ammonium formate and 0.02% formic acid (solvent B). The step gradient of elution was in percentage of solvent B: 0.0 min, 35%; 4.0 min, 60%; 8.0 min, 70%; 16.0 min, 85%; 25.0 min, 97%. The UPLC system was coupled with a Q-exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific); equipped with a heated electrospray ionization (HESI) probe. This spectrometer was controlled by Xcalibur software and operated in electrospray positive mode. MS/MS data were acquired with dd-MS2 mode at a resolution of 70,000 for MS and 35,000 for MS2 (200 *m/z*) and a normalized collision energy (NCE) of 25 and 30 eV. Data were reprocessed using Lipid Search 4.1.16 (Thermo Fisher Scientific). The product search mode was used and the identification was based on the accurate mass of precursor ions and MS2 spectral pattern.

Sequence alignment and phylogeny of Ist2

A first set of sequences from the Saccharomycotina subphylum (Tax ID: 147537) and corresponding to TMEM16 homologs (IPR007632) was retrieved from the InterPro database (Finn et al., 2017). We obtained 68 sequences belonging to 62 species. Sequences were aligned using MAFFT (E-INS-I) algorithm (Katoh et al., 2019) with the default parameters of the Jalview program (v2.11.0) (Waterhouse et al., 2009). One duplicated homolog from *Kazachstania saulgeensis* was deleted (see Fig. S7). A phylogenetic inference was done using the maximum likelihood method PhyML (-LG matrix, aLRT (SH-like) branch support, BIONJ and NNI for tree searching) (Guindon et al., 2010). The tree was displayed and formatted on FigTree v1.4.4 and *Lipomyces starkeyi* was selected as the rooting taxa. In order to display the highly conserved region that interacts with Osh6/Osh7, sequences were ordered on Jalview according to the phylogeny of Saccharomycotina (Shen et al., 2018), and we deleted sequences that do not belong to the monophyletic group including Saccharomycetaceae and Saccharomycodaceae, as indicated by our phylogenetic tree. The alignment conservation scores for each residue position of Ist2 were extracted from this subset and were displayed as a heatmap using Prism 8.3 (GraphPad Software). See Fig. S7 for the full alignment.

Sequence alignment and structural analysis of Osh6

A second set of Osh6/Osh7 homolog sequences [i.e. containing the LPTFILE motif, as previously described by Maeda et al. (2013)] were retrieved from the same 62 Saccharomycotina species. The resulting 70 sequences of Osh6/Osh7 homologs were aligned using MAFFT-G-INS-I with BLOSUM 80 matrix. Alignments were subsequently analyzed using Jalview. Amino acid evolution rate was calculated using ConSurf upon an Osh6 structure (PDB:4PH7_D) and using maximum likelihood method with -LG Matrix (Ashkenazy et al., 2016). ConSurf results were displayed using Pymol software (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

Acknowledgements

We thank E. Sajovic, A. Dubois, G. Žun and U. Petrovič for help with experiments, and A.-C. Gavin, and L. Veenhoff for strains and plasmids. We acknowledge the IJM ImagoSeine facility, member of IBISA and the France-Biolmaging infrastructure (ANR-10-INBS-04), the IJM Proteomics facility [supported by the Region Ile-de-France (SESAME), the Paris-Diderot University (ARS), and CNRS], and B. Antonny, S. Leon and members of the Jackson–Verbavatz team for helpful discussions.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: V.A., G.D., A.Č.; Methodology: J.M.D., V.A., N.-F.L., D.D., G.D., A.Č.; Validation: J.M.D., V.A., N.-F.L., L.F., D.D., A.Č.; Formal analysis: J.M.D., N.-F.L., L.F., A.Č.; Investigation: J.M.D., V.A., N.-F.L., L.F., A.Č.; Resources: J.M.D., V.A., A.Č.; Data curation: L.F.; Writing - original draft: J.M.D., A.Č.; Writing - review &

editing: V.A., N.-F.L., G.D., A.Č.; Visualization: J.M.D., N.-F.L., A.Č.; Supervision: D.D., G.D., A.Č.; Project administration: A.Č.; Funding acquisition: G.D., A.Č.

Funding

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE13-0006), and by a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique to N.-F.L.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.243733.supplemental>

Peer review history

The peer review history is available online at <https://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.243733.reviewer-comments.pdf>

References

- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T. and Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.* **44**, W344-W350. doi:10.1093/nar/gkw408
- Babu, M., Vlasblom, J., Pu, S., Guo, X., Graham, C., Bean, B. D. M., Burston, H. E., Vizeacoumar, F. J., Snider, J., Phanse, S. et al. (2012). Interaction landscape of membrane-protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **489**, 585-589. doi:10.1038/nature11354
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917. doi:10.1139/o59-099
- Brunner, J. D., Lim, N. K., Schenck, S., Duerst, A. and Dutzler, R. (2014). X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature* **516**, 207-212. doi:10.1038/nature13984
- Bushell, S. R., Pike, A. C. W., Falzone, M. E., Rorsman, N. J. G., Ta, C. M., Corey, R. A., Newport, T. D., Christianson, J. C., Scofano, L. F., Shintre, C. A. et al. (2019). The structural basis of lipid scrambling and inactivation in the endoplasmic reticulum scramblase TMEM16K. *Nat. Commun.* **10**, 3956. doi:10.1038/s41467-019-11753-1
- Charman, M., Colbourne, T. R., Pietrangelo, A., Kreplak, L. and Ridgway, N. D. (2014). Oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 4 (ORP4) is essential for cell proliferation and survival. *J. Biol. Chem.* **289**, 15705-15717. doi:10.1074/jbc.M114.571216
- Chauhan, N., Farine, L., Pandey, K., Menon, A. K. and Büttikofer, P. (2016). Lipid topogenesis — 35 years on. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1861**, 757-766. doi:10.1016/j.bbalip.2016.02.025
- Chung, J., Torta, F., Masai, K., Lucast, L., Czapla, H., Tanner, L. B., Narayanaswamy, P., Wenk, M. R., Nakatsu, F. and De Camilli, P. (2015). PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science* **349**, 428-432. doi:10.1126/science.aab1370
- Collado, J., Kalemánov, M., Campelo, F., Bourgoignie, C., Thomas, F., Loewith, R., Martínez-Sánchez, A., Baumeister, W., Stefan, C. J. and Fernández-Busnadiego, R. (2019). Tricalbin-mediated contact sites control ER curvature to maintain plasma membrane integrity. *Dev. Cell* **51**, 476-487.e7. doi:10.1016/j.devcel.2019.10.018
- D'Ambrosio, J. M., Albanèse, V. and Čopič, A. (2019). Following anterograde transport of phosphatidylserine in yeast in real time. *Methods Mol. Biol.* **1949**, 35-46. doi:10.1007/978-1-4939-9136-5_4
- Dunham, M. J., Gartenberg, M. R., Brown, G. W. (2015). *Methods in Yeast Genetics and Genomics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- de Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payrastré, B., Bourguet, W., Antonny, B. and Drin, G. (2011). Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J. Cell Biol.* **195**, 965-978. doi:10.1083/jcb.201104062
- Fairn, G. D., Hermansson, M., Somerharju, P. and Grinstein, S. (2011). Phosphatidylserine is polarized and required for proper Cdc42 localization and for development of cell polarity. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1424-1430. doi:10.1038/ncb2351
- Falzone, M. E., Malvezzi, M., Lee, B.-C. and Accardi, A. (2018). Known structures and unknown mechanisms of TMEM16 scramblases and channels. *J. Gen. Physiol.* **150**, 933-947. doi:10.1085/jgp.201711957
- Finn, R. D., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Bateman, A., Bork, P., Bridge, A. J., Chang, H.-Y., Dosztányi, Z., El-Gebali, S., Fraser, M. et al. (2017). InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res.* **45**, D190-D199. doi:10.1093/nar/gkw1107
- Ghai, R., Du, X., Wang, H., Dong, J., Ferguson, C., Brown, A. J., Parton, R. G., Wu, J.-W. and Yang, H. (2017). ORP5 and ORP8 bind phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) and regulate its level at the plasma membrane. *Nat. Commun.* **8**, 757. doi:10.1038/s41467-017-00861-5
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**, 307-321. doi:10.1093/sysbio/syq010
- Hanada, K. (2018). Lipid transfer proteins rectify inter-organelle flux and accurately deliver lipids at membrane contact sites. *J. Lipid Res.* **59**, 1341-1366. doi:10.1194/jlr.R085324
- Harayama, T. and Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 281-296. doi:10.1038/nrm.2017.138
- Hirama, T., Das, R., Yang, Y., Ferguson, C., Won, A., Yip, C. M., Kay, J. G., Grinstein, S., Parton, R. G. and Fairn, G. D. (2017). Phosphatidylserine dictates the assembly and dynamics of caveolae in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **292**, 14292-14307. doi:10.1074/jbc.M117.791400
- Hoffmann, P. C., Bharat, T. A. M., Wozny, M. R., Boulanger, J., Miller, E. A. and Kukulski, W. (2019). Tricalbins contribute to cellular lipid flux and form curved ER-PM contacts that are bridged by rod-shaped structures. *Dev. Cell* **51**, 488-502.e8. doi:10.1016/j.devcel.2019.09.019
- Im, Y. J., Raychaudhuri, S., Prinz, W. A. and Hurley, J. H. (2005). Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins. *Nature* **437**, 154-158. doi:10.1038/nature03923
- Jamecna, D., Polidori, J., Mesmin, B., Dezi, M., Levy, D., Bigay, J. and Antonny, B. (2019). An intrinsically disordered region in OSBP acts as an entropic barrier to control protein dynamics and orientation at membrane contact sites. *Dev. Cell* **49**, 220-234.e8. doi:10.1016/j.devcel.2019.02.021
- James, P., Halladay, J. and Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E. et al. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947-962. doi:10.1002/yea.1142
- Jansen, M., Ohsaki, Y., Rega, L. R., Bittman, R., Olkkonen, V. M. and Ikonen, E. (2011). Role of ORPs in sterol transport from plasma membrane to ER and lipid droplets in mammalian cells. *Traffic* **12**, 218-231. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01142.x
- Jha, A., Chung, W. Y., Vachel, L., Maleth, J., Lake, S., Zhang, G., Ahuja, M. and Muallem, S. (2019). Anoctamin 8 tethers endoplasmic reticulum and plasma membrane for assembly of Ca²⁺ signaling complexes at the ER/PM compartment. *EMBO J.* **38**, e101452. doi:10.15252/emboj.2018101452
- Katoh, K., Rozewicki, J. and Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* **20**, 1160-1166. doi:10.1093/bib/bbx108
- Kay, J. G. and Fairn, G. D. (2019). Distribution, dynamics and functional roles of phosphatidylserine within the cell. *Cell Commun. Signal.* **17**, 126. doi:10.1186/s12964-019-0438-z
- Klose, C., Surma, M. A., Gerl, M. J., Meyenhofer, F., Shevchenko, A. and Simons, K. (2012). Flexibility of a eukaryotic lipidome — insights from yeast lipidomics. *PLoS ONE* **7**, e35063. doi:10.1371/journal.pone.0035063
- Kralt, A., Carretta, M., Mari, M., Reggiori, F., Steen, A., Poolman, B. and Veenhoff, L. M. (2015). Intrinsically disordered linker and plasma membrane-binding motif sort Ist2 and Ssy1 to junctions. *Traffic* **16**, 135-147. doi:10.1111/tra.12243
- Lipp, N.-F., Gautier, R., Magdeleine, M., Renard, M., Albanèse, V., Čopič, A. and Drin, G. (2019). An electrostatic switching mechanism to control the lipid transfer activity of Osh6p. *Nat. Commun.* **10**, 3926. doi:10.1038/s41467-019-11780-y
- Loewen, C. J. R., Roy, A. and Levine, T. P. (2003). A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J.* **22**, 2025-2035. doi:10.1093/emboj/cdg201
- Ma, M., Kumar, S., Purushothaman, L., Babst, M., Ungermann, C., Chi, R. J. and Burd, C. G. (2018). Lipid trafficking by yeast Snx4 family SNX-BAR proteins promotes autophagy and vacuole membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* **29**, 2190-2200. doi:10.1091/mbc.E17-12-0743
- Maass, K., Fischer, M. A., Seiler, M., Temmerman, K., Nickel, W. and Seedorf, M. (2009). A signal comprising a basic cluster and an amphipathic helix interacts with lipids and is required for the transport of Ist2 to the yeast cortical ER. *J. Cell Sci.* **122**, 625-635. doi:10.1242/jcs.036012
- Maeda, K., Anand, K., Chiapparino, A., Kumar, A., Poletto, M., Kaksonen, M. and Gavin, A.-C. (2013). Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins. *Nature* **501**, 257-261. doi:10.1038/nature12430
- Malvezzi, M., Chalal, M., Janjusevic, R., Picollo, A., Terashima, H., Menon, A. K. and Accardi, A. (2013). Ca²⁺-dependent phospholipid scrambling by a reconstituted TMEM16 ion channel. *Nat. Commun.* **4**, 2367. doi:10.1038/ncomms3367
- Manford, A. G., Stefan, C. J., Yuan, H. L., MacGurn, J. A. and Emr, S. D. (2012). ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Dev. Cell* **23**, 1129-1140. doi:10.1016/j.devcel.2012.11.004
- Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J. M., Lacas-Gervais, S., Drin, G. and Antonny, B. (2013). A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/

- PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell* **155**, 830-843. doi:10.1016/j.cell.2013.09.056
- Moser von Filseck, J., Vanni, S., Mesmin, B., Antonny, B. and Drin, G.** (2015a). A phosphatidylinositol-4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes. *Nat. Commun.* **6**, 6671. doi:10.1038/ncomms7671
- Moser von Filseck, J., Čopič, A., Delfosse, V., Vanni, S., Jackson, C. L., Bourguet, W. and Drin, G.** (2015b). Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science* **349**, 432-436. doi:10.1126/science.aab1346
- Murphy, S. E. and Levine, T. P.** (2016). VAP, a versatile access point for the endoplasmic reticulum: review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1861**, 952-961. doi:10.1016/j.bbalip.2016.02.009
- Nishimura, T., Gecht, M., Covino, R., Hummer, G., Surma, M. A., Klose, C., Arai, H., Kono, N. and Stefan, C. J.** (2019). Osh proteins control nanoscale lipid organization necessary for PI(4,5)P₂ synthesis. *Mol. Cell* **75**, 1043-1057.e8. doi:10.1016/j.molcel.2019.06.037
- Olkonen, V. M. and Li, S.** (2013). Oxysterol-binding proteins: sterol and phosphoinositide sensors coordinating transport, signaling and metabolism. *Prog. Lipid Res.* **52**, 529-538. doi:10.1016/j.plipres.2013.06.004
- Pietrangelo, A. and Ridgway, N. D.** (2019). Phosphorylation of a serine/proline-rich motif in oxysterol binding protein-related protein 4L (ORP4L) regulates cholesterol and vimentin binding. *PLoS ONE* **14**, e0214768. doi:10.1371/journal.pone.0214768
- Quon, E., Sere, Y. Y., Chauhan, N., Johansen, J., Sullivan, D. P., Dittman, J. S., Rice, W. J., Chan, R. B., Di Paolo, G., Beh, C. T. et al.** (2018). Endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites integrate sterol and phospholipid regulation. *PLoS Biol.* **16**, e2003864. doi:10.1371/journal.pbio.2003864
- Raychaudhuri, S. and Prinz, W. A.** (2010). The diverse functions of oxysterol-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 157-177. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113334
- Riekhof, W. R., Wu, J., Gijón, M. A., Zarini, S., Murphy, R. C. and Voelker, D. R.** (2007). Lysophosphatidylcholine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of P-type ATPases in transport and a broad specificity acyltransferase in acylation. *J. Biol. Chem.* **282**, 36853-36861. doi:10.1074/jbc.M706718200
- Schulz, T. A., Choi, M.-G., Raychaudhuri, S., Mears, J. A., Ghirlando, R., Hinshaw, J. E. and Prinz, W. A.** (2009). Lipid-regulated sterol transfer between closely apposed membranes by oxysterol-binding protein homologues. *J. Cell Biol.* **187**, 889-903. doi:10.1083/jcb.200905007
- Shen, X.-X., Opulente, D. A., Kominek, J., Zhou, X., Steenwyk, J. L., Buh, K. V., Haase, M. A. B., Wisecaver, J. H., Wang, M., Doering, D. T. et al.** (2018). Tempo and mode of genome evolution in the budding yeast subphylum. *Cell* **175**, 1533-1545.e20. doi:10.1016/j.cell.2018.10.023
- Sohn, M., Ivanova, P., Brown, H. A., Toth, D. J., Varnai, P., Kim, Y. J. and Balla, T.** (2016). Lenz-Majewski mutations in PTDSS1 affect phosphatidylinositol 4-phosphate metabolism at ER-PM and ER-Golgi junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 4314-4319. doi:10.1073/pnas.1525719113
- Spira, F., Mueller, N. S., Beck, G., von Olshausen, P., Beig, J. and Wedlich-Söldner, R.** (2012). Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat. Cell Biol.* **14**, 640-648. doi:10.1038/ncb2487
- Sun, Y. and Drubin, D. G.** (2013). The functions of anionic phospholipids during clathrin-mediated endocytosis site initiation and vesicle formation. *J. Cell Sci.* **125**, 6157-6165. doi:10.1242/jcs.115741
- Sung, M.-K., Ha, C. W. and Huh, W.-K.** (2008). A vector system for efficient and economical switching of C-terminal epitope tags in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **25**, 301-311. doi:10.1002/yea.1588
- Świat, M. A., Dashko, S., den Ridder, M., Wijsman, M., van der Oost, J., Daran, J.-M. and Daran-Lapujade, P.** (2017). FnCpf1: a novel and efficient genome editing tool for *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **45**, 12585-12598. doi:10.1093/nar/gkx1007
- Takano, K., Toyooka, K. and Suetsugu, S.** (2008). EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J.* **27**, 2817-2828. doi:10.1038/emboj.2008.216
- Tani, M. and Kuge, O.** (2014). Involvement of Sac1 phosphoinositide phosphatase in the metabolism of phosphatidylserine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **31**, 145-158. doi:10.1002/yea.3004
- Tsuji, T., Cheng, J., Tatematsu, T., Ebata, A., Kamikawa, H., Fujita, A., Gyobu, S., Segawa, K., Arai, H., Taguchi, T. et al.** (2019). Predominant localization of phosphatidylserine at the cytoplasmic leaflet of the ER, and its TMEM16K-dependent redistribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**, 13368-13373. doi:10.1073/pnas.1822025116
- Wang, H., Ma, Q., Qi, Y., Dong, J., Du, X., Rae, J., Wang, J., Wu, W.-F., Brown, A. J., Parton, R. G. et al.** (2019). ORP2 delivers cholesterol to the plasma membrane in exchange for phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PI(4,5)P₂). *Mol. Cell* **73**, 458-473.e7. doi:10.1016/j.molcel.2018.11.014
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. and Barton, G. J.** (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189-1191. doi:10.1093/bioinformatics/btp033
- Weber-Boyyvat, M., Kentala, H., Peränen, J. and Olkkonen, V. M.** (2015). Ligand-dependent localization and function of ORP-VAP complexes at membrane contact sites. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 1967-1987. doi:10.1007/s00018-014-1786-x
- Wolf, W., Kilic, A., Schrul, B., Lorenz, H., Schwappach, B. and Seedorf, M.** (2012). Yeast Ist2 recruits the endoplasmic reticulum to the plasma membrane and creates a ribosome-free membrane microcompartment. *PLoS ONE* **7**, e39703-e39713. doi:10.1371/journal.pone.0039703
- Wong, L. H., Čopič, A. and Levine, T. P.** (2017). Advances on the transfer of lipids by lipid transfer proteins. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 516-530. doi:10.1016/j.tibs.2017.05.001

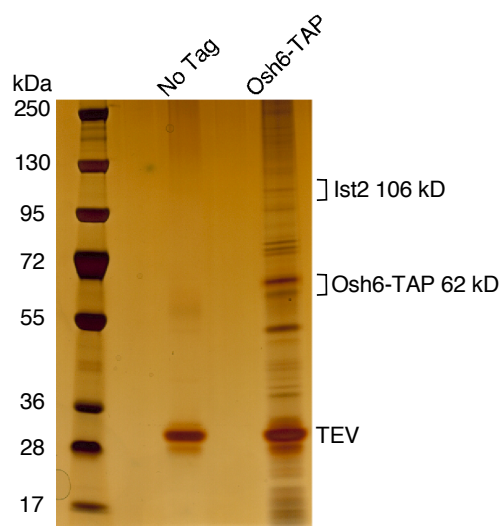


Fig. S1. Purification of Osh6-TAP from WT cells. After elution with TEV protease, eluates were loaded on SDS-PAGE and the gel was silver stained. Approximate positions of Ist2, Osh6-TAP and TEV are indicated. Experiment was performed once.

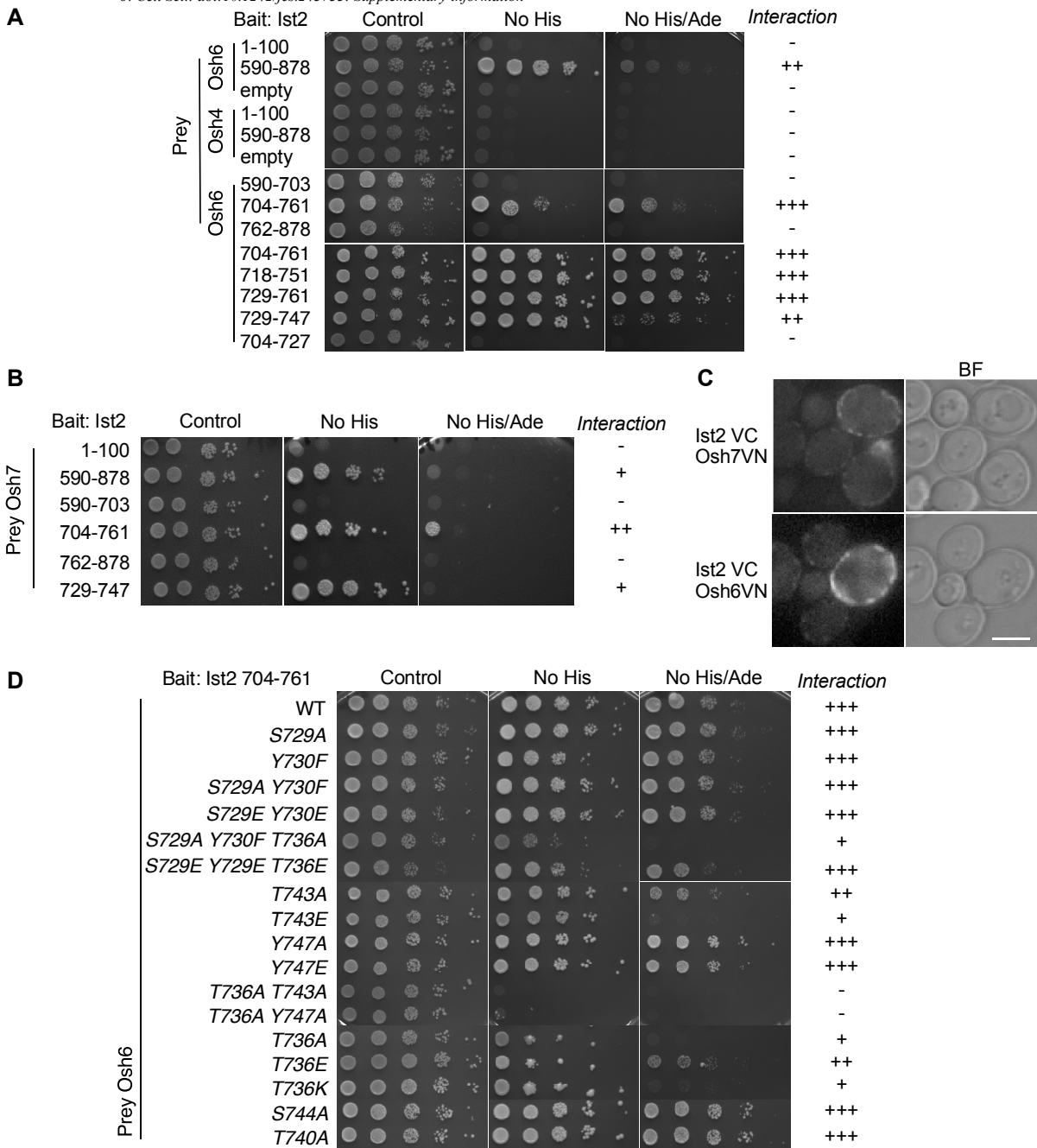


Fig. S2. Yeast two-hybrid analysis of Ist2 interaction with Osh6 and Osh7. (A) 10-fold serial dilutions of yeast cells expressing Ist2 fragments (first and last aa are indicated) fused to GAL4 DNA-binding domain (bait) and full-length Osh6 or Osh4 fused to GAL4 Activation domain (prey) on control, SD-His and SD-His-Ade reporter plates. Plates were incubated at 30°C for 3 days. (B) 10-fold serial dilutions of yeast cells expressing Ist2 fragments fused to GAL4 DNA-Binding domain (bait) and full-length Osh7 fused to GAL4 Activation domain (prey) on control, and SD-His reporter plate. Plates were incubated at 30°C for 3 days. (C) BiFC in diploid cells expressing endogenously tagged Osh7-VN and Ist2-VC or Osh6-VN and Ist2-VC, as indicated. Scale Bar = 5 µm. (D) 10-fold serial dilutions of yeast cells expressing Ist2 fragment aa704-761 fused to GAL4 DNA-Binding domain (bait) and different Osh6 mutants fused to GAL4 Activation domain (prey) on control and SD-His and SD-His-Ade reporter plates. Plates were incubated at 30°C for 3 days. Interaction score: (-) No growth detected in -His, (+) growth detected in -His, (++) weak growth detected in -His/-Ade, (+++) Strong growth detected in -His/-Ade. All plates are representative of 3 independent experiments.

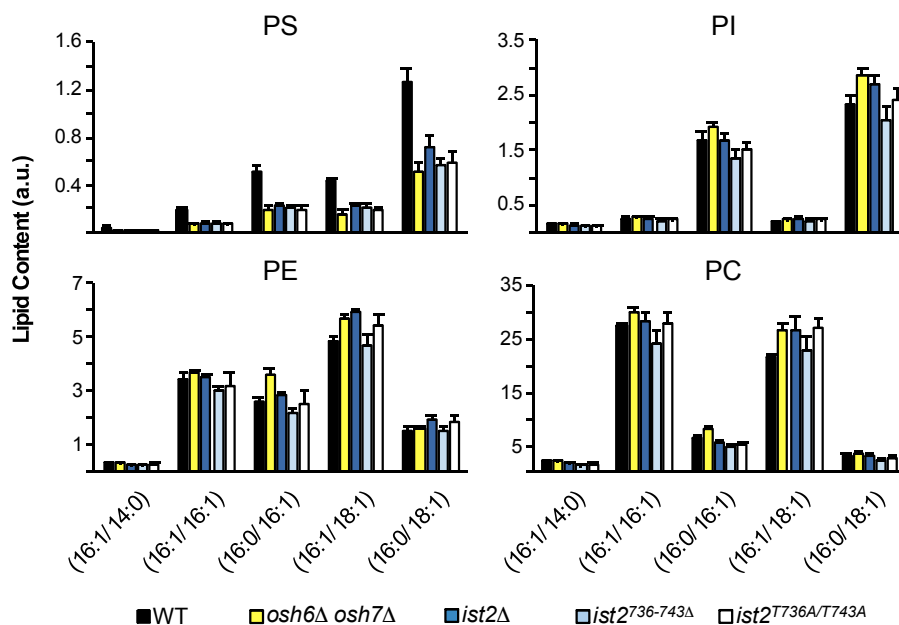


Fig. S3. Lipidomic analysis of total cellular content of PC, PE, PI and PS species in WT, *osh6Δ osh7Δ* and *ist2* mutant cells. Lipids were extracted from WT, *osh6Δ osh7Δ*, *ist2Δ*, *ist2^{T736-743Δ}* and *ist2^{T736A/T743A}* (chromosomal deletion of 8 codons) and *ist2^{T736A/T743A}* (chromosomal substitution in 2 codons) cells, and analyzed by mass spectrometry. Data are mean±s.d. from 3 independent samples. Parentheses denote acyl chain length and saturation. The experiment was performed 3 times, yielding similar results.

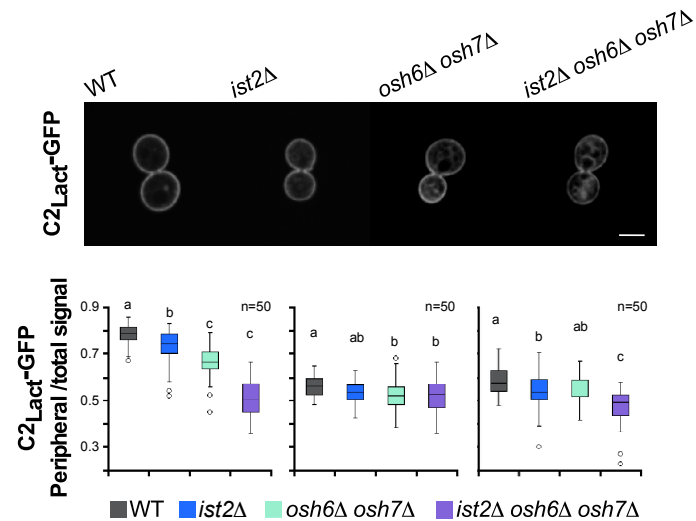


Fig. S4. Steady-state distribution of PS in WT, *ist2*Δ and *osh6*Δ *osh7*Δ cells. Subcellular localization of C2_{Lact}-GFP in WT, *ist2*Δ, *osh6*Δ *osh7*Δ and *osh6*Δ *osh7*Δ *ist2*Δ cells was assessed by fluorescence microscopy (top panels). Quantification of relative C2_{Lact}-GFP peripheral signal, normalized to total cellular fluorescence, is shown in box plots for 50 individual cells (n=50) in 3 independent experiments. Each box encloses 50% of the data, median value is displayed as a line, top and bottom of the box mark the limits of ± 25%. The lines extending from the top and bottom of each box mark the minimum and maximum values. Outliers are displayed as an individual point. Different letters (“a”, “b” and “c”) indicate significant differences between the means, “ab” denotes non-significant difference from either mean “a” or mean “b” (multiple comparison using one-way ANOVA, posthoc Tukey’s test at p < 0.05).

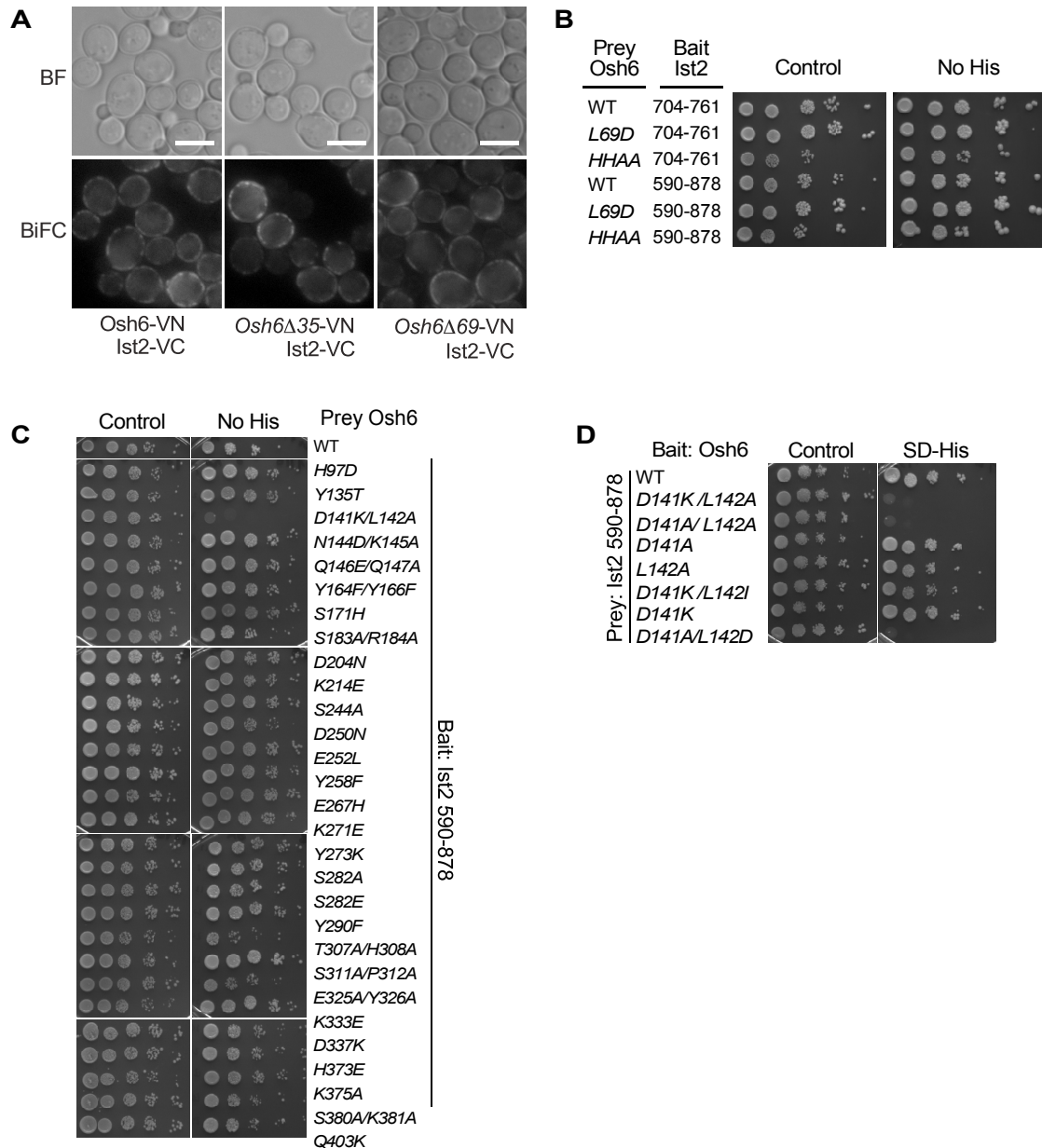


Fig. S5. Mapping Ist2 interaction site on Osh6. (A) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) between Osh6 WT, or two N-term deletion mutants Osh6Δ35 (lacking 35 N-term aa, which are disordered) or Osh6Δ69 (lacking the whole N-term lid that covers the lipid-binding pocket) fused to Venus N-term, and Ist2 fused to Venus C-term. Scale Bar= 5 μm. **(B-D)** 10-fold serial dilutions of yeast cells (AH109) expressing Ist2 full-length cytosolic tail (aa 590-878) and Osh6 WT or selected mutants with substitutions in indicated aa, fused to GAL4 Activation domain (prey) or GAL4 DNA-Binding domain (bait), respectively. Osh6 mutants were selected based on structural and conservation analysis. Interaction of bait and prey proteins activates transcription of *HIS3* (controlled by GAL promoter) and allows growth in SD-His selective media. Results are representative of 3 independent experiments.

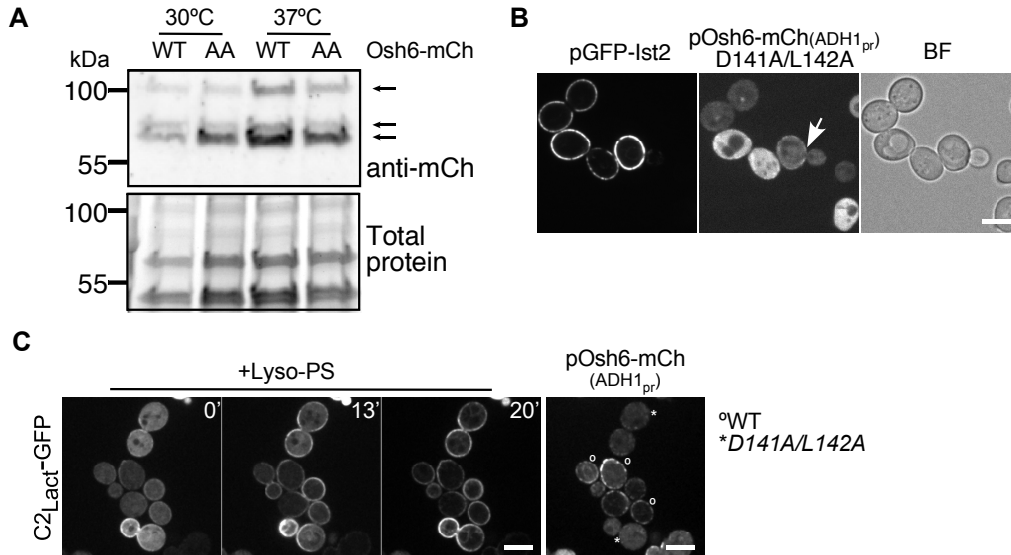


Fig. S6. Mutations of D141 and L142 do not affect the stability of Osh6 and still permit some interaction with Ist2. (A) Western blot analysis of whole cell TCA precipitates showing mCherry-tagged Osh6 and Osh6^{D141A/L142A} protein levels at 30°C and 37°C. Experiment was repeated 2 times. (B) GFP-Ist2 and Osh6^{L141A/D142A}-mCherry, expressed from low-copy plasmids in *ist2Δ osh6Δ osh7Δ* cells were visualized using fluorescence microscopy. (C) Imaging of C2_{Lact}-GFP over time in a mix of two *cho1Δ osh6Δ osh7Δ* strains (lacking endogenous PS), expressing Osh6-mCherry WT (°) or D141A/L142D mutant (*) from the medium-level ADH1-promotor. For identification, cells expressing WT Osh6 were labelled with CMAC. Time (in min) after addition of lyso-PS is indicated. Osh6-mCherry signal is shown in the right panel at t=0 min. Representative images from two independent experiments are shown. Scale Bar = 5 μm.

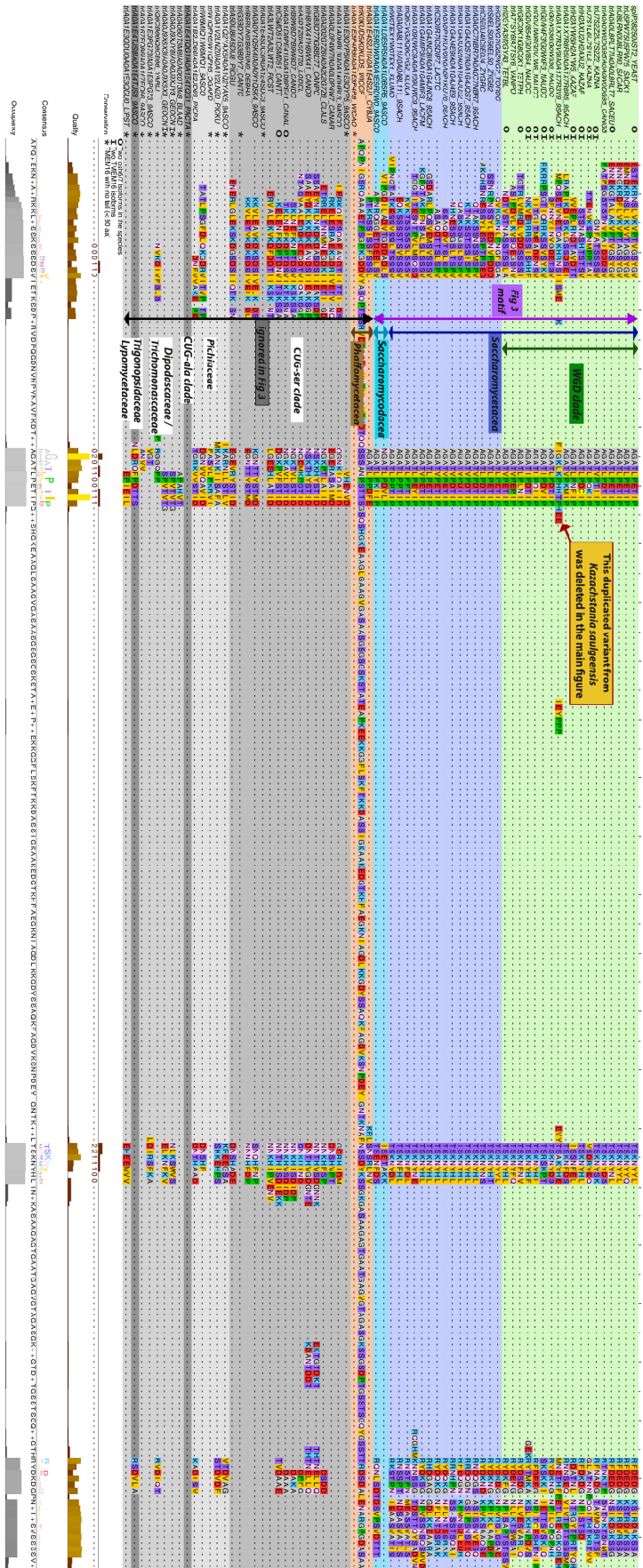


Figure S7

Fig. S7. Related to Fig. 3 and Fig. 7C: Alignment of the tail region of 68 TMEM16 homologous sequences from 62 Saccharomycotina species. Color coding is explained in the figure and is the same as in Fig. 7C. Conservation score and heatmap on a brown to yellow scale are shown at the bottom. Asterisks indicate homologues with a short cytosolic tail (< 80 aa). WGD denotes whole genome duplication (green); 'O': two OSH6 genes, 'I': two IST2 genes.

Table S1: List of proteins identified by mass spectrometry analysis of Osh6-TAP complex purified from wild-type yeast

[Click here to Download Table S1](#)

Table S2. Yeast strains used in this study.

Name	Alias	Background	Genotype	Origin/Reference
BY4742	WT	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	<i>Euroscarf</i>
BY4741	WT		<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	<i>Euroscarf</i>
VAY2817	<i>OSH6-TAP</i>	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 OSH6-TAP::KanMX</i>	<i>This study</i>
Ist2-GFP	<i>IST2-GFP</i>	BY4741	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 IST2-GFP::HIS3</i>	<i>Huh et al., 2003</i>
Osh6-GFP	<i>OSH6-GFP</i>	BY4741	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 OSH6-GFP::HIS3</i>	<i>Huh et al., 2003</i>
VAY2802	<i>OSH6-GFP ist2Δ</i>	BY4741	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ist2Δ::hphNT1 OSH6-GFP::KanMX</i>	<i>This study</i>
VAY3652	<i>OSH6-GFP scs2Δ scs22Δ</i>	BY	<i>MATα ? his3Δ1 leu2Δ0 scs2Δ::KanMX Δscs22::KanMX Osh6-GFP::HIS3</i>	<i>This study</i>
VAY2811	<i>IST2-VC</i>	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 IST2-VC::KanMX</i>	<i>This study</i>
VAY2695	<i>ist2⁴⁵⁹⁰-VC</i>	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 IST2⁴⁵⁹⁰-VC::KanMX</i>	<i>This study</i>
VAY2829	<i>OSH6-VN</i>	BY4741	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 OSH6-VN::HIS3</i>	<i>This study</i>
VAY2969	<i>OSH7-VN</i>	BY4741	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 OSH7-VN::HIS3</i>	<i>This study</i>
AH109	AH109	AH109	<i>MATα trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2 URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	<i>James et al., 1996</i>
VAY2784	<i>ist2Δ</i>	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ist2Δ::hphNT1</i>	<i>This study</i>
MdPY08	<i>cho1Δ</i>	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 cho1Δ::kanMX</i>	<i>This study</i>
SGAY1635	<i>osh6Δ osh7Δ</i>	BY4742	<i>MATα can1Δ::STE2pr-LEU2 lyp1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 osh6Δ::HYGMX osh7Δ::natNT2</i>	<i>Maeda et al., 2013</i>
SGAY7039	<i>cho1Δ osh6Δ osh7Δ</i>	BY4742	<i>MATα can1Δ::STE2pr-LEU2 lyp1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 cho1Δ::KanMX osh6Δ::hphNT1 osh7Δ::natNT2</i>	<i>Maeda et al., 2013</i>
ACY406	<i>ist2Δ osh6Δ osh7Δ</i>	SGAY1635	<i>MATα can1Δ::STE2pr-LEU2 lyp1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ist2Δ::HISMX6 osh6Δ::hphNT1 osh7Δ::natNT2</i>	<i>This study</i>
MdPY01	<i>ist2Δ osh6Δ osh7Δ</i>	ACY406	<i>MATα can1Δ::STE2pr-LEU2 lyp1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ist2Δ::kanMX osh6Δ::hphNT1 osh7Δ::natNT2</i>	<i>This study</i>
MdPY04	<i>ist2^{736-743Δ}</i>	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ist2^{736-743Δ}</i>	<i>This study</i>
MdPY06	<i>ist2^{T736A T743A}</i>	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ist2^{T736A T743A}</i>	<i>This study</i>
MdPY07	<i>cho1Δ ist2^{736-743Δ}</i>	MdPY08	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 cho1Δ::kanMX ist2^{736-743Δ}</i>	<i>This study</i>

Table S3. Plasmids used in this study.

Plasmid Name	Alias	Description	Origin/Reference
pAK75	GFP-Ist2	<i>IST2_{pr}GFP-IST2</i> (full-length), <i>CEN, HIS3</i> (pUG34-Based).	<i>Kralt et al., 2014</i>
pAK76	GFP-Ist2RL	<i>IST2_{pr}GFP-IST2</i> with randomized linker [596-917], <i>CEN, HIS3</i> (pUG34-Based).	<i>Kralt et al., 2014</i>
pAK81	GFP-IstL240	<i>IST2_{pr}GFP-IST2</i> with 100 aa deletion in cytosolic linker, <i>CEN, HIS3</i> (pUG34-Based).	<i>Kralt et al., 2014</i>
pAK77	GFP-IstL140	<i>IST2_{pr}GFP-IST2</i> with 200 aa deletion in cytosolic linker, <i>CEN, HIS3</i> (pUG34-Based).	<i>Kralt et al., 2014</i>
pAK84	GFP-IstL058	<i>IST2_{pr}GFP-IST2</i> with 135 aa deletion in cytosolic, <i>CEN, His3</i> (pUG34-Based).	<i>Kralt et al., 2014</i>
pJMD_01	GFP-Ist2RL ^[729-747wt]	57 bp of <i>IST2</i> WT [729-747] inserted in the randomized linker of pAK76.	<i>This study</i>
pJMD_02	GFP-Ist2[TT->AA]	T736A T743A Quikchange mutagenesis of pAK75.	<i>This study</i>
pJMD_07	BFP-Ist2	<i>IST2_{pr}BFP-IST2</i> full-length, <i>CEN, HIS3</i> (pUG34-Based).	<i>This study</i>
pJMD_08	BFP-Ist2[705-762]	<i>IST2_{pr}BFP-IST2</i> [codon705 to 762], <i>CEN, HIS3</i> (pUG34-Based).	<i>This study</i>
pJMD_12	BFP-Ist2RL ^[718-751wt]	102 nt of <i>IST2</i> WT [729-747] inserted in the randomized linker of pJMD_21	<i>This study</i>
pJMD_21	BFP-Ist2RL	<i>IST2_{pr}BFP-IST2</i> with randomized linker [596-917], <i>CEN, HIS3</i> (pUG34-Based).	<i>This study</i>
pRS315-Osh6-mCh	pADH1 Osh6-mCherry (L)	<i>ADH1_{pr}OSH6</i> -mCherry, <i>CEN, LEU2</i> (pRS315-based).	<i>Maeda et al., 2013</i>
pAC100	pADH1 OSH6-mCherry (U)	<i>ADH1_{pr}OSH6</i> -mCherry, <i>CEN, URA3</i> (pRS315-based); marker swap	<i>This study</i>
pVA111	pCYC1 Osh6-mCherry	<i>CYC1_{pr}OSH6</i> -mCherry, <i>CEN, URA3</i> (pRS316-based); <i>OSH6</i> subcloned	<i>This study</i>
pJMD_22	pADH1 _{pr} Osh6 L141A D142A	Quikchange mutagenesis of pAC100	<i>This study</i>
pJMD_23	pCYC1 _{pr} Osh6 L141A D142A	Quikchange mutagenesis of pVA111	<i>This study</i>
pJMD_24	pADH1 _{pr} Osh6 L141K D142A	Quikchange mutagenesis of pAC100	<i>This study</i>
pJMD_25	pCYC1 Osh6 L141K D142A	Quikchange mutagenesis of pVA111	<i>This study</i>
pC _{Lact} -GFP	C _{Lact} -GFP	<i>GPD_{pr}C_{Lact}-GFP, CEN, URA3</i> (pRS416-based)	<i>Yeung et al., 2008</i>
pAC107	C _{Lact} -GFP (LEU)	<i>GPD_{pr}C_{Lact}-GFP, CEN, LEU2</i> (pRS416-based)	<i>Lipp et al., 2019</i>
pJMD_26	crRNA Ist2 736-743	crRNA targeting <i>IST2</i> codons 736-743, <i>URA, 2 μ ori</i> , based on pUD628 (Addgene Plasmid #103018)	<i>This study</i>
pUDC175	fnCpf1	<i>TEF1_{pr}FnCPF1, CEN, NatMX</i> (p414TEF1 Backbone) Addgene Plasmid #103019	<i>Swiat et al., 2017</i>
pVA117	pRS415-ADH _{pr} Osh6Δ35-VN	<i>ADH_{pr}Osh6Δ35</i> (Lipp et al., 2019) subcloned into pRS415-VN using <i>SacI/BamHI</i> digestion	<i>This study</i>
pVA119	pRS415-ADH _{pr} Osh6Δ69-VN	<i>ADH_{pr}Osh6Δ69</i> (Lipp et al., 2019) subcloned into pRS415-VN using <i>SacI/BamHI</i> digestion	<i>This study</i>

Table S4. Plasmids constructed for the yeast two-hybrid assay.

Plasmid Name	Insert	Mutation	Construction
pJMD100	<i>OSH4</i>	-	<i>OSH4</i> coding region inserted in the BamHI and XhoI restrictions sites of pGBKT7 (Chien et al., 1991).
pJMD101	<i>OSH6</i>	-	<i>OSH6</i> coding region inserted in the BamHI and XhoI restrictions sites of pGBKT7 (Chien et al., 1991).
pJMD102	<i>OSH7</i>	-	<i>OSH7</i> coding region inserted in the BamHI and XhoI restrictions sites of pGBKT7 (Chien et al., 1991).
pJMD103	<i>OSH6</i>	<i>H97D</i>	Plasmid pJMD103 to pJMD138 were generated by Quikchange site-directed mutagenesis of <i>pJMD101</i> .
pJMD104	<i>OSH6</i>	<i>Y135T</i>	
pJMD105	<i>OSH6</i>	<i>D141K_L142A</i>	
pJMD106	<i>OSH6</i>	<i>N144D_K145A</i>	
pJMD107	<i>OSH6</i>	<i>Q146E_Q147A</i>	
pJMD108	<i>OSH6</i>	<i>Y164F_Y166F</i>	
pJMD109	<i>OSH6</i>	<i>S171H</i>	
pJMD110	<i>OSH6</i>	<i>S183A_R184A</i>	
pJMD111	<i>OSH6</i>	<i>D204N</i>	
pJMD112	<i>OSH6</i>	<i>K214E</i>	
pJMD113	<i>OSH6</i>	<i>S244A</i>	
pJMD114	<i>OSH6</i>	<i>D250N</i>	
pJMD115	<i>OSH6</i>	<i>E252L</i>	
pJMD116	<i>OSH6</i>	<i>Y258F</i>	
pJMD117	<i>OSH6</i>	<i>E267H</i>	
pJMD118	<i>OSH6</i>	<i>K271E</i>	
pJMD119	<i>OSH6</i>	<i>Y273K</i>	
pJMD120	<i>OSH6</i>	<i>S282A</i>	
pJMD121	<i>OSH6</i>	<i>S282E</i>	
pJMD122	<i>OSH6</i>	<i>Y290F</i>	
pJMD123	<i>OSH6</i>	<i>T307A_H308A</i>	
pJMD124	<i>OSH6</i>	<i>S311A_P312A</i>	
pJMD125	<i>OSH6</i>	<i>E325A_Y326A</i>	
pJMD126	<i>OSH6</i>	<i>K333E</i>	
pJMD127	<i>OSH6</i>	<i>D337K</i>	
pJMD128	<i>OSH6</i>	<i>H373E</i>	
pJMD129	<i>OSH6</i>	<i>K375A</i>	
pJMD130	<i>OSH6</i>	<i>S380A_K381A</i>	
pJMD131	<i>OSH6</i>	<i>Q403K</i>	
pJMD132	<i>OSH6</i>	<i>D141K_L142A</i>	
pJMD133	<i>OSH6</i>	<i>D141A_L142A</i>	
pJMD134	<i>OSH6</i>	<i>D141A</i>	
pJMD135	<i>OSH6</i>	<i>L142A</i>	
pJMD136	<i>OSH6</i>	<i>D141K_L142I</i>	
pJMD137	<i>OSH6</i>	<i>D141K</i>	
pJMD138	<i>OSH6</i>	<i>D141A_L142D</i>	

Table S4 continued. Plasmids constructed for the yeast two-hybrid assay.

Name	Insert	Mutation	Construction
pJMD139	Ist2_1-100	-	Ist2 coding region from amino acid position 1 to 100 inserted in the BamHI and XhoI restriction sites of pGADT7 (Chien et al., 1991).
pJMD140	Ist2_590-878	-	Ist2 coding region from amino acid position 590 to 878 inserted in the BamHI and XhoI restriction sites of pGADT7 (Chien et al., 1991).
pJMD141	Ist2_590-703	-	Ist2 coding region from amino acid position 590 to 703 inserted in the BamHI and XhoI restriction sites of pGADT7 (Chien et al., 1991).
pJMD142	Ist2_762-878	-	Ist2 coding region from amino acid position 762 to 878 inserted in the BamHI and XhoI restriction sites of pGADT7 (Chien et al., 1991).
pJMD143	Ist2_704-761	-	Ist2 coding region from amino acid position 704 to 761 inserted in the BamHI and XhoI restriction sites of pGADT7 (Chien et al., 1991).
pJMD144	Ist2_718-751	-	Ist2 coding region from amino acid position 718 to 751 inserted in the BamHI and XhoI restriction sites of pGADT7 (Chien et al., 1991).
pJMD145	Ist2_729-761	-	Ist2 coding region from amino acid position 729 to 761 inserted in the BamHI and XhoI restriction sites of pGADT7 (Chien et al., 1991).
pJMD146	Ist2_729-747	-	Ist2 coding region from amino acid position 729 to 747 inserted in the BamHI and XhoI restriction sites of pGADT7 (Chien et al., 1991).
pJMD147	Ist2_704-727	-	Ist2 coding region from amino acid position 704 to 747 inserted in the BamHI and XhoI restriction sites of pGADT7 (Chien et al., 1991).
pJMD148	Ist2_704-761	S729A	Plasmid pJMD148 to pJMD164 were generated by Quikchange site-directed mutagenesis of pJMD143.
pJMD149	Ist2_704-761	Y730F	
pJMD150	Ist2_704-761	S729A Y730F	
pJMD151	Ist2_704-761	S729E Y730E	
pJMD152	Ist2_704-761	S729A Y730F T736A	
pJMD153	Ist2_704-761	S729E Y730E T736E	
pJMD154	Ist2_704-761	T743A	
pJMD155	Ist2_704-761	T743E	
pJMD156	Ist2_704-761	Y747A	
pJMD157	Ist2_704-761	Y747E	
pJMD158	Ist2_704-761	T736A T743A	
pJMD159	Ist2_704-761	T736A Y747A	
pJMD160	Ist2_704-761	T736A	
pJMD161	Ist2_704-761	T736E	
pJMD162	Ist2_704-761	T736K	
pJMD163	Ist2_704-761	S744A	
pJMD164	Ist2_704-761	T740A	

V. Conclusion et perspectives

Les lipides sont les éléments constitutifs majeurs des membranes qui délimitent les cellules eucaryotes et les organites qu'elles contiennent. En fonction de la densité de certains lipides dans ces membranes, celles-ci acquièrent des caractéristiques toutes particulières. L'une de ces caractéristiques est la charge électrostatique portée par les membranes qui dépend de leurs teneurs en phospholipides anioniques^{34,35}. Le RE et la membrane plasmique sont riches en phospholipides anioniques. Mais c'est surtout le cas de la membrane plasmique qui contient jusqu'à 30 mol% de PS réparties presque exclusivement dans son feuillet cytosolique^{15,18,66,76,82}. Cette accumulation de PS contribue à générer un champ électrostatique attracteur des protéines chargées positivement contenues dans le cytosol⁴⁰. De nombreuses protéines contenant des régions riches en acides aminés cationiques sont ainsi attirées à grande distance par la membrane plasmique. Ces interactions sont requises par la cellule afin de concentrer l'activité physiologique de ces protéines à la surface de cette membrane. La force de ces interactions entre protéines et membranes peut être modulée en modifiant par exemple les caractéristiques électrostatiques des protéines. C'est notamment le cas du segment cationique de la protéine MARCKS dont l'interaction avec les lipides anioniques est rompue par la phosphorylation de certains de ses résidus¹³⁵.

La PS s'accumule dans la membrane plasmique pour exercer sa fonction biologique loin de son lieu de synthèse qui se déroule exclusivement dans le RE³⁸⁰. Il est apparu que le trafic vésiculaire n'assure pas ou n'assure pas à lui seul l'enrichissement en PS de la membrane plasmique³⁴². À la place, la cellule a recours à des échangeurs de lipides qui sont Osh6p et Osh7p dans la levure³⁸¹ et ORP5 et ORP8 dans l'espèce humaine³⁴⁸. Ces protéines transportent la PS depuis le RE vers la membrane plasmique en échange de PI(4)P, qui lui, est amené en retour dans le RE où il est hydrolysé.

Ma thèse s'est focalisée sur les modalités de fonctionnement de ces échangeurs PS/PI(4)P. Le premier objectif consistait à comprendre comment Osh6p et Osh7p maintiennent efficacement une activité d'échange de lipides à l'interface entre des membranes anioniques. L'étude de cette question m'a permis de révéler qu'Osh6p et Osh7p sont munies d'un couvercle qui contient un motif conservé riche en aspartate et glutamate, qui leur permet de s'affranchir de l'environnement anionique que constitue la surface des membranes cellulaires et notamment celle de la membrane plasmique.

Lorsqu'Osh6p (ou Osh7p) extrait un de ses ligands lipidiques - la PS ou le PI(4)P- le couvercle se replie et se referme, masquant une surface cationique qui interagit avec la membrane tout en créant une nouvelle surface anionique, ce qui affaiblit très fortement la liaison de la protéine à la membrane. Ceci assure la solubilisation d'Osh6p et Osh7p en présence de ligands et donc de permettre des cycles d'échange PS/PI(4)P sans que la protéine ne réside trop longtemps sur la membrane du RE et la membrane plasmique. Ces données démontrent que l'occupation d'une LTP par son ligand peut moduler son état conformationnel et donc ses capacités de liaison à la membrane et de transport de lipide comme cela avait été postulé^{334,382}. En ce qui concerne le mode de liaison à la membrane, Osh6p/Osh7p se distinguent nettement des protéines périphériques qui portent des segments cationiques afin d'interagir de manière stable et durable avec des membranes anioniques et qui sont régulées par des processus extérieurs comme la phosphorylation (cité au-dessus) ou le taux de calcium (domaine C2 de la PKC³⁸³). En effet, la liaison d'Osh6p et d'Osh7p aux membranes anioniques est intrinsèquement régulée par un changement de conformation en présence de ligands lipidiques. Par ailleurs, il est intéressant de noter que cela ressemble au mécanisme qui contrôle le recrutement des petites protéines G sur les membranes en fonction de leur statut de liaison à leurs ligands (liées au GDP ou au GTP)^{162,384}.

On ignore encore si d'autres protéines ORP/Osh utilisent un mécanisme de commutation comme Osh6p. La capacité de liaison à la membrane d'Osh6p dépend de l'occlusion ou non par le couvercle d'une surface cationique à l'entrée de la poche de liaison, qui est bien conservée parmi les protéines ORP/Osh. On peut supposer que dans Osh4p, dont le couvercle ne présente pas de motif riche en aspartate et glutamate^{334,337} cette occlusion module à elle seule son association avec les membranes du RE et du Golgi/post-Golgi, qui sont moins anioniques que la membrane plasmique et entre lesquelles cette protéine fonctionne³⁸⁵⁻³⁸⁷. Les ORD d'ORP5 et d'ORP8 n'ont pas de motifs riches en glutamate et aspartate contrairement à ORP10, qui transfère la PS dans les sites de contact RE-Golgi³⁸⁸. Ces protéines sont plus complexes, car elles résident dans le RE et se lient au Golgi ou à la membrane plasmique via un domaine PH. Il est possible que, dans cette configuration, l'ORD cible séquentiellement les membranes par de faibles interactions et qu'un motif riche en aspartate et glutamate ne soit pas une nécessité. En revanche, Osh6p est sans doute unique parmi les échangeurs PS/PI(4)P car son ORD doit à la fois cibler la membrane et échanger des lipides. Notons cependant qu'il a été observé

in vitro que la protéine ORP1S humaine, qui n'est constituée que d'un ORD et qui est cytosolique, s'associe probablement de manière transitoire aux membranes cellulaires³⁸⁹. Elle se désengage des membranes anioniques si ses ligands lipidiques sont présents dans ces membranes. Aussi, comme je l'ai mentionné dans l'introduction, la capacité de liaison membranaire de la PTP α , membre d'une famille distincte de LTPs, dépend de la capture ou non de ses ligands²⁷⁵. Il est donc possible que plusieurs protéines ORP/Osh et de nombreux autres types de LTPs possèdent un mécanisme de commutation dont la nature reste à définir.

J'ai donc montré l'existence d'un mécanisme qui permet d'assurer la vitesse des échanges PS/PI(4)P à l'interface RE/membrane plasmique. Qu'en est-il de la précision de ce transport ? Autrement dit, comment Osh6p et Osh7p peuvent-elles assurer un transport de PS de manière préférentielle vers la membrane plasmique alors que l'appareil de Golgi contient également beaucoup de PI(4)P. La précision du transport ne dépend probablement pas de la capacité d'Osh6p à lier différemment les surfaces des organites en fonction de leur composition lipidique globale. Lorsque ses ligands sont présents, l'avidité d'Osh6p pour les membranes et son activité restent largement insensibles à la densité (jusqu'à 45%) et à la nature des lipides anioniques. On peut donc supposer que d'autres facteurs contribuent au ciblage du transport des lipides assuré par Osh6p, notamment les interactions protéine-protéine.

Lors de ma thèse, j'ai contribué à confirmer cette hypothèse en participant à la découverte d'une interaction entre Osh6p et Osh7p avec Ist2p. La protéine Ist2p appartient à la famille des TMEM16, elle est ancrée par huit domaines transmembranaires dans le RE et elle connecte la membrane plasmique avec une longue chaîne peptidique cytosolique. J'ai exploré le lien évolutif entre les homologues Osh6p/Osh7p des levures et les homologues d'Ist2p. Ceci a permis de révéler l'apparition, dans la chaîne peptidique d'Ist2p, d'un domaine conservé nécessaire à sa liaison avec Osh6p et Osh7p. L'apparition de ce domaine est concomitante à l'apparition d'un ensemble de résidus en surface d'Osh6p qui ont été sélectionnés durant l'évolution. Parmi ces résidus, nous avons trouvé qu'au moins deux d'entre eux sont essentiels pour permettre l'interaction d'Osh6p et d'Osh7p avec Ist2p. Ainsi, les deux échangeurs PS/PI(4)P ont évolué de concert avec le seul membre de la famille de TMEM16 chez les levures de manière à spécifier leur activité dans les sites de contact entre le RE et la membrane plasmique. Cela dévoile un nouveau

partenariat entre une LTP et un facteur d'ancrage membranaire. Osh6p (et Osh7p) semble s'associer à Ist2p pour former une entité moléculaire capable à la fois de connecter deux membranes cellulaires et de transférer des lipides entre elles, à l'instar des protéines ORP5 et ORP8. Cette interaction avec Ist2p, associée au mécanisme de commutation électrostatique pourrait permettre à Osh6p et Osh7p d'échanger à la fois rapidement et avec précision des lipides à l'interface RE/membrane plasmique. De nombreuses questions demeurent notamment sur la nature de l'interaction entre Osh6p et Ist2p. S'agit-il d'une interaction stable qui perdure le temps d'un cycle d'échange PS/PI(4)P auquel cas la région désordonnée d'Ist2p doit être suffisamment flexible pour assurer la liaison d'Osh6p avec le RE et la membrane plasmique ? S'agit-il d'une interaction transitoire et si oui pourquoi ? La phosphorylation d'Ist2p semblerait nécessaire à son interaction avec Osh6p et Osh7p, existe-t-il un mécanisme de régulation en amont ?

Par ailleurs, les mouvements interfeuillet de la PS dans la membrane du RE sont mal compris et, comme je l'ai indiqué dans l'introduction, il existe des données contradictoires sur la répartition de la PS entre le feuillet luminal et le feuillet cytosolique de la membrane du RE^{74,75}. Il n'est pas clair si Ist2p fonctionne comme une scramblase en plus de sa fonction de fixation des membranes^{51,390-392}. Ainsi, une question ouverte et passionnante est de savoir si Ist2p peut soutenir l'activité d'Osh6p en régulant la réserve de PS disponible sur le feuillet cytosolique du RE. Autrement dit, il s'agirait d'étudier le couplage entre deux mouvements lipidiques fondamentaux au sein de la cellule : un mouvement transmembranaire et un mouvement cytosolique. Nous pouvons envisager d'étudier cela *in vitro*. Le laboratoire projette, en collaboration avec l'équipe d'A. Čopič, de reconstituer la capacité du segment cytosolique Ist2p[590-947] : à créer des sites de contact membranaire artificiels entre liposomes ; à interagir avec Osh6p ; à modifier ses capacités d'extraction et d'échange de lipides. Le laboratoire collaborera également avec l'équipe de G. Lenoir qui tentera de reconstituer la protéine Ist2p entière dans des protéoliposomes pour voir si celle-ci forme des sites de contact artificiels et comment Ist2p et Osh6p interagissent et s'influencent mutuellement.

Récemment, il a été démontré que le transfert de PS par Osh6p/Osh7p, ainsi que les activités d'autres protéines Osh (probablement Osh4p), crée un environnement unique dans la membrane plasmique avec de la PS insaturée et des stérols, qui aide Mss4p à fabriquer du PI(4,5)P₂ à partir du PI(4)P³⁹³. Cela permet d'envisager de nouveaux liens

entre les flux de stérol, de PS et de PI(4)P, le métabolisme des PIPs et éventuellement l'activité d'Ist2p et d'autres facteurs de fixation dépendants du PI(4,5)P₂^{371,394,395}.

Finalement, cette thèse suggère que les échangeurs PS/PI(4)P mettent en œuvre des mécanismes uniques qui assurent l'homéostasie particulière de la PS dans les membranes de la cellule eucaryote. Ces mécanismes se sont adaptés aux propriétés anioniques de la PS et à l'environnement moléculaire particulier des sites de contacts entre le RE et la membrane plasmique.

Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre le comportement de deux lipides clés dans les membranes biologiques ainsi que le fonctionnement d'une nouvelle famille de protéines. Des modifications de l'activité d'ORP5/8 peuvent entraîner des dysfonctionnements cellulaires comme nous l'avons détaillé dans une revue récente disponible en annexe²⁸⁹. Par exemple, l'invasion des cellules cancéreuses du pancréas est renforcée par la surexpression d'ORP5 et réduite par l'appauvrissement de d'ORP5. L'analyse d'échantillons cliniques suggère que le mauvais pronostic du cancer du pancréas humain est lié à des niveaux élevés d'expression d'ORP5. Également ORP5 est fortement exprimée dans les tissus des tumeurs du poumon, en particulier ceux des cas métastatiques. En outre, ORP5 favorise la prolifération et la migration des cellules, en fonction de sa capacité à transférer des lipides. ORP5 régule positivement le complexe mTORC1, qui joue un rôle clé dans l'activation de la prolifération et de la survie des cellules. Une raison possible est que l'activation d'Akt, un important effecteur en amont de mTORC1, dépend fortement de son recrutement dans la membrane plasmique par la PS. Ceci soutient l'idée que toute dérégulation d'ORP5 peut fausser la capacité de signalisation de la cellule en altérant la teneur en lipides de la PM.

À terme, l'étude des échangeurs PS/PI(4)P aideront à mieux déchiffrer comment des protéines comme ORP5 mais aussi ORP8 modulent les caractéristiques de la membrane plasmique et à définir plus clairement leurs rôles dans certaines pathogénèses. Également, tous ces mécanismes de régulation de la charge de surface de la membrane plasmique pourraient être des cibles thérapeutiques d'intérêt dans le cadre de la lutte contre certaines pathologies virales³⁹⁶⁻³⁹⁸, certains troubles développementaux³⁹⁹, et à l'amélioration de l'espérance de vie⁴⁰⁰.

Bibliographie

1. Chan, Y.-H. M. & Marshall, W. F. Organelle Size Scaling of the Budding Yeast Vacuole Is Tuned by Membrane Trafficking Rates. *Biophys. J.* **106**, 1986–1996 (2014).
2. Wu, Y. *et al.* Contacts between the endoplasmic reticulum and other membranes in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E4859–E4867 (2017).
3. Zamponi, N. *et al.* Mitochondrial network complexity emerges from fission/fusion dynamics. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
4. Gobley, T. N. Recherche chimique sur les oeufs de carpe. *J. Pharm. Chim.* **17**, 401–417 (1850).
5. Thudichum, J. L. W. *A Treatise on the chemical constitution of the brain: based throughout upon original researches.* (Baillière, Tindall and Cox, 1884).
6. Bertrand, G. Projet de réforme de la nomenclature de Chimie biologique. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*. **V**, 96–109 (1923).
7. Wang, D.-N., Stieglitz, H., Marden, J. & Tamm, L. K. Benjamin Franklin, Philadelphia's Favorite Son, was a Membrane Biophysicist. *Biophys. J.* **104**, 287–291 (2013).
8. Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **39**, 1848–1906 (1917).
9. Danielli, J. F. & Davson, H. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Physiol.* **5**, 495–508 (1935).
10. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (80-)*. **175**, 720–731 (1972).
11. Fahy, E. *et al.* Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **50**, S9–S14 (2009).
12. Daum, G. *et al.* Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. *Yeast* **15**, 601–614 (1999).
13. Ejsing, C. S. *et al.* Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2136–2141 (2009).
14. Sampaio, J. L. *et al.* Membrane lipidome of an epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1903–1907 (2011).

15. Symons, J. L. *et al.* Lipidomic atlas of mammalian cell membranes reveals hierarchical variation induced by culture conditions, subcellular membranes, and cell lineages. *Soft Matter* **17**, 288–297 (2021).
16. Moncelli, M. R., Becucci, L. & Guidelli, R. The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes. *Biophys. J.* **66**, 1969–1980 (1994).
17. Andreyev, A. Y. *et al.* Subcellular organelle lipidomics in TLR-4-activated macrophages. *J. Lipid Res.* **51**, 2785–2797 (2010).
18. Tuller, G., Nemeč, T., Hrastnik, C. & Daum, G. Lipid composition of subcellular membranes of an FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. *Yeast* **15**, 1555–1564 (1999).
19. Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657 (2006).
20. Yang, Y., Lee, M. & Fairn, G. D. Phospholipid subcellular localization and dynamics. *J. Biol. Chem.* **293**, 6230–6240 (2018).
21. Arroyo-Olarte, R. D. & Gupta, N. Phosphatidylthreonine: An exclusive phospholipid regulating calcium homeostasis and virulence in a parasitic protist. *Microb. Cell* **3**, 189–190 (2016).
22. Levental, K. R. *et al.* Lipidomic and biophysical homeostasis of mammalian membranes counteracts dietary lipid perturbations to maintain cellular fitness. *Nat. Commun.* **11**, 1–13 (2020).
23. Feigenson, G. W. Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1788**, 47–52 (2009).
24. Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 175–191 (2018).
25. Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S. & Eggeling, C. The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 361–374 (2017).
26. Sasaki, H., Arai, H., Cocco, M. J. & White, S. H. pH dependence of sphingosine aggregation. *Biophys. J.* **96**, 2727–2733 (2009).

27. Ringgaard, L. *et al.* Tumor repolarization by an advanced liposomal drug delivery system provides a potent new approach for chemo-immunotherapy. **1**, 1–12 (2020).
28. Weinhold, F. & Klein, R. A. What is a hydrogen bond? Resonance covalency in the supramolecular domain. *Chem. Educ. Res. Pr.* **15**, 276–285 (2014).
29. Hirama, T. *et al.* Membrane curvature induced by proximity of anionic phospholipids can initiate endocytosis. *Nat. Commun.* **8**, 1393 (2017).
30. Vamparys, L. *et al.* Conical lipids in flat bilayers induce packing defects similar to that induced by positive curvature. *Biophys. J.* **104**, 585–593 (2013).
31. Gautier, R. *et al.* PackMem: A Versatile Tool to Compute and Visualize Interfacial Packing Defects in Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **115**, 436–444 (2018).
32. Platre, M. P. & Jaillais, Y. Anionic lipids and the maintenance of membrane electrostatics in eukaryotes. *Plant Signal. Behav.* **12**, 1–5 (2017).
33. Langner, M. & Kubica, K. The electrostatics of lipid surfaces. *Chem. Phys. Lipids* **101**, 3–35 (1999).
34. McLaughlin, S. The electrostatic properties of membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, 113–136 (1989).
35. Langner, M., Cafiso, D., Marcelja, S. & McLaughlin, S. Electrostatics of phosphoinositide bilayer membranes. Theoretical and experimental results. *Biophys. J.* **57**, 335–349 (1990).
36. Jurkiewicz, P., Cwiklik, L., Vojtíšková, A., Jungwirth, P. & Hof, M. Structure, dynamics, and hydration of POPC/POPS bilayers suspended in NaCl, KCl, and CsCl solutions. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 609–616 (2012).
37. Luna, C., Stroka, K. M., Bermudez, H. & Aranda-Espinoza, H. Thermodynamics of monolayers formed by mixtures of phosphatidylcholine/phosphatidylserine. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **85**, 293–300 (2011).
38. Melcrová, A. *et al.* The complex nature of calcium cation interactions with phospholipid bilayers. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
39. Graber, Z. T., Shi, Z. & Baumgart, T. Cations induce shape remodeling of negatively charged phospholipid membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 15285–15295

- (2017).
40. Yeung, T. *et al.* Contribution of phosphatidylserine to membrane surface charge and protein targeting during phagosome maturation. *J. Cell Biol.* **185**, 917–928 (2009).
 41. Uchida, Y. *et al.* Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 15846–15851 (2011).
 42. Xu, P., Baldrige, R. D., Chi, R. J., Burd, C. G. & Graham, T. R. Phosphatidylserine flipping enhances membrane curvature and negative charge required for vesicular transport. *J. Cell Biol.* **202**, 875–886 (2013).
 43. Cerbón, J. & Calderón, V. Surface potential regulation of phospholipid composition and in-out translocation in yeast. *Eur. J. Biochem.* **219**, 195–200 (1994).
 44. Fuller, J. C., Martinez, M. & Wade, R. C. On calculation of the electrostatic potential of a phosphatidylinositol phosphate-containing phosphatidylcholine lipid membrane accounting for membrane dynamics. *PLoS One* **9**, (2014).
 45. Yeung, T. *et al.* Membrane Phosphatidylserine Regulates Surface Charge and Protein Localization. *Science (80-.)*. **319**, 210–213 (2008).
 46. Haupt, A. & Minc, N. Gradients of phosphatidylserine contribute to plasma membrane charge localization and cell polarity in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **28**, 210–220 (2017).
 47. Platre, M. P. *et al.* A Combinatorial Lipid Code Shapes the Electrostatic Landscape of Plant Endomembranes. *Dev. Cell* **45**, 465–480.e11 (2018).
 48. Moser von Filseck, J. *et al.* Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science (80-.)*. **349**, 432–436 (2015).
 49. Richens, J. L. *et al.* Spontaneous charged lipid transfer between lipid vesicles. *Sci. Rep.* **7**, 12606 (2017).
 50. Bian, X., Saheki, Y. & De Camilli, P. Ca²⁺ releases E-Syt1 autoinhibition to couple ER-plasma membrane tethering with lipid transport. *EMBO J.* **37**, 219–234 (2018).
 51. Malvezzi, M. *et al.* Ca²⁺-dependent phospholipid scrambling by a reconstituted TMEM16 ion channel. *Nat. Commun.* **4**, 1–9 (2013).

52. Ye, W., Han, T. W., He, M., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Dynamic change of electrostatic field in TMEM16F permeation pathway shifts its ion selectivity. *Elife* **8**, 1–21 (2019).
53. Feng, S. *et al.* Cryo-EM Studies of TMEM16F Calcium-Activated Ion Channel Suggest Features Important for Lipid Scrambling. *Cell Rep.* **28**, 567–579.e4 (2019).
54. Zambrano, F., Fleischer, S. & Fleischer, B. Lipid composition of the golgi apparatus of rat kidney and liver in comparison with other subcellular organelles. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **380**, 357–369 (1975).
55. Hurlock, A. K., Roston, R. L., Wang, K. & Benning, C. Lipid Trafficking in Plant Cells. *Traffic* **15**, 915–932 (2014).
56. Blagović, B., Rupčić, J., Mesarić, M. & Marić, V. Lipid analysis of the plasma membrane and mitochondria of brewer's yeast. *Folia Microbiol. (Praha)*. **50**, 24–30 (2005).
57. Atilla-Gokcumen, G. E. *et al.* Dividing cells regulate their lipid composition and localization. *Cell* **156**, 428–439 (2014).
58. Aviram, R. *et al.* Lipidomics Analyses Reveal Temporal and Spatial Lipid Organization and Uncover Daily Oscillations in Intracellular Organelles. *Mol. Cell* **62**, 636–648 (2016).
59. Brown, D. J. & DuPont, F. M. Lipid composition of plasma membranes and endomembranes prepared from roots of barley (*hordeum vulgare* L.): Effects of salt. *Plant Physiol.* **90**, 955–961 (1989).
60. Vance, J. E. & Steenbergen, R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog. Lipid Res.* **44**, 207–234 (2005).
61. Van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124 (2008).
62. Van Meer, G. & De Kroon, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* **124**, 5–8 (2011).
63. Leventis, P. A. & Grinstein, S. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 407–427 (2010).
64. Drin, G. Topological Regulation of Lipid Balance in Cells. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 51–77 (2014).

65. Vance, J. E. Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells. *Traffic* **16**, 1–18 (2015).
66. Zinser, E. & Daum, G. Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 493–536 (1995).
67. Allan, D. Mapping the lipid distribution in the membranes of BHK cells (Mini-Review). *Mol. Membr. Biol.* **13**, 81–84 (1996).
68. Kriechbaumer, V. & Botchway, S. W. *The Plant Endoplasmic Reticulum. Methods in Molecular Biology* vol. 1691 (Springer New York, 2018).
69. Schneiter, R. *et al.* Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species cocomposition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **146**, 741–754 (1999).
70. Higgins, J. A. & Dawson, R. M. C. Asymmetry of the phospholipid bilayer of rat liver endoplasmic reticulum. *BBA - Biomembr.* **470**, 342–356 (1977).
71. Higgins, J. A. & Pigott, C. A. Asymmetric distribution of phosphatidylethanolamine in the endoplasmic reticulum demonstrated using trinitrobenzenesulphonic acid as a probe. *BBA - Biomembr.* **693**, 151–158 (1982).
72. Bollen, I. C. & Higgins, J. A. Phospholipid asymmetry in rough- and smooth-endoplasmic-reticulum membranes of untreated and phenobarbital-treated rat liver. *Biochem. J.* **189**, 475–480 (1980).
73. Op den Kamp, J. A. F. Lipid Asymmetry in Membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 47–71 (1979).
74. Fairn, G. D. *et al.* High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine. *J. Cell Biol.* **194**, 257–275 (2011).
75. Tsuji, T. *et al.* Predominant localization of phosphatidylserine at the cytoplasmic leaflet of the ER, and its TMEM16K-dependent redistribution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 13368–13373 (2019).
76. Lorent, J. H. *et al.* Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 644–652 (2020).
77. Patton, J. L. & Lester, R. L. The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces*

- cerevisiae are highly localized in the plasma membrane. *J. Bacteriol.* **173**, 3101–3108 (1991).
78. Van Den Hazel, H. B. *et al.* PDR16 and PDR17, two homologous genes of *Saccharomyces cerevisiae*, affect lipid biosynthesis and resistance to multiple drugs. *J. Biol. Chem.* **274**, 1934–1941 (1999).
 79. Patton, J. L. & Lester, R. L. The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J. Bacteriol.* **173**, 3101–3108 (1991).
 80. Menon, A. K. Sterol gradients in cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **53**, 37–43 (2018).
 81. Verkleij, A. . *et al.* The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **323**, 178–193 (1973).
 82. Cerbón, J. & Calderón, V. Changes of the compositional asymmetry of phospholipids associated to the increment in the membrane surface potential. *BBA - Biomembr.* **1067**, 139–144 (1991).
 83. Cerbon, J. & Calderon, V. Generation modulation and maintenance of the plasma membrane asymmetric phospholipid composition in yeast cells during growth: their relation to surface potential and membrane protein activity. *BBA - Biomembr.* **1235**, 100–106 (1995).
 84. Bigay, J. & Antonny, B. Curvature, Lipid Packing, and Electrostatics of Membrane Organelles: Defining Cellular Territories in Determining Specificity. *Dev. Cell* **23**, 886–895 (2012).
 85. Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657 (2006).
 86. Burke, J. E. Structural Basis for Regulation of Phosphoinositide Kinases and Their Involvement in Human Disease. *Mol. Cell* **71**, 653–673 (2018).
 87. Betts, M. J. & Russell, R. B. Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. in *Bioinformatics for Geneticists* vol. 4 289–316 (John Wiley & Sons, Ltd, 2003).
 88. Allen, K. N., Entova, S., Ray, L. C. & Imperiali, B. Monotopic Membrane Proteins Join

- the Fold. *Trends Biochem. Sci.* **44**, 7–20 (2019).
89. Burn, P. Talking point Amphitropic proteins: a new class of membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 79–83 (1988).
 90. Corbalan-Garcia, S. & Gómez-Fernández, J. C. Signaling through C2 domains: more than one lipid target. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 1536–47 (2014).
 91. Stahelin, R. V. Lipid binding domains: more than simple lipid effectors. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S299-304 (2009).
 92. Pemberton, J. G. & Balla, T. Polyphosphoinositide-Binding Domains: Insights from Peripheral Membrane and Lipid-Transfer Proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1111**, 77–137 (2019).
 93. Mayer, B. J., Ren, R., Clark, K. L. & Baltimore, D. A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* **73**, 629–630 (1993).
 94. Haslam, R. J., Koide, H. B. & Hemmings, B. A. Pleckstrin domain homology. *Nature* **363**, 309–310 (1993).
 95. Tyers, M. *et al.* Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets. *Nature* **333**, 470–473 (1988).
 96. Yu, J. W. *et al.* Genome-Wide Analysis of Membrane Targeting by *S. cerevisiae* Pleckstrin Homology Domains. *Mol. Cell* **13**, 677–688 (2004).
 97. Timm, D. *et al.* Crystal structure of the pleckstrin homology domain from dynamin. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 782–788 (1994).
 98. Yoon, H. S. *et al.* Solution structure of a pleckstrin-homology domain. *Nature* **369**, 672–675 (1994).
 99. Macias, M. J. *et al.* Structure of the pleckstrin homology domain from β -spectrin. *Nature* **369**, 675–677 (1994).
 100. Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. & Sigler, P. B. Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* **83**, 1037–1046 (1995).
 101. Yamamoto, E., Kalli, A. C., Yasuoka, K. & Sansom, M. S. P. Interactions of Pleckstrin Homology Domains with Membranes: Adding Back the Bilayer via High-

- Throughput Molecular Dynamics. *Structure* **24**, 1421–1431 (2016).
102. Lemmon, M. A., Ferguson, K. M. & Schlessinger, J. PH domains: Diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* **85**, 621–624 (1996).
 103. Rebecchi, M., Peterson, A. & McLaughlin, S. Phosphoinositide-specific phospholipase C- δ .1 binds with high affinity to phospholipid vesicles containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* **31**, 12742–12747 (1992).
 104. Cifuentes, M. E., Honkanen, L. & Rebecchi, M. J. Proteolytic fragments of phosphoinositide-specific phospholipase C- δ 1. Catalytic and membrane binding properties. *J. Biol. Chem.* **268**, 11586–93 (1993).
 105. Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S. & Fesik, S. W. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **371**, 168–170 (1994).
 106. Rameh, L. E. *et al.* A Comparative Analysis of the Phosphoinositide Binding Specificity of Pleckstrin Homology Domains. *J. Biol. Chem.* **272**, 22059–22066 (1997).
 107. Levine, T. P. & Munro, S. Targeting of Golgi-Specific Pleckstrin Homology Domains Involves Both PtdIns 4-Kinase-Dependent and -Independent Components. *Curr. Biol.* **12**, 695–704 (2002).
 108. Darvill, N. *et al.* Structural Basis of Phosphatidic Acid Sensing by APH in Apicomplexan Parasites. *Structure* **26**, 1059-1071.e6 (2018).
 109. Hyvönen, M. *et al.* Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *EMBO J.* **14**, 4676–4685 (1995).
 110. He, J. *et al.* Molecular basis of phosphatidylinositol 4-phosphate and ARF1 GTPase recognition by the FAPP1 Pleckstrin Homology (PH) domain. *J. Biol. Chem.* **286**, 18650–18657 (2011).
 111. Lenoir, M. *et al.* Structural basis of wedging the Golgi membrane by FAPP pleckstrin homology domains. *EMBO Rep.* **11**, 279–284 (2010).
 112. Liu, Y., Kahn, R. A. & Prestegard, J. H. Interaction of fapp1 with Arf1 and PI4P at a membrane surface: An example of coincidence detection. *Structure* **22**, 421–430

- (2014).
113. Lomize, A. L., Pogozheva, I. D., Lomize, M. A. & Mosberg, H. I. The role of hydrophobic interactions in positioning of peripheral proteins in membranes. *BMC Struct. Biol.* **7**, 1–30 (2007).
 114. Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Sigler, P. B. & Schlessinger, J. Scratching the surface with the PH domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2**, 715–718 (1995).
 115. Blomberg, N., Baraldi, E., Nilges, M. & Saraste, M. The PH superfold: a structural scaffold for multiple functions. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 441–445 (1999).
 116. Hammond, G. R. V., Sim, Y., Lagnado, L. & Irvine, R. F. Reversible binding and rapid diffusion of proteins in complex with inositol lipids serves to coordinate free movement with spatial information. *J. Cell Biol.* **184**, 297–308 (2009).
 117. Jian, X. *et al.* Molecular Basis for Cooperative Binding of Anionic Phospholipids to the PH Domain of the Arf GAP ASAP1. *Structure* **23**, 1977–1988 (2015).
 118. Roy, N. S., Yohe, M. E., Randazzo, P. A. & Gruschus, J. M. Allosteric properties of PH domains in Arf regulatory proteins. *Cell. Logist.* **6**, e1181700 (2016).
 119. Yamamoto, E. *et al.* Multiple lipid binding sites determine the affinity of PH domains for phosphoinositide-containing membranes. *Sci. Adv.* **6**, (2020).
 120. Huang, Y. H. *et al.* Positive regulation of Itk PH domain function by soluble IP4. *Science (80-.).* **316**, 886–889 (2007).
 121. Swanson, K. D. *et al.* The Skap-hom Dimerization and PH Domains Comprise a 3'-Phosphoinositide-Gated Molecular Switch. *Mol. Cell* **32**, 564–575 (2008).
 122. Jamecna, D. *et al.* An Intrinsically Disordered Region in OSBP Acts as an Entropic Barrier to Control Protein Dynamics and Orientation at Membrane Contact Sites. *Dev. Cell* **49**, 220-234.e8 (2019).
 123. Blackshear, P. J., Witters, L. A., Girard, P. R., Kuo, J. F. & Quamo, S. N. Growth factor-stimulated protein phosphorylation in 3T3-L1 cells. Evidence for protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.* **260**, 13304–15 (1985).
 124. Albert, K. A., Walaas, S. I., Wang, J. K. T. & Greengard, P. Widespread occurrence of '87 kDa,' a major specific substrate for protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 2822–2826 (1986).

125. Aderem, A. A. *et al.* Stimulus-dependent myristoylation of a major substrate for protein kinase C. *Nature* **332**, 362–364 (1988).
126. Bell, R. M. Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* **45**, 631–632 (1986).
127. Stumpo, D. J., Graff, J. M., Albert, K. A., Greengard, P. & Blackshear, P. J. Molecular cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding the '80- to 87-kDa' myristoylated alanine-rich C kinase substrate: a major cellular substrate for protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 4012–4016 (1989).
128. Graff, J., Gordon, J. & Blackshear, P. Myristoylated and nonmyristoylated forms of a protein are phosphorylated by protein kinase C. *Science (80-.)*. **246**, 503–506 (1989).
129. Graff, J. M., Young, T. N., Johnson, J. D. & Blackshear, P. J. Phosphorylation-regulated calmodulin binding to a prominent cellular substrate for protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **264**, 21818–23 (1989).
130. Jassal, B. *et al.* The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **48**, D498–D503 (2020).
131. Albert, K. A., Wu, W. C. S., Nairn, A. C. & Greengard, P. Inhibition by calmodulin of calcium/phospholipid-dependent protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 3622–3625 (1984).
132. McIlroy, B. K., Walters, J. D., Blackshear, P. J. & Johnson, J. D. Phosphorylation-dependent binding of a synthetic MARCKS peptide to calmodulin. *J. Biol. Chem.* **266**, 4959–64 (1991).
133. Chapline, C., Ramsay, K., Klauck, T. & Jaken, S. Interaction cloning of protein kinase C substrates. *J. Biol. Chem.* **268**, 6858–6861 (1993).
134. Kim, J., Mosior, M., Chung, L. A., Wu, H. & McLaughlin, S. Binding of peptides with basic residues to membranes containing acidic phospholipids. *Biophys. J.* **60**, 135–148 (1991).
135. Kim, J., Blackshear, P. J., Johnson, J. D. & McLaughlin, S. Phosphorylation reverses the membrane association of peptides that correspond to the basic domains of MARCKS and neuromodulin. *Biophys. J.* **67**, 227–237 (1994).

136. Kim, J., Shishido, T., Jiang, X., Aderem, A. & McLaughlin, S. Phosphorylation, high ionic strength, and calmodulin reverse the binding of MARCKS to phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* **269**, 28214–9 (1994).
137. Gallant, C., You, J. Y., Sasaki, Y., Grabarek, Z. & Morgan, K. G. MARCKS is a major PKC-dependent regulator of calmodulin targeting in smooth muscle. *J. Cell Sci.* **118**, 3595–3605 (2005).
138. El Amri, M., Fitzgerald, U. & Schlosser, G. MARCKS and MARCKS-like proteins in development and regeneration. *J. Biomed. Sci.* **25**, 1–12 (2018).
139. Perutz, M. F., Kendrew, J. C. & Watson, H. C. Structure and function of haemoglobin. *J. Mol. Biol.* **13**, 669–678 (1965).
140. Segrest, J. P., Jackson, R. L., Morrisett, J. D. & Gotto, A. M. A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *FEBS Lett.* **38**, 247–253 (1974).
141. Andersson, A. & Måler, L. NMR solution structure and dynamics of motilin in isotropic phospholipid bicellar solution. *J. Biomol. NMR* **24**, 103–12 (2002).
142. Liu, J. *et al.* Molecular details on the intermediate states of melittin action on a cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1860**, 2234–2241 (2018).
143. Haney, E. F., Hunter, H. N., Matsuzaki, K. & Vogel, H. J. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: Linking structure to function? *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1788**, 1639–1655 (2009).
144. Seelig, J. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1666**, 40–50 (2004).
145. Eisenberg, D., Weiss, R. M. & Terwilliger, T. C. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature* **299**, 371–374 (1982).
146. Drin, G. & Antonny, B. Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Lett.* **584**, 1840–1847 (2010).
147. Wieprecht, T. *et al.* Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry* **36**, 6124–6132 (1997).
148. Fernández-Vidal, M., Jayasinghe, S., Ladokhin, A. S. & White, S. H. Folding Amphipathic Helices Into Membranes: Amphiphilicity Trumps Hydrophobicity. *J.*

- Mol. Biol.* **370**, 459–470 (2007).
149. Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M. & Bienert, M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* **501**, 146–150 (2001).
 150. Lee, J. K. *et al.* A Proline-Hinge Alters the Characteristics of the Amphipathic α -helical AMPs. *PLoS One* **8**, e67597 (2013).
 151. Wieprecht, T., Apostolov, O., Beyermann, M. & Seelig, J. Thermodynamics of the α -helix-coil transition of amphipathic peptides in a membrane environment: implications for the peptide-membrane binding equilibrium 1 Edited by W. Baumeister. *J. Mol. Biol.* **294**, 785–794 (1999).
 152. Gautier, R., Douguet, D., Antony, B. & Drin, G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics* **24**, 2101–2102 (2008).
 153. Donaldson, J. G. & Jackson, C. L. ARF family G proteins and their regulators: Roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 362–375 (2011).
 154. Beacham, G. M., Partlow, E. A. & Hollopeter, G. Conformational regulation of AP1 and AP2 clathrin adaptor complexes. *Traffic* **20**, 741–751 (2019).
 155. Arakel, E. C. & Schwappach, B. Formation of COPI-coated vesicles at a glance. *J. Cell Sci.* **131**, jcs209890 (2018).
 156. Weiss, O., Holden, J., Rulka, C. & Kahn, R. A. Nucleotide binding and cofactor activities of purified bovine brain and bacterially expressed ADP-ribosylation factor. *J. Biol. Chem.* **264**, 21066–21072 (1989).
 157. Palmer, D. J., Helms, J. B., Beckers, C. J. M., Orci, L. & Rothman, J. E. Binding of coatamer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *J. Biol. Chem.* **268**, 12083–12089 (1993).
 158. Orci, L., Palmer, D. J., Amherdt, M. & Rothman, J. E. Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatamer and ARF proteins from the cytosol. *Nature* **364**, 732–734 (1993).
 159. Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. & Paris, S. Myristoylation is not required for GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor ARF1 to phospholipids. *J. Biol. Chem.*

- 268**, 24531–24534 (1993).
160. Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. & Paris, S. Myristoylation of ADP-ribosylation Factor 1 Facilitates Nucleotide Exchange at Physiological Mg Levels. *J. Biol. Chem.* **270**, 1337–1341 (1995).
 161. Kahn, R. A. *et al.* The amino terminus of ADP-ribosylation factor (ARF) is a critical determinant of ARF activities and is a potent and specific inhibitor of protein transport. *J. Biol. Chem.* **267**, 13039–13046 (1992).
 162. Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. & Chabre, M. N-Terminal Hydrophobic Residues of the G-Protein ADP-Ribosylation Factor-1 Insert into Membrane Phospholipids upon GDP to GTP Exchange †. *Biochemistry* **36**, 4675–4684 (1997).
 163. Liu, Y., Kahn, R. A. & Prestegard, J. H. Structure and Membrane Interaction of Myristoylated ARF1. *Structure* **17**, 79–87 (2009).
 164. Antonny, B., Huber, I., Paris, S., Chabre, M. & Cassel, D. Activation of ADP-ribosylation Factor 1 GTPase-Activating Protein by Phosphatidylcholine-derived Diacylglycerols. *J. Biol. Chem.* **272**, 30848–30851 (1997).
 165. Bigay, J., Gounon, P., Roblneau, S. & Antonny, B. Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* **426**, 563–566 (2003).
 166. Bigay, J., Casella, J. F., Drin, G., Mesmin, B. & Antonny, B. ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J.* **24**, 2244–2253 (2005).
 167. Drin, G. *et al.* A general amphipathic α -helical motif for sensing membrane curvature. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 138–146 (2007).
 168. Vanni, S. *et al.* Amphipathic Lipid Packing Sensor Motifs: Probing Bilayer Defects with Hydrophobic Residues. *Biophys. J.* **104**, 575–584 (2013).
 169. Zhao, X., Lasell, T. K. R. & Melançon, P. Localization of Large ADP-Ribosylation Factor-Guanine Nucleotide Exchange Factors to Different Golgi Compartments: Evidence for Distinct Functions in Protein Traffic. *Mol. Biol. Cell* **13**, 119–133 (2002).
 170. Szul, T. *et al.* Dissecting the role of the ARF guanine nucleotide exchange factor GBF1

- in Golgi biogenesis and protein trafficking. *J. Cell Sci.* **120**, 3929–3940 (2007).
171. Dumaresq-Doiron, K., Savard, M.-F., Akam, S., Costantino, S. & Lefrancois, S. The phosphatidylinositol 4-kinase PI4KIII is required for the recruitment of GBF1 to Golgi membranes. *J. Cell Sci.* **123**, 2273–2280 (2010).
 172. Quilty, D. *et al.* The Arf-GDP-regulated recruitment of GBF1 to Golgi membranes requires domains HDS1 and HDS2 and a Golgi-localized protein receptor. *J. Cell Sci.* **132**, jcs208199 (2019).
 173. Coleman, R. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.* **43**, 134–176 (2004).
 174. Yamashita, A. *et al.* Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog. Lipid Res.* **53**, 18–81 (2014).
 175. Athenstaedt, K. & Daum, G. Biosynthesis of phosphatidic acid in lipid particles and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**, 7611–7616 (1997).
 176. Benghezal, M., Roubaty, C., Veepuri, V., Knudsen, J. & Conzelmann, A. SLC1 and SLC4 encode partially redundant acyl-coenzyme A 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferases of budding yeast. *J. Biol. Chem.* **282**, 30845–30855 (2007).
 177. Jain, S. *et al.* Identification of a Novel Lysophospholipid Acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **282**, 30562–30569 (2007).
 178. Riekhof, W. R. *et al.* Lysophosphatidylcholine Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **282**, 36853–36861 (2007).
 179. Ayciriex, S. *et al.* YPR139c/LOA1 encodes a novel lysophosphatidic acid acyltransferase associated with lipid droplets and involved in TAG homeostasis. *Mol. Biol. Cell* **23**, 233–246 (2012).
 180. Tattrie, N. H. Positional distribution of saturated and unsaturated fatty acids on egg lecithin. *J. Lipid Res.* **1**, 60–65 (1959).
 181. Hanahan, D. J., Brockerhoff, H. & Barron, E. J. The site of attack of phospholipase (lecithinase) A on lecithin: a re-evaluation. Position of fatty acids on lecithins and triglycerides. *J. Biol. Chem.* **235**, 1917–23 (1960).

182. Lands, W. E. & Merkl, I. Metabolism of glycerolipids. III. Reactivity of various acyl esters of coenzyme A with alpha'-acylglycerophosphorylcholine, and positional specificities in lecithin synthesis. *J. Biol. Chem.* **238**, 898–904 (1963).
183. Yabuuchi, H. & O'Brien, J. S. Positional distribution of fatty acids in glycerophosphatides of bovine gray matter. *J. Lipid Res.* **9**, 65–7 (1968).
184. Donkor, J., Sariahmetoglu, M., Dewald, J., Brindley, D. N. & Reue, K. Three Mammalian Lipins Act as Phosphatidate Phosphatases with Distinct Tissue Expression Patterns. *J. Biol. Chem.* **282**, 3450–3457 (2006).
185. Zhang, P. & Reue, K. Lipin proteins and glycerolipid metabolism: Roles at the ER membrane and beyond. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1859**, 1583–1595 (2017).
186. Han, G.-S., Wu, W.-I. & Carman, G. M. The *Saccharomyces cerevisiae* Lipin Homolog Is a Mg²⁺-dependent Phosphatidate Phosphatase Enzyme. *J. Biol. Chem.* **281**, 9210–9218 (2006).
187. Chae, M., Han, G.-S. & Carman, G. M. The *Saccharomyces cerevisiae* Actin Patch Protein App1p Is a Phosphatidate Phosphatase Enzyme. *J. Biol. Chem.* **287**, 40186–40196 (2012).
188. Carman, G. M. Discoveries of the phosphatidate phosphatase genes in yeast published in the Journal of Biological Chemistry. *J. Biol. Chem.* **294**, 1681–1689 (2019).
189. Carter, J. R. & Kennedy, E. P. Enzymatic synthesis of cytidine diphosphate diglyceride. *J. Lipid Res.* **7**, 678–83 (1966).
190. Liu, X., Yin, Y., Wu, J. & Liu, Z. Structure and mechanism of an intramembrane liponucleotide synthetase central for phospholipid biosynthesis. *Nat. Commun.* **5**, 4244 (2014).
191. Volta, M. *et al.* Identification and Characterization of CDS2, a Mammalian Homolog of the *Drosophila* CDP-diacylglycerol Synthase Gene. *Genomics* **55**, 68–77 (1999).
192. Inglis-Broadgate, S. L. *et al.* Isolation and characterization of murine Cds (CDP-diacylglycerol synthase) 1 and 2. *Gene* **356**, 19–31 (2005).
193. D'Souza, K., Kim, Y. J., Balla, T. & Epand, R. M. Distinct Properties of the Two Isoforms

- of CDP-Diacylglycerol Synthase. *Biochemistry* **53**, 7358–7367 (2014).
194. Wenk, M. R. *et al.* Phosphoinositide profiling in complex lipid mixtures using electrospray ionization mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **21**, 813–817 (2003).
 195. Wang, C. *et al.* Comprehensive and Quantitative Analysis of Polyphosphoinositide Species by Shotgun Lipidomics Revealed Their Alterations in db/db Mouse Brain. *Anal. Chem.* **88**, 12137–12144 (2016).
 196. Traynor-Kaplan, A. *et al.* Fatty-acyl chain profiles of cellular phosphoinositides. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1862**, 513–522 (2017).
 197. Shen, H., Heacock, P. N., Clancey, C. J. & Dowhan, W. The CDS1 gene encoding CDP-diacylglycerol synthase in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for cell growth. *J. Biol. Chem.* **271**, 789–795 (1996).
 198. Tamura, Y. *et al.* Tam41 Is a CDP-Diacylglycerol Synthase Required for Cardiolipin Biosynthesis in Mitochondria. *Cell Metab.* **17**, 709–718 (2013).
 199. Blunsom, N. J., Gomez-Espinosa, E., Ashlin, T. G. & Cockcroft, S. Mitochondrial CDP-diacylglycerol synthase activity is due to the peripheral protein, TAMM41 and not due to the integral membrane protein, CDP-diacylglycerol synthase 1. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1863**, 284–298 (2018).
 200. Jiao, H., Yin, Y. & Liu, Z. Structures of the Mitochondrial CDP-DAG Synthase Tam41 Suggest a Potential Lipid Substrate Pathway from Membrane to the Active Site. *Structure* **27**, 1258-1269.e4 (2019).
 201. Blunsom, N. J. & Cockcroft, S. CDP-Diacylglycerol Synthases (CDS): Gateway to Phosphatidylinositol and Cardiolipin Synthesis. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
 202. Clarke, O. B. *et al.* Structural basis for phosphatidylinositol-phosphate biosynthesis. *Nat. Commun.* **6**, 8505 (2015).
 203. AGRANOFF, B. W., BRADLEY, R. M. & BRADY, R. O. The enzymatic synthesis of inositol phosphatide. *J. Biol. Chem.* **233**, 1077–83 (1958).
 204. PAULUS, H. & KENNEDY, E. P. The enzymatic synthesis of inositol monophosphate. *J. Biol. Chem.* **235**, 1303–1311 (1960).
 205. Nikawa, J. & Yamashita, S. Molecular cloning of the gene encoding CDPdiacylglycerol-inositol 3-phosphatidyl transferase in *Saccharomyces*

- cerevisiae. *Eur. J. Biochem.* **143**, 251–256 (1984).
206. Antonsson, B. E. Purification and characterization of phosphatidylinositol synthase from human placenta. *Biochem. J.* **297**, 517–522 (1994).
207. Monaco, M. E., Feldman, M. & Kleinberg, D. L. Identification of rat liver phosphatidylinositol synthase as a 21 kDa protein. *Biochem. J.* **304**, 301–305 (1994).
208. Lykidis, A., Jackson, P. D., Rock, C. O. & Jackowski, S. The Role of CDP-Diacylglycerol Synthetase and Phosphatidylinositol Synthase Activity Levels in the Regulation of Cellular Phosphatidylinositol Content. *J. Biol. Chem.* **272**, 33402–33409 (1997).
209. Bruto, M., Prigent-Combaret, C., Luis, P., Moënne-Loccoz, Y. & Muller, D. Frequent, independent transfers of a catabolic gene from bacteria to contrasted filamentous eukaryotes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **281**, 20140848 (2014).
210. Kanfer, J. & Kennedy, E. P. Metabolism and function of bacterial lipids. II. Biosynthesis of phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **239**, 1720–6 (1964).
211. Steiner, M. R. & Lester, R. L. In vitro studies of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **260**, 222–243 (1972).
212. Lindegren, G., Hwang, Y. L., Oshima, Y. & Lindegren, C. C. Genetical mutants induced by ethyl methanesulfonate in *Saccharomyces*. *Can. J. Genet. Cytol.* **7**, 491–499 (1965).
213. Atkinson, K. D. *et al.* Yeast mutants auxotrophic for choline or ethanolamine. *J. Bacteriol.* **141**, 558–564 (1980).
214. Atkinson, K., Fogel, S. & Henry, S. A. Yeast mutant defective in phosphatidylserine synthesis. *J. Biol. Chem.* **255**, 6653–61 (1980).
215. Nikawa, J.-I. & Yamashita, S. Characterization of phosphatidylserine synthase from *saccharomyces cerevisiae* and a mutant defective in the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **665**, 420–4260 (1981).
216. Ho, B., Baryshnikova, A. & Brown, G. W. Unification of Protein Abundance Datasets Yields a Quantitative *Saccharomyces cerevisiae* Proteome. *Cell Syst.* **6**, 192-205.e3 (2018).

217. Letts, V. A., Klig, L. S., Bae-Lee, M., Carman, G. M. & Henry, S. A. Isolation of the yeast structural gene for the membrane-associated enzyme phosphatidylserine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 7279–7283 (1983).
218. Letts, V. A. & Henry, S. A. Regulation of phospholipid synthesis in phosphatidylserine synthase-deficient (chol) mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **163**, 560–567 (1985).
219. Waechter, C. J., Steiner, M. R. & Lester, R. L. Regulation of Phosphatidylcholine Biosynthesis by the Methylation Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **244**, 3419–3422 (1969).
220. Waechter, C. J. & Lester, R. L. Differential regulation of the N-methyl transferases responsible for phosphatidylcholine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **158**, 401–410 (1973).
221. Summers, E. F., Letts, V. A., McGraw, P. & Henry, S. A. *Saccharomyces cerevisiae* cho2 mutants are deficient in phospholipid methylation and cross-pathway regulation of inositol synthesis. *Genetics* **120**, 909 LP – 922 (1988).
222. KODAKI, T. & YAMASHITA, S. Characterization of the methyltransferases in the yeast phosphatidylethanolamine methylation pathway by selective gene disruption. *Eur. J. Biochem.* **185**, 243–251 (1989).
223. Trotter, P. J. & Voelker, D. R. Identification of a Non-mitochondrial Phosphatidylserine Decarboxylase Activity (PSD2) in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**, 6062–6070 (1995).
224. Fairn, G. D., Hermansson, M., Somerharju, P. & Grinstein, S. Phosphatidylserine is polarized and required for proper Cdc42 localization and for development of cell polarity. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1424–1430 (2011).
225. Turchetto-Zolet, A. C. *et al.* Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. *BMC Evol. Biol.* **11**, 263 (2011).
226. Zweytick, D. *et al.* Contribution of Are1p and Are2p to steryl ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1075–1082 (2000).
227. Oelkers, P. *et al.* A Lecithin Cholesterol Acyltransferase-like Gene Mediates

- Diacylglycerol Esterification in Yeast. *J. Biol. Chem.* **275**, 15609–15612 (2000).
228. Sorger, D. & Daum, G. Synthesis of Triacylglycerols by the Acyl-Coenzyme A:Diacylglycerol Acyltransferase Dga1p in Lipid Particles of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **184**, 519–524 (2002).
229. Wirtz, K. W. & Zilversmit, D. B. Exchange of phospholipids between liver mitochondria and microsomes in vitro. *J. Biol. Chem.* **243**, 3596–602 (1968).
230. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238–252 (1965).
231. Saunders, L., Perrin, J. & Gammack, D. ULTRASONIC IRRADIATION OF SOME PHOSPHOLIPID SOLS. *J. Pharm. Pharmacol.* **14**, 567–572 (1962).
232. Szoka, F. & Papahadjopoulos, D. Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**, 467–508 (1980).
233. Wetterau, J. R. & Zilversmit, D. B. Quantitation of lipid transfer activity. *Methods Biochem. Anal.* **30**, 199–226 (1984).
234. Maeda, T. & Ohnishi, S. Membrane fusion. Transfer of phospholipid molecules between phospholipid bilayer membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 1509–1516 (1974).
235. Machida, K. & Ohnishi, S.-I. A spin-label study of phosphatidylcholine exchange protein. Regulation of the activity by phosphatidylserine and calcium ion. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **507**, 156–164 (1978).
236. Somerharju, P., Brockerhoff, H. & Wirtz, K. W. A. A new fluorimetric method to measure protein-catalyzed phospholipid transfer using 1-acyl-2-parinaroylphosphatidylcholine. *BBA - Biomembr.* **649**, 521–528 (1981).
237. Gupta, C. M., Radhakrishnan, R. & Khorana, H. G. Glycerophospholipid synthesis: improved general method and new analogs containing photoactivable groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 4315–4319 (1977).
238. Roseman, M. A. & Thompson, T. E. Mechanism of the Spontaneous Transfer of Phospholipids between Bilayers. *Biochemistry* **19**, 439–444 (1980).
239. Pagano, R. & Sleight, R. Defining lipid transport pathways in animal cells. *Science*

- (80-). **229**, 1051–1057 (1985).
240. Wirtz, K. W. A. Phospholipid Transfer Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 73–99 (1991).
 241. Bankaitis, V. A., Aitken, J. R., Cleves, A. E. & Dowhan, W. An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* **347**, 561–562 (1990).
 242. Dickeson, S. K. *et al.* Isolation and sequence of cDNA clones encoding rat phosphatidylinositol transfer protein. *J. Biol. Chem.* **264**, 16557–16564 (1989).
 243. Devaux, P. F., Moonen, P., Bienvenue, A. & Wirtz, K. W. A. Lipid-protein interaction in the phosphatidylcholine exchange protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 1807–1810 (1977).
 244. Berkhout, T. A., Wirtz, K. W. A. & Visser, A. J. W. G. Static and Time-Resolved Fluorescence Studies of Fluorescent Phosphatidylcholine Bound to the Phosphatidylcholine Transfer Protein of Bovine Liver. *Biochemistry* **23**, 1505–1513 (1984).
 245. Kasurinen, J., Somerharju, P., van Paridon, P. A. & Wirtz, K. W. A. Affinity of Phosphatidylcholine Molecular Species for the Bovine Phosphatidylcholine and Phosphatidylinositol Transfer Proteins. Properties of the sn-1 and sn-2 Acyl Binding Sites. *Biochemistry* **29**, 8548–8554 (1990).
 246. Van Paridon, P. A., Gadella, T. W. J., Somerharju, P. J. & Gadella Wirtz, K. W. A. Properties of the Binding Sites for the sn-1 and sn-2 Acyl Chains on the Phosphatidylinositol Transfer Protein from Bovine Brain. *Biochemistry* **27**, 6208–6214 (1988).
 247. Pebay-Peyroula, E., Cohen-Addad, C., Lehmann, M. S. & Marion, D. Crystallographic data for the 9000 dalton wheat non-specific phospholipid transfer protein. *J. Mol. Biol.* **226**, 563–564 (1992).
 248. Shin, D. H., Lee, J. Y., Hwang, K. Y., Kyu Kim, K. & Suh, S. W. High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure* **3**, 189–199 (1995).
 249. Lerche, M. H., Kragelund, B. B., Bech, L. M. & Poulsen, F. M. Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: the structure reveals a hydrophobic binding

- site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands. *Structure* **5**, 291–306 (1997).
250. Finkina, E. I., Melnikova, D. N., Bogdanov, I. V. & Ovchinnikova, T. V. Lipid transfer proteins as components of the plant innate immune system: Structure, functions, and applications. *Acta Naturae* **8**, 47–61 (2016).
251. Sha, B., Phillips, S. E., Bankaitis, V. A. & Luo, M. Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol- transfer protein. *Nature* **391**, 506–510 (1998).
252. Dittman, J. S. & Menon, A. K. Speed Limits for Nonvesicular Intracellular Sterol Transport. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 90–97 (2017).
253. Wong, L. H., Gatta, A. T. & Levine, T. P. Lipid transfer proteins: the lipid commute via shuttles, bridges and tubes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 85–101 (2019).
254. Gadella, T. W. & Wirtz, K. W. Phospholipid binding and transfer by the nonspecific lipid-transfer protein (sterol carrier protein 2). A kinetic model. *Eur. J. Biochem.* **220**, 1019–28 (1994).
255. Tomasetto, C. *et al.* Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics* vol. 28 367–376 (1995).
256. Wilhelm, L. P. *et al.* STARD 3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites . *EMBO J.* **36**, 1412–1433 (2017).
257. Alpy, F. *et al.* The Steroidogenic Acute Regulatory Protein Homolog MLN64, a Late Endosomal Cholesterol-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 4261–4269 (2001).
258. Voilquin, L. *et al.* STARD3: A Swiss Army Knife for Intracellular Cholesterol Transport. *Contact* **2**, 251525641985673 (2019).
259. Iyer, L. M., Koonin, E. V. & Aravind, L. Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **43**, 134–144 (2001).
260. Gajhede, M. *et al.* X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 1040–1045 (1996).
261. Létourneau, D., Lefebvre, A., Lavigne, P. & LeHoux, J. G. The binding site specificity

- of STARD4 subfamily: Breaking the cholesterol paradigm. *Mol. Cell. Endocrinol.* **408**, 53–61 (2014).
262. Iaea, D. B., Dikiy, I., Kiburu, I., Eliezer, D. & Maxfield, F. R. STARD4 Membrane Interactions and Sterol Binding. *Biochemistry* **54**, 4623–4636 (2015).
263. Mesmin, B. *et al.* STARD4 abundance regulates sterol transport and sensing. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4004–4015 (2011).
264. Wong, L. H. & Levine, T. P. Lipid transfer proteins do their thing anchored at membrane contact sites . . . but what is their thing? *Biochem. Soc. Trans.* **44**, 517–527 (2016).
265. Helmkamp, G. M., Harvey, M. S., Wirtz, K. W. & Van Deenen, L. L. Phospholipid exchange between membranes. Purification of bovine brain proteins that preferentially catalyze the transfer of phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* **249**, 6382–9 (1974).
266. Cockcroft, S. & Garner, K. Function of the phosphatidylinositol transfer protein gene family: Is phosphatidylinositol transfer the mechanism of action? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 89–117 (2011).
267. Wyckoff, G. J., Solidar, A. & Yoder, M. D. Phosphatidylinositol transfer proteins: sequence motifs in structural and evolutionary analyses. *J. Biomed. Sci. Eng.* **03**, 65–77 (2010).
268. Yoder, M. D. *et al.* Structure of a Multifunctional Protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 9246–9252 (2001).
269. Schouten, A. *et al.* Structure of apo-phosphatidylinositol transfer protein α provides insight into membrane association. *EMBO J.* **21**, 2117–2121 (2002).
270. Tilley, S. J. *et al.* Structure-Function Analysis of Phosphatidylinositol Transfer Protein Alpha Bound to Human Phosphatidylinositol. *Structure* **12**, 317–326 (2004).
271. Vordtriede, P. B., Doan, C. N., Tremblay, J. M., Helmkamp, G. M. & Yoder, M. D. Structure of PITP β in Complex with Phosphatidylcholine: Comparison of Structure and Lipid Transfer to Other PITP Isoforms \dagger , \ddagger . *Biochemistry* **44**, 14760–14771 (2005).

272. Van Paridon, P. A., Gadella, T. W. J., Somerharju, P. J. & Wirtz, K. W. A. On the relationship between the dual specificity of the bovine brain phosphatidylinositol transfer protein and membrane phosphatidylinositol levels. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **903**, 68–77 (1987).
273. Ségui, B., Allen-Baume, V. & Cockcroft, S. Phosphatidylinositol transfer protein β displays minimal sphingomyelin transfer activity and is not required for biosynthesis and trafficking of sphingomyelin. *Biochem. J.* **366**, 23–34 (2002).
274. Tremblay, J. M., Li, H., Yarbrough, L. R. & Helmkamp, G. M. Modifications of Cysteine Residues in the Solution and Membrane-Associated Conformations of Phosphatidylinositol Transfer Protein Have Differential Effects on Lipid Transfer Activity †. *Biochemistry* **40**, 9151–9158 (2001).
275. Shadan, S. *et al.* Dynamics of lipid transfer by phosphatidylinositol transfer proteins in cells. *Traffic* **9**, 1743–1756 (2008).
276. Michell, R. H. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **415**, 81–147 (1975).
277. Saito, S., Goto, K., Tonosaki, A. & Kondo, H. Gene Cloning and Characterization of CDP-diacylglycerol Synthase from Rat Brain. *J. Biol. Chem.* **272**, 9503–9509 (1997).
278. Cai, J., Abramovici, H., Gee, S. H. & Topham, M. K. Diacylglycerol kinases as sources of phosphatidic acid. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 942–948 (2009).
279. Calleja, V., Laguerre, M., Parker, P. J. & Larijani, B. Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: Structural mechanism for allosteric inhibition. *PLoS Biol.* **7**, (2009).
280. Thomas, G. M. H. *et al.* An essential role for phosphatidylinositol transfer protein in phospholipase C-Mediated inositol lipid signaling. *Cell* **74**, 919–928 (1993).
281. Stubbs, E. B. & Agranoff, B. W. Lithium Enhances Muscarinic Receptor–Stimulated CDP-Diacylglycerol Formation in Inositol-Depleted SK-N-SH Neuroblastoma Cells. *J. Neurochem.* **60**, 1292–1299 (1993).
282. Vihtelic, T., Goebel, M., Milligan, S., O'Tousa, J. & Hyde, D. Localization of Drosophila retinal degeneration B, a membrane-associated phosphatidylinositol transfer

- protein. *J. Cell Biol.* **122**, 1013–1022 (1993).
283. Milligan, S. C., Alb, J. G., Elagina, R. B., Bankaitis, V. A. & Hyde, D. R. The Phosphatidylinositol Transfer Protein Domain of Drosophila Retinal Degeneration B Protein Is Essential for Photoreceptor Cell Survival and Recovery from Light Stimulation. *J. Cell Biol.* **139**, 351–363 (1997).
284. Amarilio, R., Ramachandran, S., Sabanay, H. & Lev, S. Differential Regulation of Endoplasmic Reticulum Structure through VAP-Nir Protein Interaction. *J. Biol. Chem.* **280**, 5934–5944 (2005).
285. Kim, S. *et al.* The phosphatidylinositol-transfer protein Nir2 binds phosphatidic acid and positively regulates phosphoinositide signalling. *EMBO Rep.* **14**, 891–899 (2013).
286. Chang, C.-L. *et al.* Feedback Regulation of Receptor-Induced Ca²⁺ Signaling Mediated by E-Syt1 and Nir2 at Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions. *Cell Rep.* **5**, 813–825 (2013).
287. Yadav, S. *et al.* RDGB α , a PtdIns-PtdOH transfer protein, regulates G-proteincoupled PtdIns(4,5)P₂ signalling during Drosophila phototransduction. *J. Cell Sci.* **128**, 3330–3344 (2015).
288. Chang, C.-L. & Liou, J. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Homeostasis Regulated by Nir2 and Nir3 Proteins at Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions. *J. Biol. Chem.* **290**, 14289–14301 (2015).
289. Lipp, N.-F., Ikhlef, S., Milanini, J. & Drin, G. Lipid Exchangers: Cellular Functions and Mechanistic Links With Phosphoinositide Metabolism. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 1–27 (2020).
290. Bankaitis, V. A., Malehorn, D. E., Emr, S. D. & Greene, R. The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *J. Cell Biol.* **108**, 1271–1281 (1989).
291. Cleves, A. E., Novick, P. J. & Bankaitis, V. A. Mutations in the SAC1 gene suppress defects in yeast Golgi and yeast actin function. *J. Cell Biol.* **109**, 2939–50 (1989).
292. Whitters, E., Cleves, A., McGee, T., Skinner, H. & Bankaitis, V. SAC1p is an integral

- membrane protein that influences the cellular requirement for phospholipid transfer protein function and inositol in yeast. *J. Cell Biol.* **122**, 79–94 (1993).
293. Rivas, M. P. *et al.* Pleiotropic Alterations in Lipid Metabolism in Yeast *sac1* Mutants: Relationship to “Bypass Sec14p” and Inositol Auxotrophy. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2235–2250 (1999).
 294. Hama, H., Schnieders, E. A., Thorner, J., Takemoto, J. Y. & DeWald, D. B. Direct Involvement of Phosphatidylinositol 4-Phosphate in Secretion in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **274**, 34294–34300 (1999).
 295. Cleves, A. E. *et al.* Mutations in the CDP-choline pathway for phospholipid biosynthesis bypass the requirement for an essential phospholipid transfer protein. *Cell* **64**, 789–800 (1991).
 296. Xie, Z., Fang, M. & Bankaitis, V. A. Evidence for an intrinsic toxicity of phosphatidylcholine to Sec14p-dependent protein transport from the yeast Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1117–1129 (2001).
 297. Xie, Z. *et al.* Phospholipase D activity is required for suppression of yeast phosphatidylinositol transfer protein defects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 12346–12351 (1998).
 298. Fang, M. *et al.* Kes1p shares homology with human oxysterol binding protein and participates in a novel regulatory pathway for yeast Golgi-derived transport vesicle biogenesis. *EMBO J.* **15**, 6447–6459 (1996).
 299. Wang, Y. J. *et al.* Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* **114**, 299–310 (2003).
 300. Wang, J. *et al.* PI4P Promotes the Recruitment of the GGA Adaptor Proteins to the Trans -Golgi Network and Regulates Their Recognition of the Ubiquitin Sorting Signal. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2646–2655 (2007).
 301. Demmel, L. *et al.* The Clathrin Adaptor Gga2p Is a Phosphatidylinositol 4-phosphate Effector at the Golgi Exit. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1991–2002 (2008).
 302. Phillips, S. E. *et al.* Yeast Sec14p deficient in phosphatidylinositol transfer activity is functional in vivo. *Mol. Cell* **4**, 187–197 (1999).
 303. Schaaf, G. *et al.* Functional Anatomy of Phospholipid Binding and Regulation of

- Phosphoinositide Homeostasis by Proteins of the Sec14 Superfamily. *Mol. Cell* **29**, 191–206 (2008).
304. Panagabko, C. *et al.* Ligand specificity in the CRAL-TRIO protein family. *Biochemistry* **42**, 6467–6474 (2003).
305. Panagabko, C., Baptist, M. & Atkinson, J. In vitro lipid transfer assays of phosphatidylinositol transfer proteins provide insight into the in vivo mechanism of ligand transfer. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1861**, 619–630 (2019).
306. Szolderits, G., Hermetter, A., Paltauf, F. & Daum, G. Membrane properties modulate the activity of a phosphatidylinositol transfer protein from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA - Biomembr.* **986**, 301–309 (1989).
307. Aitken, J. F., Van Heusden, G. P. H., Temkin, M. & Dowhan, W. The gene encoding the phosphatidylinositol transfer protein is essential for cell growth. *J. Biol. Chem.* **265**, 4711–4717 (1990).
308. Ile, K. E., Schaaf, G. & Bankaitis, V. A. Phosphatidylinositol transfer proteins and cellular nanoreactors for lipid signaling. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 576–583 (2006).
309. Schaaf, G. *et al.* Resurrection of a functional phosphatidylinositol transfer protein from a pseudo-Sec14 scaffold by directed evolution. *Mol. Biol. Cell* **22**, 892–905 (2011).
310. Bankaitis, V. A. *et al.* Thoughts on Sec14-like nanoreactors and phosphoinositide signaling. *Adv. Biol. Regul.* **52**, 115–121 (2012).
311. Burke, J. E. *et al.* Structures of PI4KIII complexes show simultaneous recruitment of Rab11 and its effectors. *Science (80-.)*. **344**, 1035–1038 (2014).
312. Li, X. *et al.* Identification of a Novel Family of Nonclassic Yeast Phosphatidylinositol Transfer Proteins Whose Function Modulates Phospholipase D Activity and Sec14p-independent Cell Growth. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1989–2005 (2000).
313. Schnabl, M. *et al.* Subcellular localization of yeast Sec14 homologues and their involvement in regulation of phospholipid turnover. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3133–3145 (2003).
314. Tripathi, A. *et al.* Functional diversification of the chemical landscapes of yeast Sec14-like phosphatidylinositol transfer protein lipid-binding cavities. *J. Biol. Chem.*

- 294**, 19081–19098 (2019).
315. Mizuike, A. *et al.* Suppression of respiratory growth defect of mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase deficient mutant by overproduction of Sfh1, a Sec14 homolog, in yeast. *PLoS One* **14**, 1–29 (2019).
 316. Sigrist, C. J. A. PROSITE: A documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief. Bioinform.* **3**, 265–274 (2002).
 317. Beh, C. T., Cool, L., Phillips, J. & Rine, J. Overlapping functions of the yeast oxysterol-binding protein homologues. *Genetics* **157**, 1117–40 (2001).
 318. Lehto, M. *et al.* The OSBP-related protein family in humans. *J. Lipid Res.* **42**, 1203–1213 (2001).
 319. Kandutsch, A. A., Chen, H. W. & Shown, E. P. Binding of 25-hydroxycholesterol and cholesterol to different cytoplasmic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 2500–2503 (1977).
 320. Kandutsch, A. A. & Thompson, E. B. Cytosolic proteins that bind oxygenated sterols. Cellular distribution, specificity, and some properties. *J. Biol. Chem.* **255**, 10813–21 (1980).
 321. Taylor, F. R., Saucier, S. E., Shown, E. P., Parish, E. J. & Kandutsch, A. A. Correlation between oxysterol binding to a cytosolic binding protein and potency in the repression of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* **259**, 12382–7 (1984).
 322. Dawson, P. A., Van Der Westhuyzen, D. R., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Purification of oxysterol binding protein from hamster liver cytosol. *J. Biol. Chem.* **264**, 9046–9052 (1989).
 323. Levanon, D. *et al.* cDNA cloning of human oxysterol-binding protein and localization of the gene to human chromosome 11 and mouse chromosome 19. *Genomics* **7**, 65–74 (1990).
 324. Ridgway, N. D., Dawson, P. A., Ho, Y. K., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. *J. Cell Biol.* **116**, 307–319 (1992).
 325. Gibson, T. J., Hyvönen, M., Musacchio, A., Saraste, M. & Birney, E. PH domain: The

- first anniversary. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 349–353 (1994).
326. Godi, A. *et al.* FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat. Cell Biol.* **6**, 393–404 (2004).
327. Wyles, J. P., McMaster, C. R. & Ridgway, N. D. Vesicle-associated membrane protein-associated protein-A (VAP-A) interacts with the oxysterol-binding protein to modify export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **277**, 29908–29918 (2002).
328. Loewen, C. J. R., Roy, A. & Levine, T. P. A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J.* **22**, 2025–2035 (2003).
329. Nishimura, T. *et al.* Inhibition of cholesterol biosynthesis by 25-hydroxycholesterol is independent of OSBP. *Genes to Cells* **10**, 793–801 (2005).
330. Urbani, L. & Simoni, R. D. Cholesterol and vesicular stomatitis virus G protein take separate routes from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **265**, 1919–23 (1990).
331. Baumann, N. A. *et al.* Transport of Newly Synthesized Sterol to the Sterol-Enriched Plasma Membrane Occurs via Nonvesicular Equilibration †. *Biochemistry* **44**, 5816–5826 (2005).
332. Schnabl, M., Daum, G. & Pichler, H. Multiple lipid transport pathways to the plasma membrane in yeast. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1687**, 130–140 (2005).
333. Beh, C. T. & Rine, J. A role for yeast oxysterol-binding protein homologs in endocytosis and in the maintenance of intracellular sterol-lipid distribution. *J. Cell Sci.* **117**, 2983–2996 (2004).
334. Im, Y. J., Raychaudhuri, S., Prinz, W. A. & Hurley, J. H. Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins. *Nature* **437**, 154–158 (2005).
335. Li, X. *et al.* Analysis of oxysterol binding protein homologue Kes1p function in regulation of Sec14p-dependent protein transport from the yeast Golgi complex. *J. Cell Biol.* **157**, 63–78 (2002).
336. Raychaudhuri, S., Im, Y. J., Hurley, J. H. & Prinz, W. A. Nonvesicular sterol movement

- from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides. *J. Cell Biol.* **173**, 107–119 (2006).
337. de Saint-Jean, M. *et al.* Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J. Cell Biol.* **195**, 965–978 (2011).
338. Mesmin, B. *et al.* 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 (2013).
339. von Filseck, J. M., Vanni, S., Mesmin, B., Antonny, B. & Drin, G. A phosphatidylinositol-4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes. *Nat. Commun.* **6**, 6671 (2015).
340. Liu, X. & Ridgway, N. D. Characterization of the sterol and phosphatidylinositol 4-Phosphate binding properties of golgi-associated OSBP-related protein 9 (ORP9). *PLoS One* **9**, 1–12 (2014).
341. Butler, M. M. & Thompson, W. Transfer of phosphatidylserine from liposomes or microsomes to mitochondria. Stimulation by a cell supernatant factor. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **388**, 52–57 (1975).
342. Mioka, T., Fujimura-Kamada, K. & Tanaka, K. Asymmetric distribution of phosphatidylserine is generated in the absence of phospholipid flippases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiologyopen* **3**, 803–821 (2014).
343. Lafer, G., Szolderits, G., Paltauf, F. & Daum, G. Isolation of a phosphatidylserine transfer protein from yeast cytosol. *BBA - Biomembr.* **1069**, 139–144 (1991).
344. Gaigg, B., Lafer, G., Paltauf, F. & Daum, G. Interaction of the yeast phosphatidylserine transfer protein with artificial and biological membranes. *BBA - Biomembr.* **1146**, 301–304 (1993).
345. Schulz, T. A. *et al.* Lipid-regulated sterol transfer between closely apposed membranes by oxysterol-binding protein homologues. *J. Cell Biol.* **187**, 889–903 (2009).
346. Raychaudhuri, S. & Prinz, W. A. The Diverse Functions of Oxysterol-Binding Proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 157–177 (2010).
347. Maeda, K. *et al.* Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins. *Nature* **501**, 257–261 (2013).

348. Chung, J. *et al.* PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER - Plasma membrane contacts. *Science (80-.)*. **349**, 428–432 (2015).
349. Sohn, M. *et al.* PI(4,5)P₂ controls plasma membrane PI4P and PS levels via ORP5/8 recruitment to ER–PM contact sites. *J. Cell Biol.* **217**, 1797–1813 (2018).
350. Artimo, P. *et al.* ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* **40**, W597–W603 (2012).
351. UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* **47**, D506–D515 (2019).
352. Lipp, N.-F. & Drin, G. In Vitro Strategy to Measure Sterol/Phosphatidylinositol-4-Phosphate Exchange Between Membranes. *Methods Mol. Biol.* **1949**, 269–292 (2019).
353. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
354. Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G. & Cullis, P. R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *BBA - Biomembr.* **812**, 55–65 (1985).
355. Poole, L. B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic. Biol. Med.* **80**, 148–157 (2015).
356. Lenoir, M. *et al.* Structural basis of dynamic membrane recognition by trans-Golgi network specific FAPP proteins. *J. Mol. Biol.* **427**, 966–981 (2015).
357. Lin, L., Huai, Q., Huang, M., Furie, B. & Furie, B. C. Crystal Structure of the Bovine Lactadherin C2 Domain, a Membrane Binding Motif, Shows Similarity to the C2 Domains of Factor V and Factor VIII. *J. Mol. Biol.* **371**, 717–724 (2007).
358. Shao, C., Novakovic, V. A., Head, J. F., Seaton, B. A. & Gilbert, G. E. Crystal structure of lactadherin C2 domain at 1.7 Å resolution with mutational and computational analyses of its membrane-binding motif. *J. Biol. Chem.* **283**, 7230–7241 (2008).
359. Ossiander, M. *et al.* Attosecond correlation dynamics. *Nat. Phys.* **13**, 280–285 (2017).
360. Takaya, T., Anan, M. & Iwata, K. Vibrational relaxation dynamics of β-carotene and

- its derivatives with substituents on terminal rings in electronically excited states as studied by femtosecond time-resolved stimulated Raman spectroscopy in the near-IR region. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3320–3327 (2018).
361. Yang, H., Xiao, X., Zhao, X. & Wu, Y. Intrinsic fluorescence spectra of tryptophan, tyrosine and phenylalanine. in *Selected Papers of the Chinese Society for Optical Engineering Conferences held October and November 2016* (eds. Lv, Y., Le, J., Chen, H., Wang, J. & Shao, J.) vol. 10255 102554M (2017).
362. Lakowicz, J. R. & Hogen, D. Dynamic Properties of the Lipid-Water Interface of Model Membranes As Revealed by Lifetime-Resolved Fluorescence Emission Spectra. *Biochemistry* **20**, 1366–1373 (1981).
363. Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012). doi:10.1002/9783527650002.
364. Gill, S. C. & von Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–326 (1989).
365. Alexandrov, A. I., Mileni, M., Chien, E. Y. T., Hanson, M. A. & Stevens, R. C. Microscale Fluorescent Thermal Stability Assay for Membrane Proteins. *Structure* **16**, 351–359 (2008).
366. Manneville, J., Leduc, C., Sorre, B. & Drin, G. Studying In Vitro Membrane Curvature Recognition by Proteins and its Role in Vesicular Trafficking. in vol. 108 47–71 (2012).
367. Bivona, T. G. *et al.* PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol. Cell* **21**, 481–493 (2006).
368. Kralt, A. *et al.* Intrinsically Disordered Linker and Plasma Membrane-Binding Motif Sort Ist2 and Ssy1 to Junctions. *Traffic* **16**, 135–147 (2015).
369. Maass, K. *et al.* A signal comprising a basic cluster and an amphipathic α -helix interacts with lipids and is required for the transport of Ist2 to the yeast cortical ER. *J. Cell Sci.* **122**, 625–635 (2009).
370. Fischer, M. A., Temmerman, K., Ercan, E., Nickel, W. & Seedorf, M. Binding of plasma membrane lipids recruits the yeast integral membrane protein Ist2 to the cortical

- ER. *Traffic* **10**, 1084–1097 (2009).
371. Manford, A. G., Stefan, C. J., Yuan, H. L., MacGurn, J. A. & Emr, S. D. ER-to-Plasma Membrane Tethering Proteins Regulate Cell Signaling and ER Morphology. *Dev. Cell* **23**, 1129–1140 (2012).
372. Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K. D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* **20**, 1160–1166 (2018).
373. Gotoh, O. Optimal alignment between groups of sequences and its application to multiple sequence alignment. *Bioinformatics* **9**, 361–370 (1993).
374. Notredame, C., Holm, L. & Higgins, D. G. COFFEE: An objective function for multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **14**, 407–422 (1998).
375. Sievers, F. & Higgins, D. G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci.* **27**, 135–145 (2018).
376. Shen, X. X. *et al.* Tempo and Mode of Genome Evolution in the Budding Yeast Subphylum. *Cell* **175**, 1533–1545.e20 (2018).
377. Le, S. Q. & Gascuel, O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 1307–1320 (2008).
378. Oteri, F., Nadalin, F., Champeimont, R. & Carbone, A. BIS2Analyzer: a server for co-evolution analysis of conserved protein families. *Nucleic Acids Res.* **45**, W307–W314 (2017).
379. Ashkenazy, H. *et al.* ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.* **44**, W344–W350 (2016).
380. Vance, J. E. & Tasseva, G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1831**, 543–554 (2013).
381. Moser Von Filseck, J. Mechanisms of lipid transport by the ORP/Osh proteins. (2015).
382. Wong, L. H., Čopič, A. & Levine, T. P. Advances on the Transfer of Lipids by Lipid Transfer Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 516–530 (2017).

383. Bonny, M. *et al.* C2-domain mediated nano-cluster formation increases calcium signaling efficiency. *Sci. Rep.* **6**, 36028 (2016).
384. Behnia, R. & Munro, S. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**, 597–604 (2005).
385. Fairn, G. D., Curwin, A. J., Stefan, C. J. & McMaster, C. R. The oxysterol binding protein Kes1p regulates Golgi apparatus phosphatidylinositol-4-phosphate function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15352–15357 (2007).
386. Alfaro, G. *et al.* The sterol-binding protein Kes1/Osh4p is a regulator of polarized exocytosis. *Traffic* **12**, 1521–1536 (2011).
387. Ling, Y., Hayano, S. & Novick, P. Osh4p is needed to reduce the level of phosphatidylinositol-4-phosphate on secretory vesicles as they mature. *Mol. Biol. Cell* **25**, 3389–3400 (2014).
388. Venditti, R. *et al.* Molecular determinants of ER–Golgi contacts identified through a new FRET–FLIM system. *J. Cell Biol.* **218**, 1055–1065 (2019).
389. Jansen, M. *et al.* Role of ORPs in Sterol Transport from Plasma Membrane to ER and Lipid Droplets in Mammalian Cells. *Traffic* **12**, 218–231 (2011).
390. Bushell, S. R. *et al.* The structural basis of lipid scrambling and inactivation in the endoplasmic reticulum scramblase TMEM16K. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
391. Falzone, M. *et al.* Cryo-EM structures reveal bilayer remodeling during Ca²⁺ activation of a TMEM16 scramblase. 420174 (2018) doi:10.1101/420174.
392. Jha, A. *et al.* Anoctamin 8 tethers endoplasmic reticulum and plasma membrane for assembly of Ca²⁺ signaling complexes at the ER/PM compartment. *EMBO J.* **38**, 1–15 (2019).
393. Nishimura, T. *et al.* Osh Proteins Control Nanoscale Lipid Organization Necessary for PI(4,5)P₂ Synthesis. *Mol. Cell* **75**, 1043-1057.e8 (2019).
394. Collado, J. *et al.* Tricalbin-Mediated Contact Sites Control ER Curvature to Maintain Plasma Membrane Integrity. *Dev. Cell* **51**, 476–487 (2019).
395. Hoffmann, P. C. *et al.* Tricalbins Contribute to Cellular Lipid Flux and Form Curved ER-PM Contacts that Are Bridged by Rod-Shaped Structures. *Dev. Cell* **51**, 488-502.e8 (2019).

396. Barajas, D. *et al.* Co-opted Oxysterol-Binding ORP and VAP Proteins Channel Sterols to RNA Virus Replication Sites via Membrane Contact Sites. *PLoS Pathog.* **10**, 34–45 (2014).
397. Nawaz-ul-Rehman, M. S. *et al.* Viral Replication Protein Inhibits Cellular Cofilin Actin Depolymerization Factor to Regulate the Actin Network and Promote Viral Replicase Assembly. *PLoS Pathog.* **12**, (2016).
398. Dubankova, A., Humpolickova, J., Klima, M. & Boura, E. Negative charge and membranetethered viral 3B cooperate to recruit viral RNA dependent RNA polymerase 3Dpol. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
399. Sohn, M. *et al.* Lenz-Majewski mutations in PTDSS1 affect phosphatidylinositol 4-phosphate metabolism at ER-PM and ER-golgi junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 4314–4319 (2016).
400. Gebre, S. *et al.* Osh6 overexpression extends the lifespan of yeast by increasing vacuole fusion. *Cell Cycle* vol. 11 2176–2188 (2012).
401. Dröscher, A. Camillo Golgi and the discovery of the Golgi apparatus. *Histochem. Cell Biol.* **109**, 425–430 (1998).
402. Wacker, I. *et al.* Array tomography: Characterizing FAC-sorted populations of zebrafish immune cells by their 3D ultrastructure. *J. Microsc.* **259**, 105–113 (2015).
403. Wei, D. *et al.* High-resolution three-dimensional reconstruction of a whole yeast cell using focused-ion beam scanning electron microscopy. *Biotechniques* **53**, 41–48 (2012).
404. Henderson, G. P., Gan, L. & Jensen, G. J. 3-D Ultrastructure of *O. tauri*: Electron Cryotomography of an Entire Eukaryotic Cell. *PLoS One* **2**, e749 (2007).
405. Giles, C. H. Franklin s teaspoonful of oil. Studies in the early history of surface chemistry, part 1. *Chem. Ind.* (1969).
406. Marrink, S. J. *et al.* Computational Modeling of Realistic Cell Membranes. *Chem. Rev.* **119**, 6184–6226 (2019).
407. Marsh, D. Structural and thermodynamic determinants of chain-melting transition temperatures for phospholipid and glycolipids membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1798**, 40–51 (2010).

408. Holthuis, J. C. M. & Menon, A. K. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* **510**, 48–57 (2014).
409. Johnson, J. E. & Cornell, R. B. Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions (Review). *Mol. Membr. Biol.* **16**, 217–235 (1999).
410. Alpy, F. & Tomasetto, C. Give lipids a START: The StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *J. Cell Sci.* **118**, 2791–2801 (2005).
411. Pemberton, J. G., Kim, Y. J. & Balla, T. Integrated regulation of the phosphatidylinositol cycle and phosphoinositide-driven lipid transport at ER-PM contact sites. *Traffic* **21**, 200–219 (2020).
412. Delfosse, V., Bourguet, W. & Drin, G. Structural and Functional Specialization of OSBP-Related Proteins. *Contact* **3**, 251525642094662 (2020).

Annexes

Chapitre méthodologique :

In Vitro Strategy to Measure Sterol/Phosphatidylinositol-4-Phosphate Exchange Between Membranes.

N-F. Lipp & G. Drin, 2019³⁵²

Revue bibliographique :

Lipid Exchangers: Cellular Functions and Mechanistic Links With Phosphoinositide Metabolism.

N-F. Lipp, S. Ikhlef, J. Milanini, & G. Drin, 2020 ²⁸⁹



Chapter 19

In Vitro Strategy to Measure Sterol/Phosphatidylinositol-4-Phosphate Exchange Between Membranes

Nicolas-Frédéric Lipp and Guillaume Drin

Abstract

Recent findings unveiled that Oxysterol-binding protein-related proteins (ORP)/Oxysterol-binding homology (Osh) proteins, which constitute a major family of lipid transfer proteins (LTPs), conserved among eukaryotes, are not all mere sterol transporters or sensors. Indeed, some of them are able to exchange sterol for phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) or phosphatidylserine (PS) for PI4P between membranes and thereby to use PI4P metabolism to generate sterol or PS gradients in the cell, respectively. Here, we describe a full strategy to measure in vitro a sterol/PI4P exchange process between artificial membranes using Förster resonance energy transfer (FRET)-based assays and a standard spectrofluorometer. Such an approach can serve to better characterize the activity of known sterol/PI4P exchangers, but also to reveal whether ill-defined ORP/Osh proteins or LTPs belonging to other families have such an exchange activity. Besides, this protocol is amenable to test whether molecules can act as Orphilins, which have been found to inhibit the sterol/PI4P exchange activity of certain ORPs. Last, our strategy to measure in real-time PI4P transport using a known lipid-binding domain can serve as a basis for the design of novel in vitro protocols aiming to detect other lipid species.

Key words ORP/Osh proteins, Sterol, Dehydroergosterol, PI4P, FRET, Liposome, Recombinant protein

1 Introduction

Lipids are precisely distributed within and between the membranes of eukaryotic cells [1, 2]. Such a distribution relies on lipid metabolism as well as lipid transport processes that are mostly mediated by cytosolic proteins called LTPs. These proteins belong to various families but share a common feature: they have a domain with a lipid-pocket, generally to host only one lipid molecule at a time. Deciphering the mode of action of these LTPs is an important issue in cell biology [3–5]. It is commonly assumed that a LTP is able to extract a lipid from a donor organelle membrane, shield this highly hydrophobic molecule from the aqueous medium, diffuse through the cytosol, and deposit this lipid in a target organelle

[6–9]. These LTPs work either across long distances or confined in membrane contact sites where two organelles are in close apposition. In vitro approaches are invaluable to decipher at the molecular level how these LTPs work (e.g., some recent references [10–14] and several chapters in this book). Recently, we devised protocols to establish that LTPs, Osh4p, and OSBP (Oxysterol-binding protein), belonging to the ORP/Osh family, have the ability to bind alternately PI4P and sterol as well as to exchange these lipids between membranes [15]. We demonstrated with OSBP that a sterol/PI4P exchanger can use PI4P metabolism to transport vectorially sterol from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi [16]. In vitro, we showed that Osh4p is able to dissipate a preexisting PI4P gradient to generate in return a sterol gradient between two distinct membranes [17]. This mechanism of counterexchange fueled by PI4P metabolism is used by other ORP/Osh proteins to transport a lipid that is not sterol. Indeed, Osh6p/Osh7p in yeast and ORP5/ORP8 in humans use a PI4P gradient to transport PS from the ER to the plasma membrane [18, 19]. Along with this, it has been revealed that the sterol/PI4P exchange activity of OSBP has a pivotal role in the replication of many human viruses, including Hepatitis C virus [20] or in cancer [21]. Consequently, OSBP appears as a potential pharmaceutical target and small molecules called Orphilins have been found to inhibit its exchange activity [21–23]. In that respect, the availability of our in vitro approach to measure a sterol/PI4P exchange activity with high temporal resolution proved to be useful to characterize some of these compounds [22, 23]. Herein, we describe in detail how to set up this approach and kinetic measurements which simply require a standard L-format spectrofluorometer.

Our strategy combines two FRET-based assays to accurately measure (1) sterol transport from L_A to L_B liposomes, which are present in an equimolar amount and mimic each an organelle membrane (ER and *trans*-Golgi, respectively, in reference to our studies on Osh4p and OSBP [16, 17]) and (2) PI4P transport in the opposite direction. It is noteworthy that these two experiments are performed under the same conditions (i.e., identical buffer, temperature, total lipid concentration, sterol, and PI4P concentration) such as to observe whether these two transport processes are coupled, and thus the occurrence of sterol/PI4P exchange (Fig. 1) [17]. In the first assay (Fig. 1a) we use L_{A-1} and L_{B-1} liposomes that are essentially made of phosphatidylcholine (*see Note 1*). L_{A-1} liposomes contain specifically both dehydroergosterol (DHE, 5 mol%), a natural fluorescent analogue of ergosterol and cholesterol (major sterol in yeast and human, respectively) and a second fluorescent lipid called 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl) (DNS-PE, 2.5 mol%). DHE molecules excited at 310 nm transfer resonance energy to the dansyl group of DNS-PE [24]. The level of FRET

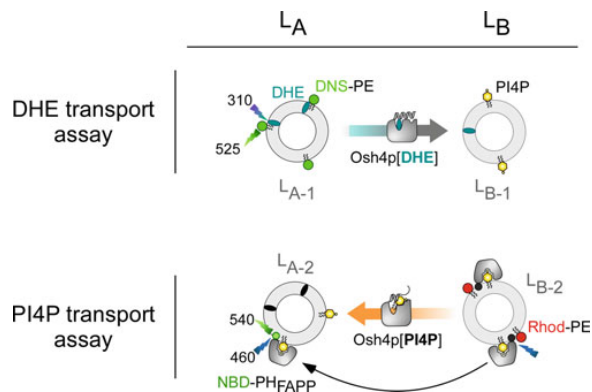


Fig. 1 Description of the two transport assays. In the DHE transport assay, L_{A-1} liposomes (DOPC/DHE/DNS-PE, 92.5/5/2.5 mol/mol) are mixed with L_{B-1} liposomes (DOPC/PI4P 96/4 mol/mol). FRET between DHE and DNS-PE in the L_{A-1} liposomes diminishes if DHE is transported to the L_{B-1} liposomes. In the PI4P transport assay, DOPC/PI4P/Rhod-PE liposomes (94/4/2 mol/mol, L_{B-2}) are incubated with 250 nM NBD-PH_{FAPP}. DOPC liposomes (L_{A-2}) doped with 5 mol % DHE are added. If PI4P transport occurs, this provokes a dequenching of the NBD signal corresponding to the translocation of NBD-PH_{FAPP} from L_{B-2} to L_{A-2} liposomes

depends on the amount of DHE in the L_{A-1} membranes. If DHE is transferred from L_{A-1} to L_{B-1} liposomes, this elicits a decrease in the FRET signal because DHE is not anymore in close proximity to DNS-PE. The normalization of this signal allows quantifying the transport of DHE from L_{A-1} to L_{B-1} liposomes. Using this assay, Osh4p was found to efficiently transport DHE and this, in a proportional manner to the amount of PI4P initially present in the L_{B-1} liposomes [17]. Here, we describe a protocol in which L_{B-1} liposomes incorporate 4 mol% PI4P.

To measure the transport of PI4P in the reverse direction, from L_B to L_A liposomes, we designed a PI4P-probe, derived from the Pleckstrin Homology (PH) domain of the human phosphoinositol-4-phosphate adapter protein (FAPP-1, Uniprot: Q9HB20). This domain has a binding site for the PI4P headgroup and a hydrophobic wedge that inserts into the membrane [25]. We reengineered this domain to include a single solvent-exposed cysteine (C13), localized in the hydrophobic wedge, to which is covalently linked a polarity-sensitive NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol) fluorophore [17]. Its ability to recognize PI4P at the liposome surface is unaffected by the level of sterol [17]. In the transport assay (Fig. 1b), NBD-PH_{FAPP} is mixed with L_{B-2} liposomes, which contain 4 mol% PI4P and 2 mol% Rhod-PE, and L_{A-2} liposomes, which incorporate 5 mol% DHE. At time zero, the NBD fluorescence is quenched due to a FRET process with Rhod-PE. If PI4P is

transported from L_{B-2} to L_{A-2} liposomes (e.g., upon injecting Osh4p), a fast dequenching occurs, due to the translocation of NBD-PH_{FAPP} onto L_{A-2} liposomes (Fig. 1b). In our assay, NBD-PH_{FAPP} is completely bound to the membranes which contain an accessible amount of PI4P between 2 and 4 μM [17]. As a consequence, the NBD signal directly reflects the distribution of NBD-PH_{FAPP} between L_A and L_B liposomes and can thus be easily normalized and converted into an amount of transported PI4P. This tracking method, albeit indirect, has at least two advantages. First it does not rely on a fluorescently labeled PI4P that is unlikely to be properly accommodated by the binding pocket of ORP/Osh proteins, as it bears an extra bulky moiety. Second, this approach offers a far higher time resolution than methods based on radiolabeled PI4P and liposome separation. In addition, such a PI4P is not commercially available and remains uneasy to produce. Along with this, we have indications that the ability of a protein to transport PI4P is not impacted by the presence of NBD-PH_{FAPP}. Given the amount of NBD-PH_{FAPP} and of accessible PI4P in our assays, only 6.25% of PI4P can be monopolized by the probe during the measurement. In addition, only 0.9% of the membrane surface is covered by the probe, considering the maximal membrane surface that one PH molecule can cover ($\approx 4.8 \text{ nm}^2$, estimated from references [26, 27]) and the total surface of liposomes ($L_A + L_B$ liposomes; $5.1 \times 10^{16} \text{ nm}^2$ with an area of 0.7 nm^2 per lipid). Experimentally, we observed that doubling or dividing by two the amount of NBD-PH_{FAPP} in the sample did not change the transport kinetics that we recorded (unpublished results).

Our strategy, which is detailed step by step below, allows for measuring the transport of sterol along its concentration gradient between two membranes by Osh4p via the dissipation of a preexisting PI4P gradient. It can be modified to measure the transport of sterol against its concentration gradient simply by changing the initial amount of DHE in the L_A and L_B liposomes as done in [17]. Our strategy is also potent to further characterize known sterol/PI4P exchangers via structure–function analysis or to screen novel drugs for their ability to block an exchange activity. Likewise, it can help to define in the future whether other members of the ORP/Osh family are sterol/PI4P exchangers. Besides, it can serve to explore the ability of LTPs, belonging to other families, to transport sterol and/or PI4P, as done recently with START-like proteins [13]. NBD-PH_{FAPP} has been used to follow the transport of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) between membranes, as it can recognize this phosphoinositide [13, 28]. We also developed a NBD-C2_{Lact} domain to specifically follow PS transport between liposomes and thereby unveiled the capacity of Osh6p and Osh7p to serve as PS/PI4P exchangers [19]. This exemplifies that our FRET-based strategy can be adapted to measure *in vitro* other transport processes by using lipid-binding

domains whose tridimensional structure and lipid-binding site are known.

2 Materials

2.1 Protein Purification and Labeling

1. pGEX-PH_{FAPP} and pGEX-Osh4p plasmids (available on request from our lab).
2. Sterilized water.
3. Electro-competent bacteria: BL21 Gold Competent Cells (Agilent).
4. Ampicillin: Prepare a 50 mg/mL stock solution with filtered and sterilized water and store it at -20°C .
5. LB medium: Lennox LB Broth medium without glucose (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl) prepared with deionized water and autoclaved.
6. LB/Ampicillin: Dilute ampicillin stock solution to 1/1000 in LB medium (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final concentration).
7. 1 M Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) stock solution in water.
8. 1 M Dithiothreitol (DTT) stock solution in water. Prepare 1 mL aliquots and store them at -20°C .
9. PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaH_2PO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , autoclaved and stored at 4°C .
10. TN buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, filtered with a Stericup filtration unit (Merck) or with a membrane vacuum filtration equipment. Store at 4°C .
11. TND buffer: Dilute 1 M DTT solution to 1/500 in TN buffer (final concentration 2 mM DTT).
12. 200 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) stock solution in isopropanol. Store at 4°C .
13. Lysis buffer. To prepare 50 mL, dissolve one tablet of complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche) in TN buffer by vortexing (*see Note 2*). Add 250 μL of 200 mM PMSF stock solution. Complete with other antiproteases, i.e., 50 μL of 1 mM bestatin stock solution, 50 μL of 1 mg/mL pepstatin A in MeOH, and 50 μL of 1 mM phosphoramidon solution (these solutions are stored at -20°C). Add 100 μL of 1 M DTT stock solution to obtain a final concentration at 2 mM.
14. DNase I Recombinant, RNase free, in powder.
15. 2 M MgCl_2 solution. Filter the solution using a 0.45 μm filter.

16. Thrombin stock solution: Dissolve 20 units in 1 mL of double-deionized water and prepare 25 μ L aliquots in 0.5 mL Eppendorf tubes. Then freeze and store at -80°C .
17. 10 mM CaCl_2 stock solution in water.
18. Dimethylformamide (DMF), anhydrous, >99% pure.
19. IANBD Amide (*N,N*-Dimethyl-*N*-(Iodoacetyl)-*N'*-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)Ethylenediamine). Dissolve 25 mg of IANBD in 2.5 mL of dimethylsulfoxide (DMSO) and prepare 25 aliquots of 100 μ L in 1.5 mL screw cap tubes. Do not completely screw the cap. Then, remove DMSO in a freeze-dryer to obtain 1 mg of dry IANBD per tube. Tubes are closed and stored at -20°C in the dark.
20. 10 mM L-cysteine solution in degassed water stored at -20°C .
21. Glycerol (99% pure).
22. 50 mL polypropylene tube (e.g., Falcon).
23. Eppendorf tubes (0.5, 1 and 2 mL).
24. Electroporator (e.g., Eppendorf 2510) and electroporation cuvette (e.g., Cell Projects, 50×2 mm gap).
25. Glutathione Sepharose 4B beads stored in 20% (v/v) ethanol at 4°C .
26. French pressure cell press (French press).
27. Fixed-angle rotor and tubes for ultracentrifuge (e.g., Ti45, Beckman).
28. Ultracentrifuge (e.g., Beckman).
29. Amicon Ultra-4 and Ultra-15 centrifugal filter units, each with a molecular weight cut-off (MWCO) of 3 and 10 kDa (Millipore).
30. UV/Visible absorbance spectrometer with quartz cuvettes.
31. Poly-Prep[®] chromatography column (with a 0–2 mL bed volume and a 10 mL reservoir).
32. Econo-Pac[®] chromatography columns (1.5×12 cm).
33. Illustra NAP 10 desalting column (GE healthcare).
34. Thermomixer.
35. XK 16/70 column packed with Sephacryl S200HR for FPLC system (GE healthcare).
36. FPLC system: ÄKTA purifier (GE healthcare) or similar.
37. TG-SDS running buffer: 25 mM Tris, pH 8.6, 192 mM glycine, 0.1% SDS.
38. 4 \times highly denaturing Laemmli buffer: 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% (v/v) glycerol, 8% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.005% (w/v) bromophenol blue.

39. Precast 15% acrylamide gel SDS-PAGE.
40. SDS-PAGE standards, low range (Biorad).

**2.2 Liposome
Preparation
and Fluorescent
Assays**

1. Chloroform (CHCl_3) and methanol (MeOH).
2. Phospholipid stock solutions (usually in CHCl_3) are aliquoted in 2 mL amber glass vials filled with argon and tightly sealed with a Teflon cap. Vials are stored at -20°C . DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 25 mg/mL in CHCl_3), brain PI4P (1- α -phosphatidylinositol-4-phosphate, 5 mg/mL in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (20:9:1)) and DNS-PE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl), 1 mg/mL) and Rhod-PE (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl), 1 mg/mL) are from Avanti Polar Lipids.
3. DHE stock solution: Dissolve 5 mg of DHE powder (Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol E2634, purity ~96%, Sigma-Aldrich) in 1 mL of MeOH. Dilute 10–20 μL of this solution to 1/30 in MeOH and record an absorbance spectrum of this solution against a blank using two quartz cells (e.g., Hellma 104-002B-QS with a chamber of 2 mm in width and 1 cm optical path) and a standard double beam UV/visible spectrometer. Determine the DHE concentration by measuring the DHE absorbance peak at 325 nm, considering a molar extinction coefficient of $13,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. If necessary, adjust the volume of the stock solution with MeOH to set the DHE concentration at 2.5 mM. Store 500 μL aliquots in 2 mL glass vials at -20°C , as done with phospholipids.
4. C16:0/C16:0-PI4P stock solution: Dissolve 1 mg of C16:0/C16:0-PI4P powder (Echelon Lipids) in 250 μL of MeOH and 250 μL of CHCl_3 . Then complete with methanol to 1 mL. The solution must become clear.
5. HK buffer: 50 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 120 mM K-Acetate. Dissolve 23.8 g of HEPES and 23.6 g of K-Acetate in 2 L of deionized water at room temperature. Adjust the pH to 7.4. Prepare frozen aliquots of 50 mL.
6. HKM buffer: Add 25 μL of a 2 M MgCl_2 stock solution to 50 mL of HK buffer.
7. Rotary evaporator (Buchi B-100 or similar).
8. Pear-shaped glass flasks (25 mL, 14/23, Duran).
9. Aluminum foil.
10. 4 mm-diameter glass beads (Sigma-Aldrich).
11. Avanti Polar Mini-Extruder with two 1 mL gas-tight Hamilton syringes.

12. Prefilters (10 mm in diameter, Avanti Polar Lipids).
13. Polycarbonate filters (19 mm in diameter, Avanti Polar Lipids) with pore size of 0.2 μm .
14. Hemolysis tubes with a cap.
15. Water bath.
16. Liquid nitrogen.
17. UV/visible spectrofluorometer with a temperature-controlled cell holder and stirring device.
18. Quartz cuvette (e.g., Hellma) for UV/visible fluorescence (minimum volume of 600 μL).
19. Small magnetic PFTE stirring bar (5 \times 2 mm).
20. Hamilton syringes (10, 25, and 50 μL).

3 Methods

3.1 Purification and Fluorescent Labeling of NBD- PH_{FAPP}

The PH domain of the FAPP-1 protein was mutated to introduce a unique cysteine within its membrane-binding interface (at position 13 of the protein) and label it with a NBD fluorophore. PH_{FAPP} (T13C/C45S/C57S/C94S) construct is cloned into a pGEX-4T3 vector (GE healthcare) to be expressed in fusion to GST. A thrombin cleavage site is located between the GST construct and the N-terminal end of the PH domain. We describe here a purification protocol based on the use of a French press and a final gel filtration step using an ÄKTA FPLC system. This protocol can be modified to include other methods for disrupting bacteria and other FPLC chromatography devices. It is important to use very freshly degassed and filtered lysis buffer supplemented with 2 mM DTT to avoid any oxidation of cysteine. In contrast, to label the protein, it is mandatory to perfectly remove DTT using a desalting column and a freshly degassed DTT-free buffer. All the steps must be done on ice at 4 °C, to avoid any degradation of the protein.

3.1.1 Expression of PH_{FAPP} in *E. coli*

1. Mix 2 μL of pGEX- PH_{FAPP} plasmid (at $\sim 65 \text{ ng}/\mu\text{L}$) with 20 μL of electro-competent bacteria and 18 μL of sterilized water. Transform the bacteria by electroporation with a 1500 V pulse for 5 ms. Then, resuspend the bacteria with 150 μL of LB medium and let them recover for 1 h at 37 °C.
2. Dilute the 150 μL culture into 25 mL of LB/Amp medium in a 200 mL sterilized Erlenmeyer flask.
3. Incubate the flask in a shaker at 37 °C at 185 rpm overnight. The preculture can be used the next day or stored one day long at 4 °C before induction procedure.

4. Inoculate 4×500 mL of LB/Amp medium with 5 mL of preculture suspension and let bacteria growth at 37 °C under agitation at 220 rpm in 2 L Erlenmeyer flasks.
5. Once the optical density of the suspension, measured at a wavelength (λ) of 600 nm, reaches a value between 0.6 and 0.7, add 500 μ L of 1 M IPTG stock solution in each flask to induce protein expression. Maintain the flasks for 4 h at 37 °C under constant shaking at 185 rpm.
6. To harvest the bacteria, fill four polypropylene centrifuge bottles each with 500 mL of culture and centrifuge for 30 min at $3000 \times g$ at 4 °C.
7. Remove the supernatant and resuspend each pellet with 25 mL of cold PBS buffer. Then, pool the bacterial suspension and fill two 50 mL falcon tubes with the suspension.
8. Centrifuge the tubes for 30 min at $3500 \times g$ at 4 °C. Discard the supernatant, let drain the residual buffer upon absorbent paper, and store the pellets at -20 °C (*see Note 3*).

3.1.2 Purification and Labeling of PH_{FAPP}

To check the proper progress of the purification, it is requested to collect 30 μ L aliquots at different steps of the protocol to perform an analysis on a 15% SDS-PAGE gel (Fig. 2). Add to each aliquot 30 μ L of 4 \times highly denaturing Laemmli buffer, vortex, spin down, and heat the aliquot at 95 °C in a dry bath heater. Store the tubes at -20 °C until analysis. Generally, we run a first gel to check the first part of the purification process prior to the gel filtration (Fig. 2a). At **step 28**, for the SDS-PAGE analysis of the protein content of the collected fractions after gel filtration (Fig. 2b, c), we mix 25 μ L aliquot of each interesting fraction with 15 μ L of Laemmli buffer prior to heating and loading onto a gel.

1. On ice, prepare two 50 mL falcon tubes that each contain 50 mL of lysis buffer.
2. Add up to 30 mL of lysis buffer to the two tubes, prepared at **step 8** of Subheading 3.1.1, which contain a bacterial pellet. Let defreeze the pellets on ice for 5–10 min. Crush the pellets with a stainless spatula, vortex, and resuspend well by pipetting back and forth the suspension with a 25 mL pipette until it is homogeneous.
3. Lysis is performed using a prechilled French press. Load 30 mL of sample inside the press cell and apply a pressure to reach 1000 psi. Collect the lysate in the same tube, keep the tube on ice, and continue this first round of lysis with the second sample.
4. Repeat **step 3** one more time to obtain a smoothed lysate (*see Note 4*).

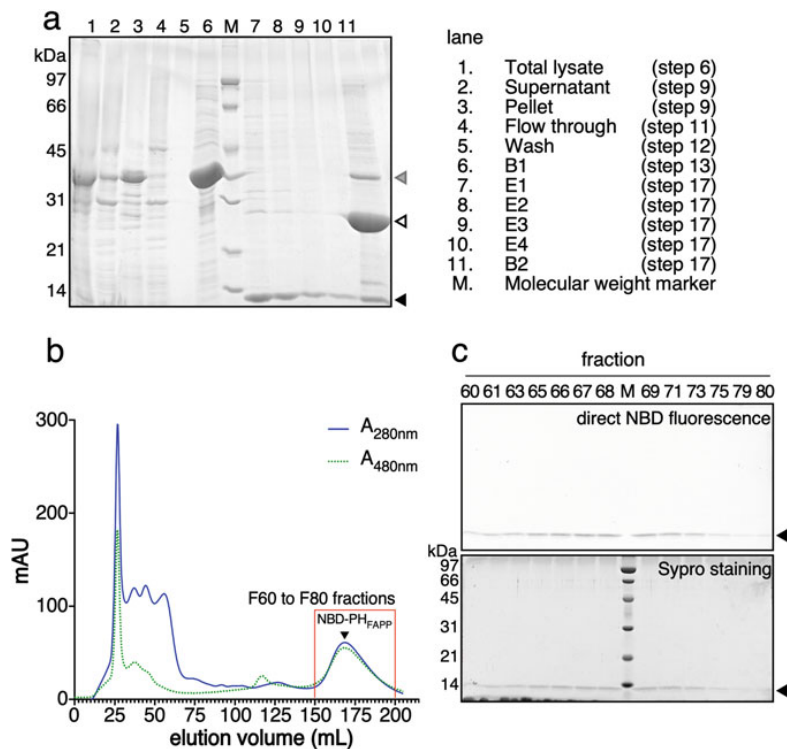


Fig. 2 NBD-PH_{FAPP} purification (a) SDS-PAGE analysis is used to check the first part of the purification protocol before labeling. It is used to verify the presence of the protein at different steps of the procedure. The arrowheads indicate the position of the PH_{FAPP} domain (black arrowhead), of the GST alone (open arrowhead) and of the GST-PH construct (gray arrowhead). An equivalent of 2.5 μL of each aliquot is loaded onto the gel (b) Gel filtration step. The chromatogram shows the evolution of the tryptophan and NBD absorbances monitored, respectively, at a wavelength of 280 and 480 nm as a function of the volume of buffer passed on the column. The peak corresponding to the protein (after 150–200 mL of elution) and the 2.5 mL fractions that are collected are framed in red. (c) SDS-PAGE analysis of collected fractions. The first picture is acquired under UV illumination without staining and reveals the presence of the NBD-PH_{FAPP} construct since it emits fluorescence. The second picture shows the same gel after a Sypro staining procedure (Note that the gel was protected from light during migration to avoid any bleaching of the NBD fluorophore)

5. Use the remaining 40 mL of lysis buffer to rinse the French press cell immediately after lysate collection and to adjust each volume of lysate (~30 mL) to a final volume of 50 mL.
6. Add 125 μL of 2 M MgCl_2 solution (final concentration 2 mM) and a pinch of DNase I (using a spatula) to each 50 mL lysate to cut DNA in small fragments, thereby limiting the viscosity of the sample. Incubate on ice for 30 min. Take an aliquot for gel analysis.

7. Transfer each 50 mL lysate in a precooled polycarbonate ultracentrifuge tube (two in total) and run a centrifugation for 1 h at $186,000 \times g$ at 4°C with an appropriate rotor and ultracentrifuge.
8. During centrifugation, dispense 1.4 mL of Glutathione Sepharose 4B bead slurry into two 50 mL tubes. Wash the beads twice by centrifugation at $500 \times g$ for 5 min with 20 mL of TND buffer.
9. Once the centrifugation is over, take an 30 μL aliquot from the supernatant and transfer the supernatant from each ultracentrifuge tube in the two 50 mL tubes containing washed beads. For gel analysis, resuspend the debris pellet in one of the ultracentrifuge tube with 50 mL of TND buffer and collect a 30 μL aliquot.
10. Place the tubes on a rotator to constantly homogenize the solution and the beads for 3–4 h at 4°C .
11. Pool the bead suspensions in a unique Econo-Pac[®] chromatography column. Let decant the beads by gravity flow to remove buffer and unbound proteins. Take an aliquot from the eluate for analysis.
12. Wash the beads by resuspending them with 20 mL of TND buffer followed by decantation. Repeat this step twice. Collect and pool the eluates and take an aliquot for analysis. After decantation, a volume of ~ 2 mL of a suspension of bead, to which GST-PH_{FAPP} is bound, lies at the bottom of the column.
13. Fill two 2 mL snap-cap microcentrifuge tubes each with 1 mL of bead suspension. Complete each tube with TND buffer up to 1.970 mL. Take a 30 μL aliquot from one tube for analysis (aliquot B1). Add 10 μL of 10 mM CaCl₂ solution and 25 μL of human thrombin protease to each tube for cleaving the PH_{FAPP} construct off the GST domain.
14. Close and place the tubes overnight on a rotator at 4°C for an optimal cleavage.
15. Add 10 μL of 200 mM PMSF solution to the 2 mL bead suspension for irreversibly stopping the thrombin activity.
16. Centrifuge the tubes at $700 \times g$ for 3 min 30 s. Collect out of each tube up to 1 mL of supernatant, which contains soluble PH_{FAPP} domain, pool, and transfer it in 2 mL snap-cap microcentrifuge tube (E1 eluate) which is maintained on ice. Avoid pipetting beads during this step.
17. Resuspend the beads with 1 mL of TN buffer to wash them and repeat three times **step 16** to recover most of the protein. Each time, pool and transfer the supernatants into a new 2 mL tube (E2, E3, and E4 eluates). For SDS-PAGE analysis take an

aliquot from each eluate and from the bead suspension (aliquot B2) at the end of the wash.

18. Pool the supernatants (i.e., the content of 4 tubes, ~8 mL) collected during **steps 16** and **17** into a 10 mL Poly-Prep[®] chromatography column. Retrieve by gravity flow the eluate that is free of any contaminating beads as those latter are retained on the bed support.
19. Concentrate the solution to ~1 mL in an Ultra-4 centrifugal filter unit with a MWCO of 3 kDa using a centrifugation speed of $1500 \times g$.
20. Equilibrate an Illustra NAP 10 desalting column with TN buffer. Load 1 mL of the PH_{FAPP} concentrated sample inside the column and let it fully penetrate into the Sephadex gel. Then, elute the sample by adding 1.5 mL of freshly degassed TN buffer devoid of DTT to the gel and collect the eluate by gravity flow into a 2 mL snap-cap microcentrifuge tube.
21. Dilute 50–100 µL of the eluate to 1/6 in TN buffer and record an absorbance spectrum from 230 to 450 nm against a blank using two quartz cuvettes. Determine the PH_{FAPP} concentration using the maximal absorbance at 280 nm and considering an extinction coefficient $\epsilon = 29,450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
22. To guarantee a complete labeling of the PH_{FAPP} domain, it is preferred to add IANBD to the protein with a ten-times molar excess. Dissolve 1 mg of IANBD powder in DMF considering that the final volume of DMF used for labeling must not exceed 5% (v/v) of PH_{FAPP} sample volume. Thus adjust the volume of DMF (V_{DMF}) to dissolve IANBD following these formulas.

$$\begin{aligned} V_{\text{DMF}} &= V_{\text{max}} \times (m_0/m) \text{ with } V_{\text{max}} \\ &= 0.05 \times V \text{ and } m \\ &= 10,000 \times C \times V \times \text{MW}_{\text{IANBD}} \end{aligned}$$

C is the deduced concentration of PH_{FAPP} based on absorbance measurement as described in **step 21**, V is the volume of PH_{FAPP} solution, MW_{IANBD} is the molecular weight of IANBD (420 g/mol), m is the required amount of IANBD in mg, V_{max} is the maximum volume of DMF usable for PH_{FAPP} labeling, m_0 corresponds to 1 mg of dry IANBD powder (*see Note 5*).

23. Add the IANBD solution to the PH_{FAPP} protein sample and shake thoroughly the reaction mixture at 800–900 rpm for 30 min at 25 °C using a thermomixer protected from light. Let the reaction continue for 90 min on ice to reach its completion.

24. Add L-cysteine to the reaction mixture to quench unreacted IANBD. L-cysteine must be in a tenfold molar excess relative to IANBD.
25. Transfer the NBD-PH_{FAPP} solution into an Ultra-4 centrifugal filter unit with a MWCO of 3 kDa. Add 5 mL of TN buffer and concentrate the sample until 2 mL to remove a large part of free NBD from the protein by centrifugation at $1500 \times g$. Repeat this washing step twice more.
26. Store the 2 mL protein sample at 4 °C before the gel filtration procedure. Storage shall not exceed a day long.
27. Prior to gel filtration, check that no orange deposit is present at the bottom of the tube. Aggregation may occur during the concentration step due to an excessive amount of protein. In that case, centrifuge the sample for 10 min at $540,000 \times g$. Collect and inject the clarified supernatant on the column for gel filtration.
28. Gel filtration is performed on a Sephacryl S200HR column. Column is fully equilibrated with TND buffer. Flow rate is set at 1 mL/min. Tryptophan and NBD absorbances are followed at $\lambda = 280$ and 480 nm, respectively.
29. Load the protein sample in a 2 mL clean injection loop. Inject the sample on the column and immediately collect the eluate in hemolysis tubes using a fractionation volume of 2.5 mL. A major peak, which is concomitantly detected at $\lambda = 280$ and 480 nm, appears after an elution volume of ~150 mL (Fig. 2b). All the fractions that correspond to this peak are analyzed on a 15% SDS-PAGE gel (Fig. 2c).
30. Pool all the fractions that only contain NBD-PH_{FAPP} protein (~13 kDa). Add glycerol to the sample at a final concentration of 10% (v/v) for the cryo-protection of the protein. Concentrate the sample using an Ultra-15 centrifugal filter unit with a MWCO of 3 kDa to a final volume of 2 mL by centrifugation at $1500 \times g$.
31. Record an absorbance spectrum from 230 to 650 nm against a blank (*see Note 6*) using two quartz cuvettes. Determine the NBD-PH_{FAPP} concentration using the maximal absorbance at 280 and 495 nm, and considering an extinction coefficient $\epsilon = 29,450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $25,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for the protein and the NBD moiety, respectively. If the two concentration values are alike, this means that the protein is labeled at 1:1 ratio with the NBD group (*see Note 7*).
32. Make 50 μL aliquots of protein in 0.5 mL Eppendorf tubes. Flash-freeze the tubes in liquid nitrogen and store them at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ for several months.

3.2 *Osh4p* Purification

We express *Osh4p* in fusion in GST without any labeling step. The plasmid (pGEX-*Osh4p*) with the coding sequence of the full-length *Osh4p* (1–434 residues) is used to transform electro-competent bacteria. The purification protocol, except a few differences, is similar to the one used to obtain NBD-PH_{FAPP}. Follow **steps 1–8** described in Subheading 3.1.1 but let the bacteria grow overnight at 30 °C after IPTG induction. Thereafter, follow all the steps described in Subheading 3.1.2, but at **step 19**, concentrate the protein sample to 2 mL for gel filtration and skip **steps 20–27**. Use ultracentrifugal filter units with a MWCO of 10 kDa. The protein is usually collected once 60–90 mL of buffer are passed on the gel filtration column.

3.3 Preparation of Liposomes

Perform all the steps at room temperature otherwise specified. Handle organic solvent, rotavapor, and liquid nitrogen with care. Use fresh, filtered, and degassed HK buffer.

1. To make the liposomes for the transport assays, mix volumes of lipid stock solutions in a pear-shaped glass according to Table 1 (also see **Notes 8** and **9**). Adjust the volume of each mixture to 1 mL with pure CHCl₃.
2. Write down the name of each liposome type (*L_A*, *L_B*, ...) on the neck of the respective flask. Wrap the flasks containing a mixture with fluorescent lipids (i.e., DHE, DNS-PE, or Rhod-PE) with aluminum foil.
3. Connect the flask to a rotary evaporator. Remove the solvent under vacuum while heating the flask at 25 °C for at least 1 h using a rotation speed of 100 rpm (see **Note 10**). A lipid film appears on the glass surface. Fill the evaporator and the flask with argon. Remove the flask and place it in a vacuum chamber for 45 min to remove any solvent traces.
4. Hydrate the film with 2 mL of HK buffer. Add a half-dozen of 4 mm-diameter glass beads to the flask to optimize the resuspension. Then, gently vortex the flask for at least 2 min in order to obtain a suspension of multilamellar lipid vesicles (MLVs) with a 4 mM lipid concentration. Divide the suspension into 1 mL aliquots stored in screw cap micro tubes. Properly label each tube cap with the liposome name.
5. Freeze and thaw the tubes five times (using liquid nitrogen and a water bath at 37 °C, respectively). Liposomes can then be directly extruded or stored at –20 °C.
6. Wet two prefilters with HK buffer, and place each of them over the orifice, inside the O-ring inner diameter of each membrane support of the mini-extruder. Insert one of the membrane supports, with the prefilter, into the extruder outer casing with the O-ring facing up. Place one 19 mm polycarbonate filter over the prefilter support and O-ring. Carefully place the

Table 1
Volume of lipid stock solutions to be mixed for liposome preparation

Liposome	Lipid composition (mol/mol)	Lipid stock solution				
		DOPC (25 mg/mL)	DHE (2.5 mM)	DNS-PE (1 mg/mL)	Brain PI4P (5 mg/mL)	Rhod-PE (1 mg/mL)
L _{A-1}	DOPC/DHE/ DNS-PE 92.5/5/2.5	233 μL	160 μL	199 μL		
L _{A-no DHE}	DOPC/DNS-PE 97.5/2.5	245 μL		199 μL		
L _{B-1}	DOPC/PI4P 96/4	241 μL			62 μL ^a	
L _{A-2}	DOPC/DHE 95/5	239 μL	160 μL			
L _{B-2}	DOPC/PI4P/ Rhod-PE 94/4/2	236 μL			62 μL ^a	200 μL
L _{A-Eq}	DOPC/DHE/ PI4P 95.5/2.5/2	240 μL	80 μL		31 μL ^b	
L _{B-Eq}	DOPC/DHE/ PI4P/Rhod-PE 93.5/2.5/2/2	235 μL	80 μL		31 μL ^b	200 μL

^aAlternatively, add 306 μL of C16:0/C16:0-PI4P at 1 mg/mL

^bAlternatively, add 153 μL of C16:0/C16:0-PI4P at 1 mg/mL

second membrane support into the casing (O-ring facing down). Place the retainer nut on the threaded end of the extruder outer casing and screw the retainer nut by hand just until it is sufficiently tight.

7. Prepare two hemolysis tubes: one filled with 1 mL of MLVs suspension and a second one to store the liposomes once they are extruded (*see Note 11*).
8. Load the MLVs sample into one of the 1 mL gas-tight Hamilton syringes and carefully connect the syringe at one end of the mini-extruder.
9. Connect the second syringe, which is empty, to the other end of the mini-extruder. The syringe plunger must be set to zero.
10. Gently push the plunger of the first syringe until the lipid solution is completely transferred to the second syringe. Gently push the plunger of the second syringe to transfer the solution back to the first syringe. Repeat these operations to pass the suspension 21 times through the filter and fragment the MLVs

into smaller and unilamellar liposomes of ~200 nm in diameter. Fill the second syringe with the final liposomes suspension and transfer this suspension into a hemolysis tube. The final suspension should be less milky and more opalescent than the suspension prior to extrusion.

11. Store extruded liposomes at 4 °C and in the dark if they contain fluorescent lipids. Liposomes should be used within 2 days.

3.4 Real-Time Measurement of Sterol Transport

Measurements are performed using a standard fluorimeter (90° format; e.g., Shimadzu RF5301PC or JASCO FP-8300) with a temperature-controlled cell holder. To accurately measure kinetics, it is mandatory to continuously stir the sample at a constant temperature (30 °C or 37 °C depending whether it is a yeast or mammalian protein, respectively). The protocol described thereafter is for measuring transport in a 600 µL sample contained in a cylindrical quartz cell (*see Note 12*) and the use of a Shimadzu RF5301PC apparatus. Use fresh, filtered, and degassed HKM buffer (*see Note 13*). Maintain the tubes filled with the suspension of extruded liposomes at room temperature during the experiment. Wrap the tubes containing fluorescent liposomes with aluminum foil and/or store them in an opaque box to protect them from light.

1. To measure the DHE-to-dansyl FRET, tune the monochromator such as to excite the sample with a wavelength (λ) equal to 310 nanometer (nm) along with a short bandwidth (1–3 nm) to prevent any DHE photobleaching (*see Note 14*). Record the dansyl emission at $\lambda = 525$ nm with a larger bandwidth (≥ 5 nm) to maximize the signal-to-noise ratio. Set up the acquisition time at 24 min and, if possible, with a time resolution < 1 s to facilitate any subsequent kinetics analysis (*see Subheading 3.6*).
2. Mix 30 µL of L_{B-1} liposome suspension with 540 µL of pre-warmed (*see Note 15*) and filtered (either at 30 °C or 37 °C) HKM buffer in the cell to obtain a final concentration of 200 µM total lipids. Put the small magnetic stirring bar into the sample using a clean small Millipore tweezer and place the cell in the spectrofluorometer holder.
3. Wait a few minutes to allow for the thermal equilibration of the sample.
4. Start the recording, and after 1 min, inject 30 µL of L_{A-1} liposome suspension (200 µM total lipids, final concentration). A signal jump must be seen as L_{A-1} liposomes contain DHE and DNS-PE and consequently light is emitted at 525 nm due to DHE-to-dansyl FRET.
5. After 3 min, inject the protein to obtain a final concentration of 200 nM (*see Note 16*) and record the signal during the next

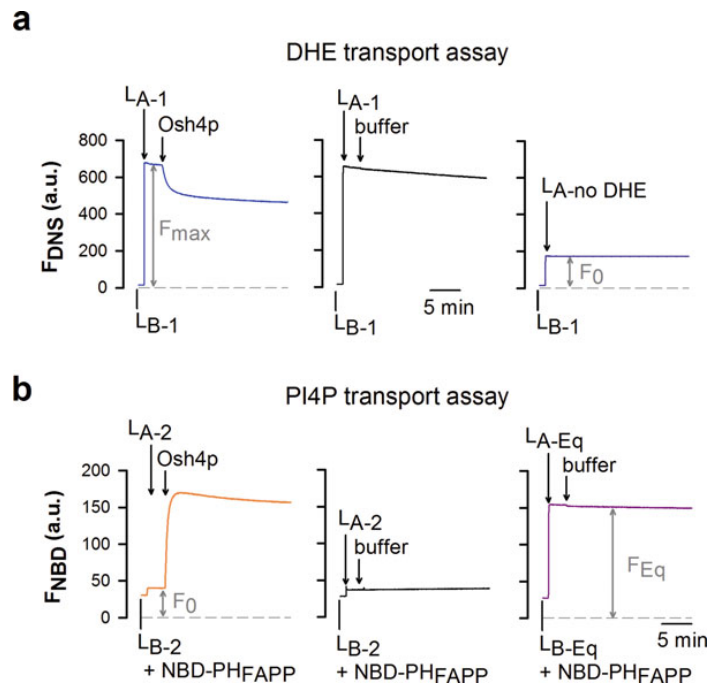


Fig. 3 Typical DHE and PI4P transport kinetics measured with Osh4p and control curves. **(a)** DHE transport assay. L_{B-1} liposomes (200 μM total lipids) and a sterol/PI4P exchanger (Osh4p, 200 nM) are sequentially added to a quartz cell containing L_{A-1} liposomes (200 μM), resulting in a diminution of FRET indicative of the transport of DHE from L_{A-1} to L_{B-1} liposomes (left panel). F_{max} is the fluorescence measured before adding LTP. A control experiment is done by adding buffer instead of protein (middle panel). Liposomes, with 2.5 mol% DNS-PE but no DHE ($L_{A-\text{no DHE}}$), are added to L_{B-1} liposomes (right panel) in order to determine F_0 . **(b)** PI4P transport assays. L_{A-2} liposomes (200 μM lipids) and Osh4p (200 nM) are sequentially added to a cuvette containing L_{B-2} liposomes (200 μM) and NBD-PH_{FAPP} (250 nM) resulting in an increase of NBD signal indicative of the transport of PI4P from L_{B-2} to L_{A-2} liposomes (left panel). A control experiment is done by adding buffer instead of protein (middle panel). To determine F_{Eq} , $L_{A-\text{Eq}}$ liposomes are added to $L_{B-\text{Eq}}$ liposomes in the presence of 250 nM NBD-PH_{FAPP}. Buffer is added instead of the protein (right panel)

20 min. If the protein of interest transports sterol from L_{A-1} to L_{B-1} liposomes, a decrease in FRET signal must be seen (Fig. 3a, left panel).

- As a control, repeat the experiment by adding, instead of protein solution, an equivalent volume of HKM buffer in order to record the spontaneous DHE transport from L_{A-1} to L_{B-1} liposomes (Fig. 3a, middle panel).

7. Record a third experiment to measure the signal F_0 that would be obtained if the entire pool of DHE molecules in L_{A-1} liposomes was transferred to L_{B-1} liposomes. To do this, mix 30 μL of L_{B-1} liposomes with 540 μL of pre-warmed and filtered HKM buffer. Start the recording and inject 30 μL of $L_{A-\text{no DHE}}$ liposomes after 1 min. A prompt increase in signal must be seen and the signal must remain stable until the end of the recording (Fig. 3a, right panel). It corresponds to the basal fluorescence of DNS-PE upon excitation at 310 nm in the absence of FRET (F_0 , see Note 17).
8. Normalize the kinetic curves measured with the LTP of interest or Osh4p as a control to determine the amount of DHE (in μM) transferred from L_A to L_B liposomes over time by transforming each data point of the curve (F value) using the formula $10 \times [1 - ((F - F_0)/(F_{\text{max}} - F_0))]$. F_{max} is the F value just before injecting LTP (see Note 18) and F_0 is the signal measured with the mix of L_{B-1} and $L_{A-\text{no DHE}}$ liposomes. The volumic DHE concentration in the assay is equal to 10 μM since the DHE pool accounts for 5% of 200 μM lipids and is quickly equilibrated between the inner and outer leaflet of liposomes ($t_{1/2}$ of transbilayer movement < 1 min [24]) and hence entirely accessible to the protein. Apply the same normalization procedure to the control curve measured by injecting only buffer.

3.5 Real-Time Measurement of PI4P Transport

1. Set the excitation monochromator at $\lambda = 460$ nm with a short bandwidth (1–3 nm) and emission monochromator at $\lambda = 540$ nm with a larger bandwidth (≥ 10 nm). Set up the acquisition time and the time resolution as for the DHE transport assay.
2. Mix 30 μL of L_{B-2} liposome suspension and NBD-PH_{FAPP} with pre-warmed, filtered, and degassed HKM buffer to a final volume of 570 μL in the quartz cuvette to obtain a final concentration of 200 μM total lipid and 250 nM NBD-PH_{FAPP} (see Note 19). Add a magnetic stirring bar and place the cuvette in the spectrofluorometer holder. Allow the thermal equilibration of the sample.
3. Start the recording. The signal must be low since the NBD-PH_{FAPP} is bound to L_{B-2} liposomes and the NBD fluorescence emission is quenched by Rhod-PE. After 1 min, inject 30 μL of L_{A-2} liposome suspension (200 μM total lipids, final concentration). A small jump in the signal must be seen due to light scattered by this second population of liposomes (Fig. 3b, left panel).
4. After 3 min, inject Osh4p or LTP to obtain a final concentration of 200 nM and record the signal during the next 20 min. If

the protein of interest transports PI4P from L_{B-2} to L_{A-2} liposomes, the NBD signal must increase and possibly reaches a plateau at the end of the measure as seen with Osh4p (Fig. 3b, left panel).

5. As a negative control, repeat the experiment by adding, instead of LTP solution, an equivalent volume of HKM buffer. No change in the NBD signal must be seen (Fig. 3b, middle panel).
6. Perform a third experiment to normalize the NBD signal. Mix 30 μL of $L_{B-\text{eq}}$ liposomes with NBD- PH_{FAPP} (250 nM) in a final volume of 570 μL of HKM buffer. Sequentially inject $L_{A-\text{Eq}}$ liposomes (at $t = 1$ min) and a volume of buffer similar to the volume of injected LTP (at $t = 4$ min). Liposomes have a size and lipid composition similar to that of the liposomes used in the transport assay, except that each population contains initially 2 mol% PI4P. Thus, the NBD signal termed F_{eq} corresponds to a situation where PI4P is already fully equilibrated between the two liposome populations and remains stable over 20 min (Fig. 3b, right panel).
7. Convert the kinetics curve measured with Osh4p or the LTP of interest to determine the amount of PI4P (in μM) transferred from L_{B-2} to L_{A-2} liposomes as a function of time. Normalize each data point of the curve by applying the formula $F_{\text{Norm}} = 0.5 \times ((F - F_0)/(F_{\text{eq}} - F_0))$ in which F corresponds to the value of the data point, F_0 corresponds to the NBD signal prior to the addition of Osh4p (*see Note 20*), and F_{eq} is the signal measured with $L_{A-\text{Eq}}$ and $L_{B-\text{Eq}}$ liposomes. The amount of PI4P (in μM) transferred from L_{B-2} to L_{A-2} liposomes corresponds to $4 \times F_{\text{Norm}}$ considering that the protein has only access to PI4P molecules present in the outer leaflet of the L_{B-2} liposomes, i.e., a pool of 4 μM (corresponding to 4% of $0.5 \times 200 \mu\text{M}$ total lipids).

3.6 Kinetics Analysis

When studying Osh4p, we recorded complex DHE and PI4P transport kinetics whose amplitude and shape could only be interpreted using a multistep kinetic model. Those curves could not be fitted for instance to exponential functions that are often used to describe simple lipid equilibration processes between two membranes akin to first-order reactions. So we recommend, as a first approach, to calculate the initial transport velocities which are representative of the efficiency of a LTP. At this end, we consider that the injection of the LTP sets the time zero of the transport process. The first data points of the curve, after injection, are then fitted with a linear equation by regression analysis. The slope is divided by the LTP concentration in the cuvette such as to determine the number of lipid molecules transported per protein per time unit (min or s). Here an interesting aspect to examine is whether or not the DHE and PI4P transport rates are similar or

equal. If yes, this might be indicative of the coupling between the two transport processes and thus of a sterol/PI4P exchange activity (*see Note 21*).

4 Notes

1. We describe here the preparation of liposomes with simple lipid compositions and a diameter of ~200 nm. These features are well adapted to measure the activity of Osh4p but can also be suitable for other LTPs. DOPC is the major lipid in our liposome preparation. It is better to use this lipid to make L_A liposomes because DOPC, with two mono-unsaturated C18 chains (C18:1), forms lipid bilayers with a low lipid-packing, thereby facilitating sterol extraction. Substituting DOPC by POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), which has one saturated C16 chain (C16:0) and one mono-unsaturated C18 chain (C18:1), to make L_A liposomes, results in slower kinetics of transport by Osh4p because sterol is less extractable. It is yet possible to make L_A liposomes with POPC and measure fast kinetics by making liposomes with small radii and thus with more packing defects, which are known to facilitate sterol extraction. In contrast, our experiences with Osh4p indicated that the use of L_B liposomes made of POPC with a diameter of 200 nm does not impact the kinetic of sterol/PI4P exchange. However, using L_B liposomes made of DOPC and with a low diameter provokes a massive slowdown of the transport as Osh4p tends to remain strongly associated to these liposomes that combine a low lipid-packing, due to the high curvature, and negative charges, due to the presence of PI4P (unpublished data).
2. For faster and better solubilization of complete EDTA-free tablets, plunge the 50 mL falcon tubes in an ultrasonic cleaner bath.
3. Bacterial pellets can be stored for weeks to months.
4. From a lumpy and thick suspension, one should obtain a smoothed and fluid lysate.
5. Typically, considering that a 50 μ L aliquot was used for the dosage, the volume of IANBD in DMF should not exceed 72.5 μ L for 1450 μ L of protein sample and should contain the required mass of IANBD.
6. We recommend using the eluate as a blank.
7. Even if the fluorophore/protein ratio is lower than 1, the PH_{FAPP} probe can be used for PI4P transport assay. In this case consider only the tryptophan absorbance to determine the concentration of the protein.

8. DHE crystallizes in methanol when it is stored at -20°C . Consequently, it is mandatory to warm the vial with hot water to fully re-solubilize DHE. Make sure that the vial is well closed during this operation.
9. The major PI4P species in commercial brain PI4P solution has a mono-unsaturated chain (C18:1) and a poly-unsaturated chain (C20:4) and is quite different from a yeast PI4P. Yet it is well transported and exchanged for sterol by Osh4p. However, we observed with other LTPs such as Osh6p, that this PI4P species is hardly exchangeable with the second lipid counterligand (PS, unpublished data). In that case, it was preferable to use C16:0/C16:0-PI4P which is close in term of its acyl-chains to the most abundant yeast PI4P species [29]. As a guideline, one can thus recommend to use brain PI4P to work with mammalian LTPs and C16:0/C16:0-PI4P with yeast proteins. It is noteworthy that a third PI4P species with long acyl chains (C18:1/C18:1-PI4P) can be purchased from Avanti Polar Lipids.
10. For lipid films including PI4P, it is key to pre-warm the mix. Put the flask under a gentle rotation in the water bath with a temperature between 32 and 34°C for 5 min prior to drying the lipid mixture under vacuum. This step is necessary to properly mix PI4P with the other lipids.
11. MLV suspensions in 1.5 mL tubes cannot be collected with the mini-extruder syringes.
12. It is ideal to inject reactants with 10, 25, or 50 μL Hamilton syringes through a guide in the cover of the fluorimeter. The guide is set up to position the tip of the needle in contact with the meniscus of the sample. Because the needle does not cross the light beam, the measurement is not interrupted by injections: kinetics can be correctly recorded with a <1 s time resolution.
13. If necessary, it is possible to add 1 mM DTT to the buffer to avoid any oxidation of the LTP.
14. The use of a neutral filter can be useful to reduce even more the intensity of the excitation beam, thus limiting the occurrence of photobleaching.
15. If the spectrofluorometer is connected to a water bath to regulate the temperature of the cell holder, one can place a Falcon 50 tube containing HKM buffer in the bath such as to pre-warm buffer at the appropriate temperature.
16. Using a stock solution of lipid transfer protein at 12–40 μM is optimal as only 3–10 μL of sample are added with a 10 μL Hamilton syringe to the reaction mix to obtain a final

concentration of 200 nM, thus avoiding any strong dilution effect and thus a signal modification.

17. Alternatively, it is possible to do this measure without using $L_{A\text{-no DHE}}$ liposomes. To do so, mix L_{A-1} and L_{B-1} liposomes as done with the experiment with the LTP. Then, instead of adding LTP, add methyl- β -cyclodextrin to obtain a final concentration of 10 mM in the sample. This compound at this concentration is able to extract all the DHE molecules from the L_{A-1} liposomes within 1–2 min. So the DNS signal decreases and reaches a plateau whose intensity corresponds to F_0 (basal dansyl signal in the absence of FRET). Please also note that at 1 mM, methyl- β -cyclodextrin acts as a LTP, able to equilibrate DHE between L_{A-1} and L_{B-1} liposomes. So the fluorescence measured at the end of the kinetic trace corresponds to the signal that would be obtained if DHE was found in equal amount between the two liposome populations.
18. Calculate the average of the F values measured during 1 min prior to the addition of the LTP.
19. We could substitute DHE by ergosterol to make L_{A-2} liposomes used in the PI4P transport assays. Indeed, the fluorescence of DHE is not measured in that assay and Osh4p, at least, has the same affinity for DHE or ergosterol. However, in our hands, ergosterol reveals itself particularly instable over time compared to DHE likely due to sensitivity to light. Likewise, the use of cholesterol might be potentially interesting yet we noted that Osh4p does not recognize cholesterol as well as DHE or ergosterol. Based on these observations, in order to compare the DHE and PI4P transport measurements and thus establish a sterol/PI4P exchange process, we recommend using the same source of sterol in the two assays. It is noteworthy that the presence of DHE in the L_{A-2} liposomes does not contribute to the NBD signal measured in the PI4P transport assay.
20. Like for the DHE transport assay, average the F values measured during 1 min prior to the addition of the LTP.
21. Two additional sets of experiments can be done to confirm this point. First it is interesting to measure the DHE transport activity of the LTP with L_{B-1} liposomes devoid of PI4P and to measure the transport of PI4P with L_{A-2} liposomes that do not contain DHE. In both cases, if the LTP is a sterol/PI4P exchanger, one should see a reduction of the transport activity of the protein in the two cases. Second, it is also very informative to identify specific mutations able to simultaneously change the DHE and PI4P transport activity of the LTP under investigation.

Acknowledgments

We thank Souade Ikhlef for careful reading. This work is funded by the French National Research Agency grant ExCHANGE (ANR-16-CE13-0006) and by the CNRS.

References

- Bigay J, Antonny B (2012) Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Dev Cell* 23:886–895
- Drin G (2014) Topological regulation of lipid balance in cells. *Annu Rev Biochem* 83:51–77
- Prinz WA (2010) Lipid trafficking sans vesicles: where, why, how? *Cell* 143:870–874
- Levine T (2004) Short-range intracellular trafficking of small molecules across endoplasmic reticulum junctions. *Trends Cell Biol* 14:483–490
- Holthuis JC, Menon AK (2014) Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* 510:48–57
- Dittman JS, Menon AK (2017) Speed limits for nonvesicular intracellular sterol transport. *Trends Biochem Sci* 42:90–97
- Lev S (2010) Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:739–750
- Lev S (2012) Nonvesicular lipid transfer from the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a013300
- Wong LH, Copic A, Levine TP (2017) Advances on the transfer of lipids by lipid transfer proteins. *Trends Biochem Sci* 42:516–530
- Iaea DB, Dikiy I, Kiburu I et al (2015) STARD4 membrane interactions and sterol binding. *Biochemistry* 54:4623–4636
- Wilhelm LP, Wendling C, Védie B et al (2017) STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *EMBO J* 36:1412–1433
- Bian X, Saheki Y, De Camilli P (2018) Ca²⁺ releases E-Syt1 autoinhibition to couple ER-plasma membrane tethering with lipid transport. *EMBO J* 37:219–234
- Horenkamp FA, Valverde DP, Nunnari J et al (2018) Molecular basis for sterol transport by START-like lipid transfer domains. *EMBO J* 37:e98002
- Jentsch JA, Kiburu I, Pandey K et al (2018) Structural basis of sterol binding and transport by a yeast StARkin domain. *J Biol Chem* 293:5522–5531
- de Saint-Jean M, Delfosse V, Douguet D et al (2011) Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J Cell Biol* 195:965–978
- Mesmin B, Bigay J, Moser von Filseck J et al (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
- Moser von Filseck J, Vanni S, Mesmin B et al (2015) A phosphatidylinositol-4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes. *Nat Commun* 6:6671
- Chung J, Torta F, Masai K et al (2015) INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science* 349:428–432
- Moser von Filseck J, Copic A, Delfosse V et al (2015) INTRACELLULAR TRANSPORT. Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science* 349:432–436
- Wang H, Perry JW, Lauring AS et al (2014) Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology* 146(1373–1385):e1371–1311
- Burgett AW, Poulsen TB, Wangkanont K et al (2011) Natural products reveal cancer cell dependence on oxysterol-binding proteins. *Nat Chem Biol* 7:639–647
- Albulescu L, Bigay J, Biswas B et al (2017) Uncovering oxysterol-binding protein (OSBP) as a target of the anti-enteroviral compound TTP-8307. *Antivir Res* 140:37–44
- Strating JR, van der Linden L, Albulescu L et al (2015) Itraconazole inhibits enterovirus replication by targeting the oxysterol-binding protein. *Cell Rep* 10:600–615
- John K, Kubelt J, Muller P et al (2002) Rapid transbilayer movement of the fluorescent sterol dehydroergosterol in lipid membranes. *Biophys J* 83:1525–1534
- Lenoir M, Grzybek M, Majkowski M et al (2015) Structural basis of dynamic membrane

- recognition by trans-Golgi network specific FAPP proteins. *J Mol Biol* 427:966–981
26. Lenoir M, Coskun U, Grzybek M et al (2010) Structural basis of wedging the Golgi membrane by FAPP pleckstrin homology domains. *EMBO Rep* 11:279–284
27. Liu Y, Kahn RA, Prestegard JH (2014) Interaction of Fapp1 with Arf1 and PI4P at a membrane surface: an example of coincidence detection. *Structure* 22:421–430
28. Ghai R, Du X, Wang H et al (2017) ORP5 and ORP8 bind phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) and regulate its level at the plasma membrane. *Nat Commun* 8:757
29. Ejsing CS, Sampaio JL, Surendranath V et al (2009) Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2136–2141



Lipid Exchangers: Cellular Functions and Mechanistic Links With Phosphoinositide Metabolism

Nicolas-Frédéric Lipp[†], Souade Ikhlef[†], Julie Milanini and Guillaume Drin^{*}

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

OPEN ACCESS

Edited by:

Rutilio A. Fratti,
University of Illinois
at Urbana-Champaign, United States

Reviewed by:

Young Jun Im,
Chonnam National University,
South Korea
Tamas Balla,
National Institutes of Health (NIH),
United States

*Correspondence:

Guillaume Drin
drin@ipmc.cnrs.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Membrane Traffic,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 15 May 2020

Accepted: 01 July 2020

Published: 21 July 2020

Citation:

Lipp N-F, Ikhlef S, Milanini J and
Drin G (2020) Lipid Exchangers:
Cellular Functions and Mechanistic
Links With Phosphoinositide
Metabolism.
Front. Cell Dev. Biol. 8:663.
doi: 10.3389/fcell.2020.00663

Lipids are amphiphilic molecules that self-assemble to form biological membranes. Thousands of lipid species coexist in the cell and, once combined, define organelle identity. Due to recent progress in lipidomic analysis, we now know how lipid composition is finely tuned in different subcellular regions. Along with lipid synthesis, remodeling and flip-flop, lipid transfer is one of the active processes that regulates this intracellular lipid distribution. It is mediated by Lipid Transfer Proteins (LTPs) that precisely move certain lipid species across the cytosol and between the organelles. A particular subset of LTPs from three families (Sec14, PITP, OSBP/ORP/Osh) act as lipid exchangers. A striking feature of these exchangers is that they use phosphatidylinositol or phosphoinositides (PIPs) as a lipid ligand and thereby have specific links with PIP metabolism and are thus able to both control the lipid composition of cellular membranes and their signaling capacity. As a result, they play pivotal roles in cellular processes such as vesicular trafficking and signal transduction at the plasma membrane. Recent data have shown that some PIPs are used as energy by lipid exchangers to generate lipid gradients between organelles. Here we describe the importance of lipid counter-exchange in the cell, its structural basis, and presumed links with pathologies.

Keywords: lipid transfer proteins, lipid exchange, phosphoinositides, sterol, phosphatidylserine, membrane contact sites, signaling, vesicular trafficking

INTRODUCTION

Most units of life can be described as a lipidic membrane that encloses an internal and aqueous compartment hosting replication and division machinery, illustrating the fundamental role of lipidic membranes in life. Cells are of course much more complex, with internal membrane-delimited organelles that compartmentalize biochemical reactions. These membranes, with a bilayer structure, result from the assembly of a myriad of lipids together with proteins. The lipid chemistry is diverse with thousands of subspecies. All of these are precisely distributed in the cell. A nanometric snapshot of a cell would reveal that the membrane of the endoplasmic reticulum (ER), the nuclear envelope and the *cis*-side of Golgi stacks mostly contain phosphatidylcholine (PC), a neutral glycerophospholipid, phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylinositol (PI), with disordered acyl chains. This snapshot would indicate that, contrastingly, the *trans*-Golgi, endosomes and the plasma membrane (PM) contain phospholipids whose acyl chains are much more ordered but also more phosphatidylserine (PS), which is an anionic lipid. Moreover,

these membranes contain an important amount of sphingolipid and sterol, which is a rigid lipid (Drin, 2014).

Consequently, organelle membranes differ in term of thickness, fluidity, and their surfaces display distinct electrostatic properties in addition to hosting specific signaling capacity. Thereby each organelle membrane offers an environment that is perfectly suited for the activity of particular subsets of integral membrane and peripheral proteins. Thus, the lipid distribution observed inside the cell supports functions as diverse as endocytosis and exocytosis, signaling pathways, ionic exchange, cellular movement, respiratory function, etc.

Many processes continuously mix membranes (for example vesicular trafficking), or consume lipids (for example signaling cascades), and thereby alter the intracellular lipid distribution. To counteract this, mechanisms that create and maintain the lipid content of organelles are constantly in action. Enzymatic metabolic pathways ensure the synthesis, interconversion and degradation of lipid subspecies. In parallel, different mechanisms transfer lipids between and within the cell membranes.

Early on, it has been suspected that transfer routes were at the core of the lipid distribution because most of the lipids or lipid precursors are made in the ER. Therefore, mechanisms are required to export lipids across the cytosol toward the Golgi complex, the PM or mitochondria. Due to the hydrophobic nature of lipids, this should take hours or even days to occur spontaneously, a timescale that is utterly incompatible with cellular functions. Today it is widely assumed that the cell largely relies on Lipid Transfer Proteins (LTPs) that contain a hydrophobic cavity to shield lipids from water and catalyze lipid transfer between organelles (Lev, 2010; Wong et al., 2017). It is equally appreciated that these transfer processes partially take place in membrane contact sites (MCSs), i.e., zones of close apposition (<30 nm) between the ER and the PM or the ER and other organelles (for a recent review, see Prinz et al., 2020).

These LTPs belong to diverse families and show a great structural diversity (Chiapparino et al., 2016). One can distinguish several types of LTPs: those that capture only one lipid ligand, host a few lipids or that accommodate two different lipid ligands. This review will focus on this third class of LTPs, showing that most of these execute heterotypic lipid exchange between two organelles. Strikingly, a shared feature of all of these exchangers is the use of PI or phosphoinositides (PIPs) as lipid ligand (Figure 1). PI accounts for ~10% of cellular glycerophospholipids (Vance, 2015) and consists of a glycerol backbone that bears two hydrophobic acyl chains and an inositol ring as the polar head. Importantly, PI is the precursor for a group of seven phosphoinositides (PIPs) that act as key signaling lipids. They are generated by PIP kinases and phosphatases that add or remove phosphate groups to a specific (3-, 4-, or 5-) position of the inositol ring. PIPs are produced in little quantities (less than 1% of total glycerophospholipids) in a tightly controlled manner (Di Paolo and De Camilli, 2006; Sasaki et al., 2009). Consequently, organelles harbor trace amounts of specific PIPs, which constitute molecular signposts and support various functions: signaling pathways, vesicular trafficking, cytoskeletal dynamics and ion transport. Notably, phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P) is present in the *trans*-Golgi and the PM,

whereas phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) is restricted to the PM. Herein, we describe the tight links between PI/PIP metabolism and lipid exchangers that belong to three families, namely the Sec14p, PITP and OSBP/ORP/Osh families. We will show that these connections impart the LTPs with a unique and central role in the cell, at the interface between lipid metabolism, cellular signaling and vesicular trafficking.

PC/PI EXCHANGE BY Sec14p AND THE NANOREACTOR MODEL

PI(4)P labels the cytosolic leaflet of the *trans*-Golgi where it plays an essential role in vesicular trafficking. For instance, in yeast, PI(4)P, along with the small G protein Arf1p, recruits tetrameric adaptor proteins during the formation of vesicles that supply endosomal and vacuolar compartments with cargo proteins (Conibear and Stevens, 1998) and Gga2p (Demmel et al., 2008) to generate dense secretory vesicles for invertase secretion (Harsay and Schekman, 2002). PI(4)P is also critical in polarized exocytosis, i.e., the biogenesis of secretory vesicles that supply the PM with lipids and proteins during asymmetric cell division. PI(4)P cooperates with the small G protein Ypt32p to initiate a process that involves several downstream proteins, including Sec2p, Sec4p, and Myo2p (Ortiz et al., 2002; Santiago-tirado et al., 2011). Inactivating Pik1p, the unique PI 4-kinase that synthesizes PI(4)P at the Golgi complex, blocks almost all transport routes (Walch-Solimena and Novick, 1999).

Seminal studies in the late eighties showed that Sec14p, a cytosolic protein of ~35 kDa, and the prototypical member of the CRAL-Trio superfamily, is essential to regulate Golgi PI(4)P levels and the secretory competence of the yeast. A key observation is that deleting Sec14p is lethal in yeast, vesicles fail to bud from the Golgi complex, and proteins accumulate within this organelle (Bankaitis et al., 1989, 1990). Intriguingly Sec14p can transfer PI and PC between membranes, unveiling a novel link between lipid transport and vesicular trafficking (Aitken et al., 1990; Bankaitis et al., 1990). Silencing Sac1p, which is ER-localized and the main PI(4)P phosphatase in yeast, bypasses the requirement of Sec14p for cellular viability (Whitters et al., 1993; Rivas et al., 1999). PI(4)P is not hydrolyzed into PI and becomes overabundant, counterbalancing a low PI(4)P production arising from the lack of Sec14p. Accordingly, when Sec14p is absent, the amount of cellular PI(4)P is reduced by half (Schaaf et al., 2008) and the level of available PI(4)P drops at the Golgi surface (Fairn et al., 2007). This resembles what is seen when Pik1p is missing and can be corrected by overexpressing this protein (Hama et al., 1999). Thus, Sec14p and Pik1p cooperate to generate a Golgi PI(4)P pool that can be downregulated by Sac1p.

Intriguingly, the disruption of PC production in Golgi also bypasses the requirement of Sec14p for yeast viability, suggesting that Sec14p modulates other facets of lipid homeostasis that are important for secretion (Cleves et al., 1991; McGee et al., 1994). Sec14p was found to be a repressor of the CDP-choline pathway, one of the two pathways for PC biosynthesis. When absent, PC is generated from diacylglycerol (DAG), resulting in a DAG overconsumption. DAG is critical for vesicle biogenesis, albeit in

in Sec14p (Panagabko et al., 2019), but it is unknown whether the opposite is true. One might suggest, based on these *in vitro* data, that Sec14p ferries PI from the ER, where it is made, to the Golgi complex to enhance PI(4)P production. Sec14p would remove PC from the Golgi complex to alleviate the toxic effect of this lipid on trafficking (Figure 2A; Cleves et al., 1991).

Many clues suggest that the intermembrane transfer activity measured *in vitro* corresponds to Sec14p activity that only occurs when given no other context or task that are available in the cell, and does not accurately reflect its cellular function. It is almost certain that Sec14p must have the dual ability to recognize PC and PI in order to fulfill its function (Schaaf et al., 2008), despite initial data (Phillips et al., 1999). A concept referred to as the nanoreactor model posits that Sec14p performs PC/PI exchange on the Golgi membrane to directly boost Pik1p activity (Schaaf et al., 2008; Bankaitis et al., 2012; Mousley et al., 2012). During a round of exchange, PC causes the egress of PI from the Sec14p cavity to form a Sec14p intermediate presenting the PI headgroup in a configuration that is competent for phosphorylation by Pik1p (Figure 2A); then Sec14p traps a new PI molecule and the PC molecule is expelled. Interestingly, the nanoreactor model assigns a dual role for Sec14p as a PC sensor and PI-presenting device that transmits PC metabolic information to the PI(4)P factory. If the DAG pool, which is crucial for TGN trafficking, is exhausted by the CDP-choline pathway for making PC, a PC pool is created, stimulating the exchange activity of Sec14p and PI(4)P synthesis. Then, higher PI(4)P levels supersede the DAG shortage to preserve vesicular trafficking. This model is difficult to test and initial attempts showed that a PC-binding mutant of Sec14p still elicits PI 4-kinase activity in the presence of PI-rich membrane (Schaaf et al., 2008). Also, given the higher affinity of Sec14p for PI vs PC and that PI is slightly more abundant than PC in the Golgi membrane (Klemm et al., 2009), it is uncertain that Sec14p performs fast PC/PI exchange. Moreover, there is no evidence that Sec14p physically interacts with Pik1p (Bankaitis et al., 2012). Although the structure of its human homolog PI4KIII β is known (Burke et al., 2014), we still do not know precisely how Pik1p recognizes and phosphorylates PI.

Sec14 HOMOLOGS IN YEAST

Yeasts also express five Sfh proteins (Sec14 homologs). Sfh1p is quite similar to Sec14p whereas the Sfh2-5p are more divergent (Li et al., 2000). Sfh1p has both nuclear and cytosolic localization but it can also target endosomes, the Golgi complex and vacuoles (Schnabl et al., 2003; Mizuike et al., 2019). Sfh1p has been used as a surrogate of Sec14p for structural studies and has been crystallized with PC or PI (Schaaf et al., 2008). However, overexpressing Sfh1p does not fully restore Sec14p function in yeast and barely transfers PI or PC *in vitro* (Li et al., 2000; Mizuike et al., 2019; Panagabko et al., 2019). Interestingly, single amino-acid substitutions confer Sfh1p with the ability to substitute for Sec14p, by changing the rate at which PC and PI cycles in and out the binding pocket (Schaaf et al., 2011). Sfh1p traps other phospholipids, PS and PE, and it can be crystallized with PE (Schaaf et al., 2008). Moreover, recent findings suggest that Sfh1p

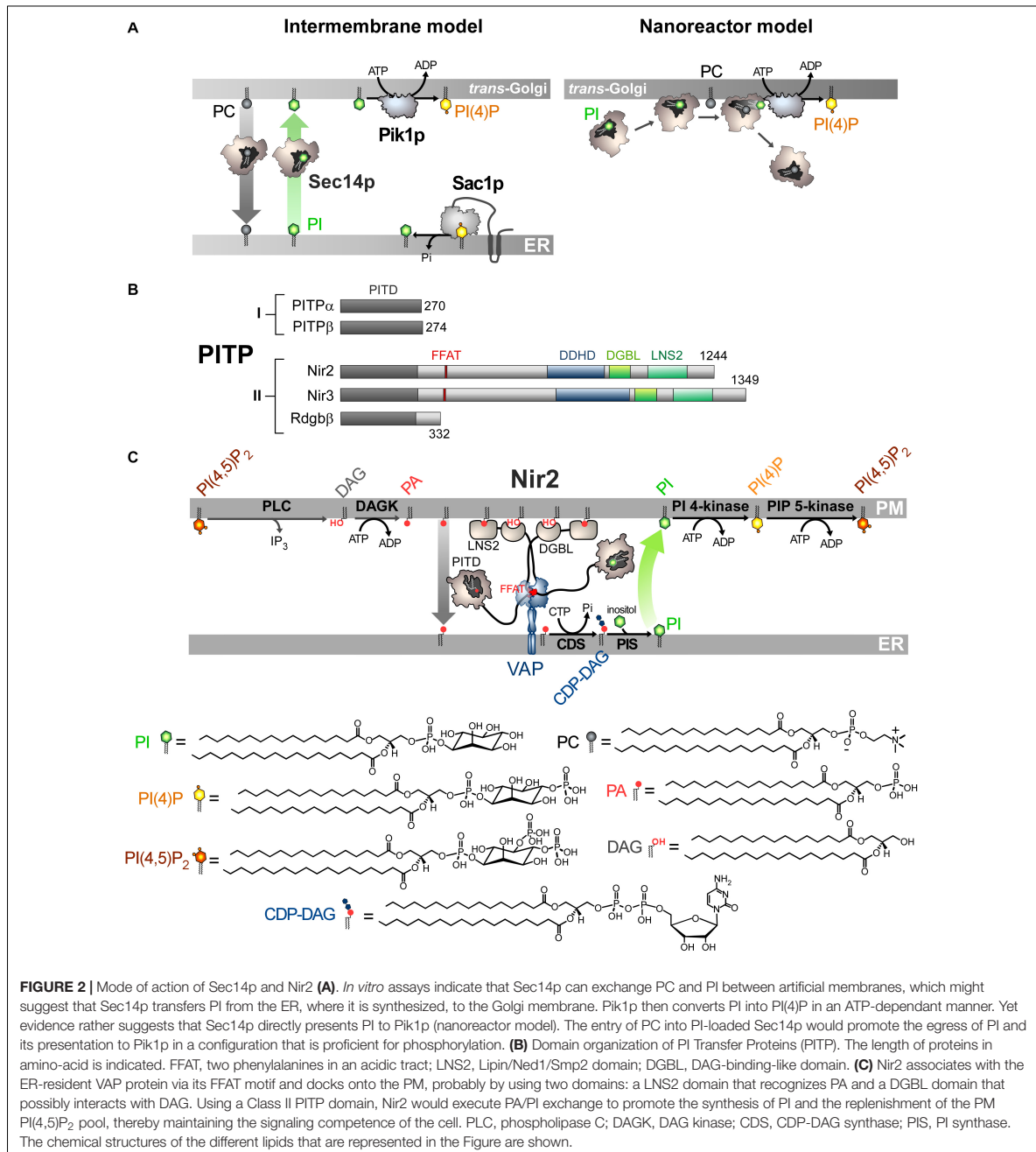
transports PS in yeast to supply PS from the ER to Psd2p, which decarboxylates PS into PE at the endosome surface (Mizuike et al., 2019). It has been suggested that Sfh1p acts as a PS/PE exchanger and delivers PE to the ER.

Like Sfh1p, the other Sfh proteins have PI but not PC transfer activity (Li et al., 2000). Despite this and their low sequence identity with Sec14p, Sfh2p, and Sfh4p can replace Sec14p when they are overexpressed (Li et al., 2000). *In vitro*, Sfh2p is able to transfer squalene but how this relates to its activity is unclear (Tripathi et al., 2019). Sfh4p functions in ER-endosome contact sites to activate the PS-to-PE conversion by Psd2p. Sfh4p interacts physically with Psd2p and is regulated by PI(4)P. It is unclear how PS is transferred to endosomes (Sfh4p does not transfer PS) and why Sfh4p has PI binding ability (Riekhof et al., 2014; Wang et al., 2020).

Sfh3p has been co-crystallized with PI (Yang et al., 2013) and can alternately encapsulate and transfer sterol (Holič et al., 2014; Tripathi et al., 2019). Sfh3p is linked to ergosterol metabolism and controls a PI(4)P-dependent signaling pathway that regulates the use of lipids at lipid droplets (LDs), which are energy-storage organelles, full of triacylglycerol (TAG) and steryl-ester and covered by a lipid monolayer, that originate from the ER (Holič et al., 2014; Ren et al., 2014). However, it is unclear exactly how Sfh3p functions. Sfh5p is involved in polarized exocytosis by supplying PI to secretory vesicles that fuse with the PM. PI is sequentially converted into PI(4)P and PI(4,5)P₂ by the PI 4-kinase, Stt4p, and the PIP 5-kinase, Mss4p. PI(4,5)P₂, with the small G protein Cdc42p, govern the organization of the actin skeleton at the PM that assists polarized exocytosis (Liat and Gerst, 2009). Recent computational approaches indicated that Sfh proteins have evolved differently and each contain a specific cavity microenvironment while conserving a common “barcode,” i.e., a few residues at specific positions in the sequence to recognize PI (Tripathi et al., 2019). This gives them specific cellular functions with or even without links to PI/PIP metabolism.

MAMMALIAN Sec14-LIKE PROTEINS CAPTURE AND TRANSFER LIPOPHILIC LIGANDS

α -TTP (α -tocopherol transfer protein) is a Sec14p-like protein with high specificity for α -tocopherol (Panagabko et al., 2003), the most abundant form of vitamin E in mammals, to ensure its secretion from liver cells. Autosomal recessive mutations in α -TTP provoke strong neurological disorders (e.g., ataxia) linked to a deficiency in circulating vitamin E (Mariotti et al., 2004). Intriguingly, a mutation that provokes a severe, early-onset form of the disease does not prevent α -TTP from sequestering α -tocopherol. Instead, it decreases its capacity to recognize PI(4,5)P₂ or PI(3,4)P₂. In fact, these PIPs guarantee the efficient transfer of α -tocopherol to the PM. *In vitro*, α -TTP exchanges α -tocopherol for PI(4,5)P₂ between membranes (Kono et al., 2013) demonstrating that α -TTP is a vitamin E/PIP exchanger in liver cells.



CRALBP (cellular retinaldehyde-binding protein) is a key component of the visual cycle of vertebrates that binds vitamin A; its malfunctioning leads to several vision pathologies (Saari and Crabb, 2005). In photoreceptor cells, when a photon hits opsin, it induces the photoisomerization of 11-*cis*-retinal (11-*cis*-RAL) to all-*trans*-retinal (all-*trans*-RAL) linked to that

receptor. All-*trans*-RAL is reduced into all-*trans*-retinol and transferred to retinal pigment epithelium (RPE) cells. All-*trans*-retinol is subsequently esterified and the all-*trans*-retinyl ester is converted into 11-*cis*-retinol by an isomerohydrolase. CRALBP enhances this process, likely by preventing the inhibition of the enzyme by the end-product of the reaction. CRALP also

serves as a substrate carrier for 11-*cis*-RDH (RDH5), facilitating the oxidation of 11-*cis*-retinol to 11-*cis*-RAL (Saari et al., 1994; Winston and Rando, 1998; Stecher et al., 1999). CRALBP then delivers 11-*cis*-RAL to the PM of RPE for export to the adjacent photoreceptor cells. CRALBP has a high affinity for 11-*cis*-RAL but cannot bind lipids such as PC or PI (Panagabko et al., 2003). However, structural analyses indicate that the mode of association of CRALBP with its ligand resembles that which is observed for the lipid-bound Sfh1p (He et al., 2009). The CRALBP structure also revealed that a mutation that causes Bothnia dystrophy induces a rearrangement of the Sec14-like domain, thus preventing the release of 11-*cis*-RAL from the binding pocket (He et al., 2009). Intriguingly, acidic PM phospholipids, such as PS and PA, might enhance the egress of 11-*cis*-RAL from CRALBP but probably not by an exchange process (Saari et al., 2009).

Another mammalian Sec14-like protein that is suspected to have an intracellular transfer activity is the Supernatant Protein Factor (SPF, also referred to as α -Tocopherol Associated Protein). It stimulates the conversion of squalene to lanosterol, and thus promotes cholesterol biosynthesis, presumably by transferring squalene to metabolically active specific membrane sites (Shibata et al., 2001). SPF is also linked to tocopherol metabolism (Porter, 2003). The structure of its Sec14-like domain, both empty and bound to squalene, is known (Stocker et al., 2002; Christen et al., 2015). It has some affinity for PI (Panagabko et al., 2003) but it is unknown whether this is important for its function.

CLASS I PITP ARE PC/PI EXCHANGERS THAT REGULATE GOLGI FUNCTIONS

In humans, five proteins constitute the PITPs family (Figure 2B; Cockcroft and Carvou, 2007). All of these contain a PI-transfer domain (PITD). Pioneer studies indicated that PITPs of Class I, referred to as PITP α and β , could transfer PC or PI between membranes, suggestive of a capacity to act as PC/PI exchangers between organelles (Helmkamp et al., 1974; Van Paridon et al., 1987; De Vries et al., 1995). Recently, it has been shown that the Class II PITPs correspond to PA/PI exchangers. As detailed below, this has a fundamental implication for phospholipase C (PLC)-based signaling pathways that generate second messengers, DAG and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3), by hydrolyzing PI(4,5)P₂ upon receptor activation.

The first class of PITPs is composed of PITP α and β . PITP α is highly expressed in the brain and is predominantly localized in the axons (Cosker et al., 2008) whereas PITP β is abundant in the liver and localizes to the Golgi complex and the ER (Morgan et al., 2004; Phillips et al., 2006; Shadan et al., 2008). These isoforms have only a PITD with the capacity to trap PI or PC and to transfer them between membranes (Van Paridon et al., 1987). The crystal structures of the rat PITP α and human PITP β have been solved both empty and loaded with PC or PI (Schouten et al., 2002; Tilley et al., 2004; Vordtriede et al., 2005). The PITD consists of an eight-stranded β -sheet flanked by two long α -helices that form a pocket that can host either one PC or one PI molecule. An α -helix (G-helix), along with 11 C-terminal amino

acid residues function as a gate to close the cavity. The polar head of the lipid is embedded inside the pocket: the inositol ring of PI makes contacts with four amino acids which are conserved in the PITD of many proteins (Schouten et al., 2002; Tilley et al., 2004; Vordtriede et al., 2005). In contrast, it is unclear how PC is recognized. The strong network of H-bonds between the PI molecule and the pocket residues explain why PITP α and β have 16-times more affinity for PI than for PC (Van Paridon et al., 1987; Tilley et al., 2004). A structural comparison of apo and lipid-loaded forms of PITP suggests that the G-helix swings out to allow the release of the lipid from the pocket. In its open and empty state, the PITD can dock onto membrane thanks to a larger hydrophobic interface (Tilley et al., 2004; Shadan et al., 2008).

The two PITPs execute distinct but redundant functions. Early data suggested that PITP α assists PLC β - or PLC γ -based signaling cascades in permeabilized cells (Thomas et al., 1933; Kauffmann-Zeh et al., 1995). Notably, it was proposed that the EGF-receptor recruits PITP α , PLC γ and PI 4-kinase to generate a robust signal by ensuring both the genesis of PI(4,5)P₂ and its conversion into second messengers. PITP α was reported to sustain the production of PI(3,4,5)P₃ by PI 3-kinase in human neutrophils in response to a chemoattractant (Kular et al., 1997). Other reconstitution assays showed that PITP α promotes the formation of secretory vesicles from the *trans*-Golgi network (TGN) (Ohashi et al., 1995) or the fusion of secretory granules with the PM (Hay and Martin, 1993). These studies conveyed the idea that PITPs, and more broadly PC/PI exchangers, could assist PIP metabolism and PIP-dependent signaling given that Sec14p could substitute for PITPs in some of these assays. However, most of them did not formally demonstrate that PITP α impacts PIPs levels. Subsequent data indicated that the physiological role of PITP α is related to the development and function of the nervous system. In mice with the *vibrator* mutation, a 5-fold decrease in PITP α expression leads to tremor, degeneration of the brain stem and spinal cord neurons, and early death (Hamilton et al., 1997). Full ablation of the PITP α gene in mice results in premature death associated to cerebellum diseases, hypoglycaemia, and intestinal and hepatic steatosis due to defects in ER function in different cell types (Alb et al., 2003). Recently, PITP α has been shown to maintain the PIP pools dedicated to PLC and PI 3-kinase-dependent signaling during axonal growth in response to external growth factors, to proteins of the extracellular matrix or to netrin-1, an extracellular guidance cue (Xie et al., 2005; Cosker et al., 2008). Interestingly, PITP α might interact with the netrin receptor along with PI(5)P to maintain the availability of PI(4,5)P₂ in the PM. As in the case for Sec14p, it is unclear whether PITP α provisions the PM with PI or directly presents PI to PI 4-kinases.

The function of PITP β remains ill-defined. Preliminary investigations suggested that the absence of PITP β is embryonic lethal in mice (Alb et al., 2002) but it has been recently reported that PITP β -null mice are viable with no obvious phenotype (Xie et al., 2018). In cell culture, PITP β samples the ER and Golgi surface within a few minutes, which suggests that it executes fast PC/PI exchange between these organelles (Shadan et al., 2008). It is accepted that PITP β upregulates the Golgi PI(4)P level, but divergent results have been obtained. PITP β seems to

be critical for Golgi-to-ER retrograde trafficking, mediated by COPI-coated vesicles. PITP β would deliver PI from the ER to the *cis*-Golgi for maintaining a PI(4)P pool to interface COPI vesicle formation with the binding of Golgi complex to the actin cytoskeleton (Carvou et al., 2010). In contrast, in neural stem cells (NSCs), PITP β potentiates PI(4)P synthesis not at the *cis* but at the *trans*-Golgi and, interestingly, this function is also ensured by PITP α (Xie et al., 2018). The PI(4)P pool serves to recruit GOLPH3 and the non-conventional myosin MYO18A that interacts with F-actin and promotes Golgi-to-PM trafficking. The tensile force exerted by actin cytoskeletal proteins interacting with proteins bound to the TGN, enhances vesicular budding, the secretory capacity of the TGN and its positioning in the apical compartment of NSCs. This facilitates the apical sorting of cargo proteins and lipids and thereby optimizes Golgi responses to apical PM signaling. This is critical: a lack of both PITP α and PITP β provokes a misalignment of NSCs in the neocortex followed by apoptotic events, preventing dorsal forebrain development.

CLASS II PITPS ARE PA/PI EXCHANGERS THAT MAINTAIN THE SIGNALING COMPETENCE OF THE CELL

Phospholipase C-based signaling pathways rely on the hydrolysis of PI(4,5)P₂ to produce second messengers. It has long been appreciated that mechanisms must be in place to rapidly regenerate the PM PI(4,5)P₂ pool and preserve the signaling competence of the cell as well as other PI(4,5)P₂-dependant processes (channel activation, endocytosis). This relies on the so-called PI cycle, a multi-step pathway that recycles DAG into PI(4,5)P₂. A first and necessary step is the conversion of DAG into PA by a DAG kinase (Cai et al., 2009) that is supposed to be DGK ϵ (Epanand, 2017). Indeed, this is the only isoform that shows high specificity for DAG species with the same acyl chain composition found in the lipid intermediates of the PI cycle. However, DGK ϵ is more clearly observable at the ER than at the PM, where it should function (Kobayashi et al., 2007; Decaffmeyer et al., 2008). Moreover, although DGK ϵ is involved in PI(4,5)P₂-dependant signaling cascades linked to cortex functions in mice, it is surprisingly not essential for their development and survival. Presumably, other DAG kinases can substitute for DGK ϵ *in vivo* (Rodriguez De Turco et al., 2001). PA is then converted into CDP-DAG via the consumption of CTP by integral membrane proteins, CDP-DAG synthase (CDS1/2) (Lykidis et al., 1997). Thereafter, the PI synthase (PIS) conjugates inositol with CDP-DAG to make PI (Tanaka et al., 1996; Kim et al., 2011). Finally, PI undergoes sequential phosphorylation to generate PI(4,5)P₂. For this cycle to function, as foreseen by Mitchell (1975), it is necessary to transfer PA from the PM to the ER and PI in the opposite direction. Indeed, CDS and PIS, the two enzymes that ensure the PA-to-PI conversion, reside at the ER, whereas PI is phosphorylated at the PM. It was unknown for many years how PA and PI lipids are transferred

between these two compartments. As mentioned previously, in 1993 a study from the S. Cockcroft team suggested that the maintenance of PI(4,5)P₂-based signaling in human cell lines was dependent on PITP α (Thomas et al., 1993). However, as this protein recognizes PI and PC, this did not indicate how PA is transferred. Later, the same group focused on human RdgB β (*a.k.a.* PITPNC1), Nir2 (alias RdgBb1; PITPNM1), and Nir3 (RdgBb2, PITPNM2), which belong to the Class II of PITP and were less well characterized than Class I in respect to their lipid binding properties. RdgB β only consists of an N-terminal PITD followed by a C-terminal extension of 80 amino-acids. Nir2/Nir3 are more complex with an N-terminal PITD followed by a FFAT motif (two phenylalanines in an acidic tract) to interact with the ER-resident VAP protein (Nishimura et al., 1999; Amarilio et al., 2005; Kim et al., 2013), and two domains, a DDHD domain, which possibly targets PI(4)P (Inoue et al., 2012) and a LNS2 (Lipin/Ned1/Smp2) domain, which was identified in the lipin proteins as possessing PA phosphatase activity. In Nir2, the LNS2 domain lacks a key catalytic residue, suggesting that Nir2 has no PA phosphatase activity but detects PA. An important study found that RdgB β can trap PI or a second lipid, PA, and not PC (Garner et al., 2012). It is unclear why Class I and II PITD are selective for PC and PA, respectively. Possibly, a single cysteine and a bulky residue, which are critical for the recognition of PC, are replaced by threonine and alanine, respectively, in Class II PITD (Garner et al., 2012).

The PITD of Nir2 and its *Drosophila* homolog *Dm*-RdgB α also displays dual specificity for PA and PI. This has central implications. First, *Dm*-RdgB α is localized to the submicrovillar cisternae (SMC), a subcompartment of the ER adjacent to the microvillar PM of *Drosophila* photoreceptor cells (Vihtelic et al., 1993), so it is localized in a subcellular region that resembles ER-PM contact sites. Second, loss-of-function mutants in *Dm*-RdgB α are characterized by an abnormal conversion of light signal into electrical response. Moreover, the rhabdomeric membranes become vesiculated, leading to photoreceptor cell degeneration (hence the name RdgB for retinal degeneration type B). Photon absorption by the GPCR rhodopsin is transduced into electrical activity by G-protein-coupled PLC β -mediated PI(4,5)P₂ hydrolysis. Therefore, one might speculate that *Dm*-RdgB α and its human homolog are strongly involved in the maintenance of cellular signaling competence. In human cell lines exposed to growth factors, Nir2 translocates to the PM due to the formation of PA, thanks to its C-terminal LNS2 (Kim et al., 2013). Nir2 is required to maintain PM PI(4,5)P₂ levels and the stimulation of PI(3,4,5)P₃ production by growth factors that positively regulate the MAPK and PI 3-kinase/Akt pathways (Kim et al., 2013). Nir2 locates to the ER by associating with VAP proteins (Amarilio et al., 2005) and Balla and co-workers eventually showed that Nir2 colonizes ER-PM contact sites following PLC activation (Kim et al., 2015). Importantly, they showed that Nir2 transfers PA from the PM to the ER and connects PA with PI metabolism to maintain proper PM PI(4,5)P₂ levels. Overall, this strongly suggested that Nir2 acts as a cellular PA/PI exchanger. They also identified a segment called DGBL (DAG-binding-like) with a sequence with some similarity to the DAG-binding C1 domain. This segment cooperates with

LNS2 to anchor Nir2 to the PM by recognizing PLC-generated DAG. Once Nir2 is docked to the PM, the excess PA is loaded inside Nir2 PITD and transferred to the ER. PA is used to make PI which is subsequently conveyed to the PM for phosphorylation (Figure 2C). Concurrently, it was reported that *Dm-RdgB α* , whose molecular configuration is similar to that of Nir2, localizes between the SMC and the PM in photoreceptors cells to couple PA and PI turnover by PA/PI exchange and thus to sustain the PLC-based signal transduction of light (Yadav et al., 2015). Note that elevated cytosolic Ca²⁺ levels, following PLC activation, enhances the formation of ER-PM contact sites by the membrane-tethering factor E-Syt1 (Giordano et al., 2013), and helps Nir2 to regenerate PI(4,5)P₂ (Chang et al., 2013). Interestingly, comparatively to Nir2, Nir3 detects lower level of PA in the PM via its LNS2 domain and has a lower PA transfer capacity. Consequently, Nir3 can sustain proper PI(4,5)P₂ levels in resting cells whereas Nir2 is only mobilized during intense receptor activation to actively exchange lipids (Chang and Liou, 2015). Finally, Balla and co-workers noted that a truncated Nir2 mutant that lacks PITD is strongly enriched in ER-PM contact sites (Kim et al., 2015). This suggests that Nir2, by transferring PA to the ER, self-regulates its PA-dependant association to the PM.

Nir2 is detected in ER-Golgi contact sites in resting cells and is critical for maintaining proper DAG levels in the TGN and the secretory capacity of this compartment (Litvak et al., 2005; Kim et al., 2013). Nir2 also controls Golgi PI(4)P levels (Peretti et al., 2008). These observations have been interpreted with the prospect that Nir2 was a PC/PI exchanger. It is today unclear how Nir2, via its PA/PI exchange ability, regulates Golgi DAG or PI(4)P levels. Intriguingly, the Nir2 PITD, which is supposed to move throughout the cytosol in order to exchange lipids, ensures the association of Nir2 with the Golgi surface (Kim et al., 2013). Overall, how Nir2 functions in ER-Golgi contacts besides its role at the ER/PM interface remains a mystery.

ROLE OF CLASS II PITPs IN PATHOLOGIES

There are tenuous links between Class II PITPs and cancer, likely due to their role in coupling lipid metabolism with cellular signaling. Nir2 enhances the transition of mammary epithelial and breast cancer cells into a more motile and invasive state, with a higher metastatic capacity. These effects are mainly mediated by the PI 3-kinase/Akt and the ERK1/2 pathways. Nir2 expression correlates with high tumor grades and poor disease outcomes in breast cancer patients. These new findings reveal important physiological roles of LTPs and their implication in human diseases (Keinan et al., 2014).

RdgB β has a single C-terminal extension that, upon phosphorylation, associates with the 14-3-3 protein, and increases its stability (Garner et al., 2011; Halberg et al., 2016). Moreover, RdgB β interacts via its PITD with ATRAP (Angiotensin II Type I Receptor-Associated Protein), a transmembrane protein that interacts with the angiotensin II receptor type 1 (AT1R) and triggers its internalization, shutting-down subsequent PLC activation, and thereby exerts

a protective effect against AngII stimulation (Garner et al., 2011, 2012; Cockcroft and Garner, 2013). However, the role of this interaction is unclear. There is compelling evidence that RdgB β is involved in the metastatic process of cancer cells (Png et al., 2012) and the mechanisms behind this have been unveiled (Halberg et al., 2016). RdgB β localizes on the Golgi surface in a PI(4)P-dependent manner to recruit the small G protein Rab1, which in turn recruits MYO18A. This enhances the secretory activity of the TGN and the release of pro-invasive and pro-angiogenic factors out of the cancer cell, thereby driving metastasis (Halberg et al., 2016).

A PI(4)P CONCENTRATION GRADIENT TO FUEL STEROL TRANSPORT

The concept of lipid exchange has been greatly expanded through the characterization of oxysterol-binding protein (OSBP) and its homologs in eukaryotes. OSBP was initially identified as a cytosolic protein that bound hydroxysterols (Kandutsch and Thompson, 1980). Moreover, some clues suggested that the downregulation of sterol synthesis by hydroxysterols, most particularly 25-hydroxycholesterol (25-HC), was dependant on OSBP. At the end of the '80s, the cDNAs of the rabbit and human OSBP were cloned (Dawson et al., 1989; Levanon et al., 1990), allowing further molecular and cellular analyses. In 1992, Ridgway and co-workers found that the C-terminal half of OSBP contains a oxysterol-binding domain (Ridgway et al., 1992) and that OSBP relocates to the Golgi apparatus in the presence of 25-HC. This translocation depends on an N-terminal pleckstrin-homology (PH) domain of ~90 aa (Haslam et al., 1993; Gibson et al., 1994; Lagace et al., 1997) that recognizes both PI(4)P and the small G protein Arf1 (Levine and Munro, 2002; Godi et al., 2004). OSBP was also found to locate to the ER by interacting with VAP (Wyles et al., 2002), thanks to an FFAT motif (Loewen et al., 2003).

The advent of genomics in the '90s led to the discovery of many OSBP homologs in eukaryotes. Based on sequence similarity to the ligand-binding domain of OSBP (OSBP-Related Domain or ORD) (Jiang et al., 1994; Beh et al., 2001), seven genes were identified in *S. cerevisiae* that encoded proteins specifically named Osh (Oxysterol-binding protein homologs). They were classified into four subfamilies: Osh1/2p, Osh3p, Osh4/5p (a.k.a., Kes1p and Hes1p), and Osh6/7p, on the basis of their overall sequence homology. The first three are complex with a PH domain and an ORD. Osh1p and Osh2p also contain an ankyrin repeats (AR) domain. The other Osh proteins only correspond to an ORD.

Furthermore, 11 human OSBP-related proteins (ORPs) were found, and together with OSBP, they define the ORP family (Lehto et al., 2001). They were classified into six subfamilies on the basis of sequence similarity and gene structure. Most of them resemble OSBP with a PH domain near the N-terminal end, an FFAT motif and a C-terminal ORD. Nevertheless, ORP2, as well as short variants of ORP1, ORP4 and ORP9, are devoid of the PH domain and, in some cases, the FFAT motif too. Members of subfamily IV (ORP5 and ORP8) and subfamily VI (ORP10

and ORP11) have no FFAT motif. ORP5 and ORP8 contain a transmembrane segment. ORP1L has an N-terminal AR domain. Importantly, a conserved EQVSHHPP sequence was identified in the ORD, which became the signature of ORP/Osh family.

The idea that OSBP controls sterol metabolism was progressively ruled out. Instead, it was proposed that OSBP regulates cellular sterol distribution. Sterol is scarce in the ER (<5 mol% of lipids) but represents up to 40 mol% of lipids in the *trans*-Golgi and the PM (Mesmin and Maxfield, 2009). The maintenance of this sterol concentration gradient in eukaryotic cells was suggested to mostly rely on non-vesicular routes (DeGrella and Simoni, 1982; Urbani and Simoni, 1990; Baumann et al., 2005). This prompted a search for specialized LTPs that were able to move sterol between organelles. OSBP was a plausible candidate (Raychaudhuri and Prinz, 2010) along with Osh proteins whose absence was found to alter ergosterol metabolism and distribution in yeast (Beh et al., 2001; Beh and Rine, 2004). The fact that OSBP has a dual ability to bind the ER and *trans*-Golgi membrane reinforced this hypothesis. Indeed, OSBP can populate ER-Golgi contact sites (Ladinsky et al., 1999; Marsh et al., 2004) which are thought, like other contact sites, to be hot spots for lipid transfer (Olkkonen and Levine, 2004).

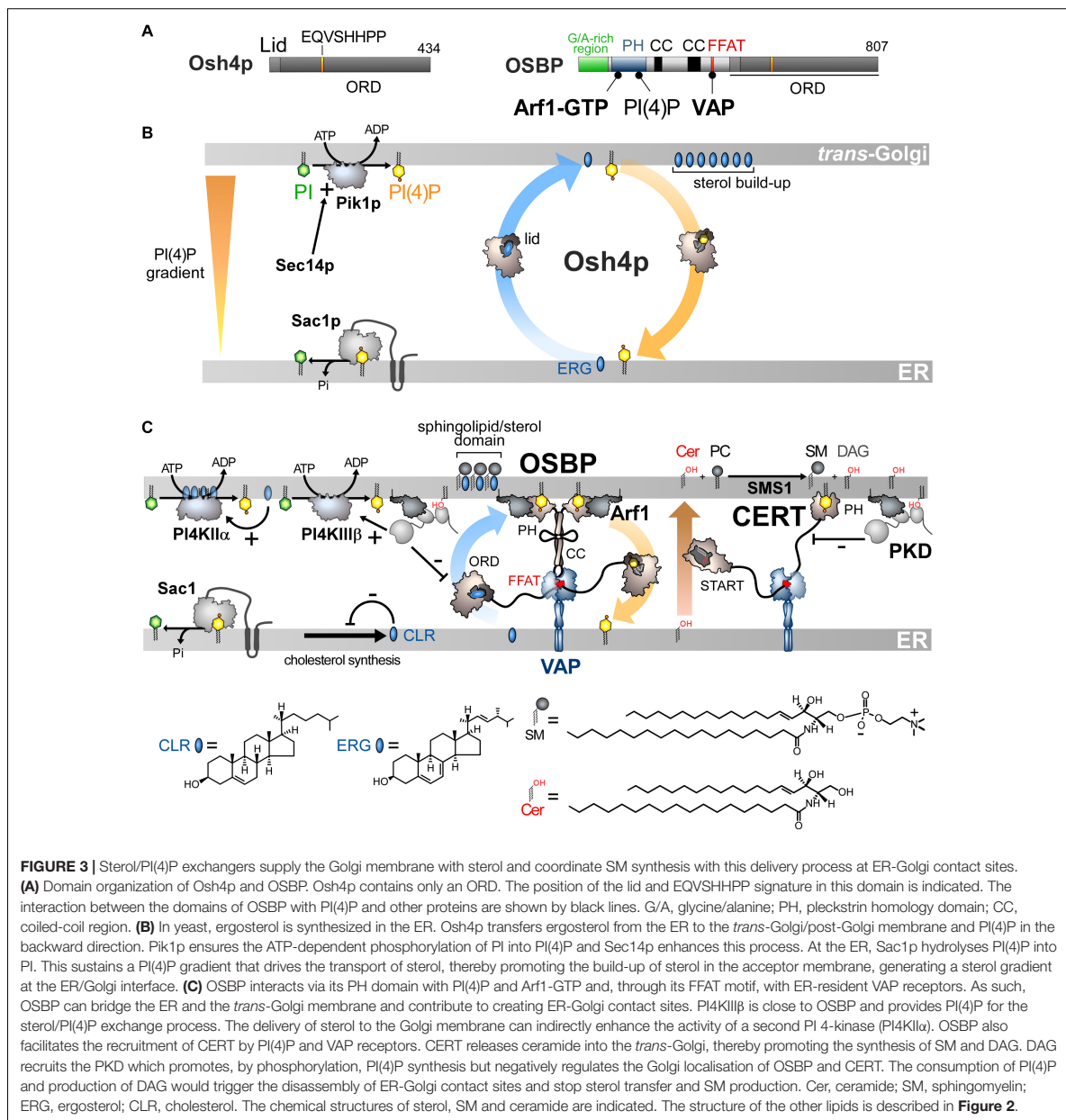
Osh4p is one of the simplest ORPs/Osh proteins, as it only consists of an ORD (**Figure 3A**). Im and co-workers solved its crystal structure and revealed that it corresponds to an incomplete β -barrel with a deep pocket to host one sterol molecule (Im et al., 2005). This pocket is closed by an N-terminal lid of ~ 30 amino-acids. The sterol is in a head-down orientation with its 3-hydroxyl group interacting with polar residues at the bottom of the pocket. The rest of the sterol is in contact with the pocket wall and inner side of the lid, stabilizing the closed conformation of Osh4p. The EQVSHHPP signature is recognizable in the structure: the two histidine residues followed by two proline residues are positioned in a β -hairpin that overhangs the entrance of the sterol-binding pocket. Data suggested that the lid opens when Osh4p delivers sterol to the membrane and closes when Osh4p extracts sterol. Osh4p and OSBP were found to transfer sterol between artificial membranes (Raychaudhuri et al., 2006; Ngo and Ridgway, 2009), supporting the notion that ORP/Osh proteins are sterol transporters (Levine, 2005). However, this idea was subsequently challenged. *In vitro*, Osh4p is a slow sterol transporter (Raychaudhuri et al., 2006) and several Osh proteins display no sterol-transfer activity (Schulz et al., 2009). It is also not certain that Osh proteins transfer sterol in yeast, notably at the ER/PM interface (Schulz et al., 2009; Georgiev et al., 2011). Finally, there are puzzling links between Osh proteins and PI(4)P. Indeed, silencing Osh4p bypasses the requirement for Sec14p meaning that yeasts devoid of Sec14p survive if Osh4p is lacking (Fang et al., 1996). In fact, Osh4p counteracts Sec14p by downregulating the Golgi PI(4)P pool (Fairn et al., 2007). Moreover, Osh4p regulates exocytosis (Fairn et al., 2007; Alfaro et al., 2011), which relies on the PI(4)P-dependent genesis of post-Golgi trafficking vesicles. In addition, Osh3p was found to downregulate PI(4)P at ER/PM interface (Stefan et al., 2011). This suggested that the Osh proteins, in addition to, or instead of transferring sterol, had functions related to PIPs. Our team eventually found that Osh4p sequesters

PI(4)P and sterol in a mutually exclusive manner. We solved the structure of the 1:1 Osh4p-PI(4)P complex and determined that the sterol-binding pocket hosts the PI(4)P acyl chains, whereas the cationic residues that define an adjacent and shallow pocket under the lid, recognize the PI(4)P headgroup. These residues belong to the helix $\alpha 7$ and the EQVSHHPP signature. The lid covers the glycerol moiety of PI(4)P.

These findings qualified Osh4p as a sterol/PI(4)P exchanger (de Saint-Jean et al., 2011) and led us to propose a model based on the observation that PI(4)P gradients exist in the cell (**Figure 3B**). PI(4)P is prominent in the Golgi and the PM (Di Paolo and De Camilli, 2006; Strahl and Thorner, 2007) but absent from the ER due to Sac1 (Foti et al., 2001; Faulhammer et al., 2007). Consequently, a steep PI(4)P concentration gradient exists both at the ER/Golgi and ER/PM interface. Because genetic interactions exist between OSH4, SEC14, SAC1 and PIK1 genes and given that Osh4p locates to the *trans*-Golgi/post-Golgi level (Li et al., 2002; Fairn et al., 2007), we proposed that Osh4p exploits a PI(4)P gradient at the ER/Golgi interface to vectorially export sterol from the ER to the Golgi, by sterol/PI(4)P exchange cycles. Within a cycle, Osh4p extracts a sterol molecule from the ER membrane, exchanges sterol for PI(4)P at the PM, and then delivers PI(4)P to the ER membrane where PI(4)P is converted into PI. When sterol is released by Osh4p in the *trans*-Golgi membrane, it is not re-extracted by the protein because PI(4)P competes with it. Conversely, once PI(4)P is delivered in the ER membrane, it encounters Sac1p and is hydrolyzed, meaning that Osh4p has no other option but to capture sterol. Thus, the presence of a PI(4)P gradient maintained by a distant PI 4-kinase and PI(4)P phosphatase can efficiently drive non-stop exchange cycles and the accumulation of sterol in the *trans*-Golgi membrane.

This model explains why Osh4p downregulates the cellular PI(4)P level (Fairn et al., 2007) and how Sac1p, although it resides at the ER, can get access to its substrate. *In vitro* measurements supported this model, showing that Osh4p is 10-times more efficient as an exchanger than as a mere transporter (Moser Von Filseck et al., 2015b). Any mutation that compromises the recognition and transfer of one ligand by Osh4p impacts the transfer of the other ligand. Thus, the Osh4p structure encodes a tight coupling between forward sterol and backward PI(4)P transfer between membranes. Moreover, Osh4p can create and maintain a sterol gradient between two membranes by dissipating a pre-existing PI(4)P gradient. These data and the fact that the residues that recognize PI(4)P are strictly conserved in ORPs/Osh proteins suggested that all of these were lipid exchangers driven by PI(4)P (Moser von Filseck and Drin, 2016).

It is still unclear how the cellular function of Osh4p relates to its exchange activity. Osh4p is involved in polarized exocytosis by regulating the genesis and fate of vesicles trafficking from the Golgi to the PM. Likely, Osh4p provisions the TGN with sterol that coalesces with sphingolipids to promote the budding of exocytotic vesicles. By consuming PI(4)P to deliver sterol, Osh4p might also control Drs2p, a PI(4)P-dependent PS flippase, and other PI(4)P-dependent proteins critical for vesicle genesis. Osh4p removes PI(4)P from exocytic vesicles, making them competent to dock with the PM (Ling et al.,



2014; Smindak et al., 2017) and possibly augments their sterol content, by sterol/PI(4)P exchange, to help the fusion process (Smindak et al., 2017). The sterol likely originates from the ER, rather than the PM as proposed recently (Smindak et al., 2017), since Osh4p extracts sterol more efficiently from fluid, ER-like than rigid, PM-like membranes (Moser Von Filseck et al., 2015b). Given its abundance (32.10^3 copies per cell) (Ghaemmaghami et al., 2003) and its sterol transfer rate driven by PI(4)P (>10 sterols.min $^{-1}$ per protein), Osh4p could supply

the TGN and post-Golgi vesicles with 32.10^4 sterol molecules per minute. During asymmetric division, a process that lasts 2 h, Osh4p could deliver up to 60% of 60.10^6 sterol molecules that are required, along with other lipids, for doubling the PM surface of the mother cell (Sullivan et al., 2006). This model might explain why changes in Osh4p levels or of its affinity for ligands alter the levels or transversal repartition of sterol in the Golgi membrane and the PM (Proszynski et al., 2005; Georgiev et al., 2011), or repress exocytosis (Alfaro et al., 2011).

It is unclear whether Osh4p exclusively uses the Golgi PI(4)P pool. At steady state, yeast PI(4)P levels are low (80,000 PI(4)P molecules per cell with 50% at the Golgi level) (Fairn et al., 2007). This does not indicate how much PI(4)P is hydrolyzed and regenerated over time. As previewed by Stefan and co-workers (Stefan et al., 2011) and measured in human cells (Mesmin et al., 2017), a fast PI(4)P turnover probably exists in yeast to drive sterol transfer.

STEROL/PI(4)P EXCHANGE AT ER/GOLGI CONTACTS SYNCHRONIZES LIPID FLOWS

Finding that Osh4p acts as lipid exchanger allowed us to determine that OSBP works in the cell as a LTP but also as a protein that orchestrates several lipid flows at ER-Golgi contact sites (Mesmin et al., 2013). OSBP dimerizes via coiled-coil regions and bridges the ER with *trans*-Golgi, via its FFAT motif and PH domain (Figures 3A,C). The OSBP ORD transfers then sterol from the ER to the Golgi. This is coupled with a backward transfer of PI(4)P to the ER membrane where PI(4)P is hydrolysed (Figure 3C). OSBP massively contributes to the ER-to-TGN transfer of sterol by consuming ~50% of the whole cellular PI(4)P pool (Mesmin et al., 2017). Thus, like Osh4p, the exchange process converts the energy of a PI(4)P gradient into a forward transfer of sterol to the Golgi apparatus (Figure 3C).

Importantly, sterol/PI(4)P exchange plays a second, critical role as it controls the residence time of OSBP and other LTPs in contact sites. Indeed, PI(4)P serves as an anchor point on the Golgi membrane, along with Arf1-GTP, for the PH domain of OSBP. Once OSBP is docked on this organelle, sterol/PI(4)P exchange starts, and PI(4)P is consumed. Consequently, PI(4)P levels decrease, forcing OSBP to disengage from contact sites. One can wonder what justifies such a mechanism since the exhaustion of PI(4)P would arrest the transfer activity of the ORD even if OSBP remains attached to the Golgi surface. In fact, this negative feedback loop synchronizes sterol and sphingolipid abundance in the Golgi membrane, which is crucial for the biogenesis of non-coated vesicles (Duran et al., 2012). Early investigations showed that, intriguingly, OSBP, in addition to VAP, influences the association of the CERT protein with the Golgi complex (Perry and Ridgway, 2006). CERT carries ceramide from the ER to the *trans*-Golgi (Hanada et al., 2003), where ceramide is transformed into sphingomyelin (SM). It is noteworthy that CERT has the same molecular configuration as OSBP. It contains a START domain instead of an ORD to transfer ceramide but, like OSBP, it bridges the ER and the Golgi membrane via a FFAT-VAP interaction and a PI(4)P-specific PH domain, respectively (Hanada et al., 2003; Kawano et al., 2006). Thus PI(4)P can recruit both OSBP and CERT at ER-Golgi contact sites to simultaneously switch on sterol and ceramide transfer. Inversely, a complete consumption of PI(4)P stops these two processes (Figure 3C; Mesmin et al., 2013, 2017; Capasso et al., 2017). Interestingly, the Golgi PI 4-kinase PI4KIII β colocalizes with OSBP, meaning that the PI(4)P source is near the sterol/PI(4)P exchange machinery (Mesmin

et al., 2017). This spatial proximity likely arises from the fact that PI4KIII β is recruited onto the membrane by Arf1 (Godi et al., 1999). Secondly, PI4KIII β docks onto membrane domain whose features (e.g., low lipid-packing) are suited for the recruitment of OSBP by PI(4)P and Arf1. A secondary, more distant PI(4)P source is positively tuned by sterol delivery (Mesmin et al., 2017). Indeed, the presence of sterol activates a palmitoyltransferase that grafts lipid tails to PI4KII α and thereby ensures its docking to the Golgi (Lu et al., 2012). This second source of PI(4)P elicits the recruitment of CERT to the ER-Golgi contact sites (Banerji et al., 2010) and OSBP in sterol-rich areas (Mesmin et al., 2017). The synthesis of SM, known to promote the thermodynamic trapping of sterol, might assist the PI(4)P-driven delivery of sterol in the Golgi membrane, as measured *in vitro* with Osh4p (Moser Von Filseck et al., 2015b). Possibly, Nir2 promotes the activity of OSBP and CERT by assisting the synthesis of Golgi PI(4)P (Peretti et al., 2008).

Additional layers of regulation exist and have been recently reviewed (Mesmin et al., 2019). In brief, the conversion of ceramide into SM gives DAG as a by-product. DAG acts as a signaling lipid that cooperates with Arf1-GTP to recruit Protein Kinase D (PKD) (Pusapati et al., 2009), which can then get access to CERT and, through phosphorylation, limits its association with PI(4)P (Prashek et al., 2017; Sugiki et al., 2018). PKD also enhances PI4KIII β activity (Hausser et al., 2005) but more permanently that of OSBP. Overall, this results in a net depletion of Golgi PI(4)P. Consequently, OSBP and CERT disengage from contact sites and cease to function (Capasso et al., 2017). All these mechanisms, connected to the sterol/PI(4)P cycle acting as a central timing belt, synchronize sterol and ceramide fluxes, ensuring co-enrichment of both lipids at the Golgi, while regulating DAG and PI(4)P levels. This cellular logistic hub precisely controls the lipid composition of the Golgi membrane, and thereby its secretory function (Duran et al., 2012).

OSBP PLAYS KEY ROLES IN OTHER SUBCELLULAR REGIONS AND IS INVOLVED IN PATHOLOGIES

Functional links exist between OSBP and the endosomal/lysosomal compartment. First, OSBP populates ER-endosomes contact sites to transfer endosomal PI(4)P for clearance by Sac1, thereby controlling WASH-dependent actin nucleation on endosomes and the function of the retromer, a protein coat responsible for endosome-to-Golgi traffic (Dong et al., 2016). Secondly, OSBP is engaged in ER-lysosome contacts to convey sterol to the limiting membrane of lysosomes. This enables mTORC1, a master regulator of cell growth, to be activated on lysosome surface. Thus, OSBP “informs” mTORC1 on cellular sterol availability to launch downstream programs (Lim et al., 2019). Whether these two functions rely on sterol/PI(4)P exchange cycles is unclear. OSBP also connects recycling endosomes to the TGN by interacting with the endosomal RELCH-Rab11 complex to transfer sterol from the first to the second organelle (Sobajima et al., 2018). We do

not know whether a PI(4)P level gradient exists at the endosome/TGN interface to fuel this process.

Human pathogens such as enteroviruses (e.g., rhinovirus or poliovirus) or hepatitis C virus (HCV) impose large changes on the morphology and lipid content of host cell membranes as they replicate. All these viruses trigger an overproduction of PI(4)P to remodel compartments into replication organelles that host supracomplexes, combining viral and host proteins, able to replicate the viral genetic material (Romero-Brey and Bartenschlager, 2014). PI4KIII β is hijacked by the 3A protein of enteroviruses for overproducing PI(4)P at the Golgi (Hsu et al., 2010) whereas HCV takes control of PI4KIII α to boost PI(4)P synthesis at the ER (Berger et al., 2009). This PI(4)P overproduction diverts the sterol/PI(4)P exchange activity of OSBP which delivers sterol in high quantities to the replication organelles (Roulin et al., 2014; Wang et al., 2014; Strating et al., 2015). Presumably, sterol, together with sphingolipids, creates an ideal membrane environment for the replication machinery. Of note, Nir2 also contributes to the replication of hepatitis C virus (HCV) by promoting the enrichment of viral replication organelle with PI(4)P (Wang and Tai, 2019). Likewise, PITP β is a host factor required for the replication of human viruses (Roulin et al., 2014; Ishikawa-Sasaki et al., 2018).

Some drugs, belonging to a class of molecules called ORPhilins, exert an antiviral activity by targeting OSBP. OSW1 binds with a nanomolar affinity to the ORD of OSBP and blocks its exchange activity (Mesmin et al., 2017), thereby inhibiting the replication of enteroviruses (Albulescu et al., 2015) or HCV (Wang et al., 2014). Itraconazole also stops viral replication by binding to the OSBP ORD (Strating et al., 2015). Interestingly, many ORPhilins were initially identified as compounds that inhibited the growth of human cancer cell lines by targeting OSBP (Burgett et al., 2011).

PS/PI(4)P EXCHANGERS REPRESENT A NEW CLASS OF HETEROTYPIC LIPID EXCHANGERS IN ORP/OSH FAMILY

Phosphatidylserine accounts for 2–10% of total membrane lipids (Daum et al., 1999; Leidl et al., 2008; Ejsing et al., 2009; Sampaio et al., 2011). It is distributed along a gradient between the ER and the PM, more specifically its cytosolic leaflet, where it represents 5–7% and up to 30% of glycerophospholipids, respectively (Vance and Steenbergen, 2005; Leventis and Grinstein, 2010). Both this build-up and the asymmetric distribution of PS in the PM are critical for signaling pathways. Indeed, given its negative charge, PS facilitates the recruitment and activity of signaling proteins including Akt, PKC and phospholipases (Leventis and Grinstein, 2010; Huang et al., 2011). PS must be actively transported to the PM since, like sterol, it originates from the ER (Vance and Tasseva, 2013). Little was known about how this is achieved (Leventis and Grinstein, 2010) until the finding that, in yeast, Osh6p and its close homolog Osh7p (Figure 4A), selectively sequester and convey PS from the ER to the PM (Maeda et al., 2013). Structural analyses explained why Osh6p is attuned to specifically trap PS. Subsequently, we established

that PI(4)P is the second ligand of Osh6/7p and that Osh6p efficiently exchanges PS for PI(4)P between membranes. In yeast, Osh6p does not transfer PS if its ability to recognize PI(4)P is disabled. Likewise, silencing Sac1p blocks Osh6p activity as the PI(4)P gradient at the ER/PM interface no longer exists. We concluded that Osh6/7p execute PS/PI(4)P exchange to directionally transfer newly synthesized PS to the PM (Figure 4B; Moser Von Filseck et al., 2015a).

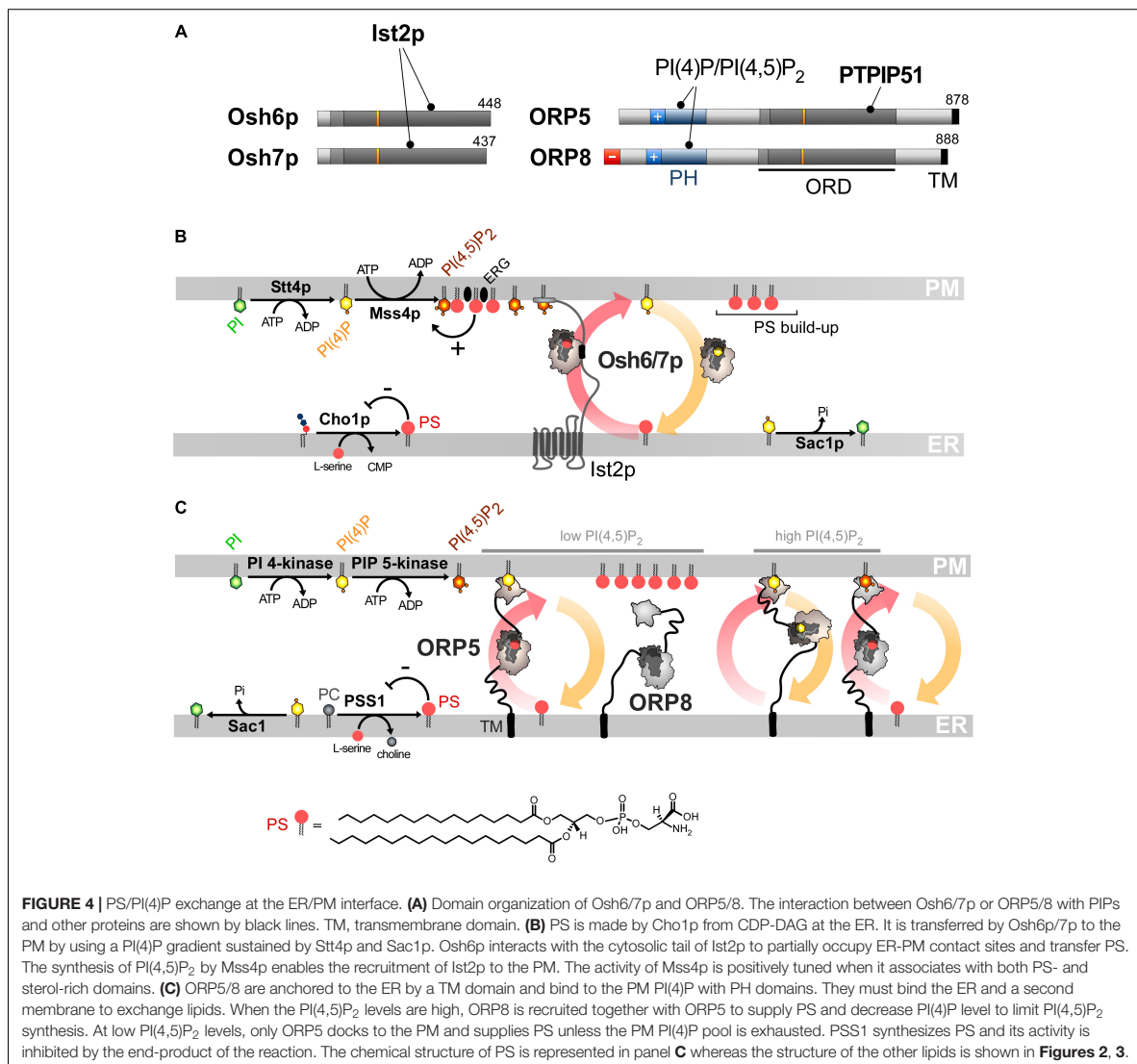
Osh6/7p are cytosolic but also locate to ER-PM contact sites (Schulz et al., 2009; Maeda et al., 2013). Recently, we showed that this is due to their interaction with the ER-residing Ist2p protein (D'Ambrosio et al., 2020). Ist2p is a homolog of Ca²⁺-activated lipid scramblases (Wolf et al., 2012, 2014; Brunner et al., 2014) and contributes to scaffolding yeast ER-PM contacts (Manford et al., 2012; Collado et al., 2019; Hoffmann et al., 2019). Its tethering capacity relies on a long and disordered cytosolic tail whose highly cationic C-terminal end binds to the PI(4,5)P₂ present in the PM. Osh6p recognizes a short motif within this linker and this is critical for its exchange activity (Figure 4B), in terms of speed and maybe accuracy. It is unclear whether Ist2p has a scramblase activity (Lee et al., 2018) and whether this is critical for the activity of Osh6/7p.

ORP5 and ORP8 contain an ORD, a PH domain to interact with the PM and are anchored to the ER via a C-terminal transmembrane segment and not by interacting with VAP (Yan et al., 2008; Du et al., 2011; Figures 4A,C). The ORD of ORP5 and ORP8 is the most closely related to that of Osh6p and Osh7p and the ORP5 ORD was found to capture PS (Maeda et al., 2013). A following study showed that ORP5 and ORP8 colonize ER-PM contact sites to deliver PS in the PM by PS/PI(4)P exchange, driven by the synthesis of PI(4)P at the PM and its hydrolysis at the ER (Chung et al., 2015). Thus, PS/PI(4)P exchange is an evolutionarily conserved mechanism.

INTERPLAY BETWEEN PS/PI(4)P EXCHANGE AND PIP METABOLISM AT THE ER/PM INTERFACE

Interestingly, ORP5/8 downregulate PM PI(4,5)P₂ levels and, challenging previous structural analyses of ORD (de Saint-Jean et al., 2011; Manik et al., 2017), it has been reported that ORP5/8 could use PI(4,5)P₂ as a counterligand, instead of PI(4)P, to provide the PM with PS (Ghai et al., 2017). Yet, another report suggested that PI(4)P is the real ligand (Sohn et al., 2018) and that the PI(4,5)P₂ level solely decreases as PI(4)P is the substrate of the PI(4)P 5-kinase (PIP5K) enzyme. In other words, PI(4)P transfer counteracts PI(4,5)P₂ synthesis.

As observed for OSBP (Mesmin et al., 2013) an interdependence exists between the mobilization of ORP5 and ORP8 in contact sites and their exchange activity, yet in a more sophisticated manner. The PH domain of ORP5/8 recognizes PI(4)P and PI(4,5)P₂ (Ghai et al., 2017; Lee and Fairn, 2018; Sohn et al., 2018). A short cationic region, appended to the PH domain, helps ORP5 and ORP8 to associate with the PM (Lee and Fairn, 2018; Sohn et al., 2018). However, these proteins are not alike: ORP8 weakly associates with the PM,



in a more PI(4,5)P₂-dependent fashion, compared to ORP5. This is determined by the features of the PH domain and the presence of an anionic N-terminal end that limits its association with the anionic surface of the PM. These differences between the sensory aptitudes of the PH domain of ORP5 and ORP8 form the basis of a rheostat mechanism that exquisitely regulates PI(4)P, PI(4,5)P₂ and PS levels at the PM. A decrease in PI(4)P or PI(4,5)P₂ levels would mainly reduce ORP5 transfer activity to restore, in turn, optimal PIP levels. In contrast, a rise in PI(4,5)P₂ levels would mobilize ORP8 at the PM, in addition to ORP5, to transfer more PI(4)P to the ER, thereby preventing extra PI(4,5)P₂ production (Figure 4C).

Remarkably, the presence of PI(4)P alone in the PM is insufficient for the yeast PI(4)P 5-kinase Mss4p to make

PI(4,5)P₂. Osh6/7p, through PS transfer and the help of other Osh proteins (likely Osh4p), are required to create domains in the PM, made of unsaturated PS and ergosterol, to which Mss4p efficiently binds to exert its activity (Nishimura et al., 2019). Thus, PI(4)P-driven exchange cycles regulate PI(4,5)P₂ production negatively and positively, by reducing the PI(4)P availability and by delivering PS and sterol, respectively. Together, these processes precisely tune the lipid composition and PIPs-based signaling competence of the PM.

Collectively, these data revealed that ORP/Osh proteins ensure the accumulation of PS in the PM, while firmly controlling PI(4,5)P₂ levels in that membrane. Furthermore, PS/PI(4)P exchange tightly connect ER and PM lipid metabolism. Pharmacological inhibition of PI4KIII α , which provides PI(4)P

to ORP5/8 at the PM, lowers PS synthesis at the ER (Sohn et al., 2016). The reason is that PSS1 and PSS2 enzymes, which make PS by swapping the head of PC and PE, respectively, for serine (Vance and Tasseva, 2013) are inhibited by the end-product of the reaction (Kuge et al., 1998). Thus, with no PI(4)P gradient to drive PS export out of the ER, PS inhibits its own production. Remarkably, in yeast, silencing the equivalent kinase, *Stt4p* reduces the cellular PS level by limiting the activity of *Pss1p* (*a.k.a.* *Cho1p*) that generates PS from CDP-DAG and serine at the ER (Tani and Kuge, 2014). Moreover, silencing *Sac1p* or limiting *Osh6/7p* activity has the same effect (D'Ambrosio et al., 2020). Thus, if PS/PI(4)P exchange are stopped, PS synthesis is repressed due to elevated PS levels at the ER. Of note, missense mutations of PSS1, which render the enzyme insensitive to feedback inhibition by PS and lead to PS overproduction, cause Lenz-Majewski syndrome which is characterized by a generalized craniofacial hyperostosis and intellectual disability (Sousa et al., 2014). Exactly how the development of this syndrome relies on the alteration of PS metabolism is unclear. In cells in which PS is overproduced, ORP8 is absent from ER-PM contacts and weak PI4P clearance from the PM is detected (Sohn et al., 2016). These anomalies, of which the mechanistic bases are unclear, suggest that defects in PIP metabolism might also be involved in the Lenz-Majewski syndrome.

ROLES OF PS/PI(4)P EXCHANGE IN OTHER CELLULAR REGIONS AND IN DISEASES

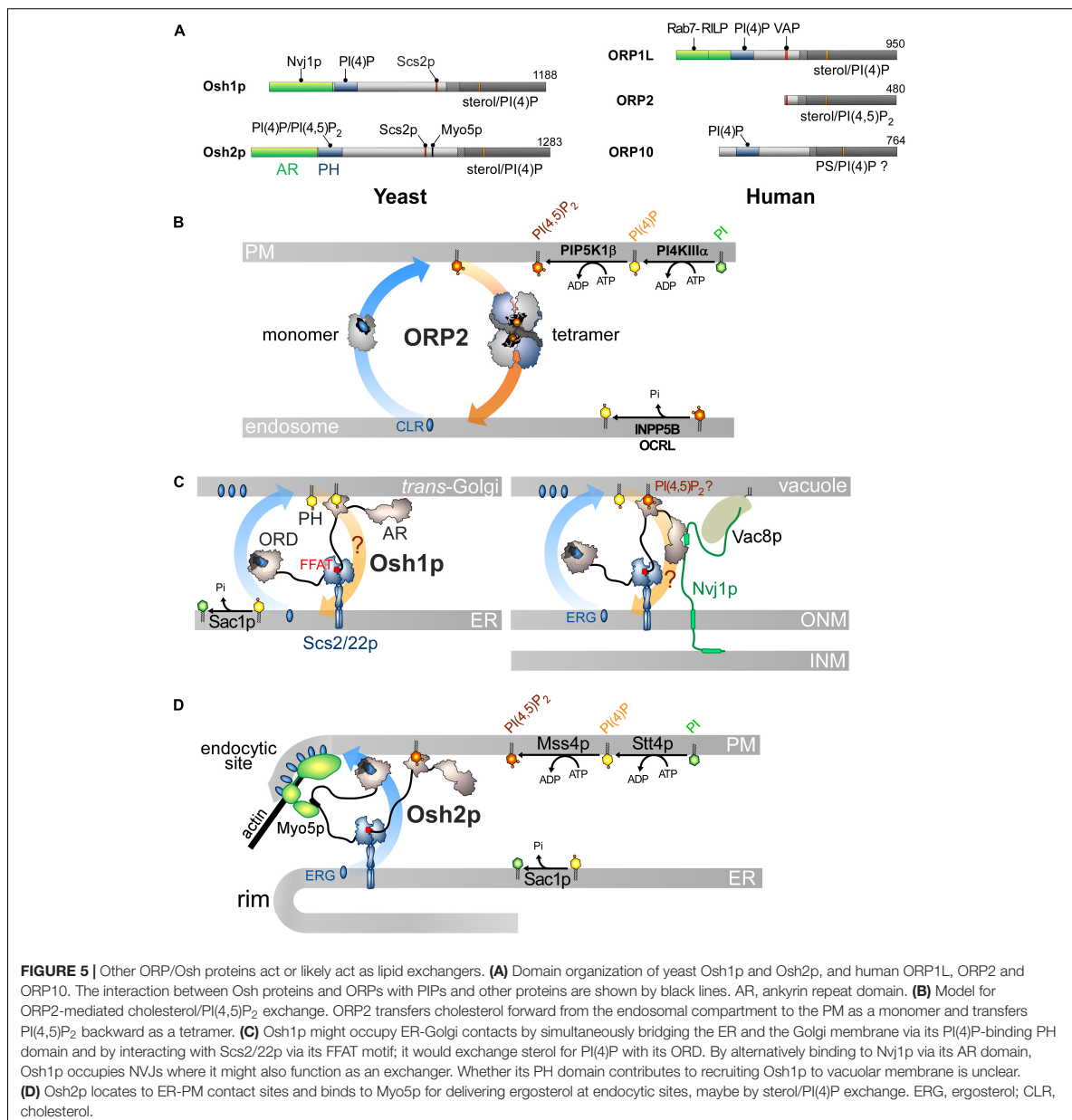
Phosphatidylserine is also exported from the ER to the mitochondrion and reaches the inner membrane of this organelle for decarboxylation into PE (Vance and Tasseva, 2013). PS transfer occurs in zones of close apposition between the ER and the outer mitochondrial membrane. In yeast, this transfer would be mediated by the ERMES complex. *Ups2-Mdm35p* (*SLMO2-TRIAP1* in humans) then transfers PS to the inner membrane (Tamura et al., 2019). Interestingly, ORP5/8 reside at ER-mitochondria contact sites and help to preserve the morphology and respiratory function of mitochondria, possibly by PS import (Galmes et al., 2016). ORP5 interacts with PTPIP51 (protein tyrosine phosphatase interacting protein-51). This outer mitochondrial membrane protein associates with VAP-B and helps to anchor mitochondria to the ER to support IP3 receptor-mediated delivery of Ca^{2+} from ER stores to mitochondria and its metabolism (Stoica et al., 2014; Gomez-Suaga et al., 2019). It is unclear whether ORP5 operates PS/PI(4)P exchange since it is not known whether the mitochondrial outer membrane contains PI(4)P. However, this membrane is surprisingly rich in PI, suggesting that PIPs can be synthesized there (Pemberton et al., 2020; Zewe et al., 2020). ORP5 also localizes to ER-LD contact sites. ORP5 associates with the LD monolayer via its ORD and transfer PS in exchange for PI(4)P made by PI4KII α . ORP5 seems mandatory for the growth of LDs but it is unclear why since the role of PS itself is elusive. Possibly, given its low levels in the monolayer, PS has no structural role but rather a signaling/regulatory function (Du et al., 2020).

Given that ORP5/8 moves lipids around in diverse subcellular regions, one can anticipate that any alteration of their activity results in cell dysfunctions. Supporting this idea, reports have shown that ORP5 expression is linked to increased cancer cell invasion and metastasis. For instance, the invasiveness of pancreatic cancer cells is enhanced by ORP5 overexpression and reduced by ORP5 depletion (Koga et al., 2008). Moreover, analysis of clinical samples suggested that poor prognosis in human pancreatic cancer relates to high expression levels of ORP5 (Koga et al., 2008). ORP5 is also highly expressed in lung tumor tissues, notably those of metastasis-positive cases (Nagano et al., 2015). Furthermore, ORP5 promotes the proliferation and migration of HeLa cells, and this depends on its ability to transfer lipids. Of note, ORP5 positively regulates the mTORC1 complex, which plays a key role in activating cell proliferation and survival (Du et al., 2018). A possible reason is that the activation of Akt, a major upstream effector of mTORC1, strongly depends on its recruitment to the PM by PS (Huang et al., 2011). This supports the idea that any deregulation of ORP5 can distort the signaling capacity of the cell by changing the lipid content of the PM. Corroborating this, a lack of ORP5/8 activity was found to result in lower PS abundance in the PM, reducing the oncogenicity of K-Ras, a signaling protein that is frequently mutated in human cancers (Kattan et al., 2019).

ORP2 EXECUTES A NEW TYPE OF EXCHANGE

ORP2 is expressed ubiquitously in mammalian tissues and consists of an ORD preceded by an FFAT motif (Figure 5A; Laitinen et al., 2002; Loewen et al., 2003). It is able to host cholesterol, oxysterols (notably 22-HC), PI(4)P or PI(4,5)P₂ (Wang et al., 2019). ORP2 is cytosolic but prone to locate to the Golgi apparatus, the ER, LDs and the PM (Laitinen et al., 2002; Hynynen et al., 2009; Wang et al., 2019). ORP2 is likely to intervene in TAG metabolism at ER-LD contact sites (Weber-Boyyat et al., 2015b). This would rely on its interaction with VAP, but it is unclear how it targets the LD surface. Other studies showed that overexpressing ORP2 reduces sterol esterification at the ER and increases sterol efflux out the cell, suggesting that ORP2 exports sterol to the PM (Hynynen et al., 2005). It has recently been shown that ORP2 supplies the PM with sterol in exchange for PI(4,5)P₂ in liver cells (Wang et al., 2019). Moreover, a lack of ORP2 provokes an enrichment of LEs with sterol at the expense of the PM. This suggests that ORP2 picks up sterol from endosomes and exploits a PI(4,5)P₂ gradient at endosome/PM interface to deliver sterol in the PM. This gradient would be sustained by the synthesis of PM PI(4,5)P₂ and its degradation into monophosphorylated PI at the endosome surface by 5-phosphatases INPP5B and OCRL. In terms of the energy budget, one ATP is consumed to move one sterol molecule, as proposed for sterol/PI(4)P exchangers (Figure 5B).

However, the sterol/PI(4,5)P₂ cycle would be different: ORP2 would transport sterol as a monomer but transfer PI(4,5)P₂ as a tetramer, but the advantage of this state is unclear. Moreover, the fact that ORP2 transfers PI(4,5)P₂ is surprising. Indeed, previous



structural analyses suggested that an ORD is unable to properly accommodate PI(3)P, PI(5)P or PI(4,5)P₂ due to steric hindrance that would be caused by a phosphate group at position 3 or 5 of the inositol ring (de Saint-Jean et al., 2011; Manik et al., 2017). Yet it is possible to solve the crystal structure of ORP2 in 1:1 complex with PI(4,5)P₂. Its inositol ring nests into the pocket with a ~180° rotation compared with that of the PI(4)P headgroup in other ORD structures (de Saint-Jean et al., 2011; Tong et al., 2013; Moser Von Filseck et al., 2015a; Manik et al.,

2017). Two conformations of ORP2 were resolved and one of the two corresponds to the conformation adopted by the protein in its tetrameric state. Intriguingly, the lid is systematically open and one of the acyl chains of PI(4,5)P₂ is outside the pocket. Thus these structures differ significantly from the ORD structures in which the ligand — PI(4)P, sterol or PS — is perfectly inserted and shielded by the lid (Im et al., 2005; de Saint-Jean et al., 2011; Maeda et al., 2013; Moser Von Filseck et al., 2015a; Manik et al., 2017). *In vitro* assays did not clearly show that ORP2

reciprocally exchanges one sterol for one PI(4,5)P₂ molecule as established for the sterol/PI(4)P activity of Osh4p (Moser Von Filseck et al., 2015b; Wang et al., 2019). One can wonder whether these ORP2-PI(4,5)P₂ complexes are predominant in the cell and also assume that ORP2 functions as a sterol/PI(4)P exchanger. Indeed, ORP2 extracts PI(4)P from membranes *in vitro* and downregulates both PM PI(4)P and PI(4,5)P₂ levels (Wang et al., 2019). As observed for ORP5/8 (Sohn et al., 2018), the regulation of PM PI(4,5)P₂ levels by ORP2 might be primarily caused by its ability to execute sterol/PI(4)P exchange and thereby control PI(4)P levels. Moreover, a difference in PI(4)P concentration at the endosome/PM interface might be sufficient to drive sterol transfer. ORP2 fails to exchange sterol for PI(4)P *in vitro* but these results must be analyzed carefully. The precise nature of sterol (Liu and Ridgway, 2014) or the acyl chains of a lipid ligand, for example PS (Moser Von Filseck et al., 2015a), can strongly influence the activity of ORP/Osh proteins. It is noteworthy that OSBP weakly exchanges sterol and PI(4)P *in vitro* except in a more sophisticated assay where PI(4)P is hydrolyzed by Sac1 (Mesmin et al., 2013). OSBP is possibly stalled in a PI(4)P-bound form except when PI(4)P is degraded to allow the protein to extract a new sterol molecule. Overall, it is necessary to reassess whether ORP2 functions as a sterol/PI(4)P exchanger. Likewise, it must be explored why the FFAT motif is functionally disconnected from its transfer capacity. More broadly, it must be defined whether the ability of ORP2 to transfer lipids relates to its role in ER-LD contacts and TAG metabolism, the PI 3-kinase/Akt signaling pathway (Kentala et al., 2018), ER-mitochondria crosstalk and adrenocortical steroidogenesis (Li et al., 2013; Escajadillo et al., 2016).

ARE OTHER ORP/OSH PROTEINS LIPID EXCHANGERS?

Sequence analyses suggest that all ORP/Osh proteins can trap PI(4)P. One might thus assume that they are all exchangers that harness PI(4)P metabolism to ferry lipids in the cell, yet this is uncertain. Indeed, Osh3p, ORP6, ORP7, and ORP11 capture or likely recognize PI(4)P but are not able to trap sterol or PS and it is unclear whether they recognize a second lipid to act as exchangers. However, some ORP/Osh proteins have a dual ability to recognize sterol and PI(4)P or PS and PI(4)P and observations suggest that they exchange these lipids in the cell. A recent report suggests that ORP3 acts as a PC/PI(4)P exchanger (D'Souza et al., 2020). Other proteins are associated with a more complex picture. We discuss this in more detail below.

Osh1p AND Osh2p LIKELY ACT AS STEROL/PI(4)P EXCHANGERS TO SUPPORT DISTINCT CELLULAR FUNCTIONS

Osh1p and Osh2p likely act as sterol/PI(4)P exchangers and translate this aptitude to diverse cellular outputs, owing to interactions with given partners in specific subcellular sites. Their

architecture resembles that of many ORP/Osh proteins with a PH domain, an FFAT motif and a C-terminal ORD (Figure 5A; Jiang et al., 1994) but they contain an N-terminal AR domain upstream of the PH domain.

Osh1p associates with the ER by interacting with Scs2p, the yeast VAP (Loewen et al., 2003), but it has a dual cellular localization. It localizes at the Golgi apparatus, presumably at ER-Golgi contacts, owing to its PI(4)P-binding PH domain. It also occupies nuclear-vacuolar junctions (NVJs), i.e., zone of close apposition of the outer nuclear membrane (ONM) with the vacuole (Levine and Munro, 2001). This depends on the association of its AR domain with the cytosolic part of Nvj1p (Kvam and Goldfarb, 2004, 2006; Shin et al., 2020), a protein that bridges the ONM to the vacuole through an interaction with the vacuolar protein Vac8p. The PH domain likely has no major role in recruiting Osh1p to NVJs (Levine and Munro, 2001; Shin et al., 2020; Figure 5C). Structural and biochemical analyses showed that the Osh1p ORD traps sterol and PI(4)P in a competitive manner and transfers sterol between membranes (Manik et al., 2017). Whether Osh1p can execute sterol/PI(4)P exchange between membranes like Osh4p awaits examination. Osh1p regulates post-Golgi vesicular trafficking to the PM, by supplying ergosterol to the TGN (Umebayashi and Nakano, 2003). Thus, Osh1p might use the Golgi PI(4)P source to deliver sterol. At the NVJs, Osh1p maybe conveys sterol from the ONM (in continuity with the ER) to the vacuole and regulate two sterol-dependant features of this organelle, its size and dynamics (Kato and Wickner, 2001; Hongay et al., 2002; Fratti et al., 2004; Li and Kane, 2009). It is unclear whether Osh1p moves sterol by exchange for PI(4)P because it is unknown whether the vacuolar membrane harbors PI(4)P. Interestingly, the activity of Osh1p is tuned by external signals that modify its repartition between the Golgi apparatus and NVJs (Kvam and Goldfarb, 2006; Shin et al., 2020). During the log phase, Osh1p is evenly distributed between these regions, but associates only with NVJs when the cell enters a stationary phase (Levine and Munro, 2001), due to higher expression of Nvj1p (Roberts et al., 2003). Tryptophan uptake is downregulated during nutrient depletion, probably because Osh1p is not located at the Golgi complex and cannot positively tune the export of the tryptophan permease Tat2p to the PM (Kvam and Goldfarb, 2006). Osh1p also dissociates from the Golgi membrane when the cytosolic pH becomes low in response to glucose deprivation. This relies on the fact that its PH domain has less affinity for the PI(4)P headgroup which undergoes protonation in that context (Shin et al., 2020). Thus, external factors change the yeast activities by regulating where sterol is delivered by Osh1p.

Osh2p localizes at ER-PM contacts owing to its PH domain and its FFAT motif (Loewen et al., 2003; Roy and Levine, 2004; Schulz et al., 2009; Schuiki et al., 2010; Maeda et al., 2013). Ultrastructural investigations revealed that Osh2p is at the rim of cortical ER and is physically linked to endocytic invaginations (Figure 5D; Encinar del Dedo et al., 2017). Osh2p associates with Myo5p, a type-I myosin that is required for actin assembly and scission of endocytic vesicles from the PM. Corroborating *in vitro* data (Schulz et al., 2009), Osh2p was found to create sterol-rich domains at endocytic sites to assist actin polymerization. Osh2p

also lowers cellular PI(4)P levels (Stefan et al., 2011), which might reflect its sterol/PI(4)P exchange activity. It is unknown whether Osh2p regulates PI(4)P and PI(4,5)P₂ pools to coordinate sterol delivery with the assembly/disassembly of the clathrin coat and actin polymerization.

A COMPLEX PICTURE FOR SEVERAL ORPs

In humans, ORP1 and ORP2 define the ORP subfamily I. ORP1 exists as a long version, (ORP1L), which contains an N-terminal AR domain followed by a PH domain, an FFAT motif and a C-terminal ORD, and a shorter one, ORP1S, only consisting of the ORD (Figure 5A; Lehto et al., 2001; Loewen et al., 2003). So far, it is unclear whether these proteins act as sterol/PI(4)P exchangers, as pure sterol transporters or sterol sensors. ORP1 ORD can trap either cholesterol or PI(4)P (Vihervaara et al., 2011; Zhao and Ridgway, 2017; Dong et al., 2019) and displays some affinity for oxysterols (Suchanek et al., 2007; Vihervaara et al., 2011). ORP1L is unique amid ORPs as it docks onto late endosomes (LEs) and lysosomes (Johansson et al., 2003), by interacting, via its AR domain, with Rab7, a protein that specifically localizes to these compartments (Johansson et al., 2005) and plays regulatory roles. Rab7 recruits, once in a GTP-bound state, the Rab7-interacting lysosomal protein (RILP) that in turn recruits p150^{Glued}, a component of dynactin/dynein motor complex. Together, these proteins control the movement of LEs/lysosomes along microtubules. When cholesterol abounds in the limiting membrane of LEs/lysosomes, ORP1L encapsulates sterol and adopts a conformation that breaks its FFAT-mediated interaction with VAP (Rocha et al., 2009; Vihervaara et al., 2011). As a result, LEs/lysosomes cluster in a perinuclear area by moving toward the minus-end of microtubules. When the cellular cholesterol level decreases, ORP1L undergoes a conformational change allowing its binding to VAP and the release of the dynactin/dynein complex. Therefore, LEs/lysosomes are scattered at the cell periphery and engaged in contacts with the ER (Rocha et al., 2009; Vihervaara et al., 2011). ORP1L might also act as an LTP according to diverse and even opposite modalities. ORP1L would transfer cholesterol from the ER to the limiting membrane of LEs, when sterol is scarce (Eden et al., 2016), maybe by using an endosomal PI(4)P pool (Hammond et al., 2014), to participate in endosome maturation. Conflicting studies suggest that ORP1L conveys LDL-derived cholesterol, expelled out from LEs/lysosomes by NPC1, to the ER along its concentration gradient (Zhao and Ridgway, 2017). This transfer cannot be ensured by sterol/PI(4)P exchange, which would drive forward sterol transfer to the endosome, but depends on PI(4)P. Recent investigations dismissed the idea that ORP1L transports PI(4)P, showing instead that its sterol transport activity is enhanced by an endosomal/lysosomal PI(3,4)P₂ pool (Dong et al., 2019). ORP1S has a cytoplasmic/nuclear distribution. It moves cholesterol from the PM to the ER and LDs (Jansen et al., 2011), but also from LEs/lysosomes to the PM, counteracting ORP1L action (Zhao et al., 2020). It is unclear how the capacity of ORP1S to shuttle sterol relates to the recognition of PI(4)P or other PIPs

(Zhao et al., 2020). Overall, it remains difficult to define how ORP1S and ORP1L precisely function.

ORP3 is the best characterized member of subfamily III. It contains a PI(4)P/PI(4,5)P₂-specific PH domain to associate with the PM (Gulyás et al., 2020), a canonical and non-canonical FFAT motif (Loewen et al., 2003; Weber-Boyvat et al., 2015a) and a C-terminal ORD that was recently shown to capture PI(4)P or PC, but neither PS nor sterol (D'Souza et al., 2020; Gulyás et al., 2020). ORP3 relocates to ER-PM contact sites upon phosphorylation by PKC following PMA treatment or agonist stimulation (Lehto et al., 2008; Weber-Boyvat et al., 2015a; Gulyás et al., 2020), a process that is synergized by an elevation of intracellular Ca²⁺ through store-operated calcium entry (SOCE) by the STIM/Orai1 complex. ORP3 might undergo a conformational change that exposes its PH domain and FFAT motif and ensures its translocation to contact sites. ORP3 activation by PKC and Ca²⁺ entry is linked to a mechanism implicated in focal adhesion dynamics. Once recruited to ER-PM contact sites, ORP3 interacts with IQSec1, a guanine nucleotide exchange factor of Arf5 to trigger focal adhesion disassembly (D'Souza et al., 2020). It is proposed that this process, associating STIM/Orai1, ORP3 and IQSec1/Arf5 occurs at the rear-front of cells to guarantee their migration (Machaca, 2020). It is unclear how this relates to reports showing that ORP3 recruits R-Ras, a small G protein that is also involved in cell adhesion and migration (Lehto et al., 2008; Weber-Boyvat et al., 2015a). Likewise, it is unknown whether the cellular function of ORP3 relies on its ability to downregulate PM PI(4)P levels and, maybe, to mediate PC/PI(4)P exchange (D'Souza et al., 2020; Gulyás et al., 2020).

ORP4 is the closest homolog of OSBP and is able to host sterol or PI(4)P via its ORD, to interact with VAP, and target PI(4)P via its PH domain (Wyles et al., 2007; Goto et al., 2012; Charman et al., 2014). However, ORP4 has distinct functions, and it is unclear whether it acts as a sterol/PI(4)P exchanger. ORP4L can partially localize to ER-Golgi contact sites, with its PH domain and through heterodimerization with OSBP to regulate Golgi PI(4)P homeostasis (Pietrangelo and Ridgway, 2018). However, ORP4 and shorter variants can interact with intermediate filaments called vimentin and remodel the vimentin network near the nucleus (Wang et al., 2002). Also, ORP4 is critical for the survival and proliferation of immortalized and transformed cells (Charman et al., 2014; Zhong et al., 2016a,b). In lymphoblastic leukemia T cells, ORP4L partly localizes on the PM where it serves as scaffolding protein for G-protein coupled receptors and PLC-β3. This triggers the production of IP3 and Ca²⁺ release from ER stores, which ensures the proliferation of macrophages and transformed T-cells (Zhong et al., 2016a,b, 2019). Possibly, ORP4L promotes PLC-β3 translocation from the nucleus to the PM (Pan et al., 2018) and extracts PI(4,5)P₂ from the PM to present this lipid to PLC-β3 and boost its activity (Zhong et al., 2019). Overall, it remains unclear why ORP4L has distinct localizations, why it can bind sterol, PI(4)P and PI(4,5)P₂ and why it interacts with vimentin.

ORP9 exists in a long form, ORP9L, whose domain organization and subcellular localization resemble those of OSBP. It binds to VAP proteins and associates with the *trans*-Golgi/TGN

via a PH domain (Wyles and Ridgway, 2004; Ngo and Ridgway, 2009). *In vitro*, ORP9L can sequester sterol or PI(4)P (Liu and Ridgway, 2014) and transfer sterol between synthetic membranes (Ngo and Ridgway, 2009; Liu and Ridgway, 2014). ORP9L appears to be important for maintaining ER-to-Golgi vesicular transport and Golgi organization, as well as sterol levels in the post-Golgi and endosomal compartment (Ngo and Ridgway, 2009). ORP9L impacts Golgi PI(4)P levels and cooperates with OSBP for building ER-Golgi contacts (Venditti et al., 2019). However, ORP9L seems functionally different from OSBP: its activity is decoupled from that of CERT and, presumably, ORP9L does not transfer sterol to the Golgi by sterol/PI(4)P exchange (Ngo and Ridgway, 2009). ORP9S is a shorter ORP9 variant that is absent from the Golgi surface as it lacks the PH domain. However, it can downregulate Golgi PI(4)P levels in a VAP-dependent manner (Liu and Ridgway, 2014), maybe by occupying preformed ER-Golgi contacts. ORP9S can disorganize Golgi structure and ER-to-Golgi trafficking (Ngo and Ridgway, 2009). Overall, it is unclear whether ORP9 variants are sterol/PI(4)P exchangers.

ORP10 is one of the two members of the ORP subfamily VI (Figure 5A). It was first described as a microtubule-associated protein that localizes to the Golgi complex and controls ER-Golgi trafficking to modulate the secretion of apolipoprotein B-100 from hepatocytes (Nissila et al., 2012). ORP10 associates with the Golgi complex via its PH domain (Nissila et al., 2012) and its ORD can trap PS (Maeda et al., 2013). Silencing ORP10 alters the PS content at the TGN, but also severely reduces ER-TGN contact sites (Venditti et al., 2019). ORP10 has no FFAT motif and heterodimerizes with ORP9 (Nissila et al., 2012) to colocalize with OSBP in ER-Golgi contacts, possibly for coordinating PS transfer, by PS/PI(4)P exchange, with ER-to-Golgi sterol transfer. These observations partially explain how PS accumulates at the TGN (Leventis and Grinstein, 2010).

DISCUSSION

Lipid exchangers belonging to three distinct families make critical connections between lipid metabolism, vesicular trafficking and signaling pathways, through the provision of lipids to organelles. Many of these ensure the directional transfer of lipids and are propelled by metabolic pathways that use CTP and ATP energy to create PI and/or PIPs. The biochemical features of lipid exchange modules might offer safeguard mechanisms to prevent any futile transfer of lipids between organelles. *In vitro* analyses of Osh4p revealed tight coupling between the rate of sterol and PI(4)P transfer that occur in opposite directions between membranes (Moser Von Filseck et al., 2015b). Simply stated, if sterol or PI(4)P is missing, the transfer of the other ligand is much slower. Likewise, mutations that abrogate the affinity of Osh4p for PI(4)P also shut down its sterol transfer capacity. Such a coupling might also exist for other ORP/Osh proteins. For instance, OSBP, Osh6p, or ORP2 fail to transfer sterol or PS in the cells when their ability to recognize PI(4)P is compromised (Mesmin et al., 2013; Moser Von Filseck et al., 2015a; Wang et al., 2019). Thus, one can assume that the ORP/Osh-mediated transfer of sterol and PS cannot occur between organelles if there is insufficient

PIP available. Moreover, in the absence of transfer from the ER, feedback mechanisms can be activated to limit the accumulation of sterol or PS in that compartment (Kuge et al., 1998; Brown et al., 2018). It is unclear whether tight coupling exists between PA and PI transfer catalyzed by Class II PITP. This is perhaps less critical as these two lipids are metabolically connected: a lack of PA or PI synthesis can ultimately limit the production of the other lipid.

Interestingly, several lipid exchangers, as they share an analogous architecture, are regulated at contact sites by similar mechanisms. In complex LTPs such as OSBP, ORP5/8 and Nir2, an interdependence exists between the lipid transfer module and the Golgi/PM-targeting domain that both have the same lipid specificity (e.g., PI(4)P in the case of OSBP and PA in the case of Nir2/Nir3) (Mesmin et al., 2013; Kim et al., 2015). This adjusts the mobilization of these LTPs at contact sites as function of the amount of available lipid to be transported. Also, the existence of homologous LTPs (e.g., ORP5/8 and Nir2/3), with slightly different aptitudes to target PIPs or PA at the PM and to transfer these lipids, support exchange processes that occur with specific velocities and for precise lipid concentration thresholds (Chang and Liou, 2015; Sohn et al., 2018). This introduces subtle ways to regulate PIP metabolism at the PM in response to external stimuli. It is unclear why certain exchangers rely on VAP to associate with the ER whereas others are directly anchored to this compartment (Amarilio et al., 2005; Chung et al., 2015).

It is also worth noting that, despite being structurally unrelated (Chiapparino et al., 2016), the lipid transfer modules of Sec14p, PITPs and ORPs/Osh proteins share features that seem important for their activity. All of these have a conserved fingerprint or bar code to recognize PI or PIPs but have evolved to recognize diverse secondary ligands and fulfill specific functions. Moreover, in these modules, a lid/gate controls the access to the lipid-binding pocket and modifies how these modules bind to membrane when it closes. Indeed, these domains adopt a membrane-docking conformation when they are empty and a soluble state once they encapsulate a lipid. We recently reported how Osh6/7p can interact with the PM during an PS/PI(4)P exchange cycle and then escape from this membrane, which is highly anionic, to return to the ER, whose surface is more neutral (Yeung et al., 2008; Leventis and Grinstein, 2010). The avidity of Osh6p for anionic membranes is strongly reduced, once it extracts PS or PI(4)P, due to the closing of its lid that contains an anionic D/E-rich motif (Lipp et al., 2019). This helps Osh6p to self-limit its dwell time on membranes and thereby, to efficiently transfer lipids at ER-PM interface. Of note, ORP1 ORD was found to associate less with the membrane upon sequestering its ligand (Dong et al., 2019). Likewise, PITP α and PITP β have less membrane-binding affinity when trapping PI (Panagabko et al., 2019). This might explain why they rapidly shuttle lipids between membranes *in vitro*, and possibly between organelles. Of note, chemical intervention and maybe endogenous phosphorylation can freeze PITP β in an empty and membrane-docking conformation by impairing the extraction of the lipid and the closing of the gate (Shadan et al., 2008). Consequently, PITP β remains tightly bound to the organelle surface. The PITD of Nir2 might have a dual role, i.e.,

to exchange lipids at ER-PM contacts in stimulated cells or to recruit Nir2 to the Golgi membrane in resting cells (Kim et al., 2013). A mechanism that is able to control the conformation of the P1TP domain is most probably at play. α -TTP has less affinity for membranes in the presence of α -tocopherol (Morley et al., 2008) and recent data suggest that Sec14p dissociates from membrane when it extracts a ligand (Sugiura et al., 2019). Considered together, these data suggest that the lipid exchangers have mechanisms to dissociate from the membrane upon lipid extraction that offer kinetic advantages. Whether this is valid for most ORP/Osh proteins or Class II P1TP awaits examination.

Our knowledge of the LTP modes of action directly relies on our ability to establish how they displace lipids *in vitro* or in cells. We succeeded to show that ORP/Osh proteins are lipid exchangers as we could measure their ability to simultaneously transfer lipids along opposite directions between membranes. Moreover, it was possible to analyze how these exchange processes rely on Sac1, the lipid content and curvature of membrane, and the acyl chain composition of ligands (Mesmin et al., 2013; Moser Von Filseck et al., 2015b). In cells, one can measure the exchange activity of ORP/Osh proteins and Class II P1TP (Mesmin et al., 2013, 2017; Chang and Liou, 2015; Chung et al., 2015; Kim et al., 2015; Moser Von Filseck et al., 2015a; Sohn et al., 2018; Wang et al., 2019). This is feasible due to the nature of lipids under scrutiny. Indeed, sterol transfer activity can be measured *in vitro* and in cells using a natural and fluorescent sterol or genetically encoded-fluorescent biosensors. Likewise, natural PIPs or PS can be tracked between artificial or cellular membranes by fluorescent probes based on lipid-binding domains. In contrast, it has always been difficult to analyze *in vitro* how PC/PI exchangers function due to the identity of the ligands. First, as PC is a major background lipid of cell membranes, it is delicate to infer how this lipid, as a ligand, contributes to the speed of the PC/PI exchange process. Secondly, the technology does not yet exist to follow the transfer of natural PC and PI in real-time. One must use radiolabeled lipids in assays lacking temporal resolution or fluorescently labeled PC or PI with potential biases due to the fluorescent moieties. However, efforts have recently been made to overcome these difficulties

using single-angle neutron scattering (Sugiura et al., 2019). It is also challenging to follow the cellular activity of PC/PI exchangers due to the lack of PC or PI biosensors. Fortunately, new tools have been designed to directly or indirectly measure the presence of PI in the membrane (Pemberton et al., 2020; Zewe et al., 2020). They revealed that PI is abundant in the Golgi membrane except if the production of PI is eliminated at the ER. This suggests that PI transfer occurs and creates a Golgi PI pool that is used thereafter to produce PI(4)P. In contrast, the PM contains hardly any PI, suggesting that PI is directly presented to PI 4-kinases. These tools might help to define whether Sec14p and P1TPs move PI in the cell and how quickly, and whether they directly present PI to PI 4-kinases or deliver PI to the membrane. It will be also interesting to obtain structural and kinetic data on Class II P1TPs, in particular Nir2, to accurately define how PA and PI are recognized and counter exchanged. The use of probes for PI and PA (Spo20) (Kim et al., 2015) might help to achieve this goal and to improve our understanding of how Class II P1TPs efficiently respond to the consumption of PIPs by PLC-based signaling cascades.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

N-FL, SI, JM, and GD conceptualized and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the CNRS and by an Agence Nationale de la Recherche Grant (ANR-16-CE13-0006).

ACKNOWLEDGMENTS

GD would like to thank Maud Magdeleine for her support during the writing of this manuscript. We are also grateful to Dr. A. Cuttriss for the final proofreading of the manuscript.

REFERENCES

- Aitken, J. F., Van Heusden, G. P. H., Temkin, M., and Dowhan, W. (1990). The gene encoding the phosphatidylinositol transfer protein is essential for cell growth. *J. Biol. Chem.* 265, 4711–4717.
- Alb, J. G., Cortese, J. D., Phillips, S. E., Albin, R. L., Nagy, T. R., Hamilton, B. A., et al. (2003). Mice lacking phosphatidylinositol transfer protein- α exhibit spinocerebellar degeneration, intestinal and hepatic steatosis, and hypoglycemia. *J. Biol. Chem.* 278, 33501–33518. doi: 10.1074/jbc.M303591200
- Alb, J. G., Phillips, S. E., Rostand, K., Cui, X., Pinxteren, J., Cotlin, L., et al. (2002). Genetic ablation of phosphatidylinositol Transfer Protein function in murine embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 2170–2179. doi: 10.1091/mbc.01
- Albulescu, L., Strating, J. R. P. M., Thibaut, H. J., Van Der Linden, L., Shair, M. D., Neyts, J., et al. (2015). Broad-range inhibition of enterovirus replication by OSW-1, a natural compound targeting OSBP. *Antiviral Res.* 117, 110–114. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.02.013
- Alfaro, G., Johansen, J., Dighe, S. A., Duamel, G., Kozminski, K. G., and Beh, C. T. (2011). The sterol-binding protein Kes1/Osh4p is a regulator of polarized exocytosis. *Traffic* 12, 1521–1536. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01265.x
- Amarilio, R., Ramachandran, S., Sabanay, H., and Lev, S. (2005). Differential regulation of endoplasmic reticulum structure through VAP-Nir protein interaction. *J. Biol. Chem.* 280, 5934–5944. doi: 10.1074/jbc.M409562000
- Banerji, S., Ngo, M., Lane, C. F., Robinson, C. A., Minogue, S., and Ridgway, N. D. (2010). Oxysterol binding protein-dependent activation of sphingomyelin synthesis in the Golgi apparatus requires phosphatidylinositol 4-kinase IIalpha. *Mol. Biol. Cell* 21, 4141–4150. doi: 10.1091/mbc.E10-05-0424
- Bankaitis, V. A., Aitken, J. R., Cleves, A. E., and Dowhan, W. (1990). An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* 347, 561–562. doi: 10.1038/347561a0
- Bankaitis, V. A., Ile, K. E., Nile, A. H., Ren, J., Ghosh, R., and Schaaf, G. (2012). Thoughts on Sec14-like nanoreactors and phosphoinositide signaling. *Adv. Biol. Regul.* 52, 115–121. doi: 10.1016/j.jbior.2011.11.001
- Bankaitis, V. A., Malehorn, D. E., Emr, S. D., and Greene, R. (1989). The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required

- for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *J. Cell Biol.* 108, 1271–1281. doi: 10.1083/jcb.108.4.1271
- Baron, C. L., and Malhotra, V. (2002). Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* 295, 325–328. doi: 10.1126/science.1066759
- Baumann, N. A., Sullivan, D. P., Ohvo-Rekila, H., Simonot, C., Pottekat, A., Klaassen, Z., et al. (2005). Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration. *Biochemistry* 44, 5816–5826. doi: 10.1021/bi048296z
- Beh, C. T., Cool, L., Phillips, J., and Rine, J. (2001). Overlapping functions of the yeast oxysterol-binding protein homologues. *Genetics* 157, 1117–1140.
- Beh, C. T., and Rine, J. (2004). A role for yeast oxysterol-binding protein homologs in endocytosis and in the maintenance of intracellular sterol-lipid distribution. *J. Cell Sci.* 117, 2983–2996. doi: 10.1242/jcs.01157
- Berger, K. L., Cooper, J. D., Heaton, N. S., Yoon, R., Oakland, T. E., Jordan, T. X., et al. (2009). Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 7577–7582. doi: 10.1073/pnas.0902693106
- Brown, M. S., Radhakrishnan, A., and Goldstein, J. L. (2018). Retrospective on cholesterol homeostasis: the central role of Scap. *Annu. Rev. Biochem.* 87, 783–807. doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-011852
- Brunner, J. D., Lim, N. K., Schenck, S., Duerst, A., and Dutzler, R. (2014). X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature* 516, 207–212. doi: 10.1038/nature13984
- Burgett, A. W., Poulsen, T. B., Wangkanont, K., Anderson, D. R., Kikuchi, C., Shimada, K., et al. (2011). Natural products reveal cancer cell dependence on oxysterol-binding proteins. *Nat. Chem. Biol.* 7, 639–647. doi: 10.1038/nchembio.625
- Burke, J. E., Inglis, A. J., Perisic, O., Masson, G. R., McLaughlin, S. H., Rutaganira, F., et al. (2014). Structures of PI4KIIIβ complexes show simultaneous recruitment of Rab11 and its effectors. *Science* 344, 1035–1038. doi: 10.1126/science.1253397
- Cai, J., Abramovici, H., Gee, S. H., and Topham, M. K. (2009). Diacylglycerol kinases as sources of phosphatidic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 942–948. doi: 10.1016/j.bbali.2009.02.010
- Capasso, S., Sticco, L., Rizzo, R., Pirozzi, M., Russo, D., Dathan, N. A., et al. (2017). Sphingolipid metabolic flow controls phosphoinositide turnover at the trans-Golgi network. *EMBO J.* 36, 1736–1754. doi: 10.15252/embj.201696048
- Carvou, N., Holic, R., Li, M., Futter, C., Skippen, A., and Cockcroft, S. (2010). Phosphatidylinositol- and phosphatidylcholine-transfer activity of P1TPbeta is essential for COPI-mediated retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 123, 1262–1273. doi: 10.1242/jcs.061986
- Chang, C. L., Hsieh, T. S., Yang, T. T., Rothberg, K. G., Azizoglu, D. B., Volk, E., et al. (2013). Feedback regulation of receptor-induced Ca²⁺ signaling mediated by E-Syt1 and Nir2 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Cell Rep.* 5, 813–825. doi: 10.1016/j.celrep.2013.09.038
- Chang, C. L., and Liou, J. (2015). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate homeostasis regulated by Nir2 and Nir3 proteins at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *J. Biol. Chem.* 290, 14289–14301. doi: 10.1074/jbc.M114.621375
- Charman, M., Colbourne, T. R., Pietrangolo, A., Kreplak, L., and Ridgway, N. D. (2014). Oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 4 (ORP4) is essential for cell proliferation and survival. *J. Biol. Chem.* 289, 15705–15717. doi: 10.1074/jbc.M114.571216
- Chiapparino, A., Maeda, K., Turei, D., Saez-Rodriguez, J., and Gavin, A. C. (2016). The orchestra of lipid-transfer proteins at the crossroads between metabolism and signaling. *Prog. Lipid Res.* 61, 30–39. doi: 10.1016/j.plipres.2015.10.004
- Christen, M., Marcaida, M. J., Lamprakis, C., Aeschmann, W., Vaithilingam, J., Schneider, P., et al. (2015). Structural insights on cholesterol endosynthesis: binding of squalene and 2,3-oxidosqualene to supernatant protein factor. *J. Struct. Biol.* 190, 261–270. doi: 10.1016/j.jsb.2015.05.001
- Chung, J., Torta, F., Masai, K., Lucast, L., Czaplá, H., Tanner, L. B., et al. (2015). PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science* 349, 428–432. doi: 10.1126/science.aab1370
- Cleves, A. E., McGee, T. P., Whitters, E. A., Champlon, K. M., Altken, J. R., Dowhan, W., et al. (1991). Mutations in the CDP-choline pathway for phospholipid biosynthesis bypass the requirement for an essential phospholipid transfer protein. *Cell* 64, 789–800. doi: 10.1016/0092-8674(91)90508-V
- Cockcroft, S., and Carvou, N. (2007). Biochemical and biological functions of class I phosphatidylinositol transfer proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 677–691. doi: 10.1016/j.bbali.2007.03.009
- Cockcroft, S., and Garner, K. (2013). Potential role for phosphatidylinositol transfer protein (PITP) family in lipid transfer during phospholipase C signalling. *Adv. Biol. Regul.* 53, 280–291. doi: 10.1016/j.bior.2013.07.007
- Collado, J., Kalemánov, M., Campelo, F., Bourgoignie, C., Thomas, F., Loewith, R., et al. (2019). Tricalbin-mediated contact sites control ER curvature to maintain plasma membrane integrity. *Dev. Cell* 51, 476–487.e7. doi: 10.1016/j.devcel.2019.10.018
- Conibear, E., and Stevens, T. H. (1998). Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1404, 211–230. doi: 10.1016/s0167-4889(98)00058-5
- Cosker, K. E., Shadan, S., van Diepen, M., Morgan, C., Li, M., Allen-Baume, V., et al. (2008). Regulation of PI3K signalling by the phosphatidylinositol transfer protein PITPα during axonal extension in hippocampal neurons. *J. Cell Sci.* 121, 796–803. doi: 10.1242/jcs.019166
- Cruz-García, D., Ortega-Bellido, M., Scarpa, M., Villeneuve, J., Jovic, M., Porzner, M., et al. (2013). Recruitment of arfaptins to the trans-Golgi network by PI(4)P and their involvement in cargo export. *EMBO J.* 32, 1717–1729. doi: 10.1038/emboj.2013.116
- D'Ambrosio, J. M., Albanèse, V., Lipp, N. F., Fleuriot, L., Debayle, D., Drin, G., et al. (2020). Osh6 requires Ist2 for localization to ER-PM contacts and efficient phosphatidylserine transport in budding yeast. *J. Cell Sci.* 133:jcs243733. doi: 10.1242/jcs.243733
- Daum, G., Tuller, G., Nemeč, T., Hrastnik, C., Balliano, G., Cattel, L., et al. (1999). Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. *Yeast* 15, 601–614. doi: 10.1002/(sici)1097-0061(199905)15:7<601::aid-yea390>3.0.co;2-n
- Dawson, P. A., Ridgway, N. D., Slaughter, C. A., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1989). cDNA cloning and expression of oxysterol-binding protein, an oligomer with a potential leucine zipper. *J. Biol. Chem.* 264, 16798–16803.
- de Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payrastré, B., Bourguet, W., et al. (2011). Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J. Cell Biol.* 195, 965–978. doi: 10.1083/jcb.201104062
- De Vries, K. J., Heinrichs, A. A. J., Cunningham, E., Brunink, F., Westerman, J., Somerharju, P. J., et al. (1995). An isoform of the phosphatidylinositol-transfer protein transfers sphingomyelin and is associated with the Golgi system. *Biochem. J.* 310, 643–649. doi: 10.1042/bj3100643
- Decaffmeyer, M., Shulga, Y. V., Dicu, A. O., Thomas, A., Truant, R., Topham, M. K., et al. (2008). Determination of the topology of the hydrophobic segment of mammalian diacylglycerol kinase epsilon in a cell membrane and its relationship to predictions from modeling. *J. Mol. Biol.* 383, 797–809. doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.076
- DeGrella, R. F., and Simoni, R. D. (1982). Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 257, 14256–14262.
- Demmel, L., Gravert, M., Ercan, E., Habermann, B., Mu, T., Kukhtina, V., et al. (2008). The clathrin adaptor Gga2p is a phosphatidylinositol 4-phosphate effector at the Golgi exit. *Mol. Biol. Cell* 19, 1991–2002. doi: 10.1091/mbc.E06
- Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651–657. doi: 10.1038/nature05185
- Dong, J., Du, X., Wang, H., Wang, J., Lu, C., Chen, X., et al. (2019). Allosteric enhancement of ORP1-mediated cholesterol transport by PI(4,5)P₂/PI(3,4)P₂. *Nat. Commun.* 10:829. doi: 10.1038/s41467-019-08791-0
- Dong, R., Saheki, Y., Swarup, S., Lucast, L., Harper, J. W., and De Camilli, P. (2016). Endosome-ER contacts control actin nucleation and retromer function through VAP-dependent regulation of PI4P. *Cell* 166, 408–423. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.037
- Drin, G. (2014). Topological regulation of lipid balance in cells. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 51–77. doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035307
- D'Souza, R. S., Lim, J. Y., Turgut, A., Servage, K., Zhang, J., Orth, K., et al. (2020). Calcium-stimulated disassembly of focal adhesions mediated by an ORP3/IQSec1 complex. *eLife* 9:e54113. doi: 10.7554/eLife.54113
- Du, X., Kumar, J., Ferguson, C., Schulz, T. A., Ong, Y. S., Hong, W., et al. (2011). A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal cholesterol trafficking. *J. Cell Biol.* 192, 121–135. doi: 10.1083/jcb.201004142

- Du, X., Zadoorian, A., Lukmantara, I. E., Qi, Y., Brown, A. J., and Yang, H. (2018). Oxysterol-binding protein-related protein 5 (ORP5) promotes cell proliferation by activation of MTORC1 signaling. *J. Biol. Chem.* 293, 3806–3818. doi: 10.1074/jbc.RA117.001558
- Du, X., Zhou, L., Aw, Y. C., Mak, H. Y., Xu, Y., Rae, J., 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. doi: 10.1083/jcb.201905162
- Duran, J. M., Campelo, F., van Galen, J., Sachsenheimer, T., Sot, J., Egorov, M. V., et al. (2012). Sphingomyelin organization is required for vesicle biogenesis at the Golgi complex. *EMBO J.* 31, 4535–4546. doi: 10.1038/emboj.2012.317
- Eden, E. R., Sanchez-Heras, E., Tsapara, A., Sobota, A., Levine, T. P., and Futter, C. E. (2016). Annexin A1 tethers membrane contact sites that mediate ER to endosome cholesterol transport. *Dev. Cell* 37, 473–483. doi: 10.1016/j.devcel.2016.05.005
- Ejsing, C. S., Sampaio, J. L., Surendranath, V., Duchoslav, E., Ekroos, K., Klemm, R. W., et al. (2009). Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 2136–2141. doi: 10.1073/pnas.0811700106
- Encinar del Dedo, J., Idrissi, F. Z., Fernandez-Golbano, I. M., Garcia, P., Rebollo, E., Krzyzanowski, M. K., et al. (2017). ORP-mediated ER contact with endocytic sites facilitates actin polymerization. *Dev. Cell* 43, 588–602.e6. doi: 10.1016/j.devcel.2017.10.031
- Epand, R. M. (2017). Features of the phosphatidylinositol cycle and its role in signal transduction. *J. Membr. Biol.* 250, 353–366. doi: 10.1007/s00232-016-9909-y
- Escajadillo, T., Wang, H., Li, L., Li, D., and Sewer, M. B. (2016). Oxysterol-related-binding-protein related Protein-2 (ORP2) regulates cortisol biosynthesis and cholesterol homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 427, 73–85. doi: 10.1016/j.mce.2016.03.006
- Fairn, G. D., Curwin, A. J., Stefan, C. J., and McMaster, C. R. (2007). The oxysterol binding protein Kes1p regulates Golgi apparatus phosphatidylinositol-4-phosphate function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15352–15357. doi: 10.1073/pnas.0705571104
- Fang, M., Kearns, B. G., Gedvilaite, A., Kagiwada, S., Kearns, M., Fung, M. K., et al. (1996). Kes1p shares homology with human oxysterol binding protein and participates in a novel regulatory pathway for yeast Golgi-derived transport vesicle biogenesis. *EMBO J.* 15, 6447–6459. doi: 10.1002/J.1460-2075.1996.TB01036.X
- Faulhammer, F., Kanjilal-Kolar, S., Knödler, A., Lo, J., Lee, Y., Konrad, G., et al. (2007). Growth control of Golgi phosphoinositides by reciprocal localization of Sac1 lipid phosphatase and Pik1 4-kinase. *Traffic* 8, 1554–1567. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00632.x
- Foti, M., Audhya, A., and Emr, S. D. (2001). Sac1 lipid phosphatase and Stt4 phosphatidylinositol 4-kinase regulate a pool of phosphatidylinositol 4-phosphate that functions in the control of the actin cytoskeleton and vacuole morphology. *Mol. Biol. Cell* 12, 2396–2411. doi: 10.1091/mbc.12.8.2396
- Fratti, R. A., Jun, Y., Merz, A. J., Margolis, N., Wickner, W., and Wickner, B. (2004). Interdependent assembly of specific regulatory lipids and membrane fusion proteins into the vertex ring domain of docked vacuoles. *J. Cell Biol.* 167, 1087–1098. doi: 10.1083/jcb.200409068
- Galmes, R., Houcine, A., Vliet, A. R., Agostinis, P., Jackson, C. L., and Giordano, F. (2016). ORP5/ORP8 localize to endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and are involved in mitochondrial function. *EMBO Rep.* 17, 800–810. doi: 10.15252/embr.201541108
- Garner, K., Hunt, A. N., Koster, G., Somerharju, P., Groves, E., Li, M., et al. (2012). Phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1 (PITPNC1) binds and transfers phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 287, 32263–32276. doi: 10.1074/jbc.M112.375840
- Garner, K., Li, M., Ugwuanya, N., and Cockcroft, S. (2011). The phosphatidylinositol transfer protein RdgBβ binds 14-3-3 via its unstructured C-terminus, whereas its lipid-binding domain interacts with the integral membrane protein ATRAP (angiotensin II type 1 receptor-associated protein). *Biochem. J.* 439, 97–111. doi: 10.1042/BJ20110649
- Georgiev, A. G., Sullivan, D. P., Kersting, M. C., Dittman, J. S., Beh, C. T., and Menon, A. K. (2011). Osh proteins regulate membrane sterol organization but are not required for sterol movement between the ER and PM. *Traffic* 12, 1341–1355. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01234.x
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., et al. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737–741. doi: 10.1038/nature02046
- Ghai, R., Du, X., Wang, H., Dong, J., Ferguson, C., Brown, A. J., et al. (2017). ORP5 and ORP8 bind phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) and regulate its level at the plasma membrane. *Nat. Commun.* 8:757. doi: 10.1038/s41467-017-00861-5
- Gibson, T. J., Hyvönen, M., Musacchio, A., Saraste, M., and Birney, E. (1994). PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem. Sci.* 19, 349–353. doi: 10.1016/0968-0004(94)90108-2
- Giordano, F., Saheki, Y., Idevall-Hagren, O., Colombo, S. F., Pirruccello, M., Milosevic, I., et al. (2013). PI(4,5)P₂-dependent and Ca²⁺-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. *Cell* 153, 1494–1509. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.026
- Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D. R., Kular, G. S., et al. (2004). FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat. Cell Biol.* 6, 393–404. doi: 10.1038/ncb1119
- Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di Tullio, G., Iurisci, C., et al. (1999). ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P₂ on the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 1, 280–287. doi: 10.1038/12993
- Gomez-Suaga, P., Perez-Nieves, B. G., Glennon, E. B., Lau, D. H. W., Paillusson, S., Morotz, G. M., et al. (2019). The VAPB-PTPIP51 endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins are present in neuronal synapses and regulate synaptic activity. *Acta Neuropathol. Commun.* 7:35. doi: 10.1186/s40478-019-0688-4
- Goto, A., Liu, X., Robinson, C. A., and Ridgway, N. D. (2012). Multisite phosphorylation of oxysterol-binding protein regulates sterol binding and activation of sphingomyelin synthesis. *Mol. Biol. Cell* 23, 3624–3635. doi: 10.1091/mbc.E12-04-0283
- Gulýás, G., Sohn, M., Kim, Y. J., Várnai, P., and Balla, T. (2020). ORP3 phosphorylation regulates phosphatidylinositol 4-phosphate and Ca²⁺ dynamics at plasma membrane-ER contact sites. *J. Cell Sci.* 133:jcs237388. doi: 10.1242/JCS.237388
- Halberg, N., Sengelaub, C. A., Navrazhina, K., Molina, H., Uryu, K., and Tavazoie, S. F. (2016). PITPNC1 recruits RAB1B to the Golgi network to drive malignant secretion. *Cancer Cell* 29, 339–353. doi: 10.1016/j.ccell.2016.02.013
- Hama, H., Schnieders, E. A., Thorner, J., Takemoto, J. Y., and DeWald, D. B. (1999). Direct involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate in secretion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 34294–34300. doi: 10.1074/jbc.274.48.34294
- Hamilton, B. A., Smith, D. J., Mueller, K. L., Kerrebrock, A. W., Bronson, R. T., Van Berkel, V., et al. (1997). The vibrator mutation causes neurodegeneration via reduced expression of PITPα: positional complementation cloning and extragenic suppression. *Neuron* 18, 711–722. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80312-8
- Hammond, G. R. V., Machner, M. P., and Balla, T. (2014). A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi. *J. Cell Biol.* 205, 113–126. doi: 10.1083/jcb.201312072
- Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., et al. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426, 803–809. doi: 10.1038/nature02188
- Harsay, E., and Schekman, R. (2002). A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway. *J. Cell Biol.* 156, 271–285. doi: 10.1083/jcb.200109077
- Haslam, R. J., Koide, H. B., and Hemmings, B. A. (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature* 363, 309–310. doi: 10.1038/363309b0
- Hausser, A., Storz, P., Martens, S., Link, G., Toker, A., and Pfizenmaier, K. (2005). Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIβ at the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 7, 880–886. doi: 10.1038/ncb1289
- Hay, J. C., and Martin, T. F. J. (1993). Phosphatidylinositol transfer protein required for ATP-dependent priming of Ca²⁺-activated secretion. *Nature* 266, 572–575. doi: 10.1038/366572a0
- He, X., Lobsiger, J., and Stocker, A. (2009). Bothnia dystrophy is caused by domino-like rearrangements in cellular retinaldehyde-binding protein mutant R234W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18545–18550. doi: 10.1073/pnas.0907454106

- Helmkamp, G. M. Jr., Harvey, M. S., Wirtz, K. W., and Van Deenen, L. L. (1974). Phospholipid exchange between membranes. *J. Biol. Chem.* 249, 6382–6389.
- Hoffmann, P. C., Bharat, T. A. M., Wozny, M. R., Boulanger, J., Miller, E. A., and Kukulski, W. (2019). Tricalbins contribute to cellular lipid flux and form curved ER-PM contacts that are bridged by rod-shaped structures. *Dev. Cell* 51, 488–502. doi: 10.1016/j.devcel.2019.09.019
- Holič, R., Šimová, Z., Ashlin, T., Pevala, V., Poloncová, K., Tahotná, D., et al. (2014). Phosphatidylinositol binding of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr16p represents an essential feature of this lipid transfer protein to provide protection against azole antifungals. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 1483–1490. doi: 10.1016/j.bbap.2014.07.014
- Hongay, C., Jia, N., Bard, M., and Winston, F. (2002). Mot3 is a transcriptional repressor of ergosterol biosynthetic genes and is required for normal vacuolar function in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 21, 4114–4124. doi: 10.1093/emboj/cdf415
- Hsu, N. Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y. H., Takvorian, P. M., et al. (2010). Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* 141, 799–811. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.050
- Huang, B. X., Akbar, M., Kevala, K., and Kim, H. Y. (2011). Phosphatidylserine is a critical modulator for Akt activation. *J. Cell Biol.* 192, 979–992. doi: 10.1083/jcb.201005100
- Hynynen, R., Laitinen, S., Kakela, R., Tanhuanpaa, K., Lusa, S., Ehnholm, C., et al. (2005). Overexpression of OSBP-related protein 2 (ORP2) induces changes in cellular cholesterol metabolism and enhances endocytosis. *Biochem. J.* 390, 273–283. doi: 10.1042/BJ20042082
- Hynynen, R., Suchanek, M., Spandl, J., Bäck, N., Thiele, C., and Olkkonen, V. M. (2009). OSBP-related protein 2 is a sterol receptor on lipid droplets that regulates the metabolism of neutral lipids. *J. Lipid Res.* 50, 1305–1315. doi: 10.1194/jlr.M800661-JLR200
- Im, Y. J., Raychaudhuri, S., Prinz, W. A., and Hurley, J. H. (2005). Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins. *Nature* 437, 154–158. doi: 10.1038/nature03923
- Inés Fernández-Ulibarri, I., Vilella, M., Lázaro-Diéguez, F., Sarri, E., Martínez, S. E., Jiménez, N., et al. (2007). Diacylglycerol is required for the formation of COPI vesicles in the Golgi-to-ER transport pathway. *Mol. Biol. Cell* 18, 3250–3263. doi: 10.1091/mbc.E07
- Inoue, H., Baba, T., Sato, S., Ohtsuki, R., Takemori, A., Watanabe, T., et al. (2012). Roles of SAM and DDHD domains in mammalian intracellular phospholipase A1 KIAA0725p. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 930–939. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.002
- Ishikawa-Sasaki, K., Nagashima, S., Taniguchi, K., and Sasaki, J. (2018). Model of OSBP-mediated cholesterol supply to Aichi Virus RNA replication sites involving protein-protein interactions among viral proteins, ACBD3, OSBP, VAP-A/B, and SAC1. *J. Virol.* 92, 1–23. doi: 10.1128/jvi.01952-17
- Jansen, M., Ohsaki, Y., Rega, L. R., Bittman, R., Olkkonen, V. M., and Ikonen, E. (2011). Role of ORPs in sterol transport from plasma membrane to ER and lipid droplets in mammalian cells. *Traffic* 12, 218–231. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01142.x
- Jiang, B., Brown, J. L., Sheraton, J., Fortin, N., and Bussey, H. (1994). A new family of yeast genes implicated in ergosterol synthesis is related to the human oxysterol binding protein. *Yeast* 10, 341–353. doi: 10.1002/yea.320100307
- Johansson, M., Bocher, V., Lehto, M., Chinetti, G., Kuismanen, E., Ehnholm, C., et al. (2003). The two variants of oxysterol binding protein-related protein-1 display different tissue expression patterns, have different intracellular localization, and are functionally distinct. *Mol. Biol. Cell* 14, 903–915. doi: 10.1091/mbc.e02-08-0459
- Johansson, M., Lehto, M., Tanhuanpaa, K., Cover, T. L., and Olkkonen, V. M. (2005). The oxysterol-binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7 and alters functional properties of late endocytic compartments. *Mol. Biol. Cell* 16, 5480–5492. doi: 10.1091/mbc.e05-03-0189
- Kandutsch, A. A., and Thompson, E. B. (1980). Cytosolic proteins that bind oxygenated sterols. Cellular distribution, specificity, and some properties. *J. Biol. Chem.* 255, 10813–10821.
- Kato, M., and Wickner, W. (2001). Ergosterol is required for the Sec18/ATP-dependent priming step of homotypic vacuole fusion. *EMBO J.* 20, 4035–4040. doi: 10.1093/emboj/20.15.4035
- Kattan, W. E., Chen, W., Ma, X., Lan, T. H., van der Hoeven, D., van der Hoeven, R., et al. (2019). Targeting plasma membrane phosphatidylserine content to inhibit oncogenic KRAS function. *Life Sci. Alliance* 2, e201900431. doi: 10.26508/lsa.201900431
- Kauffmann-Zeh, A., Thomas, G. M. H., Ball, A., Prosser, S., Cunningham, E., Cockcroft, S., et al. (1995). Requirement for phosphatidylinositol transfer protein in epidermal growth factor signaling. *Science* 268, 1188–1190. doi: 10.1126/science.7761838
- Kawano, M., Kumagai, K., Nishijima, M., and Hanada, K. (2006). Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J. Biol. Chem.* 281, 30279–30288. doi: 10.1074/jbc.M605032200
- Keinan, O., Kedan, A., Gavert, N., Selitrennik, M., Kim, S. H., Karn, T., et al. (2014). The lipid-transfer protein Nir2 enhances epithelial-mesenchymal transition and facilitates breast cancer metastasis. *J. Cell Sci.* 127, 4740–4749. doi: 10.1242/jcs.155721
- Kentala, H., Koponen, A., Vihinen, H., Pirhonen, J., Liebisch, G., Pataj, Z., et al. (2018). OSBP-related protein-2 (ORP2): a novel Akt effector that controls cellular energy metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 4041–4057. doi: 10.1007/s00018-018-2850-8
- Kim, S., Kedan, A., Marom, M., Gavert, N., Keinan, O., Selitrennik, M., et al. (2013). The phosphatidylinositol-transfer protein Nir2 binds phosphatidic acid and positively regulates phosphoinositide signalling. *EMBO Rep.* 14, 891–899. doi: 10.1038/embor.2013.113
- Kim, Y. J., Guzman-Hernandez, M. L., and Balla, T. (2011). A highly dynamic ER-derived phosphatidylinositol-synthesizing organelle supplies phosphoinositides to cellular membranes. *Dev. Cell* 21, 813–824. doi: 10.1016/j.devcel.2011.09.005
- Kim, Y. J., Guzman-Hernandez, M. L., Wisniewski, E., and Balla, T. (2015). Phosphatidylinositol-phosphatidic acid exchange by Nir2 at ER-PM contact sites maintains phosphoinositide signaling competence. *Dev. Cell* 33, 549–561. doi: 10.1016/j.devcel.2015.04.028
- Klemm, R. W., Ejsing, C. S., Surma, M. A., Kaiser, H. J., Gerl, M. J., Sampaio, J. L., et al. (2009). Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* 185, 601–612. doi: 10.1083/jcb.200901145
- Kobayashi, N., Hozumi, Y., Ito, T., Hosoya, T., Kondo, H., and Goto, K. (2007). Differential subcellular targeting and activity-dependent subcellular localization of diacylglycerol kinase isozymes in transfected cells. *Eur. J. Cell Biol.* 86, 433–444. doi: 10.1016/j.ejcb.2007.05.002
- Koga, Y., Ishikawa, S., Nakamura, T., Masuda, T., Nagai, Y., Takamori, H., et al. (2008). Oxysterol binding protein-related protein-5 is related to invasion and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 99, 2387–2394. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00987.x
- Kono, N., Ohto, U., Hiramoto, T., Urabe, M., Uchida, Y., Satow, Y., et al. (2013). Impaired -TTP-PIPs interaction underlies familial vitamin E deficiency. *Science* 340, 1106–1110. doi: 10.1126/science.1233508
- Kuge, O., Hasegawa, K., Saito, K., and Nishijima, M. (1998). Control of phosphatidylserine biosynthesis through phosphatidylserine-mediated inhibition of phosphatidylserine synthase I in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 4199–4203. doi: 10.1073/pnas.95.8.4199
- Kular, G., Loubtchenkov, M., Swigart, P., Whatmore, J., Ball, A., Cockcroft, S., et al. (1997). Co-operation of phosphatidylinositol transfer protein with phosphoinositide 3-kinase γ in the formylmethionyl-leucylphenylalanine-dependent production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in human neutrophils. *Biochem. J.* 325, 299–301. doi: 10.1042/bj3250299
- Kvam, E., and Goldfarb, D. S. (2004). Nvj1p is the outer-nuclear-membrane receptor for oxysterol-binding protein homolog Osh1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 117, 4959–4968. doi: 10.1242/jcs.01372
- Kvam, E., and Goldfarb, D. S. (2006). Structure and function of nucleus-vacuole junctions: outer-nuclear-membrane targeting of Nvj1p and a role in tryptophan uptake. *J. Cell Sci.* 119, 3622–3633. doi: 10.1242/jcs.03093
- Ladinsky, M. S., Mastrorade, D. N., McIntosh, J. R., Howell, K. E., and Staehelin, L. A. (1999). Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J. Cell Biol.* 144, 1135–1149. doi: 10.1083/jcb.144.6.1135
- Lagace, T. A., Byers, D. M., Cook, H. W., and Ridgway, N. D. (1997). Altered regulation of cholesterol and cholesteryl ester synthesis in Chinese-hamster ovary cells overexpressing the oxysterol-binding protein is dependent on the pleckstrin homology domain. *Biochem. J.* 326, 205–213. doi: 10.1042/bj3260205

- Laitinen, S., Lehto, M., Lehtonen, S., Hyvärinen, K., Heino, S., Lehtonen, E., et al. (2002). ORP2, a homolog of oxysterol binding protein, regulates cellular cholesterol metabolism. *J. Lipid Res.* 43, 245–255.
- Lee, B.-C., Khelashvili, G., Falzone, M., Menon, A. K., Weinstein, H., and Accardi, A. (2018). Gating mechanism of the extracellular entry to the lipid pathway in a TMEM16 scramblase. *Nat. Commun.* 9:3251. doi: 10.1038/s41467-018-05724-1
- Lee, M., and Fairn, G. D. (2018). Both the PH domain and N-terminal region of oxysterol-binding protein related protein 8S are required for localization to PM-ER contact sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 496, 1088–1094. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.138
- Lehto, M., Laitinen, S., Chinetti, G., Johansson, M., Ehnholm, C., Staels, B., et al. (2001). The OSBP-related protein family in humans. *J. Lipid Res.* 42, 1203–1213.
- Lehto, M., Mayranpaa, M. I., Pellinen, T., Ihalmo, P., Lehtonen, S., Kovanen, P. T., et al. (2008). The R-Ras interaction partner ORP3 regulates cell adhesion. *J. Cell Sci.* 121, 695–705. doi: 10.1242/jcs.016964
- Leidl, K., Liebisch, G., Richter, D., and Schmitz, G. (2008). Mass spectrometric analysis of lipid species of human circulating blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 655–664. doi: 10.1016/j.bbali.2008.07.008
- Lev, S. (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 739–750. doi: 10.1038/nrm2971
- Levanon, D., Hsieh, C. L., Francke, U., Dawson, P. A., Ridgway, N. D., Brown, M. S., et al. (1990). cDNA cloning of human oxysterol-binding protein and localization of the gene to human chromosome 11 and mouse chromosome 19. *Genomics* 7, 65–74. doi: 10.1016/0888-7543(90)90519-Z
- Leventis, P. A., and Grinstein, S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* 39, 407–427. doi: 10.1146/annurev.biophys.093008.131234
- Levine, T. (2005). A new way for sterols to walk on water. *Mol. Cell* 19, 722–723. doi: 10.1016/j.molcel.2005.08.006
- Levine, T. P., and Munro, S. (2001). Dual targeting of Osh1p, a yeast homologue of oxysterol-binding protein, to both the Golgi and the nucleus-vacuole junction. *Mol. Biol. Cell* 12, 1633–1644. doi: 10.1091/mbc.12.6.1633
- Levine, T. P., and Munro, S. (2002). Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components. *Curr. Biol.* 12, 695–704. doi: 10.1016/S0960-9822(02)0779-0
- Li, D., Dammer, E. B., Lucki, N. C., Sewer, M. B., and Chernoff, J. (2013). cAMP-stimulated phosphorylation of diaphanous 1 regulates protein stability and interaction with binding partners in adrenocortical cells. *Mol. Biol. Cell* 24, 848–857. doi: 10.1091/mbc.E12-08-0597
- Li, S. C., and Kane, P. M. (2009). The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 650–663. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.08.003
- Li, X., Rivas, M. P., Fang, M., Marchena, J., Mehrotra, B., Chaudhary, A., et al. (2002). Analysis of oxysterol binding protein homologue Kes1p function in regulation of Sec14p-dependent protein transport from the yeast Golgi complex. *J. Cell Biol.* 157, 63–77. doi: 10.1083/jcb.200201037
- Li, X., Routt, S. M., Xie, Z., Cui, X., Fang, M., Kearns, M. A., et al. (2000). Identification of a novel family of nonclassic yeast phosphatidylinositol transfer proteins whose function modulates phospholipase D activity and Sec14p-independent cell growth. *Mol. Biol. Cell* 11, 1989–2005. doi: 10.1091/mbc.11.6.1989
- Liat, Y.-T., and Gerst, J. E. (2009). A phosphatidylinositol-transfer protein and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase control Cdc42 to regulate the actin cytoskeleton and secretory pathway in yeast. *Mol. Biol. Cell* 20, 3583–3597. doi: 10.1091/mbc.E08
- Lim, C.-Y., Davis, O. B., Shin, H. R., Zhang, J., Berdan, C. A., Jiang, X., et al. (2019). ER-lysosome contacts enable cholesterol sensing by mTORC1 and drive aberrant growth signalling in Niemann-Pick type C. *Nat. Cell Biol.* 21, 1206–1218. doi: 10.1038/s41556-019-0391-5
- Ling, Y., Hayano, S., and Novick, P. (2014). Osh4p is needed to reduce the level of phosphatidylinositol-4-phosphate on secretory vesicles as they mature. *Mol. Biol. Cell* 25, 3389–3400. doi: 10.1091/mbc.E14-06-1087
- Lipp, N. F., Gautier, R., Magdeleine, M., Renard, M., Albançese, V., Čopić, A., et al. (2019). An electrostatic switching mechanism to control the lipid transfer activity of Osh6p. *Nat. Commun.* 10:3926. doi: 10.1038/s41467-019-11780-y
- Litvak, V., Dahan, N., Ramachandran, S., Sabanay, H., and Lev, S. (2005). Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. *Nat. Cell Biol.* 7, 225–234. doi: 10.1038/ncb1221
- Liu, X., and Ridgway, N. D. (2014). Characterization of the sterol and phosphatidylinositol 4-phosphate binding properties of Golgi-associated OSBP-related protein 9 (ORP9). *PLoS One* 9:e108368. doi: 10.1371/journal.pone.0108368
- Loewen, C. J. R., Roy, A., and Levine, T. P. (2003). A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J.* 22, 2025–2035. doi: 10.1093/emboj/cdg201
- Lu, D., Sun, H. Q., Wang, H., Barylko, B., Fukata, Y., Fukata, M., et al. (2012). Phosphatidylinositol 4-kinase IIalpha is palmitoylated by Golgi-localized palmitoyltransferases in cholesterol-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 287, 21856–21865. doi: 10.1074/jbc.M112.348094
- Lykidis, A., Jackson, P. D., Rock, C. O., and Jackowski, S. (1997). The role of CDP-diacylglycerol synthetase and phosphatidylinositol synthase activity levels in the regulation of cellular phosphatidylinositol content. *J. Biol. Chem.* 272, 33402–33409. doi: 10.1074/jbc.272.52.33402
- Machaca, K. (2020). Ca²⁺ signaling and lipid transfer ‘pas a deux’ at ER-PM contact sites orchestrate cell migration. *Cell Calcium* 89:102226. doi: 10.1016/j.ceca.2020.102226
- Maeda, K., Anand, K., Chiapparino, A., Kumar, A., Poletto, M., Kaksonen, M., et al. (2013). Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins. *Nature* 501, 257–261. doi: 10.1038/nature12430
- Manford, A. G., Stefan, C. J., Yuan, H. L., Macgurn, J. A., and Emr, S. D. (2012). ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Dev. Cell* 23, 1129–1140. doi: 10.1016/j.devcel.2012.11.004
- Manik, M. K., Yang, H., Tong, J., and Im, Y. J. (2017). Structure of yeast OSBP-related protein Osh1 reveals key determinants for lipid transport and protein targeting at the Nucleus-Vacuole Junction. *Structure* 25, 617–629.e3. doi: 10.1016/j.str.2017.02.010
- Mariotti, C., Gellera, C., Rimondi, M., Mineri, R., Uziel, G., Zorzi, G., et al. (2004). Ataxia with isolated vitamin E deficiency: neurological phenotype, clinical follow-up and novel mutations in TTPA gene in Italian families. *Neurol. Sci.* 25, 130–137. doi: 10.1007/s10072-004-0246-z
- Marsh, B. J., Volkmann, N., McIntosh, J. R., and Howell, K. E. (2004). Direct continuities between cisternae at different levels of the Golgi complex in glucose-stimulated mouse islet beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 5565–5570. doi: 10.1073/pnas.0401242101
- McGee, T. P., Skinner, H. B., Whitters, E. A., Henry, S. A., and Bankaitis, V. A. (1994). A phosphatidylinositol transfer protein controls the phosphatidylcholine content of yeast Golgi membranes. *J. Cell Biol.* 124, 273–287. doi: 10.1083/jcb.124.3.273
- Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J., Lacas-Gervais, S., Drin, G., and Antony, B. (2013). A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell* 155, 830–843. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.056
- Mesmin, B., Bigay, J., Polidori, J., Jamecna, D., Lacas-Gervais, S., and Antony, B. (2017). Sterol transfer, PI4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP. *EMBO J.* 36, 3156–3174. doi: 10.15252/embj.201796687
- Mesmin, B., Kovacs, D., and D’Angelo, G. (2019). Lipid exchange and signaling at ER-Golgi contact sites. *Curr. Opin. Cell Biol.* 57, 8–15. doi: 10.1016/j.cob.2018.10.002
- Mesmin, B., and Maxfield, F. R. (2009). Intracellular sterol dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 636–645. doi: 10.1016/j.bbali.2009.03.002
- Michell, R. H. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* 415, 81–147. doi: 10.1016/0304-4157(75)90017-9
- Mizuike, A., Kobayashi, S., Rikukawa, T., Ohta, A., Horiuchi, H., and Fukuda, R. (2019). Suppression of respiratory growth defect of mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase deficient mutant by overproduction of Sfh1, a Sec14 homolog, in yeast. *PLoS One* 14:e0215009. doi: 10.1371/journal.pone.0215009
- Morgan, C. P., Skippen, A., Segui, B., Ball, A., Allen-Baume, V., Larjani, B., et al. (2004). Phosphorylation of a distinct structural form of phosphatidylinositol transfer protein α at Ser166 by protein kinase C disrupts receptor-mediated phospholipase C signaling by inhibiting delivery of phosphatidylinositol to membranes. *J. Biol. Chem.* 279, 47159–47171. doi: 10.1074/jbc.M405827200

- Morley, S., Cecchini, M., Zhang, W., Virgulti, A., Noy, N., Atkinson, J., et al. (2008). Mechanisms of ligand transfer by the hepatic tocopherol transfer protein. *J. Biol. Chem.* 283, 17797–17804. doi: 10.1074/jbc.M800121200
- Moser Von Filseck, J., Čopič, A., Delfosse, V., Vanni, S., Jackson, C. L., Bourguet, W., et al. (2015a). Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science* 349, 432–436. doi: 10.1126/science.aab1346
- Moser von Filseck, J., and Drin, G. (2016). Running up that hill: How to create cellular lipid gradients by lipid counter-flows. *Biochimie* 130, 115–121. doi: 10.1016/j.biochi.2016.08.001
- Moser Von Filseck, J., Vanni, S., Mesmin, B., Antonny, B., and Drin, G. (2015b). A phosphatidylinositol-4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes. *Nat. Commun.* 6:6671. doi: 10.1038/ncomms7671
- Mousley, C. J., Yuan, P., Gaur, N. A., Trettin, K. D., Nile, A. H., Deminoff, S. J., et al. (2012). A sterol-binding protein integrates endosomal lipid metabolism with TOR signaling and nitrogen sensing. *Cell* 148, 702–715. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.026
- Nagano, K., Imai, S., Zhao, X., Yamashita, T., Yoshioka, Y., Abe, Y., et al. (2015). Identification and evaluation of metastasis-related proteins, oxysterol binding protein-like 5 and calumenin, in lung tumors. *Int. J. Oncol.* 47, 195–203. doi: 10.3892/ijo.2015.3000
- Ngo, M., and Ridgway, N. D. (2009). Oxysterol binding protein-related protein 9 (ORP9) is a cholesterol transfer protein that regulates Golgi structure and function. *Mol. Biol. Cell* 20, 1388–1399. doi: 10.1091/mbc.E08
- Nishimura, T., Covino, R., Gecht, M., Hummer, G., Arai, H., Kono, N., et al. (2019). Osh proteins control nanoscale lipid organization necessary for PI(4,5)P₂ synthesis. *Mol. Cell* 75, 1043–1057. doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.037
- Nishimura, Y., Hayashi, M., Inada, H., and Tanaka, T. (1999). Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 21–26. doi: 10.1006/bbrc.1998.9876
- Nissila, E., Ohsaki, Y., Weber-Boyvat, M., Perttala, J., Ikonen, E., and Olkkonen, V. M. (2012). ORP10, a cholesterol binding protein associated with microtubules, regulates apolipoprotein B-100 secretion. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 1472–1484. doi: 10.1016/j.bbailip.2012.08.004
- Ohashi, M., de Vriest, K. J., Frank, R., Snoek, G., Bankaitis, V., and Wirtzf, K. (1995). A role for phosphatidylinositol transfer protein in secretory vesicle formation. *Nature* 377, 544–547. doi: 10.1038/377544a0
- Olkkonen, V. M., and Levine, T. P. (2004). Oxysterol binding proteins: in more than one place at one time? *Biochem. Cell Biol.* 82, 87–98. doi: 10.1139/o03-088
- Ortiz, D., Medkova, M., Walch-solimena, C., and Novick, P. (2002). Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast. *J. Cell Biol.* 157, 1005–1015.
- Pan, G., Cao, X., Liu, B., Li, C., Li, D., Zheng, J., et al. (2018). OSBP-related protein 4L promotes phospholipase Cβ3 translocation from the nucleus to the plasma membrane in Jurkat T-cells. *J. Biol. Chem.* 293, 17430–17441. doi: 10.1074/jbc.RA118.005437
- Panagabko, C., Baptist, M., and Atkinson, J. (2019). In vitro lipid transfer assays of phosphatidylinositol transfer proteins provide insight into the in vivo mechanism of ligand transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 619–630. doi: 10.1016/j.bbamem.2018.12.003
- Panagabko, C., Morley, S., Hernandez, M., Cassolato, P., Gordon, H., Parsons, R., et al. (2003). Ligand specificity in the CRAL-TRIO protein family. *Biochemistry* 42, 6467–6474. doi: 10.1021/bi034086v
- Pemberton, J. G., Kim, Y. J., Humpolickova, J., Eisenreichova, A., Sengupta, N., Toth, D. J., et al. (2020). Defining the subcellular distribution and metabolic channeling of phosphatidylinositol. *J. Cell Biol.* 219:e202001185. doi: 10.1083/jcb.201906130
- Peretti, D., Dahan, N., Shimon, E., Hirschberg, K., and Lev, S. (2008). Coordinated lipid transfer between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex requires the VAP proteins and is essential for Golgi-mediated transport. *Mol. Biol. Cell* 19, 3871–3884. doi: 10.1091/mbc.e08-05-0498
- Perry, R. J., and Ridgway, N. D. (2006). Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein. *Mol. Biol. Cell* 17, 2604–2616. doi: 10.1091/mbc.e06-01-0060
- Phillips, S. E., Ile, K. E., Boukhelifa, M., Huijbregts, R. P. H., and Bankaitis, V. A. (2006). Specific and nonspecific membrane-binding determinants cooperate in targeting phosphatidylinositol transfer protein β-Isoform to the mammalian trans-Golgi network. *Mol. Biol. Cell* 17, 2498–2512. doi: 10.1091/mbc.e06-01-0089
- Phillips, S. E., Sha, B., Topalof, L., Xie, Z., Alb, J. G., Klenchin, V. A., et al. (1999). Yeast Sec14p deficient in phosphatidylinositol transfer activity is functional in vivo. *Mol. Cell* 4, 187–197. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80366-4
- Pietrangelo, A., and Ridgway, N. D. (2018). Golgi localization of oxysterol binding protein-related protein 4L (ORP4L) is regulated by ligand binding. *J. Cell Sci.* 131:jcs215335. doi: 10.1242/jcs.215335
- Png, K. J., Halberg, N., Yoshida, M., and Tavaoie, S. F. (2012). A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature* 481, 190–196. doi: 10.1038/nature10661
- Porter, T. D. (2003). Supernatant protein factor and tocopherol-associated protein: an unexpected link between cholesterol synthesis and vitamin E (Review). *J. Nutr. Biochem.* 14, 3–6. doi: 10.1016/s0955-2863(02)00262-0
- Prashek, J., Bouyain, S., Fu, M., Li, Y., Berkes, D., and Yao, X. (2017). Interaction between the PH and START domains of ceramide transfer protein competes with phosphatidylinositol 4-phosphate binding by the PH domain. *J. Biol. Chem.* 292, 14217–14228. doi: 10.1074/jbc.M117.780007
- Prinz, W. A., Toulmay, A., and Balla, T. (2020). The functional universe of membrane contact sites. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 7–24. doi: 10.1038/s41580-019-0180-9
- Proszynski, T. J., Klemm, R. W., Gravert, M., Hsu, P. P., Gloor, Y., Wagner, J., et al. (2005). A genome-wide visual screen reveals a role for sphingolipids and ergosterol in cell surface delivery in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17981–17986. doi: 10.1073/pnas.0509107102
- Pusapati, G., Krndjija, D., Armacki, M., von Wichert, G., von Blume, J., Malhotra, V., et al. (2009). Role of the Second Cysteine-rich Domain and Pro275 in Protein Kinase D2 Interaction with ADP-Ribosylation Factor 1, Trans-Golgi Network Recruitment, and Protein Transport. *Mol. Biol. Cell* 20, 4524–4530. doi: 10.1091/mbc.E09
- Raychaudhuri, S., Im, Y. J., Hurley, J. H., and Prinz, W. A. (2006). Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides. *J. Cell Biol.* 173, 107–119. doi: 10.1083/jcb.200510084
- Raychaudhuri, S., and Prinz, W. A. (2010). The diverse functions of oxysterol-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 157–177. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113334
- Ren, J., Lin, C. P. C., Pathak, M. C., Temple, B. R. S., Nile, A. H., Mousley, C. J., et al. (2014). A phosphatidylinositol transfer protein integrates phosphoinositide signaling with lipid droplet metabolism to regulate a developmental program of nutrient stress-induced membrane biogenesis. *Mol. Biol. Cell* 25, 712–727. doi: 10.1091/mbc.E13-11-0634
- Ridgway, N. D., Dawson, P. A., Ho, Y. K., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1992). Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. *J. Cell Biol.* 116, 307–319. doi: 10.1083/jcb.116.2.307
- Riekhof, W. R., Wu, W. I., Jones, J. L., Nikrad, M., Chan, M. M., Loewen, C. J. R., et al. (2014). An assembly of proteins and lipid domains regulates transport of phosphatidylserine to phosphatidylserine decarboxylase 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 289, 5809–5819. doi: 10.1074/jbc.M113.518217
- Rivas, M. P., Kearns, B. G., Xie, Z., Guo, S., Sekar, M. C., Hosaka, K., et al. (1999). Pleiotropic alterations in lipid metabolism in yeast sac1 mutants: relationship to “bypass Sec14p” and inositol auxotrophy. *Mol. Biol. Cell* 10, 2235–2250. doi: 10.1091/mbc.10.7.2235
- Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O’Toole, E., Winey, M., and Goldfarb, D. S. (2003). Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 14, 129–141. doi: 10.1091/mbc.e02-08-0483
- Rocha, N., Kuijl, C., Van Der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., et al. (2009). Cholesterol sensor ORPIL contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150^{Glued} and late endosome positioning. *J. Cell Biol.* 185, 1209–1225. doi: 10.1083/jcb.200811005
- Rodríguez De Turco, E. B., Tang, W., Topham, M. K., Sakane, F., Marcheselli, V. L., Chen, C., et al. (2001). Diacylglycerol kinase ϵ regulates seizure susceptibility and long-term potentiation through arachidonoylinositol lipid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 4740–4745. doi: 10.1073/pnas.081536298

- Romero-Brey, I., and Bartenschlager, R. (2014). Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. *Viruses* 6, 2826–2857. doi: 10.3390/v6072826
- Roulin, P. S., Lötzerich, M., Torta, F., Tanner, L. B., Van Kuppeveld, F. J. M., Wenk, M. R., et al. (2014). Rhinovirus uses a phosphatidylinositol 4-phosphate/cholesterol counter-current for the formation of replication compartments at the ER-Golgi interface. *Cell Host Microbe* 16, 677–690. doi: 10.1016/j.chom.2014.10.003
- Roy, A., and Levine, T. P. (2004). Multiple pools of phosphatidylinositol 4-phosphate detected using the pleckstrin homology domain of Osh2p. *J. Biol. Chem.* 279, 44683–44689. doi: 10.1074/jbc.M401583200
- Saari, J. C., Bredberg, D. L., and Noy, N. (1994). Control of substrate flow at a branch in the visual cycle. *Biochemistry* 33, 3106–3112. doi: 10.1021/bi00176a045
- Saari, J. C., and Crabb, J. W. (2005). Focus on molecules: cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP). *Exp. Eye Res.* 81, 245–246. doi: 10.1016/j.exer.2005.06.015
- Saari, J. C., Nawrot, M., Stenkamp, R. E., Teller, D. C., and Garwin, G. G. (2009). Release of 11-cis-retinal from cellular retinaldehyde-binding protein by acidic lipids. *Mol. Vis.* 15, 844–854.
- Sampaio, J. L., Gerl, M. J., Klose, C., Ejsing, C. S., Beug, H., Simons, K., et al. (2011). Membrane lipidome of an epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 1903–1907. doi: 10.1073/pnas.1019267108
- Santiago-tirado, F. H., Legesse-miller, A., Schott, D., and Bretscher, A. (2011). PI4P and Rab Inputs collaborate in myosin-V-dependent transport of secretory compartments in yeast. *Dev. Cell* 20, 47–59. doi: 10.1016/j.devcel.2010.11.006
- Sasaki, T., Takasuga, S., Sasaki, J., Kofuji, S., Eguchi, S., Yamazaki, M., et al. (2009). Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog. Lipid Res.* 48, 307–343. doi: 10.1016/j.plipres.2009.06.001
- Schaaf, G., Dynowski, M., Mousley, C. J., Shah, S. D., Yuan, P., Winklbauer, E. M., et al. (2011). Resurrection of a functional phosphatidylinositol transfer protein from a pseudo-Sec14 scaffold by directed evolution. *Mol. Biol. Cell* 22, 892–905. doi: 10.1091/mbc.e10-11-0903
- Schaaf, G., Ortlund, E. A., Tyeryar, K. R., Mousley, C. J., Ile, K. E., Garrett, T. A., et al. (2008). Functional Anatomy of phospholipid binding and regulation of phosphoinositide homeostasis by proteins of the Sec14 superfamily. *Mol. Cell* 29, 191–206. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.026
- Schnabl, M., Oskolkova, O. V., Holic, R., Brezna, B., Pichler, H., Zagorsek, M., et al. (2003). Subcellular localization of yeast Sec14 homologues and their involvement in regulation of phospholipid turnover. *Eur. J. Biochem.* 270, 3133–3145. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03688.x
- Schouten, A., Agianian, B., Westerman, J., Kroon, J., Wirtz, K. W. A., and Gros, P. (2002). Structure of apo-phosphatidylinositol transfer protein α provides insight into membrane association. *EMBO J.* 21, 2117–2121. doi: 10.1093/emboj/21.9.2117
- Schuike, I., Schnabl, M., Czabany, T., Hrstnik, C., and Daum, G. (2010). Phosphatidylethanolamine synthesized by four different pathways is supplied to the plasma membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 480–486. doi: 10.1016/j.bbali.2009.12.008
- Schulz, T. A., Choi, M. G., Raychaudhuri, S., Mears, J. A., Ghirlando, R., Hinshaw, J. E., et al. (2009). Lipid-regulated sterol transfer between closely apposed membranes by oxysterol-binding protein homologues. *J. Cell Biol.* 187, 889–903. doi: 10.1083/jcb.200905007
- Sha, B., Phillips, S. E., Bankaitis, V. A., and Luo, M. (1998). Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein. *Nature* 391, 506–510. doi: 10.1038/35179
- Shadan, S., Holic, R., Carvou, N., Ee, P., Li, M., Murray-Rust, J., et al. (2008). Dynamics of lipid transfer by phosphatidylinositol transfer proteins in cells. *Traffic* 9, 1743–1756. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00794.x
- Shemesh, T., Luini, A., Malhotra, V., Burger, K. N. J., and Kozlov, M. M. (2003). Prefission constriction of Golgi tubular carriers driven by local lipid metabolism: a theoretical model. *Biophys. J.* 85, 3813–3827. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74796-1
- Shibata, N., Arita, M., Misaki, Y., Dohmae, N., Takio, K., Ono, T., et al. (2001). Supernatant protein factor, which stimulates the conversion of squalene to lanosterol, is a cytosolic squalene transfer protein and enhances cholesterol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 2244–2249. doi: 10.1073/pnas.041620398
- Shin, J. J. H., Liu, P., Chan, L. J., Ullah, A., Pan, J., Borchers, C. H., et al. (2020). pH Biosensing by PI4P regulates cargo sorting at the TGN. *Dev. Cell* 52, 461–476.e4 doi: 10.1016/j.devcel.2019.12.010
- Smindak, R. J., Heckle, L. A., Chittari, S. S., Hand, M. A., Hyatt, D. M., Mantus, G. E., et al. (2017). Lipid-dependent regulation of exocytosis in *S. cerevisiae* by OSBP homolog (Osh) 4. *J. Cell Sci.* 130, 3891–3906. doi: 10.1242/jcs.205435
- Sobajima, T., Yoshimura, S., Maeda, T., Miyata, H., Miyoshi, E., and Harada, A. (2018). The Rab11-binding protein RELCH/KIAA1468 controls intracellular cholesterol distribution. *J. Cell Biol.* 217, 1777–1796. doi: 10.1083/jcb.201709123
- Sohn, M., Ivanova, P., Brown, H. A., Toth, D. J., Varnai, P., Kim, Y. J., et al. (2016). Lenz-Majewski mutations in PTDSS1 affect phosphatidylinositol 4-phosphate metabolism at ER-PM and ER-Golgi junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 4314–4319. doi: 10.1073/pnas.1525719113
- Sohn, M., Korzeniowski, M., Zewe, J. P., Wills, R. C., Hammond, G. R. V., Humpolickova, J., et al. (2018). PI(4,5)P2 controls plasma membrane PI4P and PS levels via ORP5/8 recruitment to ER-PM contact sites. *J. Cell Biol.* 217, 1797–1813. doi: 10.1083/jcb.201710095
- Sophie Mokas, J. R. M., Cristina Garreau, M.-J., Fournier, E., Robert, F., Arya, P., Kaufman, R. J., et al. (2009). Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol. Biol. Cell* 20, 2673–2683. doi: 10.1091/mbc.E08
- Sousa, S. B., Jenkins, D., Chanudet, E., Tasseva, G., Ishida, M., Anderson, G., et al. (2014). Gain-of-function mutations in the phosphatidylserine synthase 1 (PTDSS1) gene cause Lenz-Majewski syndrome. *Nat. Genet.* 46, 70–76. doi: 10.1038/ng.2829
- Stecher, H., Gelb, M. H., Saari, J. C., and Palczewski, K. (1999). Preferential release of 11-cis-retinol from retinal pigment epithelial cells in the presence of cellular retinaldehyde-binding protein. *J. Biol. Chem.* 274, 8577–8585. doi: 10.1074/jbc.274.13.8577
- Stefan, C. J., Manford, A. G., Baird, D., Yamada-Hanff, J., Mao, Y., and Emr, S. D. (2011). Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER-plasma membrane contact sites. *Cell* 144, 389–401. doi: 10.1016/j.cell.2010.12.034
- Stocker, A., Tomizaki, T., Schulze-Briese, C., and Baumann, U. (2002). Crystal structure of the human supernatant protein factor. *Structure* 10, 1533–1540. doi: 10.1016/s0969-2126(02)00884-5
- Stoica, R., De Vos, K. J., Paillusson, S., Mueller, S., Sancho, R. M., Lau, K. F., et al. (2014). ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat. Commun.* 5:3996. doi: 10.1038/ncomms4996
- Strahl, T., and Thorner, J. (2007). Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 353–404. doi: 10.1016/j.bbali.2007.01.015
- Strating, J. R. P. M., van der Linden, L., Albulescu, L., Bigay, J., Arita, M., Delang, L., et al. (2015). Itraconazole inhibits enterovirus replication by targeting the oxysterol-binding protein. *Cell Rep.* 10, 600–615. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.054
- Suchanek, M., Hynynen, R., Wohlfahrt, G., Lehto, M., Johansson, M., Saarinen, H., et al. (2007). The mammalian oxysterol-binding protein-related proteins (ORPs) bind 25-hydroxycholesterol in an evolutionarily conserved pocket. *Biochem. J.* 405, 473–480. doi: 10.1042/bj20070176
- Sugiki, T., Egawa, D., Kumagai, K., Kojima, C., Fujiwara, T., Takeuchi, K., et al. (2018). Phosphoinositide binding by the PH domain in ceramide transfer protein (CERT) is inhibited by hyperphosphorylation of an adjacent serine-repeat motif. *J. Biol. Chem.* 293, 11206–11217. doi: 10.1074/jbc.RA118.002465
- Sugiura, T., Takahashi, C., Chuma, Y., Fukuda, M., Yamada, M., Yoshida, U., et al. (2019). Biophysical parameters of the Sec14 phospholipid exchange cycle. *Biophys. J.* 116, 92–103. doi: 10.1016/j.bpj.2018.11.3131
- Sullivan, D. P., Ohvo-Rekilä, H., Baumann, N. A., Beh, C. T., and Menon, A. K. (2006). Sterol trafficking between the endoplasmic reticulum and plasma membrane in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 356–358. doi: 10.1042/BST0340356
- Szolderits, G., Hermetter, A., Paltauf, F., and Daum, G. (1989). Membrane properties modulate the activity of a phosphatidylinositol transfer protein from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 986, 301–309. doi: 10.1016/0005-2736(89)90481-1
- Tamura, Y., Kawano, S., and Endo, T. (2019). Organelle contact zones as sites for lipid transfer. *J. Biochem.* 165, 115–123. doi: 10.1093/jb/mvy088

- Tanaka, S., Nikawa, J., Imai, H., Yamashita, S., and Hosaka, K. (1996). Molecular cloning of rat phosphatidylinositol synthase cDNA by functional complementation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *pis* mutation. *FEBS Lett.* 393, 89–92. doi: 10.1016/0014-5793(96)00858-7
- Tani, M., and Kuge, O. (2014). Involvement of Sac1 phosphoinositide phosphatase in the metabolism of phosphatidylserine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 31, 145–158. doi: 10.1002/yea.3004
- Thomas, G. M. H., Cunningham, E., Fensome, A., Ball, A., Totty, N. F., Truong, O., et al. (1933). An essential role for phosphatidylinositol transfer protein in phospholipase C-mediated inositol lipid signaling. *Cell* 74, 919–928. doi: 10.1016/0092-8674(93)90471-2
- Tilley, S. J., Skippen, A., Murray-Rust, J., Swigart, P. M., Stewart, A., Morgan, C. P., et al. (2004). Structure-function analysis of phosphatidylinositol transfer protein alpha bound to human phosphatidylinositol. *Structure* 12, 317–326. doi: 10.1016/j.str.2004.01.013
- Tong, J., Yang, H., Yang, H., Eom, S. H., and Im, Y. J. (2013). Structure of Osh3 reveals a conserved mode of phosphoinositide binding in oxysterol-binding proteins. *Structure* 21, 1203–1213. doi: 10.1016/j.str.2013.05.007
- Tripathi, A., Martinez, E., Obaidullah, A. J., Lete, M. G., Lönnfors, M., Khan, D., et al. (2019). Functional diversification of the chemical landscapes of yeast Sec14-like phosphatidylinositol transfer protein lipid-binding cavities. *J. Biol. Chem.* 294, 19081–19098. doi: 10.1074/jbc.RA119.011153
- Umebayashi, K., and Nakano, A. (2003). Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell Biol.* 161, 1117–1131. doi: 10.1083/jcb.200303088
- Urbani, L., and Simoni, R. D. (1990). Cholesterol and vesicular stomatitis virus G protein take separate routes from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 265, 1919–1923.
- Van Paridon, P. A., Gadella, T. W. J., Somerharju, P. J., and Wirtz, K. W. A. (1987). On the relationship between the dual specificity of the bovine brain phosphatidylinositol transfer protein and membrane phosphatidylinositol levels. *Biochim. Biophys. Acta* 903, 68–77. doi: 10.1016/0005-2736(87)90156-8
- Vance, J. E. (2015). Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic* 16, 1–18. doi: 10.1111/tra.12230
- Vance, J. E., and Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog. Lipid Res.* 44, 207–234. doi: 10.1016/j.plipres.2005.05.001
- Vance, J. E., and Tasseva, G. (2013). Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 543–554. doi: 10.1016/j.bbalip.2012.08.016
- Venditti, R., Rega, L. R., Masone, M. C., Santoro, M., Polishchuk, E., Sarnataro, D., et al. (2019). Molecular determinants of ER–Golgi contacts identified through a new FRET–FLIM system. *J. Cell Biol.* 218, 1055–1065. doi: 10.1083/jcb.201812020
- Vihervaara, T., Uronen, R. L., Wohlfahrt, G., Björkhem, I., Ikonen, E., and Olkkonen, V. M. (2011). Sterol binding by OSBP-related protein 1L regulates late endosome motility and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 537–551. doi: 10.1007/s00018-010-0470-z
- Vihelic, T. S., Goebel, M., Milligan, S., O'Tousa, J. E., and Hyde, D. R. (1993). Localization of *Drosophila* retinal degeneration B, a membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein. *J. Cell Biol.* 122, 1013–1022. doi: 10.1083/jcb.122.5.1013
- Vordtriede, P. B., Doan, C. N., Tremblay, J. M., Helmkamp, G. M., and Yoder, M. D. (2005). Structure of PITPP β in complex with phosphatidylcholine: comparison of structure and lipid transfer to other PITP isoforms. *Biochemistry* 44, 14760–14771. doi: 10.1021/bi051191r
- Walch-Solimena, C., and Novick, P. (1999). The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase Pik1 regulates secretion at the Golgi. *Nat. Cell Biol.* 1, 523–525. doi: 10.1038/70319
- Wang, C., JeBailey, L., and Ridgway, N. D. (2002). Oxysterol-binding-protein (OSBP)-related protein 4 binds 25-hydroxycholesterol and interacts with vimentin intermediate filaments. *Biochem. J.* 361, 461–472. doi: 10.1042/bj3610461
- Wang, H., Ma, Q., Qi, Y., Dong, J., Du, X., Rae, J., et al. (2019). ORP2 delivers cholesterol to the plasma membrane in exchange for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P $_2$). *Mol. Cell* 73, 458–473.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2018.11.014
- Wang, H., Perry, J. W., Lauring, A. S., Neddermann, P., De Francesco, R., and Tai, A. W. (2014). Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology* 146, 1311–1373. doi: 10.1053/j.gastro.2014.02.002
- Wang, H., and Tai, A. W. (2019). Nir2 is an effector of VAPs necessary for efficient hepatitis C virus replication and phosphatidylinositol 4-phosphate enrichment at the viral replication organelle. *J. Virol.* 93, 1–16. doi: 10.1128/jvi.00742-19
- Wang, Y., Yuan, P., Grabon, A., Tripathi, A., Lee, D., Rodriguez, M., et al. (2020). Noncanonical regulation of phosphatidylserine metabolism by a Sec14-like protein and a lipid kinase. *J. Cell Biol.* 219:e201907128. doi: 10.1083/jcb.201907128
- Weber-Boyvart, M., Kentala, H., Lilja, J., Vihervaara, T., Hanninen, R., Zhou, Y., et al. (2015a). OSBP-related protein 3 (ORP3) coupling with VAMP-associated protein A regulates R-Ras activity. *Exp. Cell Res.* 331, 278–291. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.10.019
- Weber-Boyvart, M., Kentala, H., Peränen, J., and Olkkonen, V. M. (2015b). Ligand-dependent localization and function of ORP-VAP complexes at membrane contact sites. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 1967–1987. doi: 10.1007/s00018-014-1786-x
- Whitters, E. A., Cleves, A. E., McGee, T. P., Skinner, H. B., and Bankaitis, V. A. (1993). SAC1p is an integral membrane protein that influences the cellular requirement for phospholipid transfer protein function and inositol in yeast. *J. Cell Biol.* 122, 79–94. doi: 10.1083/jcb.122.1.79
- Winston, A., and Rando, R. R. (1998). Regulation of isomerohydrolase activity in the visual cycle. *Biochemistry* 37, 2044–2050. doi: 10.1021/bi971908d
- Wolf, W., Kilic, A., Schrul, B., Lorenz, H., Schwappach, B., and Seedorf, M. (2012). Yeast Ist2 recruits the endoplasmic reticulum to the plasma membrane and creates a ribosome-free membrane microcompartment. *PLoS One* 7:e39703. doi: 10.1371/journal.pone.0039703
- Wolf, W., Meese, K., and Seedorf, M. (2014). Ist2 in the yeast cortical endoplasmic reticulum promotes trafficking of the amino acid transporter Bap2 to the plasma membrane. *PLoS One* 9:e85418. doi: 10.1371/journal.pone.0085418
- Wong, L. H., Čopič, A., and Levine, T. P. (2017). Advances on the transfer of lipids by lipid transfer proteins. *Trends Biochem. Sci.* 42, 516–530. doi: 10.1016/j.tibs.2017.05.001
- Wyles, J. P., McMaster, C. R., and Ridgway, N. D. (2002). Vesicle-associated membrane protein-associated protein-A (VAP-A) interacts with the oxysterol-binding protein to modify export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 277, 29908–29918. doi: 10.1074/jbc.M201191200
- Wyles, J. P., Perry, R. J., and Ridgway, N. D. (2007). Characterization of the sterol-binding domain of oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 4 reveals a novel role in vimentin organization. *Exp. Cell Res.* 313, 1426–1437. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.01.018
- Wyles, J. P., and Ridgway, N. D. (2004). VAMP-associated protein-A regulates partitioning of oxysterol-binding protein-related protein-9 between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Exp. Cell Res.* 297, 533–547. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.03.052
- Xie, Y., Ding, Y. Q., Hong, Y., Feng, Z., Navarre, S., Xi, C. X., et al. (2005). Phosphatidylinositol transfer protein- α in netrin-1-induced PLC signalling and neurite outgrowth. *Nat. Cell Biol.* 7, 1124–1132. doi: 10.1038/ncb1321
- Xie, Z., Hur, S. K., Zhao, L., Abrams, C. S., and Bankaitis, V. A. (2018). A Golgi lipid signaling pathway controls apical Golgi distribution and cell polarity during neurogenesis. *Dev. Cell* 44, 725–740. doi: 10.1016/j.devcel.2018.02.025
- Yadav, S., Garner, K., Georgiev, P., Li, M., Gomez-Espinosa, E., Panda, A., et al. (2015). RDGB α , a PtdIns-PtdOH transfer protein, regulates G-protein coupled PtdIns(4,5)P $_2$ signalling during *Drosophila* phototransduction. *J. Cell Sci.* 128, 3330–3344. doi: 10.1242/jcs.173476
- Yan, D., Mayranpa, M. I., Wong, J., Perttilä, J., Lehto, M., Jauhainen, M., et al. (2008). OSBP-related protein 8 (ORP8) suppresses ABCA1 expression and cholesterol efflux from macrophages. *J. Biol. Chem.* 283, 332–340. doi: 10.1074/jbc.M705313200
- Yang, H., Tong, J., Leonard, T. A., and Im, Y. J. (2013). Structural determinants for phosphatidylinositol recognition by Sfh3 and substrate-induced dimer-monomer transition during lipid transfer cycles. *FEBS Lett.* 587, 1610–1616. doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.009
- Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silviu, J., Kapus, A., and Grinstein, S. (2008). Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* 319, 210–213. doi: 10.1126/science.1152066

- Zewe, J. P., Miller, A. M., Sangappa, S., Wills, R. C., Goulden, B. D., and Hammond, G. R. V. (2020). Probing the subcellular distribution of phosphatidylinositol reveals a surprising lack at the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 219:e201906127. doi: 10.1083/jcb.201906127
- Zhao, K., Foster, J., and Ridgway, N. D. (2020). Oxysterol binding protein-related protein 1 (ORP1) variants have opposing cholesterol transport activities from the endolysosomes. *Mol. Biol. Cell* 31, 793–802. doi: 10.1091/mbc.E19-12-0697
- Zhao, K., and Ridgway, N. D. (2017). Oxysterol-binding protein-related protein 1L regulates cholesterol egress from the endo-lysosomal system. *Cell Rep.* 19, 1807–1818. doi: 10.1016/j.celrep.2017.05.028
- Zhong, W., Pan, G., Wang, L., Li, S., Ou, J., Xu, M., et al. (2016a). ORP4L facilitates macrophage survival via G-protein-coupled signaling: ORP4L^{-/-} mice display a reduction of atherosclerosis. *Circ. Res.* 119, 1296–1312. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309603
- Zhong, W., Xu, M., Li, C., Zhu, B., Cao, X., Li, D., et al. (2019). ORP4L extracts and presents PIP₂ from plasma membrane for PLCβ3 catalysis: targeting it eradicates leukemia stem cells. *Cell Rep.* 26, 2166–2177.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.082
- Zhong, W., Yi, Q., Xu, B., Li, S., Wang, T., Liu, F., et al. (2016b). ORP4L is essential for T-cell acute lymphoblastic leukemia cell survival. *Nat. Commun.* 7:12702. doi: 10.1038/ncomms12702

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Lipp, Ikhlef, Milanini and Drin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.