



**HAL**  
open science

# VAP-A, un gymnaste moléculaire engagé dans les sites de contact membranaire

Mélody Subra

► **To cite this version:**

Mélody Subra. VAP-A, un gymnaste moléculaire engagé dans les sites de contact membranaire. Biologie cellulaire. Université Côte d'Azur, 2023. Français. NNT : 2023COAZ6013 . tel-04193876

**HAL Id: tel-04193876**

**<https://theses.hal.science/tel-04193876v1>**

Submitted on 1 Sep 2023

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

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

# THÈSE DE DOCTORAT

## VAP-A : un gymnaste moléculaire engagé dans les sites de contact membranaire

**Mélody SUBRA**

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, UMR 7275

**Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en** Sciences de la vie et de la santé  
mention : Interactions moléculaires et cellulaires  
d'Université Côte d'Azur

**Dirigée par** : Bruno MESMIN / Bruno ANTONNY

**Soutenue le** : 26 Mai 2023

**Devant le jury, composé de :**

**Guillaume DRIN**, Directeur de Recherche,  
Université Côte d'Azur, IPMC CNRS

**Wanda KUKULSKI**, Professeur, IBMM, Bern

**Juliette JOUHET**, Chargée de Recherche,  
HDR, LPCV CNRS

**Sonia LONGHI**, Directeur de Recherche,  
AFMB CNRS

**Daniel LEVY**, Directeur de Recherche, Institut  
Curie CNRS

**Bruno ANTONNY**, Directeur de Recherche,  
IPMC CNRS

**Bruno MESMIN**, Chargé de Recherche,  
HDR, IPMC CNRS

# VAP-A : un gymnaste moléculaire engagé dans les sites de contact membranaire

## **Jury :**

### **Président du jury :**

Guillaume DRIN, Directeur de Recherche UCA, CNRS, IPMC (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire) UMR 7275, Valbonne

### **Rapportrices :**

Wanda KUKULSKI, Professeur à l'IBMM (Institut de Biochimie et de Médecine Moléculaire), université de Bern, Suisse

Juliette JOUHET, Chargée de Recherche CNRS, HDR, LPCV (Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale) UMR 5168, Grenoble

### **Examinatrice :**

Sonia LONGHI, Directrice de Recherche CNRS, AFMB (Architecture et fonction des Macromolécules Biologiques) UMR 7257, Marseille

### **Invité et collaborateur :**

Daniel LEVY, Directeur de Recherche CNRS, Institut Curie UMR 168, Paris

### **Directeurs de Thèse :**

Bruno ANTONNY, Directeur de Recherche CNRS, IPMC, UMR 7275, Valbonne

Bruno MESMIN, Chargé de Recherche Inserm, HDR, IPMC, UMR 7275, Valbonne

# VAP-A s'adapte à tous les sites de contact membranaires grâce à ses régions intrinsèquement désordonnées

---

## Résumé

VAP-A est un récepteur ancré à la surface du réticulum endoplasmique (RE) pour des centaines de protéines contenant un motif FFAT. Ses partenaires possèdent des structures et des fonctions très variées. VAP-A participe à la formation des sites de contact membranaire (MCSs) entre le RE et les autres organelles et ceci permet notamment le trafic non vésiculaire des lipides entre les membranes. Par exemple, la protéine de transfert de lipide OSBP interagit avec VAP aux MCSs RE/Golgi afin de transporter le cholestérol contre son gradient de concentration par contre-échange et hydrolyse de phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P). L'interaction entre le domaine Major-Sperm-Protein (MSP) de VAP-A et le motif FFAT de ses partenaires était déjà caractérisé. Cependant, la façon dont ce récepteur universel peut s'adapter à toutes ses cibles dans tous les MCSs, qui sont très différents en terme de géométrie et de stabilité était inconnue.

Dans cette étude nous avons utilisé une approche pluridisciplinaire afin de démontrer que VAP-A contient deux régions intrinsèquement désordonnées (IDRs) qui fournissent à la protéine une flexibilité indispensable à son organisation fonctionnelle dans les MCSs. Nous avons montré qu'un mutant de VAP-A sans ses linkers flexibles possède une localisation subcellulaire restreinte aux MCSs RE/mitochondrie. Ce mutant ne peut donc pas soutenir l'activité d'OSBP et CERT aux MCSs RE/Golgi. En revanche, il interagit avec VPS13A et PTPIP51 à la mitochondrie et permet ainsi le transport de lipides qui contribuent au métabolisme des cardiolipines et à la fusion mitochondriale.

Ces résultats indiquent que la flexibilité de VAP-A fournie par ses IDRs, joue un rôle clé pour assurer son adaptabilité à différents contextes et plus précisément aux MCSs à durée de vie courte comme les MCSs RE/Golgi, cette étude démontre également l'implication de VAP-A dans la fusion mitochondriale.

---

**Mots clés :** Site de Contact Membranaire, VAP, Protéine de Transfert de Lipide, Réticulum Endoplasmique, Fusion mitochondriale, Région Intrinsèquement désordonnée

# VAP-A intrinsically disordered regions enable versatile tethering at membrane contact sites

---

## Abstract

VAP-A is a receptor at the surface of the endoplasmic reticulum (ER) for hundreds of proteins containing a FFAT motif and having a wide range of structures and functions. VAP-A is also required for creating multiple membrane contact sites (MCSs) between the ER and other compartments, which notably enable non-vesicular lipid exchanges between membranes. For example, the lipid-transfer protein (LTP) OSBP interacts with VAP at ER/Golgi MCS to transport cholesterol through coupled counter-exchange and hydrolysis of PI4P. It is well known that VAP-A partners contain a FFAT motif specifically recognized by the Major-Sperm-Protein (MSP) domain of VAP, however, how this receptor adapts to its different targets in MCSs that are so different in geometry and lifetime is not understood.

In this study, we used a multidisciplinary approach to demonstrate that VAP-A contains two intrinsically disordered linkers that provide it with a high degree of flexibility to enable functional organization of different MCSs. A VAP-A mutant without flexible linkers is restricted in its subcellular localization, and does not support lipid transport by OSBP and CERT at ER/Golgi MCS. However, this mutant is present at ER/mitochondria MCS by interacting with VPS13A and PTPIP51, and thus facilitates lipid transport contributing to cardiolipin metabolism and mitochondrial fusion.

In conclusion, this work indicates that VAP-A conformational flexibility mediated by its intrinsically disordered regions is key to ensure membrane tethering especially at short-lived MCSs; it also demonstrates the implication of VAP-A in mitochondrial fusion.

---

**Keywords :** Membrane Contact Site, VAP, Lipid Transfer Protein, Endoplasmic Reticulum, Mitochondrial fusion, Intrinsically Disordered Region

À mes chers parents,

## Remerciements

Je voudrais dans un premier temps remercier chaleureusement mes rapporteurs et examinateurs ainsi que le président du jury pour avoir accepté de juger mon travail. C'était un honneur pour mes collègues et moi de vous recevoir au sein de l'institut pour ce jour spécial.

Mes pensées vont naturellement à **Bruno Mesmin**, mon mentor, car il m'a enseigné tout ce que je sais. Oui tout ! Même le fait qu'ajouter de la poudre d'amande dans la pâte sablée de la tarte au citron la rend absolument à tomber par terre... Avant de connaître Bruno Mesmin je n'avais pas compris qu'elle était ma mission sur Terre. Alors merci Bruno d'avoir cru en moi et de m'avoir transmis ton enthousiasme pour ce beau métier. D'humeur égale et optimiste pendant toutes ces années, chaque lundi était l'opportunité de réaliser de grandes choses et d'avoir des idées nouvelles. Et même si ça partait dans tous les sens, tu as toujours considéré avec attention chacune de mes propositions. Travailler à tes côtés m'a permis de gagner (un peu) confiance en moi. Merci pour ta bienveillance, en m'incitant à faire une thèse tu m'as guidée vers la meilleure décision que je n'ai jamais prise. Chaque jour tu m'as appris énormément, et tu m'as prouvé qu'on pouvait réaliser TOUS ses rêves en même temps : avoir une famille, être un grand sportif et un grand scientifique. Nul doute que tout est possible à mes yeux à présent, je ferai tout ce que je peux pour suivre ton exemple. Tu m'as fait part de tes expériences personnelles et a su me conseiller pour mon avenir. Je te prie de m'excuser si j'ai parfois été dure en affaire (j'ai conscience de mon caractère) et aussi pour t'avoir mis sur le dos une armée de Phasmes à gérer en plus de la jolie FEMMEille que tu as déjà ☺. Merci pour tous les fous-rires que nous avons partagés, et oui, en 310 la science avance, mais dans la bonne humeur ! Merci d'avoir toujours valorisé mon travail et mes efforts, de m'avoir encouragée et aidée dans les moments plus difficiles. Je suis honorée d'avoir été ta première étudiante en thèse.

Je pense qu'au cours d'une vie, on rencontre peu de personnes comme **Bruno Antony**. Je pourrais comparer l'image de Bruno dans mon esprit à celle du Dalai-Lama, de maître Yoda ou encore du professeur Dumbledore tant il incarne le savoir et la justesse à mes yeux. Comment te remercier Bruno de m'avoir accueillie au sein de ton laboratoire. Il y a 6 ans, je suis entrée dans cet endroit magique pour mon premier stage, avec la conviction d'être exactement au bon endroit. J'ai été émerveillée par tout ce qui s'y trouvait. Je te remercie pour toutes les discussions et les idées, que tu m'as parfois données, parfois tirées du nez et qui m'ont été d'une grande aide. Je garderai toujours cet enseignement comme exemple. Je quitte ton laboratoire en sachant que je ne trouverai meilleur entourage, mais avec un bagage débordant de motivation et de passion pour ce métier que tu transmets à toute l'équipe. Je réalise la chance que j'ai eu d'avoir cette deuxième famille, cette deuxième maison. Merci de m'avoir permis de faire une thèse dans cet environnement incroyable et merci pour ta pédagogie, patiente, juste et efficace.

Ensuite, j'aimerais te remercier Mendy de m'avoir autant appris, sur le plan scientifique mais aussi personnel. **Amanda Patel**, sa sensibilité, sa rigueur scientifique et sa cuisine... ! Nous avons fait connaissance dans le contexte particulier du confinement où nous étions toutes seules dans l'institut « cloning, cloning, cloning, sequencing, and cloning again and again ... » ! Merci de m'avoir permis d'être ton élève pendant cette période, j'en garde un souvenir fabuleux, malgré le contexte, tu as su rendre ce moment agréable, et c'est là que la magie Amanda opère. Merci de t'être impliquée dans mon projet, tu m'as beaucoup aidée. Merci pour les Bbq et les soirées dansantes, les hachis Parmentier et autres dîners qu'on a partagés et bien sur le Prosecco... « great minds drink alike » ! Merci pour tous ces moments festifs qui resteront dans ma mémoire, en espérant qu'on dansera à nouveau la Javanaise ensemble.

**Joelle Bigay**, devrais-je dire, notre mère à tous, merci d'avoir toujours été présente pour m'aider à faire face à mes doutes et mes questionnements, m'enseigner ta technique et m'épauler dans mes débuts notamment pour les expériences de biochimie. Entendre ton rire (ou cris sur Antoine) raisonner à l'autre bout du couloir me manque déjà. Ta passion pour ce métier rayonne autour de toi, merci pour cette lumière que tu apportes quotidiennement au laboratoire (dès l'aube, jusqu'au coucher du soleil en général...).

**Antoine, Akim, Rita, David, Maud, Romain et autres équipiers BA**, vous avez été des collègues incroyables, généreux de bienveillance et de fous-rires, toujours prêts à festoyer, mais aussi à travailler, et

à s'entre aider. J'aurais tellement à décrire sur les nombreuses qualités de chacun d'entre vous... Je vous remercie simplement pour tous vos sourires. Akim et Zoé je vous souhaite de *tout déchirer* en thèse (même si je n'ai aucun doute là-dessus).

**Daniel, Manuella et Aurélie** merci de m'avoir accueillie dans votre institut historique, j'en garde un souvenir exceptionnel, j'ai adoré découvrir votre univers de cryo-microscopistes et voir les protéines en VRAI de VRAI ! Daniel, je te remercie plus particulièrement pour l'attention que tu as porté à mon projet, les conseils, les discussions et réflexions que nous avons partagées (et les chouquettes bien entendu).

Je tiens aussi à remercier **Lucile, Delphine, Nathalie, Gauthier et Yohan** pour leur gentillesse quotidienne qui rend la vie à l'IPMC si douce.

Un mot pour ma merveilleuse **famille** sans qui ça n'aurait pas été possible. Papa et Maman, merci pour votre aide, merci de m'avoir suivie dans toutes mes aventures, à droite à gauche, en France et ailleurs (et ce n'est pas fini !). Vous avez été d'un soutien sans faille pendant ces 9 années et même bien avant. Maman, merci pour ta patience, merci de m'avoir transmis ta fascination pour les sciences et Papa, même si « tu as décroché » depuis un moment je sais ta fierté et ton soutien. Martin et Maryl, mes amours, vous êtes dans mon esprit chaque minute et vous me manquerez tellement. Merci à vous quatre, pour les fous rires, les fêtes, les voyages, les vacances, les moments ensemble qui nous font sentir si bien. Je n'oublierai jamais votre soutien, merci d'avoir fait tant de route pour me retrouver, vous êtes tous les 4 mon trésor à moi, j'espère pouvoir vous rendre tout ce que vous me donnez.

Mamie Suzette, Papi Guy et Mamie Monique je vous embrasse et vous remercie pour votre soutien. Papi, merci pour les discussions et les soirées pizza/champagne !

Tata Sylvie, Karine, tonton Hervé, Amélie, Baptiste, merci de m'avoir soutenue et accueillie comme votre fille/sœur quand j'en avais le plus besoin. Vous avez été exceptionnels.

Petite mention spéciale pour mes très chers **amis**. Cannelle, tu es comme une sœur pour moi, je vous remercie, toi, Tantie, Lilou et Timéo, de m'apporter autant d'amour. Carla, Cam's et Nana, mes perles, je lève mon verre à nos soirées, nos clackage de babouche qui m'ont permis de décompresser chaque fin de semaine. Carla je te remercie, notre rencontre a changé ma vie... ta délicatesse légendaire m'a permis de percuter le bonheur... Cam's je suis fière de toi, fière de ta force. Je remercie aussi mon Mathiew, pour tous les bons moments ensemble pendant ces 3 dernières années. Elisa pour nos petites pauses café et nos sorties. Et Ma So', mon citron, mon Bacalàù, ta bonne humeur et tes conseils, nos week-ends, nos voyages, tu m'as tant apporté. J'espère que vous me rendrez visite où que je sois.

Merci **Lucas**, mon amour, mon héros, tu es le seul qui puisse maîtriser tous mes vertiges. J'utiliserai le langage des yeux pour te dire que je t'aime, à l'infini.

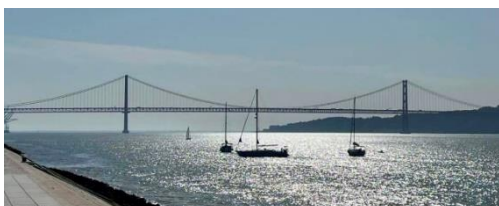


## Avant-Propos

Un des moyens adoptés par les organelles pour communiquer est le site de contact membranaire. L'objectif est de se rapprocher pour mieux échanger. Les membranes des organelles se rapprochent alors sans jamais fusionner à une distance allant de 15 à 45 nm. C'est dans cet espace confiné que des centaines de protéines travaillent à la communication intracellulaire. Ces protéines participent au transfert de petites molécules (lipides, calcium) mais aussi pour la formation et le maintien du contact. La durée de ce lien est variable, parfois moins d'une minute, parfois des heures selon les organelles engagées. Les sites de contact membranaire sont donc hétérogènes en termes de taille, de composition et de dynamique et ceci représente un défi physique pour les effecteurs qui s'y trouvent.

Dans ce manuscrit je décrirai les fonctions principales des sites de contact membranaire, leur rôle dans la biologie de la cellule, ainsi que l'importance de leur intégrité dans le contexte physiopathologique. L'analyse de deux sites de contact dont la nature et la dynamique sont extrêmement différentes sera détaillée. La seconde partie sera consacrée à l'étude des régions protéiques non structurées au sein de ces sites de contact. Cette partie me permettra d'aborder la problématique qui a fait l'objet de ma thèse : Comment une protéine s'adapte à des contextes membranaires si différents, pour être un récepteur universel compatible avec la fonction et les acteurs moléculaires de chaque site de contact ?

Comment relier deux entités fixes ? Par exemple, comment relier deux continents séparés par la mer ? En créant un pont. Mais comment relier deux entités si au moins l'une d'entre elles est mouvante ? Il faut une corde. A travers ce manuscrit, je propose de démontrer que ces problématiques existent aussi à l'échelle nanoscopique et que la nature a tout prévu pour y répondre.



Lisbonne - Pont du 25 Avril 30.04.22



Spetsès - Embarcadère 04.06.22

## Table des matières

### Partie A : Introduction - Les sites de contact membranaire (MCSs) . 14

1.	<u>Découverte et premières observations.....</u>	14
	(a) Qu'est-ce qu'une membrane ? .....	14
	(b) Qu'est-ce qu'un site de contact membranaire (MCS) ? .....	18
2.	<u>Rôles associés aux MCSs.....</u>	23
	(a) <b>Le transfert de lipides - Exemple des MCSs RE/TGN.....</b>	<b>23</b>
	i Etude des ORPs, exemple d'OSBP.....	26
1)	Organisation des domaines.....	26
2)	Relier l'architecture à la fonction – 2013.....	30
3)	Dynamique d'OSBP dans les MCSs.....	32
4)	Inhibiteurs pharmacologiques d'OSBP .....	34
5)	Autres MCSs où OSBP est active.....	37
6)	Détournement d'OSBP lors d'infections par des pathogènes .....	39
7)	Autres ORPs enrichies aux MCSs RE/TGN .....	44
	ii Etude des STARTs, exemple de CERT .....	47
1)	Organisation et fonctionnement.....	49
2)	Dépendance à OSBP .....	52
3)	Régulation par phosphorylation.....	54
	(b) <b>La dynamique et la morphologie des organelles.....</b>	<b>56</b>
	i Exemple des contacts RE/Mitochondrie .....	59
1)	La fission/ la division mitochondriale.....	62
2)	La fusion mitochondriale .....	67
3)	Les LTPs aux MCSs RE/mitochondrie .....	71
4)	Comment reconnaître différents phénotypes mitochondriaux ? .....	84
	ii Exemple des contacts RE/Peroxisome .....	87
3.	<u>Comparaison de deux sites de contact : RE/Golgi et RE/Mitochondrie .....</u>	<u>88</u>
4.	<u>Architecture fonctionnelle du récepteur commun VAP.....</u>	<u>90</u>
	(a) <b>Famille des VAPs.....</b>	<b>90</b>
	i Structure 3D de VAP .....	90
	ii Evolution moléculaire des VAPs.....	94

iii	Les homologues MOSPD.....	95
	<b>(b) Reconnaissance des motifs FFAT .....</b>	<b>96</b>
i	Différents motifs FFAT .....	98
ii	Comment étudier la liaison de VAP avec un partenaire FFAT ?.....	100
	<b>(a) Localisation subcellulaire et état oligomérique.....</b>	<b>103</b>
i	Localisation subcellulaire des VAPs.....	103
ii	Diffusion latérale.....	105
iii	Etat oligomérique .....	106
iv	Stœchiométrie du complexe OSBP/VAP .....	108
	<b>(b) Polyvalence et importance de VAP.....</b>	<b>109</b>
i	Le « VAPome ».....	109
ii	Anomalies impliquant VAP .....	110
1)	Défauts recensés en absence de VAP .....	110
2)	Implication de VAP dans des pathologies neurodégénératives.....	111
3)	Implication de VAP dans des maladies infectieuses.....	113

5.	<u>Conclusion</u> .....	113
<b>Partie B : Introduction - Les régions non structurées</b> .....		<b>115</b>
1.	<u>Prédiction de désordre, composition et taille</u> .....	115
2.	<u>Rôles potentiels et exemples</u> .....	118
	(a) <b>Région N-terminale d'OSBP, la barrière entropique</b> .....	119
	(b) <b>Kv2.1, un canal doublement régulé par ses IDRs</b> .....	122
	(c) <b>Le linker d'Ist2 : relier deux compartiments</b> .....	125
	(d) <b>Le linker restrictif de Sac1</b> .....	128
	(e) <b>L'IDR de FUS favorise une phase liquide-liquide</b> .....	130
	(f) <b>L'hélice ALPS de GMAP210 se structure au contact d'une membrane</b> .....	132
3.	<u>IDRs de VAP-A</u> .....	135
4.	<u>Hypothèse de travail</u> .....	137
<b>Partie C Matériels et méthodes</b> .....		<b>139</b>
1.	<u>Crispr/Cas9 Knock-Out (tutoriel)</u> :.....	139
2.	<u>Manipulation biochimique d'une protéine transmembranaire comme VAP-A</u> :	149
	(a) <b>Comment reconstituer une protéine transmembranaire ?</b> .....	149
	(b) <b>Comment vérifier la qualité de la reconstitution ?</b> .....	151
	(c) <b>Comment générer des MCSs <i>in vitro</i> ?</b> .....	152
3.	<u>Purification des mitochondries</u> .....	153
4.	<u>Microscopie de super résolution STED (Stimulated Emission Depletion)</u> .....	156
5.	<u>Quantification systématique de la forme des mitochondries</u> .....	160
<b>Partie D : Résultats</b> .....		<b>164</b>
1.	<u>Quelles sont les propriétés des IDRs de VAP-A, <i>in vitro</i> et <i>in silico</i> ?</u> .....	164
	(a) <b>Méthodes d'identification des régions non structurées de VAP-A</b> .....	164
	(b) <b>Les linkers de VAP-A ne sont pas impliqués dans la liaison au FFAT</b> .....	166
2.	<u>Quel est le rôle des linkers de VAP-A <i>in cellula</i> ?</u> .....	168

3.	<u>La flexibilité de VAP-A est-elle requise aux MCSs RE/TGN ?</u> .....	170
	(a) Analyse de l'activité du partenaire OSBP .....	170
	(b) Analyse de l'activité du partenaire CERT .....	174
4.	<u>Quel est le rôle de VAP-A aux MCSs RE/mitochondrie ?</u> .....	175
5.	<u>La flexibilité de VAP-A est-elle requise aux MCSs RE/mitochondrie ?</u> .....	178
	(a) Comment VAP-A est-elle impliquée dans la fusion mitochondriale ?.....	179
	(b) VAP-A sL1/2 interagit avec VPS13A et PTPIP51 .....	181
	(c) Les linkers de VAP-A ne conditionnent pas une préférence de partenaire. ....	181
6.	<u>La flexibilité de VAP-A lui permet de s'adapter à différents MCSs</u> .....	184
7.	<u>Pourquoi VAP-A sL1/2 est-elle inadaptée aux MCSs RE/TGN ?</u> .....	188
	(a) Stabilisation des MCSs RE/TGN .....	188
	(b) Modèle .....	189
	(c) Contribution des auteurs :.....	191
<b>Partie E Discussion et conclusion</b> .....		<b>194</b>
1.	<u>Discussion</u> .....	194
	(a) Rôles des IDRs dans les MCSs .....	194
	(b) Différences et ressemblances entre VAP-A et VAP-B.....	197
	(c) Espèces de CL affectées par le KO de VAP-A.....	201
	(d) Rôles inexplorés de VAP-A .....	202
	(e) Distances intermembranaires et fluctuations .....	202
	(f) Questions en suspens sur le transfert de lipides dans les MCSs .....	205
2.	<u>Conclusion</u> .....	207
<b>Partie F Références</b> .....		<b>210</b>
<b>Partie G : Annexes (articles)</b> .....		<b>233</b>

## Table des abréviations

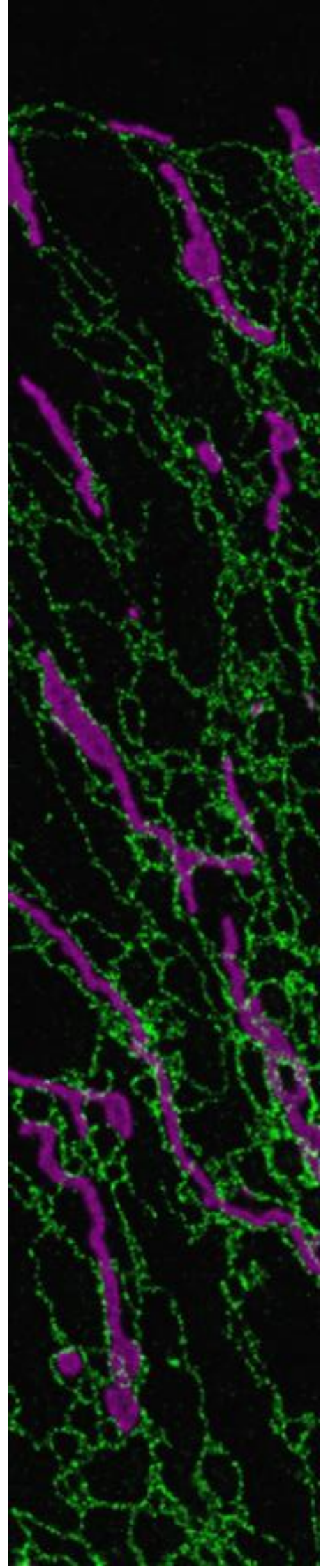
25-OH	25- hydroxy cholestérol
ACBD5	Acyl-coenzyme A-binding domain protein 5
ACC	Artificial coiled-coil
ALPS	Aliphatic lipid packing sensor
ARN	Acide ribonucléique
ATG	Autophagy related protein
ATP	Adénosine triphosphate
BAR	Bin-Amphiphysin-Rvs
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CC	Coiled-coil
CD	Circular dichroism
CERT	Ceramid transfer protein
CL	Cardiolipine
CLEM	Correlative light and electron microscopy
CRAL/Trio	Cellular retinaldehyde-binding protein and triple functional domain protein
Cryo EM	Cryo electron microscopy
Cryo-ET	Cryo electron tomography
CTL	Cholestatrienol
DAG	Diacylglycérol
DHE	Dehydroergostérol
DLS	Dynamic light scattering
DOGS-NTA-Ni	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[[N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl] (nickel salt)
DR	Dimerisation region
Drp1	Dynamine related protein
ERMES	Endoplasmic reticulum-mitochondrial encounter structure
E-SYT2	Extended synaptotagmin
FAPP	<i>Four-phosphate adaptor protein</i>
FFAT	Two phenylalanines in an acid tract
FFNT	Two phenylalanines in a neutral tract
FLIM	Fluorescence lifetime imaging microscopy
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FUS	FUsed in Sarcoma
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosine triphosphate
GUV	Giant unilamellar vesicle
HCV	Virus de l'hépatite C
IDP	Intrinsically disordered protein
IDR	Intrinsically disordered region
IFITM3	Interferon-induced transmembrane protein 3
IMM	Inner mitochondria membrane
KO	Knock out
Kv	Canaux potassiques membranaires voltage-dépendants
LAM	LTPs ancrées aux MCSs

LD	Lipid droplet
LTP	Lipid transfer protein
MAM	Mitochondria-associated membranes
MCS	Membrane contact site
Mff	Mitochondrial fission factor
Mfn	Mitofusine
MICOS	Mitochondrial inner membrane complex
MIGA	Mitoguardine
MitoPLD	Mitochondrial phospholipase D
MOSPD	Motile sperm domain containing protein
MP	Membrane plasmique
MSP	Major sperm protein
MVB	Multi vesicular body
NBD	nitrobenzoxadiazole
NPC1	Niemann-Pick type C-1
NSP	Non structural protein
OMM	Outer mitochondria membrane
OPA1	Optic atrophy 1
ORD	OSBP-related domain
ORP	OSBP-Related protein
OSBP	Oxysterol binding protein
Osh	OSBP Homologs
PA	Phosphatidic acid
PC	Phosphatidylcoline
PE	Phosphatidylethanolamine
PEG	Polyéthylène glycol
pFFAT	phospho-FFAT
PG	Phosphatidylglycérol
PH	Pleckstrin Homology
PI	Phosphatidylinositol
PI4P	Phosphatidylinositol 4 phosphate
PIP	Phosphatidylinositol phosphate
PITP	Phosphatidylinositol transfer protein
PKD	Protein kinase D
PO	Peroxisome
PONDR	Predictor of natural disordered regions
POPC	1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
PRELID	PRELI domain-containing protein 1
PS	Phosphatydilsérine
PTPIP51	protein tyrosine phosphatase-interacting protein 51
RBD	RNA binding domain
RE	Réticulum endoplasmique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPE1	hTERT-immortalized retinal pigment epithelial <b>cells</b>
Rtn	Reticulon
RUSH	Retention Using Selective Hooks

SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SM	Sphingomyéline
SMP	Synaptotagmin-like mitochondrial lipid binding protein
SMS	Sphingomyéline synthase
SNX	Sorting nexins
SPLICS	Split-GFP-based contact site sensor
sptPALM	Single particle tracking-photoactivation localization microscopy
SRM	Serine repeat motif
STARD3	Star related lipid transfer domain containing 3
START	StAR (steroidogenic acute response) related lipid transfer
STED	Stimulated Emission Depletion
SWG	Schweinfurthine G
Tcb	Tricalbin
TEM	Transmission electron microscopy
TEX2	Testis-expressed protein 2
TGN	Trans Golgi network
TMD	Transmembrane domain
Tom20	Translocase of outer membrane 20
TPR	Tetratricopeptide repeat
TULIP	Tubular lipid binding protein
VAB	Vps13 adaptor binding
VAMP	vesicles associated membranes proteins
VAP	Vamp-associated protein
VAP-A SL1/2	VAP-A short linker 1 et 2
VPS	Vacuolar sorting protein
WT	Wild type



# Introduction

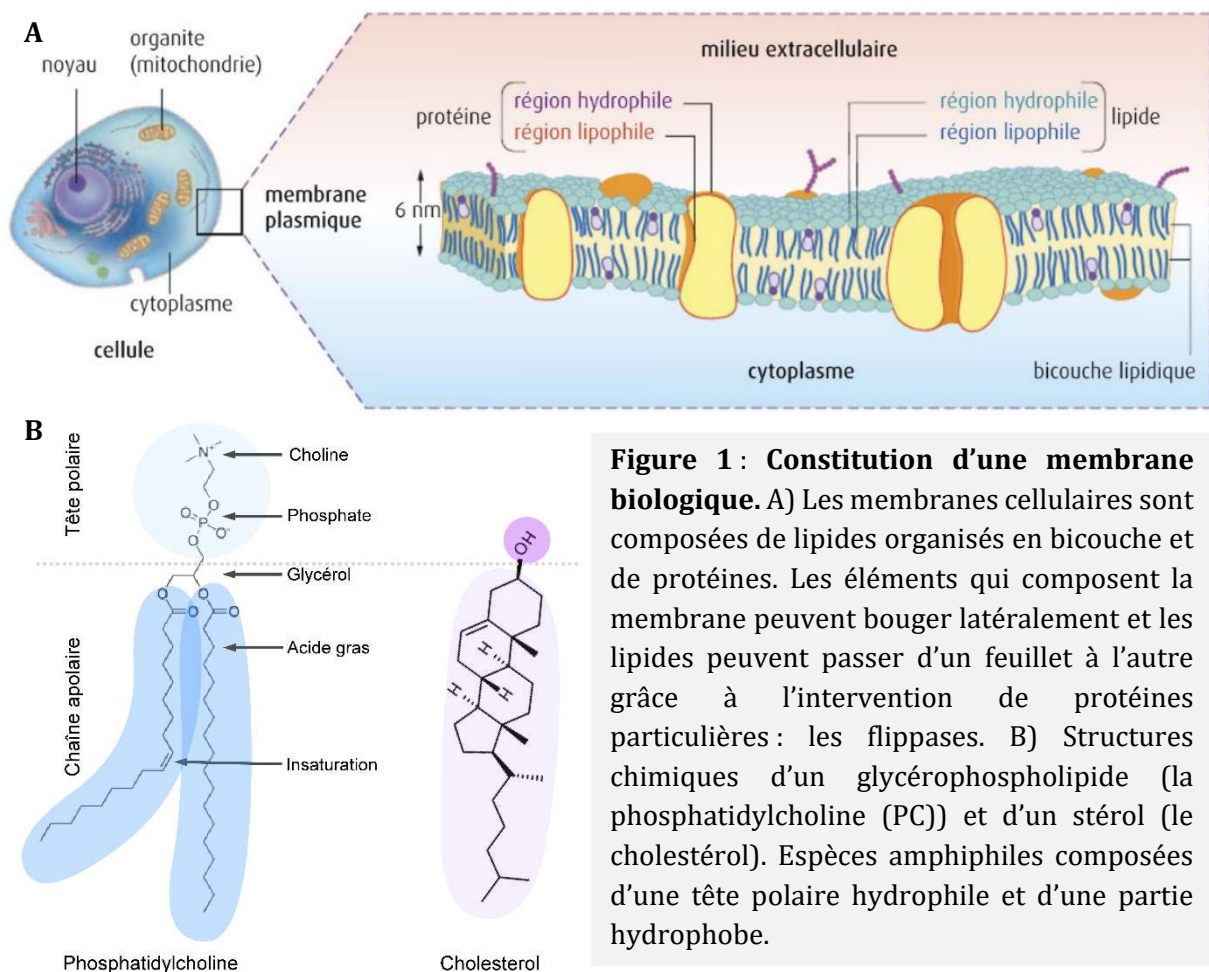


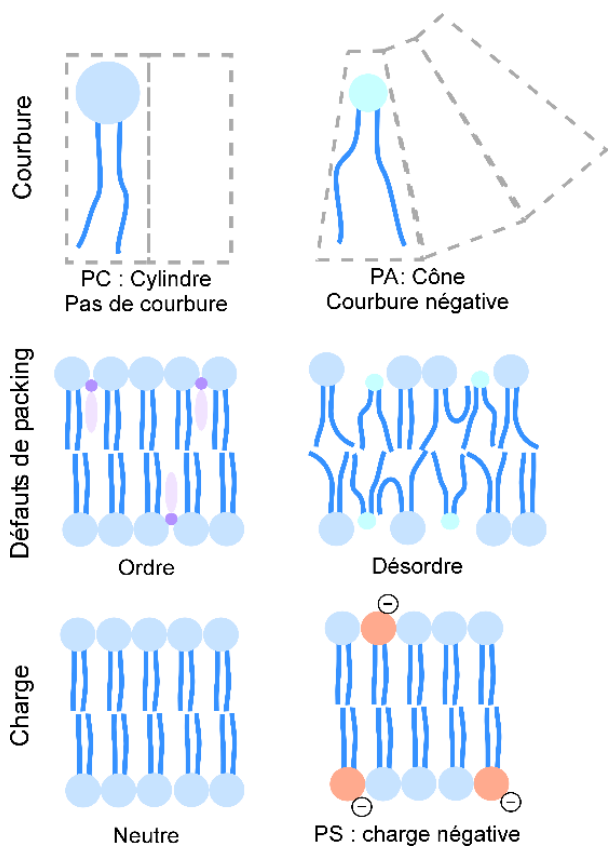
## Partie A : Introduction - Les sites de contact membranaire (MCSs)

### 1. Découverte et premières observations

#### (a) Qu'est-ce qu'une membrane ?

Les membranes sont composées de lipides et de protéines. Les lipides sont répartis en trois grandes classes : les phosphoglycérides ou phospholipides, les stérols et les sphingolipides. Les phospholipides sont les plus abondants, ils comportent deux chaînes d'acides gras estérifiés (les queues apolaires, hydrophobes) et un acide phosphorique estérifié (la tête polaire, hydrophile) greffés sur un squelette glycérol. Leur propriété amphiphile les pousse à s'organiser en bicouche et à former une structure fermée sur elle-même créant ainsi des compartiments (figure 1).





**Figure 2 : Paramètres physico-chimiques influençant la qualité des membranes biologiques.** Adapté de (Bigay and Antony, 2012). Le PA est un lipide conique qui tend à courber les membranes, le cholestérol diminue la perméabilité et la fluidité des membranes car ses cycles stéroïdiens forment une zone rigide. A l'inverse, les insaturations présentes dans les chaînes d'acides gras augmentent le désordre, la fluidité et les défauts de compaction. La qualité électrostatique de la membrane dépend de la présence de lipides chargés négativement (PS ou PI).

La tête polaire des phospholipides est constituée d'un groupement phosphate et d'un alcool. Les alcools majoritaires sont la choline, l'éthanolamine, la sérine, le glycérol et l'inositol. L'espèce lipidique est définie par cet alcool. Par exemple, un phospholipide avec une choline est une phosphatidylcholine (PC). Si le lipide ne contient pas d'alcool lié au phosphate, c'est l'acide phosphatidique (PA). La longueur des chaînes d'acide gras peut aussi varier et comporter une ou plusieurs insaturations. Plus on augmente le nombre d'insaturations, plus les membranes sont fluides. Comparez le beurre et l'huile : le beurre comporte uniquement des acides gras saturés, alors que l'huile est constituée d'acides gras insaturés.

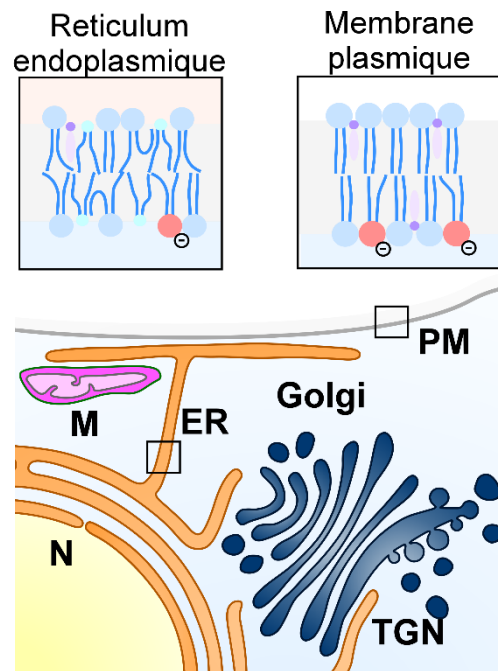
La nature moléculaire de chacun de ces lipides leur confère des propriétés chimiques particulières (charge, forme géométrique et taille) qui font qu'ils se comportent différemment au sein d'une membrane et

déterminent ses propriétés physiques. Par exemple, une accumulation de lipides coniques comme le PA qui a une petite tête polaire pourrait tendre à courber la membrane (figure 2)(Holthuis and Menon, 2014). La forme de la membrane, l'exposition de charges à sa surface par la phosphatidylsérine (PS) par exemple, son épaisseur ou encore sa fluidité sont autant de paramètres qui décrivent l'identité d'une organelle et qui permettent le recrutement de protéines périphériques impliquées dans diverses voies métaboliques ou de signalisation. Par exemple

certaines protéines sont équipées d'un motif ALPS (Amphipatique Lipid Packing Sensor) qui reconnaît les membranes courbées, ou qui présentent des défauts de compaction lipidique, en insérant ses résidus hydrophobes entre les têtes polaires des lipides (Bigay et al., 2003)(Bigay et al., 2005). C'est pourquoi la composition des membranes est précisément régulée et diffère selon les compartiments cellulaires, on parle de territoires membranaires (figure 3) (Vance, 1988)(Vance, 2015)(Harayama and Riezman, 2018).

Ces territoires sont marqués par l'ordre lipidique qui augmente le long de la voie sécrétoire. La voie sécrétoire conduit les protéines et les lipides synthétisés au réticulum endoplasmique (RE) jusqu'aux membranes du Golgi puis la membrane plasmique (MP). La membrane du RE possède ~5% de cholestérol (ses membranes sont qualifiées de « précoces ») alors que la membrane plasmique en contient 30 à 40% (membrane « tardive »). La sphingomyéline (SM) est elle aussi abondante dans ces

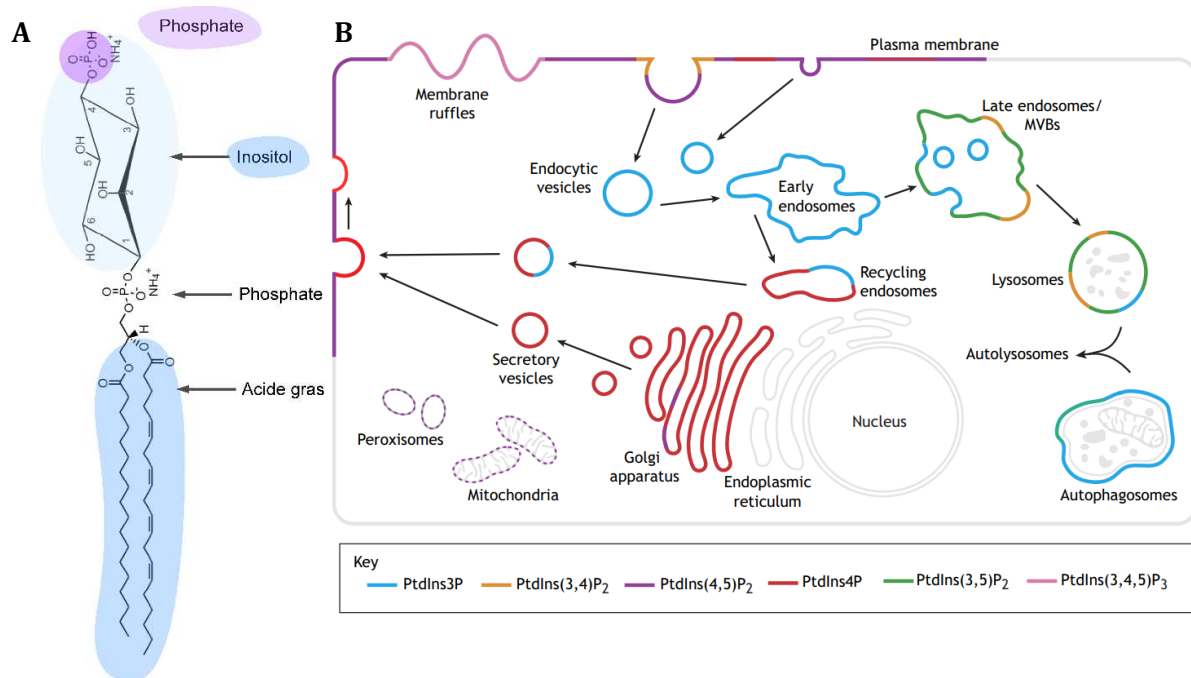
membranes tardives. Ceci est relié directement à la fonction de l'organelle, la membrane plasmique ayant une fonction de barrière protectrice, ses membranes doivent être plus ordonnées. D'autre part cette membrane doit aussi permettre l'import ou l'export de diverses molécules afin de communiquer avec les cellules voisines ou l'environnement extérieur. Les travaux de notre équipe ont montré, à l'aide de simulations de dynamique moléculaire, qu'une membrane contenant des lipides polyinsaturés est plus adaptée à la déformation et donc au bourgeonnement (Manni et al., 2018)(Tiberti et al., 2020). La flexibilité de la membrane



**Figure 3 : Territoires membranaires.** La composition lipidique des membranes varie dans la cellule selon les compartiments. Le RE possède une bicouche plus fine car plus désordonnée, avec peu de cholestérol et beaucoup de lipides polyinsaturés créant des défauts de compaction alors que la membrane plasmique est plus épaisse, plus saturée et comporte beaucoup de cholestérol, son feuillet interne expose beaucoup de charges. On observe un gradient de saturation membranaire le long de la voie sécrétoire. Adapté de (Holthuis and Menon, 2014).

plasmique permet donc l'initiation d'un processus d'endocytose par exemple (Pinot et al., 2014). Une autre caractéristique qui différencie les membranes tardives est leur asymétrie. En effet, la membrane plasmique concentre 70% de PC, 85% de SM et la majorité du cholestérol dans son feuillet externe alors que le feuillet cytosolique comporte 80% de PE et 96% de PS. Le maintien de cette asymétrie a des conséquences biologiques importantes. Par exemple : l'exposition de charge par la PS permet le recrutement de protéines périphériques sur le feuillet cytosolique de la membrane (Zachowski, 1993).

Les territoires membranaires sont aussi marqués par la distribution des phosphoinositides qui sont issus du phosphatidylinositol (PI). Cette classe lipidique peut être phosphorylée de façon réversible en position 3, 4 ou 5 sur le cycle de l'inositol par des kinases et des phosphatases spécifiques. Il y a donc différentes classes de phosphatidylinositol-phosphate (PIPs) (figure 4)(Volpatti et al., 2019). Ces PIPs servent de point d'ancrage à diverses protéines qui ont des domaines spécifiques de reconnaissance. Par exemple, le PI4P est reconnu par le



Phosphatidylinositol 4-Phosphate (PI4P)

**Figure 4 : Les territoires occupés par les différents PIPs.** A) Structure du PI4P : un phosphatidylinositol phosphorylé sur le carbone 4 de l'inositol. B) Schéma de la distribution cellulaire des PIPs. La membrane plasmique et les endosomes tardifs contiennent beaucoup de PI4,5P<sub>2</sub> alors que les membranes golgiennes sont très enrichies en PI4P. Les PIPs participent à définir l'identité des organelles en créant des territoires membranaires (Volpatti et al., 2019).

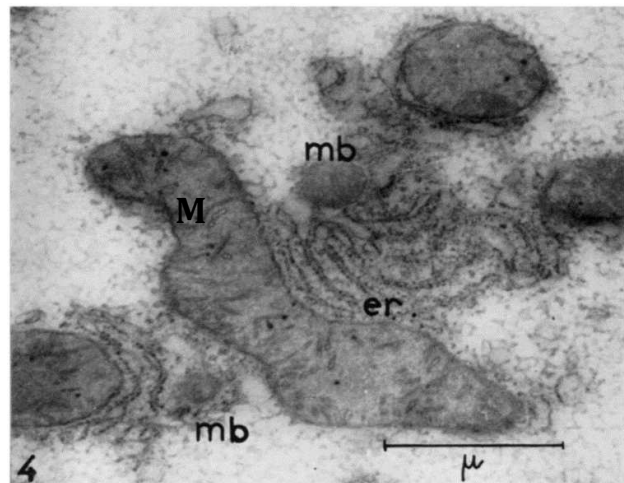
domaine PH (Peckstrin Homology) de plusieurs protéines au trans Golgi (TGN) (Levine and Munro, 1998).

Certains compartiments ont des particularités lipidiques supplémentaires, par exemple la mitochondrie possède deux membranes qui contiennent jusqu'à 20% de cardiolipine (CL) (Tatsuta and Langer, 2017). Ce lipide synthétisé à partir du PA est présent uniquement dans les membranes des mitochondries et est impliqué dans un grand nombre de fonctions qui seront abordées plus tard dans ce manuscrit.

Les membranes sont donc des structures lipidiques dynamiques dont la composition varie en fonction des compartiments cellulaires, cette organisation est également localement modulable, elle confère à la membrane les propriétés physico-chimiques caractérisant son identité et permettant ses fonctions.

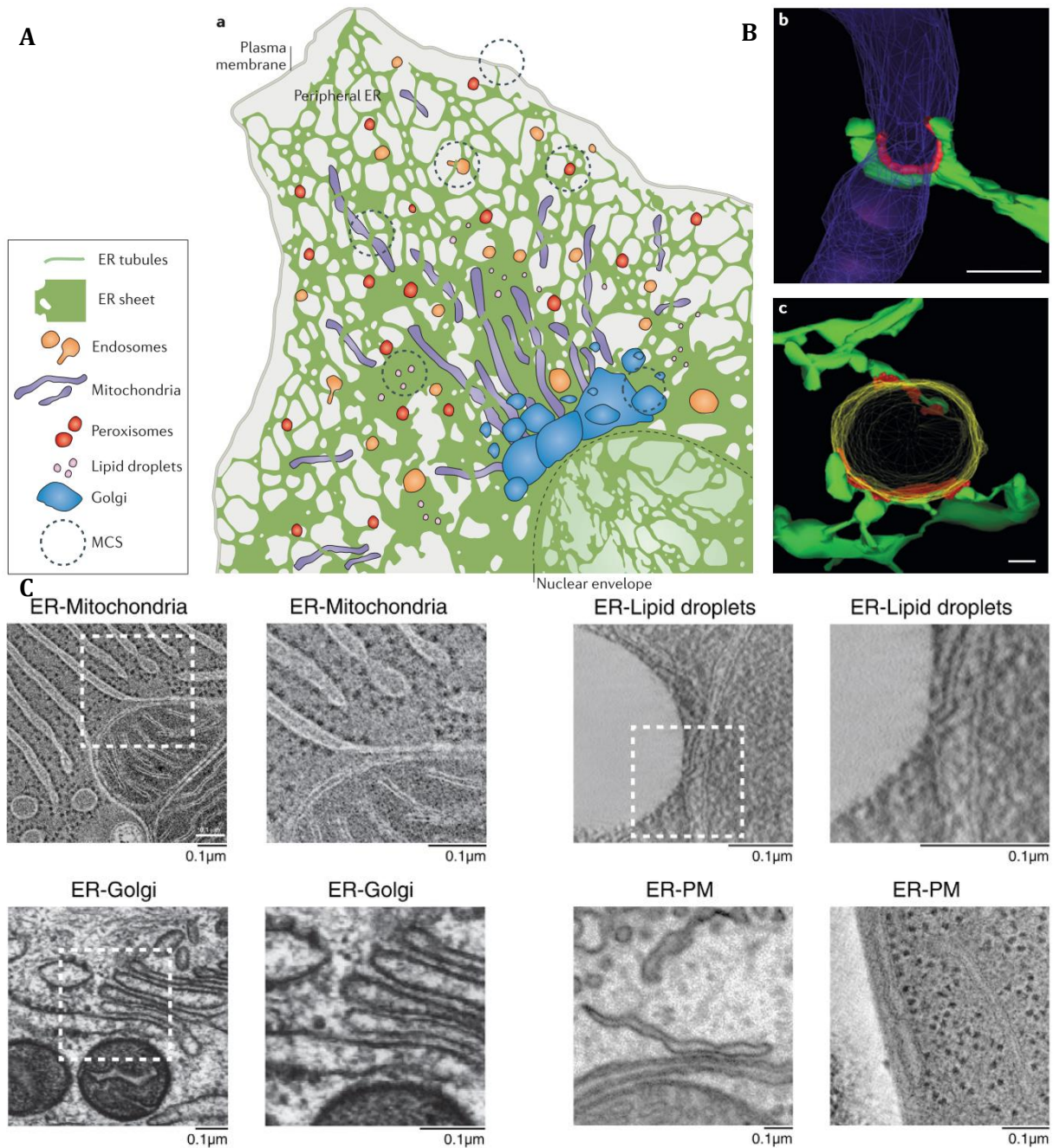
### (b) Qu'est-ce qu'un site de contact membranaire (MCS) ?

Par définition un site de contact membranaire est une région où les membranes de deux organelles différentes sont proches mais ne fusionnent pas. Ces membranes se trouvent à une distance de quelques dizaines de nanomètres et un lien est établi entre elles par des effecteurs protéiques qui stabilisent le contact et qui sont à l'origine de sa formation. Plusieurs paramètres en font varier la nature et la durée : les organelles impliquées, la composition lipidique de leurs membranes ainsi que les partenaires protéiques engagés. Les premières observations de contact membranaire ont été faites en 1956 par Bernhard et Rouiller par microscopie électronique d'hépatocytes de Rat (figure 5) (Bernhard and Rouiller, 1956). 8 ans plus



**Figure 5 : Découverte des MCSs.** Premières images de microscopie électronique montrant des contacts membranaires entre le RE (noté 'er') et la mitochondrie ('M'). D'après Bernhard and Rouiller, 1956.

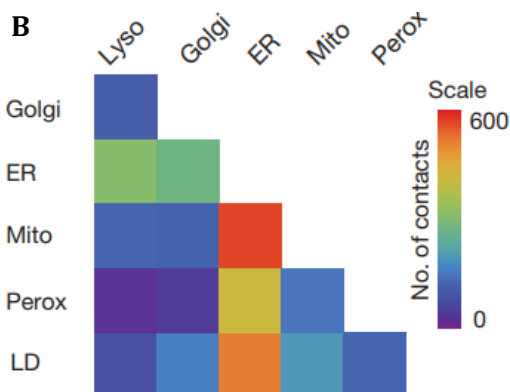
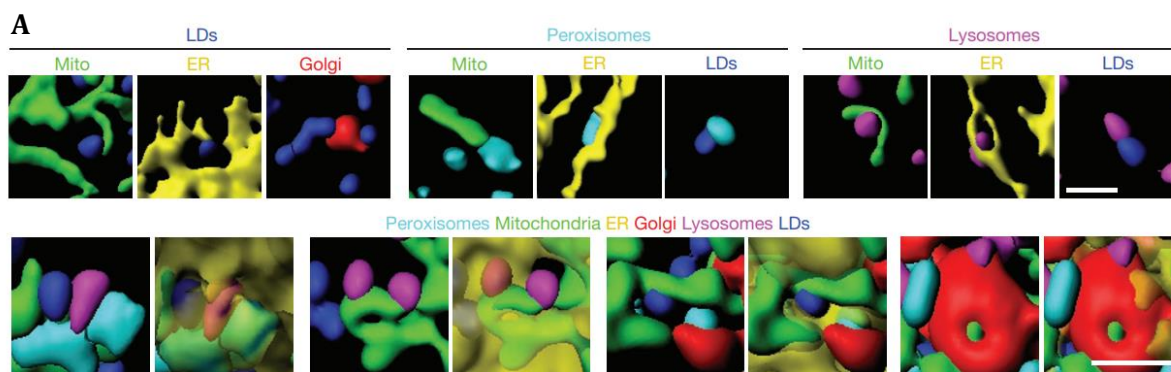
tard, en 1964, Palade décrit la voie sécrétoire et le trafic vésiculaire emprunté par les protéines (Caro and Palade, 1964). Le rôle des MCSs est inconnu et on pense que le transfert des lipides entre les organelles est médié uniquement par ce même trafic vésiculaire. C'est en 1990 que Vance isole les MCSs RE/Mitochondrie et qu'il constate un enrichissement de la PS synthase au sein de ces sites (Vance, 1990). On observe aussi qu'en bloquant le trafic vésiculaire, la PE néosynthétisée au RE peut toujours rejoindre la membrane plasmique (Sleight and Pagano, 1983) et la PS peut rejoindre la mitochondrie (Antonio E. Rusinol, Zheng Cui, Ming H. Chen, 1994). Le transfert de lipide via les régions de « continuité membranaire entre les organelles » qu'on appelle aujourd'hui site de contact est alors découvert. Dans les années 1990, les fonctions physiologiques de ces structures ont été étudiées, cependant le manque de marqueurs moléculaires a été un obstacle jusque dans les années 2000. Depuis 2010, on ne cesse d'explorer l'univers des MCSs, le nombre d'études s'accroît et nos connaissances dans ce domaine s'élargissent plaçant le RE au centre de toutes les interactions (Figure 6)(Wu et al., 2018)(Salvador-Gallego et al., 2017).



**Figure 6 : Le RE au centre des interactions.** A) Schéma du RE formant un réseau étendu de citernes et de tubules capable de former des contacts avec toutes les autres organelles. B) Modèle 3D par tomographie-EM de contacts RE/Mitochondrie (Phillips and Voeltz, 2016). C) Images de microscopie électronique de contacts entre le RE et d'autres organelles (Wu et al., 2018).

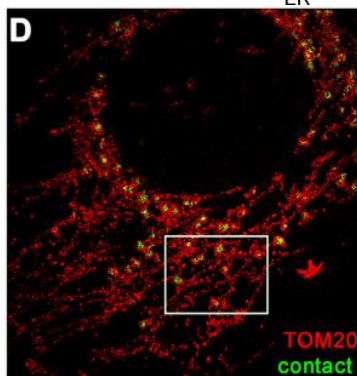
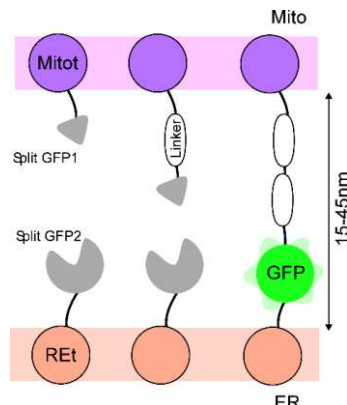
Chaque cellule est dotée d'un seul RE, capable de connecter toutes les organelles en formant des MCSs. Cependant, les autres organelles peuvent aussi être en contact entre elles. Par exemple, le Golgi et les gouttelettes lipidiques ou encore la mitochondrie et le lysosome (Figure 7) (Valm et al., 2017).





**Figure 7:** A) Exemples de contacts entre organelles. Reconstitutions 3D à partir d'images de Lattice Light Sheet. B) Interactome des organelles : une ligne représente le nombre de contacts entre l'organelle étudié et l'organelle cible, cette étude a été réalisée à l'aide de protéines de fusion fluorescentes comme mentionné dans la figure suivante. Le RE est bien l'organelle qui forme le plus de contacts, et en particulier avec la mitochondrie (Valm et al., 2017).

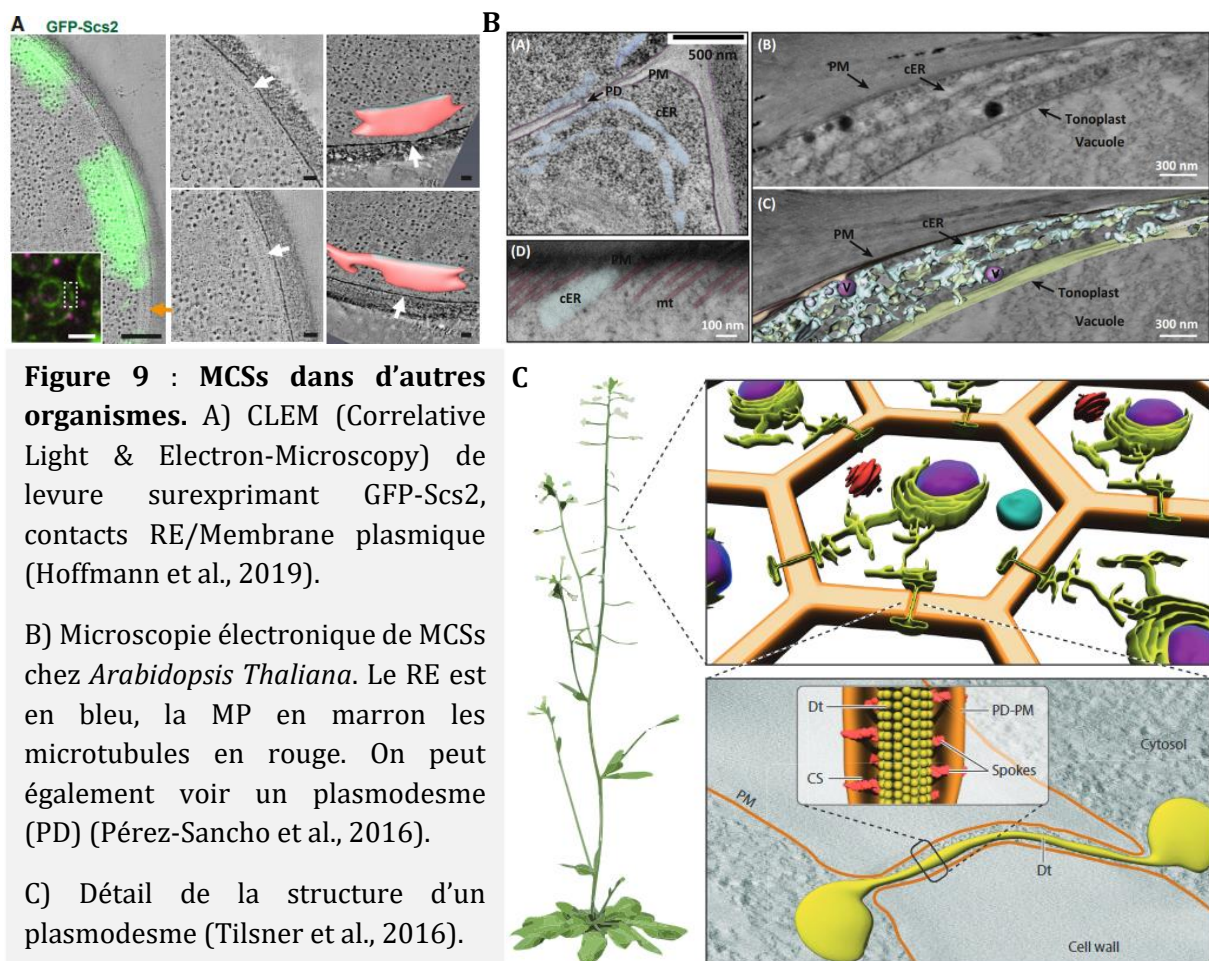
Les avancées technologiques en imagerie ont permis d'observer ces régions confinées et les outils pour étudier les contacts se sont développés (Scorrano et al., 2019). Par exemple : le SPLICS (Split GFP based Contact Site Sensor) permet une évaluation précise de la distance qui sépare les organelles (~15 à 45nm) (figure 8) (Cieri et al.,



**Figure 8 : Méthode SPLICS** appliquée aux MCSs ER/Mitochondrie : sur expression de 2 plasmides : une protéine transmembranaire du RE fusionnée avec une partie de la GFP et une de la Mitochondrie fusionnée à l'autre partie de la GFP, lorsque que le MCS se forme, la GFP est reconstituée et la fluorescence est détectable, on obtient alors des points verts visibles en D. On peut artificiellement augmenter la distance entre les membranes par l'ajout de linkers. Adapté de (Yang et al., 2018) .

2018)(Yang et al., 2018). Diverses reconstitutions de contacts sont également possibles, nous reviendrons sur les stratégies d'études adoptées *in vitro* au cours de ce manuscrit.

Les MCSs ne concernent pas que les cellules de mammifères, ces structures sont conservées au cours de l'évolution : on en rencontre chez la levure (Hoffmann et al., 2019), où ils sont d'ailleurs très étudiés. En effet, la levure est un modèle eucaryote simple par sa génétique et la plupart des protéines étudiées au sein des MCSs sont conservées de la levure à l'Homme ; ceci démontre l'importance de leurs fonctions. Les MCSs existent aussi chez les cellules végétales. Le plasmodesme est un canal qui établit une connexion entre les cytoplasmes de deux cellules voisines et qui se caractérise par la présence de MCSs entre le RE et la membrane plasmique. Cette structure joue un rôle dans le développement et l'immunité de la plante (Pérez-Sancho et al., 2016)(Tilsner et al., 2016)(figure 9). Des MCSs sont aussi observés entre la mitochondrie et le chloroplaste, impliqués dans le transfert de lipides (Jouhet et al., 2004).



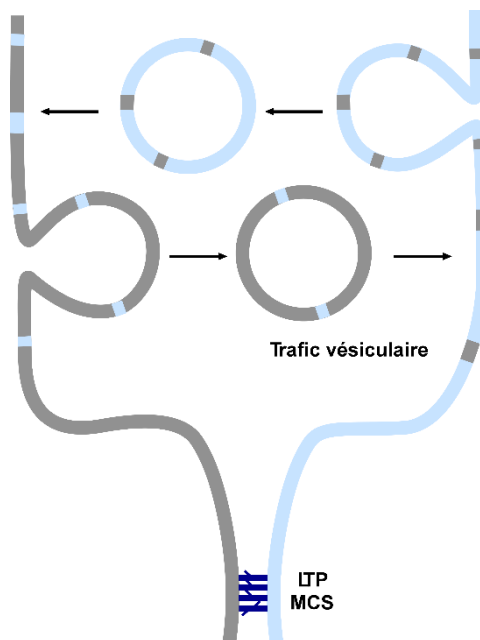
Bien que le transfert de lipide ait été le premier rôle attribué aux MCSs, beaucoup de travaux ont montré, en identifiant notamment les effecteurs protéiques qui s’y trouvent et leur activité, que ces contacts exécutent une multitude de fonctions, comme la dynamique des organelles ou encore le transfert de calcium (Prinz et al., 2020). De plus, des dysfonctionnements dans la formation des MCSs sont impliqués dans de nombreuses pathologies, ce qui indique leur importance physiologique. Les MCSs sont ubiquitaires et indispensables et nous allons aborder quelques unes de leurs fonctions avec plus de détails.

## 2. Rôles associés aux MCSs

### (a) Le transfert de lipides - Exemple des MCSs RE/TGN

Un des principaux rôles accordés aux MCSs est le transfert de lipides. Les espèces de lipides qui transitent par ces sites sont des composants essentiels des membranes. La plupart d’entre eux sont synthétisés au RE puis acheminés jusqu’à la membrane de leur compartiment cible. Bien sur, les lipides peuvent emprunter la voie vésiculaire, qui permet le transport simultané

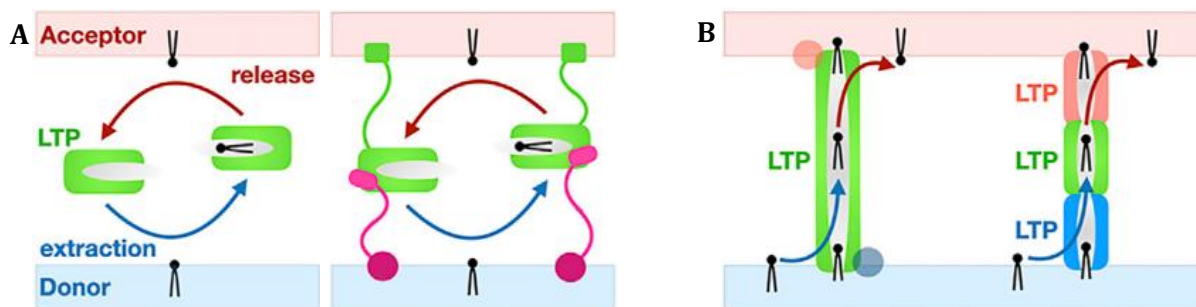
de dizaines de milliers de lipides et de protéines dans une vésicule. Bien que cette voie permet un tri très précis des protéines qu’elle transporte, elle n’est pas spécifique pour les lipides puisque tous les lipides présents au niveau du bourgeon membranaire sont transportés vers le compartiment cible (Brandizzi and Barlowe, 2013)(Antonny et al., 2018).



**Figure 10 : Deux voies de transport de lipides :** le transport vésiculaire, ATP-dépendant, faisant intervenir beaucoup de partenaires protéiques pour une faible sélectivité mais une grande capacité comparée aux LTPs qui transportent les lipides un par un de façon spécifique au sein des MCSs. Ces deux voies sont complémentaires mais ce sont les LTPs qui permettent une régulation fine de la composition des membranes (Antonny et al., 2018).

	Vesicle traffic	Lipid transfer
Capacity	30,000 lipids	1 lipid
Selectivity	Low	High
Timescale	100 s	1 s
Proteins involved	100	1-3
Energy	~100 ATP/GTP	~1 PI(4)P

Alternativement, il existe la voie non vésiculaire (figure 10), organisée par les **protéines de transfert de lipides (LTPs)** qui permettent un ajustement plus fin de la composition des membranes (David et al., 2021). Le transfert de lipides entre organelles nécessite des protéines qui protègent les parties hydrophobes des lipides lorsqu'ils traversent le cytoplasme. Ces LTPs peuvent être de différentes structures : il peut s'agir d'un domaine doté d'une poche hydrophobe qui reconnaît spécifiquement un lipide et qui transite entre les deux membranes pour conduire ce lipide, à l'image d'une navette reliée ou non aux membranes par des linkers ou des adaptateurs. Les LTPs peuvent également être des protéines tubulaires, qui forment un tunnel hydrophobe entre les membranes permettant le trafic de plusieurs lipides en même temps. Ce tunnel peut être continu ou discontinu dans le cas des TULIPs (tubular Lipid binding proteins) (figure 11)(Wong et al., 2019)(Egea, 2021). Je vais à présent détailler les échanges lipidiques qui sont effectués au sein des MCSs RE/TGN et qui mettent en jeux des LTPs « navettes ».



**Figure 11 : Mécanismes des LTPs pour le transfert non vésiculaire des lipides.** A) LTP « navette » qui extrait un lipide à la fois d'une membrane donneuse et qui diffuse dans le MCS pour délivrer ce lipide à la membrane du compartiment accepteur. Ce domaine est souvent relié aux membranes par un domaine transmembranaire et/ou des linkers et/ou des adaptateurs (rose). B) LTP « tunnel » formant un conduit permettant à plusieurs lipides de transiter simultanément de la membrane donneuse à la membrane acceptrice. Parfois, plusieurs LTP s'assemblent pour former un tunnel qui pontre les membranes (Egea, 2021).

L'appareil de Golgi est le centre de tri de la cellule. Beaucoup de molécules y transitent. Les protéines traduites au RE y entrent par le cis-Golgi, puis sont redirigées vers leur compartiment cible au départ du trans-Golgi. Ces molécules subissent des modifications post-traductionnelles au cours de leur voyage dans le Golgi, de citerne en citerne (Ladinsky et al., 2002)(Mogelsvang et al., 2004). A l'inverse, afin d'alimenter la voie sécrétoire tardive en lipides saturés (dont le cholestérol et la SM) ces lipides ou leur précurseur sont synthétisés au RE et rejoignent directement le TGN par les MCSs RE/TGN pour de contourner les compartiments précoces de la voie sécrétoire (figure 12). Au sein de ces sites, de nombreuses LTPs ayant des structures proches exécutent le transfert.

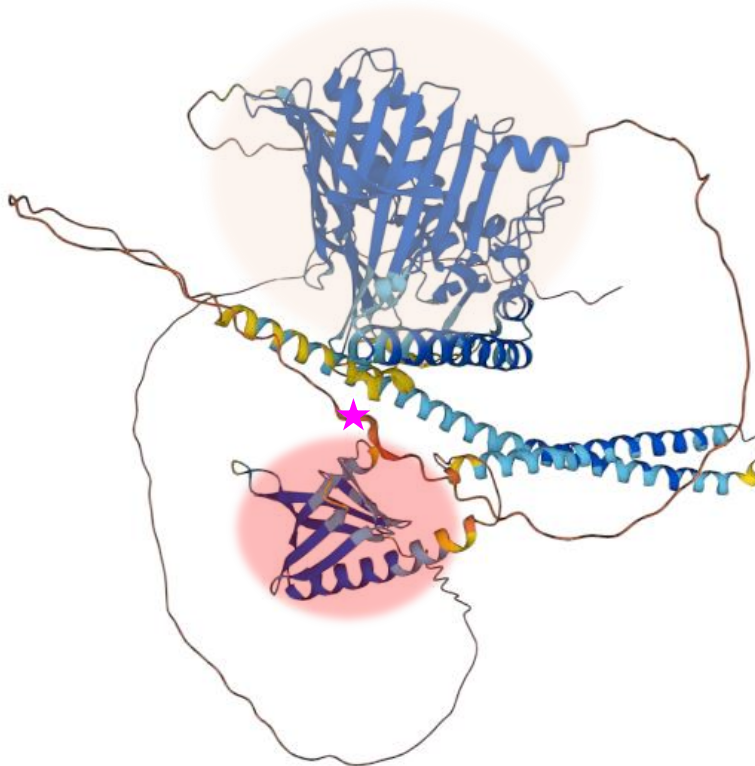


**Figure 12 :**  
**L'appareil de Golgi.** Modèle en 3D provenant d'un tomogramme ou image de microscopie électronique montrant les citernes golgiennes. Le trans golgi (en rouge) forme un contact avec le RE (en bleu) (Ladinsky et al., 2002).

## *i Etude des ORPs, exemple d'OSBP*

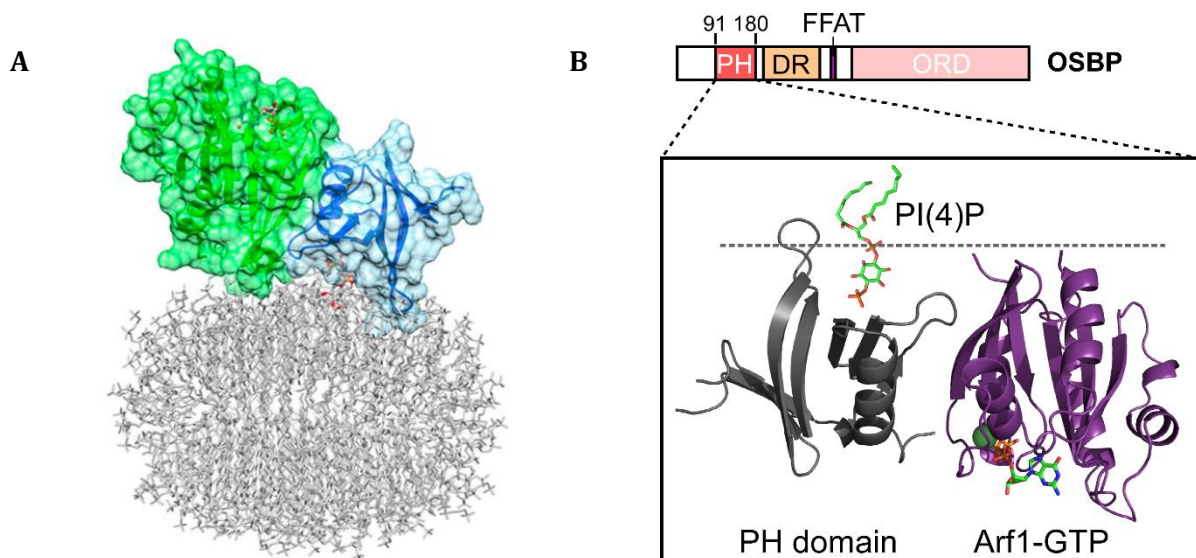
### *1) Organisation des domaines*

Notre équipe étudie depuis une dizaine d'années une LTP appelée Oxysterol binding protein (OSBP) enrichie dans les sites de contact RE/TGN. Découverte dans les années 80, (Dawson et al., 1989) (Ridgway et al., 1992) OSBP fait partie de la famille des ORPs (OSBP-Related protein). Il existe 12 protéines ORP chez l'Homme et 7 analogues chez la levure : les Osh (OSBP Homologs) (Olkkonen and Levine, 2004)(Tong et al., 2016). OSBP est une protéine de 807 acides aminés qui comporte plusieurs domaines (figure 13).



**Figure 13 : Modèle AlphaFold d'un monomère d'OSBP (Humaine).** Le domaine PH est repéré en rouge et le domaine ORD en orange. La position du motif FFAT est marquée par une étoile. Chaque composante est détaillée ci-après. OSBP est organisé en dimère.

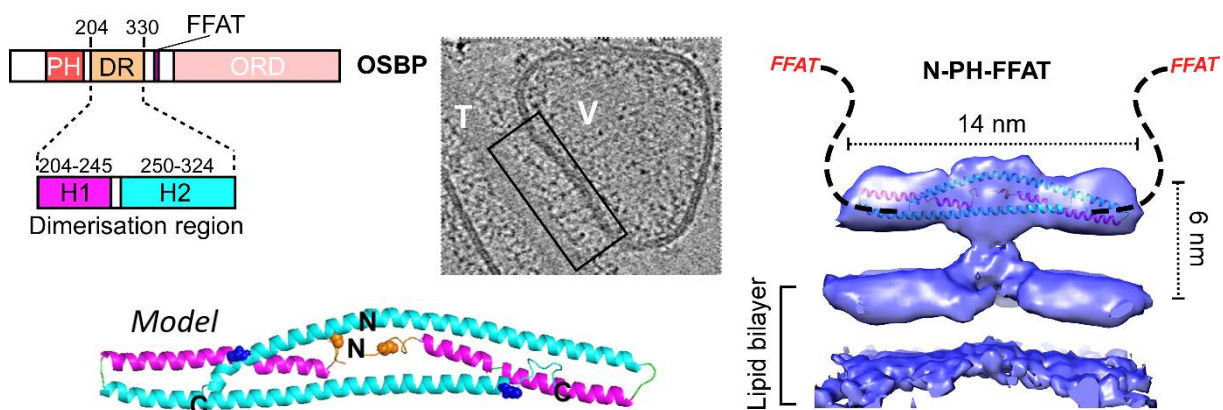
Elle possède un domaine Pleckstrin Homology (PH) en N-terminal qui interagit avec les membranes en se liant spécifiquement au PI4P (Levine and Munro, 1998) et à Arf1-GTP (Balla et al., 2005). Ceci permet la liaison d'OSBP à la membrane du TGN, très riche en PI4P (figure 4), mais aussi son recrutement sur d'autres organelles (figure 14).



**Figure 14 : Reconnaissance du PI4P et de Arf1-GTP par le domaine PH des LTPs.** A) Modèle du domaine PH de FAPP1\* (en bleu) lié à Arf1 (en vert) et au PI4P (en rouge) présent dans une micelle (Liu et al., 2014). B) Domaine PH d’OSBP, la ligne pointillée représente la membrane du Golgi (Antonny et al., 2018).

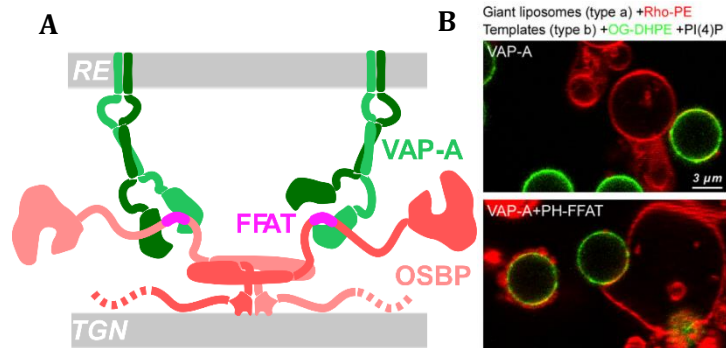
\* Le domaine PH de FAPP1 (Four-phosphate adaptor protein) a été le premier décrit pour la reconnaissance du PI4P. FAPP2 est une autre isoforme qui possède un domaine GLTP lui permettant de transférer le glucosylcéramide (un lipide lié à un sucre) entre le cis-Golgi et le trans-Golgi. (D’Angelo et al., 2007).

Le domaine PH est suivi par une région centrale de dimérisation (DR) composée de deux hélices  $\alpha$  anti parallèles formant au sein du dimère une structure en T, bien décrite par cryo-tomographie (figure 15)(de la Mora et al., 2021).



**Figure 15 : Central Core ou région de dimérisation d’OSBP.** Image de cryo-EM d’un MCS reconstitué *in vitro* entre un protéoliposome VAP-A (V) et un tube de galactosylcéramide contenant du PI4P (T) pour permettre la fixation de la partie N-terminale d’OSBP : N-PH-FFAT. Enveloppe 3D de N-PH-FFAT dans un MCS faite par tomographie (de la Mora et al., 2021).

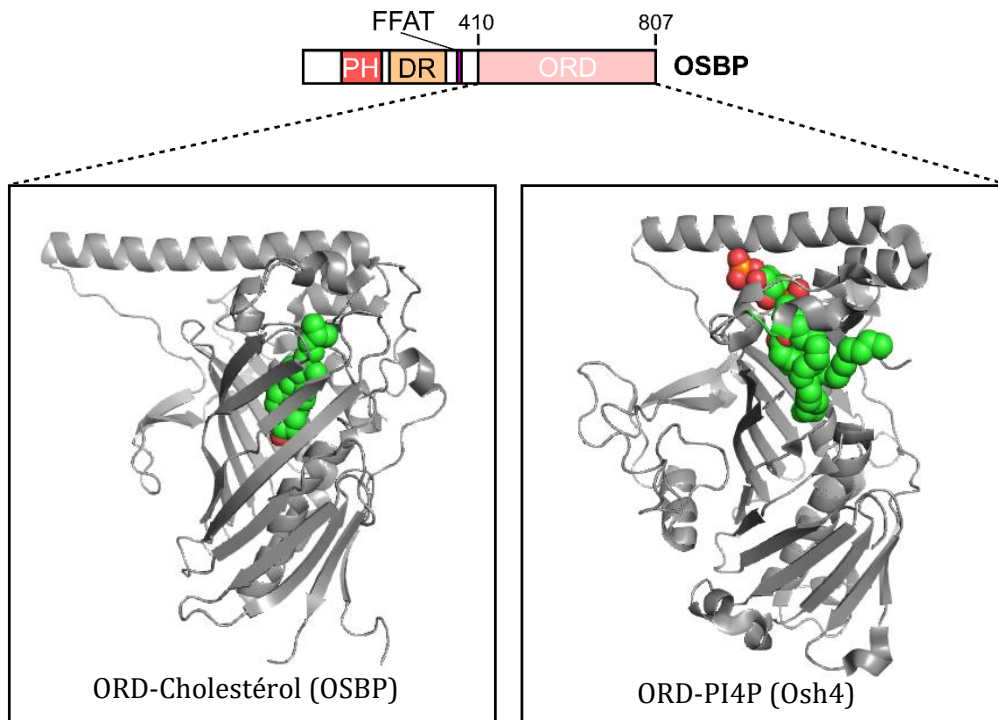
OSBP comporte un motif FFAT (séquence consensus contenant deux phénylalanines dans un environnement acide : two phenylalanines in an acid tract (Kaiser et al., 2005)) reconnu par les protéines VAP-A et VAP-B qui sont des récepteurs ancrés au RE (Loewen et al., 2003). La nature de cette interaction ainsi que la structure des VAPs seront détaillées plus tard dans ce manuscrit. Pour lors, il est nécessaire de comprendre qu'OSBP, par l'intermédiaire de sa moitié N-terminale N-PH-FFAT (résidus 1-408) peut former un pont entre la membrane du TGN et celle du RE par l'intermédiaire de VAP (figure 16).



**Figure 16 : Contact RE/TGN formé par l'interaction OSBP/VAP-A.** A) VAP-A reconnaît OSBP grâce à son motif FFAT. B) Images de liposomes géants couverts par VAP-A (rouge) et bicouche lipidique supportée par des templates (vert) contenant du PI4P. L'ajout de la partie N-terminale d'OSBP : N-PH-FFAT entraîne la formation de contacts (Mesmin et al., 2013).



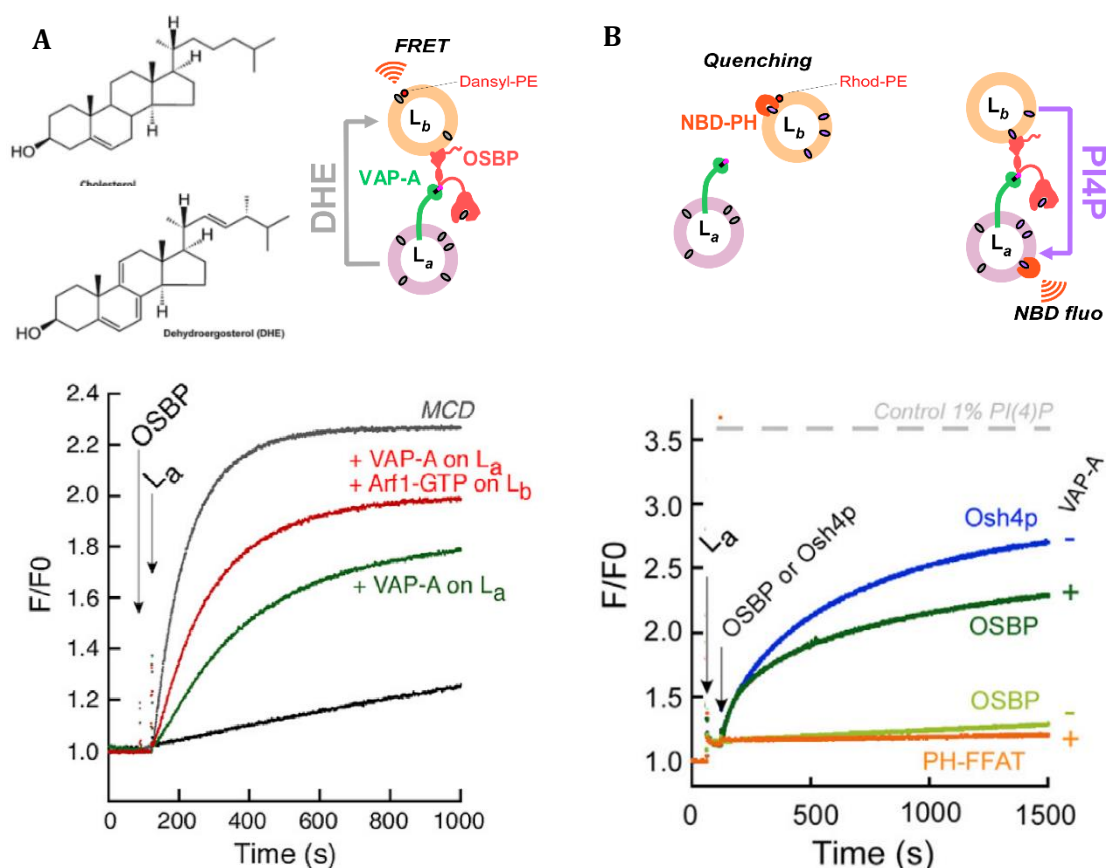
Le domaine de transfert de lipide ORD (OSBP-related domain) situé en C-terminal constitue la seconde moitié de la protéine. Il possède une poche hydrophobe pouvant accueillir deux lipides : le PI4P ou le cholestérol (de Saint-Jean et al., 2011),(Mesmin et al., 2013). La structure cristallographique du domaine ORD d'OSBP a été résolue très récemment (Kobayashi et al., 2022), cependant celle de son homologue Osh4 chez *Saccharomyces cerevisiae* a été résolue en 2005 (Im et al., 2005) (figure 17).



**Figure 17 : Structure du domaine ORD d'OSBP.** Structure cristallographique de l'ORD d'OSBP avec une molécule de cholestérol dans la poche hydrophobe (à gauche) (Kobayashi et al., 2022). Modèle généré à partir de la structure d'un analogue chez la levure (Osh4), cristallisée avec un PI4P dans la poche hydrophobe (de Saint-Jean et al., 2011)(à droite).

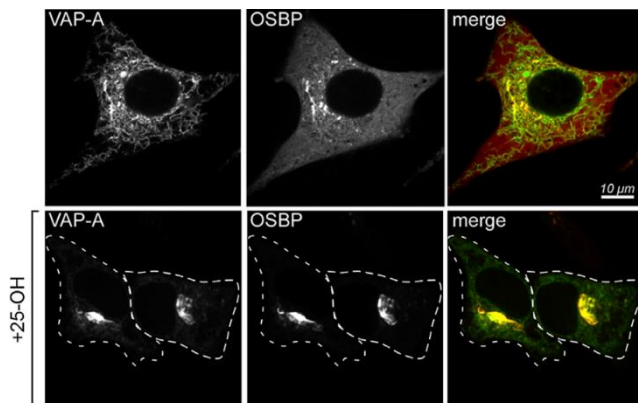
## 2) Relier l'architecture à la fonction – 2013

Les propriétés de pontage membranaire et d'échanges de lipides d'OSBP ont été largement disséquées par notre équipe. *In vitro*, des expériences de transfert de stérol entre liposomes montrent l'importance du pontage permis par VAP-A pour l'efficacité de l'échange opéré par OSBP. On constate également que l'ajout de Sac1 (qui hydrolyse le PI4P) améliore l'activité de transfert de stérol d'OSBP. Ces expériences ont été réalisées avec du dehydroergostérol (DHE), un stérol intrinsèquement fluorescent, mimant le cholestérol. Le transport inverse de PI4P a aussi été mesuré (figure 18). Plus récemment, à l'aide d'un système de reconstitution complet, il a été



**Figure 18 : Activité d'OSBP *in vitro*.** A) Expérience de transfert de stérol entre liposomes mesuré par signal de FRET. Le liposome  $a$  ( $L_a$ ) contient du DHE : un analogue fluorescent du cholestérol et des DOGS-NiNTA permettant de lier la protéine VAP-A-His-tag. Le liposome  $b$  ( $L_b$ ) contient du PI4P et du dansyl-PE. L'ajout d'OSBP et de VAP-A entraîne un transport de DHE par OSBP du  $L_a$  vers le  $L_b$  et un signal de FRET est observable entre le DHE et le dansyl-PE. B) Expérience de transfert de PI4P entre deux liposomes. Cette fois le  $L_b$  contient le PI4P et de la rhodamine-PE. On utilise le domaine PH de FAPP couplé à une molécule fluorescente : le NBD. Au point 0 le signal du NBD est « quenché » par la rhodamine-PE. A l'ajout d'OSBP et de VAP-A, le PI4P est transporté du  $L_b$  vers le  $L_a$ , PH-FAPP-NBD change alors de liposome et on peut observer le signal fluorescent du NBD (Mesmin et al., 2013).

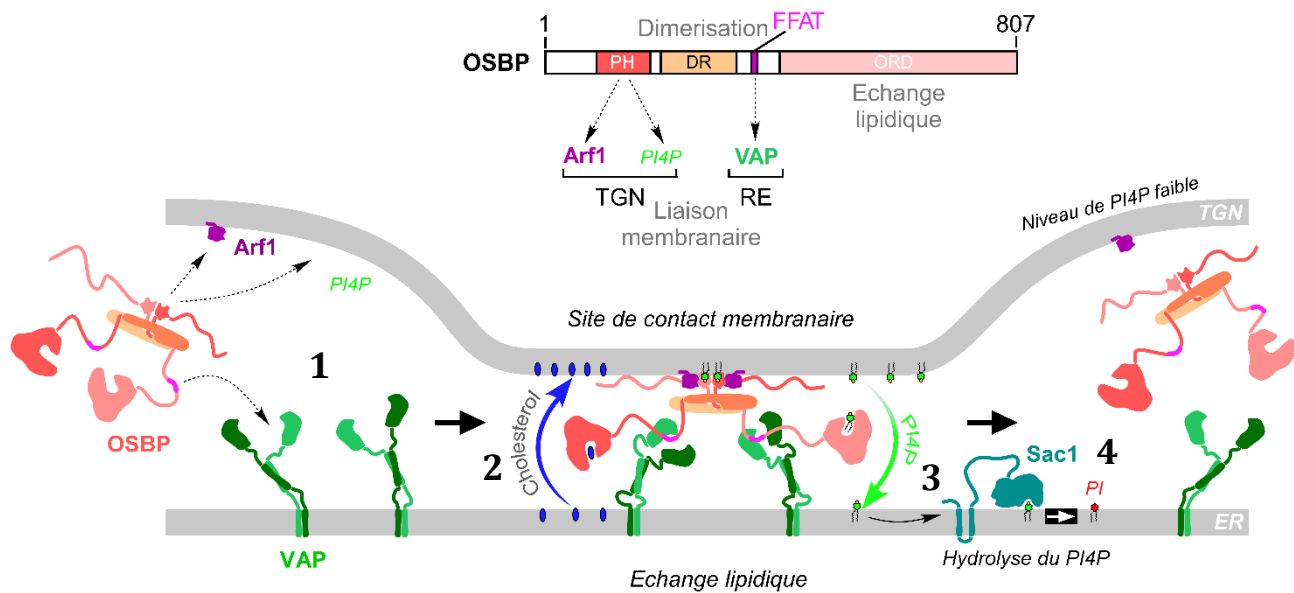
montré qu'une molécule d'OSBP peut transférer 15 molécules de PI4P par minute (de la Mora et al., 2021). Osh4p, qui n'est pas reliée aux membranes, transfère ~17 molécules de PI4P par minute (Von Filseck et al., 2015)(Moser von Filseck et al., 2015). Les reconstitutions *in vitro* en utilisant des liposomes de petites tailles miment relativement mal les MCSs, or le fonctionnement optimal d'OSBP ne serait mesurable que dans des conditions de contact plus étendu « latéralement » ; ceci pourrait expliquer la différence de vitesse observée. *In cellula*, OSBP est localisé partiellement dans le cytosol et au TGN, cependant inhiber son activité de transfert de lipides en ajoutant l'oxystérol 25-OH, qui fait compétition avec le cholestérol en entrant dans la poche hydrophobe du domaine ORD, accentue son recrutement sur les membranes du TGN. L'accumulation de PI4P induite par son inhibition entraîne un recrutement d'OSBP via son domaine PH. Si les taux de PI4P au TGN sont faibles, alors OSBP se détache de la membrane (figure 19)(Mesmin et al., 2013)(Mesmin et al., 2019).



**Figure 19 : La localisation subcellulaire d'OSBP est dépendante de son Activité.** Immuno-marquage de VAP-A et OSBP dans des cellules Hela sauvages ou traitées avec un inhibiteur d'OSBP : le 25-OH. Ce traitement entraîne un recrutement d'OSBP et de VAP-A dans la région péri nucléaire correspondant au TGN (Mesmin et al., 2013).

En 2013 notre équipe relie la structure d'OSBP à sa fonction et propose un modèle en 4 étapes décrivant le cycle d'OSBP (figure 20). Premièrement, les membranes du Golgi (TGN) et du RE sont pontées par OSBP et VAP, ceci permet la seconde étape : le transfert du cholestérol depuis son lieu de synthèse, le RE, jusqu'au TGN par le domaine ORD d'OSBP. Dans le même temps mais dans le sens inverse, la troisième étape se produit : le PI4P est transporté. Celui-ci est ensuite hydrolysé au cours de la dernière étape par la phosphatase membranaire Sac1 présente au RE (Zewe et al., 2018). L'hydrolyse du PI4P prévient les cycles futiles et permet le transfert du cholestérol de manière unidirectionnelle. Le PI4P synthétisé au Golgi est considéré comme un

« ATP lipidique » car sa consommation permet le transport de stérol contre son gradient de concentration. Le même mécanisme d'échange existe pour Osh4p chez la levure (de Saint-Jean et al., 2011)(Von Filseck et al., 2015). Le PI obtenu après hydrolyse du PI4P par Sac1 est transporté au TGN par des PITPs (LTPs spécifiques du PI) afin d'être phosphorylé de nouveau par une kinase pour reformer le pool de PI4P et compléter le cycle d'OSBP (Cockcroft and Lev, 2020).

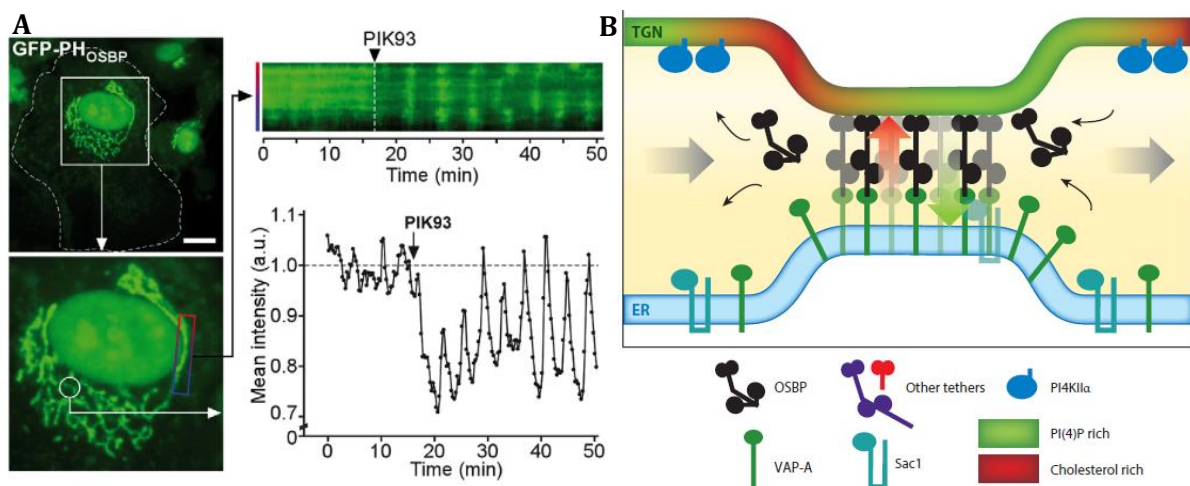


**Figure 20 : Cycle d'OSBP en quatre étapes.** 1. Formation du MCS par OSBP et VAP-A. 2. Transport du cholestérol du RE au TGN. 3. Transport du PI4P du TGN au RE. 4. Hydrolyse du PI4P par Sac1. Adapté de Mesmin et al., 2013.

### 3) Dynamique d'OSBP dans les MCSs

Deux kinases peuvent synthétiser le PI4P au TGN : la PI4KII $\alpha$  et la PI4KIII $\beta$ . Inhiber la PI4KIII $\beta$  avec la drogue PIK93 n'empêche pas le recrutement de la protéine OSBP au Golgi par son domaine PH (Mesmin et al., 2017). Ceci suggère que le PI4P consommé par OSBP n'est pas produit uniquement par la PI4KIII $\beta$ . En 2017, notre équipe montre que l'inhibition de cette kinase provoque une oscillation régulière du domaine PH d'OSBP au TGN. Le modèle suivant est établi : l'activité locale d'OSBP fait qu'une portion de membrane du TGN devient riche en cholestérol et pauvre en PI4P. Or, quand le taux de PI4P devient trop faible, notamment en cas de traitement au PIK93, OSBP se détache pour aller se ré-attacher dans un site plus éloigné, riche en PI4P, par exemple alimenté par PI4KII $\alpha$ . Il est important de noter que les deux kinases ne se localisent pas

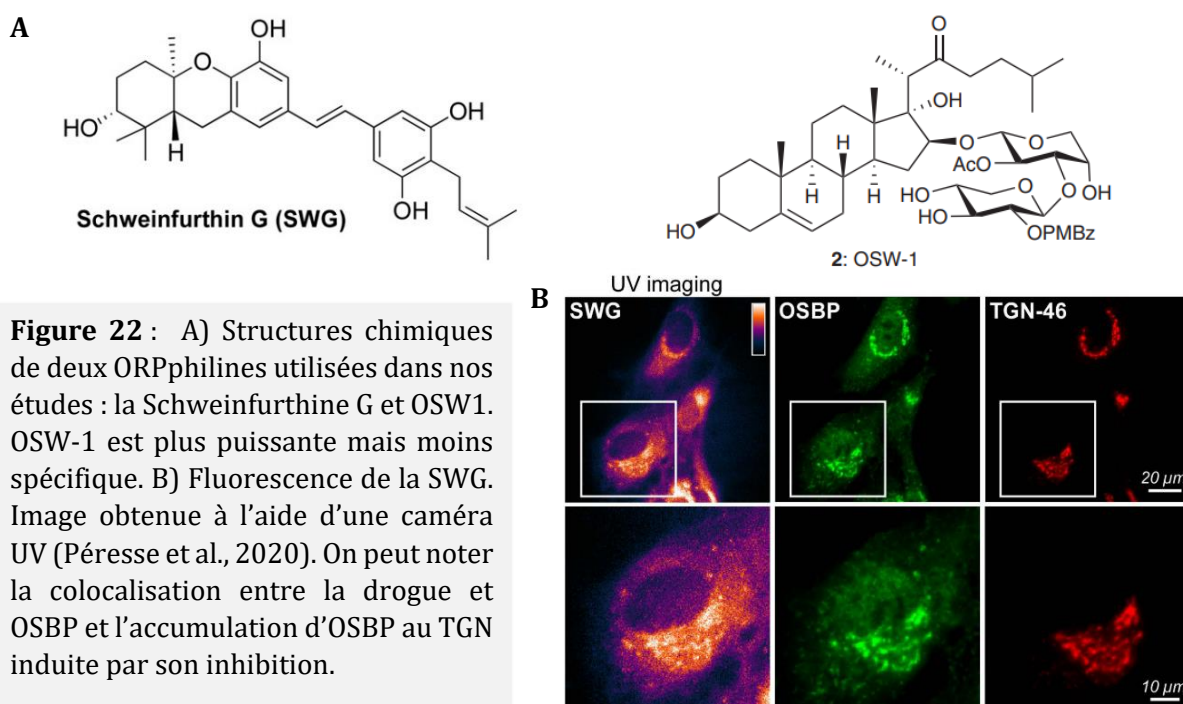
sur les mêmes territoires membranaires : la PI4KIII $\beta$  possède un motif ALPS qui favorise son association sur des régions membranaires fluides avec des défauts de packing ; à l'inverse, la PI4KII $\alpha$  réside dans les régions plus ordonnées, elle est donc située à l'écart d'OSBP. L'hypothèse est que les vagues observées correspondent au glissement d'OSBP le long des membranes du TGN, cherchant du PI4P (figure 21). Nous avons plus récemment observé des oscillations plus discrètes pour la protéine VAP-A mais parfaitement synchrones avec OSBP, ce qui suggère un glissement du contact RE-TGN dans son intégralité (figure R5).



**Figure 21 :** A) Vagues de GFP-PH(OSBP) au TGN sous inhibition de la PI4KIII $\beta$  par PIK93. Le kymographe et les mesures d'intensité sont obtenus à partir de la région entourée dans le Golgi. B) Modèle expliquant les vagues observées. La distance entre la PI4KII $\alpha$  et OSBP impacte la dynamique des MCSs RE/TGN. OSBP et la PI4KII $\alpha$  se suivent, la kinase synthétise le PI4P tandis qu'OSBP le consomme (Mesmin et al., 2017).

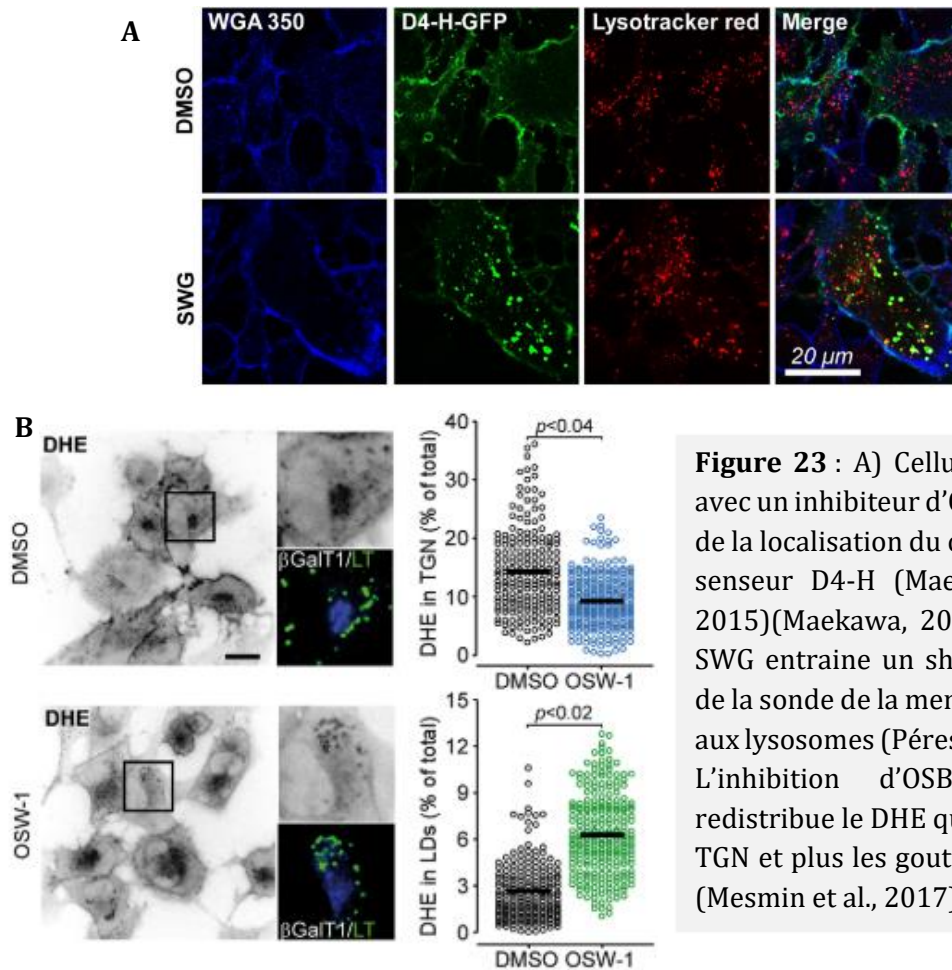
#### 4) Inhibiteurs pharmacologiques d'OSBP

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant spécifiquement OSBP ont permis de mettre en évidence son impact dans un contexte cellulaire. Les ORPphilines sont des molécules qui ressemblent parfois au cholestérol et qui peuvent prendre sa place dans la poche hydrophobe du domaine ORD. Ces composés naturels inhibent la croissance de certaines lignées de cellules cancéreuses en ciblant OSBP et/ou ORP4 (Burgett et al., 2011). Notre équipe a montré récemment qu'une des ORPphilines, la Schweinfurthine G (SWG), est intrinsèquement fluorescente, ce qui a rendu possible le suivi de sa distribution en microscopie et d'identifier que son enrichissement au TGN dépend de l'abondance d'OSBP (Péresse et al., 2020) (Figure 22). En entrant directement dans la poche hydrophobe du domaine ORD avec une affinité de l'ordre du nanomolaire, la SWG inhibe l'activité de transfert de lipides d'OSBP. Comme avec un traitement au 25-OH (figure 19), le recrutement d'OSBP au TGN est amplifié sous SWG. Inhiber l'activité d'échange lipidique d'OSBP entraîne une augmentation du taux de PI4P au TGN, conduisant au recrutement d'OSBP sur ces membranes, via le domaine PH (Article 1) (Péresse et al., 2020). Nous avons démontré que l'inhibition d'OSBP affecte la distribution globale du cholestérol. La sonde D4-H qui se lie au cholestérol membranaire à partir de 30 mol% décore la membrane plasmique (Maekawa, 2017;

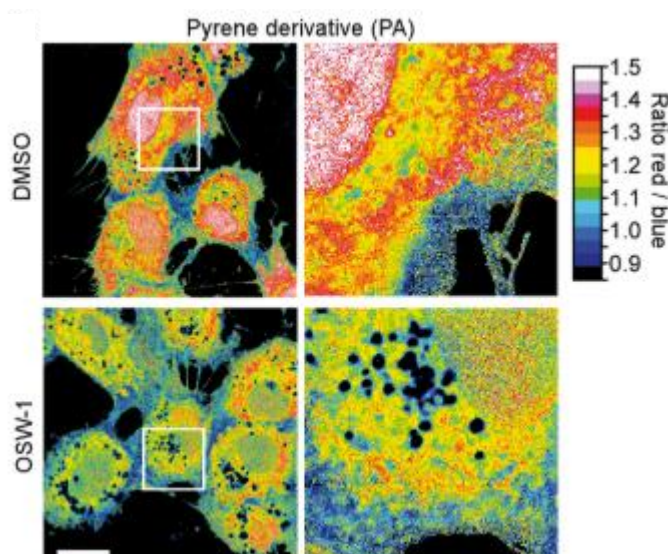


**Figure 22 :** A) Structures chimiques de deux ORPphilines utilisées dans nos études : la Schweinfurthine G et OSW1. OSW-1 est plus puissante mais moins spécifique. B) Fluorescence de la SWG. Image obtenue à l'aide d'une caméra UV (Péresse et al., 2020). On peut noter la colocalisation entre la drogue et OSBP et l'accumulation d'OSBP au TGN induite par son inhibition.

Maekawa and Fairn, 2015), or un traitement avec la SWG entraîne un shift de cette sonde aux lysosomes. La distribution globale du cholestérol dans la cellule est donc affectée, et ceci est aussi visible par imagerie UV du DHE (Wüstner et al., 2016)(figure 23). Le blocage d'OSBP par une autre ORPphilin, OSW-1, entraîne une légère accumulation de stérols au niveau des gouttelettes



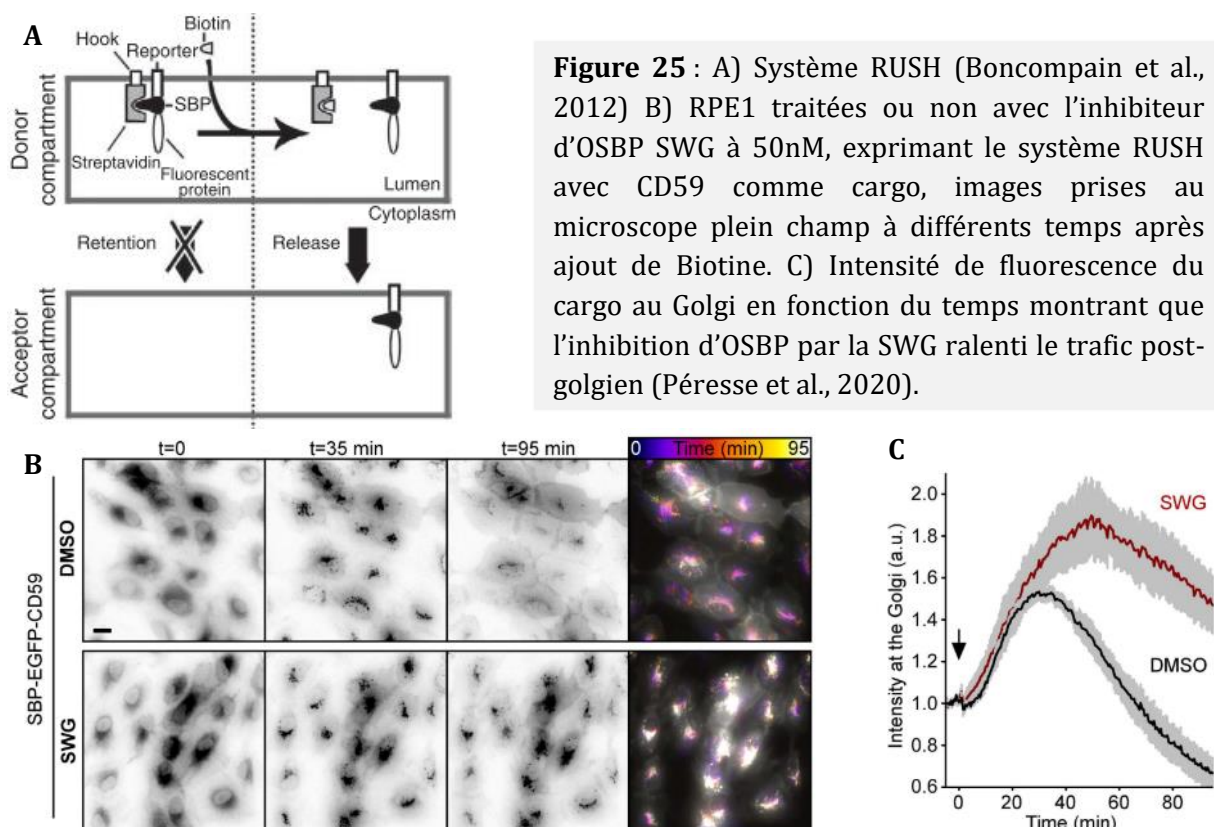
**Figure 23 :** A) Cellules RPE1 traitées avec un inhibiteur d'OSBP, observation de la localisation du cholestérol avec le senseur D4-H (Maekawa and Fairn, 2015)(Maekawa, 2017). L'ajout de la SWG entraîne un shift de localisation de la sonde de la membrane plasmique aux lysosomes (Péresse et al., 2020). B) L'inhibition d'OSBP par OSW-1 redistribue le DHE qui décore moins le TGN et plus les gouttelettes lipidiques (Mesmin et al., 2017).



**Figure 24 : Sonde PA : Sonde d'ordre lipidique** (Niko et al., 2016). Sonde ratio-métrique permettant de visualiser l'ordre des membranes. Dans des RPE1 sauvages, le RE est très désordonné (rouge) et ce désordre diminue le long de la voie sécrétoire lorsque l'on se rapproche de la MP (bleue). Si on applique un traitement OSW-1 qui cible OSBP, le cholestérol s'accumule au RE et ses membranes sont plus ordonnées (Mesmin et al., 2017).

lipidiques au détriment du TGN, réduisant ainsi le gradient d'ordre lipidique le long de la voie sécrétoire (figure 24).

Les ORPphilines ont permis de révéler le rôle d'OSBP dans le contrôle de la sécrétion mesurée grâce au système RUSH. Ce système permet de suivre le trafic intracellulaire d'une protéine « reporter » en l'exprimant liée à une protéine ancrée dans un compartiment donneur (ici le RE) par l'intermédiaire d'une streptavidine. L'addition de biotine provoque la libération de la protéine reporter. Ce reporter est également fusionné à une GFP pour pouvoir suivre son parcours jusqu'au compartiment accepteur en microscopie (Boncompain et al., 2012). Grâce à ce système nous avons identifié que l'inhibition de l'activité d'OSBP entraîne un ralentissement global de la sécrétion post-golgienne (figure 25), les mêmes effets sont observés avec cette méthode lors d'une déplétion de cholestérol (Kovács and Antony, 2021).



De plus, les travaux récents du laboratoire ont démontré qu'inhiber l'activité ou la synthèse d'OSBP avec des siRNA empêche la sécrétion de protéines membranaires impliquées



dans la mise en place des jonctions entre cellules comme la E-cadhérine, ce qui peut entraîner une perte de la polarité apico-basale des cellules épithéliales (Kovács and Antonny, 2021).

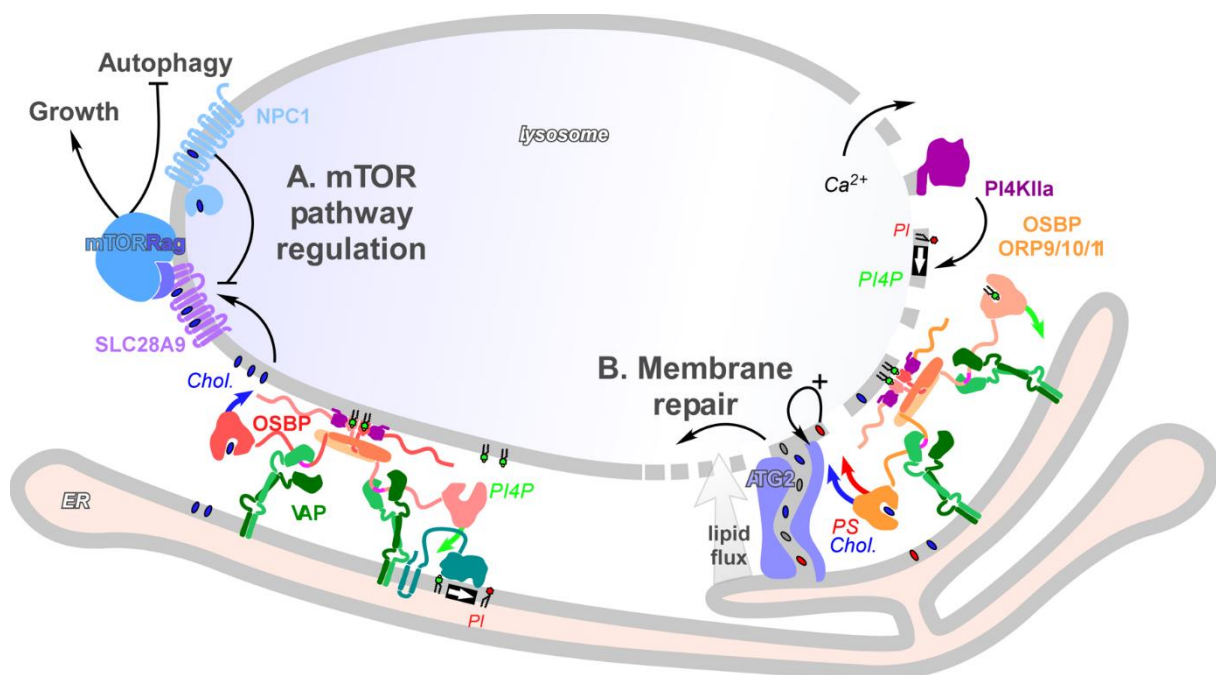
En inhibant les activités d'ORP4 et d'OSBP, les ORPphilins sont cytotoxiques pour des lignées cancéreuses après 48h de traitement (Roberts et al., 2019a). Cependant, l'implication d'OSBP dans la survie de ces cellules est inconnu. Par le contrôle des taux de PI4P et de cholestérol intracellulaire, OSBP régule plusieurs voies de signalisations comme la voie des MAP kinases. Lorsqu'elle est cytosolique, OSBP peut former un oligomère avec la phosphatase PP2A. Cet oligomère peut déphosphoryler ERK, un acteur majeur de cette voie de signalisation clé dans la prolifération cellulaire (Wang et al., 2005)(Wang et al., 2008). La voie JAK-STAT3 est elle aussi indirectement régulée par OSBP puisque la formation du complexe JAK2/STAT3 dépend des taux de stérol, la formation de ce complexe active des gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire (Romeo and Kazlauskas, 2008). OSBP est donc un bon candidat comme nouvelle cible pharmacologique anti-cancer.

Les ORPphilines sont donc des outils intéressants pour étudier non seulement OSBP dans le contexte cellulaire mais aussi ses partenaires et comprendre ses rôles dans les pathologies humaines. Notre équipe collabore avec l'équipe de Fanny Roussi à l'ICSN (Institut de Chimie des Substance Naturelle) qui nous aide dans cette démarche.

### *5) Autres MCSs où OSBP est active*

Comme mentionné précédemment, il existe des pools de PI4P dans les membranes d'autres compartiments cellulaires comme les endosomes, les lysosomes et même la membrane plasmique (Hammond et al., 2014). OSBP peut donc être recruté sur ces membranes. Le niveau de cholestérol lysosomal est régulés par la protéine NPC1 (Niemann-Pick type C-1), qui permet au cholestérol dérivé des LDL d'atteindre la membrane limitante du lysosome. Des niveaux élevés de cholestérol dans cette membrane activent un facteur d'échange (GEF) et l'activation des GTPases Rag. Les Rags permettent le recrutement de la protéine mTORC1 aux lysosomes où elle est active dans voies métaboliques importantes impliquées dans la croissance, la prolifération cellulaire et

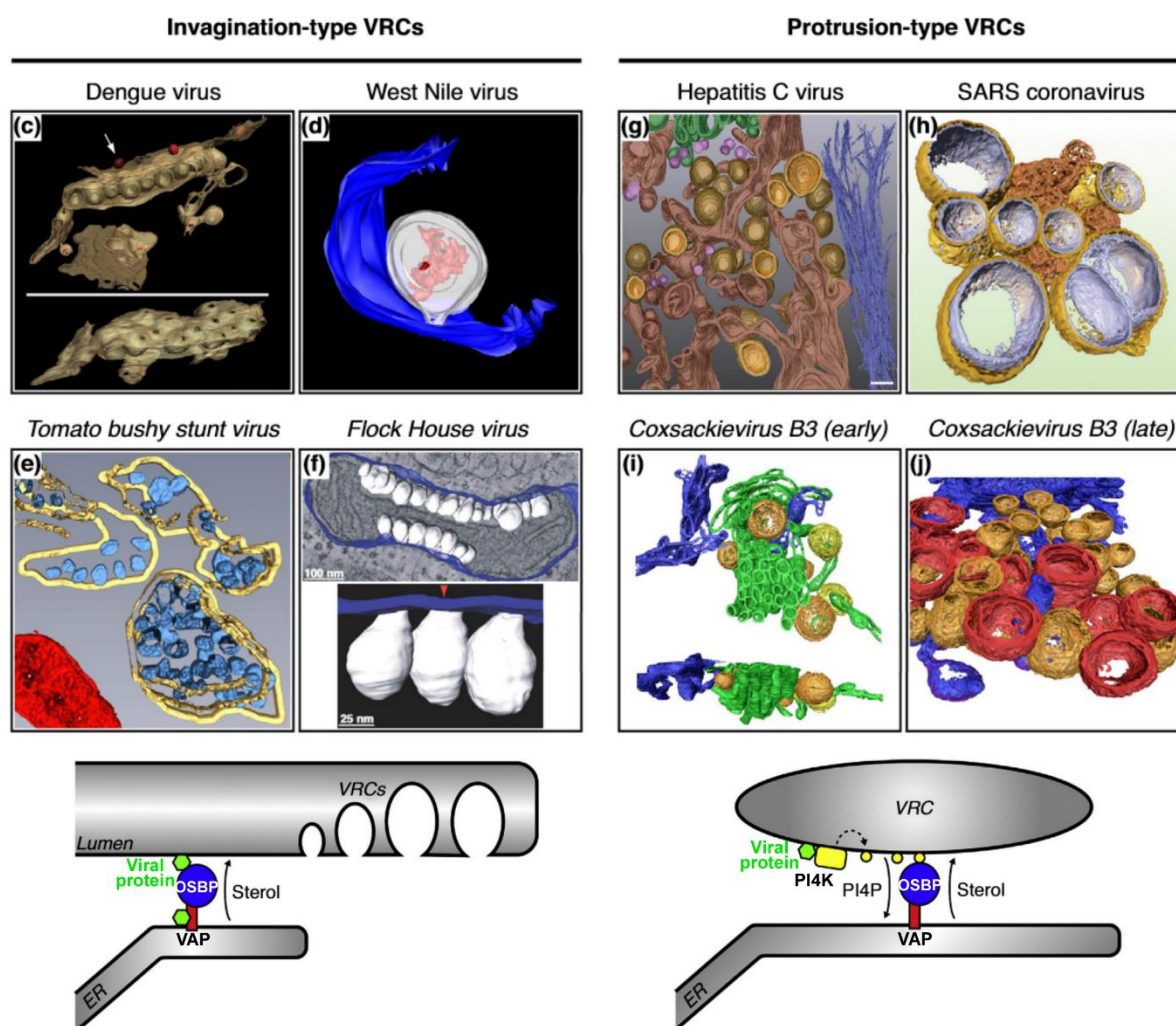
l'inhibition de l'autophagie (Höglinger et al., 2019). La perte de cette protéine dans la maladie de Niemann-Pick de type C entraîne une signalisation mTORC1 aberrante et un dysfonctionnement lysosomal et mitochondrial (figure 26A)(Lim et al., 2019)(Davis et al., 2021). De plus, deux études récentes décrivent un nouveau rôle pour le PI4P, OSBP et plusieurs ORPs dans la réparation de la membrane lysosomale (Radulovic et al., 2022; Tan and Finkel, 2022). La perméabilisation des lysosomes, qui se produit dans de nombreuses pathologies liées à l'âge, libère du calcium dans le cytosol. Cela conduit au recrutement de la kinase PI4KII $\alpha$  à la surface du lysosome, qui synthétise le PI4P et recrute ensuite OSBP, ORP9, ORP10 et ORP11. Par la suite, les MCSs RE/Lysosome médiés par OSBP/ORP et VAP-A conduisent à l'échange de cholestérol et de PS contre le PI4P qui aident à la réparation de la membrane. Il est à noter que le transport du PS vers les lysosomes active ATG2, une LTP de type tunnel, qui participe également à la réparation rapide du lysosome, amplifiant ainsi ce processus (figure 26B)(article 4)(Subra et al., 2023a).



**Figure 26 :** A) OSBP apporte le cholestérol au lysosome et permet ainsi l'activation de la voie mTORC1. Cette voie est exacerbée dans des cellules NPC1 KO (maladie de Niemann-Pick type C) car cette protéine permet de réguler le taux de cholestérol. Adapté de Lim et al., 2019. B) La perméabilisation du lysosome libère du calcium (Ca<sup>2+</sup>) qui recrute PI4KII $\alpha$ . Cette kinase synthétise le PI4P et recrute OSBP, ORP9, ORP10 et ORP11. Par la suite, les MCSs RE/Lysosome médiés par OSBP/ORP et VAP-A permettent l'échange de cholestérol et de PS qui aident à la réparation de la membrane. Le transport du PS active ATG2 qui participe également à la réparation rapide du lysosome. Adapté de Tan and Finkel, 2022.

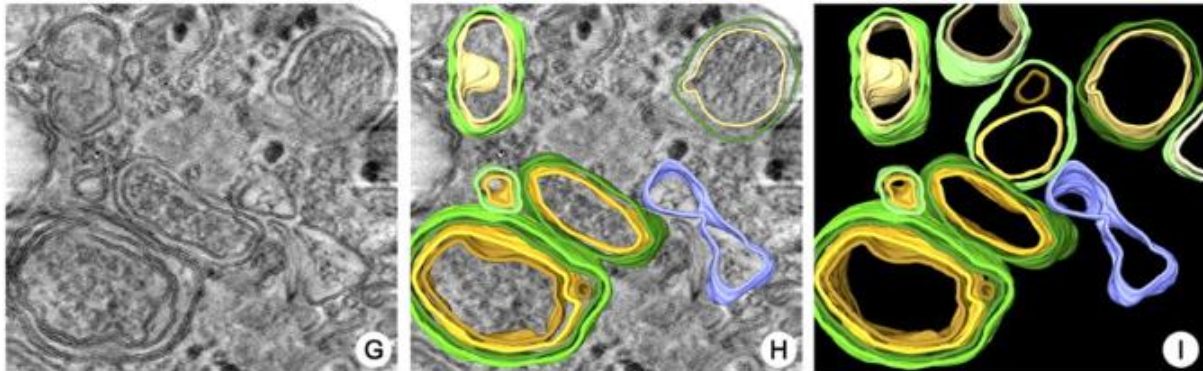
## 6) Détournement d'OSBP lors d'infections par des pathogènes

De nombreux virus à ARN simple brins à polarité positive (RNA(+)) comme le virus de l'hépatite C (HCV), le poliovirus, le virus de la dengue ou encore le SARS-COV2 détournent la machinerie sécrétoire de la cellule afin de fabriquer leurs organelles de réplication soit par invagination soit par protrusion d'une membrane déjà existante (figure 27)(Strating and van Kuppeveld, 2017) (Altan-Bonnet, 2017). Ces organelles de réplication sont très enrichies en PI4P afin de permettre l'ancrage de complexes d'ARN polymérase pour promouvoir la synthèse d'ARN viral et donc la réplication (Roulin et al., 2014)(Strating and van Kuppeveld, 2017)(figure 28). La PI4KIII $\beta$  ainsi qu'OSBP sont détournées pour apporter des lipides aux membranes de ces

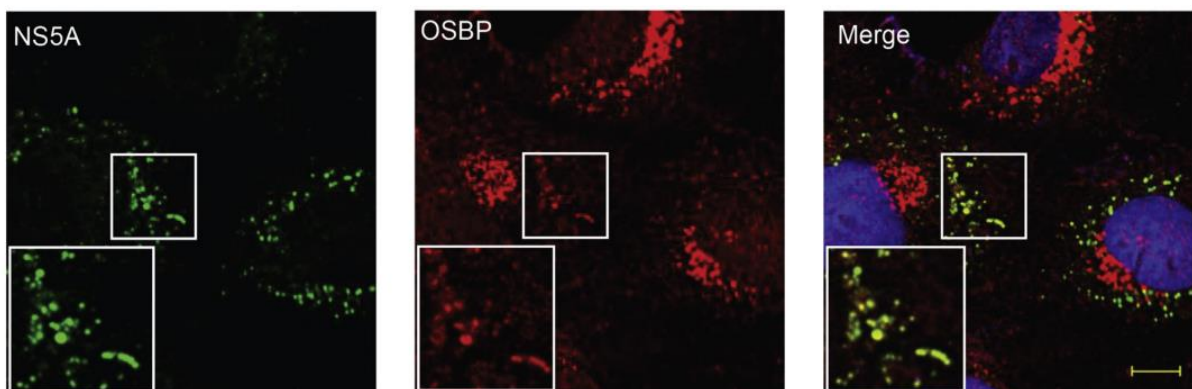


**Figure 27 :** Deux types d'organelles de réplication (VRC) : invagination ou protrusion. Reconstitution 3D de tomo-EM. L'échange lipidique opéré par OSBP dans les MCSs permet d'enrichir les organelles de réplication en cholestérol. Adapté de (Strating and van Kuppeveld, 2017).

compartiments (Wang et al., 2014). Il a d'ailleurs été montré que certains composés comme l'Itraconazole ou encore des ORPphillins (OSW-1) bloquent l'infection virale en inhibant l'activité d'OSBP (Strating et al., 2015)(Roberts et al., 2019b) (figure 29).

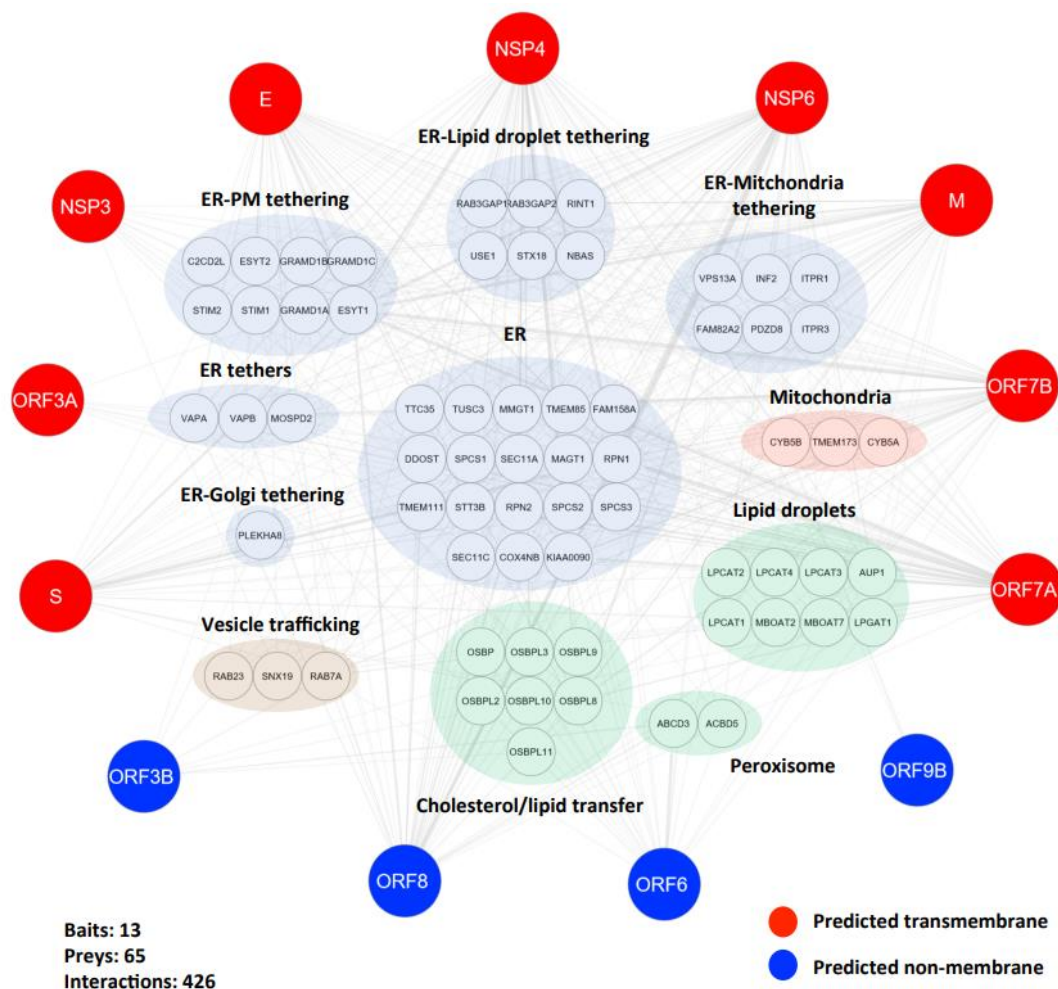


**Figure 28 :** Reconstitutions montrant l'architecture en 3D des organelles de réplifications à simple (en bleu) ou multi-membranes (jaune/vert) du poliovirus a un stade tardif de développement. Ces compartiments sont à l'origine des invaginations du Golgi (Belov et al., 2012).



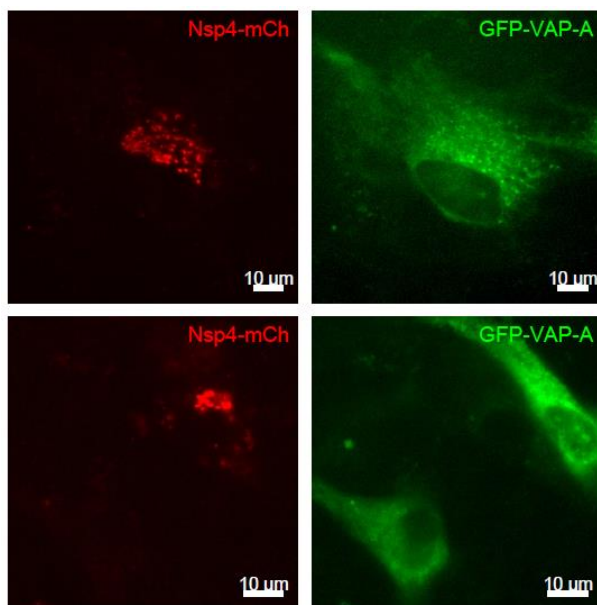
**Figure 29 :** Cellules JFH-1 infectées par le HCV. La protéine virale NS5A colocalise avec OSBP (Wang et al., 2014).

Lors du premier confinement, entre Mars et Mai 2020, j'ai contribué au clonage et à l'étude des protéines virales du SARS-CoV-2 (article 2)(Miserey-Lenkei et al., 2021). Au début de cette pandémie, des interactomes reliant les 26 protéines du virus à des protéines humaines ont été publiés (Gordon et al., 2020)(St-germain et al., 2020)(figure 30). Ces expériences de « proximity labelling » détectent la plupart des ORPs dont OSBP, beaucoup de protéines contenant un FFAT et par conséquent VAP-A et VAP-B. Le travail de notre équipe en collaboration avec celle de Bruno Goud (Institut Curie, Paris) a été de cloner chacune des protéines du virus en fusion avec des protéines fluorescentes vertes (EGFP) ou rouges (mCherry), afin de fournir une caractérisation dans différentes lignées cellulaires de la localisation de chacune. Nous avons ensuite partagé cette librairie pour faciliter des études plus approfondies (article 2)(Miserey-Lenkei et al., 2021). Nous



**Figure 30 :** Interactome généré par Bio-ID reliant les protéines du Sars-Cov2 à des protéines humaines, la plupart des « hits » sont des LTPs ou protéines enrichies dans les MCSs (St-germain et al., 2020).

savions que les virus Sars-Cov RNA(+) utilisent les protéines NSP3 et 4 (non structural protein) pour former les organelles de réplication (Oudshoorn et al., 2017) et que la formation de ce type d'organelles implique le détournement de la machinerie VAP/OSBP (Wang et al., 2014). De plus, NSP4 possède un motif FFAT. J'ai donc co-exprimé NSP4-mCherry et EGFP-VAP-A dans des cellules RPE1 afin d'examiner leur localisation. Ces expériences préliminaires ont montré que ces deux protéines ont la même localisation subcellulaire et que NSP4 entraîne un recrutement de VAP-A au niveau des MCSs RE/TGN (figure 31). Il semble donc que ces deux protéines interagissent mais la nature et la fonction de cette interaction reste à explorer, de plus, il serait intéressant de savoir si cet enrichissement de VAP-A dans la région proche du TGN conduit à un détournement de la protéine OSBP.



**Figure 31:** Colocalisation entre Nsp4-mCherry et GFP-VAP-A dans des cellules RPE1. Une cellule sur-exprimant Nsp4-mCherry montre un recrutement de GFP-VAP-A dans la région périnucléaire correspondant au Golgi (en haut). Dans les cellules qui n'expriment pas Nsp4, VAP-A est diffuse, cette localisation correspond au RE (en bas).

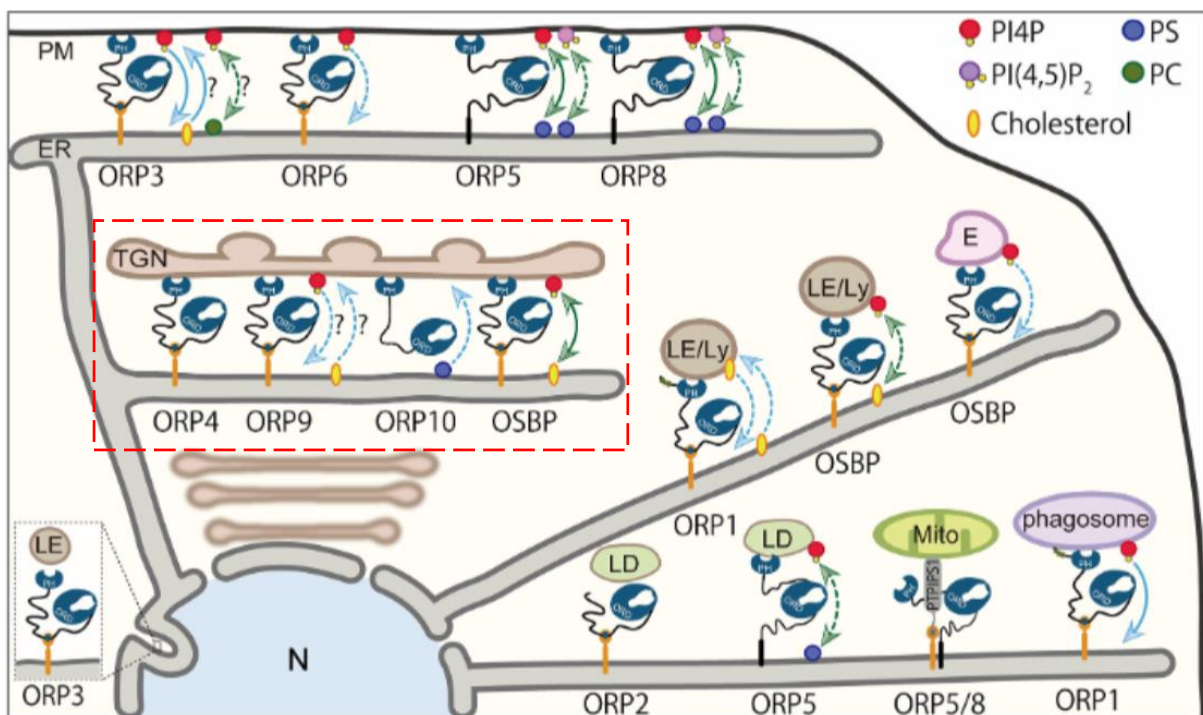
Il a été montré qu'OSBP est également détourné lors d'infections par certaines bactéries comme *Legionella pneumophila* pour la création de compartiments de réplication LCV (*Legionella* containing vacuole)(Vormittag et al., 2022). De plus, certains parasites protistes comme *Toxoplasma Gondii* ou encore *Plasmodium falciparum* possèdent des protéines proches d'OSBP qui pourraient être impliquées dans le transport de lipides entre la lumière intestinale de l'hôte et la

membrane des parasites, ceci étant indispensable au développement du parasite. Ces protéines pourraient donc être des nouvelles cibles thérapeutiques en cas d'infections (Zeng and Zhu, 2006).

Pour résumer, OSBP connecte les membranes de deux organelles grâce à sa partie N-terminale et transporte le cholestérol par contre-échange du PI4P entre ces deux membranes grâce à son domaine ORD situé en C-terminal. Son architecture en deux parties permet donc sa localisation et son activité. L'analyse de ses fonctions a permis de révéler l'existence d'un couplage spatio-temporel entre le transport de cholestérol et le turnover du PI4P. Il a ainsi été montré qu'OSBP gère la distribution du cholestérol ainsi que l'ordre des membranes dans l'ensemble de la cellule, et pour ça, elle consomme la moitié du PI4P cellulaire. Le modèle a pu être élargi à d'autres ORPs transportant d'autres types de lipides dans d'autres MCSs chez l'Homme mais aussi chez la levure. Par exemple ORP5 et 8 et leurs analogues Osh6 et 7 transportent la PS entre le RE et la membrane plasmique par contre échange de PI4P (Moser von Filseck et al., 2015)(Ghai et al., 2017). Les protéines Nir, des PITP, transportent ensuite le PI obtenu après hydrolyse du PI4P par Sac1 vers la membrane plasmique à la fin du cycle afin d'être phosphorylé de nouveau par une kinase pour reformer le pool de PI4P (Kim et al., 2015). Cette molécule est également indispensable pour le recrutement d'autres LTPs au sein des MCSs RE/TGN.

### 7) Autres ORPs enrichies aux MCSs RE/TGN

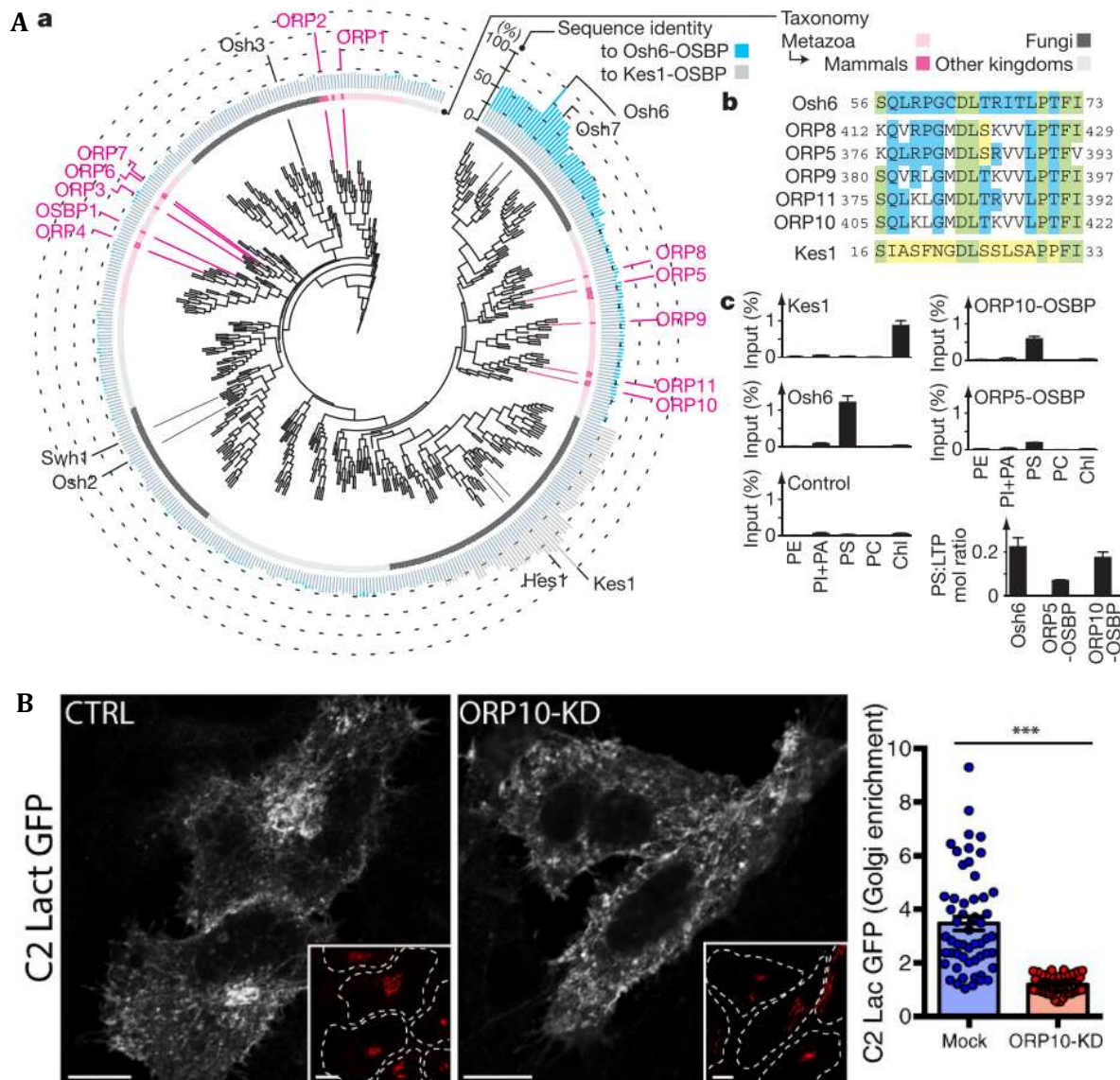
D'autres ORPs sont enrichies dans les MCSs RE/TGN (figure 32)(Nakatsu and Kawasaki, 2021). ORP4 (ou OSBP2) et ORP9 ont aussi un domaine PH, un motif FFAT et un domaine ORD. Leur architecture très proche de celle d'OSBP et certaines expériences de transfert *in vitro* indiquent qu'ORP4 pourrait lier et transférer le cholestérol et le PI4P entre le RE et le TGN (Wang et al., 2002)(Charman et al., 2014)(Wyles and Ridgway, 2004). Il semble donc qu'il y ait une redondance fonctionnelle entre certaines ORPs. Cependant l'abondance de ces protéines est inférieure à celle d'OSBP et dépend du tissu. Par exemple, ORP4 est principalement exprimée dans les cellules du testicule, du cœur et du cerveau (Udagawa et al., 2014).



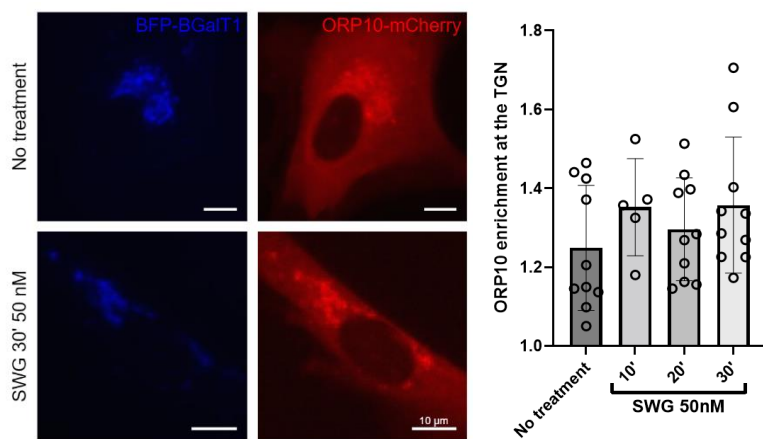
**Figure 32 : Echanges lipidiques opérés par les ORPs dans les MCSs.** MCSs RE/TGN encadrés en rouge. On peut également constater que d'autres ORPs fonctionnent de la même façon qu'OSBP au sein d'autres MCSs. Exemple d'ORP5 et 8 qui échangent la PS contre le PI4P aux MCSs RE/Membrane plasmique (Nakatsu and Kawasaki, 2021).



Des données expérimentales indiquent que ORP10 lie et transporte la PS du RE au TGN (Maeda et al., 2013)(Venditti et al., 2019)(figure 33). Cette protéine possède un domaine PH qui n'a pas été caractérisé. Néanmoins, mes données préliminaires indiquent que l'inhibition d'OSBP par la SWG induit un léger recrutement d'ORP10-mCherry au TGN (figure 34). Ceci suggère que le domaine PH d'ORP10 reconnaît le PI4P et que sa localisation subcellulaire dépend de l'activité

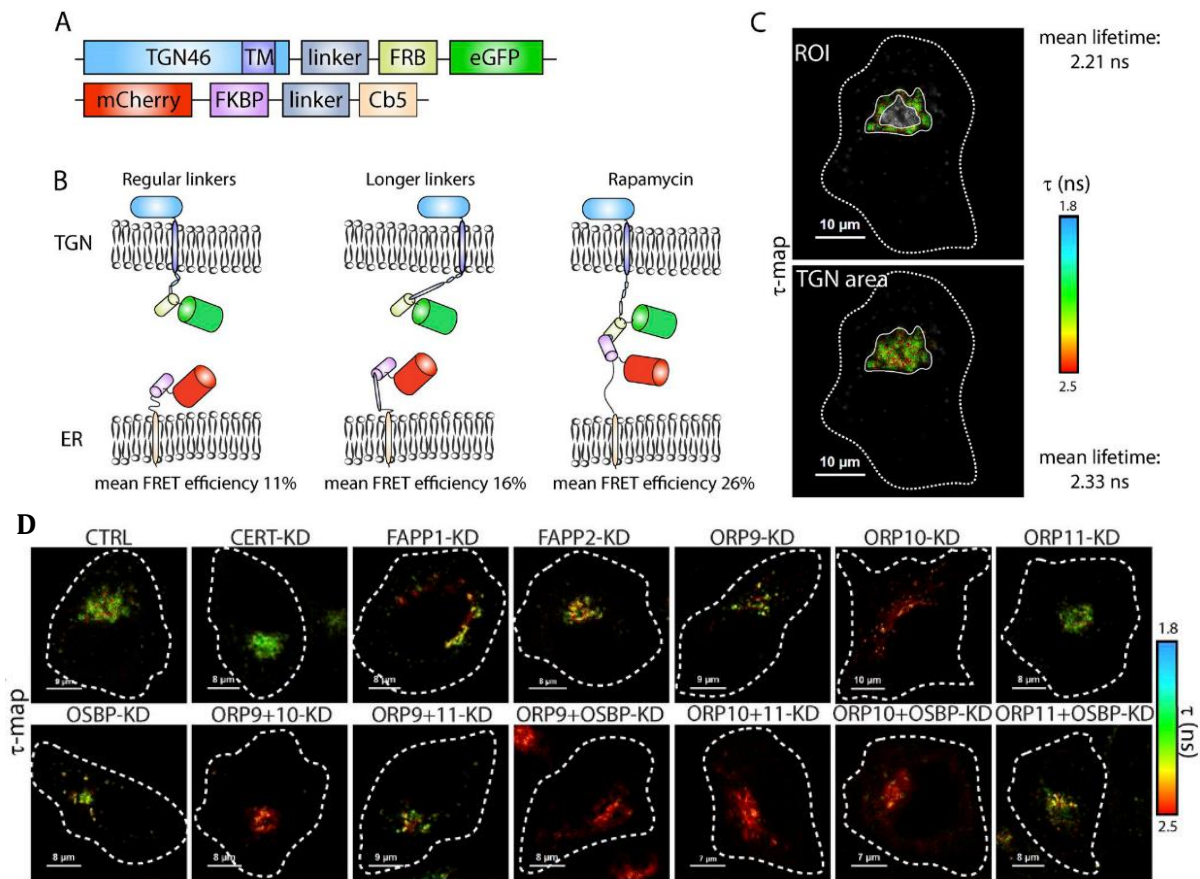


**Figure 33 :** A a) Analyse phylogénétique des domaines ORDs de différentes ORPs (en rose) et Osh (en noir). Identités de séquences avec Osh6 et Osh4 (Kes1) représentées par des histogrammes. b) Conservation de séquences dans la poche à lipide du domaine ORD. c) Les domaines ORD de ORP5, 8 et 10 lient du PS *in vitro* (Maeda et al., 2013). B) Distribution du PS dans des cellules Hela témoins et KO pour ORP10 en utilisant le domaine C2 de la lactadhérine (LactC2-GFP, sonde spécifique du PS). Les encarts montrent un marqueur du Golgi. Le KO d'ORP10 entraîne une diminution du PS au Golgi (Venditti et al., 2019).



**Figure 34 :** Données préliminaires. ORP10-mCherry surexprimée dans des RPE1 est localisée au TGN (marqué en bleu par BGal-T1). L'inhibition d'OSBP par la SWG induit un léger recrutement d'ORP10 au TGN. Ce traitement court est peut-être insuffisant pour recruter ORP10.

d'OSBP, ces éléments sont à confirmer. Cette protéine ne possède pas de motif FFAT, elle n'est donc pas liée au RE par VAP-A mais de façon surprenante, il a été montré qu'ORP10 est indispensable à la formation des MCSs RE/TGN (Venditti et al., 2019)(figure 35). La formation d'hétérodimères avec d'autres ORP (9 et 11) possédant un motif FFAT a été montrée aux MCSs RE/Lysosomes (Tan and Finkel, 2022) et RE/endosomes. Au sein de ces derniers MCSs, ORP10 transporte le PS par contre échange de PI4P et ainsi, régule la fission des endosomes (Kawasaki et al., 2021). Cette protéine est 10 fois moins abondante qu'OSBP (environ 66 000 copies par cellules contre 350 000 copies pour OSBP dans les cellules Hela (Itzhak et al., 2016)). La machinerie de transfert de PS entre le RE et le Golgi est peu connue, les pools de PS les plus importants se trouvent à la membrane plasmique et proviennent directement du RE transportés par ORP5 et 8. Nous avons disséqué la régulation du cycle d'OSBP mais il reste beaucoup à explorer sur les autres ORPs et sur d'éventuelles coopérations entre les différentes LTPs qui co-existent au sein des MCSs RE/TGN.

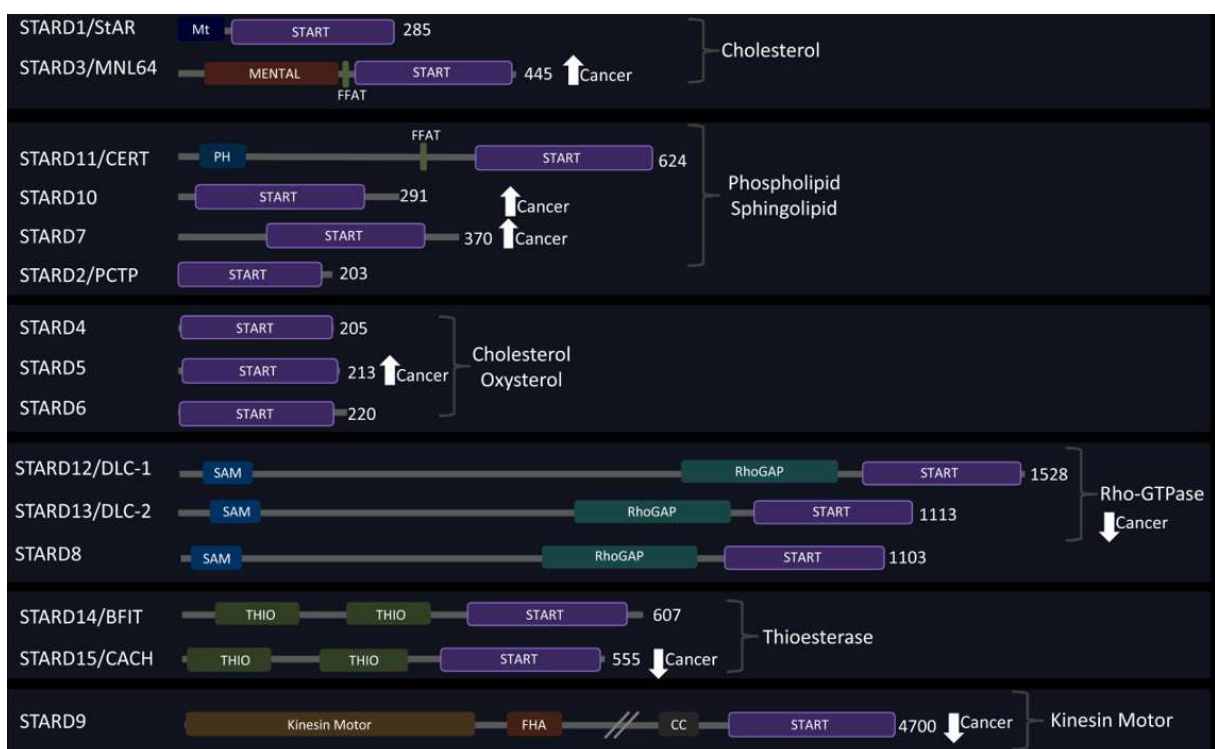


**Figure 35 :** A-C) FRET-FLIM, une autre méthode pour étudier les MCSs *in cellula*, basée sur le signal de FRET émis lorsque la GFP liée à une protéine du TGN rencontre la m-Cherry liée à une protéine du RE. La méthode d'imagerie FLIM permet de mesurer  $\tau$  la durée de vie du signal fluorescent qui est inversement-proportionnel au signal de FRET puisque le signal GFP est perdu lorsque le FRET se produit. Les valeurs  $\tau$  sont représentées par une échelle en pseudo-couleurs allant de 1,8 à 2,5 ns. Un temps de vie court correspond donc à un signal de FRET fort. D) Inhibition de synthèse de différentes ORPs par des siRNA et observation du maintien des MCSs RE/TGN : l'absence d'ORP10 empêche la formation des MCSs (Venditti et al., 2019).

### ii Etude des STARTs, exemple de CERT

CERT (Ceramid transfert protein) est une LTP découverte dans les années 2000 par l'équipe de Hanada. Cette protéine est capable de transporter le céramide entre le RE et le TGN (Hanada et al., 2003). Comme OSBP, elle est active dans les MCSs. CERT (ou STARD11) fait partie de la famille des protéines STARTs (StAR (steroidogenic acute response) related lipid transfer) (figure 36)(Peretti et al., 2020). Les STARTs transportent différents types de ligands, elles impactent donc le trafic lipidique intracellulaire dans son ensemble, et de ce fait, ont un rôle dans différents contextes physiopathologiques (Clark, 2012). A cette famille s'ajoute une dizaine de

protéines appelées *START-like* qui ne partagent pas de similarité de séquence avec le domaine START mais qui possèdent une poche hydrophobe de conformation tridimensionnel similaire, ces protéines peuvent avoir un domaine GRAM permettant un recrutement à la membrane plasmique. Elles peuvent aussi échanger des lipides comme le cholestérol (Naito et al., 2019). Les STARTs et les *START-like* font partie de la superfamille des STARKin qui comprend également les PITPs (transportant du PI, du PC et du PA), les PRELI (PA et PS) et les LAMs (LTPs ancrées aux MCSs) qui transportent du cholestérol (Wong and Levine, 2016)(Naito and Saheki, 2021).

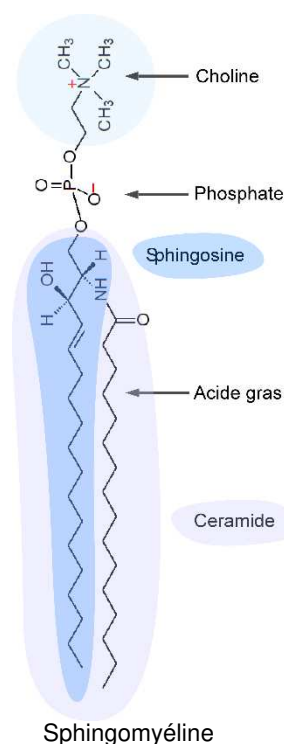


**Figure 36 : Les protéines STARTs.** Les 15 membres de cette famille possèdent un domaine START en C-terminal. Ce domaine comprend une poche hydrophobe capable de lier spécifiquement un lipide, indiqué à droite. L'expression de certaines STARTs est dérégulée dans des cas de cancers (Peretti et al., 2020).

## 1) Organisation et fonctionnement

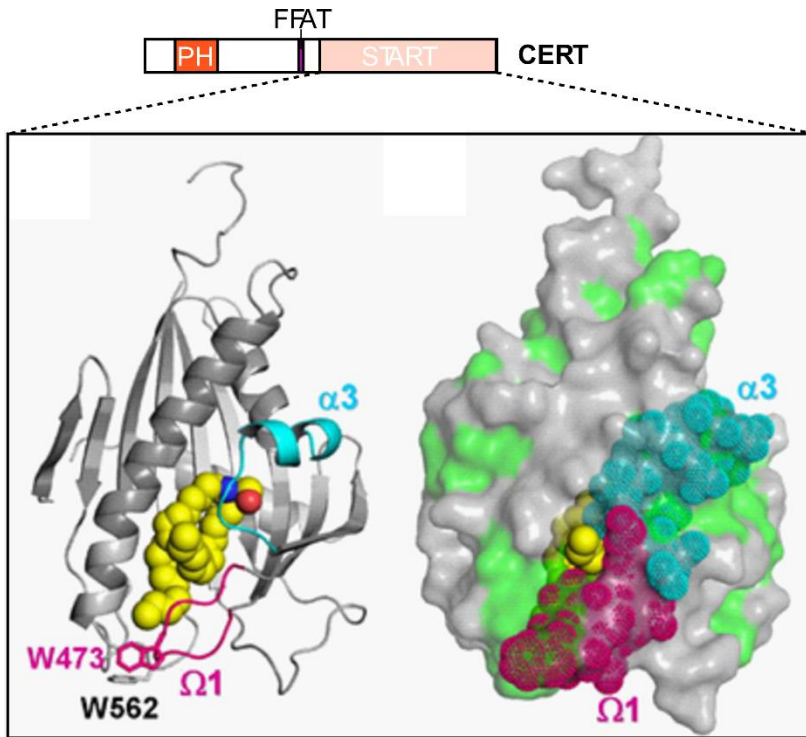
Le céramide est le précurseur de la sphingomyéline (SM), un lipide qui comporte une tête polaire identique à celles de la PC, et un acide gras branchés sur une sphingosine (figure 37). Le taux d'insaturation des chaînes carbonées des SM est très pauvre, c'est pourquoi ce lipide a tendance, comme le cholestérol, à ordonner les membranes. D'ailleurs, il est très présent dans les membranes tardives : la membrane plasmique en comporte 16%. Ces lipides sont essentiels dans la composition des membranes puisqu'ils influencent fortement leurs propriétés physico-chimiques. De plus, le cholestérol a tendance à s'associer aux SM formant des micro domaines très ordonnés (Ohvo-Rekilä, 2002). La SM est synthétisée

au TGN à partir du céramide par la sphingomyéline synthase (SMS)(Kolesnick, 1991). Le céramide qui alimente cette réaction est lui synthétisé au RE et est ensuite transporté par CERT aux MCSs RE/TGN, via son domaine START. La structure cristallographique du domaine START de CERT a été résolue en 2008 en complexe avec le céramide (figure 38)(Kudo et al., 2008). Il a été reporté que CERT est aussi capable de transporter du DAG (diacylglycérol) qui a une structure proche du céramide (Kumagai et al., 2005). Aucune donnée n'est publiée à ce jour sur l'état oligomérique de CERT. Cependant, des programmes comme Marcoil ou Multicoil prédisent qu'une hélice- $\alpha$  serait capable de former un coiled-coil en amont du domaine START, ceci pourrait permettre la dimérisation de CERT. De plus, le modèle correspondant à cette région proposé par AlphaFold ressemble à la région de dimérisation d'OSBP. En aval de cette région, CERT possède un motif



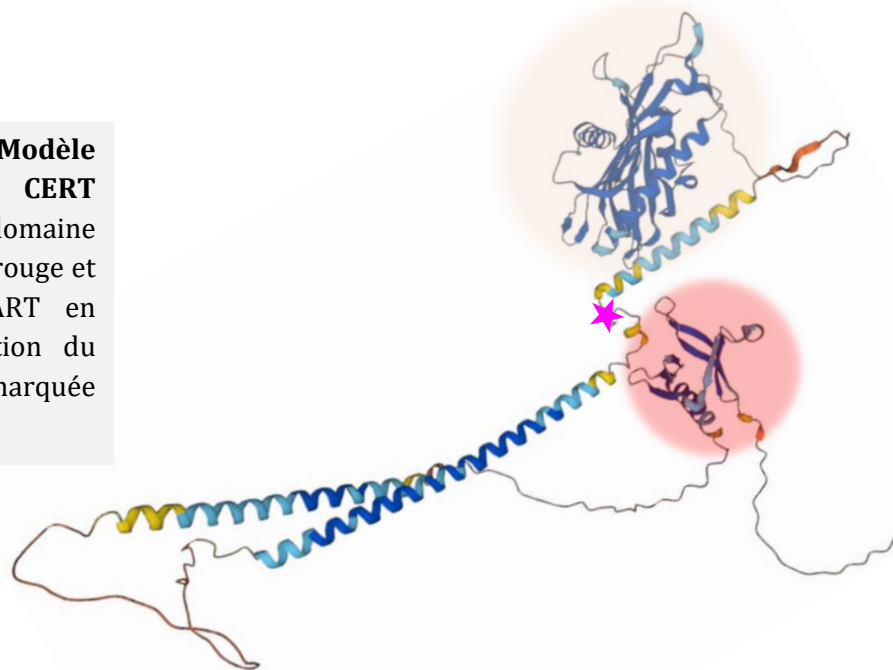
**Figure 37 : Structure chimique de la sphingomyéline.**

FFAT lui permettant, comme OSBP, de se lier aux récepteurs VAP du RE et, en N-terminal, un domaine PH, reconnaissant le PI4P au TGN (figure 39).

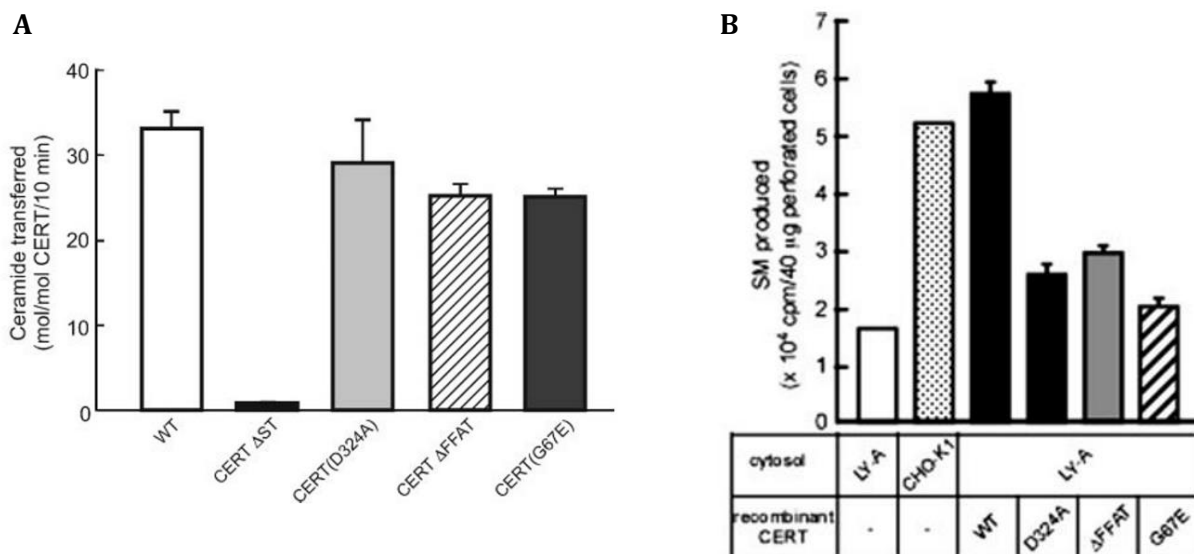


**Figure 38 : Structure du domaine START de CERT avec un céramide (jaune) inséré dans la poche hydrophobe du domaine. Selon Kudo et al., 2008, l'hélice  $\alpha 3$  et la boucle  $\Omega 1$  constituent un couvercle pour ouvrir et fermer la cavité et les tryptophanes exposés à l'extérieur (résidus W) pourraient lier la membrane afin d'extraire ou de transférer le céramide. Représentation en ruban à gauche et en surface à droite.**

**Figure 39 : Modèle Alphafold de CERT (Humaine).** Le domaine PH est repéré en rouge et le domaine START en orange. La position du motif FFAT est marquée par une étoile.



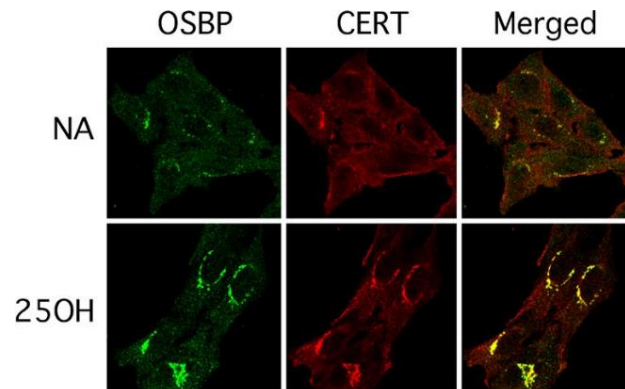
CERT possède donc les mêmes attribus qu'OSBP pour être recruté aux MCSs RE/TGN. Cependant, les expériences de transfert réalisées *in vitro* en 2006 n'indiquent pas que le tethering est indispensable à l'activité de CERT. Le transfert de ceramide est seulement légèrement ralenti par des mutations du motif FFAT ou du domaine PH (figure 40A). En revanche, dans un système cellulaire il a été montré que ces mutants sont peu actifs (figure 40B). Notons que le système de reconstitution *in vitro* utilisé à cette époque ne comportait pas VAP pour la liaison du motif FFAT et pas de PI4P pour permettre la liaison du domaine PH. De ce fait l'activité de CERT mesurée dans ces expériences pourrait être sous estimée (Kawano et al., 2006). Depuis, aucune expérience de reconstitution complète n'a été effectuée avec CERT mais les expériences menées sur OSBP nous permettent de comprendre que l'activité optimale de ces protéines nécessite le pontage membranaire via la liaison à VAP et au PI4P (Mesmin et al., 2013).



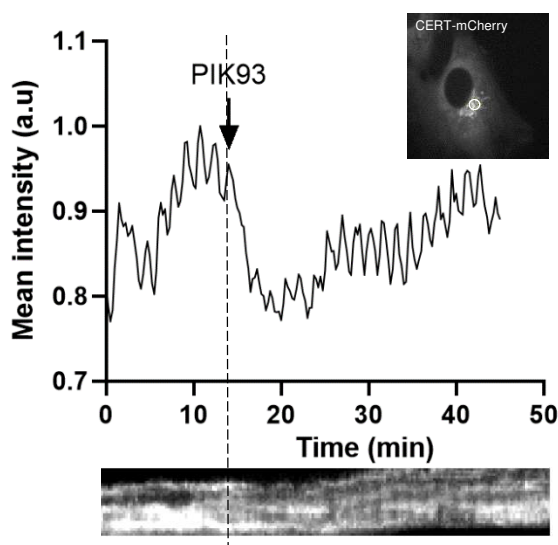
**Figure 40 : Activité de CERT.** A) L'activité de transfert de céramide par CERT a été mesurée *in vitro* dans un système reconstitué avec des liposomes et des lipides radioactifs. CERT transfère environ 3 céramides par minutes, ce système est inefficace en absence du domaine START ( $\Delta$ ST) et légèrement ralenti avec les mutations suivantes : D324A (mutation dans le motif FFAT),  $\Delta$ FFAT ou G67E (mutation dans le domaine PH). B) l'activité de CERT influence directement la synthèse de SM : le taux de SM produit par des cellules déficientes pour CERT (LY-A) est nettement inférieur aux cellules contrôles (CHO-K1). Cet effet est réversé par CERT WT mais pas par les mutants. Les cellules LY-A ou CHO-K1 perforée ont été incubées avec du céramide radioactif [<sup>3</sup>H] puis avec les protéines recombinantes : CERT WT ou les mutants. La radioactivité de la SM [<sup>3</sup>H] produite a été ensuite déterminée (Kawano et al., 2006).

## 2) Dépendance à OSBP

CERT est la seule protéine de la famille des START qui possède un domaine PH en N-terminal. Comme mentionné précédemment, le domaine PH reconnaît le PI4P (Lemmon, 2008), très abondant au TGN. Ceci entraîne CERT aux mêmes MCSs qu'OSBP. OSBP contrôle le taux de PI4P au TGN, ceci implique que le recrutement de CERT par son domaine PH est contrôlé par l'activité d'OSBP. En effet, le blocage de l'activité d'OSBP par traitement au 25-OH entraîne un recrutement d'OSBP (comme mentionné précédemment figure 19) mais aussi de CERT au TGN (figure 41)(Perry and Ridgway, 2006). Par ailleurs, mes données expérimentales indiquent que lors de l'inhibition de la PI4KIII $\beta$ , CERT oscille de la même façon qu'OSBP dans les MCSs RE/TGN (revoir figure 21)(figure 42). Ce qui suggère que la localisation de CERT dépend fortement de l'activité d'OSBP et des pools de PI4P qu'elle contrôle.



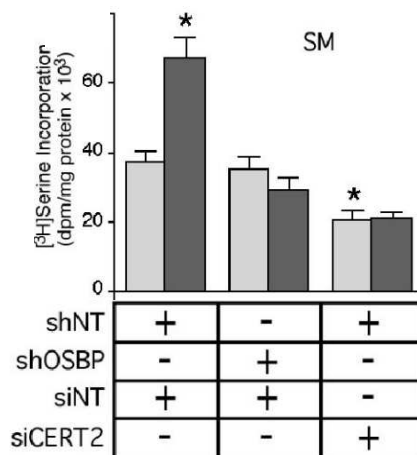
**Figure 41 : La localisation de CERT dépend de l'activité d'OSBP.** Immunofluorescence de OSBP et CERT endogènes dans des cellules traitées ou non avec le 25-OH, inhibiteur d'OSBP. L'inhibition d'OSBP entraîne une accumulation d'OSBP et de CERT au TGN (Perry and Ridgway, 2006).



**Figure 42 : Vagues de CERT-mCherry au TGN** lors de l'inhibition de la PI4KIII $\beta$  par PIK93. Le kymographe et les mesures d'intensité sont obtenus à partir de la région entourée dans le Golgi. Données non publiées.

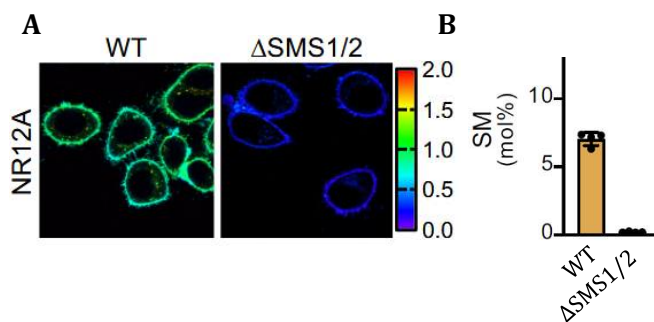


Les travaux de l'équipe de Hanada ont permis de disséquer le rôle de CERT dès les années 2000. Il a été démontré que son activité de transfert de céramide influence directement les taux de SM intracellulaire et que ceci est régulé par l'activité d'OSBP. En effet, l'inhibition de l'activité de transfert de lipides par OSBP entraîne un recrutement de CERT au TGN (figure 41) et une augmentation de son activité : une fois recrutée, elle transporte d'avantage de céramide du RE au TGN et celui-ci est ensuite converti en SM par la SMS, on observe donc une forte augmentation du taux de SM en lipidomique (figure 43)(Perry and Ridgway, 2006)(Banerji et al., 2010). A cette époque le



**Figure 43 : Effet du silencing d'OSBP et/ou CERT sur la SM.** Expérience de lipidomique indiquant que l'inhibition d'OSBP par le 25-OH (barres gris foncé) induit une forte augmentation du taux de SM (colonne 1). Cet effet est annulé lorsque la synthèse d'OSBP est bloquée par siRNA (colonne 2). Supprimer CERT entraîne une baisse de la SM et annule l'effet 25-OH (colonne 3) (Perry and Ridgway, 2006).

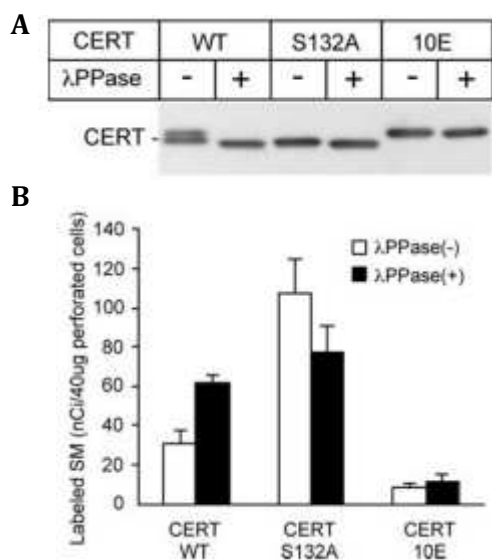
mécanisme reste incompris car les connaissances sur le fonctionnement d'OSBP et le turnover de PI4P sont insuffisantes. Aujourd'hui nous pouvons interpréter ces résultats de la façon suivante : si l'activité de transfert de lipides d'OSBP est bloquée avec un traitement au 25-OH, l'accumulation de PI4P au TGN induit un recrutement des protéines avec un domaine PH comme CERT. Et le taux de SM intracellulaire augmente, reflétant l'activité de CERT. De plus, l'association du cholestérol avec la SM dans les membranes renforce le lien entre l'activité de CERT et celle d'OSBP. Ces lipides sont indispensables pour maintenir l'ordre dans les membranes tardives. A ce sujet, des données récentes montrent que la déletion des SMS 1 et 2 par CRISPR-Cas9 Knock Out (KO) perturbe drastiquement l'ordre de la membrane plasmique, observé avec la sonde ratiométrique NR12A (Sokoya et al., 2022)(figure 44).



**Figure 44 : Le taux de SM influence l'ordre des membranes.** A) L'ordre des lipides signalés par la sonde solvatochromique NR12A dans le feuillet externe de la membrane plasmique des cellules KO pour les SMS est réduit par rapport aux cellules sauvages. B) Ces cellules KO ont un taux de SM fortement diminué, mesuré en lipidomique. (Sokoya et al., 2022).

### 3) Régulation par phosphorylation

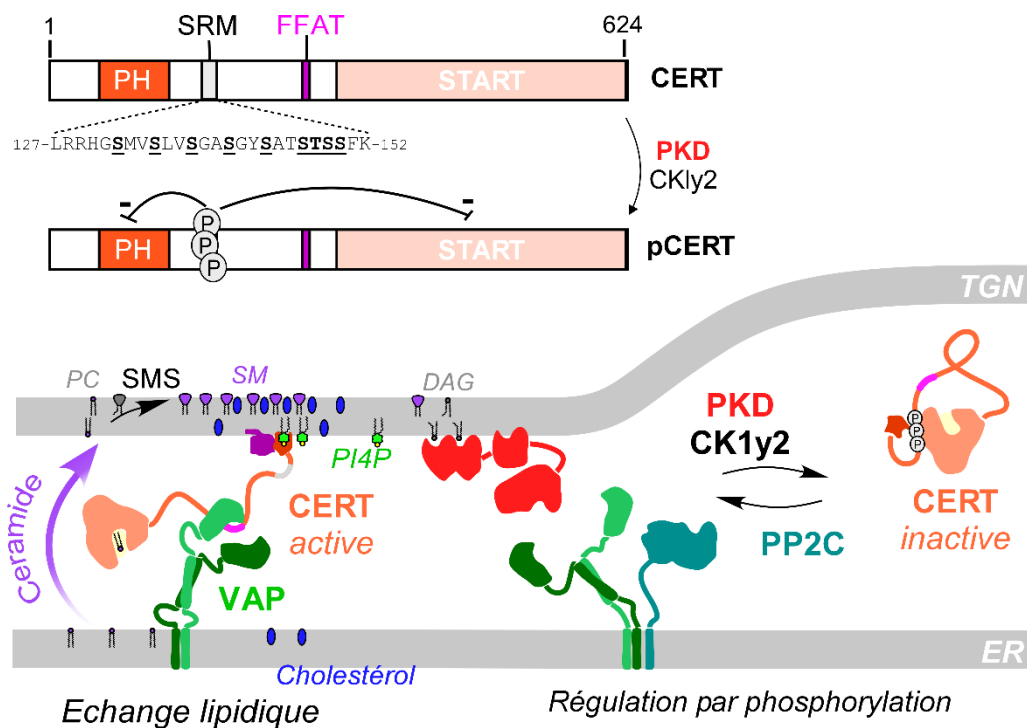
L'activité de CERT est aussi régulée par la phosphorylation de sa région SRM (sérine repeat motif) (figure 45 et 46). Il s'agit d'un motif contenant 8 sérines et une thréonine, situé en aval du domaine PH. Deux kinases peuvent phosphoryler ce motif : la PKD (proteine kinase D)(Fugmann et al., 2007) et la CK1y2 (casein kinase 1 y2)(Tomishige et al., 2009). Un mutant de CERT non phosphorylable montre une activité exacerbée (le taux de SM est augmenté), alors qu'un phosphomimétique inhibe son activité (figure 45)(Kumagai et al., 2007). La phosphorylation inhibe donc l'activité de CERT. Dans ce contexte, le domaine PH et le domaine



**Figure 45 : Régulation de CERT par phosphorylation.** A) Analyse de mutants de CERT par Western Blot. CERT WT peut être phosphorylé ou non, c'est pourquoi on peut voir deux bandes sur le blot, la phosphorylation implique une petite différence de taille. En présence de Phosphatase λPPase, seule la forme non phosphorylée subsiste (histogrammes noirs en B). Le mutant S132A est non phosphorylable et le mutant 10E est un phosphomimétique. B) Ces mutants sont exprimés dans des cellules Hela puis les taux de SM de ces cellules sont analysés pour refléter l'activité de transfert de céramide par CERT (Kumagai et al., 2007).

START sont inhibés : CERT ne reconnaît plus le PI4P au TGN et ne peut plus transférer le céramide, la protéine est cytosolique. Il a été montré que la répression de liaison au PI4P est résolue par l'élimination du domaine START, de même que la répression de l'activité de transfert de céramide

est résolue par la suppression du domaine PH. Ces observations ont conduit à la supposition que la phosphorylation entraîne un repliement de CERT, le domaine PH serait en interaction avec le domaine START (Prashek et al., 2017)(Sugiki et al., 2018). Cette inhibition est reversée par la phosphatase PP2Cε ancrée au RE, qui permet la déphosphorylation du SRM et donc l'activation de CERT (Saito et al., 2008). Ainsi l'activité de CERT est doublement régulée, d'une part par le taux de PI4P au TGN dépendant de l'activité OSBP, et d'autre part par phosphorylation. La phosphorylation dépend de la propre activité de CERT puisque le transfert de céramide permet la synthèse de SM, qui génère du DAG. Le DAG permet le recrutement de la PKD qui inactive CERT par phosphorylation. Cette boucle permet un rétrocontrôle négatif de l'activité de CERT (figure 46)(Villani et al., 2008)(Kumagai and Hanada, 2019)(Hanada et al., 2009)(Mesmin et al., 2019). La phosphorylation de CERT se produit seulement si les niveaux de SM dans la cellule sont importants. Le système PKD/PP2Cε permet donc le maintien du niveau de SM constant.



**Figure 46 : CERT, activité et régulation.** Sous sa forme active, CERT est recrutée aux MCSs RE/TGN grâce à son domaine PH et son motif FFAT et y transporte le céramide. Celui-ci est ensuite converti en SM par la SMS qui utilise la PC comme substrat. Le DAG est le second produit de la réaction. Le DAG permet l'ancrage de la PKD au TGN (Villani et al., 2008). Cette kinase phosphoryle CERT qui change de conformation et passe sous sa forme cytosolique inactive. CERT peut être déphosphorylée par la phosphatase PP2Cε pour revenir à l'état initial. Adapté de (Mesmin et al., 2019).

Il n'y a pas d'analogue de CERT chez la levure mais la protéine Nvj2 (TEX2 chez l'Homme) peut remplir la fonction de transport de céramide du RE au TGN (Liu et al., 2017). TEX2 participe aussi à la formation des MCSs RE/lysosome et au maintien de leur composition lipidique (Du et al., 2023). Comme OSBP, il a été montré que CERT peut être détournée par certains pathogènes comme les *Chlamydiae* pour former des MCSs entre le RE et les compartiments de réplication bactériens appelés inclusion, afin d'acquérir les lipides de la cellule hôte (Derré et al., 2011)(Derré, 2015).

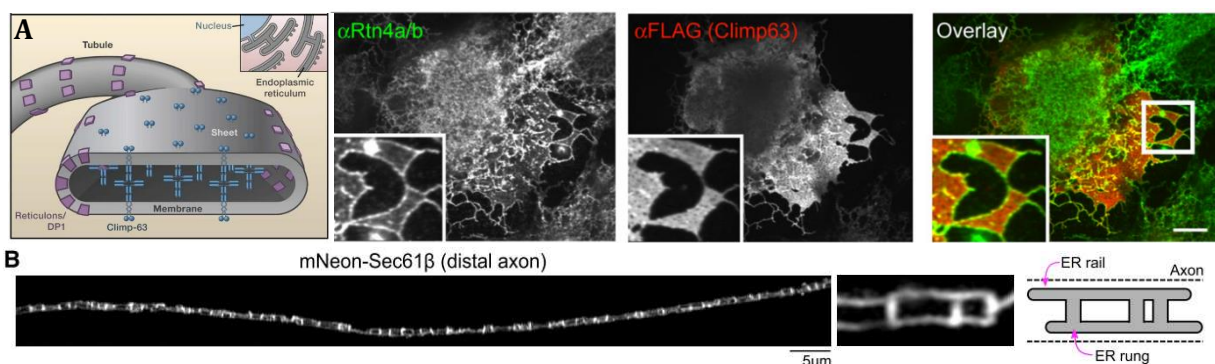
Le transport des lipides qui fait suite à leur synthèse au RE est un événement essentiel pour la biogénèse des membranes et le contrôle précis de leur composition. Cette régulation est assurée par les LTPs. J'ai détaillé ici les échanges lipidiques majeurs qui ont lieu au sein des MCSs RE/TGN, mais ce type de mécanismes d'échange, de contre-échange, de coopération entre différentes LTPs et de régulation se produisent très probablement dans tous les MCSs. Les MCSs jouent un rôle important dans la physiologie des membranes cellulaires et nous allons voir dans les prochains paragraphes qu'ils conditionnent aussi la dynamique des organelles, notamment par le biais des échanges lipidiques.

### **(b) La dynamique et la morphologie des organelles**

Le RE joue un rôle central dans la communication entre organelles, en effet, il est le mieux placé morphologiquement pour former des MCSs avec chacune d'elles. Il constitue l'enveloppe nucléaire et s'étend en formant un vaste réseau dans le cytoplasme. Dans les années 50, Georges E. Palade et Keith R. Porter effectuent des travaux majeurs sur cette organelle. En observant le RE par microscopie électronique, Palade décrit des tubules entremêlés d'un diamètre variable (50-300 nm), sans structure interne apparente et ayant une membrane fine et très dense. Ce vaste réseau tridimensionnel est présent dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception des érythrocytes matures (Porter, KR. Palade, 1957). Le principal rôle attribué au RE dans les années 70 est la synthèse et le stockage des protéines. Plus tard, on découvre que de nombreuses voies de synthèse de lipides se font aussi au RE. En effet, la plupart des lipides constituant les

membranes cellulaires proviennent du RE lors d'une synthèse *de novo*, sinon, ils proviennent du milieu extérieur ou sont recyclés (Harayama and Riezman, 2018).

La morphologie d'une organelle n'est pas anodine, elle peut déterminer son rôle et son état. Par exemple, le RE comprend deux grandes régions qui se distinguent par leur morphologie, en tubules et en feuillettes ou citernes (Staehelein, 1997). Cette morphologie est déterminée et régulée par les protéines et les lipides qui s'y trouvent. Les protéines de la famille des réticulons comme DP1 ou Yop1p se lient aux membranes très courbées des tubules et stabilisent ces structures (Voeltz et al., 2006)(Zurek et al., 2011). Au contraire, certaines protéines sont retrouvées dans les régions en feuillettes, qui sont plus plates, comme Climp63 qui permet d'agrandir la lumière du RE en espaçant les membranes (Shibata et al., 2010). La proportion de feuillettes et de tubules dépend du type cellulaire et n'est pas figée. D'ailleurs, la surexpression de l'une de ces protéines accentue un phénotype au détriment de l'autre. Une cellule sécrétrice qui produit beaucoup de protéines possède plus de feuillettes tandis qu'une cellule neuronale a un large réseau tubulaire. Une étude récente indique que dans les axones, les tubules du RE ont une organisation très particulière en forme d'échelle. Cette organisation serait indispensable au trafic vésiculaire axonal (Zamponi et al., 2022) (figure 47). La structure du RE est dynamique, guidée par le cytosquelette (Terasaki et



**Figure 47 : Forme du RE.** A) On distingue deux types de morphologies pour le RE : en feuillet, autour du noyau et en tubules aux extrémités de la cellule. Par immunofluorescence on observe les protéines du réticulon (Rtn4a/b) enrichies dans les régions où les membranes sont très courbées : les tubules et les bords des feuillettes, tandis que Climp63 est enrichie uniquement dans les feuillettes (Shibata et al., 2010). B) Le RE est organisé en échelle dans la partie distale des axones. Structure observée dans des neurones de rat grâce à l'expression de la protéine du RE Sec61β fusionnée à la protéine fluorescente mNeon (Zamponi et al., 2022).

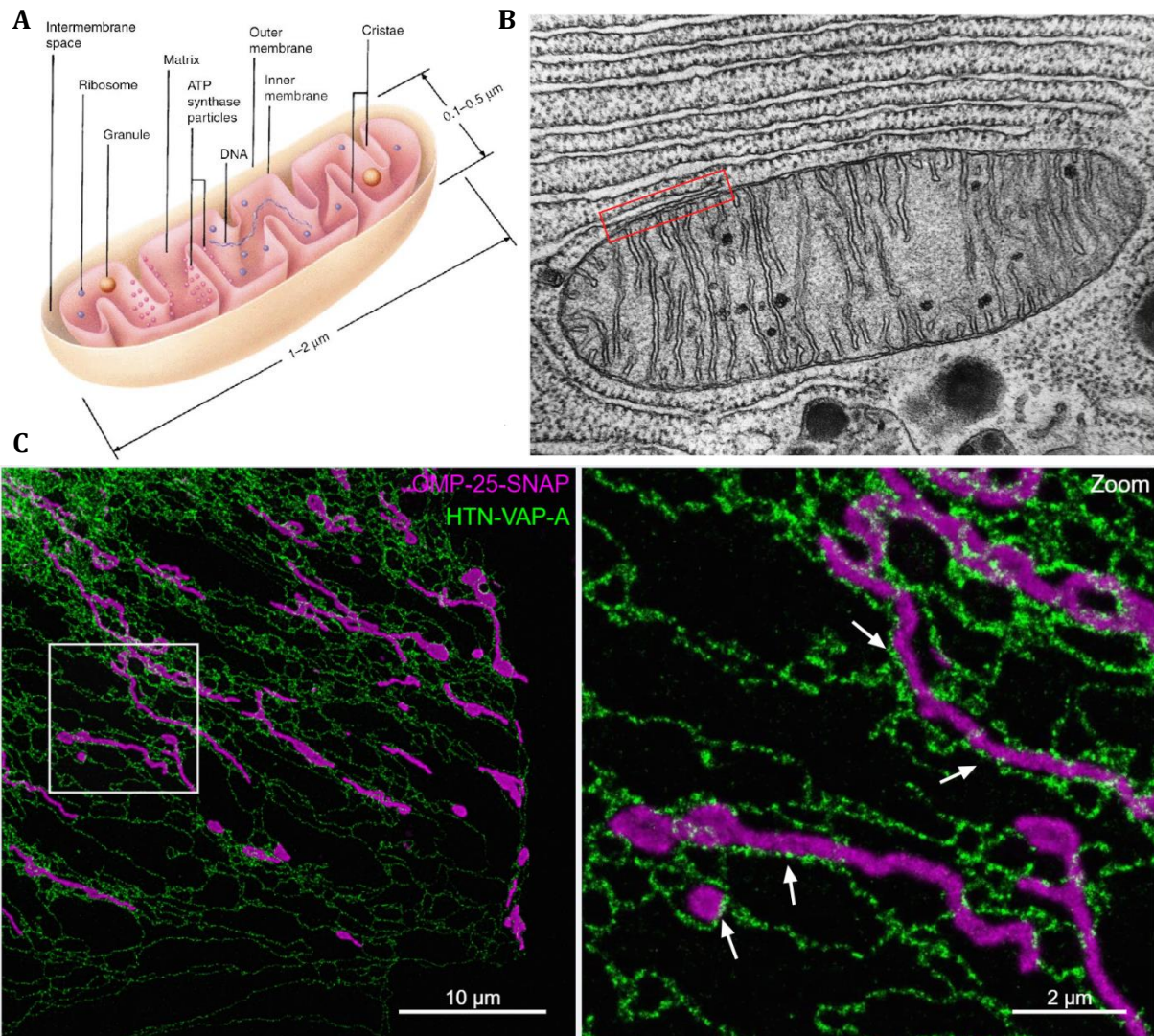
al., 1986)(Friedman et al., 2010). Les feuillettes comportent des trous qui peuvent s'agrandir pour transformer cette région du RE en tubules (Schroeder et al., 2019).

Il existe une organisation spatiale de la morphologie du RE en lien direct avec ses fonctions. Le RE est souvent organisé en feuillettes autour du noyau, alors que son réseau tubulaire couvre le reste du cytoplasme. Les différences fonctionnelles entre tubules et feuillettes du RE ont fait l'objet de recherches intenses par l'équipe de Tom Rapoport dès la fin des années 1990, qui ont notamment permis de faire le lien entre les feuillettes et la formations des polysomes (Friedman and Voeltz, 2011). Un polysome est un ensemble de ribosomes reliés entre eux par un ARN messager lors de sa traduction. Les polysomes forment des spirales qui sont beaucoup plus adaptées à une association avec des feuillettes, ils donnent un aspect granuleux au RE qu'on dit « rugueux ». Cette mise en place proche du noyau permet une « prise en charge » rapide des ARN messagers par les ribosomes pour la traduction des protéines. De plus, la lumière du RE au niveau des citernes est plus large, ceci est avantageux pour accueillir les protéines néosynthétisées. Quant aux tubules, ils sont inaccessibles aux polysomes et constituent le RE dit « lisse » (Shibata et al., 2006). Le RE « lisse » ou tubulaire est le lieu de synthèse des lipides et permet la formation des contacts avec d'autres organelles (Voeltz et al., 2002)(Westrate et al., 2015). Ces MCSs sont indispensables au transfert des lipides et ceci peut contrôler la dynamique des organelles (Salvador-Gallego et al., 2017).

### *i Exemple des contacts RE/Mitochondrie*

Les MCSs RE/mitochondrie ont été les premiers découverts et sont les mieux caractérisés. Des expériences de microscopie en temps réel ont montré que la dynamique du RE et celle de la mitochondrie sont liées car ces organelles maintiennent des contacts très stables dans le temps (Friedman et al., 2010) grâce à la force des interactions qui s'y produisent. En effet les MAMs (Mitochondria Associated Membranes) peuvent être purifiés selon des protocoles s'étalant sur des heures, témoignant ainsi de leur stabilité. Les mitochondries sont abondantes en nombre dans les cellules eucaryotes (entre 300 et 2000 mitochondries par cellules) et forment un réseau très dynamique. En effet, elles fusionnent et fissionnent pour maintenir l'intégrité de leur génome et leur état métabolique (Lackner and Nunnari, 2009). La fission et la fusion mitochondriales ont été très étudiées ces dernières décennies car un défaut dans une étape de ces processus peut conduire à de lourdes pathologies neurologiques comme les maladies de Parkinson, de Charcot ou encore la SLA-8 (sclérose latérale amyotrophique) (Kwong et al., 2006). En cas de défauts, on observe des changements morphologiques majeurs indiquant que la forme des mitochondries est liée à leur métabolisme et ceci influence l'homéostasie cellulaire.

La mitochondrie possède une double membrane. La membrane interne (IMM) forme des crêtes, elle renferme toute la machinerie nécessaire à la réplication et à la réparation de l'ADN mitochondrial. La membrane externe (OMM) forme des MCSs avec le RE (figure 48). Cette organelle fournit l'énergie sous forme d'ATP à la cellule puisqu'elle est le site du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative permettant la respiration aérobie (Frey and Mannella, 2000). La



**Figure 48 :** A) La mitochondrie possède deux membranes : la membrane externe (OMM) et la membrane interne (IMM) qui forme des crêtes par repliement. Ceci créé 2 compartiments : la matrice qui contient entre autres l'ADN mitochondrial, à l'intérieur de l'IMM, et l'espace intermembranaire (Frey and Mannella, 2000). B) Image de microscopie électronique d'une mitochondrie dans une cellule pancréatique, cette cellule sécrétrice possède une grande proportion de RE « rugueux » marqué par la présence des polysomes. Le cadre rouge indique un MCS avec le RE « lisse ». *K. R Porter Science Source*. C) Images de super résolution (STED) mettant en évidence le réseau mitochondrial (magenta) en association avec le réseau du RE (marqué par VAP-A en vert) dans des cellules HUVECs, les flèches pointent des MCSs.



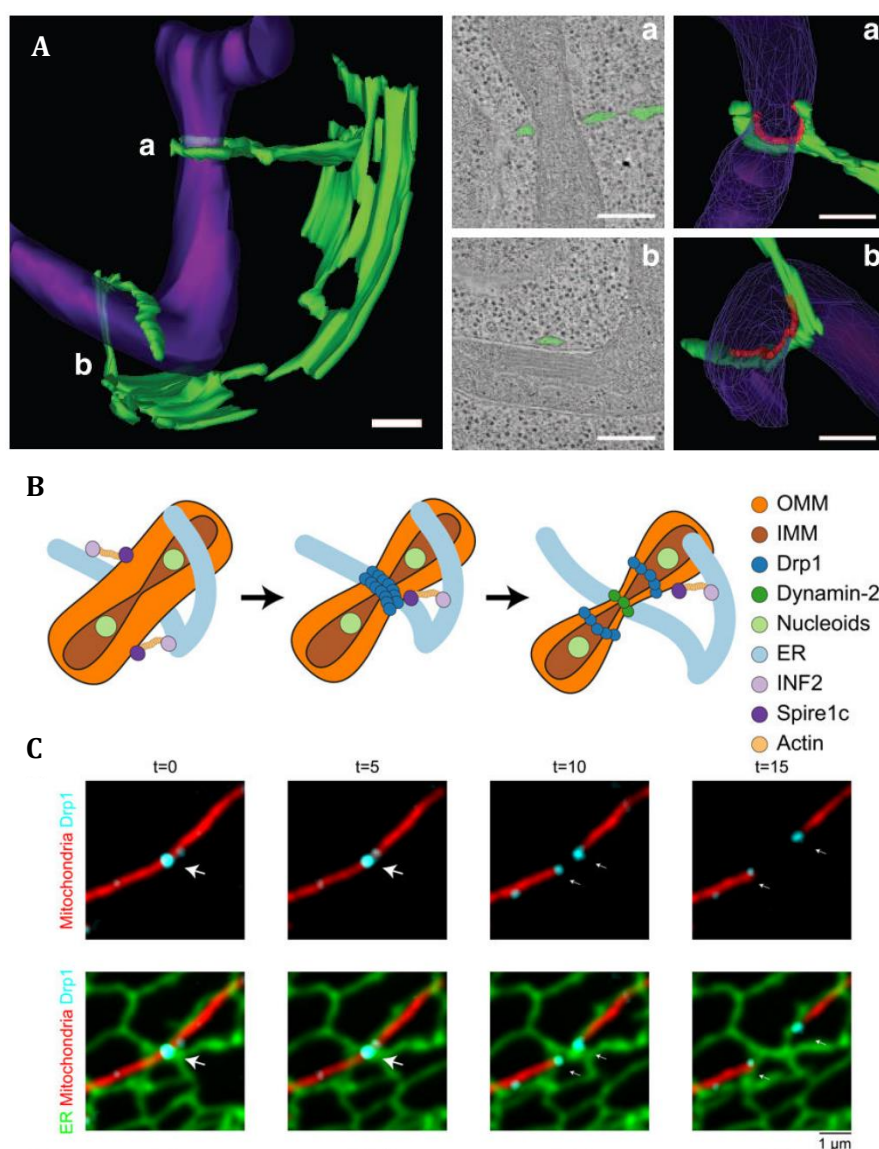
mitochondrie est également impliquée dans la division cellulaire, l'autophagie, l'apoptose et le métabolisme du calcium (Friedman and Nunnari, 2014).

Le transfert d'ions comme le calcium entre compartiments est une autre grande fonction des MCSs. Cet aspect ne sera pas développé dans ce manuscrit. En effet, le RE est aussi le site de stockage du calcium dans la cellule et les MCSs RE/mitochondrie sont indispensables au transfert de cet ion et à la régulation des niveaux de calcium mitochondriaux. Ces taux contrôlent de nombreux aspects de la fonction mitochondriale, notamment la phosphorylation oxydative, la production et la signalisation des ROS (Reactive Oxygen Species) et l'apoptose. Il est aussi nécessaire à l'initiation de la fission par constriction de la membrane interne mitochondriale (Chakrabarti et al., 2018). Les MCSs RE/mitochondrie comportent des canaux calciques ancrés au RE appelés récepteurs de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3Rs) qui s'attachent aux mitochondries par l'intermédiaire du canal sélectif anionique dépendant du voltage (VDAC). Ce duo permet le transfert de calcium d'un compartiment à l'autre (Prinz et al., 2020).

La mitochondrie peut synthétiser certains phospholipides membranaires comme la PC, la PE et la CL à partir de précurseurs mais ses membranes sont composées également de PA et de PS. A l'exception des vésicules dérivées des mitochondries (MDVs) qui sont formées au moment d'un contrôle qualité pour l'élimination de protéines endommagées (Sugiura et al., 2014), aucun transport vésiculaire n'existe entre la mitochondrie et les autres organelles, l'échange de lipides se fait donc aux MCSs grâce à des LTPs. Deux composantes connexes contribuent fortement à la dynamique du réseau mitochondrial : les protéines qui participent à ces événements et la composition lipidique de ses membranes.

## 1) La fission/ la division mitochondriale

La fission mitochondriale est un bon exemple de l'implication des MCSs dans la régulation de la dynamique des organelles puisqu'il permet son initiation. En effet, le RE entoure la mitochondrie en formant des MCSs qui définissent le site de fission et crée une légère constriction par action mécanique du cytosquelette d'actine et de myosine. Celui-ci est recruté aux MCSs par INF2 (RE Inverted formin) et Spire 1c (Friedman et al., 2011)(Korobova et al., 2013)(Manor et al., 2015). De façon surprenante, il a été observé que la constriction de l'IMM se produit avant cet évènement, ce qui suggère qu'un signal provenant de la matrice entraîne l'initiation de la fission par le recrutement du RE, mais ce signal n'est pas clairement défini. Les données les plus récentes suggèrent que ce signal est initié par des échanges de calcium entre le RE et la matrice



**Figure 49 : La fission mitochondriale.**

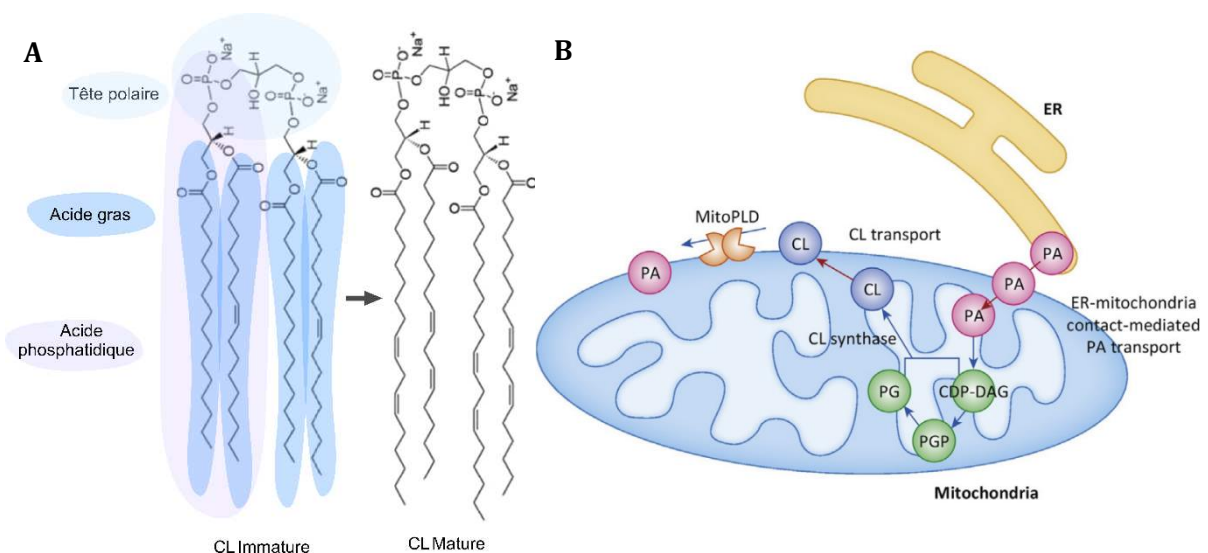
A) Initiation de la fission par formation des MCSs (rouge) RE (vert)/mitochondrie (violet), conduisant à une légère constriction de la mitochondrie.

Reconstructions 3D faites à partir d'images de microscopie électronique (Friedman et al., 2011).

B) Schéma des effecteurs protéiques impliqués dans la fission mitochondriale. C) La position des tubules du RE définissent le site de fission, Drp1 est recrutée au même site. (Wu et al., 2018).

mitochondriale, conduisant à la dissociation d'un complexe appelé MICOS qui unit l'OMM et l'IMM (Cho et al., 2017)(Wu et al., 2018). Après cette première étape, la protéine cytosolique Drp1(Dynamin related protein) ou son analogue Dnm1 chez la levure, qui sont des GTPases, s'assemblent pour former un oligomère de forme hélicoïdale qui entoure la membrane externe mitochondriale en permettant sa constriction au niveau du site de fission (Bleazard et al., 1999)(Labrousse et al., 1999). Cette action nécessite l'intervention d'adapteurs ancrés à la membrane externe mitochondriale : Mff (Mitochondrial fission factor)(Gandre-Babbe and van der Blik, 2008). La dernière étape qui conduit à la scission de la mitochondrie est permise par la Dynamine-2, une autre GTPase (Lee et al., 2016)(figure 49).

La mitochondrie possède de nombreuses enzymes qui lui permettent de remodeler les lipides. Par exemple, la synthèse de CL se fait dans l'IMM à partir du PA provenant du RE. Le PA transite de l'OMM à l'IMM grâce au complexe protéique Triap/PRELID (Potting et al., 2013). Une partie de la CL est ensuite transportée dans la membrane externe et peut être reconvertie en PA par la MitoPLD (Phospholipase D) (Kameoka et al., 2018) (figure 50). La taille et la saturation des

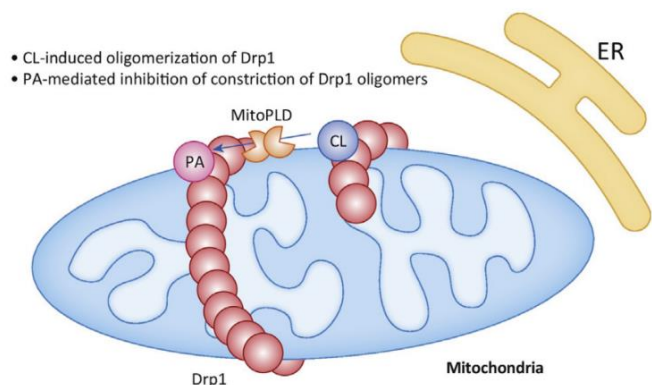


**Figure 50 :** A) Structure de la CL : assemblage de deux PA sur un glycérol, la maturation conduit à des inversions de chaînes d'acides gras contenant plus d'insaturations. B) Le PA est synthétisé au RE et transporté par les LTPs présentes aux MCSs jusqu'à la membrane externe mitochondriale. Une fraction de ce PA est à son tour transporté vers la membrane interne où il est converti en CL en passant par différents intermédiaires : Cytidine diphosphate diacylglycérol (DCP-DAG) et phosphatidylglycérol (PG). Une partie de la CL est transportée vers la membrane externe et peut être reconvertie en PA par la MitoPLD (Kameoka et al., 2018).

chaînes d'acide gras des CL peuvent être remodelées lors de leur maturation grâce à la Tafazzin, une transacylase (Schlame et al., 2012)(Schlame and Xu, 2020)(Tatsuta et al., 2014). Ce remodelage est essentiel, les patients KO pour la Tafazzin sont atteints du syndrome de Barth et souffrent de grave retards de croissances et de cardio-myopathies (Vreken et al., 2000)(Pizzuto and Pelegrin, 2020). La mitochondrie régule donc finement la composition lipidique de ses membranes et cet équilibre est crucial dans le maintien de sa dynamique et de sa fonction. Par exemple, une baisse de CL entraîne une altération des crêtes mitochondriales et déstabilise la chaîne de transport d'électrons permettant la respiration oxydative, en conséquence, la mitochondrie devient non fonctionnelle. En effet, la CL est indispensable à la mise en place des complexes qui composent la chaîne de transfert d'électrons (Dudek, 2017). De plus, elle sert de point d'ancrage à de nombreuses protéines impliquées dans des voies de signalisation. Par exemple, lors de la mitophagie, lorsque la mitochondrie est non fonctionnelle et vouée à être dégradée, la CL permet le recrutement du complexe ATG8/LC3, qui active la machinerie qui initie la formation de l'autophagosome autour de la mitochondrie conduisant à sa dégradation (Ding and Yin, 2012).

La fission est régulée par les lipides présents dans la membrane externe mitochondriale. la CL active l'oligomérisation de Drp1 et son activité GTPase (Francy et al., 2017). Au contraire, le PA inhibe la constriction en interagissant avec Drp1 (Adachi et al., 2016, 2018)(figure 51).

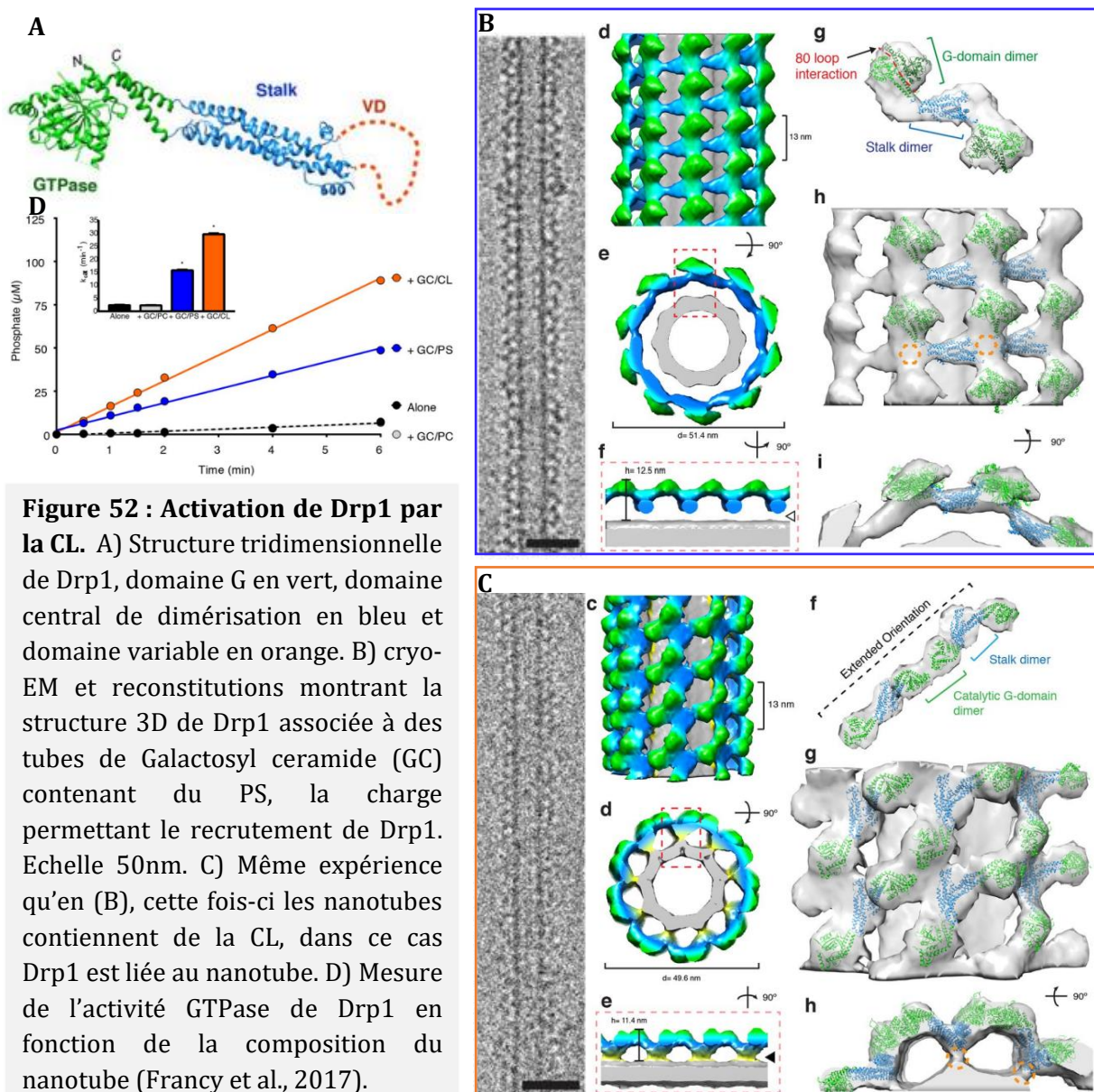
Des expériences de cryo-EM ont montré que la CL permet une interaction directe entre le domaine variable (VD) de



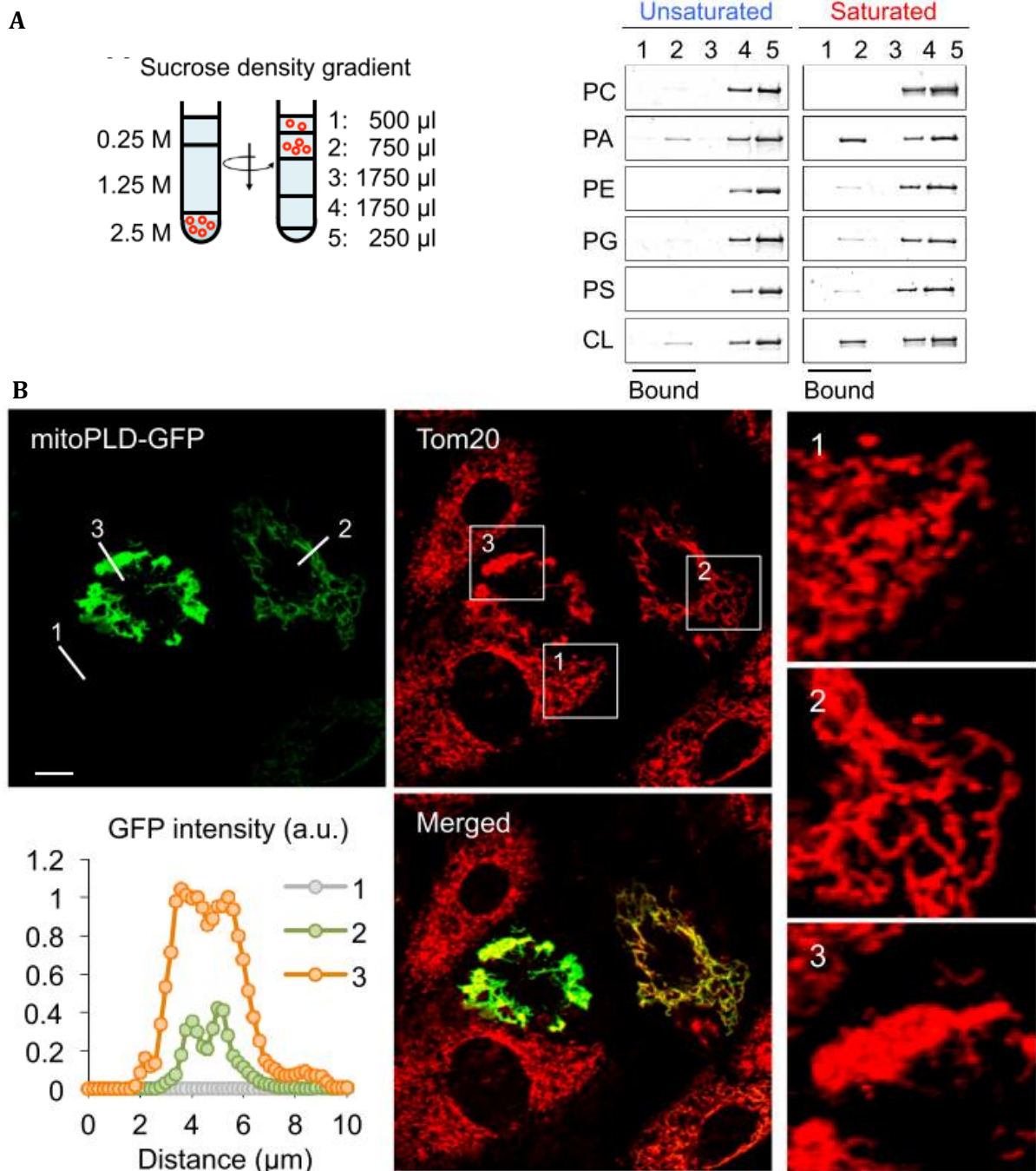
**Figure 51 : Rôle des lipides membranaires dans la régulation de la fission mitochondriale.** L'oligomérisation de Drp1 est inhibée lorsqu'elle interagit avec le PA mais promue par la liaison à la CL. La MitoPLD régule les taux de PA et de CL dans la membrane externe mitochondriale (Kameoka et al., 2018).

Drp1 et la membrane et que ceci induit un changement de la structure hélicoïdale de Drp1 pour

augmenter son activité GTPase (figure 52). Le VD de Drp1 comporte des boucles non structurées qui reconnaissent la CL, une mutation dans ces régions inhibe la fission mitochondriale (Mahajan et al., 2021). De plus, des expériences de flottaison ont montré que Drp1 se lie au PA saturé et qu'une accumulation de PA dans l'OMM par sur-expression de la MitoPLD, inhibe la fission mitochondriale (figure 53). Finalement, les MCSs avec le RE jouent un rôle dans la fission mitochondriale à deux niveaux : l'initiation et la régulation, via le transfert de PA, précurseur de la CL.



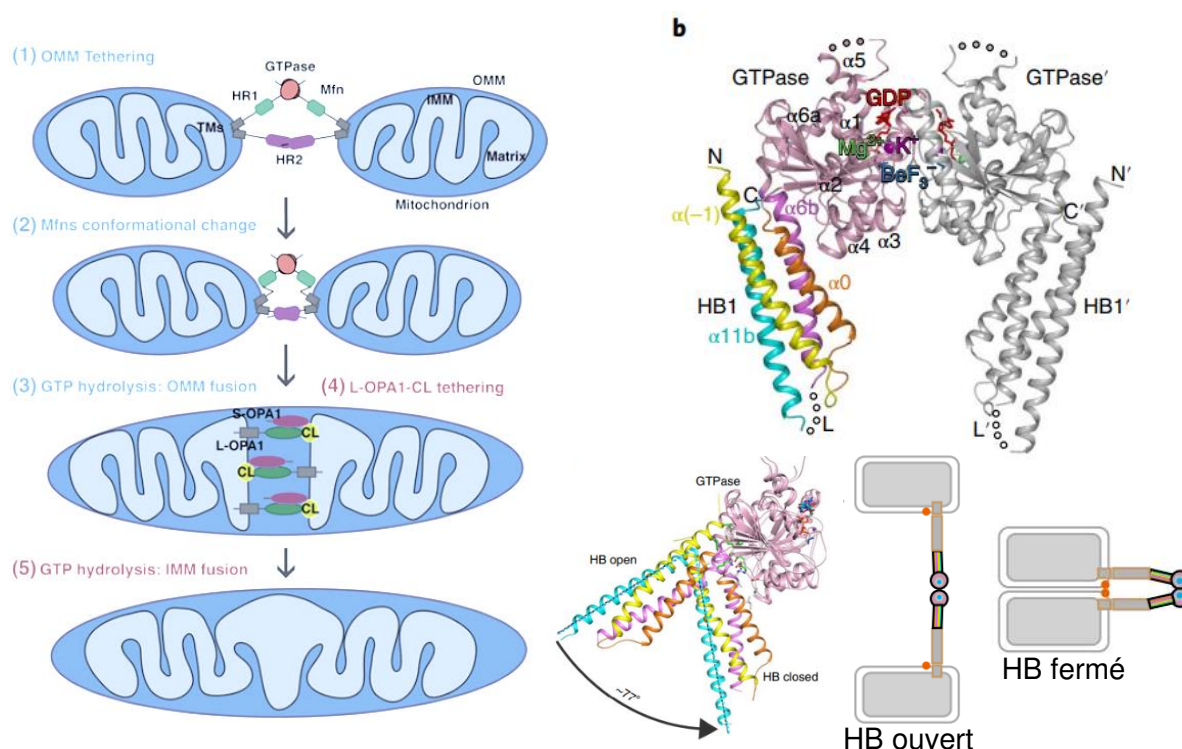
**Figure 52 : Activation de Drp1 par la CL.** A) Structure tridimensionnelle de Drp1, domaine G en vert, domaine central de dimérisation en bleu et domaine variable en orange. B) cryo-EM et reconstitutions montrant la structure 3D de Drp1 associée à des tubes de Galactosyl ceramide (GC) contenant du PS, la charge permettant le recrutement de Drp1. Echelle 50nm. C) Même expérience qu'en (B), cette fois-ci les nanotubes contiennent de la CL, dans ce cas Drp1 est liée au nanotube. D) Mesure de l'activité GTPase de Drp1 en fonction de la composition du nanotube (Francy et al., 2017).



**Figure 53 : La liaison de Drp1 au PA inhibe la fission mitochondriale.** A) Expérience de flottaison de liposomes avec des compositions lipidiques différentes (palmitoyl-oleylphosphatidylcholine (POPC) 84%, Rhodamine-PE 1% et 15% du lipide indiqué) en présence de Drp1 recombinante. Les fractions « top » 1 et 2 contiennent la fraction de Drp1 qui s'est liée aux liposomes. Drp1 se lie préférentiellement au PA et à la CL saturés. B) Des fibroblastes ont été transfectés avec la MitoPLD-GFP, 3 cellules ont été sélectionnées avec des niveaux d'expression de MitoPLD-GFP croissants. La forme des mitochondries est visualisée grâce à Tom20 en rouge. Plus l'expression de MitoPLD-GFP est forte plus les mitochondries sont allongées, ceci suggère que l'augmentation de PA inhibe la fission. Lorsque la surexpression est trop forte (cellule 3), les mitochondries s'aggrègent dans la région périnucléaire, cet effet est une conséquence non spécifique de la surexpression de n'importe quelle protéine de l'OMM (Adachi et al., 2016).

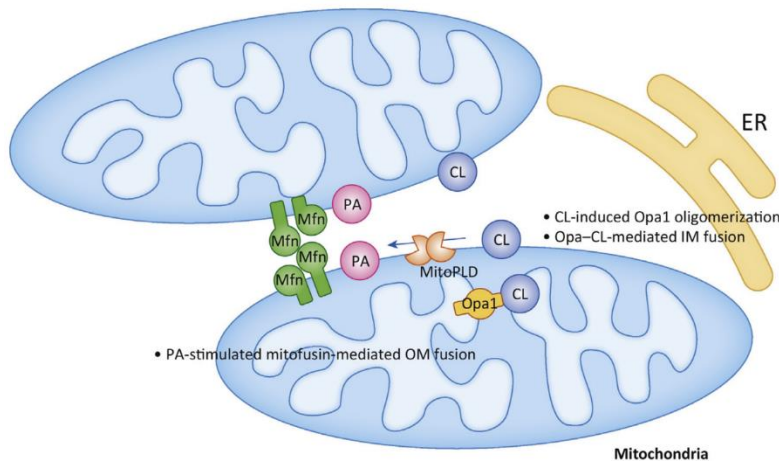
## 2) La fusion mitochondriale

D'autres effecteurs protéiques entrent en jeu dans le processus de fusion mitochondriale. La première étape fait intervenir deux GTPases : les Mitofusines (Mfns) 1 et 2 (Chen et al., 2003) (Koshiba et al., 2004). Elles permettent l'attachement de la membrane externe de deux mitochondries, grâce à leurs domaines GTPases qui s'assemblent en dimères. La liaison du GTP induit un changement de conformation de ces protéines qui passent de l'état ouvert à l'état fermé. La fusion des membranes est ensuite induite par hydrolyse du GTP (Cao et al., 2017)(Yan et al., 2018)(Tilokani et al., 2018). A la suite de ces étapes, les membranes internes des mitochondries doivent aussi fusionner. Pour cela, OPA1 ou son analogue Mgm1p chez la levure, d'autres GTPases spécifiques de la membrane interne effectuent une action similaire (figure 54)(Sesaki et al., 2003)(Cipolat et al., 2004)(Song et al., 2009).



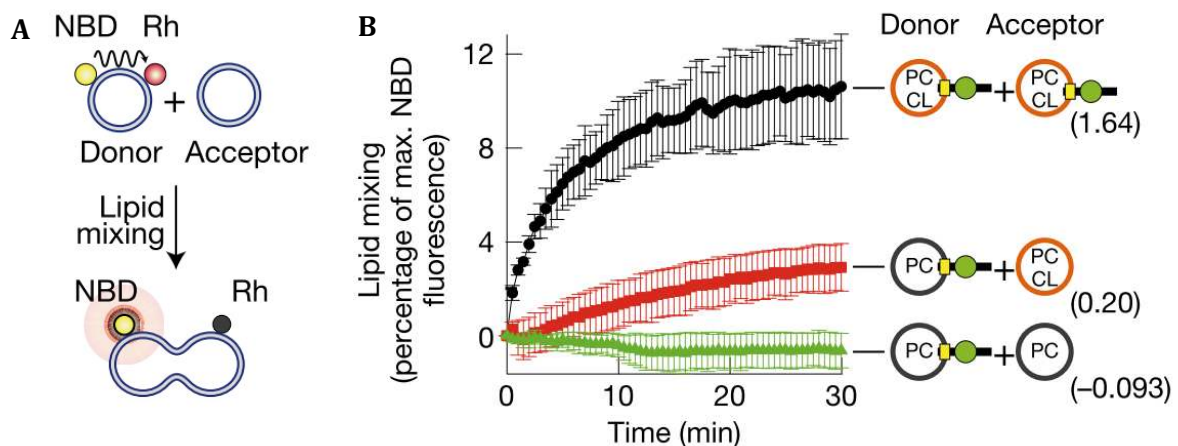
**Figure 54 : La fusion mitochondriale.** Les membranes externes (OMM) de deux mitochondries s'attachent grâce aux Mfns capables de former des dimères pour rapprocher les membranes (b) Structure cristallographique de la Mfn1 en dimère. La liaison du GTP induit un changement conformationnel du bundle d'hélices  $\alpha$  (HB) des Mfns1 qui passent de l'état ouvert à l'état fermé, conduisant au rapprochement des membranes puis à leur fusion lors de l'hydrolyse du GTP (Yan et al., 2018). La membrane interne (IMM) fusionne ensuite grâce à OPA1 (Tilokani et al., 2018).

Comme la fission, la fusion mitochondriale est dépendante des MCSs avec le RE via le transfert de PA. Plus précisément, le PA est indispensable à la fusion des OMM, alors que la CL, produite à la mitochondrie à partir du PA, interagit avec OPA1 dans l'IMM pour permettre la fusion de cette membrane (figure 56). Des expériences de reconstitution *in vitro* montrent que la fusion



**Figure 56 : Rôle des lipides membranaires dans la régulation de la fusion mitochondriale.** Le PA présent à la membrane externe permet le recrutement des Mfns. La CL présente dans la membrane interne est indispensable à la fusion des membranes internes par d'OPA1 (Kameoka et al., 2018).

de deux liposomes peut être réalisée par OPA1 (ancrée par son domaine transmembranaire dans la membrane d'un liposome) par une interaction avec la CL sur le liposome opposé (Ban et al., 2017)(Ban et al., 2018)(figure 57). Par ailleurs, le PA semble important pour la fusion car la MitoPLD qui synthétise un pool de PA à partir de CL à l'OMM est indispensable. En effet, le silencing de

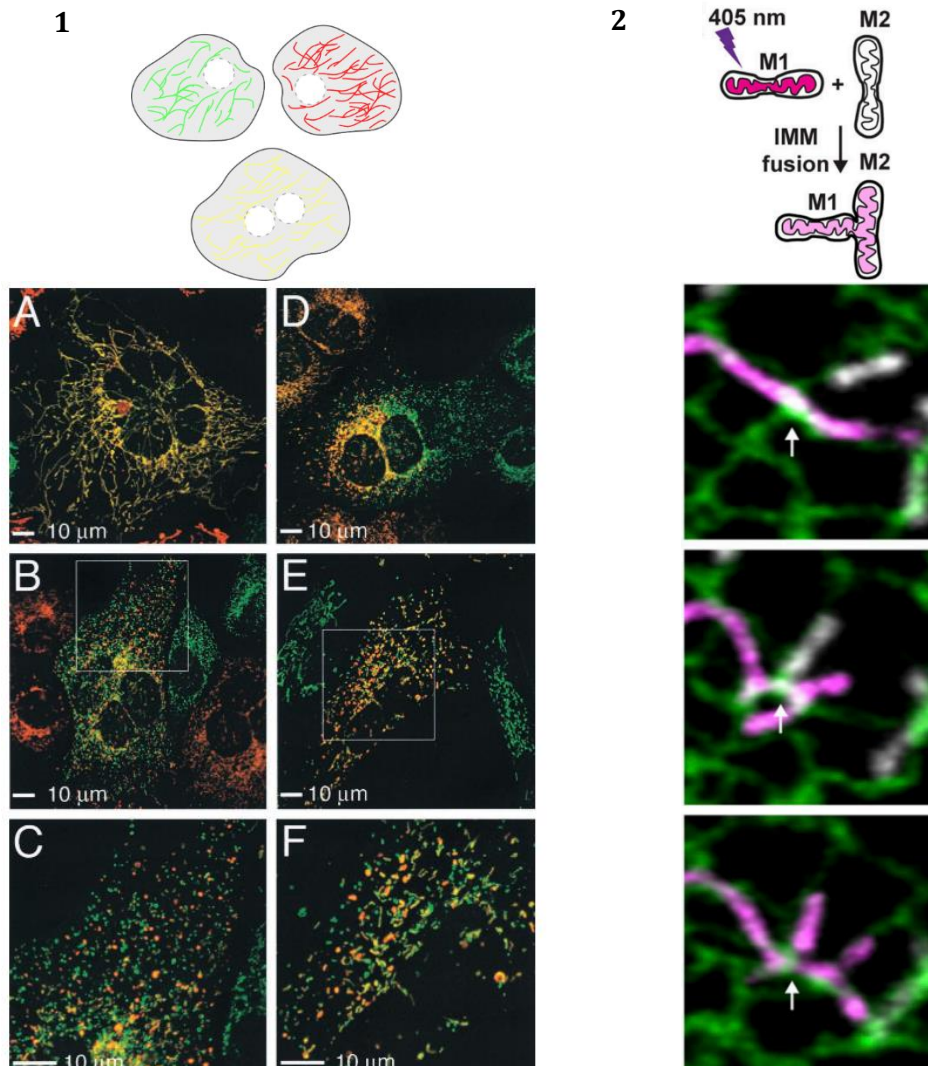


**Figure 57 : Fusion membranaire induite par OPA1 en présence de CL.** A) Expérience de fusion membranaire entre deux liposomes contenant L-OPA1 transmembranaire en présence de GTP, le signal fluorescent du NBD est quenché au début de l'expérience par la Rhodamine, la fusion des liposomes permet l'éloignement des sondes et la détection du signal. B) L-OPA1 a été reconstituée dans des liposomes constitués de PC, ou des liposomes constitués de PC et de CL. La fusion est efficace seulement en présence de CL (Ban et al., 2017).



la MitoPLD par des siRNA entraîne un défaut de fusion mitochondrial. Cependant, les mitochondries sont collées les unes aux autres, ceci suggère que La MitoPLD fonctionne en aval de l'ancrage médié par les Mfns (Choi et al., 2006). Le rôle du PA dans la fusion reste incompris à ce jour, néanmoins nous savons que ce lipide « fusogénique » induit un changement d'environnement lipidique localisé qui perturbe la morphologie membranaire. Sa forme conique pourrait être à l'origine de zones de courbure négative adaptées à un événement de fusion (Kooijman et al., 2005). Le PA pourrait aussi engendrer des défauts de packing permettant d'améliorer la mixité des membranes lors de fusion (Vamparys et al., 2013), cependant aucune étude réalisée dans un contexte physiologique ne confirme cette idée. Un mécanisme similaire impliquant le PA, obtenu par l'action de la PLD1, est également décrit pour stimuler la fusion de vésicules d'exocytose avec la membrane plasmique (Zeniou-Meyer et al., 2007)(Ammar et al., 2013)(Bullen and Soldati-Favre, 2016). La mito-PLD, indispensable à la fusion des mitochondries par son activité de phospholipase, est organisée en dimère stabilisé par les Mitoguardines (MIGA 1 et 2). Ces protéines sont ancrées dans la membrane externe mitochondriale (Zhang et al., 2016). Elles possèdent un motif FFAT leur permettant d'interagir avec les protéines VAP au RE, et participent donc à la formation des MCSs RE/mitochondrie (Freyre et al., 2019). Récemment, la protéine du RE ABHD16A a été identifiée par une approche de protéomique basée sur la proximité avec la Mfn, concentrée aux sites de fission et de fusion mitochondriale. Cette acyltransférase peut convertir la PS en LysoPS (une PS avec une seule chaîne carbonée, la tête polaire étant plus imposante que la partie hydrophobe, le lipide est en forme de cône inversé) sur la membrane mitochondriale (Nguyen and Voeltz, 2022). Ainsi elle pourrait réguler le taux de lipides coniques ou coniques inversés afin d'imposer une courbure négative ou positive favorisant la fusion ou la fission mitochondriale, ce mécanisme est dépendant de l'arrivée de PS à la mitochondrie par différentes LTP, et principalement par ORP8 (Galmes et al., 2016). Cependant l'activité d'ORP8 à la mitochondrie est peu connue. En plus des techniques d'analyses *in vitro* par fusion de liposomes mimant les mitochondries, il existe des méthodes *in cellula* pour observer et quantifier la fusion mitochondriale (figure 58).

Les MCSs avec le RE sont essentiels pour le maintien de la dynamique des mitochondries, car ils concentrent les machineries de fusion et de fission (Abrisch et al., 2020) et permettent l'arrivée du PA à la mitochondrie, précurseur de la CL. Ces lipides sont les régulateurs clés des mécanismes de fission et de fusion mitochondriale. Nous allons maintenant aborder les mécanismes qui permettent l'apport du PA à la mitochondrie : plusieurs LTPs peuvent effectuer le transfert au sein des MCSs RE/mitochondrie.

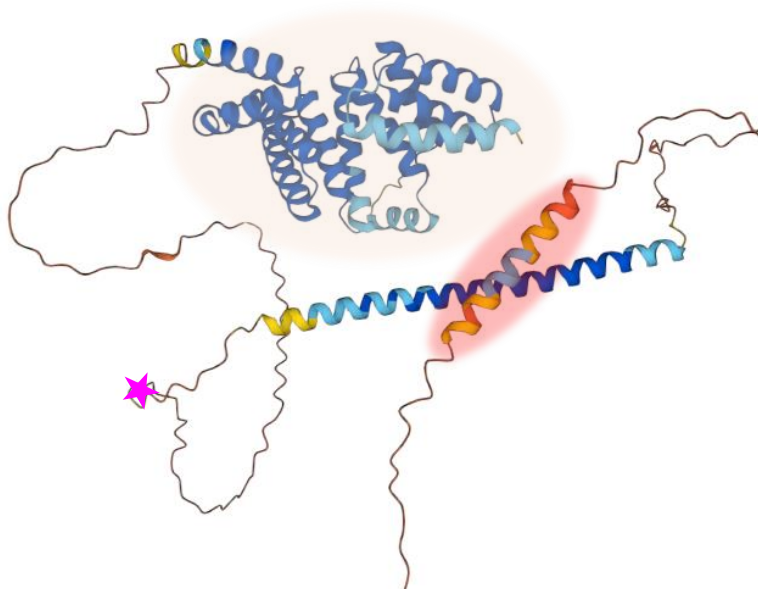


**Figure 58 : Méthodes pour étudier la fusion mitochondriale *in cellula*.** 1) PEG fusion test : deux populations de cellules sont mélangées, l'une surexprime un marqueur mitochondrial vert et l'autre rouge. Les cellules sont traitées avec du PEG, ceci entraîne leur fusion. Les mitochondries (A) WT ont fusionné tandis que les mitochondries des cellules Mfn KO n'ont pas fusionné (B-F) (Chen et al., 2003). 2) Cellules transfectées avec un marqueur de RE (vert) et une sonde matricielle de la mitochondrie grise. Cette sonde est photo-activable par irradiation à 405nm et devient magenta. Par cette méthode on obtient deux mitochondries de couleurs différentes dans la même cellule. La fusion des mitochondries conduit à un mélange de leur matrice et la couleur se propage (Abrisch et al., 2020).

### 3) Les LTPs aux MCSs RE/mitochondrie

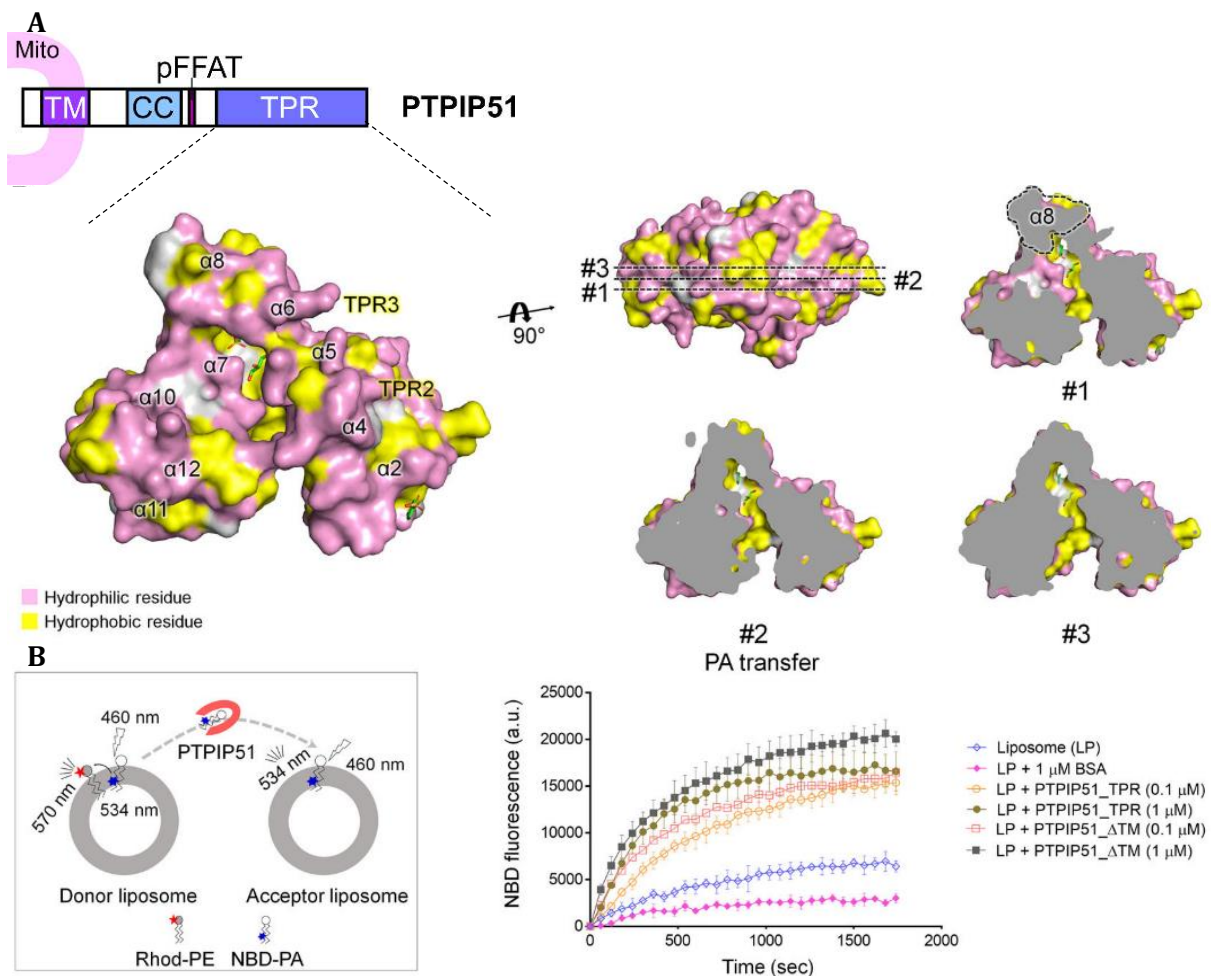
La protéine **PTPIP51** aussi appelée RMDN3 transporte le PA entre le RE et la mitochondrie via son domaine TPR (tetratricopeptide repeat) situé en C-terminal (Yeo et al., 2021). Elle participe au maintien des MCSs RE/mitochondrie. En effet, cette protéine possède un domaine transmembranaire en N-terminal ancré dans la membrane externe mitochondriale et un motif FFAT lui permettant d'interagir avec les récepteurs VAPs au RE (Stoica et al., 2014). Une hélice pouvant former un coiled-coil est présente à la suite du domaine transmembranaire, selon LOGICOIL (Vincent et al., 2013) cette protéine pourrait être organisée en tétramère (figure 59).

**Figure 59 :** Modèle Alphafold d'un monomère de PTPIP51 (RMDN3) (Human). Le domaine TPR est repéré en orange et le domaine transmembranaire en rouge. La position du motif FFAT est marquée par une étoile.



La structure du domaine TPR de PTPIP51 a été résolue récemment et il a été montré *in vitro* que la poche hydrophobe présente au cœur de ce domaine permet le transfert de PA entre les membranes. La vitesse de transfert mesurée est lente (environ 0,075 PA/PTPIP51/min) mais le système de reconstitution mime mal les conditions physiologiques : la protéine n'est pas reconstituée dans la membrane du liposome accepteur par son domaine transmembranaire et n'est pas reliée au liposome donneur via VAP (figure 60). *In cellula*, des analyses de lipidomique ont montrées que la suppression de PTPIP51 conduit à une diminution du taux de CL mitochondrial, ce qui suggère une inhibition de l'arrivée du précurseur, le PA, depuis le RE (Yeo et al., 2021). La première structure cristallographique d'un domaine TPR provient de Tp0958, une

protéine de *Treponema pallidum*. Cette bactérie responsable de la syphilis possède ses propres LTPs alors que la plupart des bactéries détournent celles de la cellule hôte (Deka et al., 2012). Récemment, d'autres protéines bactériennes avec des domaines TPR transportant des stérols ont été identifiées (Zhai, 2022). Le domaine TPR est donc un domaine conservé, il est présent également dans les protéines du complexe APC (anaphase promoting complex), qui comprend Cdc26 et APC6 chez l'Homme et Cdc16 et Cut9 chez la levure. Ces protéines sont des régulateurs



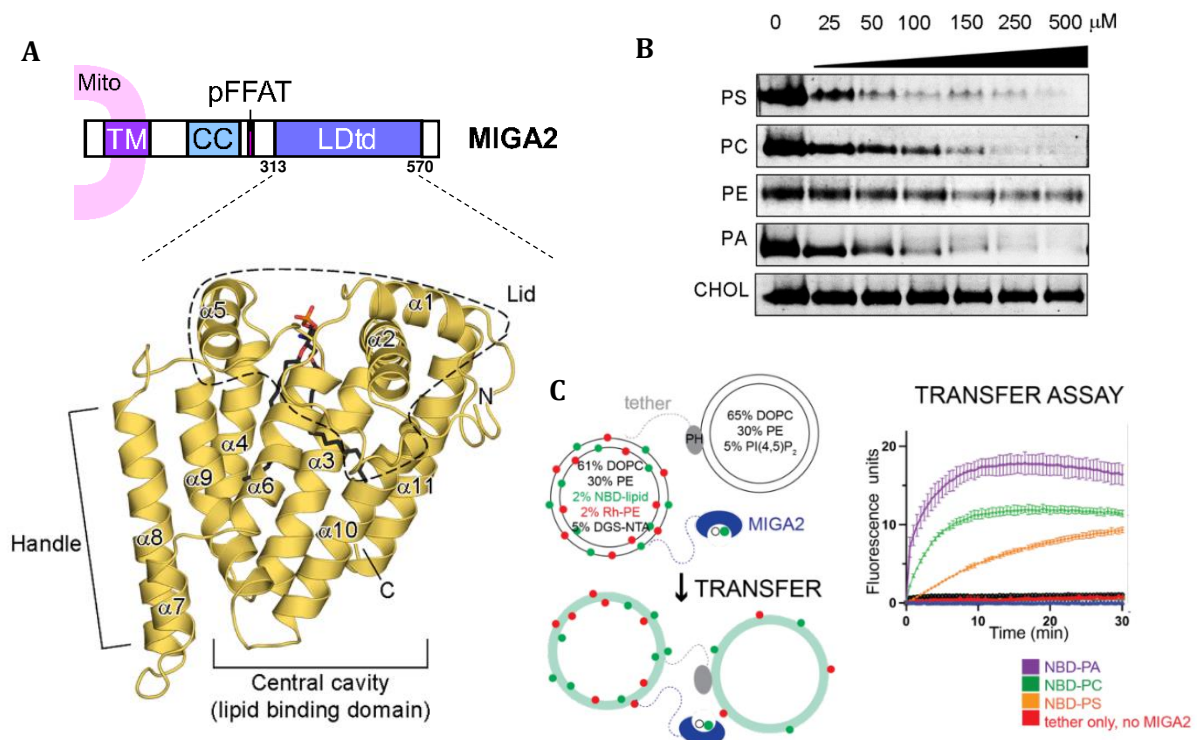
**Figure 60 : Structure cristallographique du domaine TPR de PTPIP51 permettant le transfert de PA.** A) Les résidus hydrophobes sont en jaunes et les résidus hydrophiles en rose. Les coupes transversales permettent de visualiser la poche hydrophobe qui accueille le PA. B) L'activité de transfert de PA de PTPIP51 (PTPIP51\_ΔTM et PTPIP51\_TPR) a été mesurée *in vitro* par un test de transfert de lipides basé sur le FRET (représentation schématique à gauche). Le domaine TPR seul est moins efficace pour le transfert de PA que PTPIP51\_ΔTM, probablement parce qu'il ne peut pas s'organiser en oligomère, la région CC étant tronquée (Yeo et al., 2021). Calcul de la vitesse de transfert de PA par PTPIP51 :

$$\left(\frac{1}{(t^{1/2} / 60)}\right) * \left(\frac{[\text{Lipides}] * [\text{PA}\%]}{[\text{PTPIP51}]}\right) = n \text{ PA/PTPIP51/min}$$

$$\left(\frac{1}{(200\text{s}/60)}\right) * \left(\frac{[6,25 \mu\text{M}] * [4\%]}{[1\mu\text{M}]}\right) = 0,075 \text{ PA/PTPIP51/min}$$

clés du cycle cellulaire (Wang et al., 2009)(Zhang et al., 2010). Le mécanisme de liaison du domaine TPR à la membrane n'est pas clairement défini, néanmoins il a été montré que les protéines SNX20 et 21 (Sorting Nexins) possèdent un domaine PX (Phox Homology) en amont du domaine TPR permettant la liaison au PI3P et au PI4,5P2 (Clairfeuille et al., 2015). Le complexe PTPIP51/VAP permet l'attachement des membranes du RE et de la mitochondrie, il participe donc à la formation du contact. Il a été montré par ailleurs que la perturbation des MCSs RE/mitochondrie par délétion du couple PTPIP51/VAP-B empêche aussi l'apport de calcium à la mitochondrie (De vos et al., 2012).

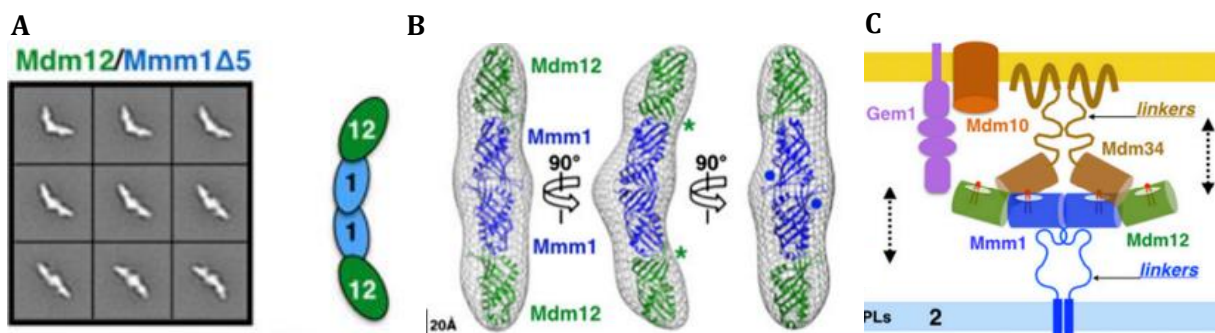
Récemment, il a été montré que la protéine **MIGA2**, qui participe à la formation de contacts entre le RE et la mitochondrie via son motif FFAT phosphorylé (Xu et al., 2020) est aussi une LTP. La structure cristallographique de son domaine de liaison aux gouttelettes lipidiques LDtd (LD targeting domain) a été résolue. Il avait été précédemment décrit que MIGA2 se lie aux gouttelettes lipidiques, créant ainsi des MCSs Mitochondrie/LD (Freyre et al., 2019), cependant elle peut lier d'autres surfaces membranaires, comme celle du RE. Son domaine LDtd s'attache aux membranes chargées négativement par la présence de PS, de PA ou encore de PI4P grâce à une hélice qui comporte des résidus chargés positivement (deux arginines, une lysine). De plus, le domaine LDtd possède une poche hydrophobe qui peut accueillir différents phospholipides : le PA, la PC et le PS. Des expériences de transfert *in vitro* montrent que MIGA2 transporte plus rapidement le PA que les autres lipides, nécessaire à la dynamique mitochondriale (figure 61)(Kim et al., 2022)(Hong et al., 2022).



**Figure 61: MIGA2.** A) Structure cristallographique du LDtd de MIGA2. L'hélice amphipatique annotée « handle » permet la liaison aux membranes. MIGA2 extrait ensuite un lipide (en rouge et noir) dans sa cavité centrale hydrophobe. B) Compétition *in vitro*. MIGA2 est purifiée avec le NBD-PC dans sa poche hydrophobe, d'autres lipides sont ajoutés avec une concentration croissante et on observe la baisse de signal NBD qui correspond à la sortie du NBD-PC initial par compétition avec un autre lipide. La PS, la PC et le PA entrent dans la cavité hydrophobe. (Kim et al., 2022) C) Expérience de transfert de lipides *in vitro*. Les liposomes sont attachés par un tether artificiel pour recréer des MCSs. Les liposomes donneurs contiennent initialement la Rh-PE et des lipides NBD (PA, PC, PS), la fluorescence du NBD est inhibée. Lorsque les lipides sont transférés par MIGA2 des liposomes donneurs aux liposomes accepteurs, la fluorescence NBD devient détectable. MIGA2 transfère plus rapidement le PA, environ 8 PA/MIGA2/min.

Il n'y a pas d'analogue de PTPIP51 ou de MIGA2 chez la levure. Cependant, le complexe **ERMES** (endoplasmic reticulum-mitochondrial encounter structure) exerce la même fonction que les complexes PTPIP51 ou MIGA2/VAP. Ce complexe est recruté aux sites de fission/fusion mitochondriale (Murley et al., 2013) et permet le transfert des lipides impliqués dans ces événements du RE à la mitochondrie (Kornmann and Walter, 2010). ERMES est composé de quatre protéines qui créent un pont entre le RE et la mitochondrie. Il comprend une protéine soluble : Mdm12, une protéine ancrée au RE par une hélice- $\alpha$  transmembranaire : Mmm1 (Jeong et al., 2017) et deux protéines ancrées dans la membrane externe mitochondriale : Mdm10 et Mdm34 (Kornmann et al., 2009). La GTPase Gem1 présente aussi à la membrane mitochondriale régule l'assemblage du complexe en fonction des besoins cellulaires (Kornmann et al., 2011). Mmm1, Mdm12 et Mdm34 possèdent toutes un domaine SMP (Synaptotagmin-like mitochondrial lipid binding protein) qui permet le transport de lipides. De nombreuses protéines possèdent ce domaine très conservé (Kopec et al., 2010). Elles font partie des LTPs dites TULIP (tubular lipid binding domain). Par exemple, la structure cristallographique du domaine SMP de E-SYT2 (extended synaptotagmin) montre un sillon hydrophobe où différents phospholipides comme la PC, la PE, la PS ou le PI peuvent transiter (Schauder et al., 2014). E-SYT2 chez l'Homme ou les Tricalbines chez *S. cerevisiae* transfèrent des lipides via leur domaine SMP aux MCSs RE/membrane plasmique (Yu et al., 2016)(Saheki et al., 2016). L'avancée des méthodes en cryo-EM et cryo-corrélative *in situ* ont permis de mieux disséquer la structure des MCSs faisant intervenir E-SYT2 (Fernández-Busnadiago et al., 2015), les Tricalbines (Hoffmann et al., 2019)(Collado et al., 2019a) et le complexe ERMES (AhYoung et al., 2015)(Wozny et al., 2023).

La structure du complexe ERMES est un sujet débattu car *in vitro*, la protéine Mmm1 est organisée en dimère, de ce fait, les expériences de cryo-EM réalisées *in vitro* prédisent que ERMES est organisé de la façon suivante : un complexe composé de trois domaines SMP (celui de Mmm1, de Mdm12 et de Mdm34) organisé en dimère, via la dimérisation de Mmm1. Il avait été proposé que ce complexe diffuse entre les membranes dans le MCS afin de transporter les lipides, ce mouvement permit par des régions flexibles non structurées appelées « linkers » présentes dans les séquences de Mmm1 et Mdm34 (figure 62) (AhYoung et al., 2015). Or, la cryo-microscopie faite

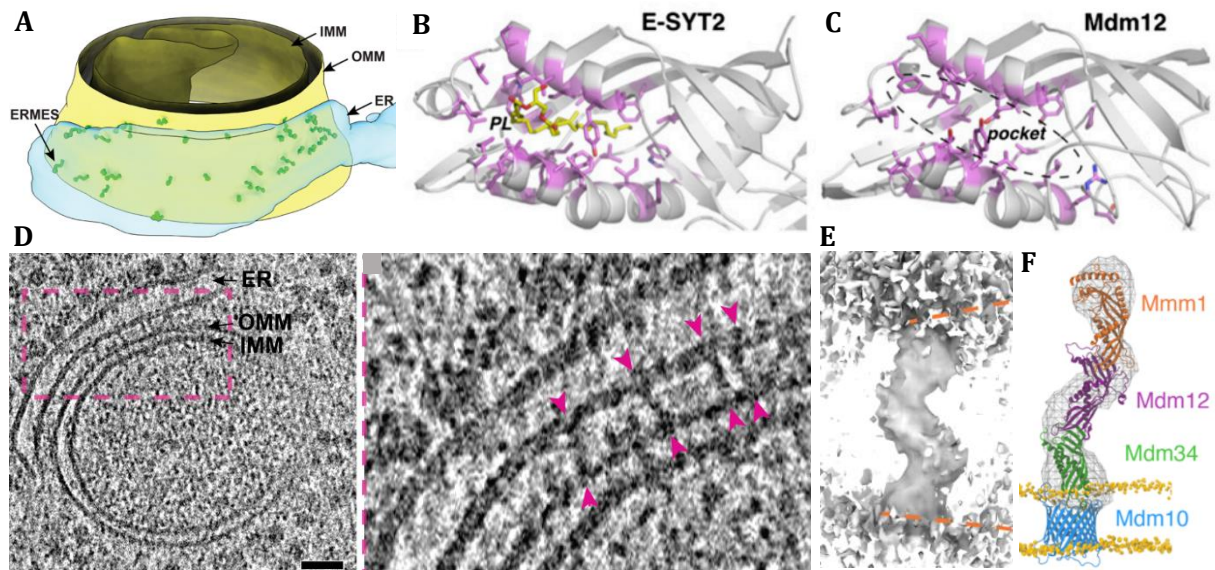


**Figure 62 : Organisation du complexe ERMES, première version.** A) Architecture des domaines SMP de Mmm1 et Mdm12 *in vitro* en cryo-EM. B) Reconstruction 3D du complexe formé par Mmm1 et Mdm12 avec Mmm1 en dimère. C) Modèle proposé pour le transfert de lipides dans le MCS, le complexe ERMES représenté comme une « navette à lipide » mobile grâce aux linkers de Mdm34 et Mmm1 (AhYoung et al., 2015).

récemment *in situ* suggère un arrangement séquentiel des domaines SMP de Mmm1, Mdm12 et Mdm34, avec à chaque fois une boucle terminale d'une sous-unité interagissant avec une crevasse formée par la sous-unité suivante sans faire de dimère, ceci ayant été déjà démontré dans la co-cristallisation de Mmm1 et Mdm12 (Jeong et al., 2017). Cet assemblage forme un pont entre le RE et la mitochondrie (figure 63). Cependant les lipides ne peuvent pas passer aux interfaces entre les différentes sous-unités. Des réarrangements sont nécessaires, probablement permis par les régions linkers (Wozny et al., 2022).

Le complexe ERMES participe à la formation des MCSs par son assemblage qui créé, d'après les données de moyennage de cryo-EM *in situ*, un pont de ~24,2 nm entre les deux membranes et permet le transfert de phospholipides (grâce aux domaines SMP présents dans les protéines qui le composent) du RE vers la mitochondrie.

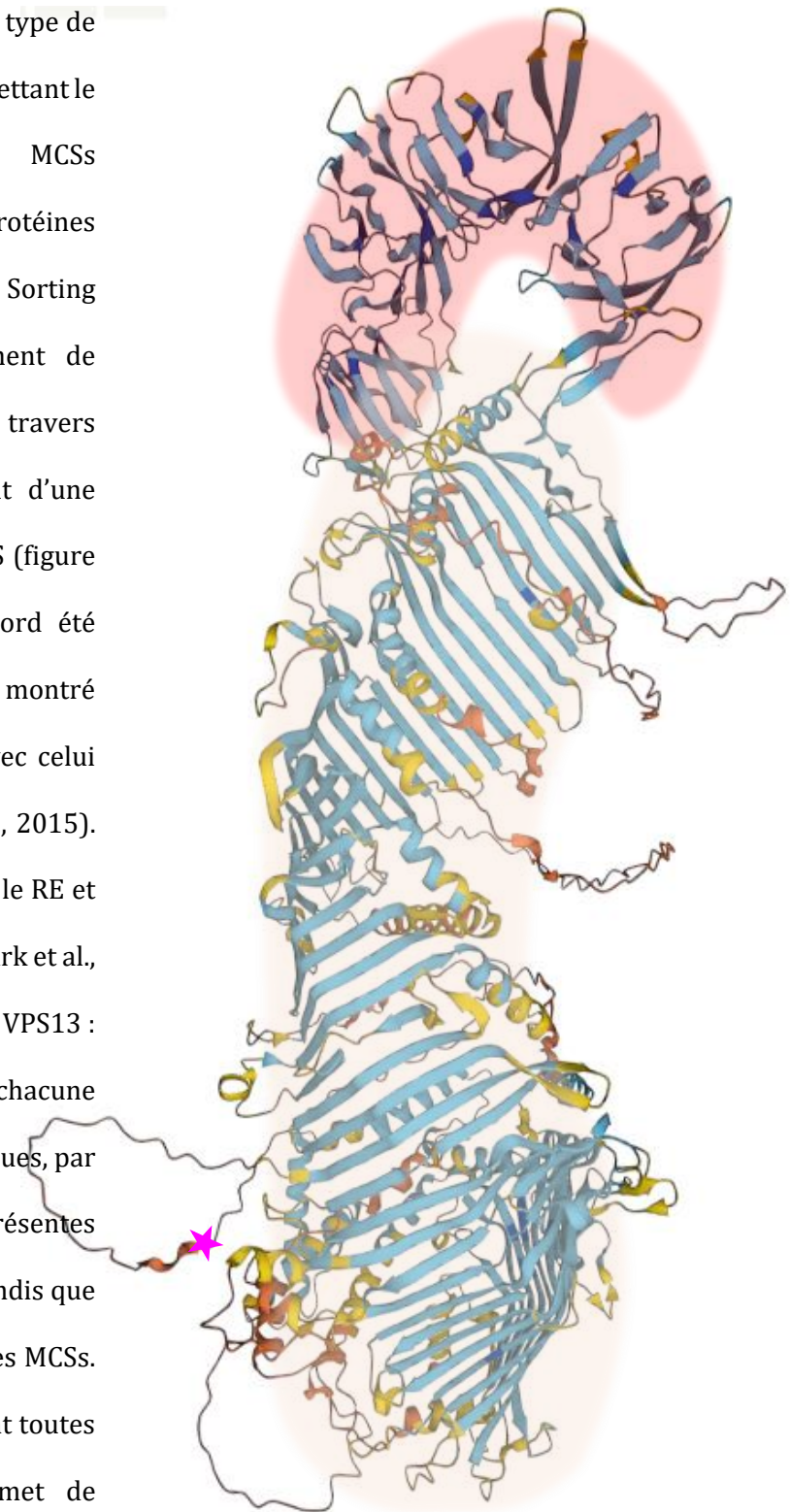




**Figure 63 : Organisation du complexe ERMES.** A) Modèle de cryo-electro tomogramme d'un MCS RE/mitochondrie montrant les ponts formés par les complexes ERMES. Pour une surface de MCS de  $0,04 \mu\text{m}^2$ , on observe environ 30 ponts formés par le complexe ERMES. B) Structure cristallographique du domaine SMP de E-SYT2, la poche hydrophobe (violet) peut accueillir un phospholipide (jaune)(Schauder et al., 2014). C) Structure du domaine SMP de Mdm12 (Jeong et al., 2017). D) Cryo-EM image d'un site de contact RE/mitochondrie et zoom dans le MCS. Les flèches indiquent les connexions créées par le complexe ERMES en moyenne la taille du complexe est de  $\sim 24.2 \text{ nm}$ . E) Carte 3D du complexe ERMES obtenue par la moyenne de sous-volumes générés par cryo-ET. F) Modèle d'assemblage des protéines du complexe ERMES, formant un tunnel à phospholipides qui relie le RE et la mitochondrie (Wozny et al., 2022).

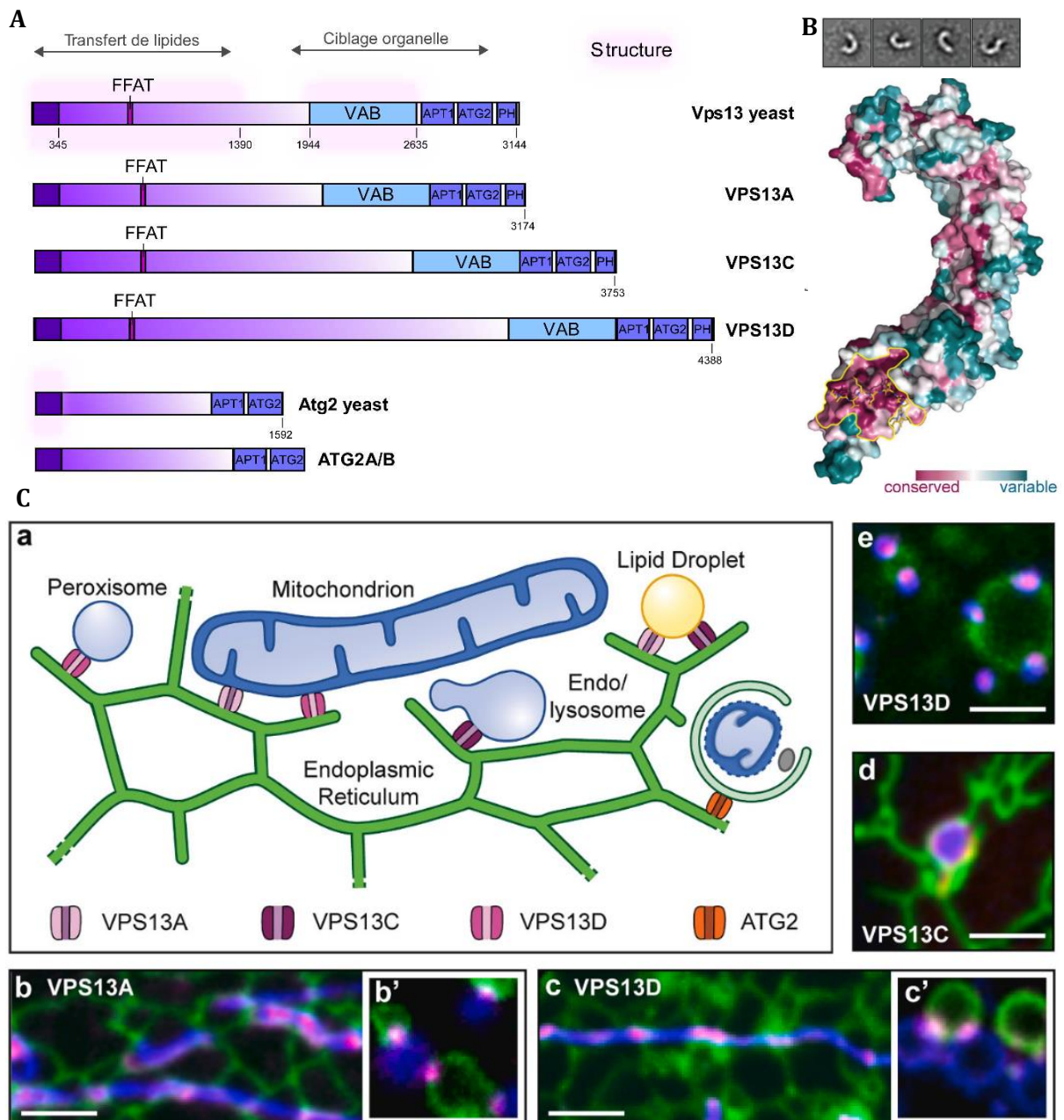
Une autre protéine chez l'Homme possède un domaine SMP, il s'agit de **PDZD8**. Cette protéine possède un domaine transmembranaire N-terminal ancré à la membrane du RE et une région C1 suivie d'un coiled-coil qui lie Rab7 présente aux endosomes ou aux lysosomes. Au sein de ces contacts, PDZD8 transporte différents lipides comme le PA, la PS et la PC (Shirane et al., 2020)(Gao et al., 2021). PDZD8 est aussi présente dans les MCSs RE/mitochondrie mais aucune étude à ce jour ne montre l'implication de cette protéine dans le transport de lipides entre ces compartiments. Cependant, une étude indique que la délétion de cette protéine impacte fortement l'intégrité des MCSs RE/mitochondrie et que ceci affecte le transfert de calcium entre ces deux organelles (Hirabayashi et al., 2017).

Enfin, il existe un dernier type de protéines connues à ce jour permettant le transfert de lipides aux MCSs RE/mitochondrie. Ce sont les protéines de la famille **VPS13** (Vacuolar Sorting Protein). Ces protéines forment de grands tunnels hydrophobes au travers desquels les lipides passeraient d'une membrane à l'autre dans un MCS (figure 64). La protéine Vps13 a d'abord été identifiée chez la levure et il a été montré que son rôle était redondant avec celui du complexe ERMES (Lang et al., 2015). Elle est localisée aux MCSs entre le RE et la mitochondrie ou la vacuole (Park et al., 2016). Chez l'Homme, il existe 4 VPS13 : VPS13A, B, C et D. Elles sont chacune localisées dans des MCSs spécifiques, par exemple VPS13A et D sont présentes entre le RE et la mitochondrie tandis que VPS13C est engagée dans d'autres MCSs. A l'exception de VPS13B, elles ont toutes un motif FFAT qui leur permet de s'associer avec le RE via VAP (Leonzino et al., 2021). Afin de ponter le RE et une autre organelle, ces protéines ont une région VAB (Vps13 adaptor binding)



**Figure 64 : Modèle AlphaFold de VPS13A.** La position du motif FFAT permettant l'attachement au RE est marquée par une étoile. La région C-terminale permettant la liaison avec une autre organelle est repérée en rouge et le tunnel à lipides situé en N-terminal en orange. Chacune de ces composantes sera détaillée dans ce chapitre.

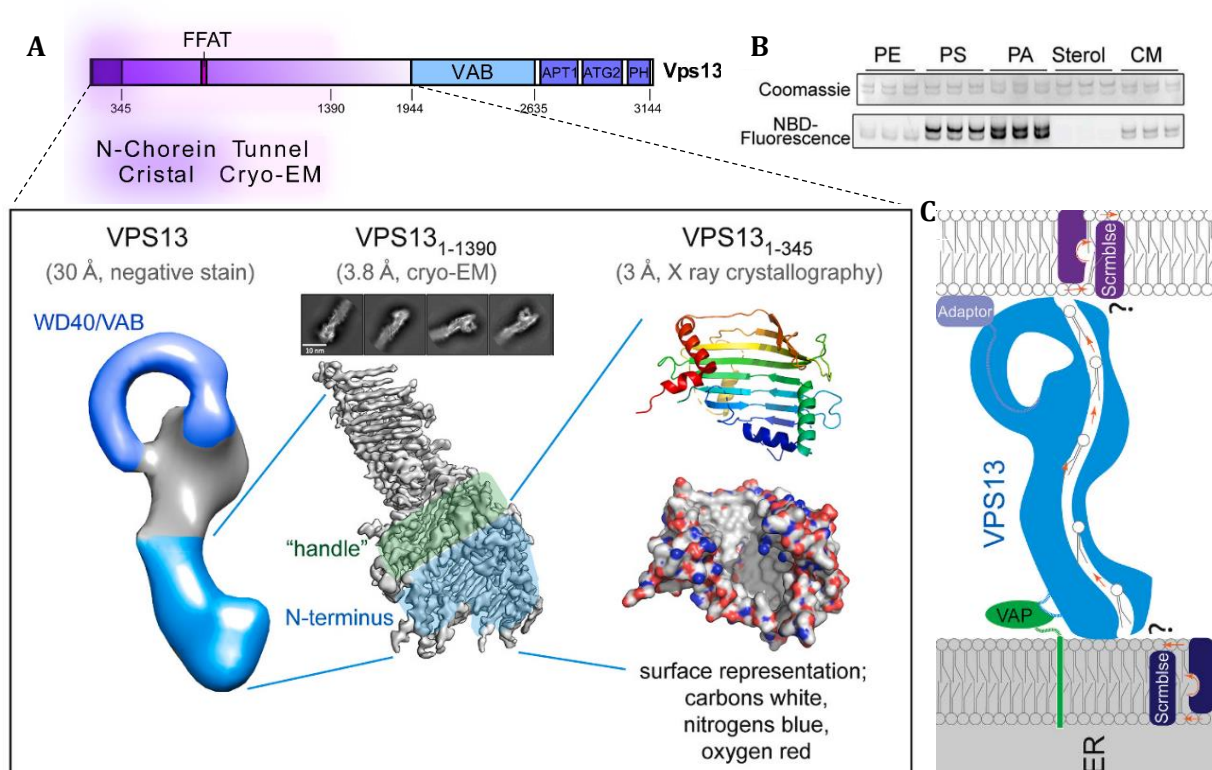
parfois appelée WD40 et/ou un domaine DH/PH et/ou un motif APT1 et ATG-C (figure 65). Ces déterminants situés en C-terminal permettent la liaison avec un adaptateur ou une membrane spécifique d'une organelle (Bean et al., 2018). Par exemple, VPS13D est reliée à la mitochondrie par l'intermédiaire de la GTPase Miro qui interagit avec sa région VAB (Guillén-Samander et al., 2021). La structure du domaine VAB de Vps13 (levure) en interaction avec le motif Proline-X-Proline de Mcp1p, une scramblase présente à l'OMM chez la levure, a été résolue récemment (Adlakha et al., 2022). Le domaine PH de VPS13A peut se lier à XK, une scramblase de la membrane plasmique. Les scramblases sont des protéines capables de rééquilibrer les lipides entre les feuillettes membranaires. Le transfert de lipides dépendant de VPS13A entre le RE et la membrane plasmique serait donc couplé au scrambling des lipides au sein des membranes (Guillén-Samander et al., 2022). Le motif ATG2\_C comporte une hélice amphipatique (c'est-à-dire avec une face hydrophobe et une face polaire) qui permet à VPS13 de se localiser aux gouttelettes lipidiques (Kumar et al., 2018). Le domaine APT1 interagit avec des phospholipides comme le PI3P, enrichi principalement dans les membranes des endosomes et des autophagosomes (Rzepnikowska et al., 2017) et le domaine DH/PH interagit avec le PI4P ou le PI4,5P2 et/ou avec des protéines GTPases (figure 65). Beaucoup d'éléments restent inconnus à ce jour mais pour résumer, les VPS13 ont plusieurs composantes en C-terminale qui leur permettent d'être localisée à un ou plusieurs compartiments cellulaire et grâce à leur FFAT, elles peuvent ponter les membranes des deux organelles engagées dans le MCS.



**Figure 65 : Pontage des membranes par les protéines VPS13 et engagement dans les MCSs.** A) Représentation schématique des protéines VPS13 et similarités avec les protéines ATG2 impliquées dans la formation des autophagosomes. Les zones surlignées en rose sont celles dont la structure a été résolue. Focus sur la partie C-terminale permettant la reconnaissance d'adaptateurs situés sur les membranes de divers compartiments cellulaires. B) Structure du domaine VAB capable d'interagir avec un adaptateur qui comporte un motif P-X-P (en jaune). Le code couleur indique la conservation de la séquence (Adlakha et al., 2022). C) Les VPS13 de mammifères sont localisées dans divers MCSs (a). VPS13A est adressée à la mitochondrie (b, Protéine d'intérêt en magenta, organelle cible en bleu et RE en vert) par son domaine DH/PH et son motif ATG2 et aux gouttelettes lipidiques par son motif ATG2 seul (b'). VPS13C est recrutée aux endosomes (d) et aux gouttelettes lipidiques et VPS13D aux peroxisomes et à la mitochondrie via son domaine VAB qui interagit avec Miro (e,c) (Leonzino et al., 2021)(Dziurdzik and Conibear, 2021).

Ces protéines de plus de 3000 acides aminés forment un tunnel par lequel peuvent transiter différents types de phospholipides comme la PC, PS, le PA et la PE. Des expériences réalisées *in vitro* montrent qu'une protéine VPS13 peut transférer 0,4 PS par minute, il semble donc que ces LTPs soient moins efficaces que les LTPs « navettes » comme OSBP ou MIGA2. Cependant, le système de reconstitution utilisé était incomplet, la protéine entière n'ayant jamais été purifiée (Kumar et al., 2018). Le tunnel à lipides, très riche en feuillets  $\beta$  a été révélé par cryo-EM et constitue la moitié N-terminale de la protéine (Li et al., 2020). Le motif N-Chorein qui comprend les 345 premiers acides aminés de ce tunnel a été résolu par cristallographie, il est la première poche hydrophobe qui accueille les lipides en provenance du RE. Ensuite, ces lipides transitent jusqu'à l'organelle cible dans le sillon qui se trouve dans la continuité du motif N-Chorein (Kumar et al., 2018)(figure 66). Les VPS13 constituent un système peu sélectif par lequel plusieurs lipides peuvent transiter d'une membrane à l'autre, sans la grande sélectivité des LTPs « navette ». Ces LTPs ont été découvertes récemment et depuis 5 ans les études à leur sujet se multiplient. Les forces qui permettent le transfert des lipides et les mécanismes de régulation de ce transfert restent à explorer, cependant la découverte de ces LTPs a introduit un concept très novateur dans le monde des MCSs. En effet, la taille des VPS13 ( $\sim 220$  Å de hauteur !) permet à ces protéines d'accueillir simultanément plusieurs lipides dans leur cavité (Li et al., 2020). Ceci suggère un transfert massif de lipides qui pourrait conduire à la croissance membranaire d'un organelle (Melia and Reinisch, 2022). Il a d'ailleurs été montré que les protéines ATG2, qui sont plus courtes mais qui ont une forte similarité de séquence avec les VPS13 pour la partie C-terminale fonctionnent de la même façon et permettent l'apport des lipides provenant du RE vers la membrane d'un phagophore en formation lors du processus d'autophagie (Maeda et al.,

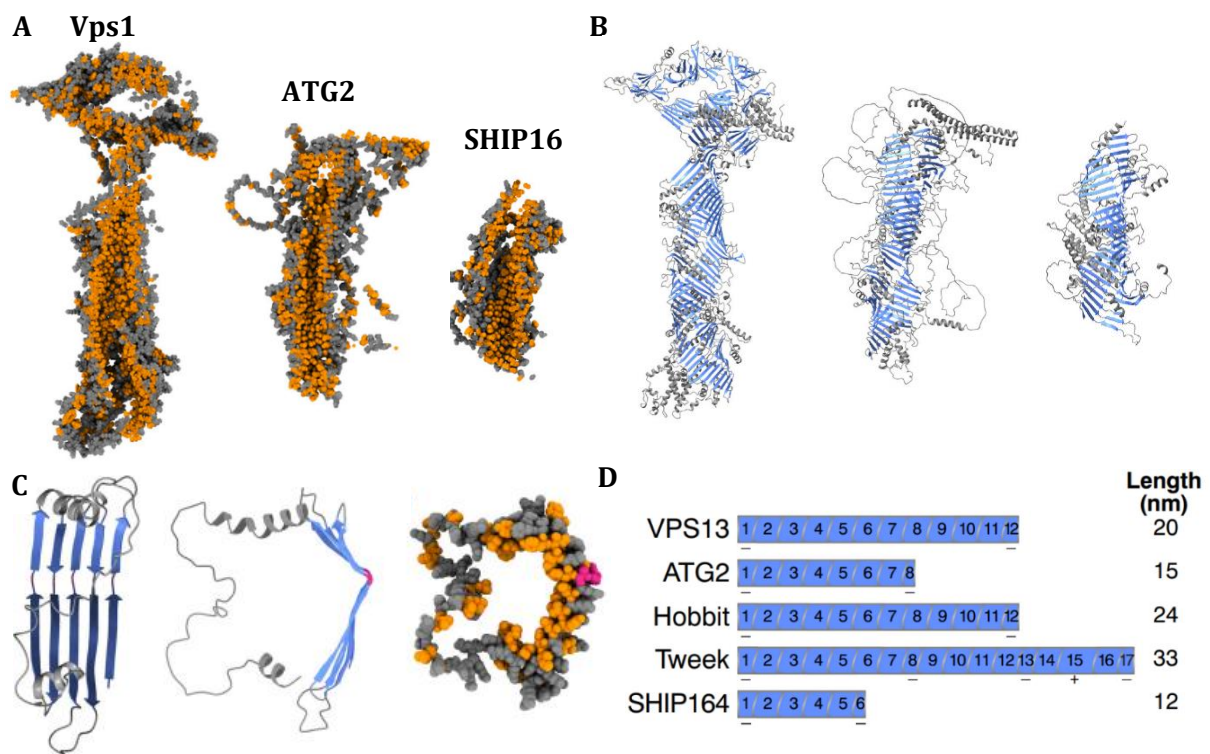
2019)(Valverde et al., 2019)(Osawa et al., 2019). De plus, avec OSBP, ATG9 participe à la réparation des lysosomes (Tan and Finkel, 2022)(voir figure 26)



**Figure 66 : Transfert de lipides par les protéines VPS13** A) Représentation schématique de Vps13 (levure). Encart : Architecture de la partie N-terminale qui comporte le tunnel à lipide. Une partie a été cristallisée (Kumar et al., 2018) (motif N-Chorein en violet) et la structure du tunnel a été résolue par cryo-EM (rose) (Li et al., 2020). B) Vps13 est incubée avec différents phospholipides marqués par du NBD et l'ensemble migre sur un gel. Le signal de fluorescence NBD indique la quantité de phospholipide portée par la protéine, qui elle est visualisée par marquage coomassie. Vps13 se lie essentiellement à la PS et au PA mais peut aussi transporter la PE et le ceramide (CM) (Kumar et al., 2018). C) Modèle proposé pour le transfert de lipides « en masse » entre les membranes, médié par l'association de LTPs « tunnel » de la famille VPS13 avec des adaptateurs pour ponter ces membranes : VAP pour son attachement au RE et une pléiade de possibilité pour le ciblage de l'autre organelle (Leonzino et al., 2021).

Nottons que récemment, des nouvelles protéines « VPS13-like » ont été décrites par homologie structurale basée sur des prédictions Alphafold ou RoseTTAfold (Toulmay et al., 2022). Par exemple, SHIP164 possède aussi un motif N-Chorein et est impliqué dans le trafic de lipides entre des petits endosomes et le Golgi (Hanna et al., 2022). Les protéines Tweek (Csf1 chez *S. cerevisiae*) et Hob (Hobbit chez *D. melanogaster*) sont aussi des LTPs « tunnels » qui ont une fonction aux MCSs RE/membrane plasmique (Neuman et al., 2022a). Les structures des VPS13

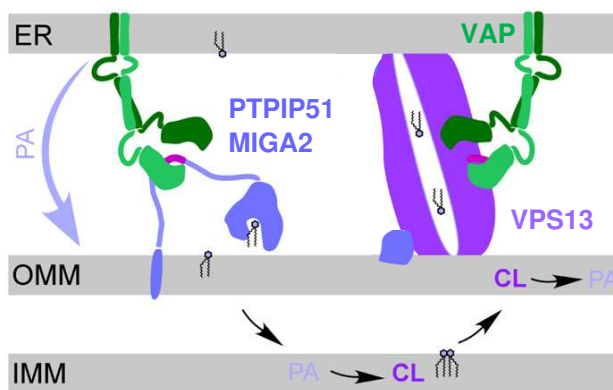
humaines n'ont pas été résolue, cependant la similarité (56%) avec les protéines de levure permet d'obtenir des modèles précis. Ces protéines sont de tailles variables mais semblent couvrir toute la distance qui sépare les deux organelle au MCS. La partie hydrophobes où les lipides transitent est composée d'une unité modulaire simple qui se répète pour former le tunnel. Le nombre d'unités varie selon les VPS13-like et ceci module la taille de la protéine (figure 67)(Neuman et al., 2022b)(Levine, 2022). Beaucoup reste a explorer sur cette nouvelle famille de LTPs, et notamment sur la façon dont elles peuvent moduler l'espace confiné des MCSs en imposant des distances qui séparent les membranes. De même, les études de l'activité de ces protéines seront importantes dans le futur. Ces protéines peu abondantes (~20 000 copies par cellule Hela) mais imposantes par leur taille, sont toutes impliquées dans des maladies. Par exemple, une mutation



**Figure 67 : Les tunnels des protéines VPS13-like ont différentes tailles.** A) Sections transversales des tunnels de Vps13, ATG2A et SHIP164, en orange les résidus hydrophobes bordent l'intérieur du sillon où les lipides transitent. B) Représentation en rubans des mêmes structures, principalement composées de feuillets  $\beta$  (bleus), un motif est répété : le RGB (Repeating  $\beta$  Groove). C) Modèle du RGB. D) Nombre de RGB présent dans les différentes protéines de la même famille et estimation de la longueur totale de chacune (Neuman et al., 2022a). Les données structurales disponibles en cryo-EM donnent des tailles moyennes quelque peu différentes : 22,5 nm pour VPS13 (Li et al., 2020), 20nm pour ATG2 (Li et al., 2020) et 10nm pour SHIP164 (Hanna et al., 2022).

invalidante de VPS13A cause la Neuroacanthocytose (*chorea-acanthocytosis*), une lourde pathologie neurodégénérative. La délétion de VPS13C augmente fortement les risques de développer la maladie de Parkinson et un organisme VPS13D KO n'est pas viable (Leonzino et al., 2021).

Chez l'Homme, PTPIP51, MIGA2, PDZD8, VPS13A et VPS13D sont les LTPs enrichies aux MCSs RE/mitochondrie qui peuvent potentiellement apporter du PA, précurseur de la CL à la membrane mitochondriale (figure 68). Les protéines impliquées directement dans la fusion et la fission mitochondriale décrites précédemment se concentrent également en ce lieu et leur activité dépend de ces lipides. L'intégrité des MCSs entre le RE et la mitochondrie est donc essentielle au maintien de la dynamique de l'organelle. La perturbation de l'un de ces paramètres engendre de graves désordres physiopathologiques.



**Figure 68 : schéma récapitulatif du transfert de PA aux MCSs RE/Mitochondrie.** Les LTPs enrichies aux MCSs RE/mitochondrie peuvent apporter du PA, précurseur de la CL à l'OMM. Celui-ci est ensuite converti en CL dans l'IMM puis une partie est retournée à la membrane externe, utile à la régulation de la fusion et la fission mitochondriale.

#### 4) Comment reconnaître différents phénotypes mitochondriaux ?

La mutation ou la délétion de protéines directement impliquées dans la fusion ou la fission mitochondriale perturbe drastiquement la dynamique du réseau mitochondrial et des aberrations morphologiques sont observables. Pour des défauts de fission, générés par délétion ou mutation des protéines Drp1, Mff ou encore la dynamine 2, on observe des mitochondries anormalement allongées (Tilokani et al., 2018). L'inhibition de la Dynamine 2 empêche la dernière étape de fission et ceci créé un « cou » qui sépare deux mitochondries (Lee et al., 2016). Au contraire, les défauts de fusion génèrent des phénotypes de mitochondries rondes, souvent dites fragmentées. Ceci est observé lors de la délétion de Mfn1, OPA1 ou encore la Mito-PLD (Tilokani et al., 2018),(Choi et al., 2006) et (Ban et al., 2017). Des mitochondries en cours de mitophagie sont



rondes également. Afin de distinguer ces deux derniers phénotypes on peut observer en microscopie électronique l'état des crêtes, qui sont détruites lors de la mitophagie (Yoshii et al., 2011). Notons cependant que la délétion de OPA1 perturbe aussi les crêtes mitochondriales sans induire de mitophagie (Stephan et al., 2020). Afin de confirmer le phénotype, il est possible d'exprimer une protéine impliquée dans la formation des autophagosomes comme LC3, sa colocalisation avec un marqueur mitochondrial indique que la mitochondrie est en cours de dégradation (Williams and Ding, 2018).

Comme mentionné précédemment, l'apport de lipides comme le PA provenant du RE à la membrane mitochondriale est essentiel pour permettre les phénomènes de fusion et de fission. Des études ont montré que la délétion de certaines protéines qui assurent ce transit comme VPS13D ou MIGA2 donne lieu à d'importants changements morphologiques (Zhang et al., 2016)(Anding et al., 2018)(Shen et al., 2021). Le phénotype observé est le même que pour un défaut de fusion : les mitochondries sont rondes (figure 69). Il est connu que le PA à la mitochondrie est crucial pour les événements de fusion, alors qu'au contraire il a tendance à inhiber la fission. Cependant, aucune étude n'a établi de lien direct à ce jour entre la délétion de ces LTPs et un défaut de fusion mitochondrial.

**Figure 69 : Phénotypes mitochondriaux rencontrés.** Les défauts de fissions sont associés à des longues mitochondries tandis que les défauts de fusion entraînent des mitochondries rondes, fragmentées. Ceci s'observe aussi lors de défauts d'apport de lipides par les LTPs. La mitophagie arrondi aussi les mitochondries mais des moyens existent pour reconnaître ce phénotype particulier.

**Mitochondries normales**

RPE1 cells

**Défauts de fusion  
Mitochondries rondes**

Mfn1-kd

(Tilokani et al., 2018) MEFs cells

**Défauts de fission  
Mitochondries allongées**

Drp1-kd

(Tilokani et al., 2018) MEFs cells

Mff siRNA

(Friedman et al., 2011) Cos-7 cells

Dyn2 siRNA

L: 736 nm  
D: 67 nm

(Lee et al., 2016) Sk-Mel2 cells

**Mito PLD RNAi**

Mito PLD RNAi

(Choi et al., 2006) NIH3T3 cells

M  
N

500nm

**CRISPR-OPA1**

CRISPR-OPA1

(Ban et al., 2017)(Stephan et al., 2020) HeLa cells

WT  
OPA1-KD

500nm

**Mitophagie  
Mitochondries rondes**

Mito  
GFP-LC3

Colocalisation avec marqueurs de l'autophagie

Désorganisation des crêtes

Autophagosome

(Williams and Ding, 2018) MEFs cells

d  
f

500nm

(Yoshii et al., 2011) MEFs cells

**Défaut de transport de lipides par KO des LTPs aux MCSs RE/mitochondrie  
Mitochondries rondes**

Miga2<sup>-/-</sup>

500nm

(Zhang et al., 2016) MEFs cells

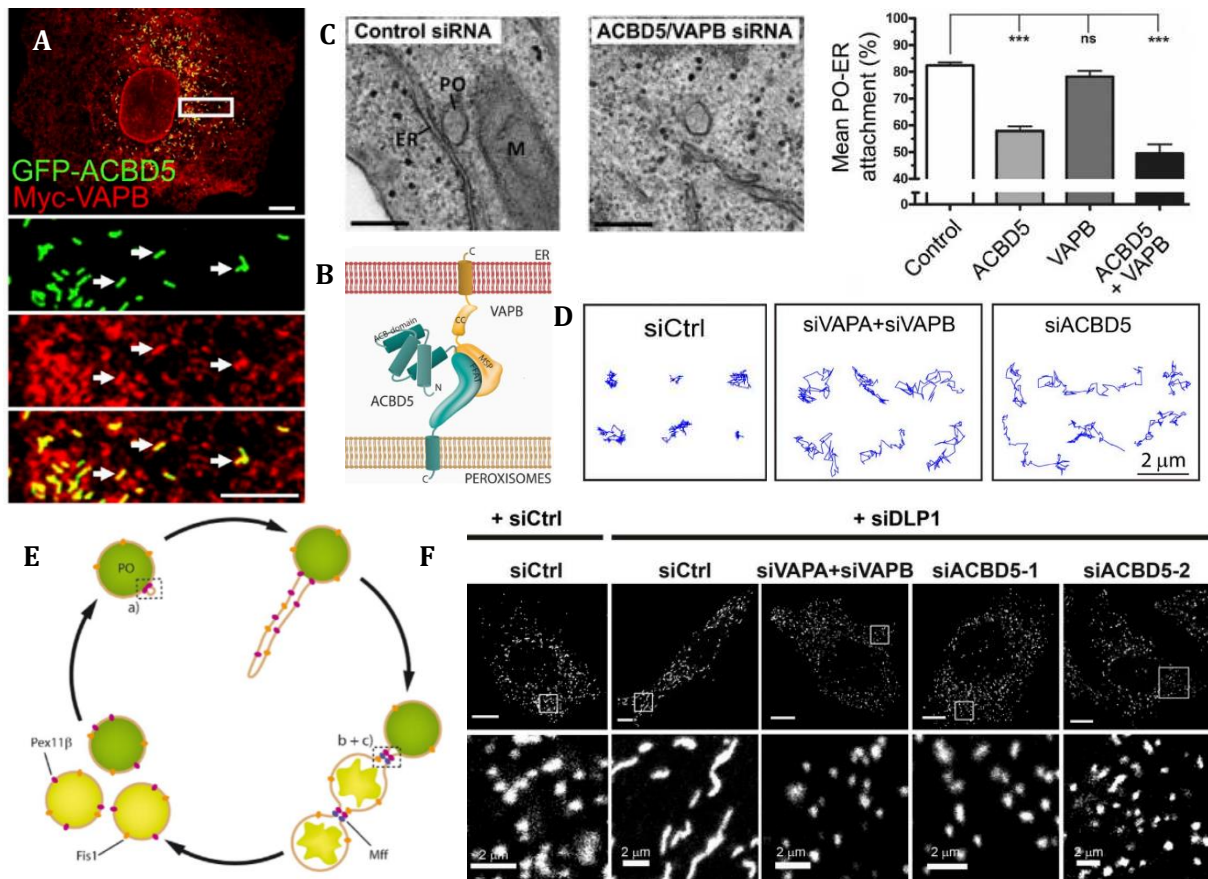
VPS13D KO

2µm

(Anding et al., 2018) HeLa / Drosophila

## *ii Exemple des contacts RE/Peroxisome*

Les peroxysomes (PO) sont des organelles qui jouent un rôle clé dans le métabolisme des lipides. Par exemple, ils contribuent à la  $\beta$ -oxydation des acides gras et à la synthèse des acides biliaires et des plasmalogènes (des phospholipides qui contiennent un alcool gras lié au glycérol par une liaison vinyloxy au lieu d'un acide gras (Wanders and Waterham, 2006)). Les PO sont des organelles extrêmement dynamiques dont la forme évolue. Ils peuvent proliférer et ceci implique des changements morphologiques importants. En effet, ces organelles très dynamiques ont la capacité d'étendre leur membrane en vue d'une future division. Dans un premier temps, la membrane est remodelée par Pex11B et allongée par un apport de phospholipides, s'en suit un recrutement de la machinerie de fission comprenant Fis1 et DLP1 mais aussi DRP1 et Mff, qui participent aussi à la fission mitochondriale (Schrader et al., 2016). Les PO forment des MCSs avec le RE grâce à l'interaction de ACBD5 (Acyl-CoA binding domain 5) avec les récepteurs VAPs (Costello et al., 2017)(Hua et al., 2017) via un motif FFAT particulier régulé par phosphorylation par la kinase GSK3 $\beta$  (glycogène synthase kinase 3 $\beta$ ) (Kors et al., 2022a). Ces MCSs influencent fortement la dynamique de l'organelle et jouent un rôle dans le transfert de lipides permettant la croissance des PO ; cependant ce mécanisme de transfert n'est pas connu (figure 70). VPS13D, localisée aux MCSs RE/PO, pourrait remplir ce rôle (Leonzino et al., 2021). Inhiber la formation des MCSs RE/PO entraîne une forte diminution des taux de plasmalogènes et de cholestérol, conduisant à de lourds désordres neurologiques (Darwisch et al., 2020). Les MCSs RE/PO sont, comme les MCSs RE/Mitochondrie, indispensables au maintien de la dynamique et de la morphologie de l'organelle, via le transfert de lipides.

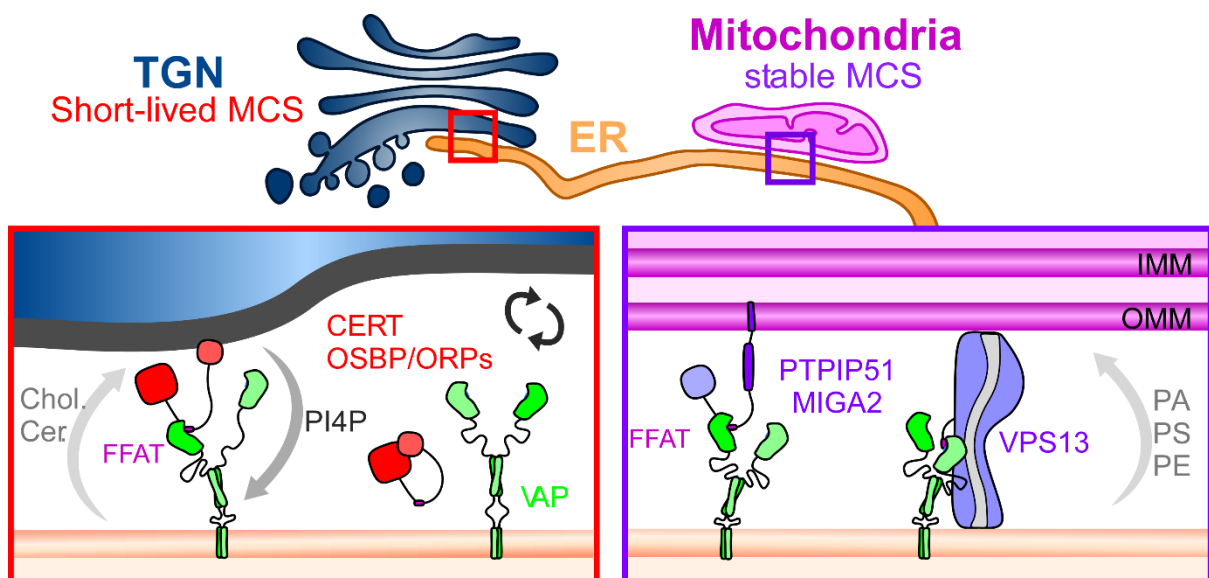


**Figure 70 :** A) Colocalisation entre le récepteur du RE VAP-B et la protéine contenant un FFAT ACBD5 au PO. B) Schéma de l'interaction ACBD5/VAP-B dans le MCS RE/PO. C) Les MCSs RE/PO nécessitent la protéine ACBD5. D) les MCSs RE/PO influencent la dynamique de l'organelle : les suivis de trajectoires montrent que les PO sont plus mobiles en absence de VAP ou ACBD5. E) Schéma de la division du PO (Schrader et al., 2016). Remodelage de la membrane et élongation par apport de lipides, fission par des GTPases. F) Le silencing de la DLP1 inhibe la fission, les PO sont allongés. Dans ce contexte, l'abolition des MCSs RE/PO par silencing de ACBD5 ou VAP-A/VAP-B empêche l'élongation des membranes précédant la fission. D'après (Costello et al., 2017) et (Hua et al., 2017).

### 3. Comparaison de deux sites de contact : RE/Golgi et RE/Mitochondrie

Nous avons précédemment détaillé la fonction de transfert de lipides des MCSs RE/TGN et RE/Mitochondrie ainsi que les acteurs moléculaires qui remplissent cette fonction. Cependant nous n'avons pas disséqué les différences entre ces deux territoires. Il s'avère que la dynamique des MCSs RE/TGN s'oppose à celle des MCSs RE/Mitochondrie. En effet, OSBP réalise des cycles répétés d'engagement et de désengagement aux MCSs pour se placer dans les zones riches en PI4P

nécessitant du cholestérol (Mesmin et al., 2017) de même que CERT, qui s'accroche et se décroche perpétuellement du TGN via son domaine PH (Hanada et al., 2009). Ceci est sans compter la nature très dynamique du Golgi, dont les citernes changent de composition avec des vitesses de maturation de l'ordre de la minute, ce qui signifie que les contacts sont éphémères et doivent être constamment renouvelés (David et al., 2021). En revanche, diverses observations suggèrent un couplage entre la dynamique des mitochondries et celle du RE. Il semble en effet que les MCSs RE/mitochondrie sont maintenus pendant les mouvements de ces organelles (Friedman et al., 2010)(Valm et al., 2017), suggérant qu'ils sont relativement stables. En effet, les MAMs (Mitochondria Associated Membranes) peuvent être purifiés selon des protocoles s'étalant sur des heures. De plus, les MCSs RE/mitochondrie sont bien décrits pour leur implication dans les événements de fission et de fusion des mitochondries, en regroupant la machinerie protéique dédiée (Abrisch et al., 2020) et en stabilisant les mitochondries tout au long de ces processus (Guo et al., 2018). De plus, certains partenaires de VAP au sein de ces MCSs, comme PTPIP51 et MIGA2, possèdent un TMD ancrés dans l'OMM, ceci suggère que l'interaction entre ces protéines et VAP n'est pas soumise à un « turnover » comme c'est le cas pour OSBP et CERT (figure 71).



**Figure 71 : Comparaison des MCSs RE/TGN soumis à un « turnover » permanent des LTPs partenaires de VAP, en opposition avec la stabilité des MCSs RE/mitochondrie.**

#### 4. Architecture fonctionnelle du récepteur commun VAP

La plupart des LTPs mentionnées dans les chapitres précédents utilisent VAP comme point d'ancrage au RE. La famille de protéines VAP joue donc un rôle clé dans la formation des MCSs. VAP-A et VAP-B sont en effet les récepteurs d'une multitude de protéines à motif FFAT. Nous allons maintenant détailler la structure, l'évolution et les fonctions de ces récepteurs.

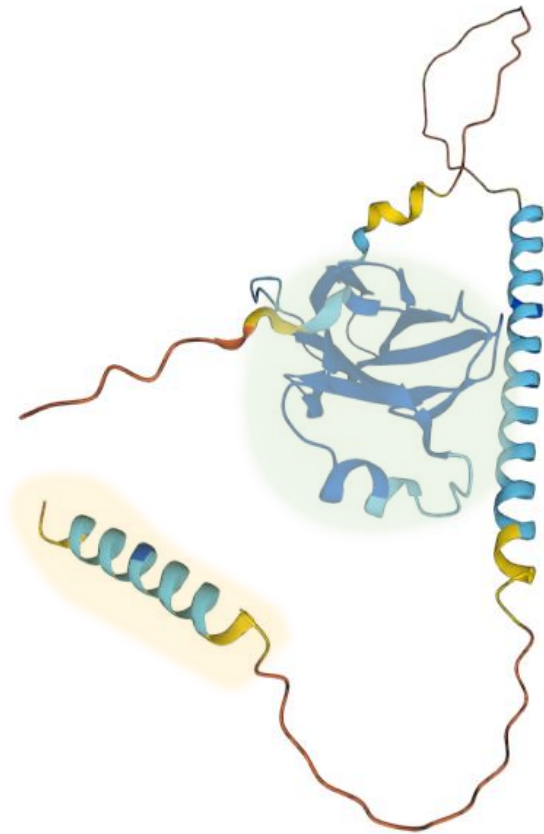
##### **(a) Famille des VAPs**

En 1995, la première protéine VAP est identifiée chez *Aplysia californica*. Il est montré qu'en interagissant avec des protéines VAMPs (vesicles associated membranes proteins) comme SNAP-25, elle est indispensable à la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique et permet ainsi la transmission synaptique, cette protéine de 33 kDa est appelée VAP-33 (VAMP-associated protein of 33 kDa)(Skehel et al., 1995). Un homologue de VAP-33 est identifié en 1998 chez l'homme avec 50% de similarité de séquence, cette protéine est largement exprimée dans tous les tissus, ce qui indique qu'elle participe à la fusion de vésicules également dans des cellules non neuronales (Weir et al., 1998). Rapidement, des analogues de VAP sont identifiés et on constate que cette famille est très conservée dans l'évolution. Leur présence, leur abondance dans tous les organismes eucaryotes et leur importance physiologique font des VAPs des protéines très étudiées depuis les années 2000. Ironiquement, l'interaction de VAP avec VAMP est peu définie au niveau moléculaire et pourrait n'exister que dans certaines conditions *in vitro* (Murphy and Levine, 2016).

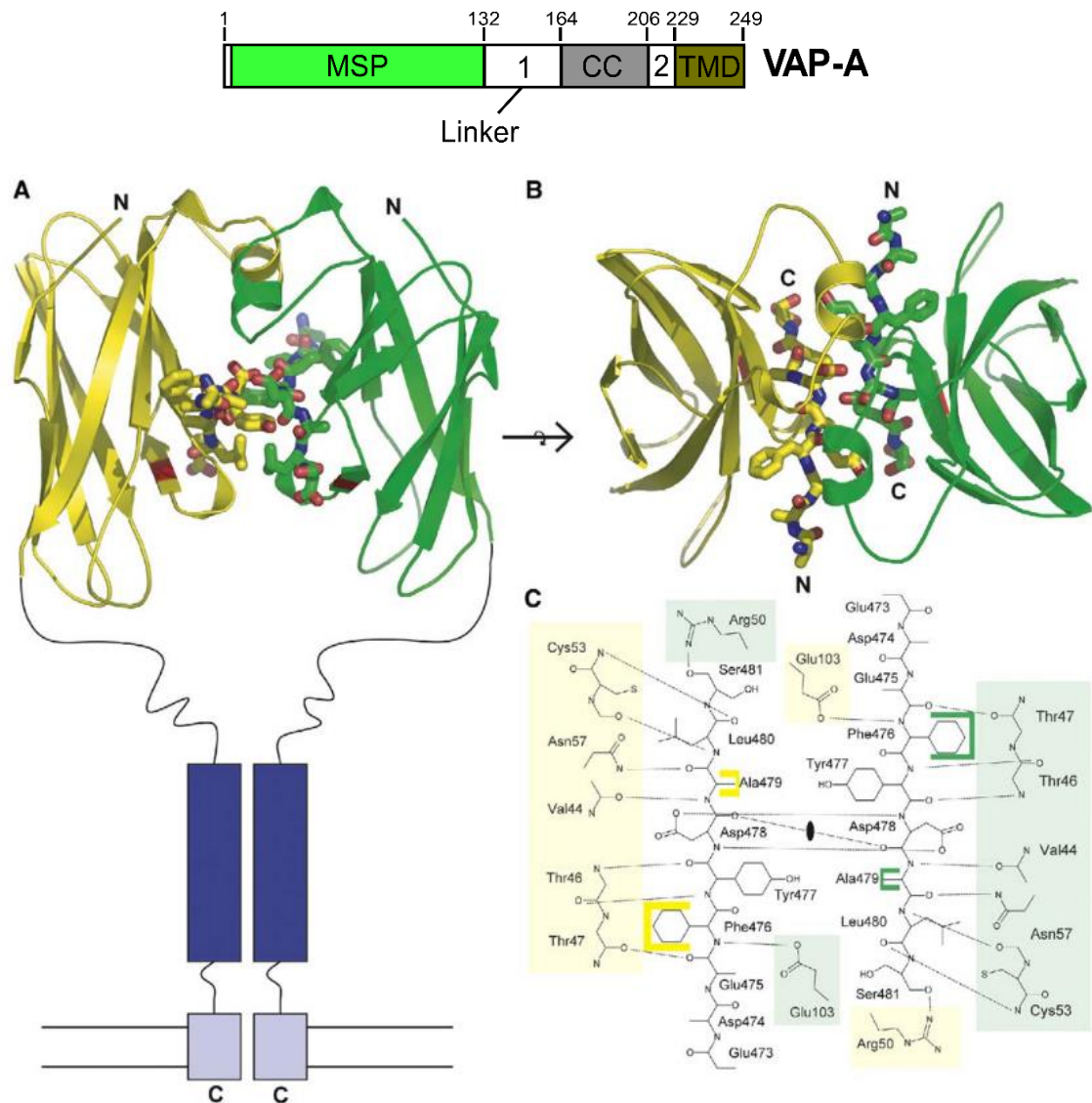
##### ***i Structure 3D de VAP***

La famille VAP est caractérisée par la présence d'un domaine MSP (Major sperm protein homology domain, la protéine MSP est très abondante dans les spermatozoïdes du Nématode, indispensable à leur motilité), une région centrale coiled-coil (CC) permettant la dimérisation de la protéine et un domaine transmembranaire (TMD) ancré au RE en C-terminal (figure 72). La structure cristallographique du domaine MSP de VAP-A a été résolue en complexe avec le motif FFAT de ORP1. Le MSP est caractérisé par 7 feuillets  $\beta$  comparables à ceux des immunoglobulines,

il peut s'assembler en dimère symétrique. Selon la structure cristallographique le complexe 2:2 formé par les domaines MSP et les motifs FFAT est stabilisé par plusieurs contacts de chaînes latérales entre les deux motifs FFAT (Kaiser et al., 2005)(figure 73). Cependant, les données de RMN suggèrent un complexe 1:1 dans lequel les mêmes chaînes latérales sont impliquées dans l'interaction entre VAP-A (Humaine) et le motif FFAT d'OSBP (Furuita et al., 2010)(figure 74). La structure de la protéine entière n'a jamais été résolue car elle comporte des régions non structurées (linkers) qui ne sont pas adaptées à la cristallisation. De même, les travaux de cryo-EM et de cryotomographie réalisés par l'équipe de Daniel Lévy (avec qui nous collaborons) sur VAP-A reconstitué dans un MCS *in vitro* ne permettent pas d'obtenir une résolution suffisante pour attribuer une structure à la protéine entière car la position et les densités de VAP-A n'étaient pas constantes au cours de l'analyse, suggérant une certaine flexibilité de la protéine. Néanmoins cette analyse montre une forme allongée pour VAP-A d'environ 12 nm à partir de la bicouche lipidique (de la Mora et al., 2021)(figure 75).

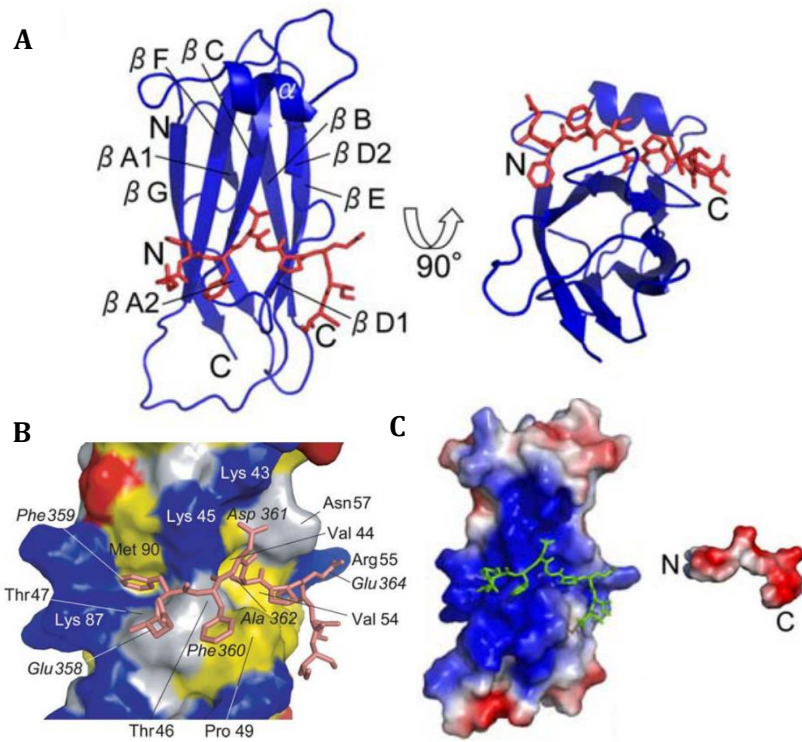


**Figure 72 : Modèle AlphaFold d'un monomère de VAP-A (humaine).** La position du domaine MSP est repérée en vert et le TMD situé en C-terminal en jaune. Chaque domaine sera détaillé dans ce chapitre.

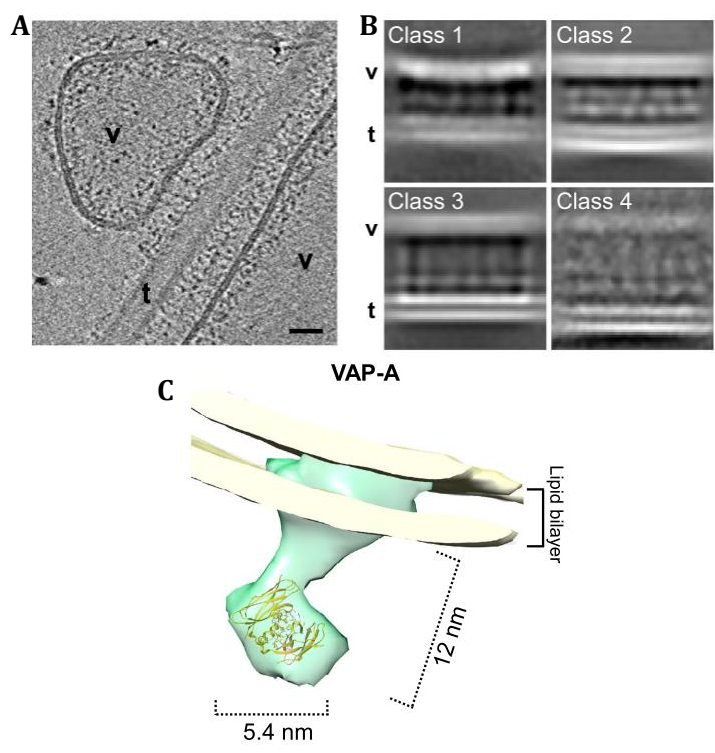


**Figure 73 : Structure cristallographique du complexe VAP-FFAT.** A et B) Deux motifs FFAT d'ORP1 de Rat (représentés en bâton) entre deux domaines MSP de VAP-A de Rat (1-125) (représentés en ruban). Le résidu VAP Cys53 est coloré en rouge pour aider l'orientation. A) Orientation plausible du complexe VAP-FFAT sur les membranes. Les CC sont représentés en bleu foncé, et les TMD en bleu clair. C) Schéma des interactions moléculaires entre les deux MSP de VAP et les deux motifs FFAT (même orientation qu'en B). Les interactions hydrophobes de van der Waals sont indiqués par des barres colorées (Kaiser et al., 2005).





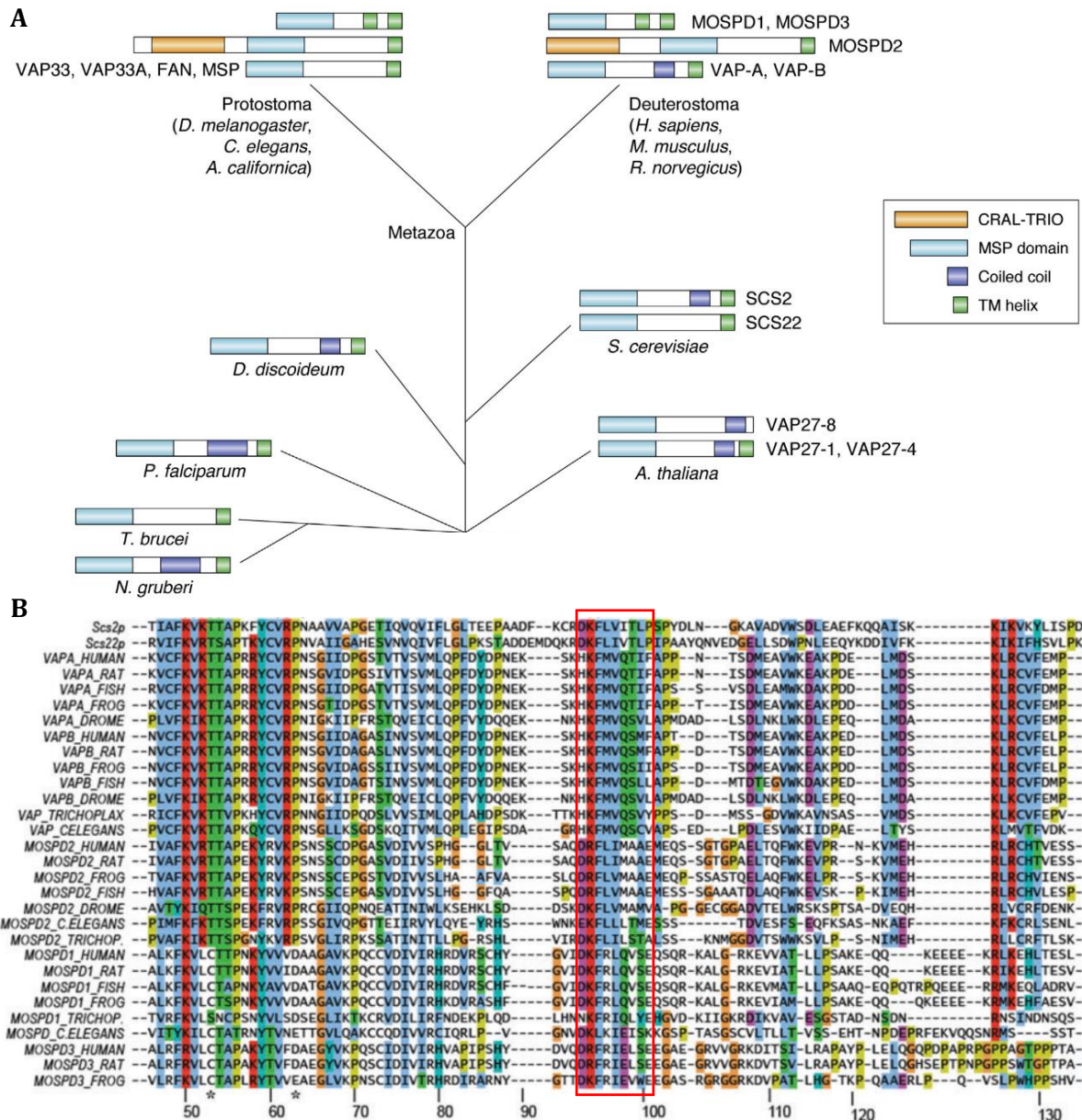
**Figure 74 : Structure RMN du complexe VAP-A FFAT.** A) Motifs FFAT d'OSBP (358-366) (en rouge) dans le domaine MSP de VAP-A (6-125) (en bleu). B) Détail de l'interaction, les résidus d'OSBP sont en italique. C) Surfaces du MSP et du FFAT colorées selon le potentiel électrostatique. (Furuita et al., 2010).



**Figure 75 : Cryo-ET** A) MCS reconstitué entre une vésicule (v) contenant VAP-A et un tube de galactosylceramide (t) contenant du PI4P et PH-FFAT. Bar = 25nm. B) 4 classes 3D de MCSs ont été déterminées du fait de l'hétérogénéité des distances intermembranaires. La classe 3, la plus homogène a été retenue pour le moyennage de sous volumes de tomogrammes. C) Modèle 3D de VAP-A obtenu. La résolution de 19,6 Å est insuffisante pour attribuer la structure (de la Mora et al., 2021).

## ii Evolution moléculaire des VAPs

Les homologues de VAP qui contiennent un domaine MSP et un TMD sont répandus dans toutes les branches phylogénétiques des eucaryotes (Dudás et al., 2021). Scs2p, un des deux analogues de VAP-A chez *Saccharomyces cerevisiae* possède 38% d'identité et 66% de similarité de séquence avec VAP-A (Kagiwada et al., 1998).

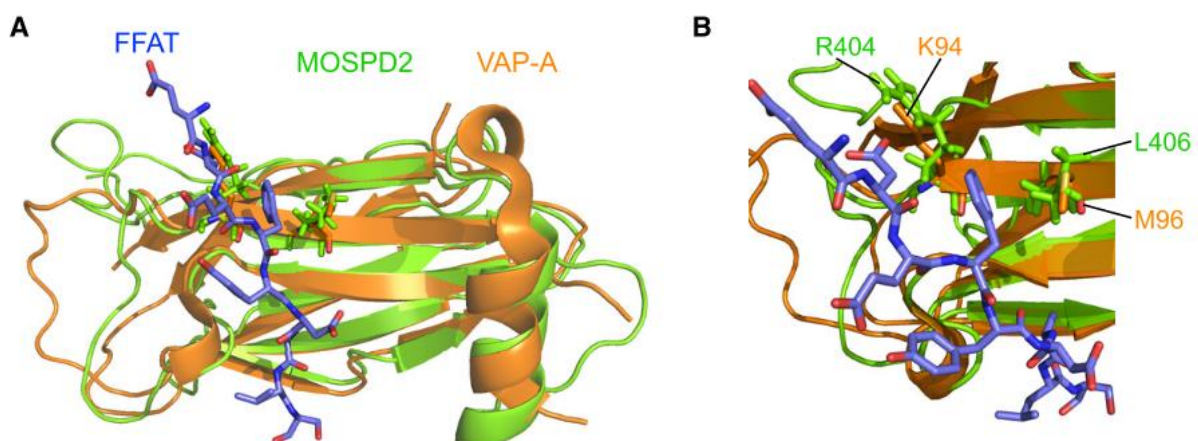


**Figure 76 :** A) Aperçu schématique de l'évolution des protéines VAP basé sur l'analyse des séquences, ces protéines ont été caractérisées expérimentalement (Dudás et al., 2021). B) Alignement des domaines MSP de protéines de la famille des VAPs incluant les protéines de levure Scs2p et Scs22p. L'encadré rouge représente la région du MSP la plus conservée qui correspond au site de liaison d'un motif FFAT.

Chez l'Homme il y a 7 protéines dans la famille des VAP : VAP-A, VAP-B et VAP-C ; la forme C est une version tronquée de VAP-B qui possède uniquement une partie du MSP dont le rôle n'a pas été analysé (Nishimura et al., 1999). Il existe également une isoforme allongée de VAP-A appelée VAP-A-L dont le rôle n'est pas identifié. A cela s'ajoutent les protéines MOSPD1, 2 et 3 (motile sperm domain containing proteins). Ces protéines ont été identifiées indépendamment de VAP mais possèdent un domaine MSP (Thaler et al., 2011)(Di Mattia et al., 2018)(Cabukusta et al., 2020). Certaines protéines de la famille VAP possèdent un domaine CRAL/Trio (cellular retinaldehyde-binding protein and triple functional domain protein) permettant la liaison à des petites molécules lipophiles (Zimmer et al., 2000) (Di Mattia et al., 2018) (figure 76).

### *iii Les homologues MOSPD*

Malgré le rôle important des protéines VAPs dans la formation des MCSs et le transfert des lipides et autres métabolites, les cellules KO pour VAP-A ou VAP-B sont viables et les contacts entre le RE et d'autres organites persistent (Dong et al., 2016)(Stoica et al., 2014). Ceci suggère la présence d'autres protéines capables de se substituer à VAP-A et VAP-B, du moins partiellement. Par une analyse protéomique, l'équipe de Fabien Alpy a mis en évidence la protéine MOSPD2 qui comporte un domaine MSP avec un site de liaison aux motifs FFAT, la séquence de cette protéine possède 50% de similarité avec VAP-A (figure 77). MOSPD2 est ancrée au RE par son TMD et est



**Figure 77 :** A) Aligment des structures des domaines MSP de MOSPD2 et de VAP-A en complexe avec le motif FFAT de ORP1. La structure de MOSPD2 est une prédiction basée sur des similarités de séquences. B) Interface de liaison entre le FFAT et le MSP, les résidus critiques K94 et M96 de VAP-A sont R404 et L406 pour MOSPD2 (Di Mattia et al., 2018).

impliquée dans la formation des MCSs entre le RE et les endosomes, les mitochondries et le Golgi grâce à son interaction avec les protéines contenant des motifs FFAT. Bien que 200 fois moins abondante, cette protéine semble jouer un rôle proche de celui de VAP-A. En plus de son domaine MSP elle possède le domaine CRAL/Trio qui serait impliqué dans le transport de lipides (Di Mattia et al., 2018). Cette information conduit à l'hypothèse qu'à elle seule, MOSPD2 pourrait remplir la fonction d'un complexe de type OSBP/VAP, c'est-à-dire assurer aussi bien l'attachement des membranes dans le MCS que le transfert de lipides. Cependant, des recherches plus approfondies sur ce domaine doivent être menées pour en comprendre la fonction. Récemment, il a été montré que MOSPD2 peut former un pontage entre le RE et les gouttelettes lipidiques grâce à une hélice amphipatique présente dans son domaine CRAL/Trio. Ainsi, MOSPD2 participe à l'homéostasie des gouttelettes lipidiques (Zouiouich et al., 2022).

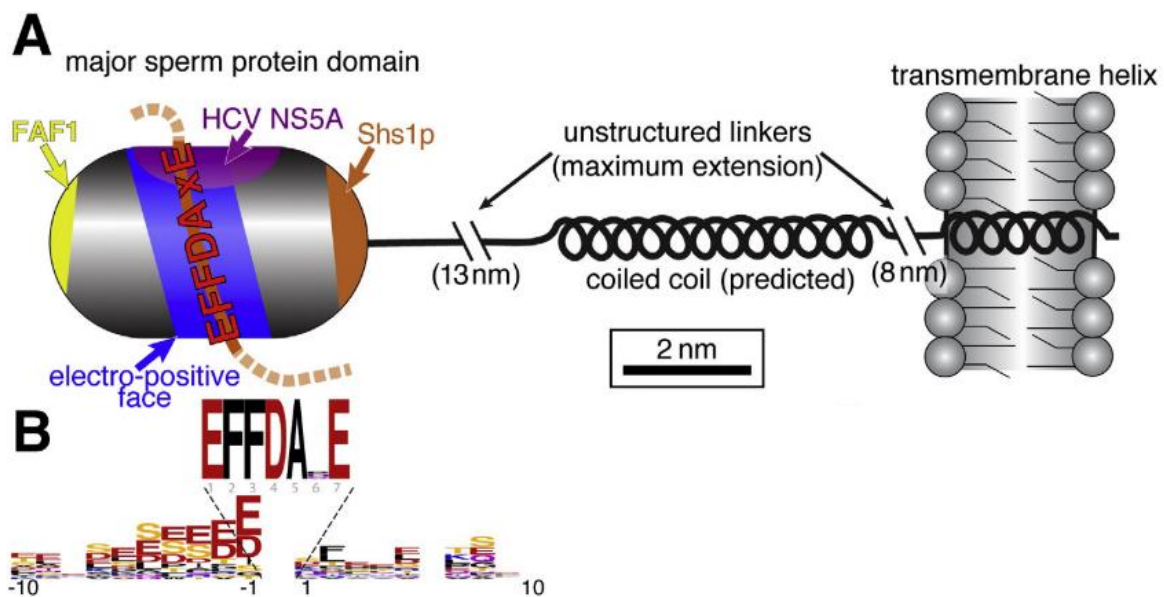
MOSPD 1 et 3 sont également des protéines qui comportent un domaine MSP, localisées au RE grâce à leurs double TMD. MOSPD1 a été identifiée pour son rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Thaler et al., 2011) et MOSPD3 joue un rôle dans la reformation de l'enveloppe nucléaire après la division cellulaire. Récemment, il a été montré que MOSPD1 et MOSPD3 interagissent avec des partenaires contenant des motifs FFAT non conventionnels (voir détails page 98)(Cabukusta et al., 2020).

### **(b) Reconnaissance des motifs FFAT**

Le rôle majeur des protéines VAPs est de servir de point d'ancrage au RE à des protéines partenaires contenant un motif FFAT (Loewen et al., 2003). Selon leur provenance, ces partenaires permettent le pontage du RE avec toutes les autres organelles, notamment afin de réguler le transport des lipides. Des analyses structurales des complexes VAP-FFAT visant à identifier les mutations qui abolissent spécifiquement l'interaction de VAP-A ou VAP-B avec les motifs FFAT ont été menées. En introduisant des mutations au hasard dans Scs2, il a été découvert que les résidus critiques permettant l'interaction étaient regroupés dans la région la plus conservée du domaine MSP (figure 76). En effet, les résidus K94 et M96 de VAP-A et K87 et M89 de VAP-B

forment un patch chargé positivement à l'intérieur du MSP qui permet la liaison du motif FFAT (Loewen and Levine, 2005)(Murphy and Levine, 2016).

Le motif FFAT conventionnel est constitué des sept résidus EFFDAXE (x peut être n'importe-quel acide aminé) avec une séquence acide en amont. Les résidus du motif FFAT se lient aux résidus aliphatiques du domaine MSP par des liaisons de van der Waals hydrophobes et des liaisons hydrogène (Kaiser et al., 2005). La séquence acide en amont ajoute une interaction électrostatique supplémentaire (Furuita et al., 2010) (figure 71,72 et 77). Le motif FFAT est présent dans des centaines de protéines mais il n'est pas toujours optimal, il tolère des substitutions d'acides aminés qui réduisent son affinité pour VAP. Un programme de prédiction établissant des scores aux FFAT été mis au point. Un score de 0 correspond à un motif FFAT parfait, ce qui signifie que l'interaction avec VAP est optimale. Le score est établi à partir de la séquence mais plusieurs points sont pris en compte pour définir un motif FFAT : il doit être conservé entre les espèces ; il doit apparaître dans une partie non structurée, accessible, de la

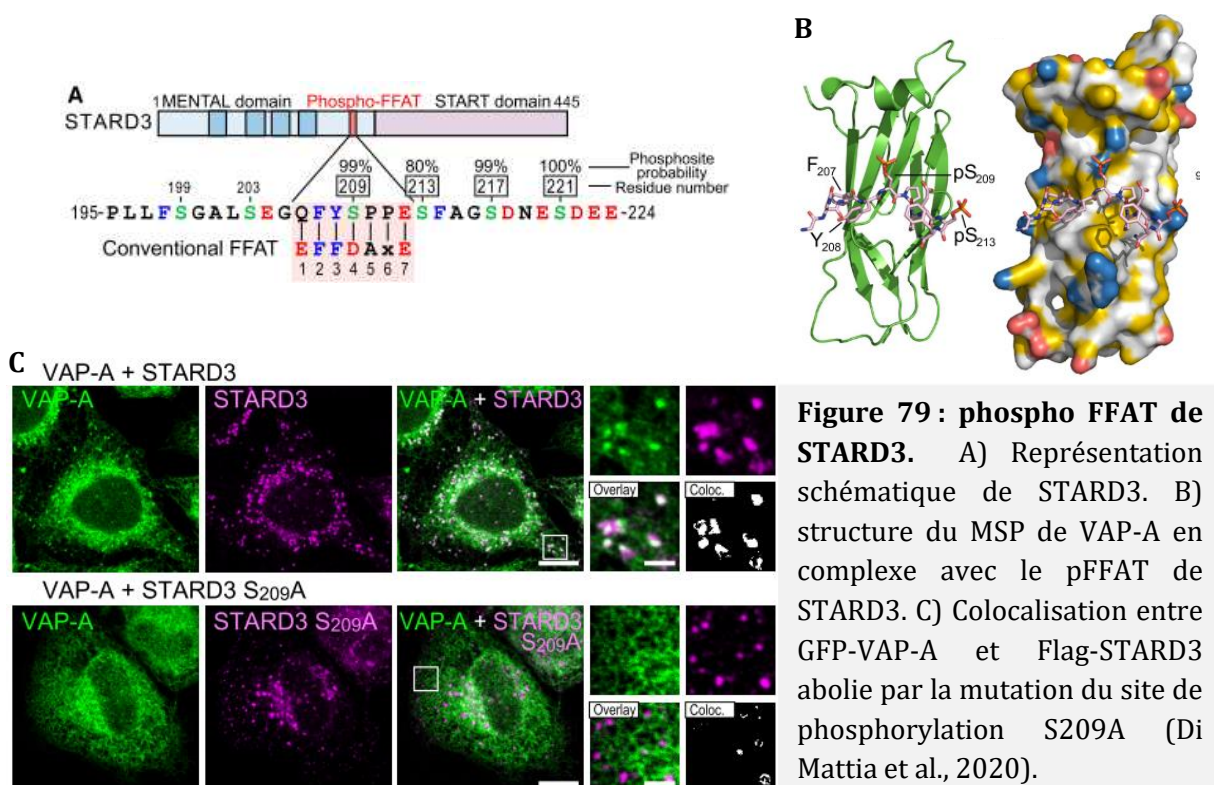


**Figure 78 : Motifs FFAT dans les protéines qui se lient à la VAP.** A) Schéma de VAP, ancrage membranaire C-terminal avec trois sites de liaison conservés sur le domaine MSP globulaire N-terminal : la face électro-positif (bleue) lie les motifs EFFDAXE (rouge) ainsi que les lipides anioniques ; la base (marron) lie une hélice dans Shs1p ; et le côté (violet) se lie à NS5A et NS5B, issus du virus de l'hépatite C (HCV). Une boucle près de l'extrémité (jaune) lie FAF1, une protéine contenant un FFAT. B) Consensus des régions flanquantes (10 acides aminés de part et d'autre) dans 14 séquences eucaryotes qui contiennent le motif EFFDAXE. La partie amino terminal est enrichi en résidus acides (Murphy and Levine, 2016).

protéine et il doit avoir une localisation subcellulaire cytoplasmique (Mikitova and Levine, 2012)(Murphy and Levine, 2016)(Slee and Levine, 2019). C'est le cas pour le FFAT d'OSBP qui a un score de 0 (Wyles et al., 2002) et d'autres ORPs/Osh/Nir, CERT, VPS13 et PITPs (Loewen et al., 2003). Néanmoins l'affinité entre le MSP de VAP et le FFAT d'OSBP est de l'ordre du micromolaire (1 à 10  $\mu\text{M}$ ), ce qui est une affinité moyenne à faible (Kaiser et al., 2005). Certaines interactions électrostatiques entre le MSP et des protéines ne contenant pas de FFAT ont aussi été reportées (figure 78).

### *i Différents motifs FFAT*

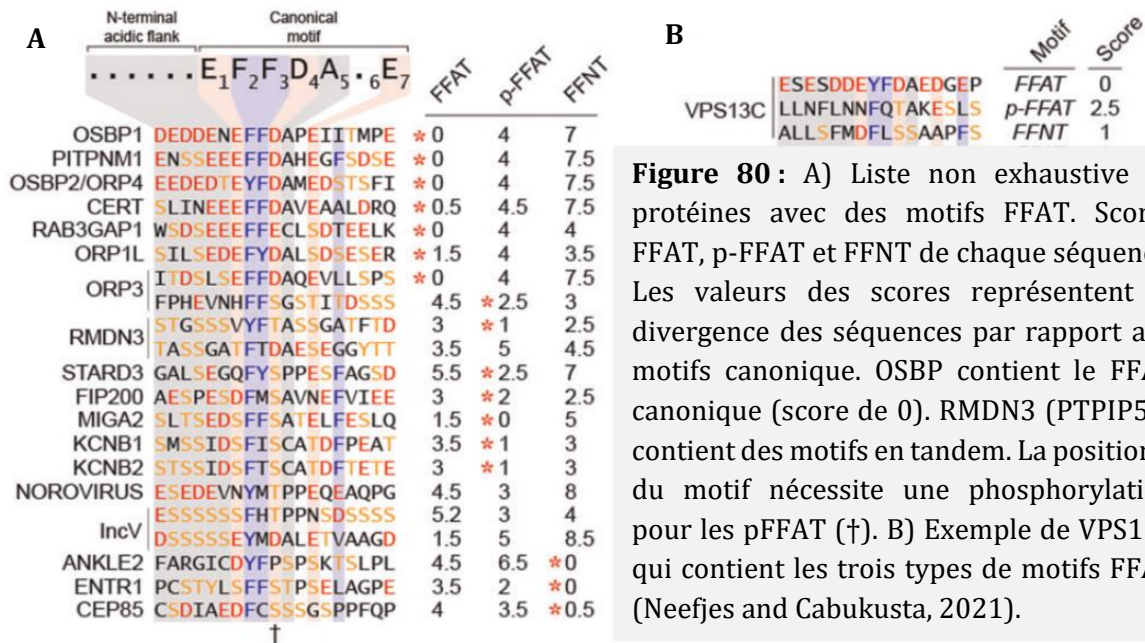
Il existe des motifs FFAT non conventionnels appelés phospho FFAT (pFFAT) où une phosphorylation régule la reconnaissance du domaine MSP. Les résidus acides du motif FFAT sont remplacés par un ou plusieurs acides aminés phosphorylables : Sérine ou Thréonine. Par exemple, le motif FFAT de STARD3, impliquée dans les MCSs RE/endosomes tardifs (Alpy et al., 2013), doit être phosphorylé sur la sérine 109 pour que la protéine soit liée à VAP-A ou MOSPD2 (figure 79)(Di Mattia et al., 2020). MIGA2, PTPIP51, Kv2.1 and Kv2.2 (des canaux potassiques



**Figure 79 : phospho FFAT de STARD3.** A) Représentation schématique de STARD3. B) structure du MSP de VAP-A en complexe avec le pFFAT de STARD3. C) Colocalisation entre GFP-VAP-A et Flag-STARD3 abolie par la mutation du site de phosphorylation S209A (Di Mattia et al., 2020).

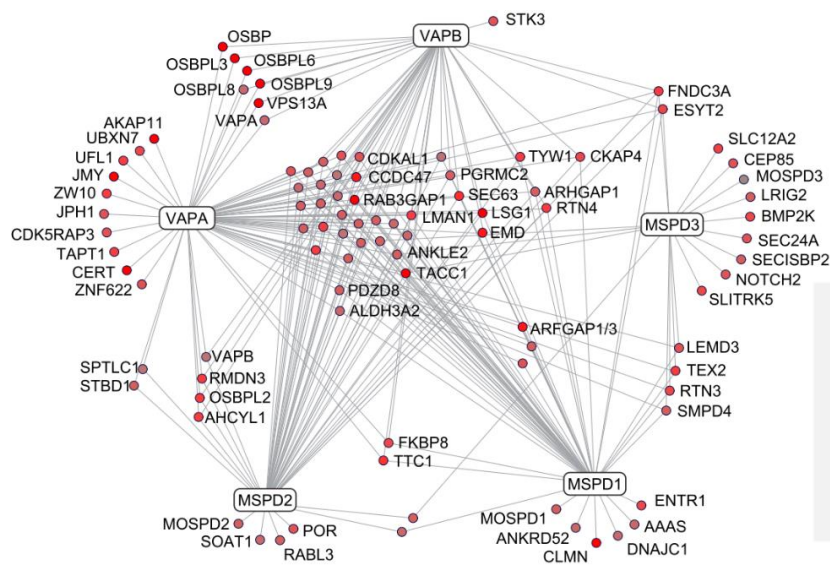
membranaires voltage-dépendants) possèdent également des motifs pFFAT (James and Kehlenbach, 2021).

Il a été démontré récemment que la séquence FFAT pouvait aussi se trouver dans une séquence d'acides aminés neutres. Ces motifs FFNT (two phenylalanines in a neutral tract) peuvent être reconnus par MOSPD1 et MOSPD3. Les protéines CEP85, ANKLE2 et ENTR1 sont des partenaires de MOSPD1 et 3 qui comportent des motifs FFNT et qui sont impliqués dans la construction de l'enveloppe nucléaire (figure 80)(Cabukusta et al., 2020)(Neefjes and Cabukusta, 2021).



**Figure 80 :** A) Liste non exhaustive de protéines avec des motifs FFAT. Scores FFAT, p-FFAT et FFNT de chaque séquence. Les valeurs des scores représentent la divergence des séquences par rapport aux motifs canonique. OSBP contient le FFAT canonique (score de 0). RMDN3 (PTPIP51) contient des motifs en tandem. La position 4 du motif nécessite une phosphorylation pour les pFFAT (+). B) Exemple de VPS13C qui contient les trois types de motifs FFAT (Neefjes and Cabukusta, 2021).

Des motifs FFAT peuvent aussi être présents sur des protéines qui ne se trouvent pas dans les MCSs et qui n'ont pas d'activité de transfert de lipides. Par exemple, la tubuline possède un motif FFAT, quoique partiellement masqué, mais le rôle physiologique d'une éventuelle interaction avec VAP n'a pas été analysé (Murphy and Levine, 2016). Les différences dans les motifs FFAT sont donc un moyen de réguler les interactions et donc la localisation subcellulaire des protéines partenaires des VAPs. Cependant les associations ne sont pas clairement prédéfinies, un partenaire FFAT peut se lier à différentes protéines VAPs et vice-versa (figure 81).



**Figure 81 : Carte d'interaction des VAPs.** La plupart des partenaires peuvent lier plusieurs VAPs et vice versa (Cabukusta et al., 2020).

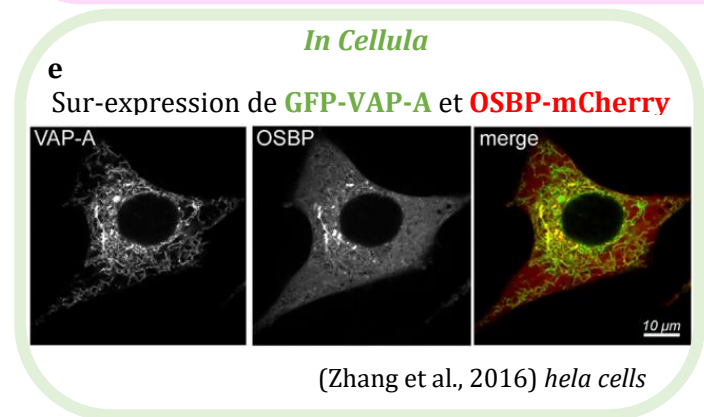
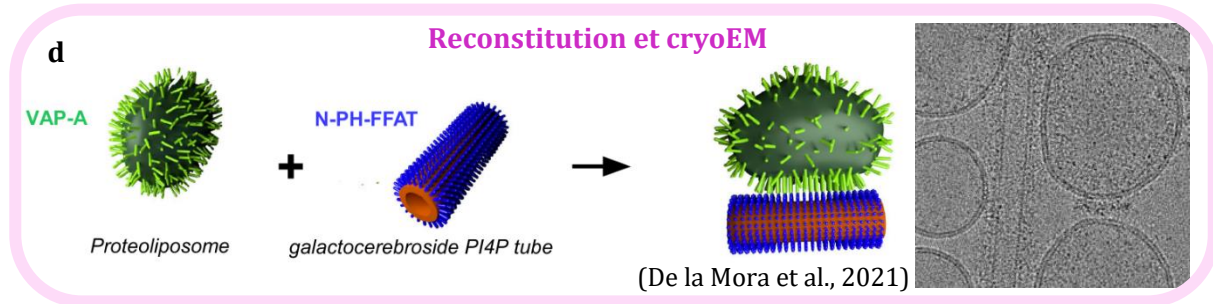
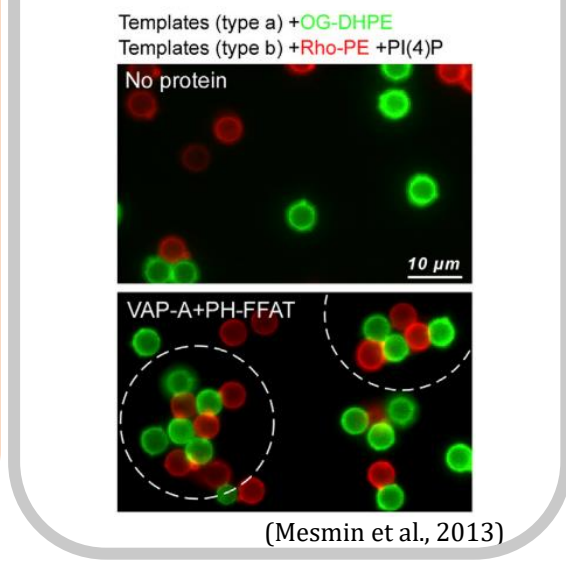
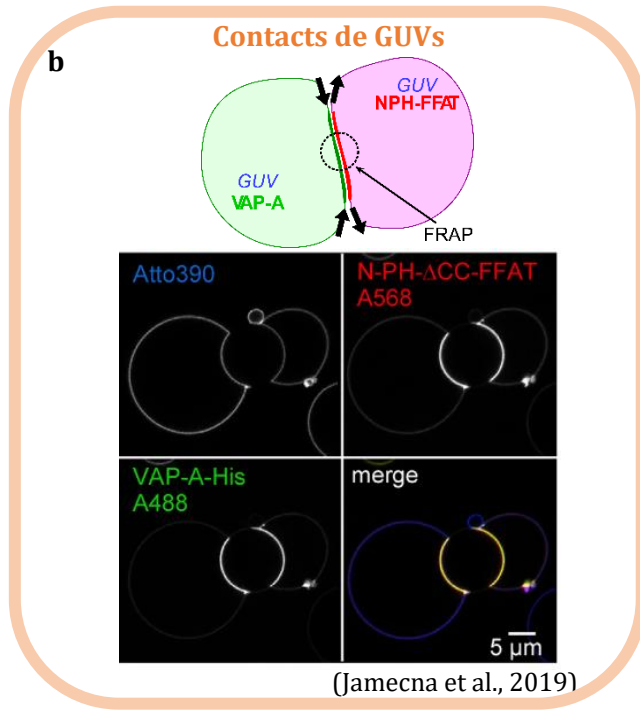
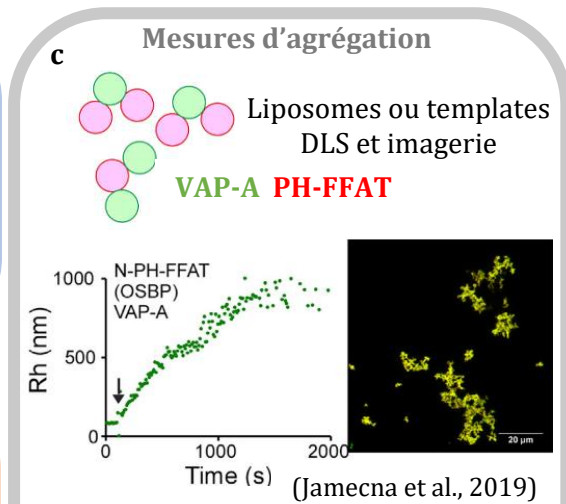
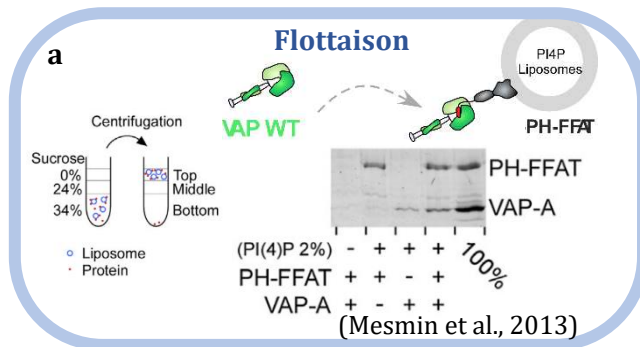
## ii Comment étudier la liaison de VAP avec un partenaire FFAT ?

Plusieurs approches complémentaires peuvent être utilisées pour disséquer l'interaction entre VAP et un partenaire ayant un FFAT connu. Il est possible de purifier ces deux protéines et de reconstituer le système *in vitro* à l'aide de liposomes ou de liposomes géants (GUVs : giant unilamellar vesicles) (figure 82 a/b). VAP peut être purifiée avec son domaine TMD, dans ce cas elle devra être reconstituée sur des liposomes, sinon le TMD est remplacé par un tag Histidine qui pourra se lier à des lipides nickel (DOGS-NTA-Ni). *In vitro*, la flottaison est une méthode simple pour vérifier l'interaction entre VAP et un de ses partenaires. Dans le cas où un partenaire se lie à une autre membrane, la liaison VAP-partenaire peut être analysée en DLS (dynamic light scattering) : le suivi de l'agrégation des liposomes donne des informations sur la cinétique de l'association (figure 82c). On peut également observer cette agrégation au microscope, les liposomes étant de petits objets, il est possible de les remplacer par des billes de verre « template » qui supportent la bicouche lipidique. On peut observer des contacts entre GUVs en microscopie confocale ou encore des MCSs reconstitués en cryo-EM (figure 82d). Dans ce cas, des tubes de galactosylcérébroside et des protéoliposomes sont utilisés, ces deux objets différents en terme de géométrie permettent d'identifier l'orientation des partenaires protéiques. Dans le cas des GUV, des marquages fluorescents sont utilisés. *In cellula* des études de colocalisation sont menées en marquant les protéines endogènes à l'aide d'anticorps ou en les sur-exprimant (figure 82e). Un



chapitre est dédié à la reconstitution de VAP-A et à la formation des MCSs *in vitro* dans la partie méthode de ce manuscrit.

Pour l'avenir, on peut envisager des nouvelles méthodes permises par les avancées technologiques en cryo-EM *in situ* et aussi en microscopie de super résolution. L'espace confiné du MCS pourra être agrandi jusqu'à 10 fois grâce à des techniques de microscopie d'expansion, qui consiste à couler un gel d'acrylamide ayant la propriété d'enfler sur des cellules (Chen et al., 2015)(Asano et al., 2018)(Gambarotto et al., 2019), puis de marquer les protéines d'intérêt à l'aide d'anticorps. Cette méthode couplée à des techniques d'imagerie de super résolution comme le STED (Gambarotto et al., 2019) et même à la cryo-EM (Laporte et al., 2022) sont aujourd'hui possibles et sont en cours d'optimisation au laboratoire. Ces méthodes révolutionnaires permettent à présent d'approcher une résolution de l'ordre du nanomètre (Shaib et al., 2022).

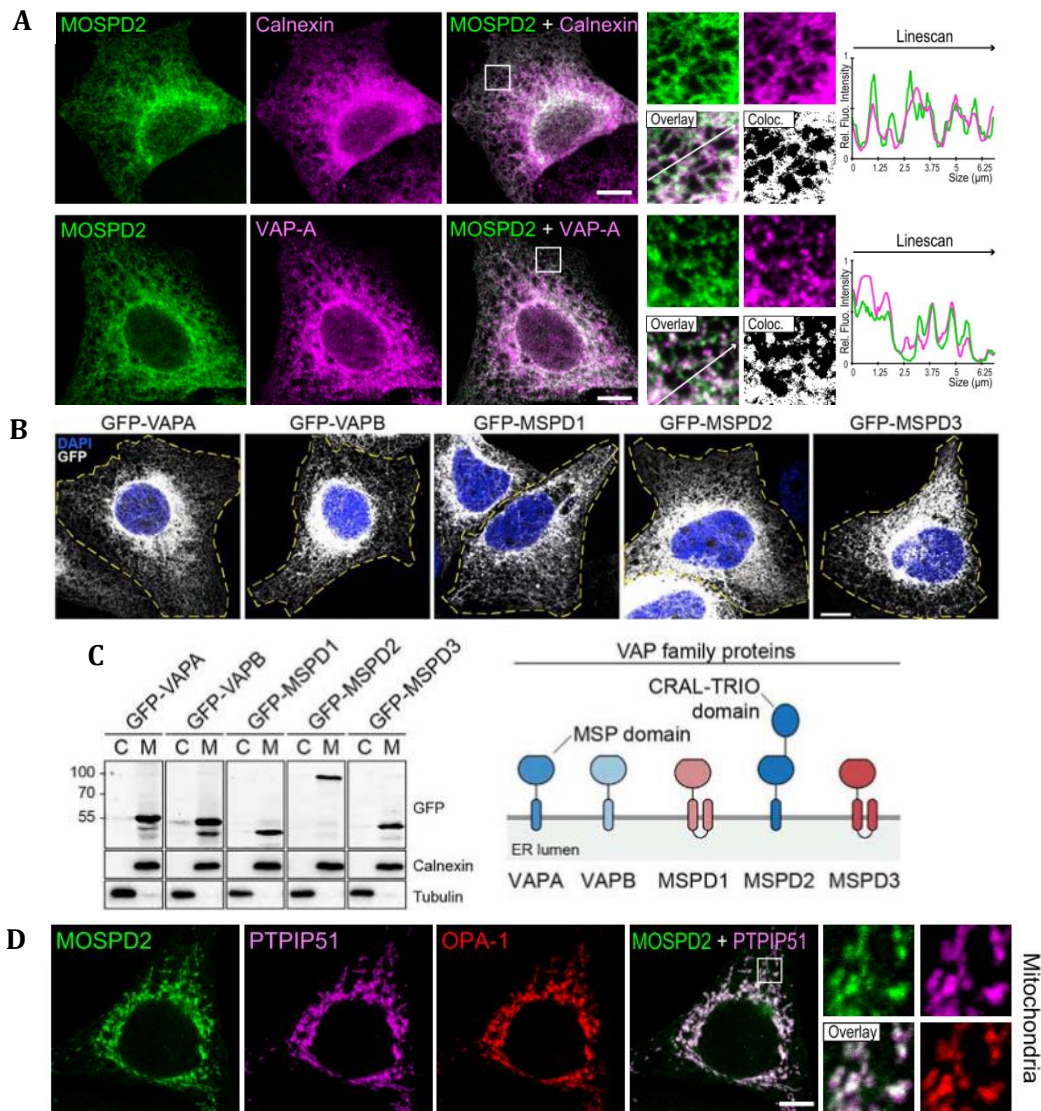


**Figure 82 : Méthodes pour étudier l'interaction VAP-OSBP ou PH-FFAT.** VAP flotte avec des liposomes PI4P/PH-FFAT. La cinétique d'agrégation causée par l'interaction est mesurable en DLS et observable en microscopie. Les MCSs peuvent être recréés *in vitro* et observés au confocal ou en cryoEM. *In cellula*, VAP et OSBP sont colocalisées.

## **(a) Localisation subcellulaire et état oligomérique**

### ***i Localisation subcellulaire des VAPs***

Le ou les TMD présents chez les protéines VAPs sont des hélices  $\alpha$  transmembranaires qui les conduisent au RE (Skehel et al., 2000). La distribution subcellulaire des VAPs endogènes est donc réticulaire (Cabukusta et al., 2020). Cependant cette localisation peut être affectée notamment lors de la surexpression d'un partenaire. Par exemple, la surexpression d'OSBP entraîne VAP-A au TGN (Mesmin et al., 2013) de la même façon que la surexpression de PTPIP51 entraîne MOSPD2 à la mitochondrie (Di Mattia et al., 2018). Toujours ancrée au RE, elle s'accumule dans les MCSs où son partenaire est enrichi (figure 83).

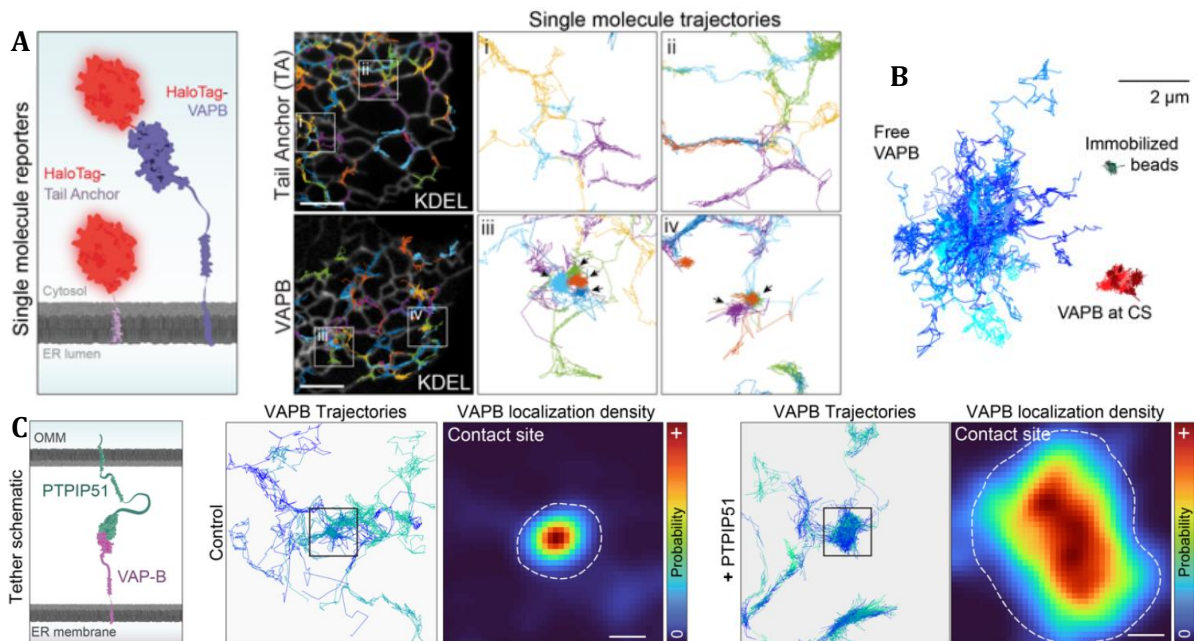


**Figure 83 : Localisation subcellulaire des protéines VAPs.** A) Dans des cellules HeLa, GFP-MOSPD2 est colocalisée avec la Calnexin, une protéine du RE et avec VAP-A endogène. B) La même localisation est observée pour les autres VAPs. C) Des HEK293T sur-exprimant les différentes protéines VAP ont été fractionnées : la partie cytosolique (C) a été séparée des membranes (M). Ces fractions sont validées par les anticorps anti-Tubulin, présente uniquement dans le cytosol et la Calnexin, présente au RE. Les VAPs sont présentes uniquement dans la fraction membranaire. D) La localisation de MOSPD2 est affectée par la surexpression de PTPIP51, un partenaire des VAPs spécifique de la mitochondrie (marquée par OPA-1). D'après (Di Mattia et al., 2018) et (Cabukusta et al., 2020).

## *ii Diffusion latérale*

VAP peut diffuser le long du RE via son TMD, sa trajectoire peut être analysée par suivi de molécule unique, une méthode qui allie la microscopie de super résolution et des techniques poussées d'analyses d'image appelée sptPALM (single particle tracking-photoactivation localization microscopy). Cette analyse a récemment permis de mettre en évidence que la trajectoire de VAP présente des « hubs » de localisation correspondant aux MCSs RE/mitochondrie. En effet, VAP-B visite plusieurs contacts et reste quelques secondes dans chacun, lorsqu'elle est engagée dans un MCS sa diffusion est diminuée, elle passe de  $\sim 1,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$  à  $\sim 0,25 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , indiquant qu'elle y forme des interactions. En revanche, sans son domaine MSP, VAP-B explore toute la surface du RE de façon aléatoire. La surexpression de son partenaire PTPIP51 renforce la localisation de VAP-B au sein des MCSs. Malheureusement cette méthode ne permet pas d'analyser la dynamique de VAP dans les MCSs RE/TGN car ceux-ci se trouvent dans une région trop épaisse de la cellule ne permettant pas l'utilisation du PALM. Cependant, elle

démontre la dynamique qui s'opère au cœur d'un MCS pourtant stable. Les compartiments restent en contact plusieurs minutes, cependant, les protéines qui s'y trouvent et qui participent au maintien de ce contact sont très mobiles, et diffusent à l'intérieur et à l'extérieur du site à une vitesse de l'ordre de la seconde (figure 84)(Obara et al., 2022).



**Figure 84 : Analyse de la diffusion latérale de VAP-B.** A) Schéma montrant les particules uniques analysées lors du sptPALM. Trajectoire d'une protéine contrôlée au RE non engagée dans les MCSs, opposée à celle de VAP-B montrant des « hubs ». B) La trajectoire de VAP-B libre (bleu) est très diffuse comparée à VAP-B engagée dans un MCS (rouge). VAP-B engagée est toujours mobile dans le MCS comparée à une bille immobile (vert). C) Schéma de VAP-B en interaction avec son partenaire PTPIP51 aux MCSs RE/mitochondrie. La surexpression de PTPIP51 entraîne un fort engagement de VAP-B dans les MCSs et une augmentation de la taille de ces contacts (Obara et al., 2022).

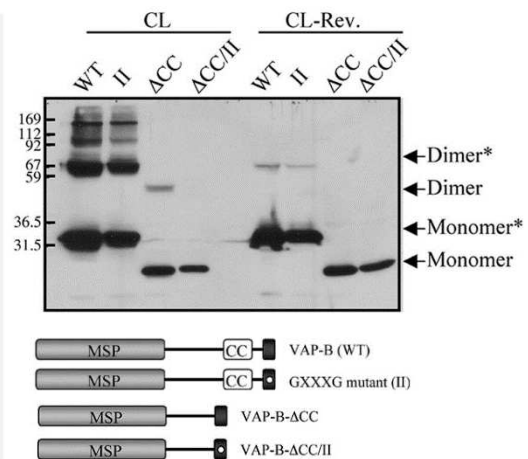
### *iii Etat oligomérique*

Le TMD des VAPs contient le motif GXXXG très conservé dans les hélices transmembranaires (Russ and Engelman, 2000). Ce motif participe à la dimérisation de VAP-B même s'il est insuffisant. En revanche, la région coiled-coil est essentielle (figure 85). Quant au domaine MSP, il a été montré qu'il n'apporte aucune contribution à la dimérisation (Kim et al., 2010).

Un coiled-coil dans le cas d'un dimère, consiste en deux hélices  $\alpha$  qui s'enroulent sur elles-mêmes grâce à un effet hydrophobe : les contacts entre les résidus hydrophobes et l'eau sont minimisés. Cette hélice est constituée de répétitions d'heptades comprenant généralement des leucines et suivant le motif hpphpcp (h : résidu hydrophobe, c : résidu chargé, p : résidu polaire)

afin de créer une face hydrophobe. Les leucines interagissent avec les leucines de l'hélice opposée lors de l'association, à l'image d'une fermeture éclair : « Leucine zipper ». Le nombre de répétitions d'heptades nécessaires pour obtenir une structure coiled-coil stable est de trois à quatre. En considérant une translation de 1,4 Å/résidu, cela donne pour l'unité de construction minimale  $0,14 \times 28 = 4$  nm (Woolfson, 2005). On peut donc considérer pour VAP-A et B que le coiled-coil composé de 6 heptades mesure environ 5,9 nm. Les coiled-coil peuvent avoir différentes structures, en effet les hélices peuvent être parallèles ou antiparallèles et elles n'ont pas nécessairement la même séquence. De plus, elles peuvent donner lieu à des homodimères ou hétérodimères et parfois même à des multimères. Dans le cas de VAP-B on peut voir des bandes correspondant à des multimères sur gel, la délétion du coiled-coil inhibe cet effet. Cependant, la

**Figure 85 :** Oligomérisation de différents mutants de VAP-B tagués par un Myc et exprimés dans des cellules HEK293. Le cross-linking (CL) est fixé par le paraformaldéhyde de façon réversible (CL-Rev). Visualisation par Western Blot grâce à un anti-Myc. VAP-WT ainsi que le mutant du motif GXXXG du TMD sont retrouvés sous la forme monomérique et dimérique tandis que le mutant  $\Delta$ CC est principalement retrouvé sous forme monomérique. La délétion des deux déterminants aboli complètement la dimérisation (Kim et al., 2010).

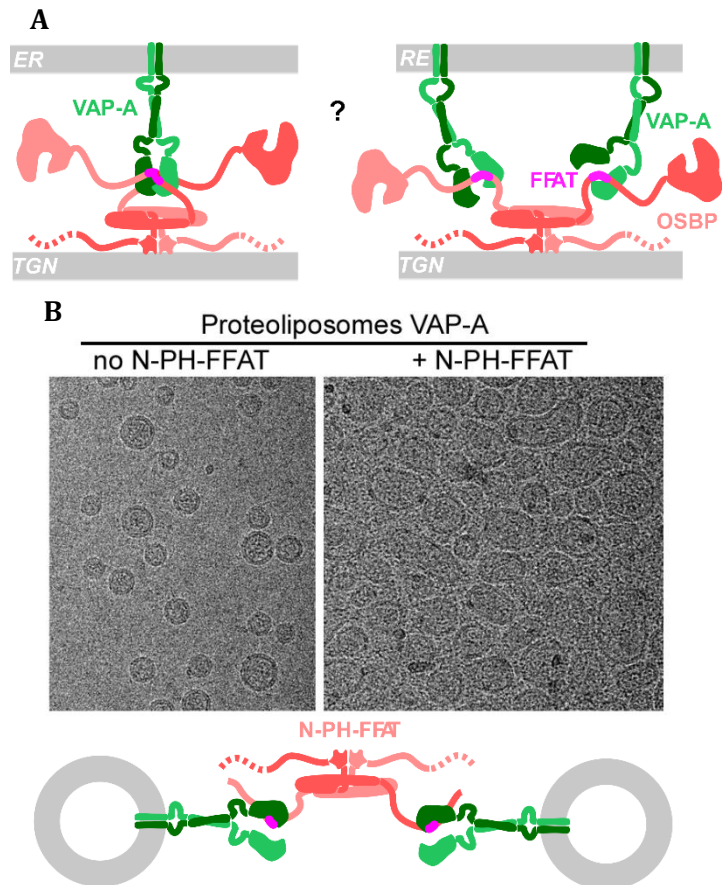


fonction cellulaire de l'oligomérisation des VAPs n'a pas été décrite.

#### iv Stœchiométrie du complexe OSBP/VAP

Plusieurs études montrent que VAP-A forme des dimères grâce à son domaine coiled-coil et son TMD (Murphy and Levine, 2016). Il est donc connu qu'OSBP et VAP sont indépendamment organisées en dimère et qu'un motif FFAT d'OSBP interagit avec un domaine MSP de VAP-A. Deux options sont alors possibles pour

expliquer la stœchiométrie de l'interaction OSBP/VAP : un dimère d'OSBP peut s'associer à un ou deux dimères de VAPs. La seconde configuration libère un MSP pour une interaction avec une autre protéine contenant un FFAT, ceci peut avoir des conséquences sur l'activité des autres partenaires dans le MCS. En effet, plusieurs LTPs partenaires de VAP occupent les mêmes MCSs. OSBP est impliquée dans la régulation du transfert de céramide par CERT (Perry and Ridgway, 2006) et le recrutement de ces deux protéines au Golgi via le PI4P dépend de l'activité



**Figure 86 :** A) deux scénarii pour la stœchiométrie OSBP/VAP. B) Expérience préliminaire de cryo-EM menée par l'équipe de Daniel Lévy montrant une agrégation de liposomes VAP après ajout de NPH-FFAT, un dimère de N-PH-FFAT peut lier deux dimères de VAP-A (donnée non publiée).

de transfert de PI de Nir2 (Peretti et al., 2008). Il existe donc une coopérativité fonctionnelle entre ces protéines au sein du MCS RE/TGN. Une coopération spatiale, via le récepteur commun VAP est envisageable. Des expériences préliminaires de cryo-EM menée par l'équipe de Daniel Lévy montrent une agrégation de liposomes VAP après ajout de N-PH-FFAT, ceci suggère que le dimère de NPH-FFAT peut lier deux dimères de VAP qui sont sur des liposomes différents (figure 86). Cet



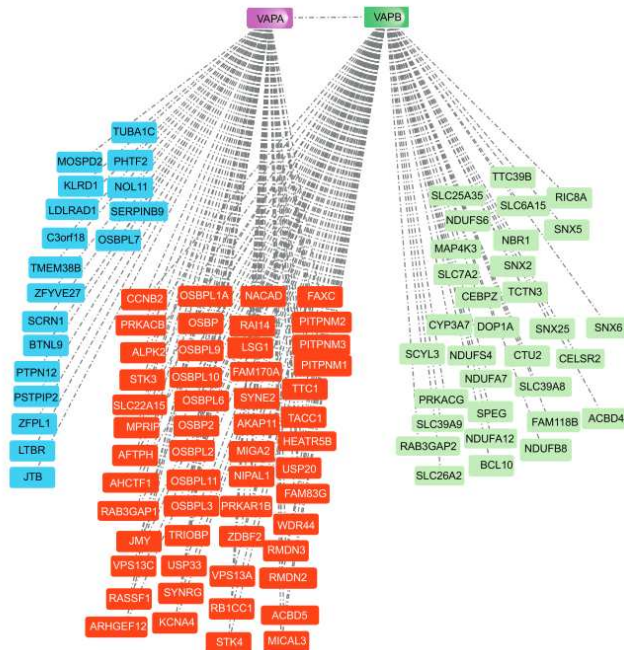
effet de pontage n'est pas visible avec une version monomérique d'OSBP. Ainsi, le scénario mettant en jeux deux dimères de VAP pour un dimère d'OSBP est privilégié.

## **(b) Polyvalence et importance de VAP**

### ***i Le « VAPome »***

Comme mentionné précédemment, VAP est le récepteur au RE de centaines de protéines avec un motif FFAT. Mais les partenaires contenant un FFAT représentent seulement 50% des partenaires des VAPs. Ceci suggère que d'autres types d'interactions doivent encore être découverts. Pour étudier l'interactome complet des VAPs deux approches ont été utilisées. La première choisie par Huttlin et al., est la spectrométrie de masse après chromatographie d'affinité : à partir d'une banque de plasmide de 2597 protéines humaines taguées (FLAG-HA) servant d'appât, exprimées dans des cellules HEK293T, la chromatographie d'affinité permet la rétention des partenaires de chacune de ces protéines, les partenaires sont ensuite identifiés par spectrométrie de masse et le réseau d'interaction est analysé (Huttlin et al., 2015)(Huttlin et al., 2017)(Huttlin et al., 2021). La seconde est le marquage de proximité qui repose sur la fusion d'une protéine d'intérêt à une enzyme, la biotine ligase BirA pour la technique BioID, et l'ascorbate peroxydase pour la méthode APEX (Cabukusta et al., 2020)(James et al., 2019). Par exemple, la méthode BioID utilisée par B. Cabukusta consiste à sur-exprimer la protéine d'intérêt en fusion avec BirA, en présence de biotine et d'ATP, l'enzyme produit du biotinoyl-5'-AMP qui réagit avec les résidus de lysine des protéines proximales. Ainsi toutes les protéines voisines sont biotinylée, et peuvent être récupérées sur des billes de streptavidine et analysée en spectrométrie de masse. Récemment C. James et R. Kehlembach ont regroupé les résultats de plusieurs interactomes (figure 87)(James et al., 2019)(James and Kehlenbach, 2021). Des centaines de protéines sont identifiées à proximité de VAP. Parmi elles on retrouve OSBP, et d'autres ORPs, RMDN3 (PTPIP51), CERT, des VPS13, MIGA2, ESYT1, des PITPs (Nir) et ACBD5, toutes décrites précédemment et impliquées dans la formation des MCSs et le transfert de lipides. Mais on rencontre également des protéines impliquées dans le remodelage morphologique du RE comme Rtn4 (Manford et al., 2012). Les VAPs ont donc un vaste répertoire de partenaires qu'on appelle le « VAPome » qui

atteste de leur implication dans de nombreuses fonctions cellulaires vitales. Cet interactome n'est cependant pas exhaustif et la surexpression de VAP imposée par ces méthodes expérimentales peut introduire un biais dans le résultat. La spécificité de VAP-A versus VAP-B reste aussi à définir, en effet les interactomes de ces deux protéines ne sont que partiellement superposés.



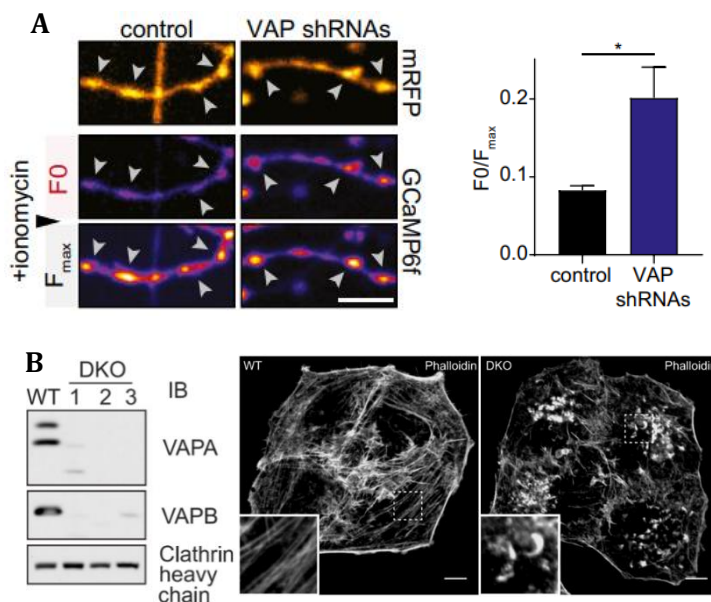
**Figure 87 : L'interactome de VAP-A et VAP-B.** Les protéines représentées en bleu sont les seuls partenaires de VAP-A, et celles représentées en vert sont ceux de VAP-B. Les protéines représentées en orange sont des partenaires communs à VAP-A et VAP-B (James and Kehlenbach, 2021).

## ii Anomalies impliquant VAP

### 1) Défauts recensés en absence de VAP

VAP-A et VAP-B, par leur vaste interactome, interviennent dans de nombreux processus cellulaires. Aucune lignée de souris VAP-A n'a jamais pu être générée, ceci témoigne de son importance physiologique. Cependant, plusieurs études *in cellula* avec des lignées KO pour VAP-A ou VAP-B générées par Crispr/cas9 ou une simple inactivation des gènes par des siRNA ont été menées. Certains dysfonctionnements correspondant à la perte de fonction des partenaires de VAP sont observés. Par exemple, une étude récente montre que par son interaction avec CERT, VAP-A permet la formation des MCSs entre le RE et les MVBs (multivesicular bodies), permettant la biogénèse de vésicules extracellulaires qui transportent toutes sortes de cargos favorisant la communication cellulaire. De façon attendue, le KO de VAP-A empêche la formation de ces vésicules (Barman et al., 2022). Par son interaction avec différentes protéines impliquées dans

l'autophagie, VAP module également la biogénèse des autophagosomes, celle-ci est inhibée en présence d'un VAP non fonctionnel (Zhao et al., 2018). VAP-A et VAP-B interagissent aussi avec SCRN1 (secernin-1) via son motif FFAT, les deux interactants sont indispensables pour promouvoir le remodelage du RE nécessaire à la libération des vésicules synaptique. L'influx de calcium au niveau des boutons synaptiques est donc réduit dans des cellules où l'expression de VAP a été éteinte (Lindhout et al., 2019). Récemment, il a été montré que VAP soutient la plasticité synaptique en stabilisant les mitochondrie dans les dendrites des neurones (Rangaraju, 2023). Enfin, il a été reporté que dans des cellules Hela double KO pour VAP-A et B, le cytosquelette d'actine est perturbé, cet effet a été relié à un défaut de nucléation promu normalement par le complexe WASH, lui-même régulé par les niveaux de PI4P présents aux endosomes. Le niveau de PI4P aux endosomes étant contrôlé par OSBP en partenariat avec VAP (Dong et al., 2016)(figure 88). De plus, une étude en cours démontre l'implication directe de VAP-A dans la motilité cellulaire, les MCSs RE/membrane plasmique étant indispensables à la dynamique des plaques d'adhésion focales (Siegfried, 2023).



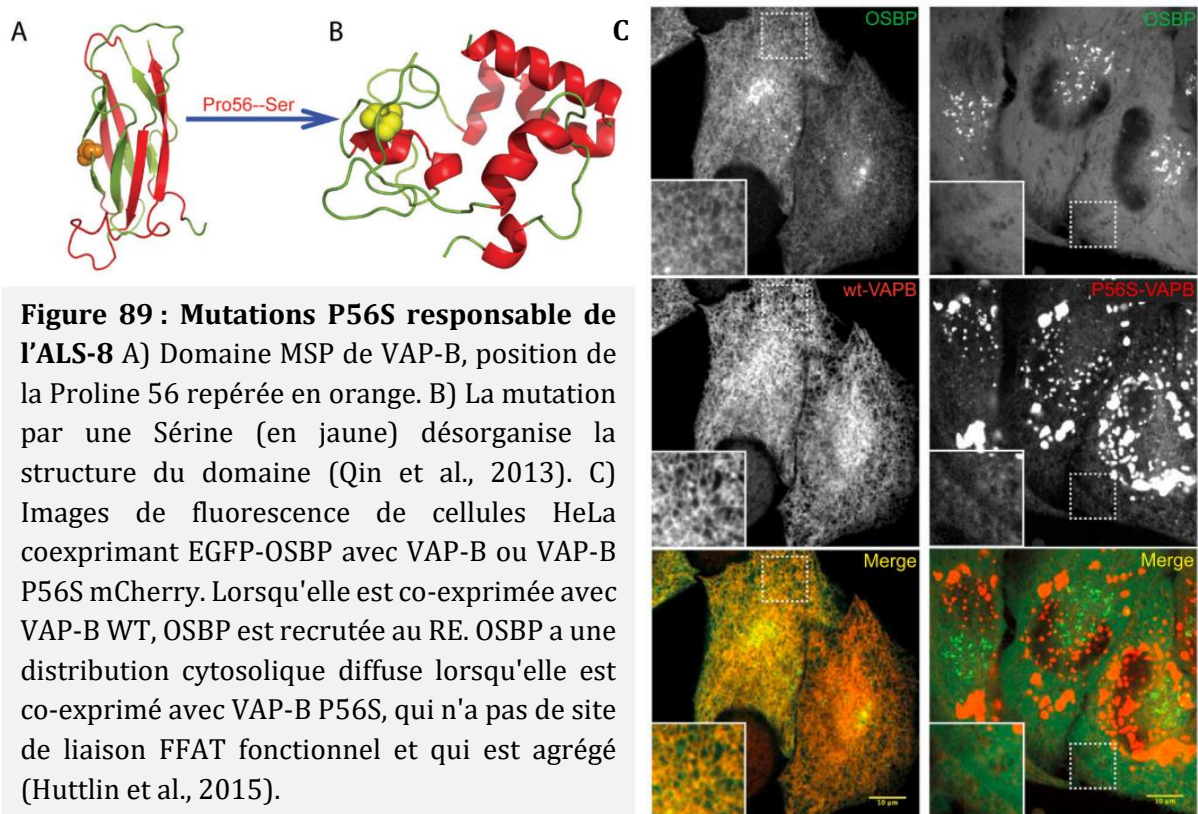
### Figure 88 : Exemples de défauts observés en absence de VAP.

**A)** Le silencing de VAP par les shRNAs réduit la marge d'activation de l'influx calcique induit par ajout d'ionomycine dans les boutons synaptiques. L'influx est reporté par la fluorescence de GCaMP6f (Lindhout et al., 2019). **B)** Western Blot et marquage phalloïdine (actine) de cellules Hela WT et VAP double KO montrant la perte des fibres de stress et l'accumulation de comètes d'actine dans les cellules double KO (Dong et al., 2016).

## 2) Implication de VAP dans des pathologies neurodégénératives

Des mutations dans le domaine MSP de VAP-B sont à l'origine d'une forme familiale de sclérose latérale amyotrophique (SLA-8), la plus courante est la mutation ponctuelle P56S

(Nishimura et al., 2004). Elle entraîne la désorganisation de la structure du domaine MSP qui est remplacée par cinq hélices amphiphiles comparables à celles de l' $\alpha$ -synucléine responsable de la maladie de Parkinson (Qin et al., 2013). Cette mutation conduit à l'agrégation de la protéine et réduit l'efficacité de liaison des motifs FFAT sur le MSP (Huttlin et al., 2015)(figure 89). La perte de fonction et l'agrégation de VAP-B entraînent la mort des motoneurones à l'origine des lourds symptômes de la pathologie (Kanekura et al., 2006)(Suzuki and Matsuoka, 2011)(Kabashi et al., 2013). La mutation T46I dans le domaine MSP de VAP-B est aussi à l'origine d'une autre forme de SLA (Chen et al., 2010)(Lua et al., 2011). D'autres délétions ou mutations dans la séquence de VAP-B hors du domaine MSP ont été identifiées chez des patients atteints de SLA mais n'ont pas été étudiées (Dudás et al., 2021).



VAP est également impliquée dans d'autres pathologies neurodégénératives comme Alzheimer et Parkinson par son engagement dans la formation des MCSs RE/mitochondrie. En effet, le point commun entre ces pathologies, est la perte de contact entre le RE et la mitochondrie (Paillusson et al., 2016). Il a été montré que la perte du lien entre PTPIP51 et VAP-B induite par

par GSK-3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ), une serine/threonine kinase activée dans les cellules des patients atteints de ce type de pathologies, pourrait être à l'origine de cette perte de contact (Stoica et al., 2016).

### 3) Implication de VAP dans des maladies infectieuses

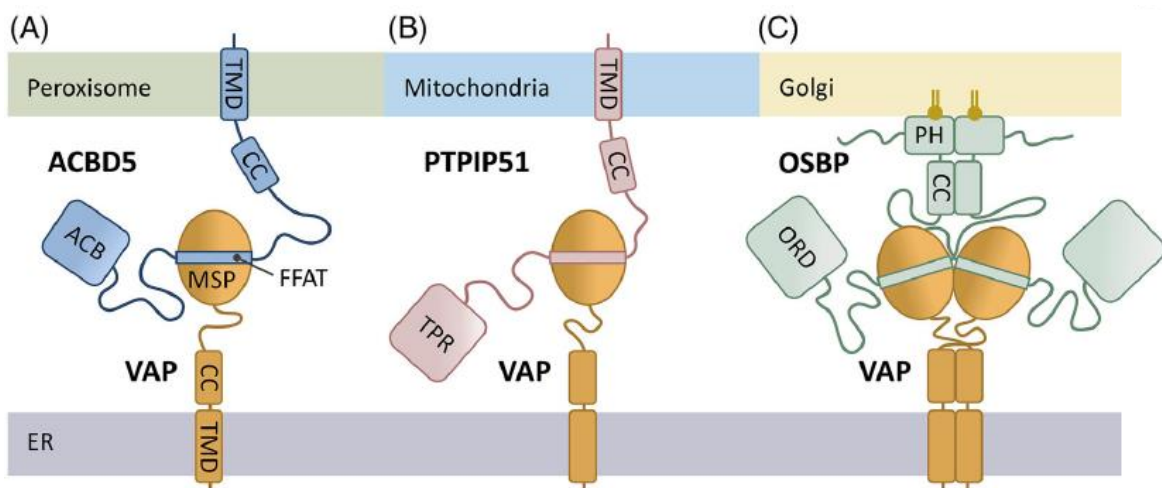
VAP-A et VAP-B favorisent la réplication de certains virus comme le HCV responsable de l'hépatite C en interagissant avec des protéines non structurales (NSP) via leur motif FFAT (Gao et al., 2004) ou encore les NS1/2 du Norovirus responsable de la gastro-entérite (Mccune et al., 2017). Cependant, des mécanismes sont mis en place par la cellule hôte pour contrer l'infection virale. Par exemple la protéine antivirale IFITM3 (Interféron-inducible transmembrane protein 3), dont l'expression est augmentée lors d'une infection, interagit avec VAP-A et empêche son association avec OSBP. Ainsi, elle perturbe l'homéostasie du cholestérol intracellulaire et inhibe l'entrée du virus (Amini-Bavil-Olyaei et al., 2013). IFITM3 ne possède pas de motif FFAT, cette protéine interagit avec la « tige » de VAP, cette observation ouvre la possibilité d'autres types d'interactions inexplorées.

VAP joue aussi un rôle dans l'infection bactérienne par *Chlamydia trachomatis*, Avec son partenaire CERT, elle est recrutée au niveau des corps d'inclusion utiles à la prolifération bactérienne (Derré et al., 2011)(Dudás et al., 2021).

## 5. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons disséqué les rôles majeurs des MCSs et principalement l'importance du transfert de lipides dans le fonctionnement et la dynamique des organelles. Les travaux menés par notre équipe sur OSBP ont permis de comprendre les mécanismes liés au transfert d'un lipide contre du PI4P entre membranes apposées. De plus, l'analyse du complexe OSBP-VAP réalisée en cryo-EM a apporté des réponses sur l'organisation spatiale du complexe. De nombreuses études citées dans ce chapitre ont décrit d'autres mécanismes de transfert de lipides opérés par différents types de LTPs entre plusieurs compartiments cellulaires. Le point commun à ces études est VAP (Kors et al., 2022b) (figure 90). Très étudié aussi dans le contexte

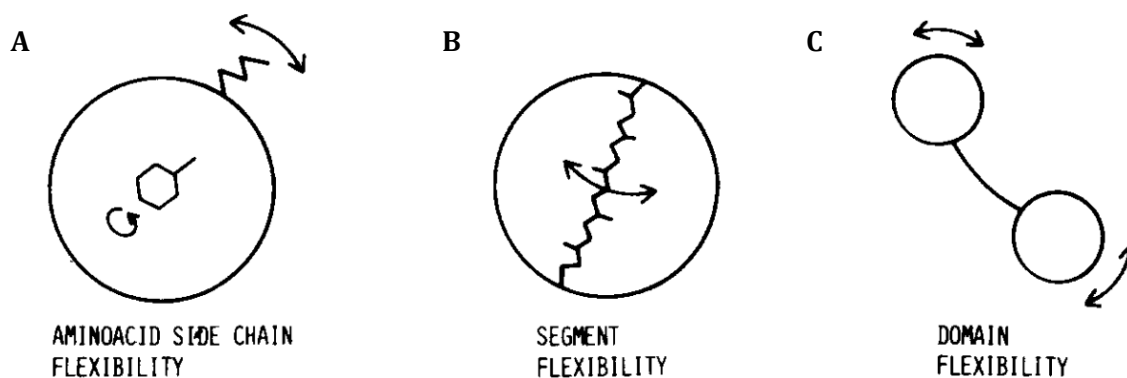
pathologique (Kors et al., 2022c), ce récepteur universel ancré au RE permet l'organisation de complexes avec tout type de protéine possédant un motif FFAT. Par ailleurs, ces interactions contribuent souvent à la formation et au maintien des MCSs, et supportent l'activité de transfert de lipides par des LTPs engagées dans ces complexes. Les nombreuses études sur les interactions entre VAP et ses partenaires ont conduit à établir un interactome composé de centaines de protéines ayant des structures variables (OSBP vs VPS13A) et provenant de différents compartiments cellulaires ayant des dynamiques distinctes (Golgi vs mitochondrie). Le constat est que ce récepteur universel peut s'adapter à un large spectre de partenaires ayant des structures très variées. Ce type d'adaptabilité pourrait reposer sur des propriétés spécifiques de VAP qui seraient distinctes du modèle d'interaction MSP-FFAT. L'objet de ma thèse était de comprendre les attributs moléculaires qui permettent à VAP de faire ces ajustements. J'ai porté mon attention sur les régions de VAP qui relient ses domaines structurés entre eux, appelées « linkers », qui sont des régions prédites pour être intrinsèquement désordonnées. Dans le chapitre suivant, nous allons analyser les caractéristiques et les rôles de telles régions.



**Figure 90 : Diversité des partenaires de VAP aux MCSs** A) ACBD5 ancré à la membrane du PO, se lie à VAP par son motif FFAT et transporte des acides gras à longue chaîne grâce à son domaine ACB entre le RE et le PO. B) PTP51 ancré à l'OMM, transporte divers lipides du RE à la mitochondrie par son domaine TPR, relié à VAP par son motif FFAT. C) OSBP échange le cholestérol et le PI4P grâce à son domaine ORD aux MCSs RE/TGN, relié à VAP par son motif FFAT (Kors et al., 2022b).

## Partie B : Introduction - Les régions non structurées

Les analyses de cristallographie menées depuis les années 50 par diffraction des rayons X décrivaient les protéines comme des structures statiques. Cependant, la limite de cette technique met en évidence que ces molécules sont souvent flexibles. En effet, il existe des régions protéiques trop fragiles pour être résolues en cristallographie, de plus certaines structures montrent différentes conformations possibles indiquant qu'une chaîne d'acides aminés peut être mobile (figure 91). Ce concept a été introduit en 1983 (Huber and Bennett, 1983) et depuis, les régions flexibles, ou non structurées que nous appellerons IDRs (Intrinsically disordered regions) ont été étudiées. Nous savons que ces régions sont très abondantes, 34% des protéines comportent au moins une IDR, et nous allons détailler leurs caractéristiques et fonctions dans ce chapitre.

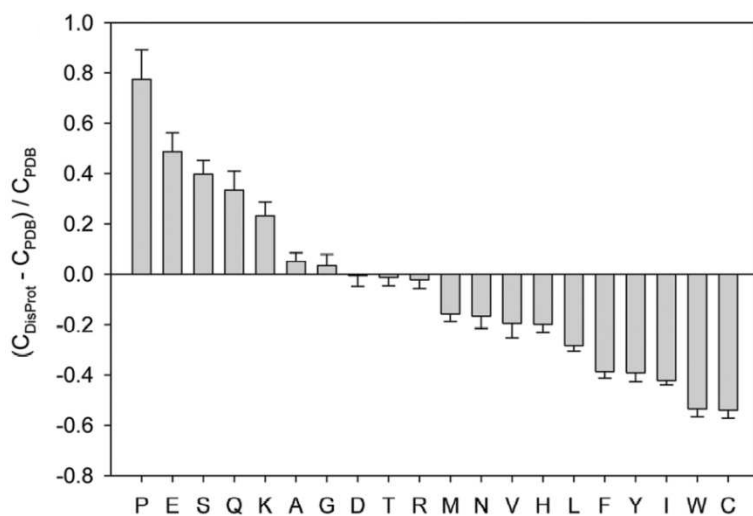


**Figure 91 : Concept de flexibilité introduit par Huber et Bennett en 1983.** Les protéines sont flexibles, mais souvent de manière différente selon les parties. A) Les chaînes latérales des acides aminés peuvent être flexibles, aussi bien qu'une partie terminale. B) Des segments peptidiques à l'intérieur de la séquence peuvent être mobiles, souvent impliqués dans des interactions avec d'autres protéines. C) Des domaines structurés peuvent se déplacer par rapport aux autres parties de la molécule grâce à des IDRs.

### 1. Prédiction de désordre, composition et taille

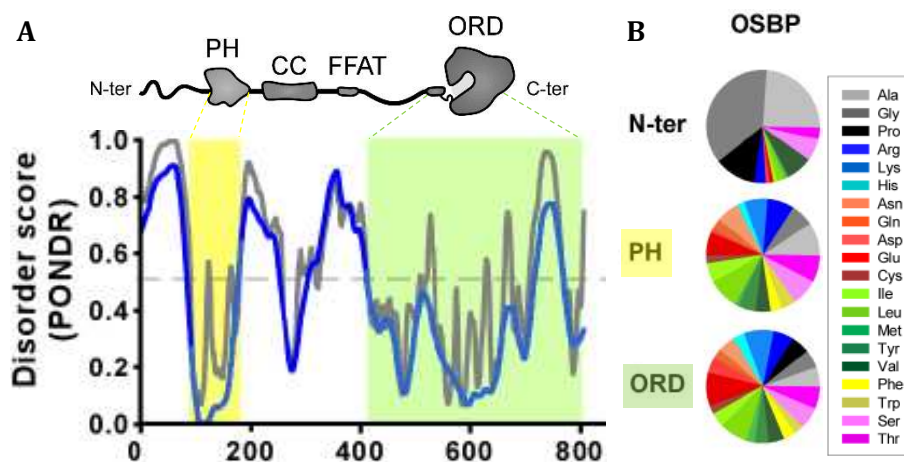
Les IDRs sont définies comme des régions de protéines qui n'ont pas de structure secondaire fixe. Il existe aussi des protéines entièrement désordonnées, on parle de IDPs (intrinsically disordered proteins). Nous allons considérer uniquement le "désordre" qui s'applique au squelette de la protéine et non pas aux chaînes latérales des résidus. Ces IDRs contiennent beaucoup de résidus polaires et chargés (Glu, Ser, Gln, Lys) qui tolèrent le contact avec le solvant

aqueux. A l'inverse, elles comportent peu d'acides aminés hydrophobes (Val, Leu, Ile) et aromatiques (Phe, Trp et Tyr) qui sont plutôt présents dans les régions globulaires des protéines. L'acide aminé le plus enrichi dans les IDRs est la Proline, ce résidu induit un coude dans la chaîne d'acides aminés du fait de sa structure cyclique. 93% des résidus d'acide glutamique sont localisés à la surface des protéines globulaires ou dans les IDRs du fait de leur charge. La sérine qui comporte un groupement hydroxyle est très polaire également (Theillet et al., 2013)(Van Der Lee et al., 2014)(figure 92).



**Figure 92 : Fréquence des différents acides aminés dans les IDRs.** Comparaison des profils de composition entre des protéines désordonnées de la base de données DisProt et des protéines complètement structurées d'une banque de protéines (PDB-Protein Data Bank) d'après (Theillet et al., 2013).

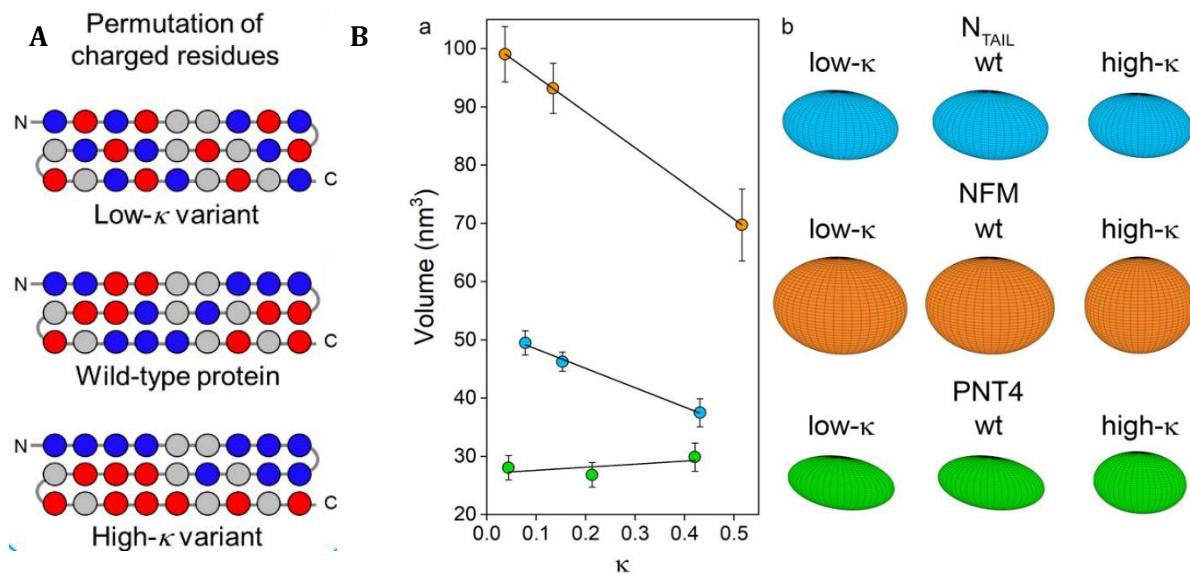
Les résidus qui composent une chaîne d'acides aminés définissent la structure de cette chaîne et par conséquent sa fonction. Des algorithmes permettent aujourd'hui de prédire le désordre d'un peptide à partir de sa séquence d'acides aminés. PONDR (Predictor Of Natural Disordered Regions) a été le premier prédicteur développé en 1997 (Romero et al., 1997)(figure 93). Depuis d'autres outils ont permis de montrer que 35 à 50% des protéines eucaryotes contiennent des



**Figure 93 : A) Score de désordre prédit par PONDR pour OSBP. B) La région IDR N-terminale ne présente pas la même composition que les domaines globulaires PH et ORD.** Adapté de Jamecna et al., 2019.

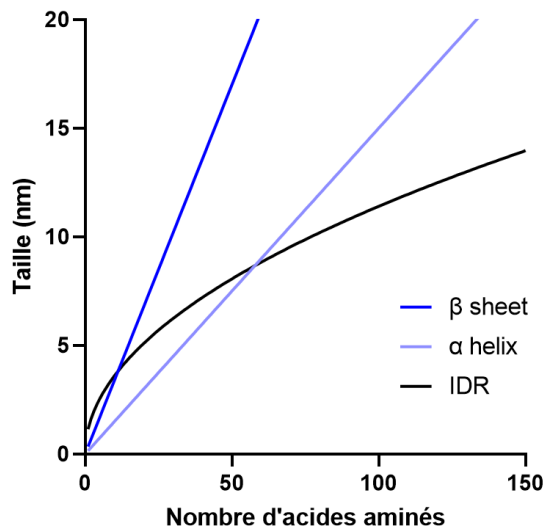


IDRs d'au moins 40 résidus (Dunker et al., 2002) et AlphaFold permet aussi de prédire ce type de régions (Ruff and Pappu, 2021). De plus, une analyse poussée de la séquence permet de prédire la conformation spatiale de l'IDR. En effet, la distribution des charges influence la compaction du peptide. En modifiant artificiellement la position des résidus chargés dans une chaîne d'acides aminés non structurée, on fait varier le volume occupé par ce peptide (figure 94) (Bianchi et al., 2022).



**Figure 94 : Lien entre la compaction d'un peptide IDR et la distribution de ses charges :** A) Schéma des structures primaires d'un ensemble de protéines, dérivées d'une IDR WT en répartissant plus uniformément les résidus de charge opposée (low- $\kappa$ ) ou en les regroupant en deux blocs au niveau des moitiés N et C-terminale (high- $\kappa$ ). Les sphères bleues et rouges indiquent respectivement les résidus chargés positivement et négativement. B) Régression du volume de l'ellipse de trois peptides différents par regroupement des charges. (La conformation de chaque modèle a été étudiée par chromatographie d'exclusion de taille et par spectrométrie de masse afin de détacher des valeurs expérimentales permettant de calculer le volume et de représenter l'ellipse moyenne du peptide.) (Bianchi et al., 2022)

Pour estimer la taille d'un peptide organisé en hélice  $\alpha$  on considère 3,6 résidus par tours d'hélice correspondant à 0,54 nm soit une fonction linéaire de 0,15 nm par résidu. Pour un feuillet  $\beta$  qui correspond à un peptide étendu au maximum, on considère également une fonction linéaire, qu'on estime à 0,34 nm par résidu. Envisager la taille d'une région non structurée est plus complexe, en effet cette chaîne libre peut se replier sur elle-même et n'est statistiquement jamais retrouvée dans une forme étendue maximale, c'est pourquoi on utilise une fonction racine carrée pour estimer sa taille moyenne (figure 95)(Creighton, 1993). Il existe une autre façon de calculer la taille d'une sequence IDR dans le cas où elle se trouve entre deux domaines structurés, et donc restreinte dans ses mouvements. Dans ce cas, la formule linéaire 0,18 nm par résidu qui considère une boucle aléatoire peut être utilisée (Tong et al., 2013).



**Figure 95 : Estimer la taille d'un peptide**

Feuillet  $\beta$  (violet foncé) :  $0,34 \text{ nm} \times n$

Hélice  $\alpha$  (violet clair) :  $0,15 \text{ nm} \times n$

IDRs :  $\sqrt{1,30 \times n}$

Où  $n$  est le nombre de résidus

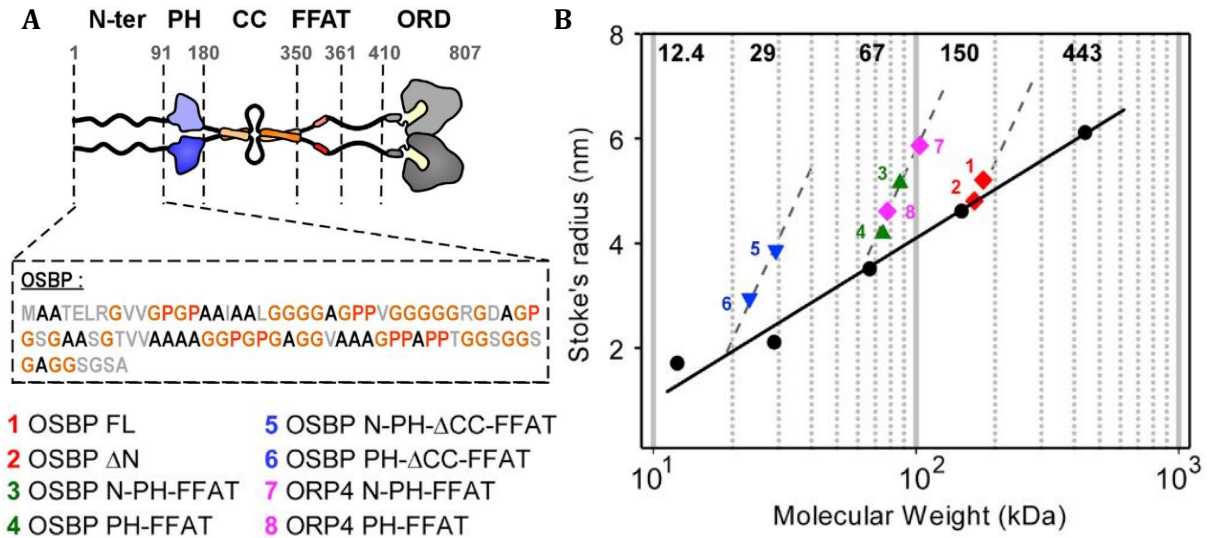
(Creighton, 1993)

## 2. Rôles potentiels et exemples

L'absence de structure dans une protéine ou une partie de celle-ci peut être aussi importante que la présence d'une structure d'un point de vue fonctionnel. Par ailleurs, l'importance biologique des IDRs se démontre par leur persistance évolutive et par leur abondance dans le protéome. Nous allons détailler des fonctions associées aux IDRs dans ce chapitre à travers quelques exemples tirés du contexte des MCSs. (D'autres exemples sont décrits dans la revue (Jamecna and Antonny, 2021)).

### (a) Région N-terminale d'OSBP, la barrière entropique

Beaucoup de LTPs enrichies aux MCSs contiennent des IDRs. Par exemple, les ORPs comportent à leur extrémité N-terminale une séquence de 50 à 150 acides aminés prédite pour être non structurée. Les travaux de thèse de Denisa Jamecna ont permis de caractériser les régions



**Figure 96 : La région N-terminale d'OSBP est une IDR.** A) Séquence d'acides aminés de la région IDR N-terminale d'OSBP et constructions utilisées pour l'expérience. ORP4 possède également une région N-terminale IDR. B) Rayon hydrodynamique comparé au poids moléculaire des différentes constructions (symboles colorés) déterminé par gel filtration analytique. Les standards (cercles noirs) sont des protéines globulaires. Pour chaque construction, la région IDR N-terminale augmente le rayon hydrodynamique. D'après Jamecna et al., 2019.

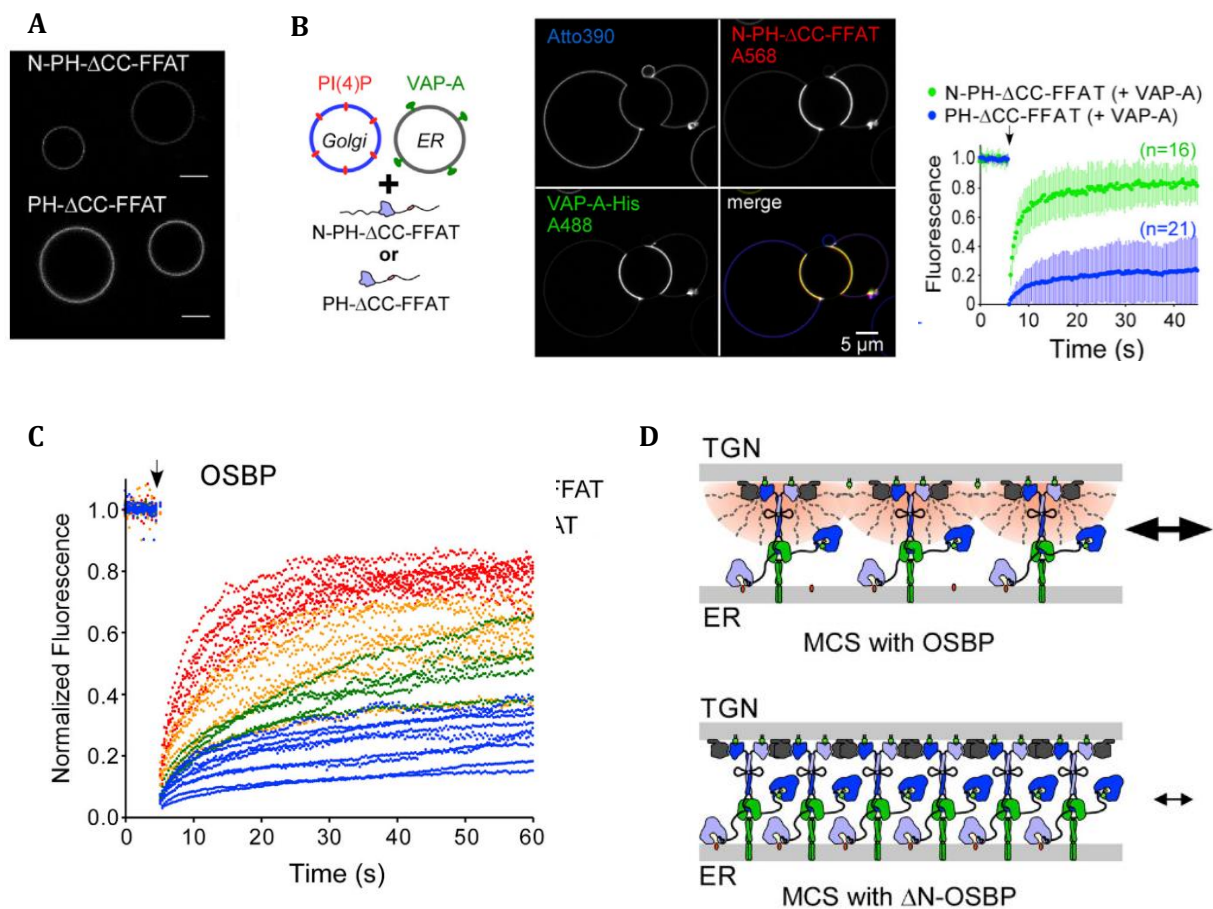
N-ter d'OSBP et d'ORP4 et de comprendre leur rôle (Jamecna et al., 2019). Notamment, la comparaison des profils de gel filtration analytique entre diverses constructions d'OSBP et d'ORP4 (contenant ou non leurs régions N-ter) a confirmé que ces régions sont des IDRs (figure 96). Bien que la troncation du N-ter d'OSBP ne présente aucun effet sur l'activité d'échange de lipides par OSBP *in vitro*, des différences frappantes sont observées entre les constructions N-PH-FFAT et PH-FFAT lorsqu'elles sont mises au contact de liposomes enrichis en PI4P. PH-FFAT (ΔN-ter) provoque le pontage de ces liposomes (on parle d'« homotethering »), tandis que N-PH-FFAT est incapable. La région N-ter d'OSBP prévient donc la liaison de deux domaines PH d'un dimère d'OSBP à deux membranes opposées qui contiennent du PI4P. Il est ainsi possible que le N-ter

d'OSBP soit un moyen d'éviter le pontage de deux régions golgiennes, identiques en termes de lipides, mais ceci reste à démontrer *in cellula*.

Afin de mieux définir la fonction du N-ter d'OSBP et d'imiter la géométrie et l'encombrement d'un MCS *in vitro*, des liposomes géants (ou GUVs, giant unilamellar vesicles) ont été utilisés à la place des « petits » liposomes (qui sont eux classiquement produits par extrusion). Dans ce contexte, il est possible de mesurer par microscopie le recrutement de protéines marquées par des fluorophores à la surface membranaire ainsi que leur enrichissement à l'interface entre deux GUVs (c'est-à-dire, dans le MCS reconstitué). Pour cette expérience, des constructions d'OSBP  $\Delta$ CC ont été utilisées afin d'éviter la formation spontanée de dimères et donc l'homotethering. N-PH- $\Delta$ CC-FFAT est systématiquement moins recruté à la surface des GUVs comparé à PH- $\Delta$ CC-FFAT (figure 96). Cette construction sature la membrane à plus faible concentration, indiquant que la région IDR N-terminale limite le recrutement d'OSBP via son domaine PH sur des membranes contenant du PI4P en créant un encombrement stérique. De plus, des expériences de FRAP sur des MCSs entre GUVs ont permis d'examiner la dynamique de ces protéines. Les constructions  $\Delta$ N-ter présentent un retour de fluorescence beaucoup plus lent, indiquant que la région IDR N-terminale facilite la mobilité latérale d'OSBP dans les MCSs. Ce résultat a été retrouvé *in cellula* (Figure 97).

Ces travaux montrent que la région N-terminale non structurée d'OSBP a un rôle clé dans le turnover de cette protéine au MCS, et probablement dans sa fonction d'échange lipidique. Grâce à son effet de barrière entropique, l'IDR N-ter est un régulateur de densité protéique permettant la dynamique latérale dans le contexte confiné des MCSs qui nécessite une organisation et une géométrie précise pour une activité d'échange de lipides optimale. Un projet actuellement en cours au laboratoire se concentre sur l'exploration de ce modèle de barrière entropique qui pourrait être étendu à d'autres LTPs présentes dans les MCSs, en faisant varier les propriétés physicochimiques de leurs IDRs N-terminales ou C-terminales. Un des objectifs est de définir une IDR minimale en termes de taille et de déterminer la composition en acide aminés adéquate

permettant le fonctionnement, la dynamique et la coordination entre différentes LTPs dans les MCSs.



**Figure 97 : La partie N-terminale d’OSBP limite sa densité et permet sa dynamique.** A) Visualisation du recrutement de N-PH-ΔCC-FFAT ou PH-ΔCC-FFAT marquées sur des GUVs contenant 2% de PI4P. Le mutant ΔN-ter peut être beaucoup plus concentré sur la membrane du GUV. B) Mélange de GUVs mimant le Golgi (PI4P) et de GUVs mimant le RE en présence de VAP-A, formation de MCSs *in vitro*, FRAP sur les MCSs montrant une différence de dynamique entre N-PH-ΔCC-FFAT et PH-ΔCC-FFAT. C) Expériences de FRAP *in cellula* au Golgi montrant une baisse de dynamique latérale de la protéine dans les MCSs en absence de sa région IDR. D) La région N-terminale limite la densité d’OSBP (bleue) facilitant ainsi sa diffusion. VAP est représentée en vert et Arf1 en gris.

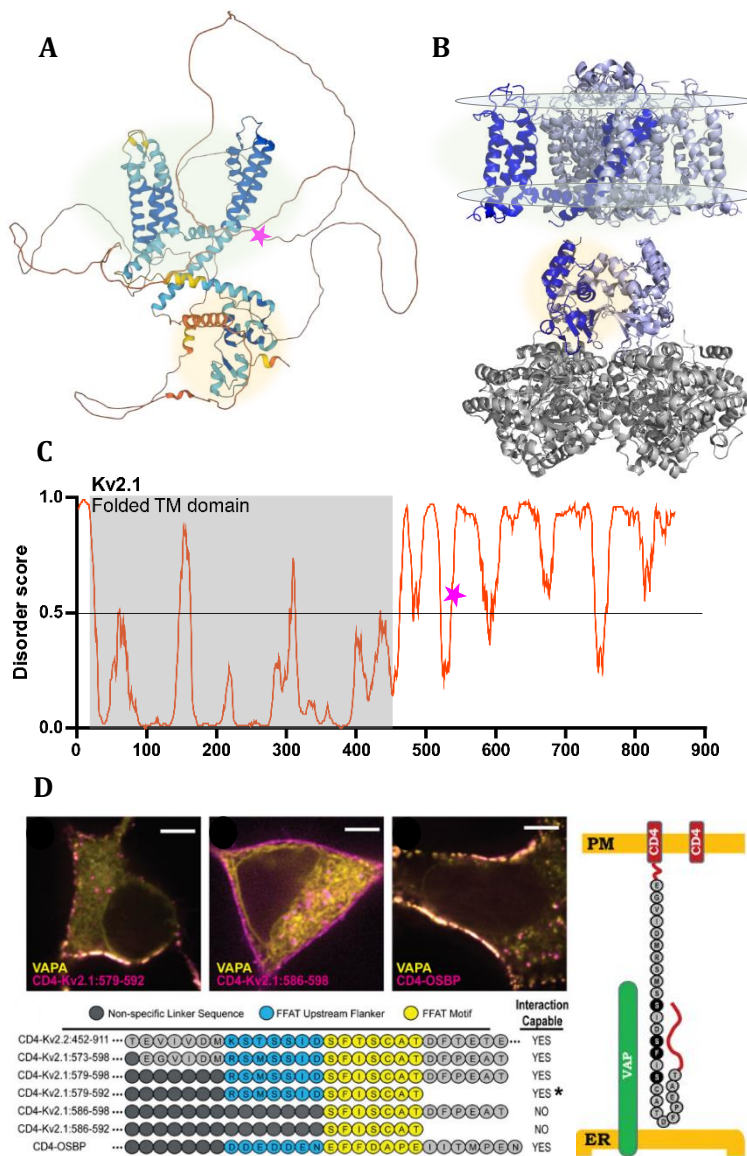
OSBP est un modèle qui témoigne de l’importance des IDRs car elle possède plusieurs types d’IDRs (figure 91) et que chacune d’entre elles a une fonction connue. Comme mentionné précédemment, la région IDR N-terminale crée une barrière entropique indispensable à la régulation de la densité protéique aux MCSs et à la diffusion latérale d’OSBP. De plus, une autre IDR située entre le coiled-coil et le domaine ORD permettrait la mobilité du domaine ORD. Cette fonction n’a pas été explorée expérimentalement mais il est probable que la remplacer par une

structure rigide entraverait le déplacement de l'ORD entre membranes et rendrait la protéine inactive. Pour finir, OSBP se lie à VAP grâce à son motif FFAT accessible au niveau de ce même linker (figure 13) et nous allons voir qu'OSBP n'est pas le seul exemple pour ce type d'interaction.

### **(b) Kv2.1, un canal doublement régulé par ses IDRs**

La principale caractéristique des IDRs est l'accessibilité des résidus, c'est pourquoi une IDR peut être à l'origine d'une interaction protéique. Prenons l'exemple du canal potassium voltage dépendant Kv2.1. Ce canal exprimé dans la membrane plasmique des neurones, des cellules endocrines et des cellules musculaires, s'ouvre en réponse à une dépolarisation membranaire pour conduire l'influx potassique. La prédiction de désordre de la séquence de Kv2.1 suggère que la moitié C-terminale de la protéine pourrait être non structurée (figure 98). Cette longue IDR C-terminale très peu caractérisée, comporte un motif pFFAT lui permettant d'interagir avec VAP au RE. Cette interaction conduit à l'agrégation des canaux Kv2.1 aux MCSs RE/membrane plasmique et à leur inactivation (Johnson et al., 2018)(Kirmiz et al., 2018). Une fois rassemblés en clusters, ces canaux sont donc inactifs, cependant, le cluster est dissociable grâce à la phosphatase Calcineurin, active en présence de calcium, qui déphosphoryle le motif FFAT de Kv2.1, le détachant de VAP (Johnson et al., 2019)(figure 99). Beaucoup reste à explorer sur le rôle de l'IDR C-terminale de Kv2.1, par exemple, la longueur minimale entre le domaine transmembranaire et le motif FFAT pour permettre l'interaction avec VAP est inconnue. On pourrait émettre l'hypothèse que la longueur de cette région permet, comme la région N-terminale d'OSBP, de créer une barrière entropique afin de faciliter la dynamique de Kv2.1 dans les membranes. De plus, le rôle des « clusters » de Kv2.1 est mal connu, il est possible qu'ils participent au maintien des MCSs RE/membrane plasmique.

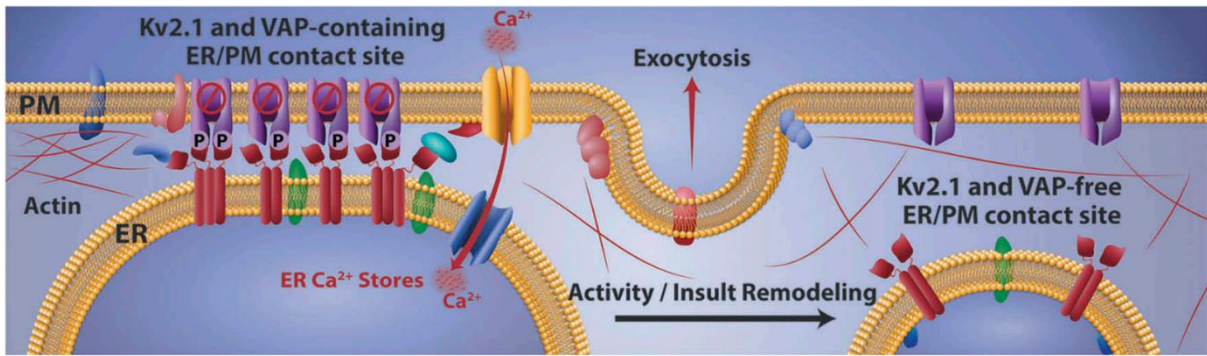
Outre cela, ce type de canal est inactivé par fermeture de son pore central par un mécanisme de type C appelé « ball and chain » (Zagotta et al., 1990): le domaine N-terminal (T1 $\alpha$ ) du canal qui se trouve dans le cytosol vient boucher le pore. Une IDR située entre la partie



**Figure 98 :** A) Modèle AlphaFold d'un monomère de Kv2.1 *Human* le FFAT est repéré par une étoile. Le domaine « Ball » T1α est repéré en orange et le domaine transmembranaire en vert. B) Structure de Kv2.1 *Rattus Norvegicus* résolue en cryo-EM en tétramère, version chimérique avec le Kv1.2. La sous unité auxiliaire β en gris provient d'une autre protéine partenaire (Matthies et al., 2018). C) DISOPRED, prédiction de désordre pour Kv2.1, ~50% de la séquence est désordonnée, le motif FFAT se trouve dans l'IDR. D) Caractérisation du motif pFFAT de Kv2.1 induisant le « clustering » de Kv2.1 aux MCSs RE/membrane plasmique. Ce motif est remplaçable par le FFAT canonique d'OSBP. L'interaction est annulée lorsque l'IDR C-terminale de Kv2.1 est raccourcie, et que le séquence acide qui précède le motif FFAT est supprimée (Johnson et al., 2018).

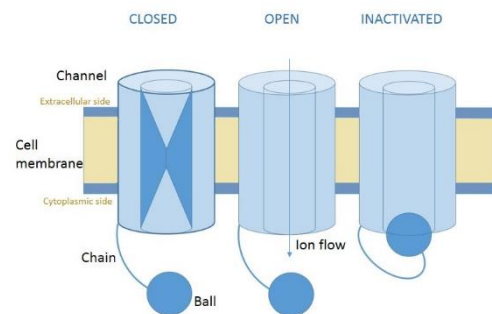
structurée transmembranaire du canal et le domaine T1α permet la mobilité du domaine et la fermeture du pore. Ceci est indispensable à ce mécanisme de régulation (Zhou et al., 2000) (Long et al., 2007)(Matthies et al., 2018)(figure 100).

Ainsi, les IDRs ne sont pas essentielles pour l'activité de ce type de protéines transmembranaires, néanmoins elles permettent la **régulation** de leur activation et leur recrutement aux MCSs.



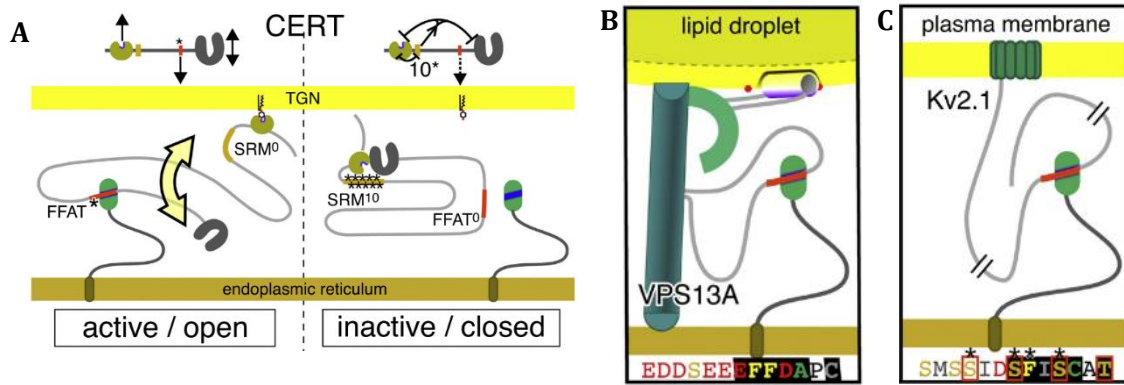
**Figure 99 :** Modèle de fonctionnement de Kv2.1(violet), inactivé par son interaction avec VAP(rouge) qui force son agrégation aux MCSs. Cette interaction peut être reversée par déphosphorylation du motif FFAT de Kv2.1 par la Calcineurin dont l'activité est dépendante du niveau de calcium environnant, lui-même régulé par Orai1(jaune) et STIM1(bleu) aux MCSs RE/Membrane plasmique. D'après (Johnson et al., 2019) .

**Figure 100 :** Modèle d'inactivation « ball and chain » (type C) des canaux voltage dépendants: cette inactivation rapide est permise par l'IDR (« chain ») située entre le domaine transmembranaire et la « ball » (Zagotta et al., 1990).



Ce mécanisme d'interaction protéine/protéine via un motif présent dans une IDR et conduisant au recrutement dans un MCS s'applique à d'autres protéines évoquées précédemment dans ce manuscrit. Les motifs FFAT d'OSBP, de CERT mais également ceux de protéines très structurées comme VPS13A ou Kv2.1 (figure 64 et 101)(Alli-Balogun and Levine, 2019) se trouvent systématiquement dans des IDRs. Des régulations peuvent aussi se produire par phosphorylation sur une sérine présente dans une IDR, par exemple le SRM de CERT se trouve dans une IDR, une fois phosphorylée la protéine est repliée sur elle-même dans une conformation inactive.



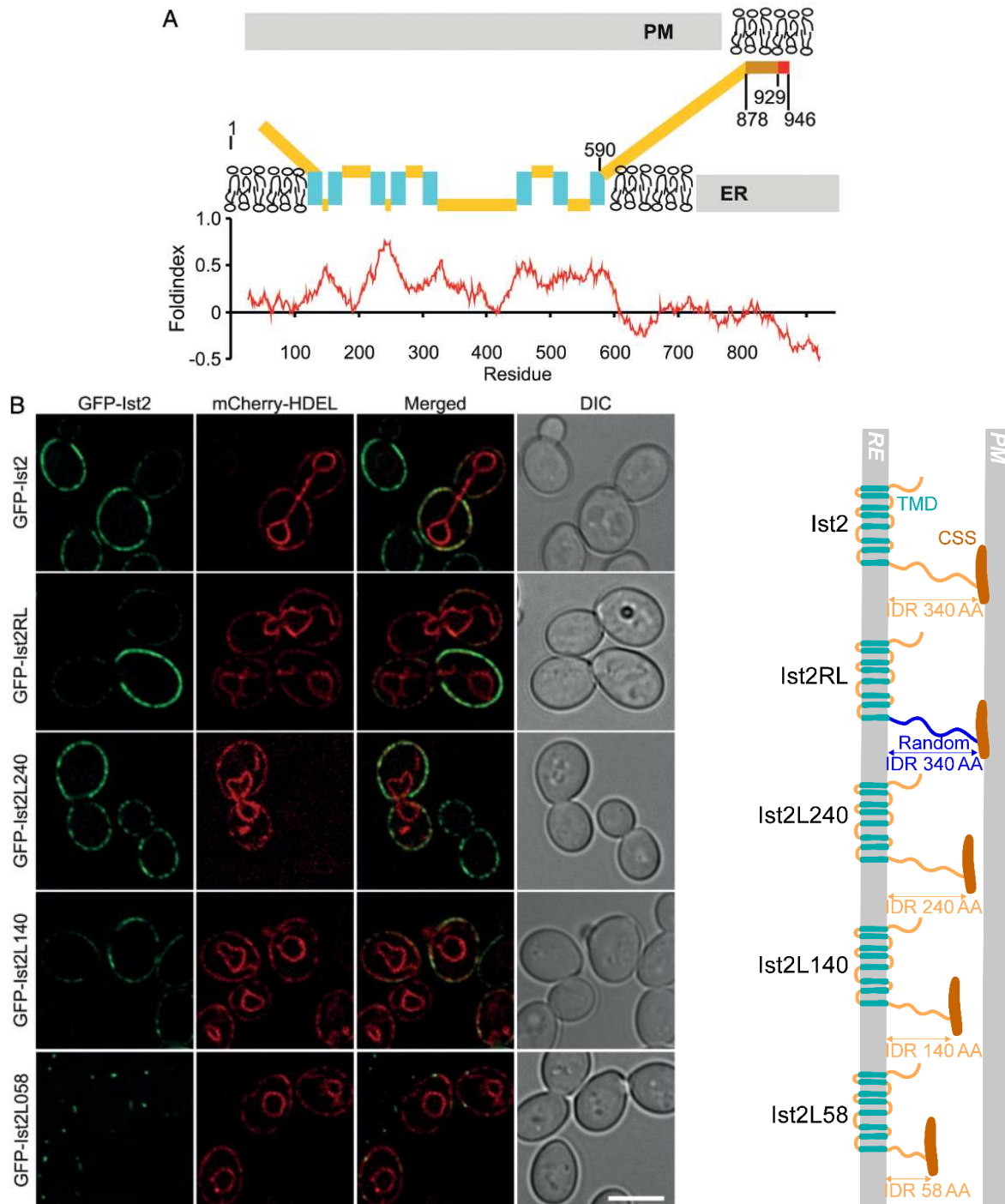


**Figure 101 :** A) Le motif FFAT de CERT se trouve dans une région non structurée ainsi que son SRM, permettant la régulation de son activité. B) Un motif FFAT prédit dans une boucle latérale non structurée a été caractérisé expérimentalement dans VPS13A. C) Les motifs FFAT sont induits par phosphorylation dans Kv2.1 (et Kv2.2, non montré), qui ponte la membrane plasmique et le RE via VAP. Les cases rouges indiquent les résidus qui sont phosphorylés. Le motif FFAT se trouve dans une IDR. (Alli-Balogun and Levine, 2019)

### (c) Le linker d'Ist2 : relier deux compartiments

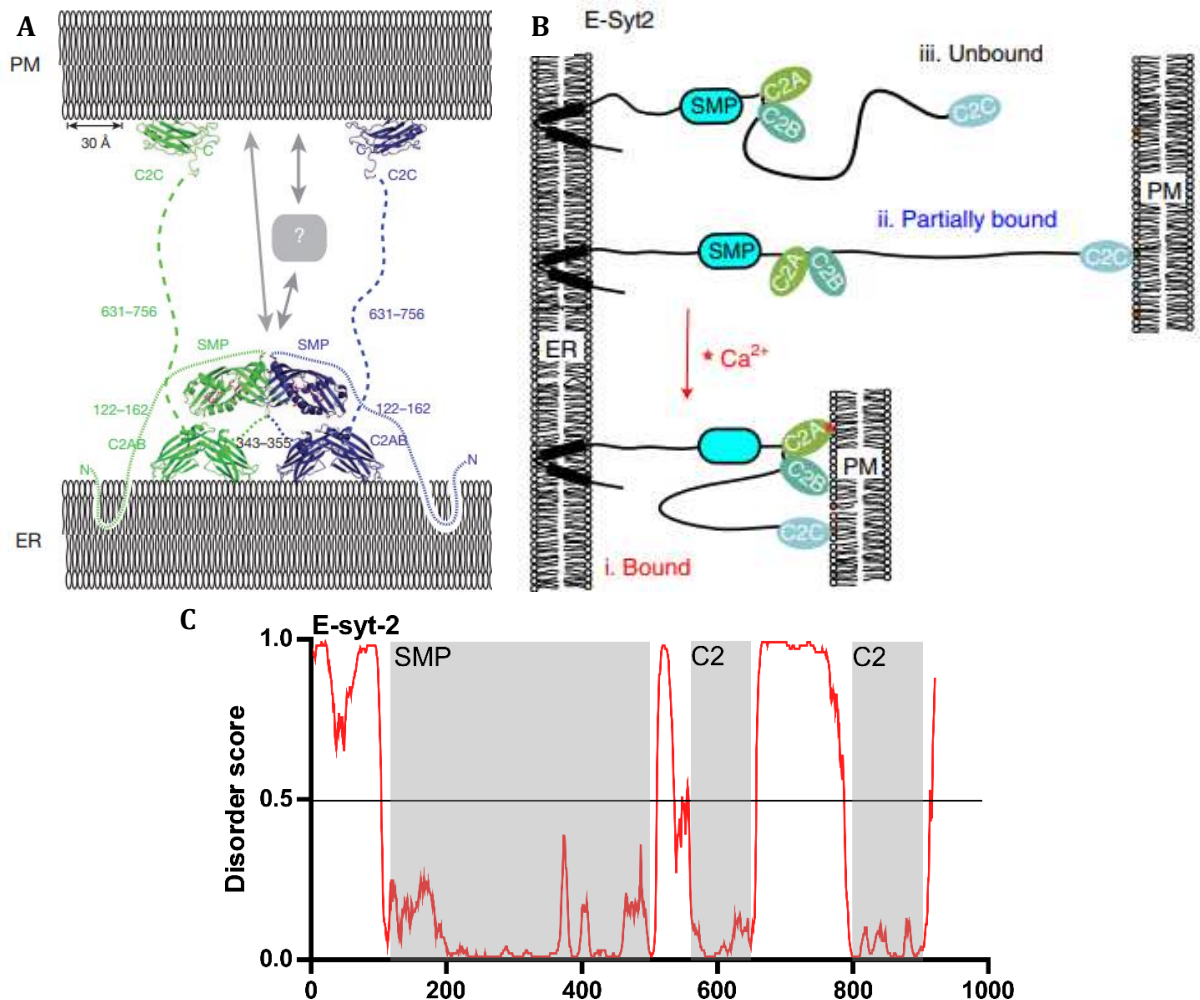
Ist2 est une protéine ancrée au RE chez la levure par un TMD à 8 segments, elle permet la formation des MCSs avec la membrane plasmique via son domaine C-terminal CSS (cortical sorting signal) qui consiste en une hélice amphipatique. Une séquence de 300 résidus prédite pour être une IDR sépare ces deux domaines structurés, sa taille lui permettrait de couvrir les ~30 nm du MCS, et par conséquent de relier les deux membranes (Kralt et al., 2015). Par ailleurs, un court segment de cette IDR est nécessaire à la liaison et à la localisation d'Osh6, cette interaction est requise pour le transport de PS médié par Osh6 vers la membrane plasmique (D'Ambrosio et al., 2020). Une étude a démontré que la localisation d'Ist2 est affectée si son IDR est raccourcie, alors que changer la séquence de cette région de façon aléatoire n'a aucun impact (figure 102). Cette étude a mis en évidence l'implication d'une IDR comme élément indispensable à la localisation subcellulaire d'une protéine de part sa longueur, ici Ist2 aux MCSs RE/membrane plasmique. En effet, réduire la taille du linker d'Ist2 réstreint sa localisation à quelques zones ponctiformes à la membrane plasmique. Il est possible qu'une protéine ayant un linker plus court ne puisse trouver que peu de zones où les membranes sont suffisamment proches pour que la distance qui les sépare soit couverte.

Ce modèle de pontage via des linkers existe aussi chez les Extended Synaptotagmins (E-syt) chez l'Homme ou les tricalbines (Tcb) chez les levures, impliquées dans le transfert de lipides entre le RE et la membrane plasmique via leur domaine SMP (Schauder et al., 2014). L'activité des E-syt



**Figure 102 : Localisation d'Ist2 et des IDRs mutants.** A) Représentation schématique de Ist2 et prédiction de désordre. La région IDR se situe entre les résidus 589 et 928, entre le TMD et le CSS. B) Localisation de GFP-Ist2 aux MCSs RE/membrane plasmique, le RE est marqué en rouge par l'expression de mCherry-HDEL. Localisation des mutants : la randomisation de la séquence du linker n'affecte pas la localisation d'Ist2 (Ist2RL) tandis que la taille du linker est déterminante (Ist2L240, Ist2L140 et IstL58). Adapté de (Kralt et al., 2015).

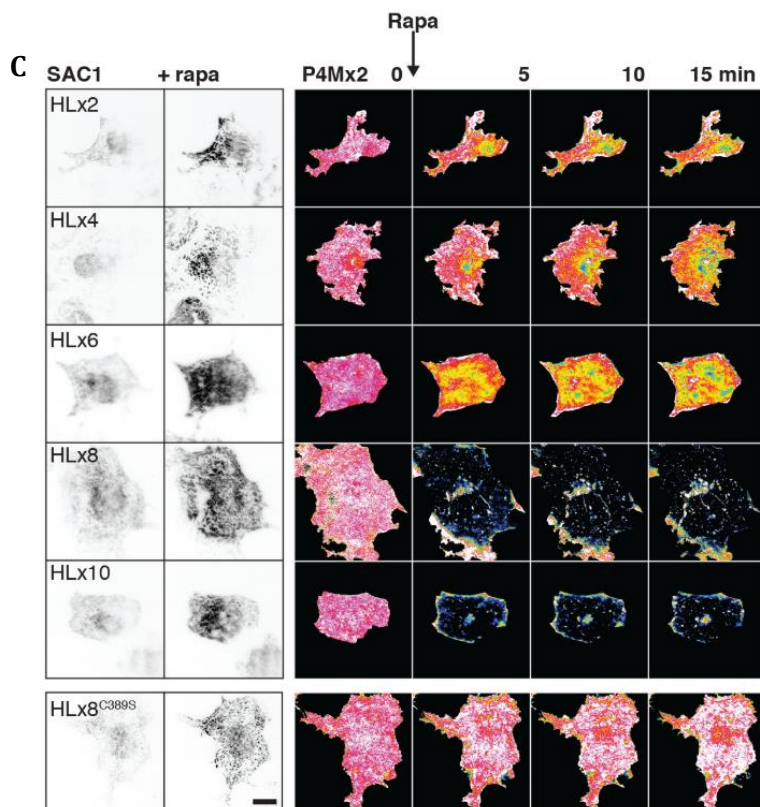
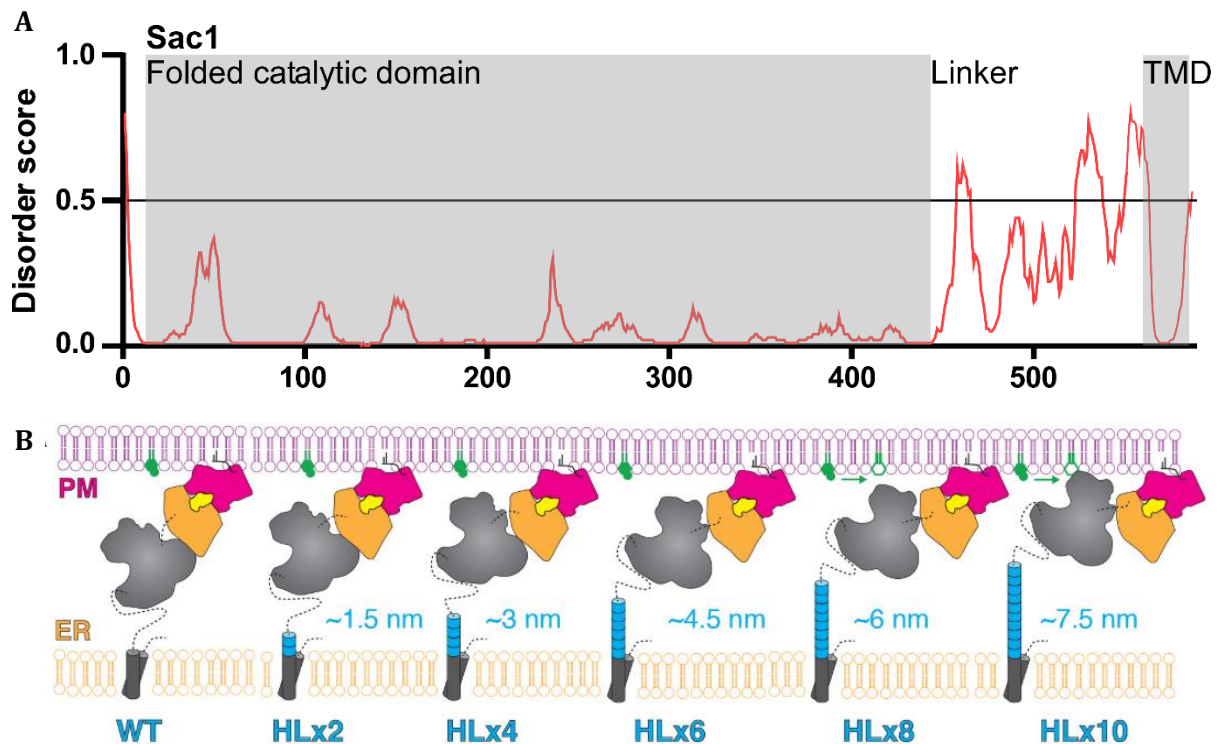
dépend du taux de calcium environnant, un de ses domaine C2 exerce une autoinhibition intramoléculaire sur le domaine SMP qui peut être levée en présence de fortes concentrations de calcium (figure 103)(Saheki et al., 2016)(Bian et al., 2018). Ce taux est possiblement régulé par l'activité de Orai1 et STIM1, il existe donc un lien étroit entre la signalisation calcique et les échanges de lipides au sein des MCSs RE/membrane plasmique. De plus, en présence de calcium, un des autres domaines C2 des E-syt permettant sa fixation à la membrane plasmique via le PI(4,5)P2, exerce une force de traction, mesurable à l'aide de pinces optiques, qui rapproche les membranes et ainsi, actionne les échanges lipidiques. Les linkers qui séparent les domaines C2 des E-syt permettent cette modulation (Ge et al., 2022).



**Figure 103 :** A) Structure de E-syt2, estimation de sa conformation dans un MCS (Schauder et al., 2014). B) Rôle des linkers IDRs séparant les domaines C2 dans E-syt2, activée par traction de la membrane plasmique à proximité de la membrane du RE. Traction mesurée à l'aide de pinces optiques permettant de bouger des objets microscopiques, ici des billes de silice revêtues de lipides mimant la membrane plasmique afin de recruter E-syt2 (Ge et al., 2022). C) Prédiction de désordre par DISOPRED pour E-syt2.

#### (d) Le linker restrictif de Sac1

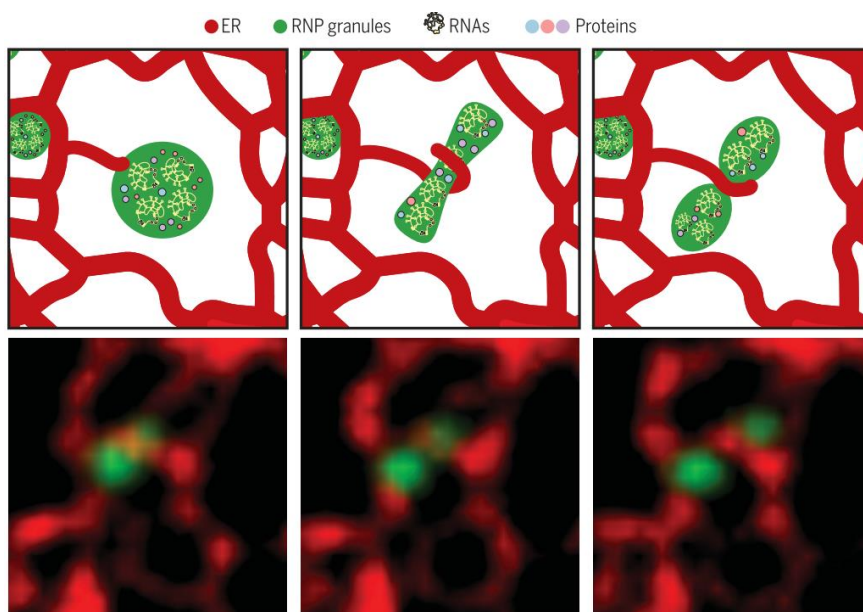
Le PI4P est un lipide ayant de nombreuses fonctions cellulaires (Balla, 2013). C'est un intermédiaire métabolique incontournable pour la synthèse d'autres PIPs composant les membranes, il est le point d'ancrage des protéines comportant un domaine PH comme CERT et OSBP au TGN (Levine and Munro, 1998), il permet un contrôle de la composition des membranes, servant de monnaie d'échange énergétique à OSBP pour le transport de cholestérol contre son gradient de concentration du RE au Golgi (Mesmin et al., 2013) ou à ORP5 pour le transfert de PS entre le RE et la membrane plasmique (Doyle et al., 2022). Le taux de PI4P dans les membranes est finement régulé par Sac1, une phosphatase ancrée au RE par son domaine transmembranaire qui hydrolyse le PI4P dans cette membrane. Sac1 possède un linker entre son TMD et son domaine catalytique, celui-ci ne lui permet pas d'atteindre la membrane du compartiment opposé. En effet, Sac1 fonctionne en « cis », c'est-à-dire qu'elle hydrolyse le PI4P présent sur la membrane du compartiment où elle se trouve : le RE (Zewe et al., 2018). Allonger la taille du linker artificiellement (par ajout successif de motifs répétés EAAAR [ $\sim 0,75$  nm] formant une hélice  $\alpha$ ) lui donne accès à la membrane opposée, ce qui entraîne une déplétion de PI4P à la membrane plasmique (figure 104). La taille du linker de Sac1 est donc déterminante pour son activité et pour l'homéostasie globale du PI4P.



**Figure 104:** A) Prédiction de désordre par DISOPRED pour Sac1. B) Linker ajouté (HL, bleu) à Sac1 (répétition d'hélices de 0,75 nm EAAAR). Le système FKBP (orange) lié à Sac1-mCherry combiné à la sur expression de FRB (rose) lié à la membrane plasmique permet le recrutement de Sac1 aux MCSs RE/MP par ajout de rapamycine (jaune). C) Images TIRF de FKBP-SAC1-mCherry avant et après ajout de rapamycine et visualisation du PI4P par la sonde P4M. Les chimères allongées de SAC1 sont bien recrutées aux MCSs. L'insertion de 2 à 6 hélices n'affecte pas le pool de PI4P à la membrane. L'ajout de 8 ou 10 hélices entraîne une déplétion du PI4P membranaire. Le mutant HL8 inactif C389S n'affecte pas le pool de PI4P (Zewe et al., 2018)

### (e) L'IDR de FUS favorise une phase liquide-liquide

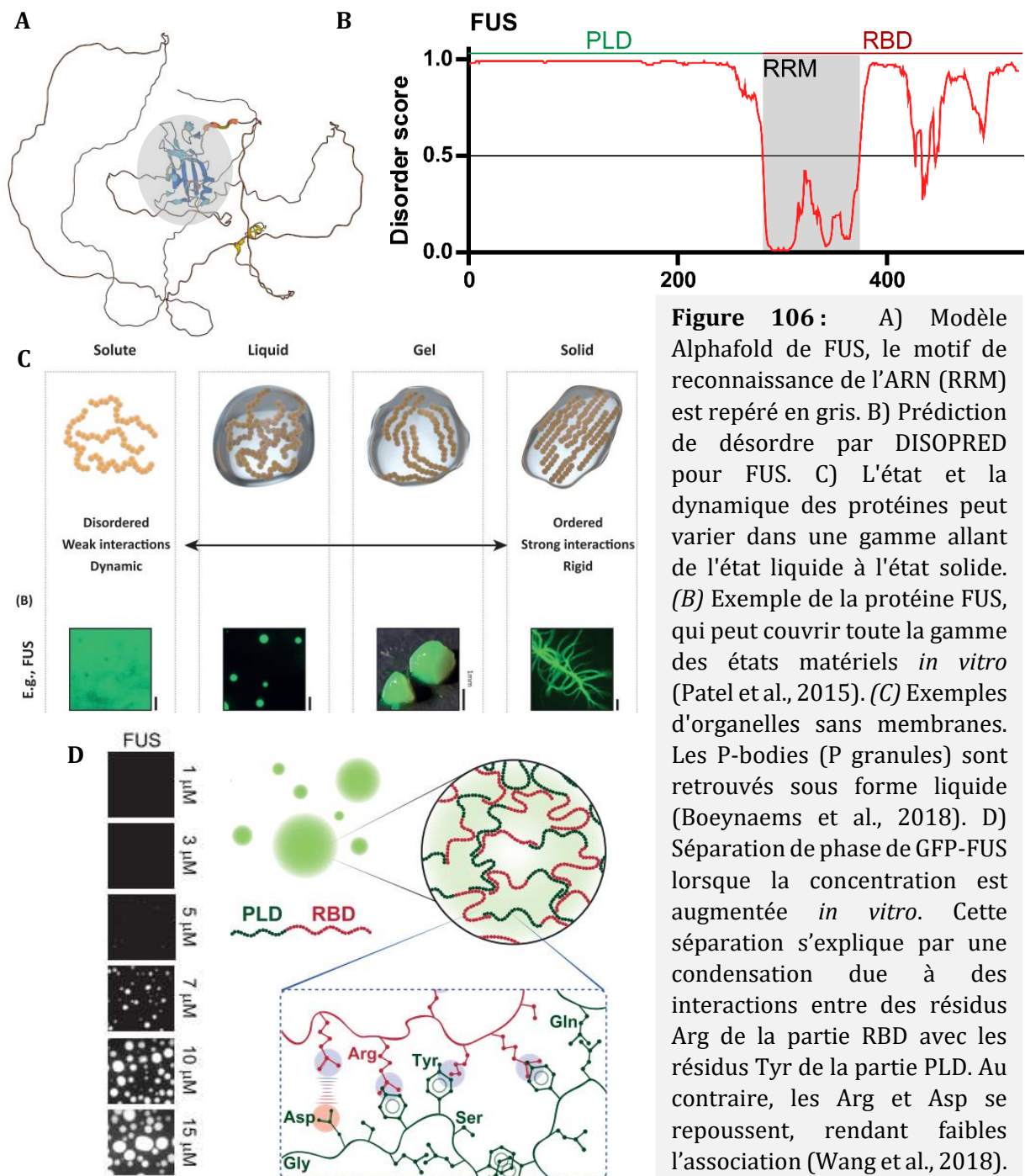
La plupart des cellules comportent des organelles qui ne sont pas délimités par une membrane. Il s'agit d'un assemblage de protéines et d'acides ribo-nucléiques (ARN) souvent appelés P-bodies (processing bodies) ou nucleoli qui participent à la régulation de l'expression génique. Le RE forme des sites de contact avec ces organelles et permet ainsi leur fusion ou fission, au même titre que les MCSs RE/mitochondrie sont à l'origine d'évènements de fusion et fission des mitochondries (figure 105)(Lee et al., 2020). Malgré l'absence de membrane, ces organelles conservent leur structure grâce à un phénomène de transition de phase : lors d'un mélange entre un polymère et une solution, la séparation des phases produit une région à haute concentration et une région à faible concentration, les deux entités coexistent donc sous forme de phases séparées au lieu d'une solution mélangée, on appelle cela une phase liquide-liquide ou une gouttelette liquide (Boeynaems et al., 2018).



**Figure 105 :** Les tubules du RE (rouge) forment des contacts avec les P-bodies (vert) aux sites de fusion/fission (Lee et al., 2020) .

Les IDRs, très présentes dans ces organelles sans membrane (Darling et al., 2018), permettent des interactions faibles (cation- $\pi$  ou électrostatiques) entre des acides aminés spécifiques afin de créer un condensat et une phase liquide-liquide (Wang et al., 2018). Par exemple, le facteur de transcription FUS impliqué dans la réparation de l'ADN et présent dans des P-bodies particuliers appelés « granules de stress » (dans des conditions de stress, FUS se déplace rapidement vers le cytoplasme et forme des granules de stress), possède une longue IDR N-

terminale d'environ 250 résidus (PLD pour Prion like domain) qui lui permet de créer une phase liquide en interagissant avec des acides aminés de la partie C-terminale : RBD (RNA binding domain contenant le RRM RNA recognition motif). Les interactions entre les résidus tyrosine et arginine provenant des deux régions opposées de la protéines favorisent l'auto-association, et au contraire, les interactions électrostatiques jouent un rôle modulateur (Wang et al., 2018)(figure 106). La nature liquide de ces compartiments permet la diffusion rapide nécessaire aux réactions chimiques permettant la réparation de l'ADN (Patel et al., 2015). Cependant, cette transition de phase peut s'avérer aberrante dans certains cas et conduire à la formation d'un gel et même d'une phase solide, ceci est observé chez les patients atteints d'ALS6, qui présentent des mutations sur FUS, ou lors du vieillissement. D'ailleurs d'autres maladies du vieillissement causées par des protéines sujettes à l'agrégation peuvent résulter d'un défaut de maintien de l'homéostasie de la phase liquide. Les propriétés physico-chimiques des phases liquide-liquide découvertes récemment chez de nombreuses protéines démontrent une variété de fonctions cellulaires (Alberti et al., 2019).



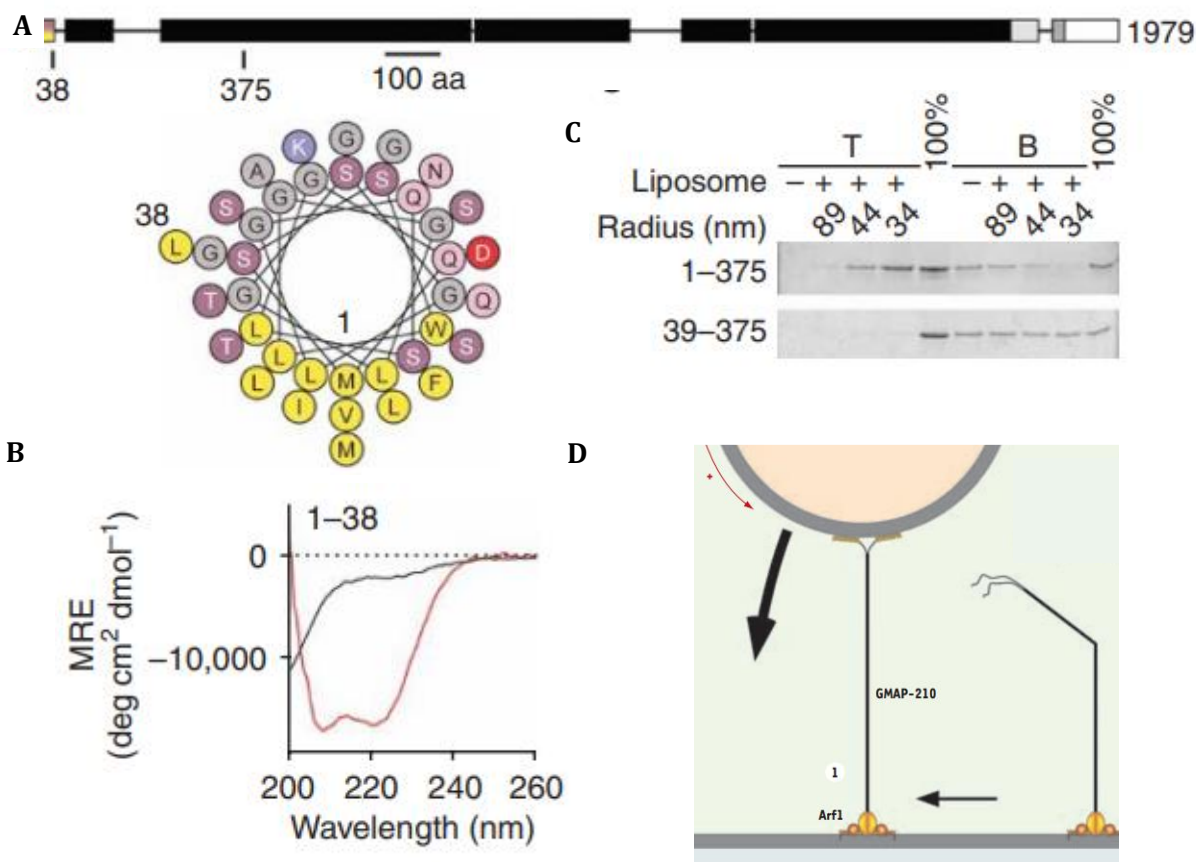
**Figure 106:** A) Modèle AlphaFold de FUS, le motif de reconnaissance de l'ARN (RRM) est repéré en gris. B) Prédiction de désordre par DISOPRED pour FUS. C) L'état et la dynamique des protéines peut varier dans une gamme allant de l'état liquide à l'état solide. (B) Exemple de la protéine FUS, qui peut couvrir toute la gamme des états matériels *in vitro* (Patel et al., 2015). (C) Exemples d'organelles sans membranes. Les P-bodies (P granules) sont retrouvés sous forme liquide (Boeynaems et al., 2018). D) Séparation de phase de GFP-FUS lorsque la concentration est augmentée *in vitro*. Cette séparation s'explique par une condensation due à des interactions entre des résidus Arg de la partie RBD avec les résidus Tyr de la partie PLD. Au contraire, les Arg et Asp se repoussent, rendant faibles l'association (Wang et al., 2018).

### (f) L'hélice ALPS de GMAP210 se structure au contact d'une membrane

Nous avons précédemment analysé le rôle des IDRs « déroulées », à l'image d'un spaghetti, servant à relier deux domaines protéiques pour assurer leur mobilité ou encore à unir deux compartiments cellulaires, elles peuvent également créer un encombrement stérique formant une barrière entropique pour limiter la densité protéique ou même créer un compartiment liquide.



Ces IDRs peuvent aussi contenir des séquences permettant l'interaction avec d'autres protéines et/ou leur propre régulation. D'autres IDRs, au contraire, connaissent une transition structurelle lors d'une interaction avec une autre protéine ou avec une membrane. C'est le cas des hélices amphipatiques : beaucoup d'entre-elles se structurent lorsqu'elles interagissent avec une bicouche lipidique. L'interaction commence par une attraction électrostatique due à la charge négative exposée par la membrane, les résidus hydrophobes de la séquence s'insèrent ensuite dans la bicouche et pour finir, la transition en hélice  $\alpha$  se fait spontanément car il s'agit de la conformation énergétique la plus stable (Gim, 2018). Dans le cas particulier des motifs ALPS (Amphipatic lipid packing sensor), qui sont des hélices amphipatiques ne contenant pas/peu de résidus chargés sur leur face polaire et qui sont sensibles aux défauts de packing lipidiques, ils se lient et se structurent en hélice  $\alpha$  préférentiellement à la surface de petits liposomes (ayant une courbure membranaire prononcée, par ex. avec un rayon  $<50$  nm). Cet effet est observé sur les spectres de dichroïsme circulaire de GMAP210 (CD, figure 107). Le motif ALPS de la golgine GMAP210 capture les petites vésicules COPI et COPII transitoirement afin de les faire fusionner avec le Golgi. Comme le linker d'Ist2 mentionné précédemment, GMAP210 est comparable à une corde moléculaire, cette fois-ci plus longue et rigidifiée par une structure coiled-coil de 200 nm, permettant aussi de connecter deux membranes mais plus éloignées (Drin et al., 2007). D'autres hélices amphipatiques et motifs ALPS ont été découverts et caractérisés grâce à l'outil informatique Heliquest (Gautier et al., 2008). Par exemple, chez la levure, Osh4p assure le transport de stérol aux MCSs RE/Golgi, cette protéine comporte une hélice amphipatique N-terminale de type ALPS lui permettant de se lier aux membranes et qui sert également de couvercle « lid » pour fermer la poche hydrophobe qui contient le lipide à transporter (de Saint-Jean et al., 2011).



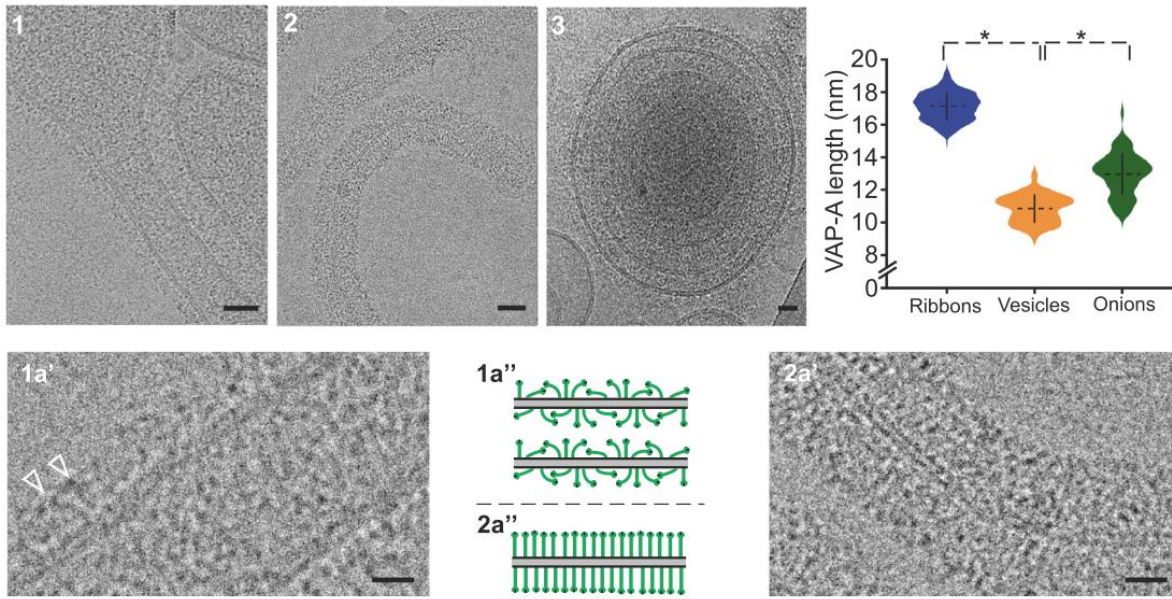
**Figure 107 :** A) Séquence du motif ALPS de GMAP210 (résidus 1 à 38). B) Spectre CD de la région amphipatique de GMAP-210 (résidus 1 à 38) non structurée en noir, structurée en hélice en présence de liposomes en rouge. C) Expérience de flottaison montrant la liaison de GMAP-210 à des liposomes de petite taille uniquement en présence du motif ALPS. D) GMAP-210 ancrée via son domaine GRAB par Arf1 sur la surface plane d'une citerne golgienne reconnaît la surface courbée d'une vésicule de transport par ses hélices ALPS qui se structure uniquement au contact de la membrane. Adapté de (Drin et al., 2007).

La diversité des exemples décrits précédemment témoigne de l'importance biologique des IDRs. En effet, le désordre intrinsèque, relativement peu étudié jusqu'à présent, est crucial pour une multitude de fonctions cellulaires et de ce fait, est impliqué dans de nombreuses pathologies (Uversky et al., 2008). Médiateur d'interactions protéine-protéine ou protéine-membrane, parfois responsable de la localisation et/ou de la fonction cellulaire, parfois chélateur de métaux, les propriétés des IDRs font qu'elles peuvent servir de barrière entropique et même participer à la formation d'une phase liquide (Guharoy et al., 2015). L'abondance des IDRs dans les protéines

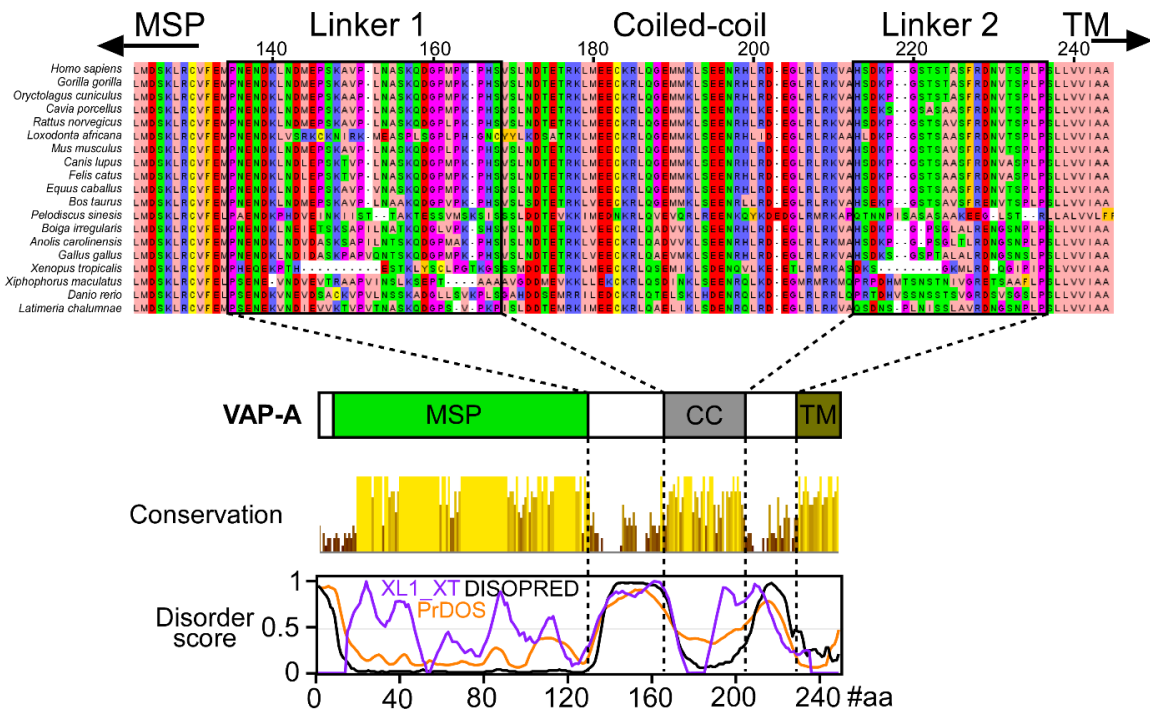
enrichies dans les MCSs peut s'expliquer par l'encombrement protéique au sein de ces espaces confinés. En effet, les protéines solubles dans le cytosol peuvent diffuser dans les 3 dimensions alors que les protéines membranaires engagées dans les MCSs n'accèdent qu'à deux dimensions. Les IDRs apportent la longueur et la flexibilité nécessaire à ces protéines pour atteindre un compartiment, un partenaire cible ou encore réguler l'encombrement à l'intérieur du site. Un linker augmente le rayon de Stokes et donc la liberté d'un domaine à parcourir l'espace, pour effectuer des interactions ou encore transférer des molécules.

### 3. IDRs de VAP-A

Nous avons précédemment démontré que la protéine VAP-A reconstituée dans des liposomes éloigne son domaine MSP à des distances variables de la membrane en fonction de la densité de la protéine. *In vitro*, il a également été montré que le changement de conformation de VAP-A est couplé à la taille de son partenaire, c'est-à-dire que VAP-A est inclinée lorsqu'elle est en complexe avec OSBP, mais présente une conformation plus droite avec une forme plus courte d'OSBP dépourvue du domaine ORD (N-PH-FFAT). Ces données suggèrent que VAP-A est bien équipée pour s'adapter verticalement à un large spectre d'interactants de structures différentes (Mora et al., 2021) (figure 108). Cependant les caractéristiques moléculaires qui confèrent à VAP-A sa flexibilité n'ont pas été étudiés. Nous avons remarqué qu'en aval du domaine MSP, VAP-A contient deux régions linkers (ci-après nommées L1 et L2) de 32 et 24 résidus, flanquant son domaine coiled-coil. Ces séquences montrent une conservation d'acides aminés inférieure à celle des domaines MSP, coiled-coil et TMD, mais sont systématiquement présentes chez toutes les espèces. De plus, différents algorithmes prédisent que les linkers de VAP-A sont des régions intrinsèquement désordonnées (IDRs), ce qui est également suggéré par la structure Alphafold (figure 109 et 72).



**Figure 108 :** Reconstitution de VAP-A à haute densité protéique (LPR 70 mol/mol) conduisant à la formation de vésicules déformées (1), de rubans (2) ou d'oignons (3). Graphiques montrant la distribution de la longueur de la région extramembranaire de VAP-A, Images cryo-EM, barre = 25 nm. Vues rapprochées 1a' et 2a' et représentation schématique de l'orientation des protéines dans la membrane selon la concentration. Le domaine MSP est pointé par les flèches blanches. Barres = 10 nm (Mora et al., 2021)

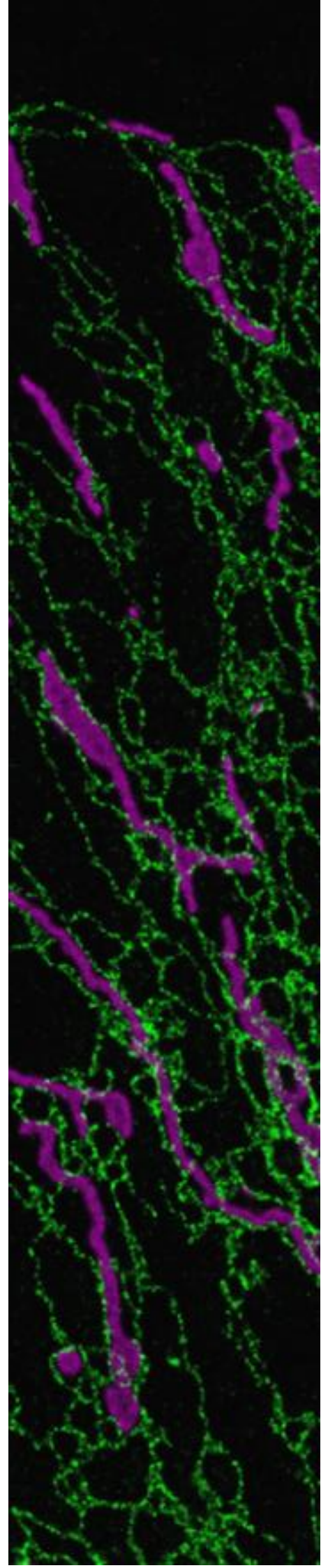


**Figure 109 :** Prédiction d'IDRs dans la séquence de VAP-A. A) Alignement Clustal-O de séquences de VAP-A de vertébrés. Le score de conservation (jaune) est proportionnel à la taille de la barre. B) Le désordre intrinsèque calculé par différents algorithmes suggère que les linkers 1 et 2 sont des IDRs.

#### 4. Hypothèse de travail

Les interactions entre le domaine MSP de VAP-A et le motif FFAT de ses partenaires ont été largement étudiées ces dernières années. Cependant, la géométrie de VAP-A et son pouvoir d'adaptation restent incompris. La question à laquelle j'ai dû répondre au cours de ma thèse a été la suivante : Comment VAP-A peut-elle s'adapter à un tel nombre de partenaires et dans des contextes de MCSs aussi variés ? Les analyses structurales réalisées en cryo-EM ont permis de démontrer que VAP-A présente une longueur variable en fonction de sa densité sur une membrane, ceci suggère que cette protéine est flexible. De plus, selon AlphaFold et plusieurs algorithmes de prédiction de désordre, VAP-A possède deux IDRs potentielles : les linkers 1 et 2, qui contiennent respectivement 32 et 24 acides aminés. L'hypothèse de départ était que ces régions sont flexibles et agissent comme des ressorts moléculaires pour aider VAP-A à s'adapter à différentes situations. Pour répondre à cette problématique et disséquer l'architecture fonctionnelle de VAP-A au sein des MCSs, nous avons utilisé plusieurs approches expérimentales *in vitro* et *in cellula*, allant de l'imagerie à la lipidomique. Dans le chapitre consacré aux résultats je retracerai notre réflexion étape par étape et les questions auxquelles nous avons dû répondre, au gré des observations, au cours de ces trois dernières années.

# Matériels & méthodes

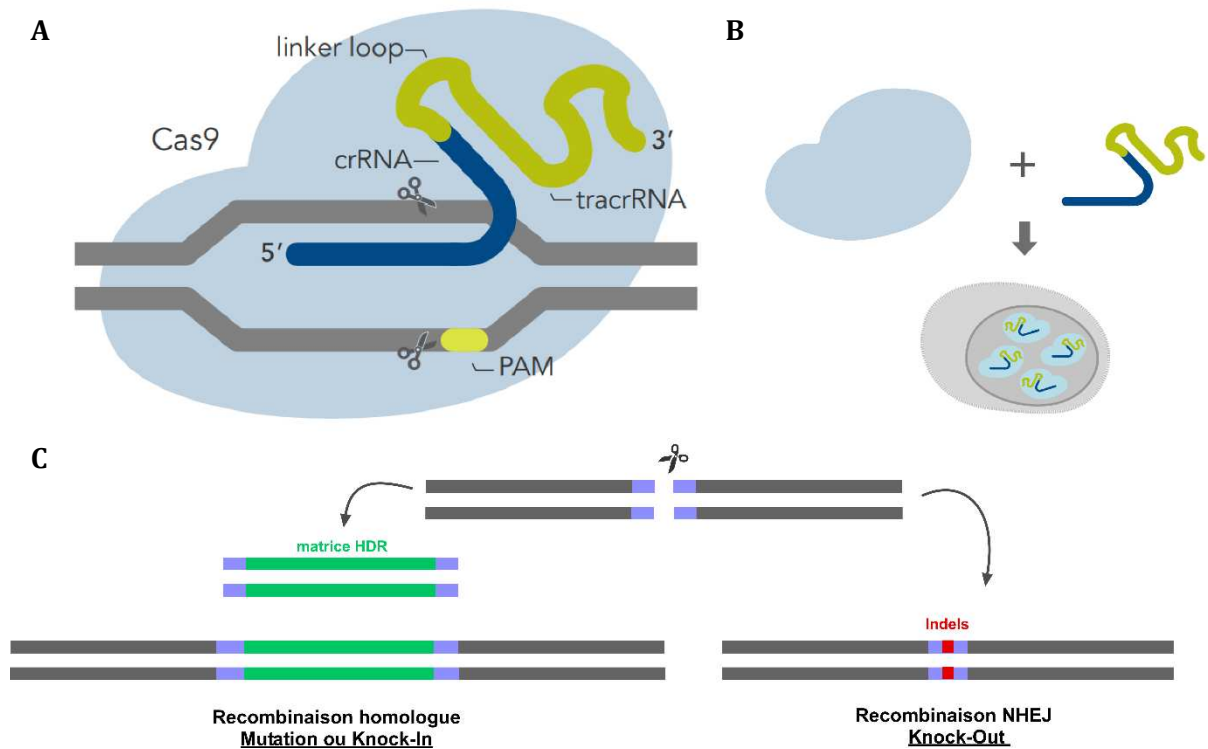


## Partie C Matériels et méthodes

Au cours de ma thèse, j'ai mis en place ou contribué à la mise au point de nouvelles méthodes au laboratoire qui sont aujourd'hui utilisées par d'autres chercheurs. Ces méthodes sont détaillées dans ce chapitre. D'autres protocoles, qui avaient déjà été mis au point auparavant par mes collègues, sont décrits dans la partie matériels et méthodes des publications en annexes de ce manuscrit.

### 1. Crispr/Cas9 Knock-Out (tutoriel) :

L'édition du génome par la méthode Crispr/Cas9 découverte par Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna leur a valu un prix Nobel de chimie en 2020. Cette méthode consiste à causer une cassure double brin de l'ADN à un endroit spécifique du génome. A la suite de cette cassure, deux scénarios sont possibles : i) La cellule met en place des mécanismes de réparation de l'ADN qui peuvent être inefficaces, la recombinaison non homologue « ends joining » (NHEJ) introduit souvent des insertions ou des délétions conduisant à l'inactivation du gène (knock-out : KO). ii) Alternativement, cette réparation peut se faire via une recombinaison homologue en présence d'un fragment d'ADN matrice (HDR Homology Direct Repair) dans lequel on peut aisément introduire des mutations ou un gène entier pour réaliser un knock-in (Doudna and Charpentier, 2014). Ainsi il est possible d'intégrer une GFP dans le génome à la suite d'un gène d'intérêt afin de suivre une protéine endogène (sans la sur-exprimer). Pour ce faire, un complexe RNP (ribonucléo-protéique) qui contient la Cas9 recombinante, complexée à un ARN guide est introduit dans les cellules. L'ARN guide s'hybride à l'ADN après une séquence PAM (Protospacer adjacent motif) de motif « ngg » avec « n » n'importe quelle base, dans le cas de la Cas9 dérivée de *S. pyogenes* que nous utilisons. Différentes approches peuvent être utilisées, nous allons détailler une démarche pour la réalisation d'un KO dans des lignées cellulaires immortalisées par transfection de la Cas9 recombinante complexée à un ARN guide. L'avantage de cette approche est que la Cas9 ne sera plus présente dans les cellules après l'édition. Ceci permet de minimiser les risques de coupures non spécifiques (figure M1).



**Figure M1 : La méthode d'édition Crispr/Cas9.** A) La Cas9 crée une cassure de l'ADN double brin guidée par un ARN guide qui s'hybride à la séquence cible, l'accroche est toujours effectuée par une séquence PAM « ngg ». B) Création du complexe ribonucléoprotéique contenant la Cas9 et l'ARN guide délivré aux cellules. C) Réparation de l'ADN par recombinaison homologue à partir d'une séquence matrice HDR dans le but de faire un knock-in ou une mutation ou NHEJ, introductions d'indels (insertions/délétions) conduisant à l'inactivation du gène.

La première étape consiste à **designer des ARN guides** pour cibler le gène d'intérêt. Pour ça, on peut utiliser les prédictions du site de l'université californienne de Sans Francisco <https://genome.ucsc.edu/> qui propose des ARN guides à partir de la version actuelle Hg38 du génome (onglet Génomes/ Human Hg38). Après avoir écrit le nom du gène d'intérêt dans la barre de recherche on peut obtenir beaucoup d'informations sur ce gène, notamment ses coordonnées. Plus bas sur cette page, dans l'onglet « genes and gene predictions » il faut activer la fonction « CRISPR targets » et rafraichir la page. On peut ensuite zoomer sur un exon, de préférence le premier ou le deuxième, afin d'éviter l'expression de formes raccourcies de la protéine. Un code couleur permet de déterminer la spécificité de coupure permise par chaque ARN guide proposé selon 5 programmes de prédictions. On peut cliquer sur ces cases colorées afin d'obtenir la



séquence et la spécificité de chaque ARN guide. L'objectif est d'avoir un ARN guide très spécifique de la région ciblée afin d'éviter la mutation de gènes non spécifiques appelés « off-targets ». Il est important de vérifier que les off-targets ne sont pas situés dans des exons de gènes importants en vue de l'analyse ultérieure. S'il y a un doute, il faudra alors vérifier l'intégrité de ces gènes par PCR et par séquençage une fois les lignées établies (figure M2). Il est utile de designer deux ARN guides pour chaque gène à cibler afin de maximiser les chances d'édition. On peut aussi vérifier l'efficacité des ARN guides sur d'autres programmes comme celui proposé par IDT-DNA <https://eu.idtdna.com/> dans l'onglet Tools/CRISPR genome editing. Une fois le design des ARN guide effectué, il faut se procurer la Cas9 endonucléase, et les sgRNA commercialisés par IDT-DNA. Le sgRNA est un fragment d'ARN qui comporte la partie designée (crRNA : 20 nucléotides + 3 pour la séquence PAM) et une partie designée par la compagnie : trRNA, qui permet au fragment d'être fixé à la Cas9.



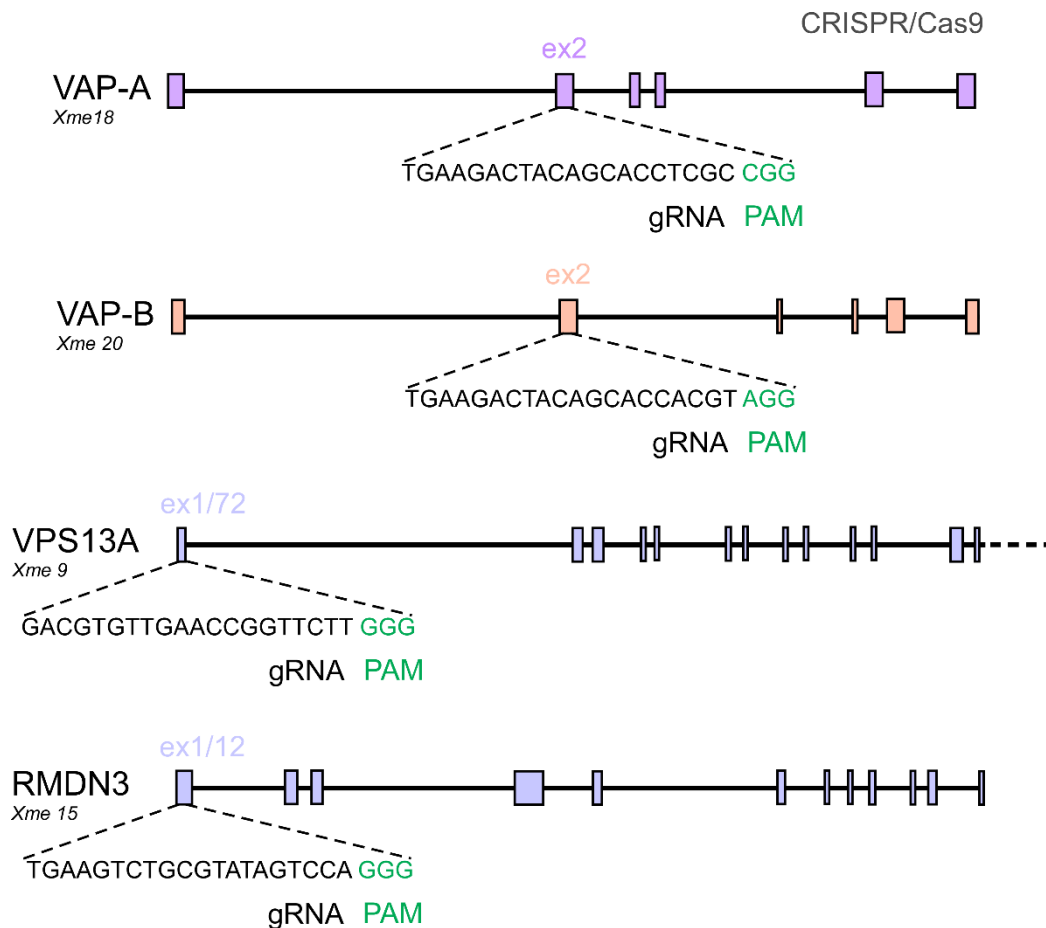
**B**

MIT Guide Specificity Score: 72  
 Position: chr18:9931896-9931918  
 Band: 18p11.22  
 Genomic Size: 23  
 Strand: -  
[View Data for this feature \(hg38/Human\)](#)

Guide Sequence	GGCCTCACACAGTACGGCG			
Protospacer Adjacent Motif (PAM)	AGG			
MIT Guide Specificity Score	72			
Efficiency: Doench et al. 2016 Score	96% (68)			
Efficiency: Moreno-Mateos (In-vitro) Score	57% (48)			
Efficiency: Doench et al 2014 Score	45			
Bae et al. Out-of-Frame Score	82			
Number of potential off-targets	0 mismatches: 0 off-targets	1 mismatches: 1 off-targets	2 mismatches: 2 off-targets	3 mismatches: 8 off-targets
	4 mismatches: 41 off-targets			
Potential Off-targets	Mismatched nucleobides	CFD Score	Locus	Position
	.....A...A...A...A CGG	0.530	intergenic CALCOO2-SUMO2P17	chr17:48867729 (-)
	..AT.C.....G.....GGG	0.271	intron PDE9A	chr21:42696275 (-)
	A...A..G...C.....AGG	0.228	intron SKI	chr1:2259195 (-)
	C.....C.....A...A. GGG	0.174	intergenic RPS-1059L7.1/PMPEA1-MIR4532	chr20:52877218 (-)
	.....TA... TGG	0.173	exon VAPB	chr20:58419297 (-)
	..AT.....CAG	0.150	intron IN5C	chr11:15222562 (-)
	.....T...A...TT. TGG	0.127	intron MYO18A	chr17:29113089 (-)
	....C.G...G.G.....GGG	0.119	intergenic AIG1P1-RICTOR	chr5:39074095 (-)
	..T.....T.C.A AGG	0.094	intergenic CTCF-RLTPR	chr18:67543023 (-)
	.....A...G.T...T GGG	0.087	intron LRIG3	chr12:58880040 (-)
	.....T.....C.....C AGG	0.085	intergenic RP4-669L17.10-WBP1LP7	chr1:393479 (-)

**Figure M2 : Choix des ARN guides. Exemple de VAP-A** A) ARN guides proposés pour cibler l'exon 2 de VAP-A, le code couleur représente la spécificité (vert>jaune>rouge>noir). B) Page de l'ARN guide, séquence. Cet ARN guide est situé sur le brin négatif de l'ADN, il faudra donc considérer la séquence réverse complémentaire. Spécificité selon différents algorithmes et liste des cibles non spécifiques. Ici on peut voir que cet ARN guide peut cibler aussi VAP-B avec deux mismatch pour l'hybridation, pour cette étude ce n'était pas problématique car nous souhaitions initialement éteindre VAP-A et VAP-B. Dans un autre contexte, il faut choisir un ARN guide qui n'a pas de cible non spécifique dans des exons avec moins de 4 mismatches.

Les séquences 5'-3' des crRNA utilisés pour cette étude sont les suivantes : VAP-A : TGAAGACTACAGCACCTCGC; VAP-B : TGAAGACTACAGCACCACGTAGG; VPS13A : GACGTGTTGAACCGTTCTTGGG; et PTPIP51: TGAAGTCTGC GTATAGTCCAGGG (figure M3).



**Figure M3 : ARN guides utilisés pour cette étude, afin d'effectuer les KO de VAP-A, VAP-B, VPS13A et PTPIP51 (RMDN3)**

La seconde étape est la **préparation et la transfection du complexe RNP**. 1,2 µL d'un sgRNA (1 µM) et 1,7 µL de la Cas9 HiFi (62 µM) sont mélangés par des aspirations dans un volume final de 5 µL complété par du PBS. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, 2 µL d'« électroporation enhancer », une solution proposée par IDT-DNA sont ajoutés au mélange. La totalité de cette préparation (7µL) est ajoutée à 1 million de cellules ayant été reprises dans 100 µL de la solution Lonza V pour une électroporation avec le programme AMAXA X01 (le programme doit être adapté en fonction du type cellulaire, ici il s'agit de RPE1 : des cellules épithéliales

rétiniennes immortalisées humaines qui sont génétiquement stables et qui ne présentent pas de phénotypes transformés. Elles sont couramment utilisées pour étudier le trafic et la dynamique des membranes intracellulaires). Si on veut faire un knock-in ou une mutation ponctuelle, c'est à cet instant que la séquence HDR est introduite dans le mélange, il existe des outils pour le design de cette séquence <https://eu.idtdna.com/pages/tools/alt-r-crispr-hdr-design-tool>. Les cellules sont ensuite suspendues dans du milieu de culture et 48 heures après la transfection elles sont triées dans des boîtes 96 puits. Par dilution limite, onensemence une cellule par puit afin d'isoler des clones. Le reste des cellules est gardé en culture, congelé et une partie est utilisée pour mesurer le taux d'édition.

La troisième étape est **la mesure du taux d'édition**. Après extraction de l'ADN génomique des cellules grâce au kit « DNA blood and tissues » de Qiagen, la région d'intérêt du gène cible est amplifiée par PCR à l'aide d'amorces spécifiques. Il faut donc designer une paire d'amorce afin d'amplifier une région d'environ 800 paires de bases autour du site d'hybridation de l'ARN guide. Pour avoir cette séquence, on copie/colle la séquence de l'ARN guide choisie (dans le sens 5'-3', si l'ARN guide est situé sur le brin - de l'ADN, on peut immédiatement changer la séquence pour obtenir le reverse complément) dans l'encart BLAT search genome sur <https://genome.ucsc.edu/> dans l'onglet Tools/Blat. Après avoir cliqué sur Submit et choisi le « detail » en première ligne, on copie/colle la séquence d'ADN génomique obtenue à nouveau sur BLAT, on répète cette opération 5 fois jusqu'à obtenir un fragment d'environ 800/1000 paires de bases (figure M4). L'amplification d'un gène à partir d'ADN génomique peut être délicate, il est conseillé d'utiliser une polymérase de haute-fidélité et de veiller à respecter les règles suivantes lors du design des amorces : 18 à 22 bases, taux de GC compris entre 40 et 60%, pas de structures secondaires, d'homodimérisation ou d'hétérodimérisation entre les deux amorces, maximum 4 répétitions de bases, une attache GC en 3', pas plus de 3 GC dans les 5 premières bases en 3'. Il est utile de vérifier que cette amorce est bien spécifique de la région que l'on veut amplifier grâce au programme BLAT. Sur <https://eu.idtdna.com/> dans l'onglet Tools/Oligoanalyser tool, toutes ces informations sont disponibles. Il est utile de vérifier sur un gel d'agarose la présence d'une seule bande à la

taille souhaitée après la PCR. Une fois les conditions de PCR optimisées, il faut purifier le fragment d'ADN obtenu grâce au kit « PCR clean up » de Macherey nagel puis séquencer le fragment. Pour ça, une autre PCR est réalisée en utilisant une amorce de séquençage. La quantification du taux d'édition se fait par le programme TIDE (Tracking of Indels by Decomposition <http://shinyapps.datacurators.nl/tide/>) par comparaison des chromatogrammes de séquençage d'un ADN contrôle provenant de cellules WT et de l'ADN des cellules éditées. Le logiciel décompose les données de séquençage au site de fixation de l'ARN guide et quantifie les mésappariements pour estimer le taux de coupure. Attention, les séquences à comparer doivent commencer à la même base, de ce fait il faut couper les chromatogrammes (figure M5). Dans le cas d'un knock-in ou d'une mutation ponctuelle, la quantification se fait via Tider <http://shinyapps.datacurators.nl/tider/> qui fonctionne sur le même principe mais requiert le chromatogramme du gène à introduire ou l'ADN contenant la mutation d'intérêt.

## BLAT Search Genome

Genome:  Search all

Human

CGCCG GTACTGTGTG AGGCC

## Genomic chr18 :

## BLAT Search Results

Go back to [chr18:9931802-9932161](#) on the Genome Browser.

Custom track name:

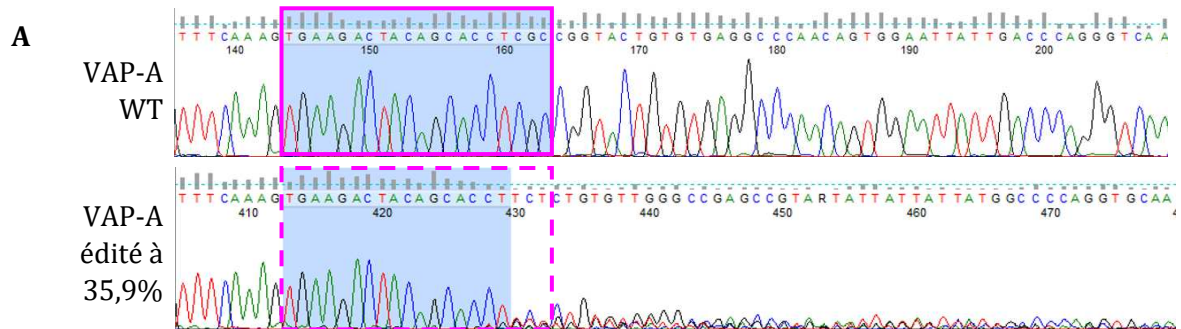
Custom track description:

ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHROM	STRAND	START	END	SPAN
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	220	1	220	220	100.0%	chr18	+	9931799	9932018	220
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	147	10	164	220	97.5%	chr15	-	89201571	89201725	155
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	53	66	132	220	89.6%	chr20	+	58418265	58418331	67
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	22	65	87	220	100.0%	chr14	-	86918575	86918598	24
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	22	189	212	220	87.0%	chr18	+	51397629	51397651	23
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	22	189	212	220	87.0%	chr16	+	68392244	68392266	23

```

gcataataaa cacttaacaa atatgtgaat gaatgaatgg attgaatgaa 9931348
tgaacaaaca aaattgaggt gaagcaaaag cactgatgtc atagggtgta 9931398
GGGTCTTCAG ATGTAGAGAT TTTTGCAGTT GGCCTAGTAA AATGAACTTG 9931448
AAGATTGACA CTGTTTTGCA GACAAC TGGG AAATTCTGTT ATTTTCAGCA 9931498
ACGTATTAAC AACATACTGT AAAAATACAG TTGTAAAGTT CATAGATCCA 9931548
AAGTTTCATA GTACTTTTTT GATAGAAATC ATACATGTTT ATGGTAGAAA 9931598
TTTTGTGAAA TACAGGGAAT GAAGAAGAAA ATATGACTTG TTTTAAAGTC 9931648
TGCCACCTCG AGAAAGGCAG TGTTAGTAGC CATTGGGAT ATTTATGCCT 9931698
ACAAATGTCA GCACTTAATT AAAATTGAGG TTATATATT TCAGTTTTGA 9931748
ATCCTTCGTT GTTGAGAATC CAATTAATTTT TGTGTTTCTC TTTAATTTTT 9931798
AAACTTTACA GGCCCTTCA CAGATGTAGT CACTACAAAT CTAAATTGCG 9931848
GAAATCCATC GGATAGAAAA GTGTGTTTCA AAGTGAAGAC TACAGCACCT 9931898
CGCCGGTACT GTGTGAGGCC CAACAGTGGG ATTATTGACC CAGGGTCAAC 9931948
TGTGACTGTT TCAGGTAGCA AATCATGTTT TGAATTTATG TACATTTGAA 9931998
TTTTGACCTT TTATGATTAT GTTTTTGTTT AATAAGGTTT CATCTGGAGG 9932048
GAGGGAAATA ATTCTTATAT TATTCTGGTT TTGCCTTTAA AGATGTCTTG 9932098
TTACAGTACT CTGCAAGCTG TTTCAGAAAA TTTCTCACTC ATCTTCTGTG 9932148
TAGGGAGTGT GGTCAGTTTA TAAGAAATTA TTGTCAATTA CAAACTTTAG 9932198
TCTTTATTTT TACAGCTAAC CACTACCTTC TCTGCCTTTG TTATTTTATC 9932248
TTTGAAAAAT TATATCATTT TTCTGATGGG TCATTCTCCT TCAGATCATG 9932298
ATCATATTAC ACATTGCATG CAGCTATAGA AGTGTCATAA TTCTTTTGCT 9932348
TAAAAAGGTG CAATGCCACT TTTTGCCTA CTGTGTCAA TCAGATGAGT 9932398
CTTTATGCCT TTCATTGTAA atgtcaacag tgtcctgtgt gtgaaaactt 9932448
tatttttatt ttactactct cttatgtggt tacttgtcaa agaagtatgc 9932498
ttgcatata tggattactt
  
```

**Figure M4** : Blat des deux ARN guides sélectionnés 5'-3' (encadrés en rose (1) et en rouge (2)) pour obtenir la région à amplifier par PCR à l'aide d'amorces « sens » et « antisens » (en orange). Après purification cette PCR sera à nouveau amplifiée pour le séquençage à l'aide d'une amorce « sens » uniquement (soulignée en vert).



**B**

**TIDE: Tracking of Indels by DEcomposition**

Upload Data:  
Title plot (e.g. sample name)  
VAPA 2b

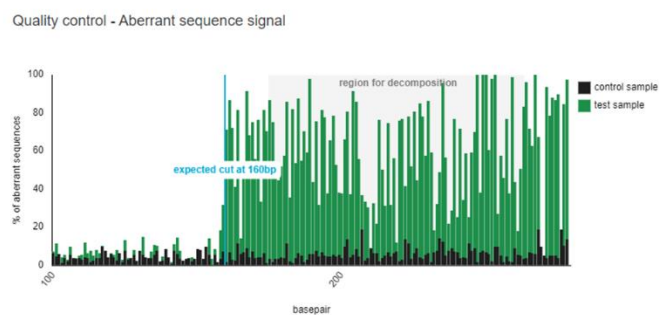
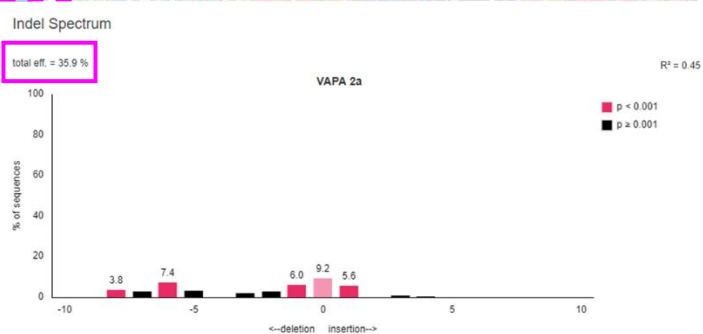
Nuclease ①  
SpCas9

Guide sequence  
Paste your guide sequence (from '5' to '3'). Do not include the PAM.  
TGAAGACTACAGCACCTCGC

Control Sample Chromatogram (.ab1)  
Browse... -1\_A07\_001.ab1 VAP-A WT

Test Sample Chromatogram (.ab1)  
Browse... 3-\_G08\_014.ab1 VAP-A édité (1)

Load Example Data



**TIDE: Tracking of Indels by DEcomposition**

Upload Data:  
Title plot (e.g. sample name)  
VAPA 2a

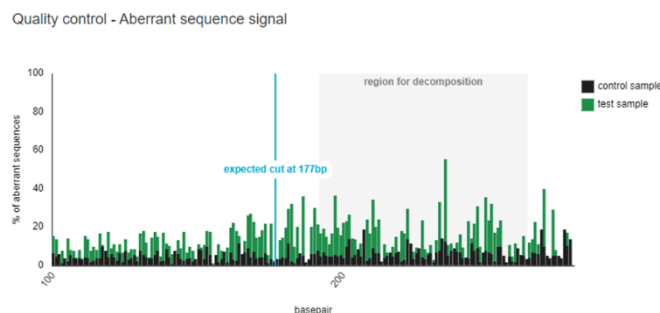
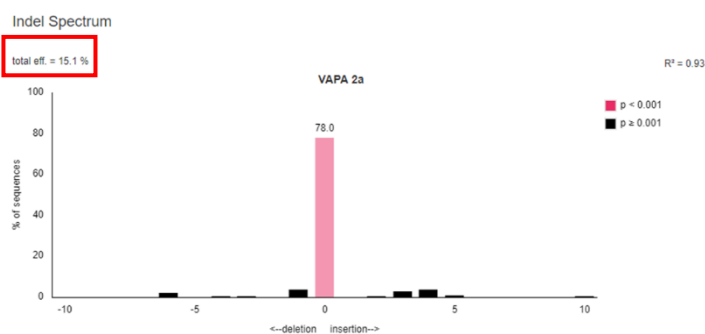
Nuclease ①  
SpCas9

Guide sequence  
Paste your guide sequence (from '5' to '3'). Do not include the PAM.  
CGCCGGTACTGTGTGAGGCC

Control Sample Chromatogram (.ab1)  
Browse... -1\_A07\_001.ab1 VAP-A WT

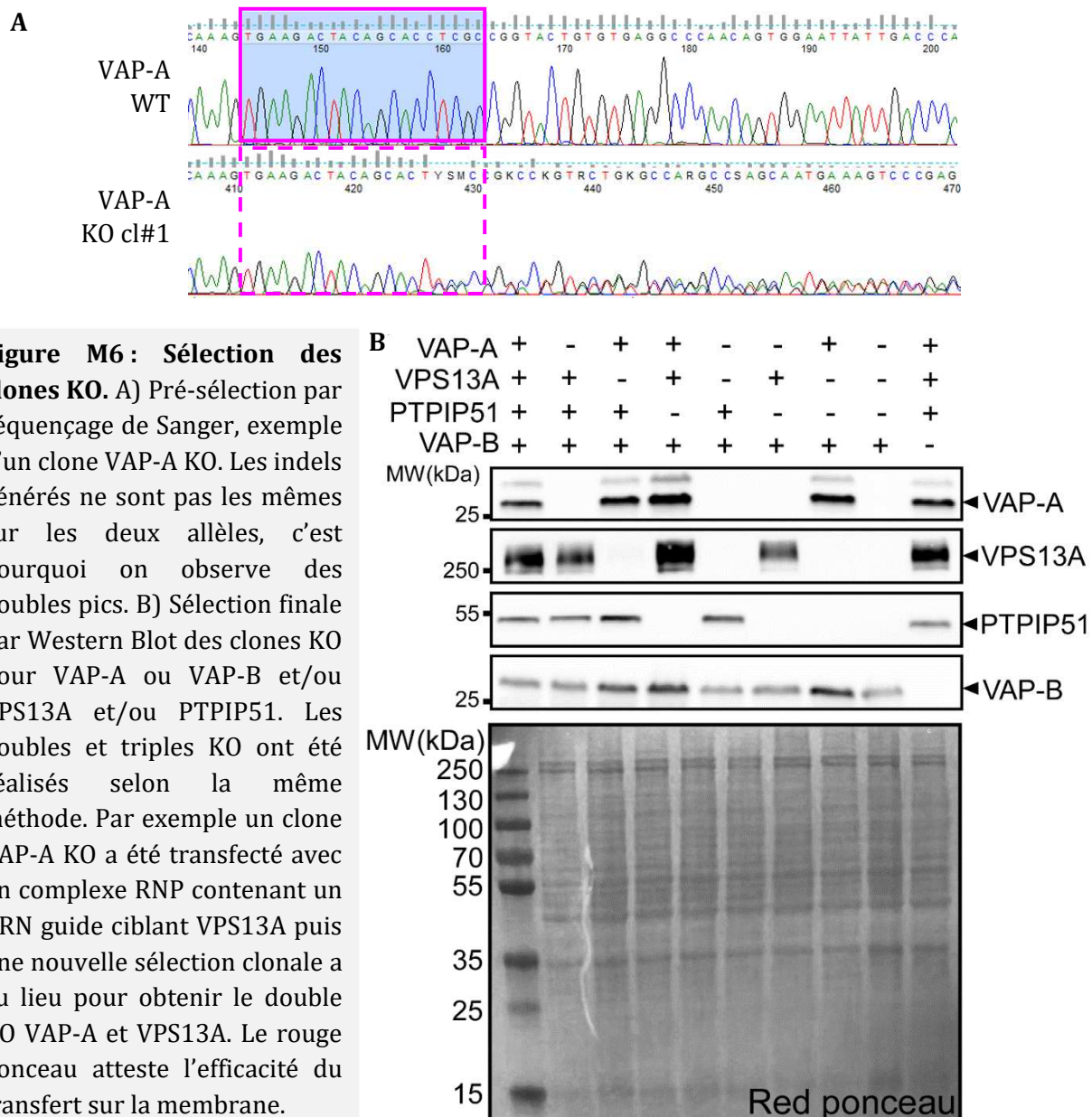
Test Sample Chromatogram (.ab1)  
Browse... 2-\_F08\_012.ab1 VAP-A édité (2)

Load Example Data



**Figure M5 : Quantification du taux d'édition par TIDE.** A) Séquençage de Sanger, apparition de doubles pics signifiant des mésappariements générés par Crispr à partir du site de fixation de l'ARN guide (encadrés rose). B) Comparaison des produits de PCR contrôles (WT) avec ceux édité par la Cas9, guidée par les deux ARN guides différents. Le premier a été sélectionné (35,9% d'édition contre 15,1% pour l'ARN guide 2).

La dernière étape est **la sélection clonale**. Les clones transfectés avec le complexe RNP contenant l'ARN guide le plus efficace sont gardés en culture et une fois que ces clones ont suffisamment poussés, ils sont passés dans des plaques 12 puits. Un suivi de chaque clone est assuré, lorsque le puits est confluent  $\frac{1}{4}$  des cellules sont passées dans une plaque 6 puits pour le maintien de la culture et le reste est utilisé pour extraire l'ADN génomique et réaliser une PCR selon les mêmes conditions que précédemment, puis un séquençage. Si une mutation est présente dans la séquence, l'expression protéique du clone est analysée par un Western Blot. Nous avons utilisé des anticorps primaires de lapin anti VAP-A, VAP-B, VPS13A et PTPIP51 provenant de Atlas



**Figure M6 : Sélection des clones KO.** A) Pré-sélection par séquençage de Sanger, exemple d'un clone VAP-A KO. Les indels générés ne sont pas les mêmes sur les deux allèles, c'est pourquoi on observe des doubles pics. B) Sélection finale par Western Blot des clones KO pour VAP-A ou VAP-B et/ou VPS13A et/ou PTPIP51. Les doubles et triples KO ont été réalisés selon la même méthode. Par exemple un clone VAP-A KO a été transfecté avec un complexe RNP contenant un ARN guide ciblant VPS13A puis une nouvelle sélection clonale a eu lieu pour obtenir le double KO VAP-A et VPS13A. Le rouge ponceau atteste l'efficacité du transfert sur la membrane.



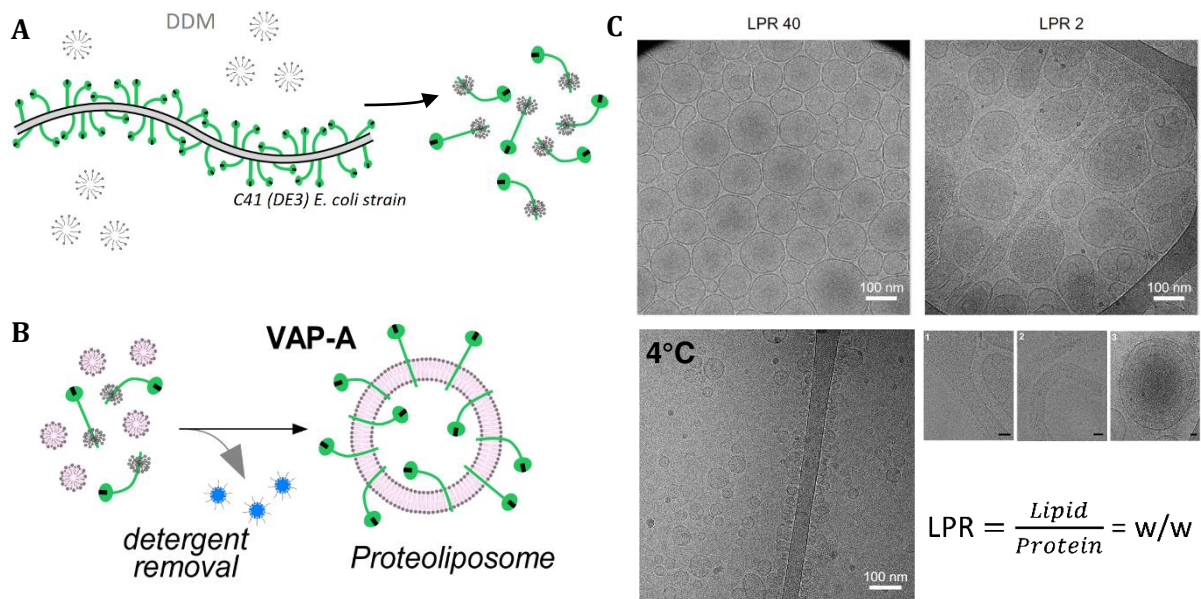
antibodies et des anticorps secondaires Jackson ImmunoResearch Labs conjugués à une HRP (figure M6).

## 2. Manipulation biochimique d'une protéine transmembranaire comme VAP-A :

### **(a) Comment reconstituer une protéine transmembranaire ?**

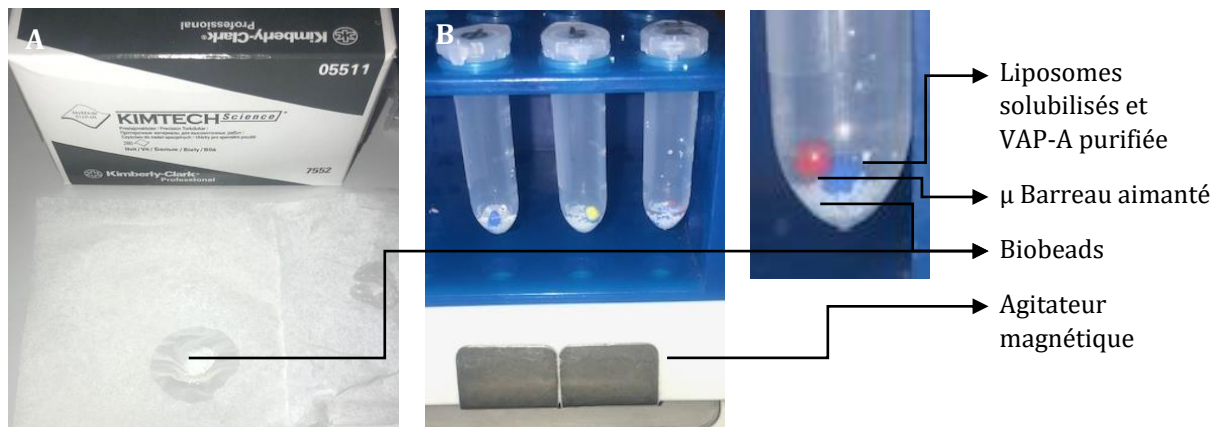
Au cours de ma thèse j'ai eu la chance d'être accueillie par Daniel Levy et son équipe à l'Institut Curie afin d'apprendre la méthode de reconstitution de VAP-A entière et de découvrir la cryo-microscopie électronique. Jusqu'à présent VAP était purifiée et utilisée sans son TMD, celui-ci était remplacé par un tag Histidine pour permettre sa liaison à des lipides Nickel : les DGS-NTA(Ni) (dioleoyl-glycero-succinyl (nickel salt)) incorporés dans les liposomes. Afin d'étudier la structure du complexe OSBP/VAP en cryo-EM, l'équipe de Daniel Lévy a utilisé la protéine entière, insérée dans la membrane d'un liposome par son hélice transmembranaire C-terminale. La purification d'une protéine avec un TMD nécessite l'utilisation d'un détergeant doux, ici le DDM (Dodecyl maltoside), afin de solubiliser les membranes des bactéries dans lesquelles l'expression est induite. Le caractère amphiphile des détergents permet la protection du TMD hydrophobe. VAP-A purifiée avec son TMD inséré dans des micelles de DDM est ensuite reconstituée dans des membranes lipidiques (figure M7). La reconstitution nécessite la présence de liposomes solubilisés eux aussi par un détergeant. On utilise couramment le Triton X100 à une concentration qui permet la solubilisation des liposomes (4 mM). Cette concentration dépend de la cmc (concentration micellaire critique) propre à chaque détergeant (pour le Triton X100, elle est de 0.22-0.24 mM) ; c'est une concentration seuil au-delà de laquelle le détergeant s'organise en micelles. Il est important de ne pas solubiliser les liposomes avec un excès de détergeant puisque celui-ci devra être retiré ensuite à l'aide de Biobeads lors de la reconstitution. Le ratio détergeant/lipides doit être de 2.5 poids/poids. Lorsque l'on met VAP-A enchâssée dans des micelles de DDM en présence de liposomes solubilisés par du Triton X100 sous agitation, une solution contenant des micelles lipides-protéine-détergeant et lipides-détergeant est obtenue. L'ajout de Biobeads sous agitation permet de retirer progressivement les détergents (Rigaud and Lévy, 1995), ce qui entraîne la formation de vésicules (à bicouche lipidique) dans lesquelles le

TMD de VAP-A est incorporé (figure M8). La concentration protéique, le temps et la température d'incubation des Biobeads sont des paramètres qui permettent de jouer sur la taille et la forme des protéoliposomes. En effet, la température a un impact sur la vitesse d'absorption des détergents par les Biobeads (Rigaud, 1997). Ainsi, les reconstitutions faites à 4°C produisent des protéoliposomes plus petits, d'environ 30nm de diamètre tandis que ceux réalisés à température ambiante ont un diamètre de ~200nm. La concentration protéique est un moyen de jouer sur le LPR (lipid/protein ratio). Plus ce ratio est diminué, plus les membranes des liposomes sont chargées en protéines, ceci peut donner lieu à des oignons, des liposomes déformés ou même cassés, que l'on appelle rubans. Des reconstitutions faites à faibles LPR sont utilisées pour créer des MCSs *in vitro* et visualiser les protéines en cryo-EM tandis que des hauts LPR sont utilisés pour effectuer des expériences fonctionnelles comme des analyses de transfert de lipides (figure M7 et



**Figure M7 : Purification et reconstitution de VAP-A.** A) Purification de VAP-A entière par solubilisation des membranes des bactéries *Escherichia Coli* C41(DE3) qui expriment la protéine d'intérêt. Le TMD de VAP-A est stabilisé par des micelles de détergeant (DDM). B) Reconstitution de VAP-A dans des liposomes solubilisés par du Triton X100, tous les détergents sont éliminés par les Biobeads (bleues). C) La concentration protéique et la température influence la forme des protéoliposomes obtenus. A température ambiante, des fortes concentrations protéiques donnent lieu à 1) des vésicules déformés 2) des rubans et 3) des oignons. A 4°C les protéoliposomes obtenus sont plus petits. Un LPR de 2 w/w (poids/poids) correspond à un LPR de 70 mol/mol et 40 w/w correspond à un LPR de 1400 mol/mol (de la Mora et al., 2021).

M8). Il est possible de reconstituer des protéines à TMD dans des liposomes géants (GUVs) visibles en microscopie optique mais ceci n'a pas été réalisé avec VAP-A (Dezi et al., 2013).

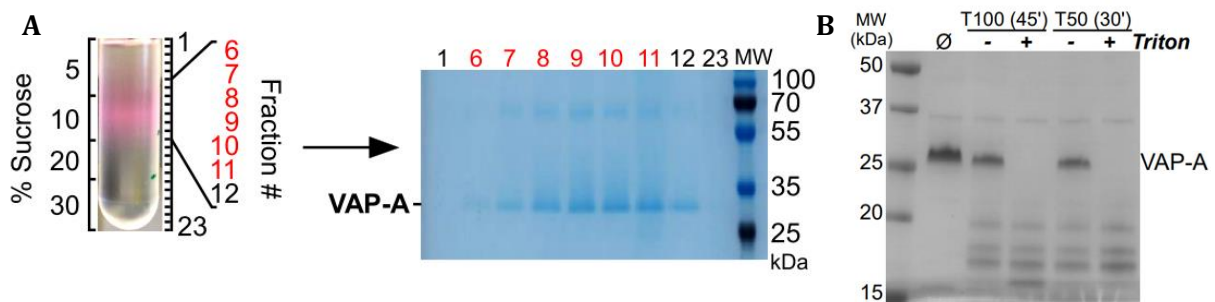


**Figure M8 : Reconstitution de VAP-A, protocole expérimental.** Les liposomes solubilisés et VAP-A entière purifiée en DDM sont placés aux concentrations souhaitées 15 minutes sous agitation rotative lente dans des tubes eppendorfs de 2 mL. Les détergents sont retirés grâce à 3 additions successives de Biobeads préalablement essorées dans un papier absorbant avant d'être pesées (A). Lors de la première addition le ratio Biobeads/détergent est de 10 poids/poids pour 2 heures d'agitation lente, la deuxième fois on ajoute à nouveau des Biobeads à un ratio de 20 pour 1 heure. Pour finir, une troisième addition est faite, à un ratio de 20, pour 1 heure supplémentaire. L'utilisation de mini barreaux aimantés est nécessaire pour mélanger ces petits volumes (50  $\mu$ L) (B). Les Biobeads sont toujours prélevées avec des pointes coupées pour éviter toute détérioration. A la fin de l'expérience, la reconstitution finale est récupérée à l'aide d'une P200 afin d'exclure les Biobeads.

### (b) Comment vérifier la qualité de la reconstitution ?

En dehors de la visualisation des protéoliposomes par cryoEM, deux méthodes sont utilisées pour vérifier la qualité d'une reconstitution. La première est la flottaison : les protéoliposomes sont mélangés à une solution dense en sucrose dans un tube puis superposés par des coussins de sucrose de densités décroissantes. Les protéoliposomes sont retrouvés dans les fractions supérieures après ultracentrifugation (ils peuvent être visualisés par un imageur s'ils contiennent un lipide fluorescent). Les fractions sont ensuite analysées sur gel SDS-PAGE afin de vérifier la présence de protéines dans les fractions supérieures. La deuxième façon de vérifier la qualité de la reconstitution est la protéolyse. Au vu du caractère aléatoire de la reconstitution, on considère que 50% des protéines reconstituées sont orientées à l'extérieur du liposome, l'autre

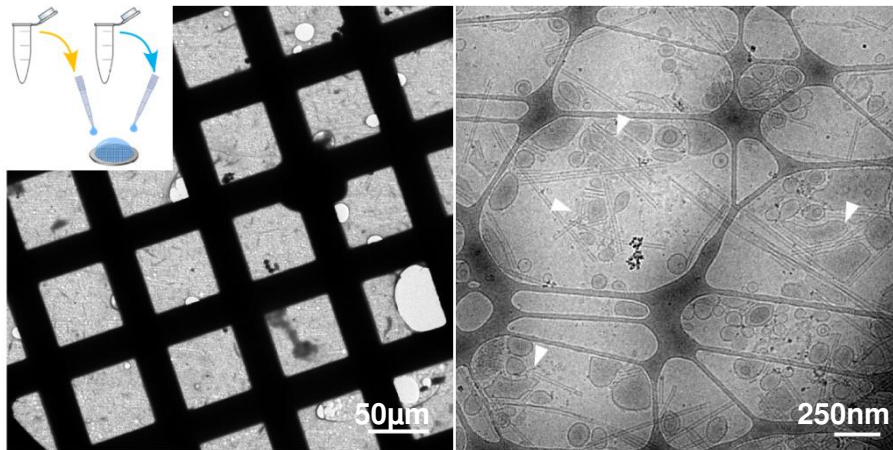
moitié est donc protégée de la lyse par la trypsine à l'intérieur du liposome (figure M9) (de la Mora et al., 2021).



**Figure M9 : Méthodes pour vérifier la qualité d'une reconstitution.** A) Flottaison : les protéoliposomes sont placés sous un gradient de sucrose, après centrifugation on retrouve les lipides (marqués en rose) dans les mêmes fractions que la protéine identifiée sur gel. B) Protéolyse par la trypsine de protéoliposomes. 50% de VAP-A est lysé au cours de cette expérience réalisée à deux concentrations différentes de trypsine et deux temps d'incubation. L'ajout de Triton montre qu'en solubilisant les liposomes, la fraction initialement protégée de VAP-A devient accessible à la trypsine (de la Mora et al., 2021).

### (c) Comment générer des MCSs *in vitro* ?

L'objectif de notre équipe et de celle de Daniel Lévy était de reconstituer des MCSs *in vitro* entre la partie N-terminale d'OSBP (N-PH-FFAT) et VAP-A afin d'analyser la structure de ce complexe. Le mélange de protéoliposomes VAP-A et de tubes N-PH-FFAT dans un eppendorf avant la congélation conduit à une agrégation massive du matériel. C'est pourquoi les protéoliposomes VAP-A et les tubes N-PH-FFAT sont ajoutés directement sur des grilles cryo-EM afin de créer des MCSs. Les tubes sont constitués de 80% de Galactosyl( $\beta$ )Ceramide, 10% de PC, 5% de PS et 5% de PI4P pour permettre la liaison de PH-FFAT. Une goutte de 2  $\mu$ L de tubes N-PH-FFAT (0.15 mg/ml) est déposée sur la grille, 1 minute plus tard une goutte de 2  $\mu$ L de protéoliposomes (0.05 mg/ml, LPR 70 mol/mol) est ajoutée. Après 30 secondes d'incubation la grille est congelée par le vitrobot et est observée en cryo-EM (figure M10). Les images de contacts ont permis par moyennage de sous volumes d'obtenir des modèles 3D de VAP-A et de N-PH-FFAT entre des membranes opposées, qui révèlent l'organisation du complexe (figures 15 et 75) (de la Mora et al., 2021).

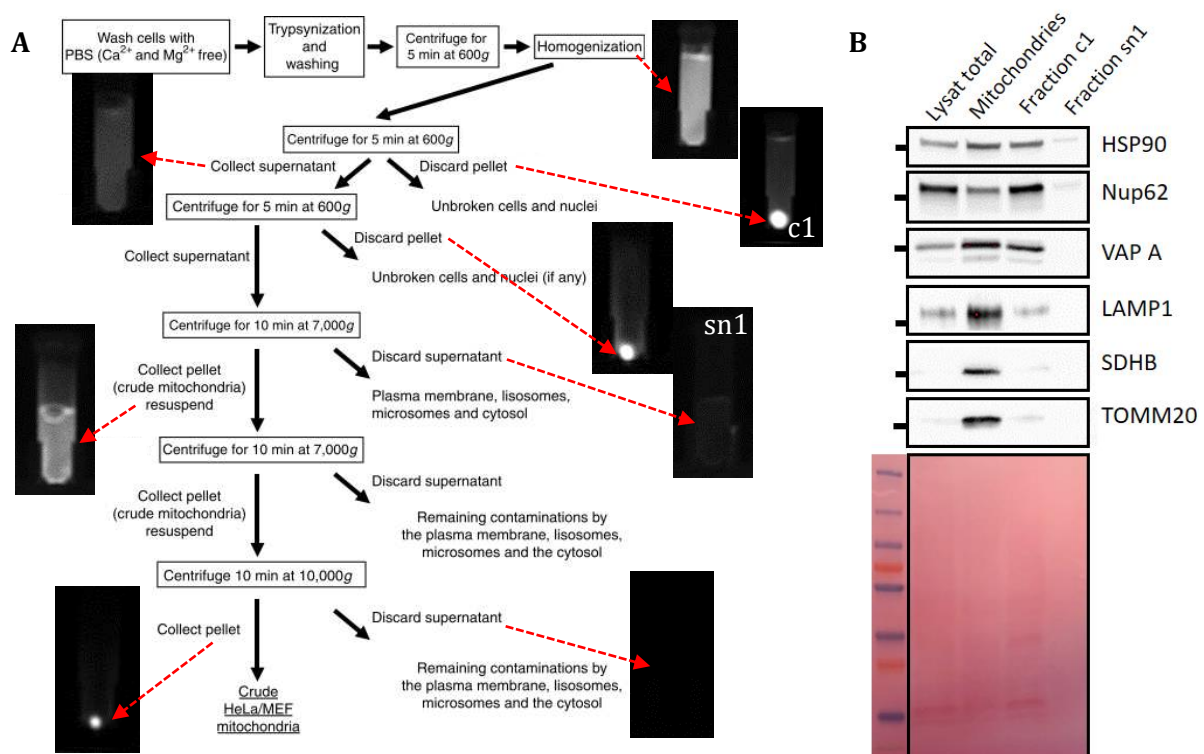


**Figure M10 :** formation de contacts (flèches blanches) entre les protéoliposomes VAP-A et les tubes NPH-FFAT sur une grille de microscopie juste avant la congélation de l'échantillon.

### 3. Purification des mitochondries

Les mitochondries et les MAM (mitochondria-associated membrane) ont été isolés en suivant la méthode proposée par Wieckowski en 2009 basée sur une série de centrifugations à des vitesses croissantes qui séparent les organelles en fonction de leur vitesse de sédimentation (Wieckowski et al., 2009). La mise au point du protocole au laboratoire a été faite à partir de 4 millions de RPE1 marquées au mitotracker Red. La fluorescence a permis de suivre les mitochondries au cours de la purification, en imageant les tubes à chaque étape au Fusion FX imager (Vilber). Après le marquage, les cellules sont décollées de la boîte par action de la trypsine puis lavées au PBS, le culot de cellules est ensuite resuspendu dans du PBS supplémenté en CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM et MgCl<sub>2</sub> 1,06 mM. Après une centrifugation de 5 minutes à 600xg à 4°C, les cellules sont reprises dans 2 mL d'un tampon de lyse, contenant 225 mM de Mannitol, 75 mM de succrose, 0,1 mM EDTA et 30 mM Tris HCl à pH 7.4. Ce mélange est ensuite disposé dans un Homogénéisateur de Dounce préalablement refroidit. La lyse des cellules se fait par ~500 passages de piston dans le Dounce en chambre froide. En déposant une goutte de ce lysat entre lame et lamelle, on peut voir au microscope que 80% des cellules sont lysées. Ce lysat peut ensuite être centrifugé 5 minutes à 600xg à 4°C pour éliminer les cellules non lysées et les noyaux. Cette étape est répétée une deuxième fois. En éliminant les débris, on élimine également une quantité non négligeable de mitochondries que l'on peut voir grâce au signal fluorescent du mitotracker. Le surnageant (sn) qui comprend les mitochondries, est ensuite centrifugé 10 minutes à 7000xg à 4°C. Le culot obtenu est suspendu dans 1 mL de tampon (225 mM Mannitol, 75 mM succrose et 30 mM Tris HCl à pH

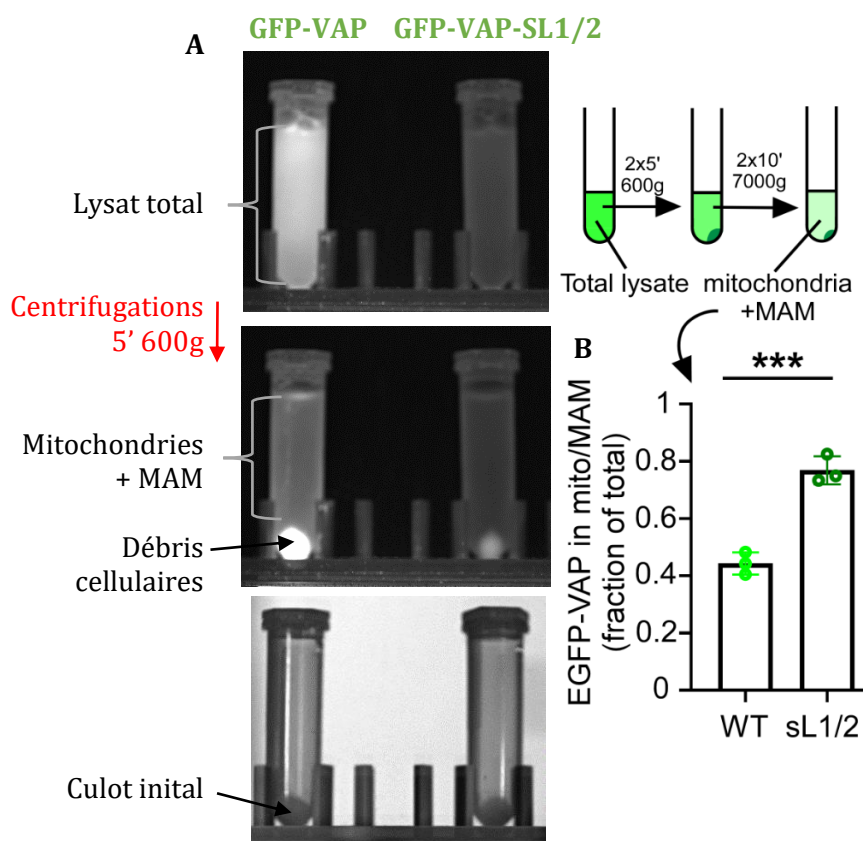
7.4). Une nouvelle étape de centrifugation de 10 minutes à 7000xg à 4°C est réalisée, le sn1 contient les contaminations restantes de membranes plasmiques, de microsomes, de lysosomes et le cytosol. Le culot qui contient les mitochondries et les MAM est rincé par 2 mL de tampon froid avant une dernière centrifugation de 10 minutes à 10000xg à 4°C. Ce culot est repris dans du tampon RIPA afin d'analyser les protéines en Western Blot. Le tampon RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) est composé de 50 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0,1% SDS (Sodium dodecyl sulfate), 2 mM EDTA (éthylènediaminetétraacétique), 50mM NaF, 0,5% Sodium deoxycholate, 1% NP-40 et un cocktail d'inhibiteurs de protéases complete de ROCHE). Différentes fractions sont prélevées à plusieurs étapes du procédé de purification pour cette analyse. Le lysat total, la fraction mitochondriale finale, le premier culot (c1) qui comporte des noyaux et des cellules non lysées et la fraction sn1. Ces fractions sont déposées sur gel avant un Western Blot permettant de révéler la présence de protéines présentes dans différentes organelles. Par exemple, HSP90 et VAP-A sont des marqueurs typiques du RE, Nup62 du noyau,



**Figure M11 :** A) Protocole de purification des mitochondries (Wieckowski et al., 2009), suivi des étapes de purification par imagerie de la fluorescence du mitotracker red. B) Western Blot révélant la présence de protéines présentes dans différents compartiments cellulaires. Le rouge ponceau permet de connaître la quantité de protéine déposée dans chaque puit.

Lamp1 des lysosomes et enfin SDHB et TOMM20 sont des protéines mitochondriales. On peut voir un net enrichissement des protéines mitochondriales dans la fraction finale, cependant cette purification est contaminée par la présence de lysosomes. On constate aussi la présence des protéines du RE, indiquant que cette purification comporte les MAM (figure M11).

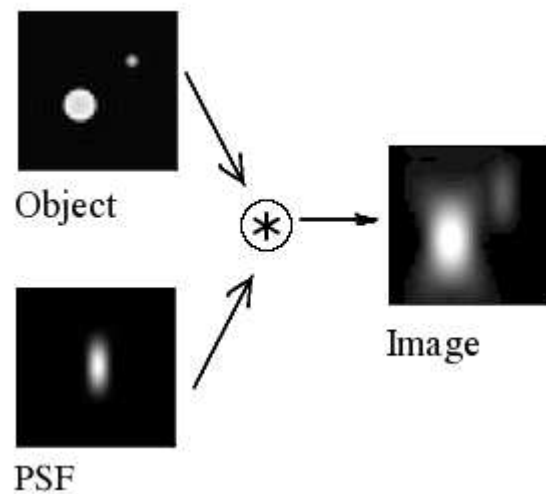
Cette méthode de purification nous a permis de quantifier la fraction de GFP-VAP-A engagée dans les MCSs ER/Mitochondrie. En réalisant cet essai à partir de cellules RPE1 VAP-A KO, stables GFP-VAP-A ou GFP-VAP-A sL1/2 nous avons pu déterminer la fluorescence initiale, dans le lysat total, correspondant à la totalité de GFP-VAP-A exprimée. Dans la fraction mitochondriale comprenant les MAM, on retrouve un pourcentage de fluorescence qui correspond à la portion de GFP-VAP-A impliquée dans les MCSs (figure M12).



**Figure M12 :** Quantification de la fraction de GFP-VAP-A impliquée dans les MAM. A) Fluorescence de la GFP imagée au Fusion à différentes étapes de purification. Pour comparer les deux conditions les culots initiaux doivent contenir le même nombre de cellules. B) Ratio entre la fluorescence de la GFP dans le lysat total et la fluorescence de la fraction mitochondriale. GFP-VAP-A sL1/2 est plus engagée dans ces MCSs.

#### 4. Microscopie de super résolution STED (Stimulated Emission Depletion)

La microscopie à fluorescence est une technique utilisée depuis des décennies pour observer des protéines de manière spécifique. Toutefois cette technique présente une limite dans la distinction de deux objets proches imposée par la diffraction de la lumière. Cette diffraction, aussi appelée PSF (Point Spread Function ou fonction d'étalement du point) implique que l'image d'un objet est plus « étalée » que l'objet réel (figure M12). Cette limitation avoisine les 200 nm en résolution latérale pour un microscope confocal. Le STED est une approche de super résolution permettant d'aller au-delà de cette limite. Stefan W. Hell, Eric Betzig et William Merner ont été récompensés par un prix Nobel de chimie en 2014 pour la découverte de cette technique qui permet donc de dissocier deux protéines distantes de 20 à 30 nm. L'étude des MCSs se prête à l'utilisation d'approches de super résolution car la distance qui sépare deux membranes au sein de ces sites est d'environ 30 nm. En imagerie confocale on ne pourrait donc pas distinguer ces deux membranes, qui apparaîtraient superposées.



**Figure M12 : L'image d'un objet est déformée par rapport à l'objet réel, cet effet est dû à la diffraction : PSF (ici orientée en z).**

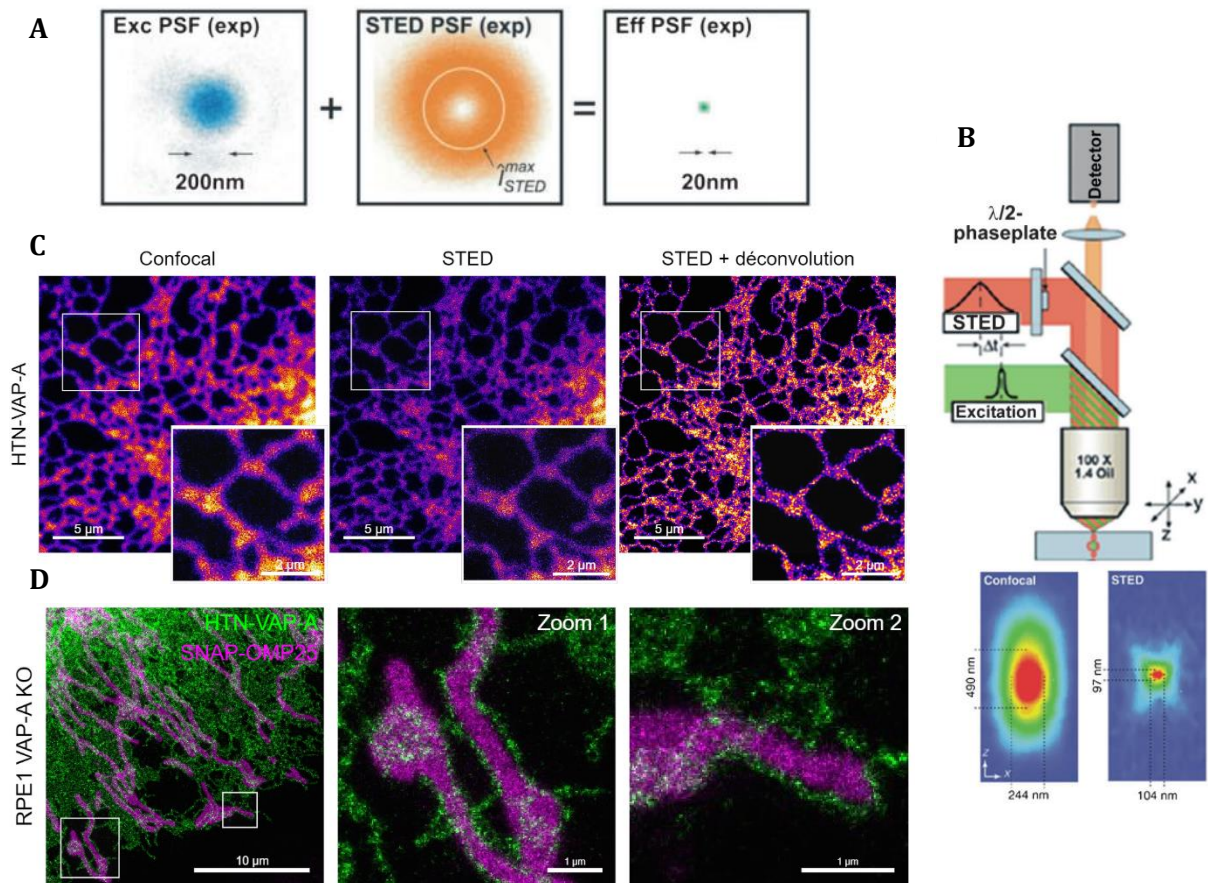
microscope confocal. Le STED est une approche de super résolution permettant d'aller au-delà de cette limite. Stefan W. Hell, Eric Betzig et William Merner ont été récompensés par un prix Nobel de chimie en 2014 pour la découverte de cette technique qui permet donc de dissocier deux protéines distantes de 20 à 30 nm. L'étude des MCSs se prête à l'utilisation d'approches de super résolution car la distance qui sépare deux membranes au sein de ces sites est d'environ 30 nm. En imagerie confocale on ne pourrait donc pas distinguer ces deux membranes, qui apparaîtraient superposées.

La microscopie STED est une microscopie de fluorescence dont l'illumination est restreinte par un laser de déplétion afin de dépasser les limites de résolution imposées par la diffraction. Cette limite est supprimée par émission stimulée en renvoyant les fluorophores à leur état fondamental sans émettre de fluorescence. Cette déplétion en forme de donut autour de la PSF permet de restreindre la zone d'excitation (figure M13)(Möckl et al., 2014).

La préparation des échantillons dédiés à l'imagerie STED est particulière. En effet cette méthode nécessite l'utilisation de fluorophores spécifiques (stables, résistants à la déplétion).



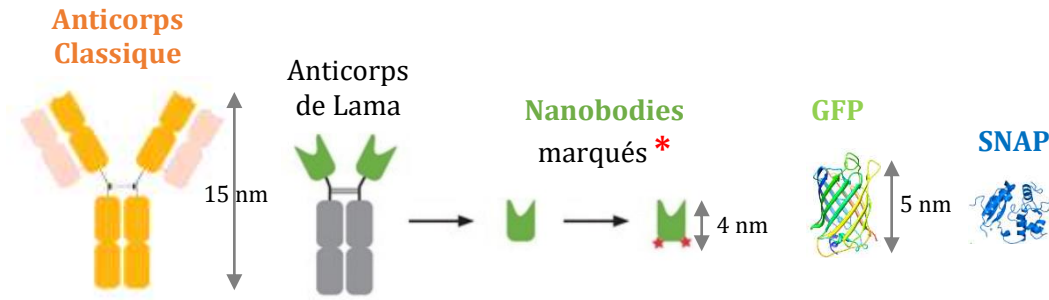
Afin de marquer les protéines d'intérêt, une méthode consiste donc à les sur-exprimer en fusion avec des SNAP-tag ou HaloTag (HTN). Les protéines SNAP-tag ou HTN ne sont pas intrinsèquement fluorescentes comme la GFP, mais se lient de manière covalente à des fluorophores commerciaux compatibles avec le STED. L'autre intérêt de ces tags est qu'ils sont plus petits que la GFP, ce qui est avantageux dans des approches de superrésolution. Il est aussi possible de sur-exprimer la protéine d'intérêt liée à une GFP et d'utiliser un anticorps anti-GFP comprenant un fluorophore compatible STED mais ce système n'est pas idéal si l'on cherche à limiter les distances entre protéines d'intérêt et marqueurs. Enfin, les protéines endogènes peuvent



**Figure M13 : Principe du STED.** A) Profils mesurés du faisceau d'excitation (à gauche), du faisceau STED (au centre) et de la PSF effective (à droite). B) Organisation du microscope confocal équipé d'un laser de déplétion pour le STED. PSF obtenue par une bille fluorescente de 48 nm en confocal (à gauche) et en STED (à droite). C) Gain apporté par la méthode STED et la déconvolution (un traitement d'image additionnel) en comparaison avec une image confocale classique sur un marquage de VAP-A au RE. Le RE est l'un des organelles les plus difficiles à imager avec ses tubules d'environ 20 nm de diamètre. D) La résolution atteinte permet la distinction de la membrane du RE (vert) et de la membrane de la mitochondrie (magenta).

être visualisées à l'aide d'immunomarquages classiques, les anticorps secondaires devront cependant être liés à des fluorophores compatibles au STED. Dans ce cas, utiliser des nanobodies (provenant d'anticorps de Lama) améliore grandement la résolution car ils sont plus petits que les anticorps classiques, ce qui réduit l'espace entre le fluorophore et la protéine d'intérêt (figure M14).

La méthode de fixation des échantillons nécessite aussi une optimisation. Nous utilisons généralement un fixateur chimique composé d'un mélange de 4% paraformaldéhyde (PFA) et



**Figure M14 : Echelle de taille des différentes méthodes utilisées pour le marquage de protéines.**

0.1% Glutaraldéhyde (GA) pendant 10 minutes à température ambiante, cependant des nouvelles méthodes de fixation sont en cours d'étude actuellement au laboratoire. Notamment, la cryo-fixation permettrait une meilleure conservation des structures (Laporte et al., 2022). Lors de l'immunomarquage, les cellules sont d'abord perméabilisées 30 minutes par un mélange saponine 0,05%, BSA 0,2% dans du PBS, puis incubées 2 heures avec les anticorps primaires, comme le GFP-Booster\_ATTO647N (Chromotek). Ce nanobody équipé d'un fluorochrome ne nécessite pas d'incubation avec un secondaire, cependant il faut réaliser 3 lavages avec le tampon de perméabilisation avant de monter la lamelle afin de réduire le bruit de fond. Dans le cas où les protéines d'intérêt sont sur-exprimées, les marquages sont fait sur les cellules vivantes, avec des ligands commerciaux Janélia fluor 646 HaloTag Ligand (Promega) à 0,2  $\mu\text{M}$  ou le SNAP-Cell-TMR-Star (New England Biolab) à 3  $\mu\text{M}$ , incubés 30 minutes à 37°C dans le milieu nutritif des cellules. Ce milieu est ensuite remplacé par du milieu neuf après 3 lavages pour une nouvelle incubation de 30 minute avant la fixation. Les cellules cultivées sur des coverslips en verre 0,17 mm (#1.5) sont ensuite montées sur des lames dans le milieu de montage Aberrior (GmbH). Il faut attendre une nuit pour que le milieu polymérise, les échantillons sont ensuite imagés avec l'objectif 100X/1.4 à huile. Il est possible de cultiver les cellules sur des boîtes de type Ibidi avec un fond en verre en vue de faire du Live-STED afin d'analyser la dynamique des organelles (Schroeder et al., 2019).

La déplétion implique une diminution du nombre de photons détectés, ceci nécessite une forte puissance d'excitation pouvant conduire à du photoblanchiment. Cet effet est d'ailleurs le

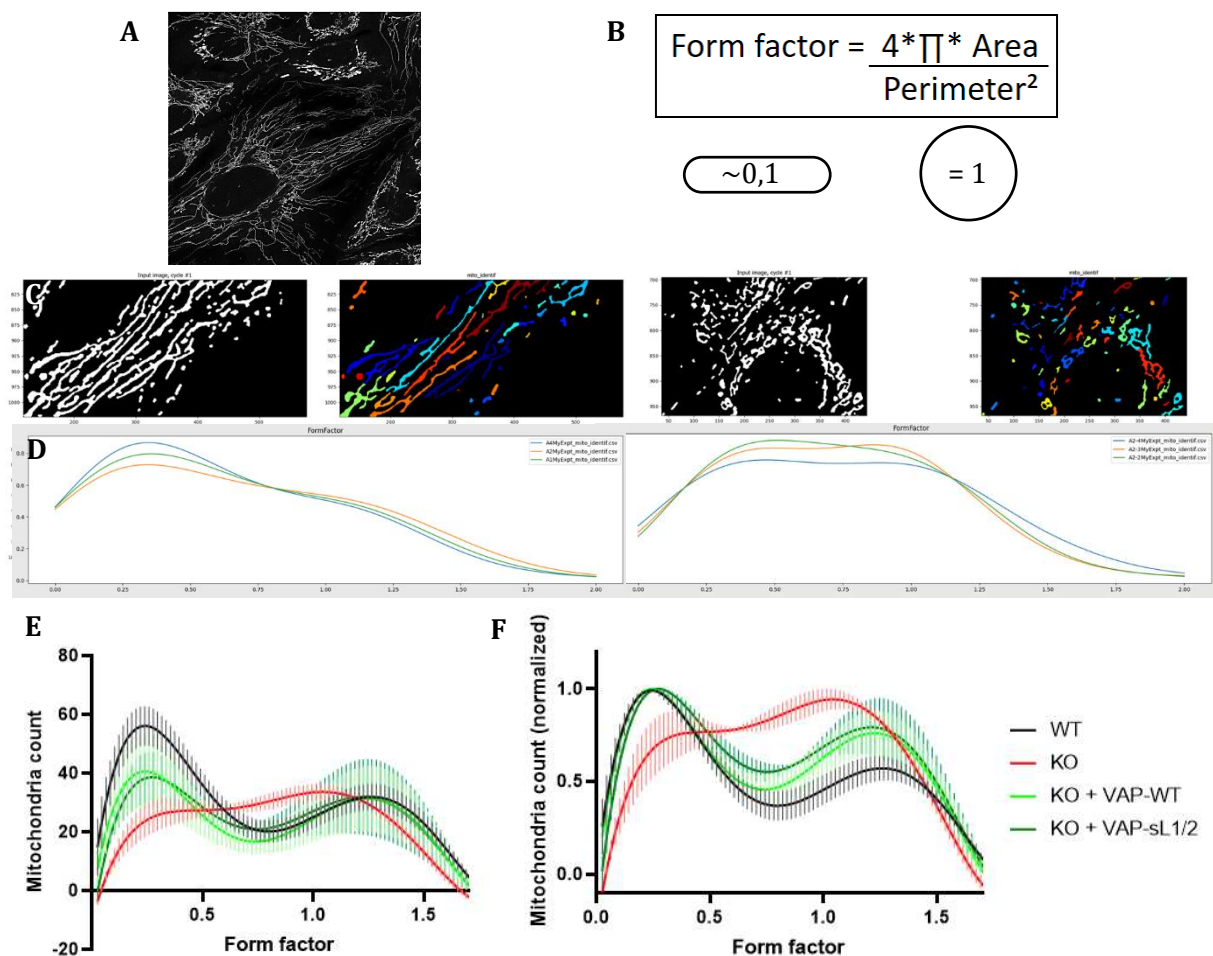
défi majeur auquel il faut faire face lorsque l'on utilise le STED. Cependant l'équipe de Christian Eggeling a récemment réalisé des images de STED avec des sondes solvatochromiques dérivées du Nile Red réputées instables en imagerie (Carravilla et al., 2021). Les conditions d'acquisition doivent donc être optimisées pour chaque fluorophore, j'ai été accompagnée par Sophie Abélanet, ingénieure de la plateforme d'imagerie, pour déterminer ces paramètres.

Le microscope Leica sp8 STED 3X que nous utilisons au laboratoire est équipé d'un module FALCON permettant de faire du Tau-STED. Cette méthode combine le signal optique du STED et mesure la demi-vie de chaque fluorophore. Elle permet une haute résolution à des intensités de laser très faibles afin de diminuer les risques de photobleaching (Alvarez et al., 2021). Le STED est, parmi toutes les méthodes de super-résolution, une des plus simples à mettre en place car la préparation des échantillons est la même que pour le confocal. Couplée à la microscopie d'expansion, actuellement en cours d'optimisation au laboratoire, nous espérons que le STED nous permettra d'ici peu d'approcher des résolutions de l'ordre de 10 nm.

## 5. Quantification systématique de la forme des mitochondries

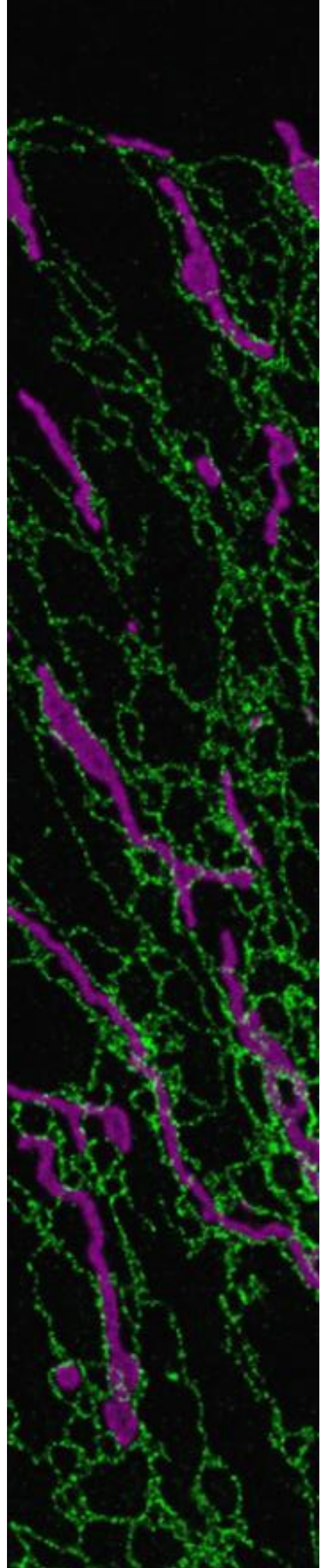
Nous avons observé que le KO de VAP-A entraîne un changement dramatique de la morphologie des mitochondries. Dès lors, nous voulions quantifier cet effet de manière systématique à partir d'images réalisées en microscopie confocale. Célia Watine, Vanille Lejal et Sébastien Goffart, un groupe d'étudiants en bio-informatique à Polytech Nice-Sophia nous ont aidé dans le cadre de leur projet « biologie intégrative » à résoudre cette problématique. Ils ont créé une chaîne d'automatisation de traitement d'image appelée « pipeline » à l'aide du logiciel Cellprofiler. Les premières étapes de ce pipeline corrigent les images et homogénéisent l'éclairage et le contraste. L'image nettoyée est ensuite binarisée, grâce à un seuil d'intensité déterminé pour l'ensemble de l'image qui permet d'attribuer à chaque pixel une valeur de 0 si la valeur d'intensité du pixel est en dessous du seuil ou 1 si elle est au-dessus. De cette image binaire, le module « IdentityPrimaryObject » permet l'identification des objets, ici les mitochondries marquée grâce au Mitotracker. L'identification des mitochondries est faite sur l'ensemble de l'image sans

distinguer à quelle cellule elles appartiennent. Ce module est flexible, on peut ajuster visuellement le paramètre de l'encadrement des tailles d'objets « acceptés » comme étant des mitochondries afin d'exclure des objets aberrants. Une fois que ces paramètres sont satisfaisants il faut en extraire les caractéristiques de forme. Pour cela les étudiants ont utilisé un autre module : « MeasureObjectSizeShape », qui permet de déterminer 30 indicateurs quantitatifs rendant compte de la forme de l'objet analysé. Tous les résultats sont disponibles à la fin du procédé d'analyse dans un fichier Excel mais l'indicateur que nous avons retenu est le « form factor ». Ce paramètre géométrique dépend de l'aire et du périmètre de l'objet analysé. Une valeur de 1 correspond à un disque parfait. L'avantage du form factor est qu'il permet une interprétation rapide en réalisant une distribution des valeurs obtenues. Ces valeurs sont ensuite rangées dans un histogramme des effectifs où le nombre de mitochondries pour chaque valeur de form factor est normalisé par le nombre de mitochondrie dans l'image. Ces données sont à nouveau normalisées par l'effectif moyen maximal obtenu pour la condition contrôle.



**Figure M15 :** A) Projection maximale d'une image confocale utilisée pour la quantification comportant plusieurs z-stacks, marquage mitochondrial sur des RPE1 WT. B) Formule mathématique de l'indicateur de forme utilisé pour la quantification. Schéma d'interprétation du « form factor ». Un disque parfait correspond à une valeur de 1 ; plus l'ellipse s'allonge plus la valeur se rapproche de 0. C) Coloration des mitochondries identifiées par le module « IdentifyPrimaryObject ». Les couleurs permettent la distinction de deux objets proches. Mitochondries de cellules WT à gauche et de cellules KO à droite. D) Interface de visualisation graphique des effectifs de mitochondries en fonction du form factor. A gauche, pour trois images contenant des mitochondries normales on obtient trois courbes avec un pic autour de 0.25 alors que pour des mitochondries de cellules KO (panel de droite) on a un deuxième pic qui apparaît pour des valeurs de form factor de 1, correspondant à des mitochondries rondes. E) Moyenne des données brutes de 3 expériences indépendantes, avec 5 images pour chaque condition soit ~9000 mitochondries analysées par condition. F) Normalisation de (E) par le nombre de mitochondries analysées et par la moyenne maximale de la condition contrôle.

# Résultats



## Partie D : Résultats

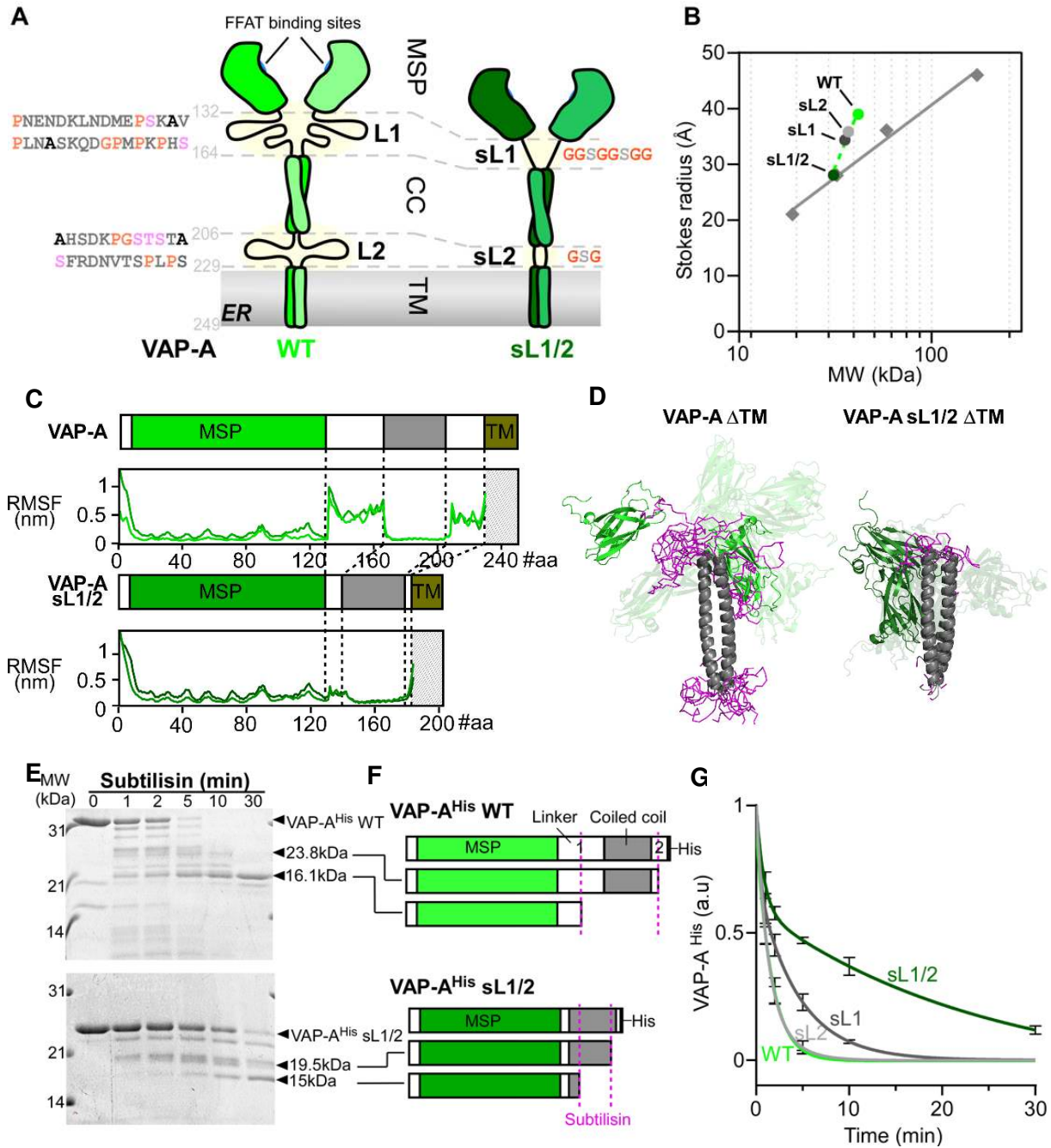
### 1. Quelles sont les propriétés des IDRs de VAP-A, *in vitro* et *in silico* ?

#### (a) Méthodes d'identification des régions non structurées de VAP-A

Notre premier objectif était d'obtenir des informations sur les propriétés des linkers de VAP-A, nous avons donc imaginé différents mutants pour lesquels nous avons supprimé ces linkers en les remplaçant par des courtes séquences GGSGGSGG (8 acides aminés pour le linker 1 ; sL1) et GSG (3 acides aminés pour le linker 2 ; sL2) (figure R1A). En analysant le comportement des linkers à l'aide de simulations de dynamique moléculaire menées par Romain Gautier, nous avons constaté qu'ils sont extrêmement mobiles et présentent une grande capacité de flexion (figure R1C et D). Considérant que les IDRs ont des dimensions hydrodynamiques plus grandes que les domaines globulaires, nous avons examiné l'influence des linkers sur la taille de VAP-A par gel filtration analytique. Pour simplifier l'analyse, nous avons utilisé des constructions de VAP-A avec un tag 6×His remplaçant le TMD C-terminal. Nous avons observé que les linkers ont un impact important sur la taille de la protéine, augmentant le rayon de Stokes jusqu'à ~1.1 nm (VAP-A<sup>His</sup> WT versus sL1/2). Les VAP-A<sup>His</sup> sL1 et sL2 montrent des tailles intermédiaires (figure R1B).

De plus, des expériences de protéolyse ménagée sur les constructions VAP-A<sup>His</sup> en utilisant de la subtilisine, qui clive préférentiellement les protéines au niveau de boucles flexibles, montrent que VAP-A<sup>His</sup> WT est rapidement digérée ( $t_{1/2}$  = 1,13 min), tandis que VAP-A<sup>His</sup> sL1/2 est beaucoup plus résistante ( $t_{1/2}$  = 16,9 min) (figure R1E). Comme déterminé par spectrométrie de masse, deux fragments majeurs dérivés de VAP-A<sup>His</sup> WT résultent du clivage dans les régions L1 et L2. En revanche, les clivages de VAP-A<sup>His</sup> sL1/2 se produisent dans la région du coiled-coil, ce qui est cohérent avec la protéolyse plus lente de cette construction (figure R1F et G). Nous avons également remarqué une plus grande sensibilité de VAP-A<sup>His</sup> sL2 à la subtilisine par rapport à sL1, probablement parce que le linker 1 est plus long que le linker 2, et donc une cible plus facile pour la protéase. Ensemble, ces données démontrent que les linkers de VAP-A sont des IDRs qui rendent la protéine flexible.

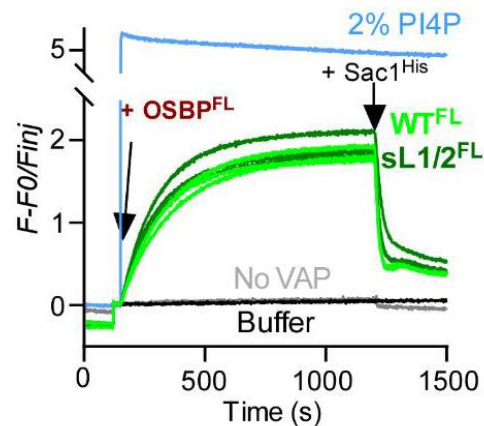
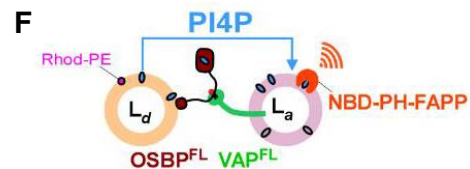
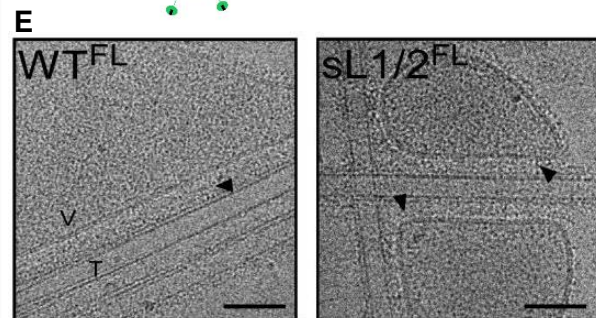
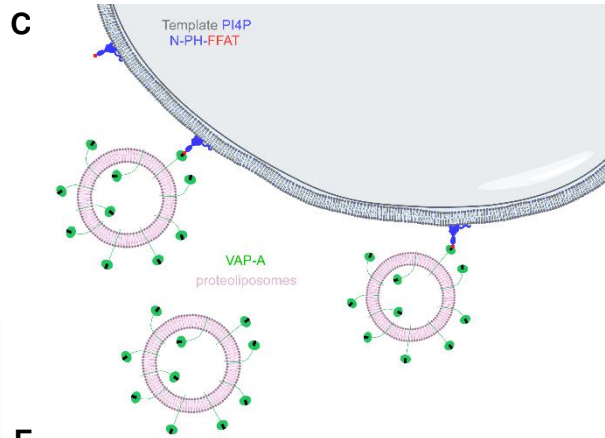
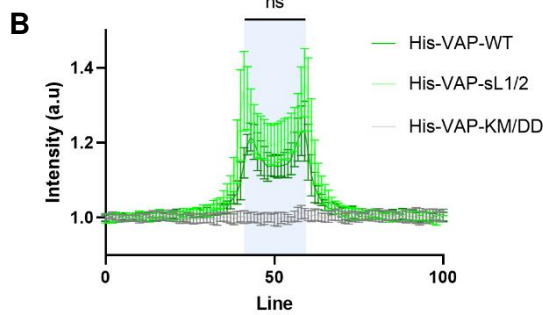
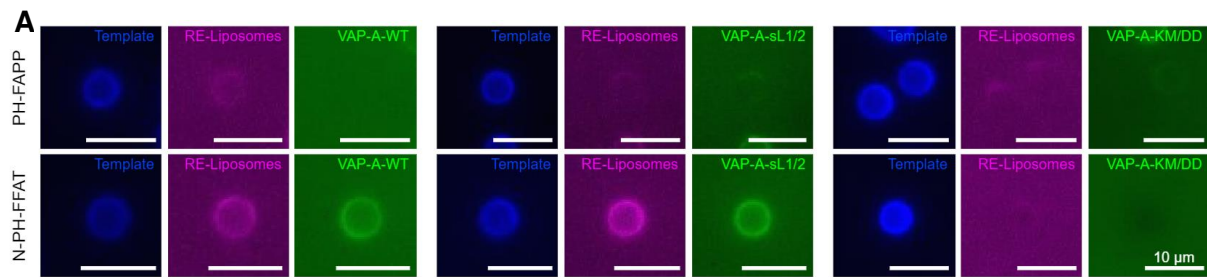




**Figure R1 : Caractérisation des IDRs de VAP-A.** A) Organisation des domaines de VAP-A et ses séquences IDRs L1 et L2. Construction VAP-A avec des linkers courts (sL1/2) utilisée pour cette étude. B) Gel filtration analytique des VAP-A<sup>His</sup> avec des linkers WT, sL1 ou sL2 ou sL1/2. C) RMSF calculée par simulation de dynamique moléculaire avec VAP-A sans son TMD. Les deux lignes représentent la RMSF des deux monomères engagés dans le dimère. Les régions linkers montrent une plus forte fluctuation. D) Snapshots de la simulation de dynamique moléculaire. E,F,G) Protéolyse ménagée par la subtilisine analysée sur gel SDS-PAGE avec un marquage Sypro-orange. Les flèches indiquent les principaux fragments retrouvés en spectrométrie de masse. VAP-A sL1/2 est plus résistante au clivage par la subtilisine, la fraction entière persiste au cours du temps. Le graphique représente la moyenne de 3 expériences indépendantes +/- SEM.

## **(b) Les linkers de VAP-A ne sont pas impliqués dans la liaison au FFAT**

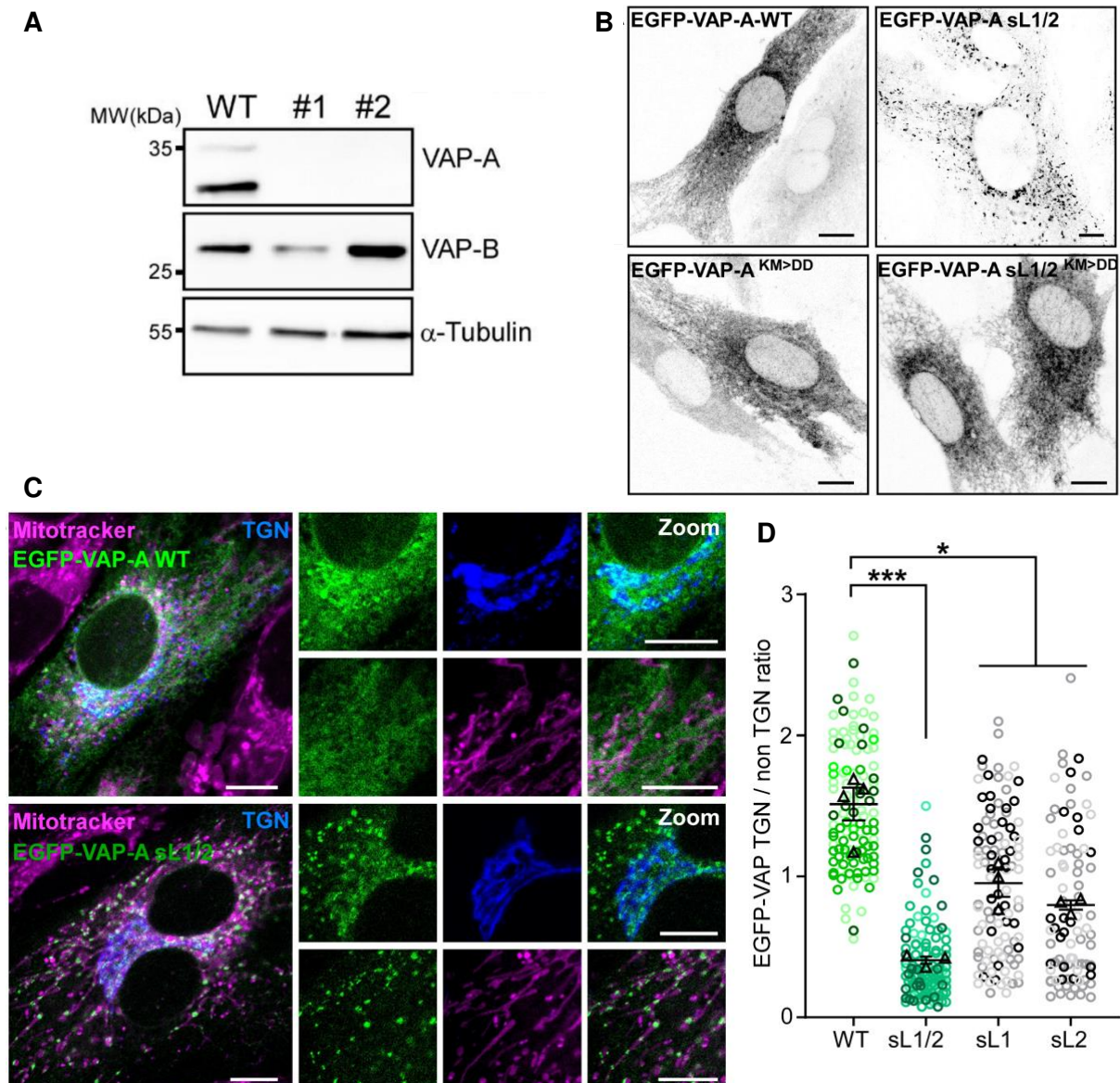
Avant de poursuivre cette étude, il était nécessaire de vérifier que l'élimination des linkers de VAP-A n'a pas d'impact sur sa liaison à ses partenaires. Pour cela nous avons réalisé des expériences de flottaison *in vitro* entre des liposomes contenant du PI4P afin de lier la protéine N-PH-FFAT purifiée et VAP-A<sup>His</sup> WT ou mutants, ces expériences sont présentées dans la figure supplémentaire 1 de l'article 3. Ici j'ai choisi de montrer ce même effet d'une autre façon : en microscopie optique, il est possible de visualiser et de quantifier des processus de liaison membranaire à la surface de « supertemplates ». Ces supertemplates, aussi appelés « *supported bilayers* » sont formés par la fusion de liposomes sur des billes de silice de taille calibrée (5 µm de diamètre), conduisant à l'enrobage de ces billes par au moins une bicouche lipidique (Mesmin et al., 2013). Dans notre cas, nous avons utilisé d'une part des supertemplates comprenant 2% de PI4P, afin de recruter N-PH-FFAT, et d'autre part des liposomes contenant VAP-A<sup>His</sup> (figure R2C). Tous les mutants de VAP-A<sup>His</sup> ont montré la même capacité que VAP-A<sup>His</sup> WT à lier N-PH-FFAT. Le domaine PH de FAPP2 (PH-FAPP) a été utilisée comme témoin négatif, cette protéine ne comporte pas de motif FFAT et ne peut donc pas recruter les liposomes VAP-A (figure R2A et B). De plus, en cryo-EM, Daniel Levy, Manuella Dezi et Aurélie Di Cicco, avec qui nous collaborons, ont observé qu'il est possible de reconstituer des MCSs entre des nanotubes N-PH-FFAT et des protéoliposomes VAP-A WT ou VAP-A sL1/2 (figure R2E). Nous avons également vérifié que la mutation des linkers de VAP-A n'impacte pas l'activité de son partenaire OSBP *in vitro* par une expérience de transfert de PI4P entre des protéoliposomes VAP-A WT ou sL1/2 et des liposomes PI4P/OSBP (figure R2F). Ces expériences nous ont permis de valider notre construction VAP-A sL1/2 comme mutant de flexibilité pour le reste de l'étude.



**Figure R2 :** A,C) Liposomes contenant de la rhodamide-PE (magenta) et des DGS-NTA(Ni) pour la fixation de VAP-A<sup>His</sup> en présence de supertemplates coâtés par des lipides ATTO390-DOPE (bleu) et du PI4P, mis en présence de PH-FAPP ou de N-PH-FFAT. B) Quantification de la liaison des liposomes VAP-A aux supertemplates, VAP-A WT<sup>His</sup> et VAP-A sL1/2<sup>His</sup> lient N-PH-FFAT, cette liaison est abolie par la mutation KM/DD. E) Images de cryo-EM de MCSs reconstitués *in vitro* entre des protéoliposomes VAP-A et des tubes de galactosylcerebroside contenant du PI4P et N-PH-FFAT (bar = 50 nm). F) Mesure de transfert de PI4P *in vitro* en temps réel par OSBP. La sonde PI4P marquée NBD-PH-FAPP (250 nM) est mixée avec les liposomes donneurs (L<sub>d</sub> : 250 μM de lipides contenant 4% de PI4P et 2% de Rhodamine-PE) et les liposomes accepteurs (L<sub>a</sub> : 250 μM de lipides contenant 150 nM de VAP-A reconstitué à LPR 1300 mol/mol et 2% de DGS-NTA(Ni)). A t=150s, 100nM d'OSBP est ajouté puis à t=1200s 100 nM de Sac1<sup>His</sup> afin d'hydrolyser le PI4P. La courbe bleue représente le signal pour une équilibration du PI4P entre L<sub>d</sub> et L<sub>a</sub>.

## 2. Quel est le rôle des linkers de VAP-A *in cellula* ?

Pour évaluer le rôle des linkers de VAP-A dans les cellules, nous avons d'abord établi des lignées cellulaires RPE1 knockout (KO) par CRISPR/Cas9 (voir Méthodes page 139) (figure R3A). L'objectif était d'éviter la formation d'hétérodimères entre la protéine VAP-A endogène et les constructions exprimées. Comme attendu, dans les cellules KO, EGFP-VAP-A WT décore l'ensemble du RE, avec une concentration visible dans des sous-domaines, qui peuvent correspondre à des MCSs avec d'autres organelles, y compris le TGN (figure R3B). En revanche, EGFP-VAP-A sL1/2 est enrichie dans de grandes structures ponctiformes dispersées dans le cytoplasme. Ces structures sont co-localisées avec un marqueur mitochondrial, ce qui suggère un recrutement massif de EGFP-VAP-A sL1/2 dans les MCSs RE/Mitochondrie, au détriment des MCSs RE/TGN (figure R3C et D). Cependant, lorsque EGFP-VAP-A sL1/2 est mutée pour empêcher sa liaison à un motif FFAT (mutation KM>DD), elle n'est plus limitée aux MCSs RE/mitochondries, mais est présente dans tout le réseau du RE, au même titre que EGFP-VAP-A KM>DD (figure R3B). Ceci suggère que la localisation de EGFP-VAP-A sL1/2 à proximité des mitochondries dépend de partenaires qui contiennent le motif FFAT. Des expériences de STED et de fractionnement cellulaire présentées dans la figure 2 de l'article 3 confirment ce résultat avec plus de précision. Ainsi, ces données suggèrent que la flexibilité de VAP-A fournie par ses linkers est nécessaire pour son engagement dans divers MCSs.



**Figure R3 :** A) Lignées VAP-A KO par Crispr/Cas9, Western Blot. B) Images confocale de cellules RPE1 KO pour VAP-A transfectées avec les constructions EGFP-VAP-A WT ou sL1/2 (en haut) et mutants de liaisons au FFAT KM>DD (en bas). C) Même expérience qu'en (B) avec des marqueurs du TGN (bleu) et des mitochondries (magenta), montrant la colocalisation de EGFP-VAP-A sL1/2 avec les mitochondries. D) Quantification de l'enrichissement du signal EGFP au TGN en fonction du mutant de VAP-A exprimé (un point correspond à une cellule analysée, moyenne de 3 expériences indépendantes).

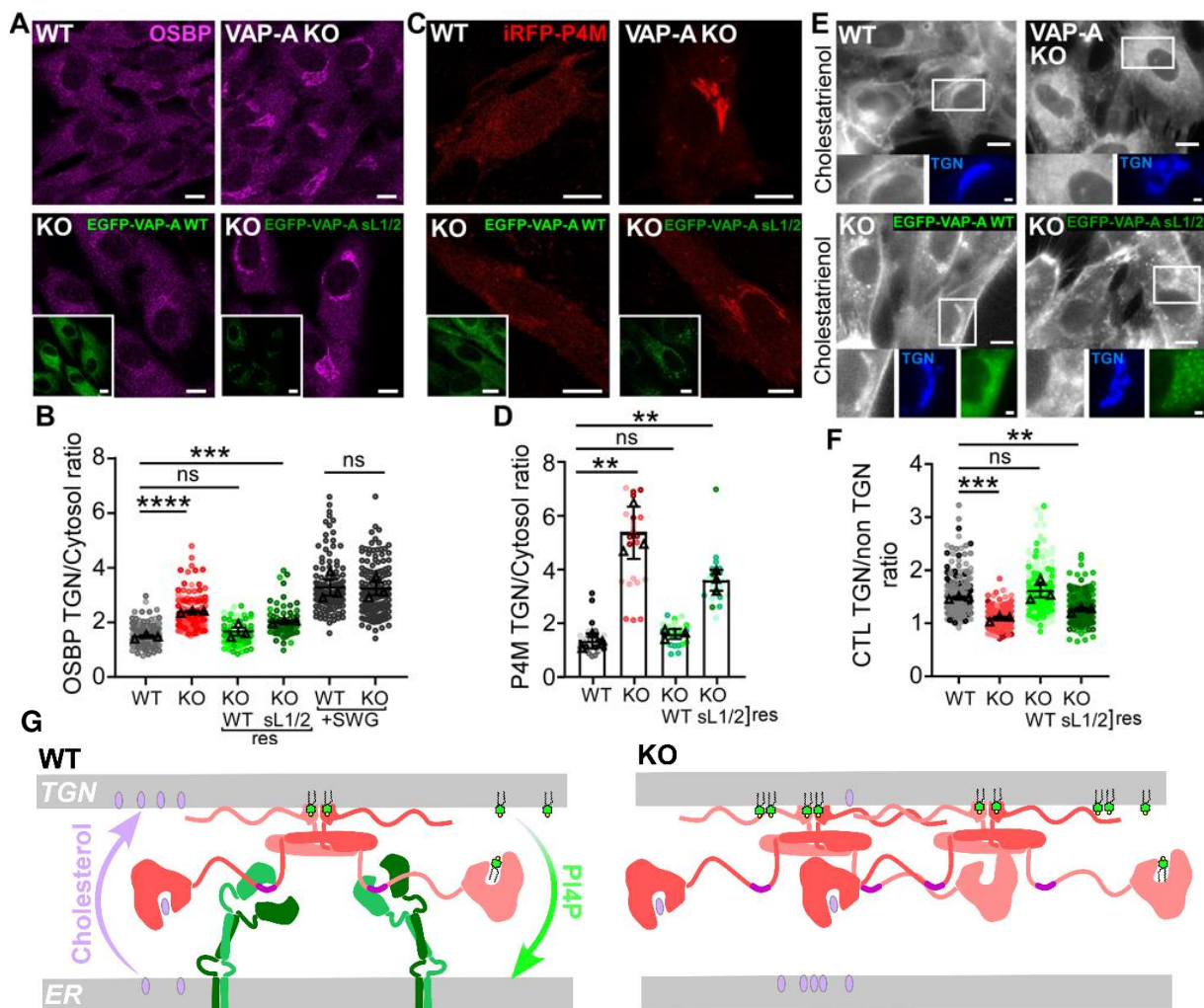
### 3. La flexibilité de VAP-A est-elle requise aux MCSs RE/TGN ?

#### **(a) Analyse de l'activité du partenaire OSBP**

Comme mentionné précédemment, plusieurs LTPs contenant un motif FFAT, comme OSBP et CERT, sont recrutés par VAP-A au niveau des MCSs RE/TGN. Ces LTPs possèdent un domaine PH reconnaissant spécifiquement le PI4P, ce qui leur permet de cibler le TGN. Par conséquent, leurs activités de transfert de lipides sont étroitement couplées au renouvellement de PI4P (Capasso et al., 2017; Mesmin et al., 2017). J'ai bénéficié de l'expertise de mes collègues et des outils d'étude pour OSBP déjà en place au laboratoire pour vérifier si la flexibilité de VAP-A est nécessaire à l'attachement fonctionnel de ce type de LTPs aux MCSs RE/TGN. Nous avons d'abord évalué la localisation subcellulaire d'OSBP endogène par immunofluorescence dans des cellules WT versus VAP-A KO, et dans des cellules VAP-A KO exprimant de manière stable soit EGFP-VAP-A WT soit EGFP-VAP-A sL1/2 (figure R4A).

Dans les cellules WT, OSBP se trouve principalement dans le cytosol. En effet, son activité d'échange de PI4P affaiblit son attachement au TGN. En revanche, le KO de VAP-A entraîne un déplacement d'OSBP du cytosol vers le TGN, ce qui suggère une augmentation du taux de PI4P dans ces membranes, résultant d'une diminution de l'activité d'OSBP (figure R4A, B et G). Cet effet peut être mimé par un traitement des cellules avec l'inhibiteur SWG (50 nM, 30 min), qui bloque l'activité d'échange lipidique d'OSBP (Péresse et al., 2020). Dans ce cas, le recrutement d'OSBP au TGN est encore plus fort que dans les cellules VAP-A KO, qui conservent vraisemblablement une activité partielle d'OSBP en raison de la présence de VAP-B, connue pour interagir également avec OSBP. Dans les expériences de réexpression de EGFP-VAP-A, la localisation cytosolique d'OSBP est complètement restaurée par VAP-A WT, mais pas par la construction sL1/2 (figure R4A et B), suggérant que ce mutant, qui est situé à la mitochondrie, ne participe pas au cycle d'échange lipidique d'OSBP.

OSBP contribue de manière significative au transport intracellulaire de cholestérol en consommant des quantités massives de PI4P. Nous avons donc testé si le renouvellement du PI4P et la distribution du cholestérol étaient affectés par le remplacement de VAP-A WT par sL1/2 par imagerie confocale. Nous avons observé que la sonde iRFP-P4M, spécifique du PI4P, est fortement recrutée au TGN lorsqu'elle est transfectée dans des cellules déficientes pour VAP-A, ce qui indique un pool de PI4P beaucoup plus important que dans les cellules WT (figure R4C et D). Le taux de PI4P au TGN est restauré lorsque les cellules expriment EGFP-VAP-A WT, mais reste élevé

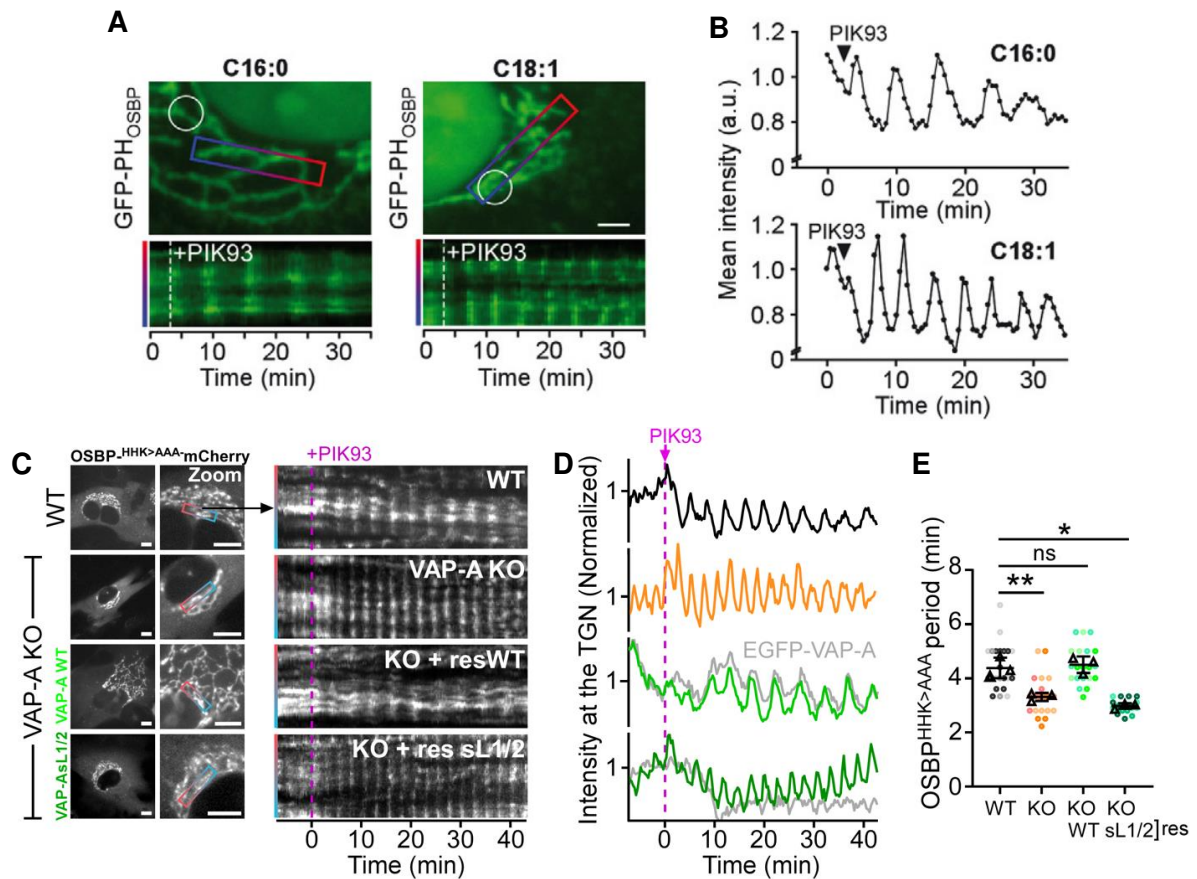


**Figure R4 :** A) Immunofluorescence d'OSBP endogène dans des RPE1 WT ou VAP-A KO (en haut), ou VAP-A KO surexprimant EGFP-VAP-A WT ou sL1/2 (en bas). OSBP est recrutée au TGN dans les cellules VAP-A KO ou en présence de EGFP-VAP-A sL1/2. B) Graphique de quantification de l'enrichissement d'OSBP dans la zone périnucléaire correspondant au TGN (~150 cellules analysées). C et D) Même observation avec la sonde PI4P P4M-iRFP transfectée transitoirement. E) Images faites au microscope plein champ des mêmes conditions où les cellules ont été transfecté avec un marqueur du TGN (bleu) et incubée avec le CTL imagé par lampe UV. F) Quantification de l'enrichissement en CTL au niveau du TGN (~250 cellules analysées). G) Schéma récapitulatif des conséquences du KO de VAP-A sur les MCSs RE/TGN.

avec le mutant sL1/2, ce qui démontre une nouvelle fois un rôle critique des linkers de VAP-A dans l'activité d'OSBP et indirectement dans le turnover de PI4P au niveau du TGN. Afin d'évaluer la distribution du cholestérol, l'autre lipide transporté par OSBP, nous avons utilisé la microscopie sensible aux UV pour obtenir des images de cellules marquées avec un stérol intrinsèquement fluorescent, le cholestatrienol (CTL), excellent mimétique du cholestérol. Le CTL est abondant dans les régions périnucléaires positives pour le marqueur TGN (GalT1) dans les cellules VAP-A WT ; toutefois, cet enrichissement au TGN est absent dans les cellules VAP-A KO ou lorsqu'elles expriment EGFP-VAP-A sL1/2 (figure R4E et F). Ces données suggèrent que la flexibilité de VAP-A est un paramètre important pour sa fonction en tant que récepteur d'OSBP au niveau des MCSs RE/TGN.

Etant donné que le turnover de PI4P influence la dynamique d'OSBP, nous avons examiné ses mouvements à la surface du TGN par imagerie time-lapse. Nous avons précédemment décrit que l'inhibition de PI4KIII $\beta$ , la kinase qui produit le PI4P à proximité d'OSBP, par un traitement à PIK93, déclenche des ondes progressives d'OSBP, qui correspondent au glissement des MCSs du RE vers les sous-domaines du TGN riches en PI4P. De plus, la fréquence d'oscillation d'OSBP est couplée aux niveaux de saturation des lipides membranaires (figure R5A et B (Mesmin et al., 2017)). Comme le montre les figures R5C et D, les cellules transfectées avec le rapporteur OSBP<sup>HHK>AAA</sup>-mCherry (une forme catalytiquement inactive d'OSBP qui n'interfère pas avec le renouvellement du PI4P) présentent des oscillations régulières après l'ajout de l'inhibiteur PIK93. Cependant, il est intéressant de noter que les enregistrements réalisés avec des cellules VAP-A KO ou des cellules VAP-A KO transfectées par le mutant EGFP-VAP-A sL1/2 montrent des périodes d'oscillation plus courtes par rapport aux contrôles. Nos résultats suggèrent que l'absence de VAP-A modifie l'environnement lipidique de la membrane du TGN et que VAP-A sL1/2 ne permet pas de rétablir l'activité d'OSBP, et donc la qualité des membranes du TGN.





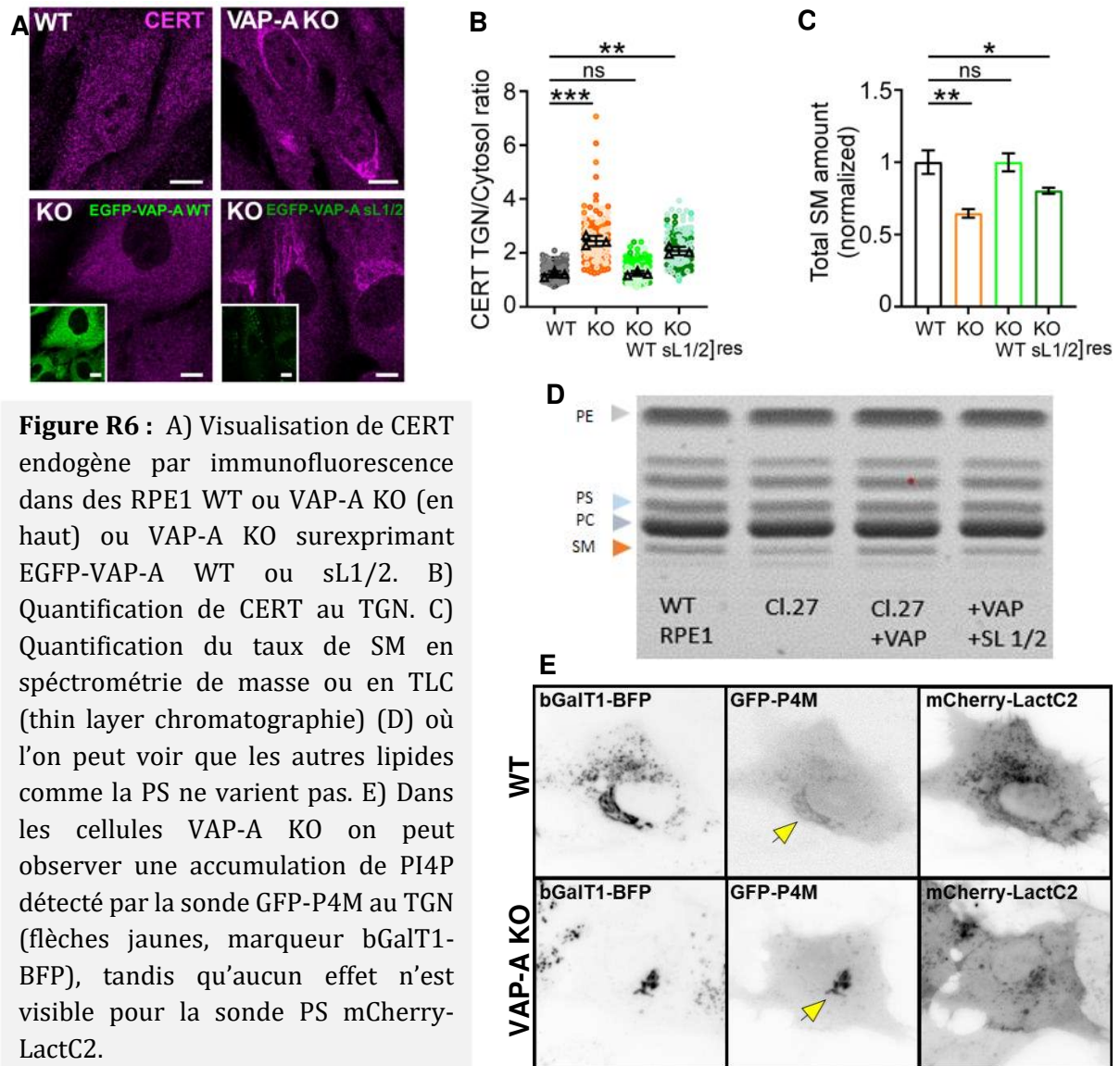
**Figure R5 :** A et B) Vagues de GFP-PH-OSBP observées par B. Mesmin en 2017 après ajout de PIK93. Changement de rythme associé à des traitements avec des lipides C16 :0 rendant les membranes plus ordonnées ou C18 :1 pour un effet opposé. C) Vagues de OSBP<sup>HHK>AAA</sup>-mCherry, surexprimé dans des RPE1 WT ou VAP-A KO, ou VAP-A KO avec expression stable de EGFP-VAP-A WT ou sL1/2. D) Quantification de l'intensité de fluorescence au TGN montrant le rythme des vagues d'OSBP<sup>HHK>AAA</sup>, affecté par le KO de VAP-A, et rétabli par EGFP-VAP-A WT mais pas par le mutant sL1/2. E) Quantification de la période des vagues observées : environ une vague toutes les 4,5 secondes pour des cellules WT.

## **(b) Analyse de l'activité du partenaire CERT**

Le remplacement de VAP-A endogène par EGFP-VAP-A sL1/2 pourrait aussi altérer l'activité de CERT. En effet, cette LTP comporte également un domaine PH, son recrutement au TGN dépend donc des taux de PI4P. CERT transporte le céramide nouvellement synthétisée du RE vers le TGN, où il est converti en sphingomyéline (SM) par l'action de la SM synthase 1 (Hanada et al., 2003). Pour tester la fonction des linkers flexibles de VAP-A sur l'activité de CERT au niveau des MCSs RE/TGN, nous avons d'abord évalué sa localisation subcellulaire. Comme pour OSBP, CERT endogène est principalement cytoplasmique (figure R6A). CERT montre aussi une forte accumulation périnucléaire en l'absence de VAP-A, qui est corrigée par EGFP-VAP-A WT mais pas par l'expression du mutant sL1/2 (figure R6A et B). Cette relocalisation de CERT coïncide avec une diminution significative de la quantité de SM cellulaire, déterminée par des analyses de spectrométrie de masse (figure R6C) et de TLC réalisées par Lucile Fleuriot et Ana Rita Dias Araujo (figure R6D). Ces résultats suggèrent que dans ces conditions, CERT est principalement liée à la membrane du TGN qui subit l'accumulation de PI4P, mais moins engagée dans des MCSs RE/TGN fonctionnels. L'ensemble de ces données indiquent un rôle clé pour les linkers flexibles de VAP-A dans son engagement avec OSBP et CERT au sein des MCSs RE/TGN. Supprimer les linkers change la localisation subcellulaire de VAP-A, la forçant à quitter les MCSs RE/TGN. Ainsi, l'activité de ses partenaires OSBP et CERT au sein de ces MCSs est altérée et des répercussions sont observables sur les lipides qu'elles transportent.

D'autres partenaires avérés ou putatifs de VAP-A existent aux MCSs RE/TGN, dont des membres de la famille OSBP/ORPs, tels qu'ORP9 ou ORP11, mais nous ne les avons pas étudiés. Cependant, le transporteur de PS ORP10 nous a intrigué, car cette protéine ne comporte pas de motif FFAT, mais est bien présente dans ces MCSs, et y jouerait un rôle majeur selon le groupe de De Matteis (Venditti et al., 2019). Nous avons émis l'hypothèse qu'au même titre que OSBP et CERT, si ORP10 dépend de VAP-A, son activité d'échange de PS devrait être altérée par le KO de VAP-A. Toutefois, aucun changement des taux de PS n'a été observé en spectrométrie de masse ou en TLC. De plus, la distribution intracellulaire de GFP-Lactadhérine-C2, une sonde spécifique de la

PS, est similaire dans les cellules WT et VAP-A KO (figure R6 D et E), suggérant que l'activité d'ORP10 est mineure dans les cellules RPE1, ou indépendante de VAP-A et du turnover de PI4P au TGN.



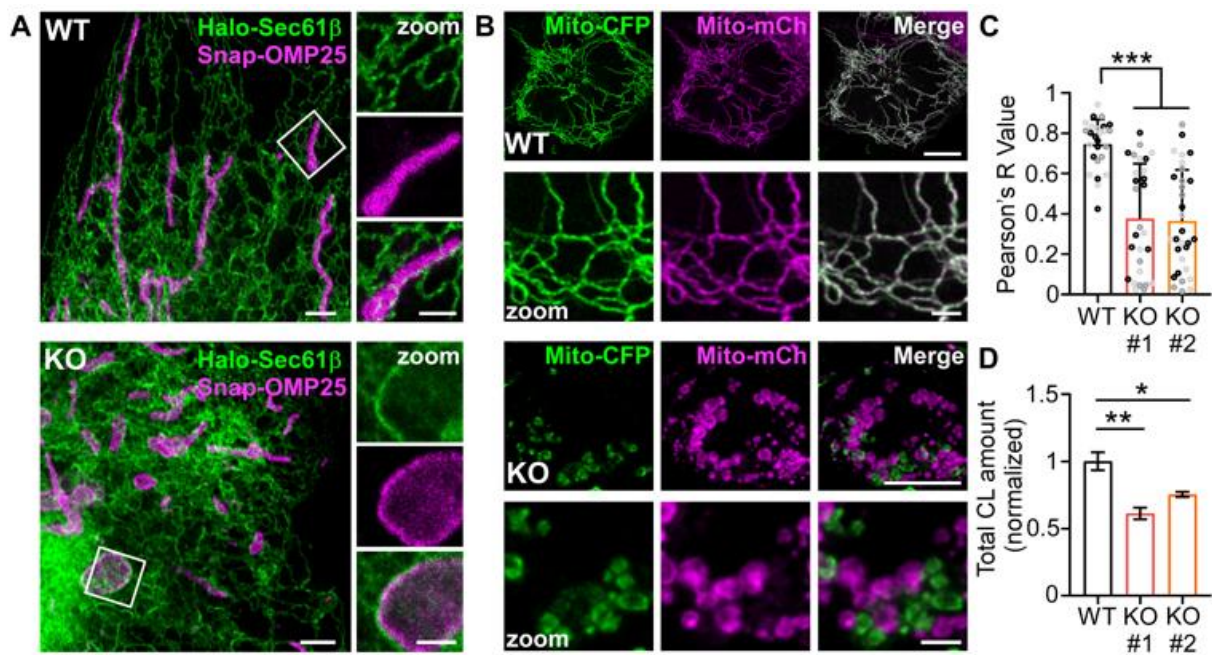
#### 4. Quel est le rôle de VAP-A aux MCSs RE/mitochondrie ?

Etant donné que le mutant VAP-A sL1/2 montre une préférence pour les MCSs RE/mitochondrie, nous avons cherché à examiner le rôle de VAP-A dans ces MCSs, qui était peu étudié, voire méconnu. Des données indiquaient que les protéines VAP interagissent au niveau des MCSs RE/mitochondrie avec plusieurs LTPs, y compris la protéine PTPIP51 ancrée dans l'OMM (Stoica et al., 2014; De vos et al., 2012), qui transfère le PA du RE à l'OMM (Yeo et al., 2021),

et les protéines de type canal VPS13A et D, capables de transférer plusieurs phospholipides entre membranes, y compris le PA (Kumar et al., 2018). Considérant que l'apport de PA aux mitochondries favorise la synthèse de CL, un lipide clé pour la fonction et la dynamique des mitochondries, nous avons pensé que VAP-A pourrait contribuer à la dynamique des mitochondries. Pour tester cette hypothèse, nous avons transfecté des cellules WT ou VAP-A KO avec un marqueur du RE (Sec61-Halo) ainsi que la protéine mitochondriale SNAP-OMP25, et avons effectué un marquage avec des fluorophores compatibles au STED (voir Méthodes page 156). Tandis que l'imagerie des cellules WT montre de longues mitochondries tubulaires s'étendant dans tout le cytoplasme, les mitochondries des cellules VAPA KO sont fragmentées et présentent des formes sphériques élargies. Malgré cela, nous avons observé des contacts entre le RE et ces mitochondries rondes, indiquant que VAP-A n'est pas obligatoire pour la formation de MCSs RE/mitochondrie (figure R7A). Une nouvelle problématique s'est donc présentée : comment le KO de VAP-A affecte la morphologie des mitochondries ?

Les changements de forme des mitochondries résultent souvent d'un déséquilibre entre fusion et fission de ces organelles (Giacomello et al., 2020), mais peuvent également se produire pendant la mitophagie (voir page 86). Nous avons testé et exclu la seconde possibilité, en évaluant la distribution du marqueur d'autophagie LC3. Ensuite, nous avons utilisé la vidéo-microscopie confocale pour déterminer si les mitochondries sphériques des cellules VAP-A KO présentaient une dynamique aberrante. Alors que dans les cellules WT, des événements fréquents de fusion et de fission des mitochondries sont observés, aucun événement de fusion mitochondriale n'a pu être détecté dans les cellules VAP-A KO au cours de l'expérience. Ces résultats sont présentés dans la figure supplémentaire 4 de l'article 3 et dans une vidéo associée. Pour mieux quantifier la fusion mitochondriale, nous avons utilisé le « fusion test », avec du polyéthylène glycol (PEG) afin de générer des hybrides entre des cellules transfectées avec un marqueur ciblant les mitochondries couleur Cyan (Mito-CFP) ou rouge (Mito-mCherry). Lorsque les cellules WT ont été examinées 16 heures après le traitement au PEG, tous les hybrides cellulaires présentaient une colocalisation des signaux de fluorescence, ce qui indique que la fusion mitochondriale s'est produite. En

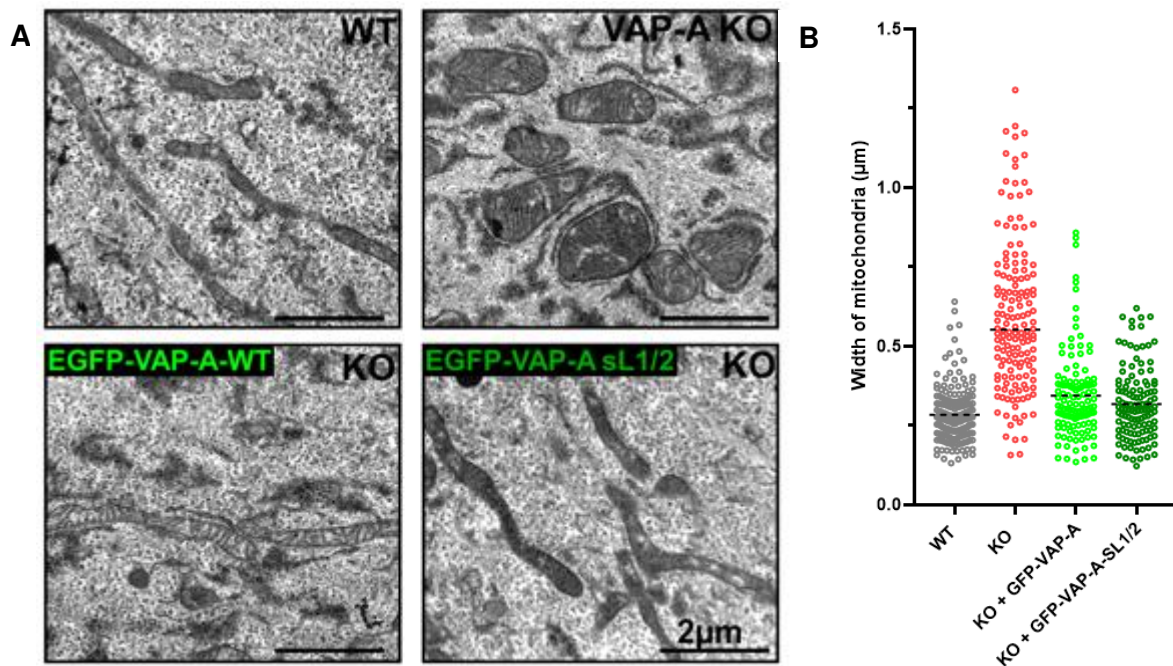
revanche, une fraction significative des hybrides cellulaires VAP-A KO contenait deux populations de mitochondries monochromes (figure R7B et C). Pour résumer, les cellules dépourvues de VAP-A ont une capacité réduite à conduire la fusion mitochondriale. Comme les phospholipides PA et CL jouent un rôle important dans ce mécanisme, nous avons soupçonné que le défaut de fusion dans les cellules VAP-A KO pourrait être corrélée à dysfonctionnement lié au transfert de lipides vers la mitochondrie, ou de métabolisme lipidique. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré les quantités totales de CL dans les cellules WT et dans deux lignées VAP-A KO indépendantes par spectrométrie de masse. Par rapport aux cellules WT, les niveaux de CL ont massivement diminué, de 43 % et 25 %, selon la lignée cellulaire déficiente en VAP-A (figure R7D). Le PA n'a pas pu être détecté par analyse lipidomique, probablement en raison de sa nature trop éphémère dans les cellules RPE1. Dans l'ensemble, ces expériences indiquent que VAP-A contribue à la régulation de la fusion des mitochondries et maintient ainsi leur morphologie. Cela reflète vraisemblablement le rôle de VAP-A dans le contrôle du transfert de PA dépendant des LTPs au niveau des MCSs RE/mitochondrie, qui conduit finalement à la synthèse de CL, indispensable à la fusion, cependant cette hypothèse doit être confirmée.



**Figure R7 :** A) Images de STED de RPE1 WT ou VAP-A KO transfectées transitoirement avec un marqueur du RE (vert) et une protéine de l'OMM (magenta) montrant le changement morphologique des mitochondries. B) Test de fusion mitochondrial au PEG, les cellules WT montrent de la fusion mitochondriale contrairement aux KO. C) Quantification de la colocalisation des marqueurs mitochondriaux par coefficient de Pearson. D) Quantification du total de CL par spectrométrie de masse, baisse de CL dans les lignées VAP-A KO.

## 5. La flexibilité de VAP-A est-elle requise aux MCSs RE/mitochondrie ?

Avant cela, nous avons cherché à savoir si VAP-A sL1/2 était fonctionnel au niveau des MCSs RE/mitochondrie. Etant donné que la forme des mitochondries était clairement différente entre les cellules WT et VAP-A KO, nous avons un moyen simple de vérifier l'efficacité de nos constructions VAP-A à rétablir ce phénotype. Nous avons donc mesuré ces changements en utilisant des paramètres géométriques pour une analyse précise : d'une part avec l'analyse automatisée d'images pour extraire le « form factor » (voir Méthodes page 160), et d'autre part par des mesures manuelles sur des clichés de microscopie électronique à transmission réalisés par Sandra Lacas-Gervais. Comme indiqué précédemment, par rapport aux cellules WT, les mitochondries sont principalement sphériques dans les cellules VAP-A KO. La surexpression de EGFP-VAP-A WT ou du mutant sL1/2 inverse ce phénotype en restaurant la forme des mitochondries (figure R8). Ces résultats indiquent qu'une forme plus rigide de VAP-A est active aux MCSs RE/mitochondrie et est capable de maintenir la morphologie des mitochondries.

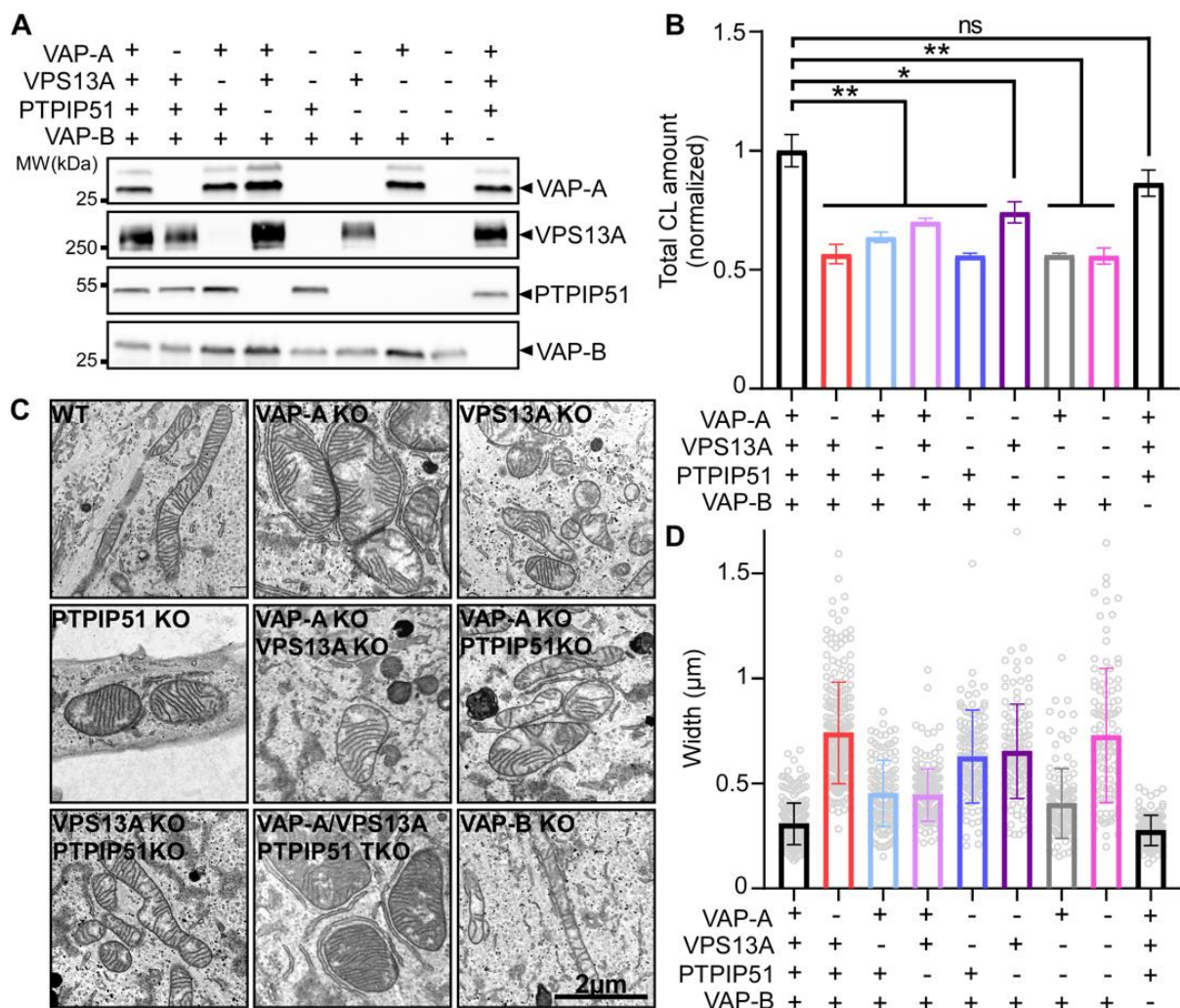


**Figure R8 :** A) Images de microscopie électronique à transmission des mitochondries des cellules RPE1 WT ou VAP-A KO (en haut), et VAP-A KO surexprimant EGFP-VAP-A WT ou sL1/2 (en bas). Les deux versions de VAP-A sont capable de rétablir la morphologie des mitochondries. B) Quantification des images, mesure directe de la largeur des mitochondries sur Image J.

### (a) Comment VAP-A est-elle impliquée dans la fusion mitochondriale ?

Les données disponibles dans la littérature suggèrent que VPS13A et PTPIP51, qui permettent le transfert de PA entre membranes, pourraient contribuer au métabolisme lipidique mitochondrial impacté lors du KO de VAP-A. Nous avons donc utilisé une nouvelle fois la méthode CRISPR/Cas9 pour abolir l'expression cellulaire de VAP-A, VPS13A et PTPIP51 individuellement ou en combinaison (voir Méthodes page 139) (figure R9A). Nous avons ensuite réalisé une analyse lipidomique afin de mesurer les quantités de CL dans les lignées cellulaires correspondantes (figure R9B). Nous avons observé que non seulement PTPIP51 KO, mais aussi VPS13A KO montraient une diminution du taux de CL et un phénotype de mitochondries rondes. Nous avons noté que la lignée VPS13A/PTPIP51 double KO (DKO) présente un effet plus fort, similaire à celui obtenu pour VAP-A KO (c'est-à-dire une diminution de la CL d'environ 45 %), alors qu'aucune baisse supplémentaire des niveaux de CL n'a été mesurée pour les cellules VAP-

A/VPS13A/PTPIP51 triple KO (TKO). Le KO de VAP-A conduirait donc un niveau minimal de CL où aucune LTP partenaire ne fonctionne, c'est pourquoi la suppression de VPS13A ou PTPIP51 ne fournit pas d'effet additif. Nous avons ensuite analysé les défauts phénotypiques associés aux mitochondries dans ces différentes lignées KO par microscopie électronique. Comme attendu, les mitochondries montrent des formes sphériques gonflées dans les cellules VAP-A KO seul ou en combinaison avec VPS13A et/ou PTPIP51 (figure R9C et D). Cependant, un phénotype plus modeste est observé dans les cellules VPS13A KO et PTPIP51 KO. Par ailleurs, il est possible que d'autres LTPs, comme MIGA2 qui est également partenaire de VAP-A, puissent transporter du PA



**Figure R9 :** A) Analyse Western Blot des différentes lignées KO générées par CRISPR/Cas9. B) Quantification du total de CL dans ces différentes lignées par spectrométrie de masse. C) Visualisation de la morphologie des mitochondries par imagerie TEM. D) Quantification, mesure de la largeur des mitochondries à partir des images de TEM.



du RE à l'OMM dans cette condition afin de maintenir une certaine activité de fusion (Hong et al., 2022).

Etant donné que VAP-A et VAP-B ont une abondance similaire dans les cellules RPE1, nous avons aussi établi une lignée cellulaire KO pour VAP-B. Contrairement à ce que nous avons observé avec VAP-A KO, nous n'avons trouvé aucun changement significatif des niveaux de CL dans les cellules VAP-B KO, et aucune altération de la forme des mitochondries. Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que l'impact de VAP-A sur les niveaux de CL et sur la morphologie des mitochondries est largement médié par les LTPs contenant un motif FFAT : VPS13A et PTPIP51.

### **(b) VAP-A sL1/2 interagit avec VPS13A et PTPIP51**

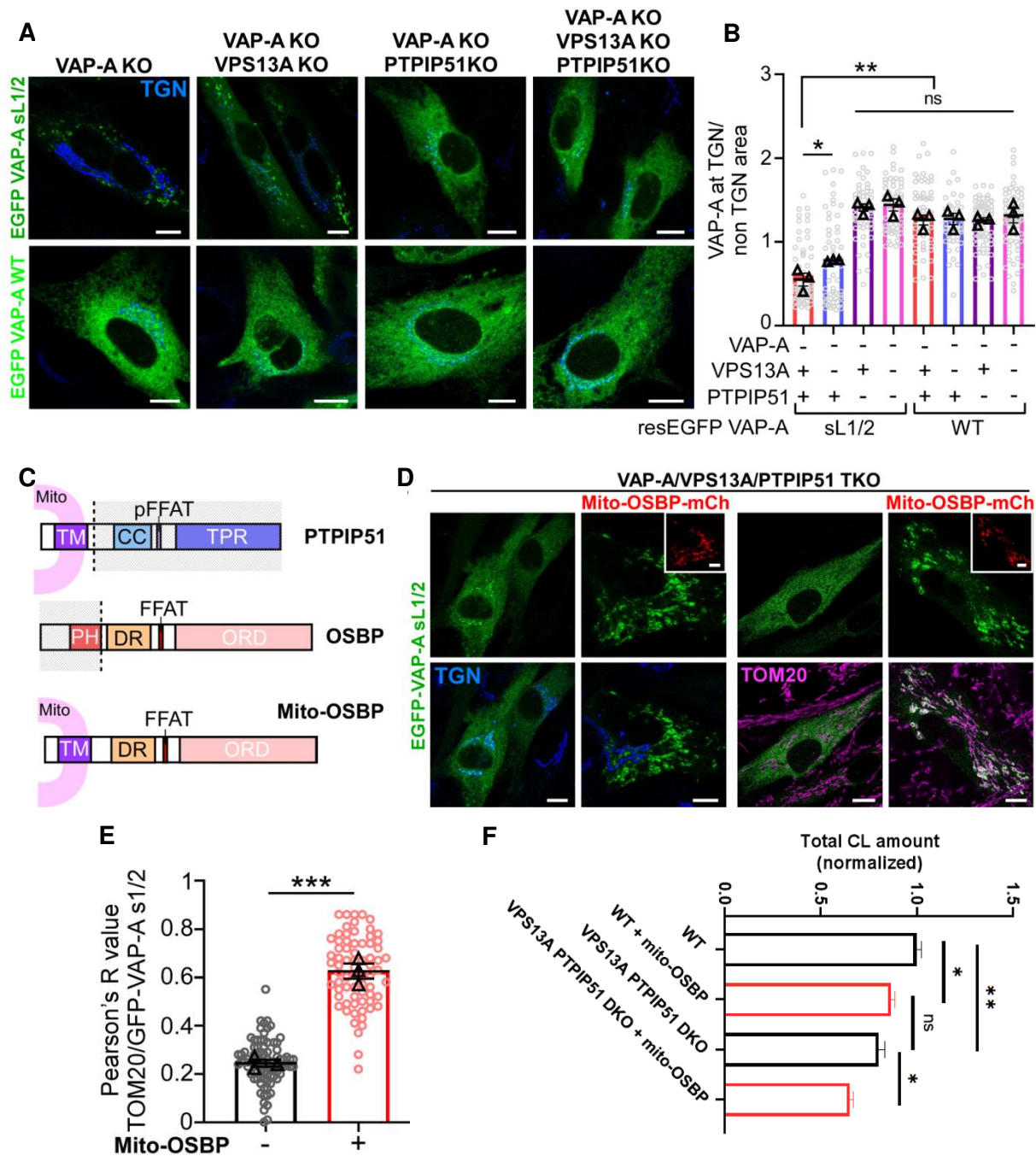
La présence de VPS13A et PTPIP51 (qui comportent des motifs FFAT) dans les MCSs RE/mitochondrie, pourraient expliquer la localisation subcellulaire de VAP-A sL1/2. Pour tester cette hypothèse, nous avons suivi la distribution de EGFP-VAP-A sL1/2 dans des cellules VAP-A KO, VPS13A KO et/ou PTPIP51 KO. Comme le montre la figure R10A, la construction sL1/2 n'est plus limitée aux mitochondries dans les cellules VAP-A/VPS13A DKO, VAP-A/PTPIP51 DKO et VAP-A/VPS13A/PTPIP51 TKO. L'effet est plus frappant dans les deux dernières conditions, où EGFP-VAP-A sL1/2 est localisé dans tout le RE, rappelant la distribution de EGFP-VAP-A WT (figure R10A et B). Ces résultats démontrent que VPS13A et PTPIP51 sont des partenaires clés de VAP-A au niveau des MCSs RE/mitochondrie, et les principaux interactants du mutant VAP-A sL1/2.

### **(c) Les linkers de VAP-A ne conditionnent pas une préférence de partenaire**

Afin de déterminer si l'absence de linkers flexibles limite la capacité de VAP-A à s'adapter à certains partenaires, par exemple en rendant le mutant sL1/2 inadaptés aux partenaires du TGN mais adapté à ceux de la mitochondrie, nous avons cherché à attacher aux mitochondries un interactant de VAP-A spécifique du TGN dans la lignée TKO. Pour cela, nous avons conçu une construction OSBP-mCherry dans laquelle le segment N-terminal comprenant le domaine PH est remplacé par le domaine TMD de PTPIP51 (résidus 1 à 43) (figure R10C). L'imagerie confocale a confirmé que la chimère d'OSBP (Mito-OSBP-mCherry), localisée aux mitochondries dans les

cellules VAP-A/VPS13A/PTPIP51 TKO (figure R10D), entraîne le recrutement d'EGFP-VAPA sL1/2 qui n'est plus distribuée dans tout le RE, mais concentrée près des mitochondries, comme le montre la forte augmentation du coefficient de Pearson entre EGFP-VAP-A sL1/2 et le marqueur de l'OMM TOM20 (figure R10E). Ce résultat suggère que le mutant VAP-A sL1/2 est plus adapté aux MCSs RE/mitochondrie qu'aux MCSs RE/TGN et que ceci ne dépend pas du partenaire engagé.

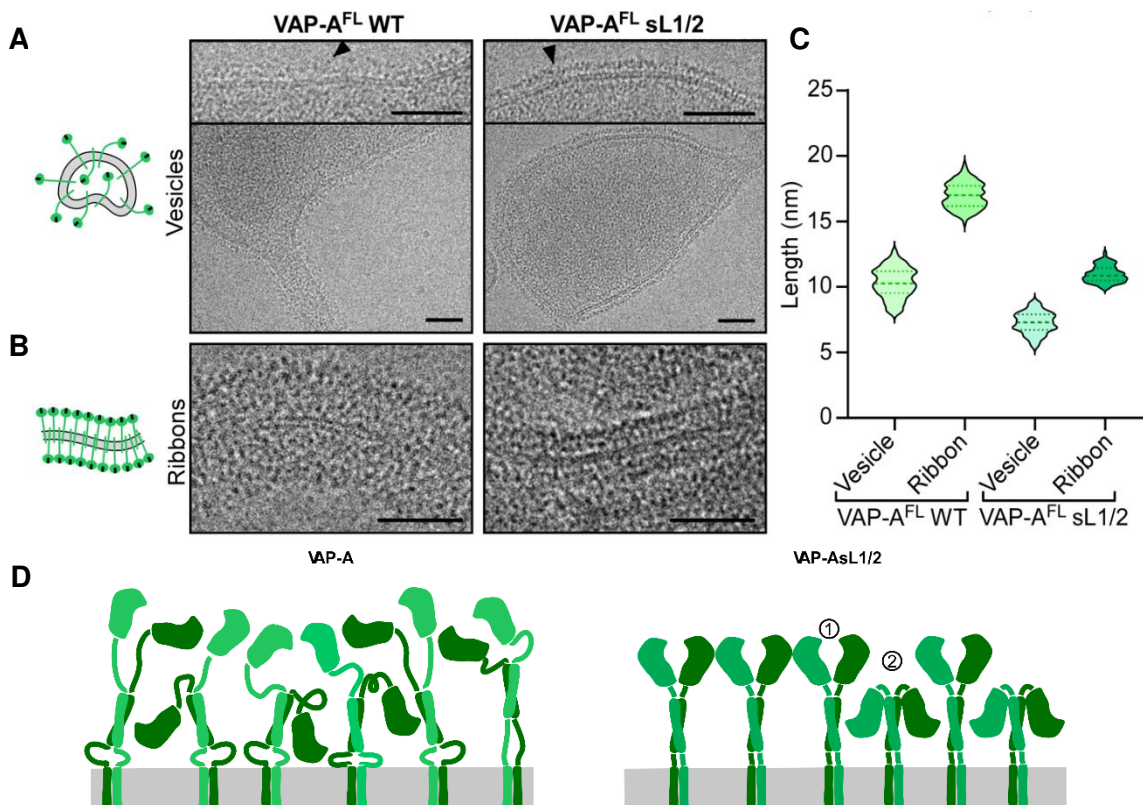
Nous avons également effectué des analyses lipidomiques pour mesurer les niveaux de CL dans les RPE1 VPS13A/PTPIP51 DKO exprimant ou non transitoirement la chimère Mito-OSBP (figure R10F). Nos résultats indiquent que Mito-OSBP ne rétabli pas la quantité de CL dans ces cellules. En fait, nous avons mesuré une diminution supplémentaire des niveaux de CL lors de l'expression de Mito-OSBP. Il est possible que Mito-OSBP entre en compétition avec d'autres transporteurs de PA, tels que MIGA2 comme mentionné ci-dessus, pour se lier à VAP-A au niveau des MCSs RE/mitochondrie. Cette expérience suggère également que VPS13A et PTPIP51 ne sont pas seulement des attaches structurelles pour d'autres transporteurs, mais qu'ils jouent un rôle actif dans le transfert des lipides et que VAP-A a un rôle majeur dans cette voie en formant des interactions avec différentes LTPs entre le RE et les mitochondries.



**Figure R10 :** A) Images confocales de cellules KO pour les protéines indiquées et exprimant transitoirement EGFP-VAP-A sL1/2 ou WT. L'absence des interactants de VAP-A à la mitochondrie entraîne une relocalisation de GFP-VAP-A sL1/2. B) Quantification de l'enrichissement de EGFP-VAP-A au TGN (~60 cellules analysées). C) Organisation des domaines de PTPIP51, d'OSBP et de la chimère Mito-OSBP, où le domaine PH a été remplacé par le TMD de PTPIP51. D) Expression transitoire de Mito-OSBP et EGFP-VAP-A sL1/2 dans des RPE1 TKO et Immunomarquage du TGN (bleu) et des mitochondries (magenta). La surexpression de Mito-OSBP restaure la localisation mitochondriale du mutant VAP-A sL1/2. E) Quantification de la colocalisation entre EGFP-VAP-A sL1/2 et le marqueur mitochondrial TOM20 en fonction de l'expression de Mito-OSBP. F) Quantification du total de CL par spectrométrie de masse dans les cellules WT ou VPS13A et PTPIP51 DKO en fonction de l'expression transitoire de Mito-OSBP (expérience non publiée).

6. La flexibilité de VAP-A lui permet de s'adapter à différents MCSs

Nous avons émis l'hypothèse que la préférence de VAP-A sL1/2 pour les MCSs RE/mitochondrie était due à sa moindre flexibilité par rapport à VAP-A WT, nous avons observé par dynamique moléculaire (figure R1C et D) et par cryo-EM cette différence de flexibilité. En effet les reconstitutions à faible LPR nous permettent de voir que VAP-A possède un grand nombre de conformations possibles dans l'espace et adapte sa longueur en fonction de sa densité (plus dense sur les rubans que sur les vésicules) (figure R11). Pour VAP-A sL1/2, on observe une bande continue de densités qui correspondent à l'alignement des domaines MSP, cependant, il existe aussi une différence de taille en fonction de la concentration protéique, d'environ 5 nm (figure R11C). Cette taille correspond à celle d'un domaine MSP, il est donc envisageable que VAP-A sL1/2 adopte deux types de conformations : la conformation 1 lorsqu'elle est très dense, sur les rubans

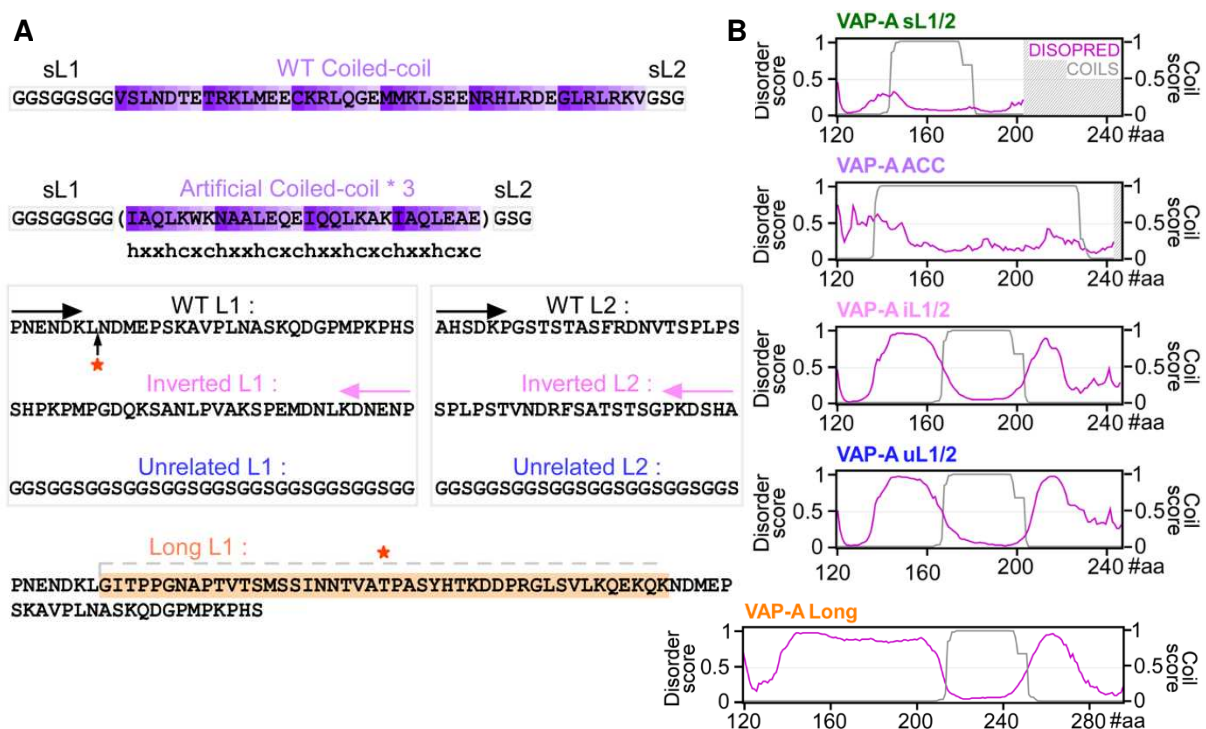


**Figure R11** : Images de cryo-EM de VAP-A WT ou sL1/2 reconstitué dans des protéoliposomes à un LPR de 70 mol/mol conduisant à la formation de vésicules déformées (A) ou de rubans (B). C) Graphique montrant la distribution des longueurs observées pour les domaines extramembranaires de VAP-A (~120 mesures par condition). D) Schéma récapitulatif des observations : les images témoignent de la flexibilité de VAP-A WT en comparaison avec sL1/2 mais montrent également sa plus petite taille. Les linkers de VAP-A WT permettent au domaine MSP d'explorer un espace plus large et un nombre supérieur de possibilités de conformations.

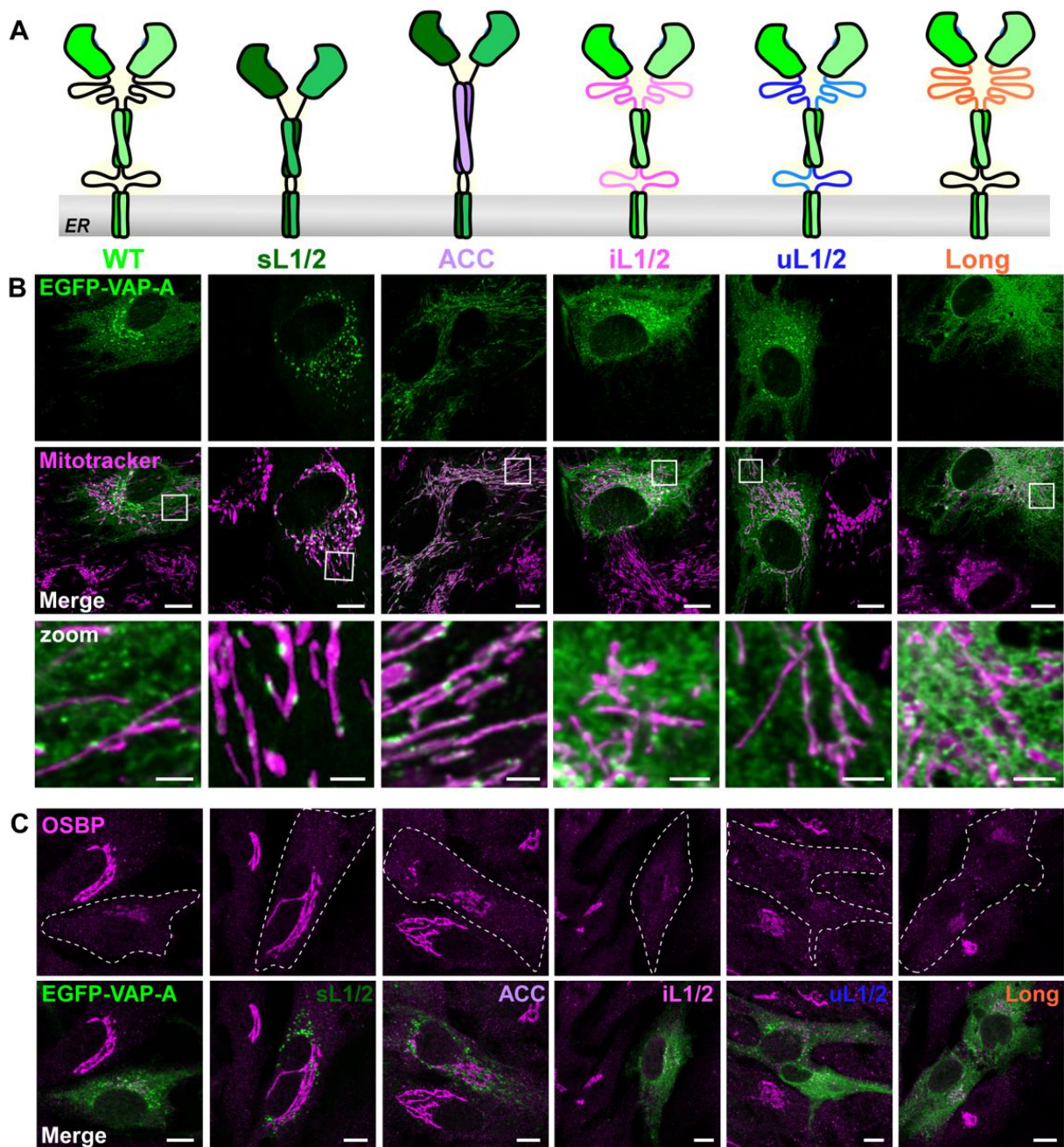
et la conformation 1 ou 2 sur les vésicules (figure R11D). Etant donné que le mutant VAP-A sL1/2 est plus court que VAP-A WT, jusqu'à ~6 nm selon l'analyse d'images cryo-EM (figure R11), les effets observés jusqu'à lors pourraient également résulter de la portée limitée de son domaine MSP. Pour tester cette possibilité, nous avons conçu une construction VAP-A rigide mais plus longue, dont la taille correspond à celle de VAP-A WT. La région coiled-coil de VAP-A (résidus 165 à 206), qui comprend 6 heptades et s'étend sur une distance de 5,9 nm (en considérant une translation de 1,4 Å/résidu), a été remplacée par un coiled-coil artificiel (ACC) plus long, de 12 heptades, formant une tige rigide d'environ 11,8 nm, dans la construction VAP-A sL1/2 (figure R12). Nous avons ensuite comparé la distribution subcellulaire de VAP-A ACC avec celle des constructions WT et sL1/2. De manière remarquable, EGFP-VAP ACC dans les cellules VAP-A KO est fortement concentrée dans les MCSs RE/mitochondrie (figure R13), comme EGFP-VAP-A sL1/2. Nous avons ensuite analysé la localisation subcellulaire d'OSBP endogène dans les cellules VAP-A KO après expression des différentes constructions de VAP-A. Comme observé avec EGFP-VAP-A sL1/2, l'expression de EGFP-VAP-A ACC ne rétablit pas l'accumulation d'OSBP au TGN observée dans les cellules VAP-A KO (figure R4A), ce qui indique que ce mutant de VAP-A n'est pas fonctionnel aux MCSs RE/TGN.

Nous avons pensé que si les linkers de VAP-A permettent sa fonction au niveau de plusieurs MCSs grâce à leur flexibilité, leur remplacement par des IDRs d'une autre séquence mais de la même longueur, ou encore par une séquence flexible plus longue, devrait avoir peu d'impact sur la fonction de VAP-A au niveau des MCSs et sur sa localisation subcellulaire. Nous avons donc conçu deux différents mutants de VAP-A dans lesquels nous avons remplacé les linkers originaux soit par des séquences inversées par rapport à VAP-A WT (VAP-A iL1/2), soit par des séquences riches en Glycines et Serines de même longueur (VAP-A uL1/2) (figure R12). Nous avons également exploité la séquence d'une isoforme naturelle de VAP-A, produite par épissage alternatif (VAP-A Long) qui diffère de la forme canonique de VAP-A par l'insertion de 45 résidus dans son premier linker. La prédiction de l'algorithme pour le désordre intrinsèque indique que la séquence insérée est non structurée (figure R12B), formant ainsi un linker flexible extra-long.

Comme le montre la figure R13, EGFP-VAP-A iL1/2, uL1/2 ainsi que EGFP-VAP-A Long se trouvent dans tout le réseau du RE lorsqu'elles sont exprimées dans des cellules VAP-A KO, ressemblant à la distribution de EGFP-VAP-A WT. De plus, toutes ces constructions flexibles rétablissent la localisation cytosolique d'OSBP dans les cellules VAP-A KO, ce qui indique qu'elles assurent la fonction de VAP-A au niveau des MCSs RE/TGN. Globalement, ces expériences démontrent que la nature non structurée et flexible des IDRs de VAP-A, plutôt que leur séquence exacte, sont des paramètres clés pour permettre l'attachement de différentes organelles par VAP-A et faire de cette protéine un récepteur universel.



**Figure R12 :** A) De haut en bas : séquences des « shorts » linkers et du coiled-coil de la construction VAP-A sL1/2 et VAP-A ACC, puis des linkers flexibles de VAP-A WT, inversés « inverted », changés par des G et S « unrelated » et long. B) Prédiction du désordre intrinsèque par DISOPRED et des coiled-coils par COILS pour chaque construction.



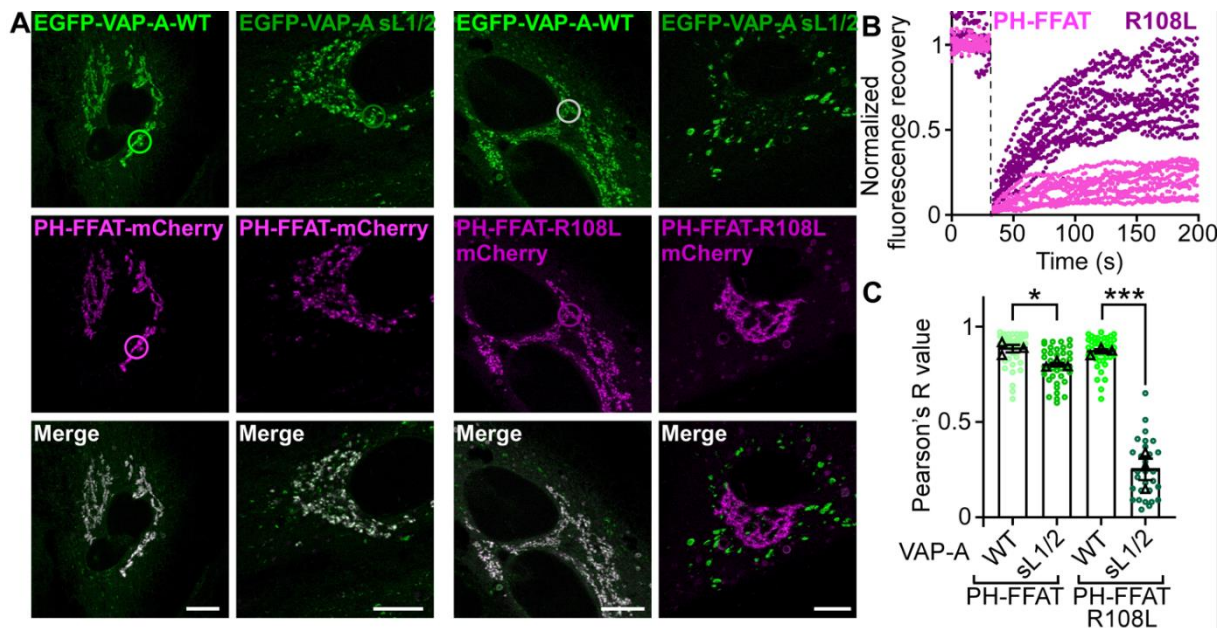
**Figure R13 :** A) Organisation des domaines de VAP-A WT, des constructions rigides VAP-A sL1/2 et VAP-A ACC, et des constructions flexibles iL1/2, uL1/2 et la forme longue. B) Localisation subcellulaire de ces différentes constructions transfectées avec un tag EGFP dans des RPE1 VAP-A KO. La localisation dépend de la flexibilité, cependant toutes les constructions ont rétabli la morphologie des mitochondries (magenta). B) Dans les mêmes conditions qu'en (A), un immunomarquage d'OSBP endogène a été réalisé (magenta). Seules les versions flexibles de VAP-A rétablissent la localisation d'OSBP, qui est cytosolique et peu enrichie au TGN dans des RPE1 WT (voir figure R4A).

## 7. Pourquoi VAP-A sL1/2 est-elle inadaptée aux MCSs RE/TGN ?

### (a) Stabilisation des MCSs RE/TGN

Les expériences décrites jusqu'à présent suggèrent qu'en raison de sa flexibilité, VAP-A pourrait s'adapter à tous les MCSs, alors qu'une forme rigide pourrait être sélective, indépendamment de la nature exacte de l'interactant. Afin de déterminer comment les linkers flexibles de VAP-A déterminent ses propriétés d'attachement, nous avons d'abord envisagé de réduire la dynamique des MCSs RE/TGN, qui sont transitoires par nature du fait du turnover de PI4P. Ceci peut être réalisé en surexprimant le fragment PH-FFAT d'OSBP qui, en interagissant avec VAP-A, produit des ponts solides entre les membranes qui persistent dans le temps (Mesmin et al., 2013; Wakana et al., 2015). Comme l'illustre la figure R14A, EGFP-VAP-A WT se concentre dans la zone périnucléaire correspondant au TGN après expression de PH-FFAT-mCherry. Le retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) au niveau de cette région montre que PH-FFAT et VAP-A se déplacent très lentement, ce qui indique que les MCSs sont stables (figure R14B). De façon remarquable, PH-FFAT-mCherry induit également une relocalisation robuste de EGFP-VAP-A sL1/2, qui ne décore plus les MCSs RE/mitochondrie. Comme contrôle, nous avons introduit une mutation ponctuelle dans le domaine PH de PH-FFAT-mCherry (R108L) qui réduit fortement son affinité pour le PI4P, mais n'empêche pas le ciblage au TGN (Levine and Munro, 1998). Comme prévu, le retour de fluorescence après photoblanchiment de PH-FFAT-mCherry R108L est beaucoup plus rapide (~3 fois) que la construction WT correspondante, indiquant que les MCSs RE/TGN sont peu stabilisés dans ce cas. Bien que EGFP-VAP-A WT soit efficacement relocalisée dans la région périnucléaire par la construction PH-FFAT-mCherry R108L, EGFP-VAP-A sL1/2 reste concentré dans les MCSs RE/mitochondrie (figure R14A et C). Cette expérience clé nous a permis de démontrer que le mutant VAP-A sL1/2 rigide est inadapté aux MCSs transitoires, c'est pourquoi il se concentre dans les MCSs RE/mitochondrie. Nous avons ainsi pu décrire précisément le rôle des IDRs de VAP-A, lui permettant de s'adapter aux MCSs dynamiques et fluctuants, comme les MCSs RE/TGN.



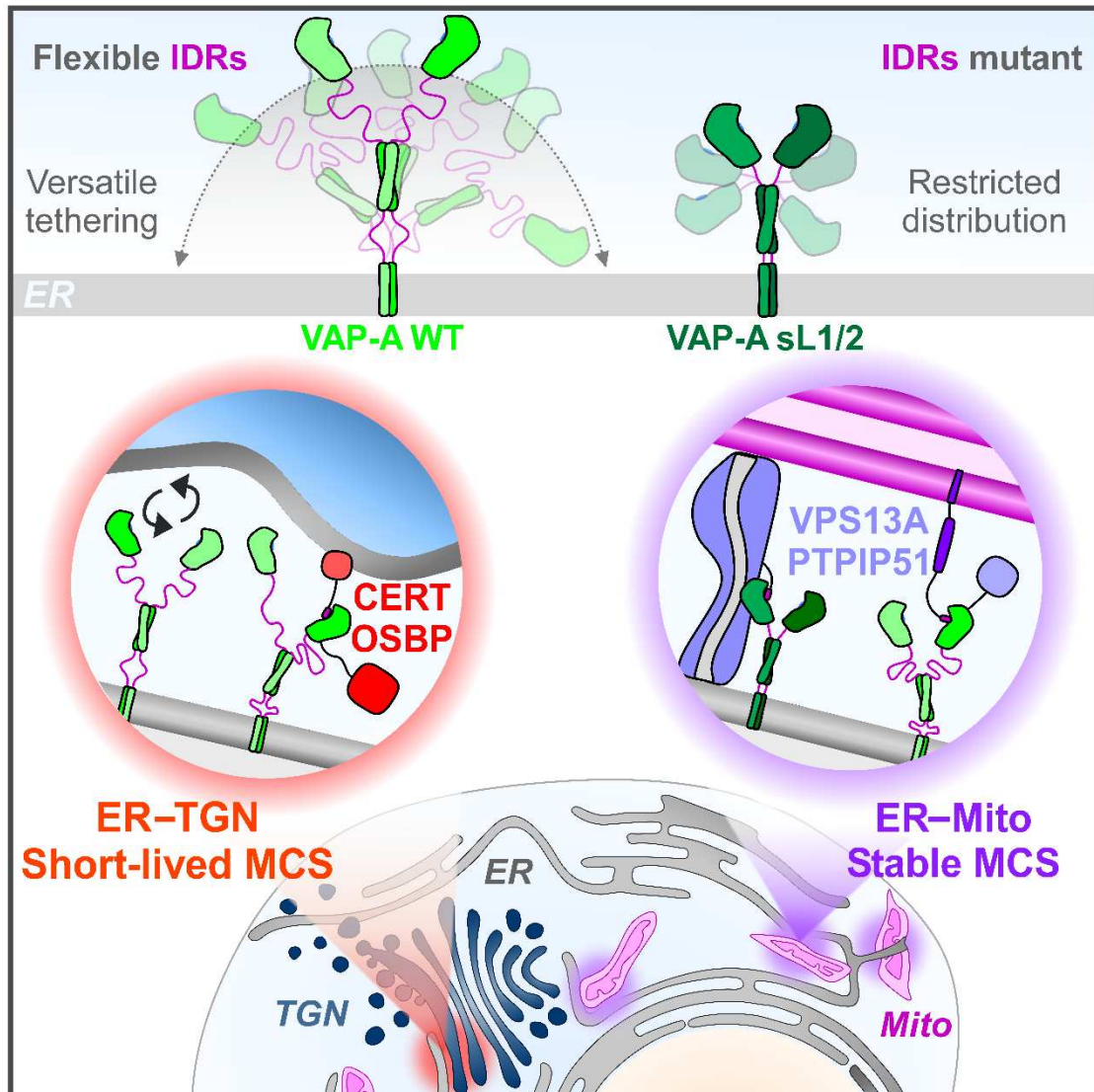


**Figure R14 :** A) Cellules RPE1 VAP-A KO exprimant de façon stable EGFP-VAP-A WT ou sL1/2 et de façon transitoire PH-FFAT-mCherry ou PH-FFAT-R108L-mCherry, cette mutation affaiblit la liaison du domaine PH au PI4P. L'expression de PH-FFAT entraîne un recrutement de EGFP-VAP-A WT et sL1/2 au TGN tandis que seul EGFP-VAP-A WT est recruté en présence de PH-FFAT-R108L. B) Analyses de FRAP sur PH-FFAT ou PH-FFAT-R108L montrant une différence de dynamique. C) Quantification de la colocalisation entre EGFP-VAP-A et la PH-FFAT-mCherry ou le mutant R108L.

### (b) Modèle

Nous avons étudié l'architecture fonctionnelle de VAP-A, un récepteur qui contribue de manière significative à la fonction du RE en interagissant avec une multitude de protéines et en reliant le RE à d'autres organelles. Nous avons identifié deux régions IDRs dans VAP-A comme des éléments clés contrôlant son activité de liaison. Ces régions ne sont pas structurées, comme en témoignent leur sensibilité protéolytique, leur comportement en gel filtration analytique et les simulations de dynamique moléculaire. Ces IDRs apportent de la flexibilité et ceci est cohérent avec le fait que la longueur de VAP-A est variable en fonction de sa densité sur une membrane (Mora et al., 2021). Remarquablement, la visualisation en cryo-EM d'une construction dont les deux régions linkers sont supprimées (VAP-A sL1/2) indique qu'elle est plus rigide que la forme WT. Bien que VAP sL1/2 conserve sa capacité intrinsèque d'interagir avec les protéines contenant des FFAT, une observation majeure a été sa relocalisation massive vers les MCSs RE/mitochondrie

au détriment des MCSs RE/TGN. En conséquence, la fonction des LTPs dépendantes de VAP : OSBP et CERT dans le trafic des lipides du Golgi est altérée, alors que VAP-A sL1/2 peut mimer la fonction de VAP-A WT au niveau du MCS RE/mitochondrie. Notamment le maintien du métabolisme des CL et la capacité de fusion mitochondriale grâce à des interactions avec PTPIP51 et VPS13A. A première vue, on peut simplement considérer que VAP-A sL1/2 est enrichie au niveau des MCSs RE/mitochondrie en raison de sa plus petite taille par rapport à VAP-A WT, comme pour s'adapter à la taille de ses partenaires ou à une distance intermembranaire précise. Cependant, nous avons montré que VAP-A ACC, plus rigide et plus longue, dont la taille correspond à celle de VAP-A WT, se concentre également au niveau des MCSs RE/mitochondrie et que VAP-A sL1/2 se relocalise au niveau des MCSs RE/TGN lorsqu'ils sont artificiellement stabilisés. De plus, le positionnement d'OSBP à la surface des mitochondries favorise la localisation de VAP-A sL1/2 au niveau du MCS RE/mitochondrie dans les cellules dépourvues de VPS13A et PTPIP51. Ainsi, il est peu probable qu'un mécanisme de ségrégation médié par la taille se produise. Dans l'ensemble, les stratégies expérimentales présentées indiquent que VAP-A sL1/2 se concentre préférentiellement dans les MCSs ayant une plus grande stabilité, tandis que les linkers flexibles de VAP-A lui permettent son engagement dans des MCSs hautement dynamiques, comme les MCSs RE/TGN, à courte durée de vie. Nous proposons que les IDRs de VAP-A se comportent comme des ressorts moléculaires qui assurent sa flexibilité verticale et latérale pour fournir un ancrage adaptatif aux MCSs. Le modèle de la figure R15 montre que grâce à ses IDRs flexibles, VAP-A fixe les membranes dans différents contextes de MCSs, y compris les MCSs RE/TGN, qui dépendent du turnover de PI4P et qui sont donc soumis à des fluctuations membranaires, alors que VAP-A sL1/2 nécessite des contacts plus stables pour interagir efficacement avec ses partenaires (article 6).



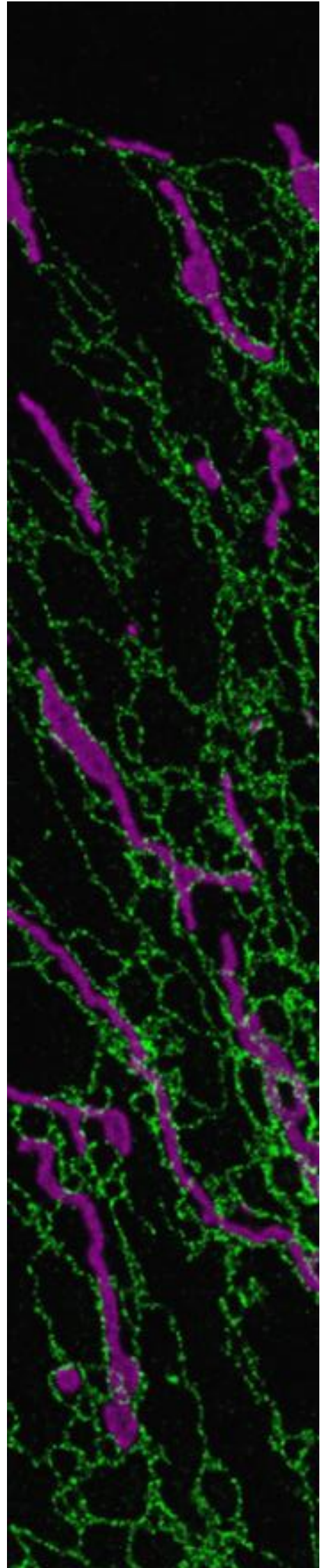
**Figure R15** : Modèle montrant que les linkers de VAP-A WT permettent au domaine MSP d'explorer un espace plus large pour se lier à différents partenaires et ainsi adapter sa fonction à divers MCSs, tandis que VAP-A sL1/2, rigide, est contraint aux MCSs RE/mitochondrie stables.

**(c) Contribution des auteurs :**

Bruno Mesmin et Daniel Lévy ont conçu l'étude. Bruno Mesmin, Daniel Levy et moi avons conçu les expériences que j'ai réalisées. Manuella Dezi, Joëlle Bigay, Bruno Mesmin et moi avons purifié les protéines. Aurélie Di Cicco, Manuella Dezi et Daniel Lévy ont réalisé l'imagerie et l'analyse cryo-EM. Sandra Lacas-Gervais a réalisé l'imagerie EM. Sophie Abélanet et moi avons réalisé l'imagerie STED. Ana Rita Dias Araùjo, Lucile Fleuriot et Delphine Debayle ont réalisé des analyses lipidomiques et des mesures par spectrométrie de masse. Romain Gautier a effectué des

simulations de dynamique moléculaire. Fanny Roussi a synthétisé le CTL et la SWG. Bruno Antony et Amanda Patel ont fourni des conseils sur la conception expérimentale. Bruno Mesmin et moi avons rédigé l'article (Subra et al., 2023b).

# **Discussion & conclusion**



## Partie E Discussion et conclusion

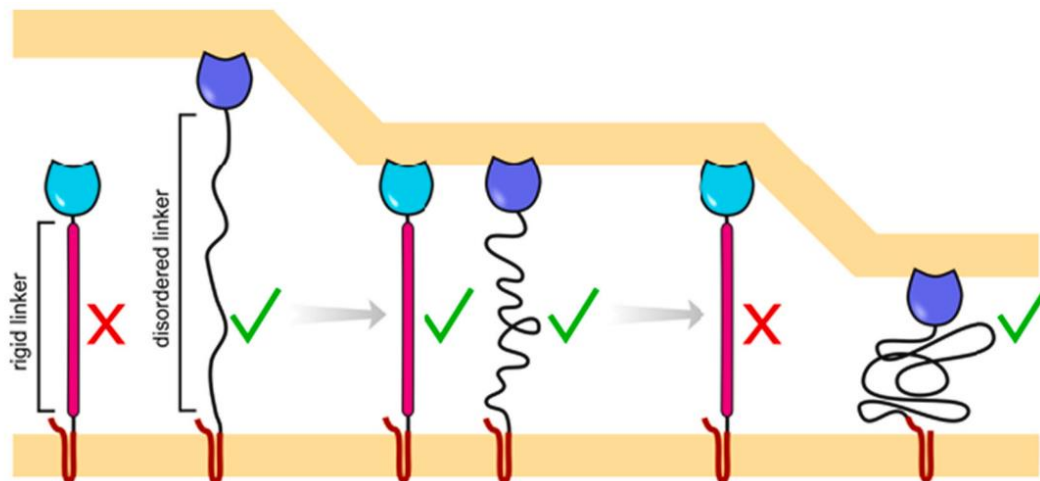
### 1. Discussion

#### (a) Rôles des IDRs dans les MCSs

De nombreuses protéines enrichies dans les MCSs contiennent des segments prédits comme étant des IDRs (Gatta and Levine, 2017; Jamecna and Antony, 2021); cependant, leurs rôles et leur impact sur la dynamique des protéines restent largement inexplorés. En dehors du fait que ces régions peuvent contenir des motifs permettant des interactions moléculaires et autres mécanismes de régulations décrits précédemment, leurs propriétés physiques et géométriques sont remarquables. Lorsque ces IDRs sont suffisamment longues, comme c'est le cas dans Ist2, l'une de leurs principales fonctions au niveau des MCSs est de franchir l'espace interorganellaire pour former un pont moléculaire entre les membranes (D'Ambrosio et al., 2020; Kralt et al., 2015). A l'inverse, les linkers courts peuvent restreindre le champ d'action des domaines catalytiques. Par exemple, ce mécanisme empêche la phosphatase Sac1 d'hydrolyser le PI4P en trans au niveau des MCSs (Zewe et al., 2018). De plus, notre laboratoire a montré récemment que l'IDR N-terminale d'OSBP permet de diminuer la densité protéique au niveau des MCSs et ainsi, facilite les mouvements latéraux des protéines (Jamecna et al., 2018). Dans le contexte confiné des MCSs, les IDRs semblent réguler la dynamique des protéines. Il a été montré dans d'autres contextes que les IDRs favorisent la transition de phase (Wang et al., 2018), il est possible que les MCSs, qui comportent beaucoup d'IDRs soient dans un étatphasique différent du cytosol, mais ceci n'a pas été exploré.

Mes travaux de thèse révèlent un nouveau rôle clé pour les IDRs au sein des MCSs : permettre l'attachement de la membrane à plusieurs MCSs présentant des dynamiques différentes. D'ailleurs, des simulations de systèmes d'apposition membranaire à gros grains avaient déjà montré que des récepteurs et des ligands rigides ancrés à une membrane se dissocient plus facilement lorsque cette membrane fluctue (Hu et al., 2013). A comparer avec une protéine reliée à une seule membrane, le MCS met en jeux deux membranes différentes, ce qui

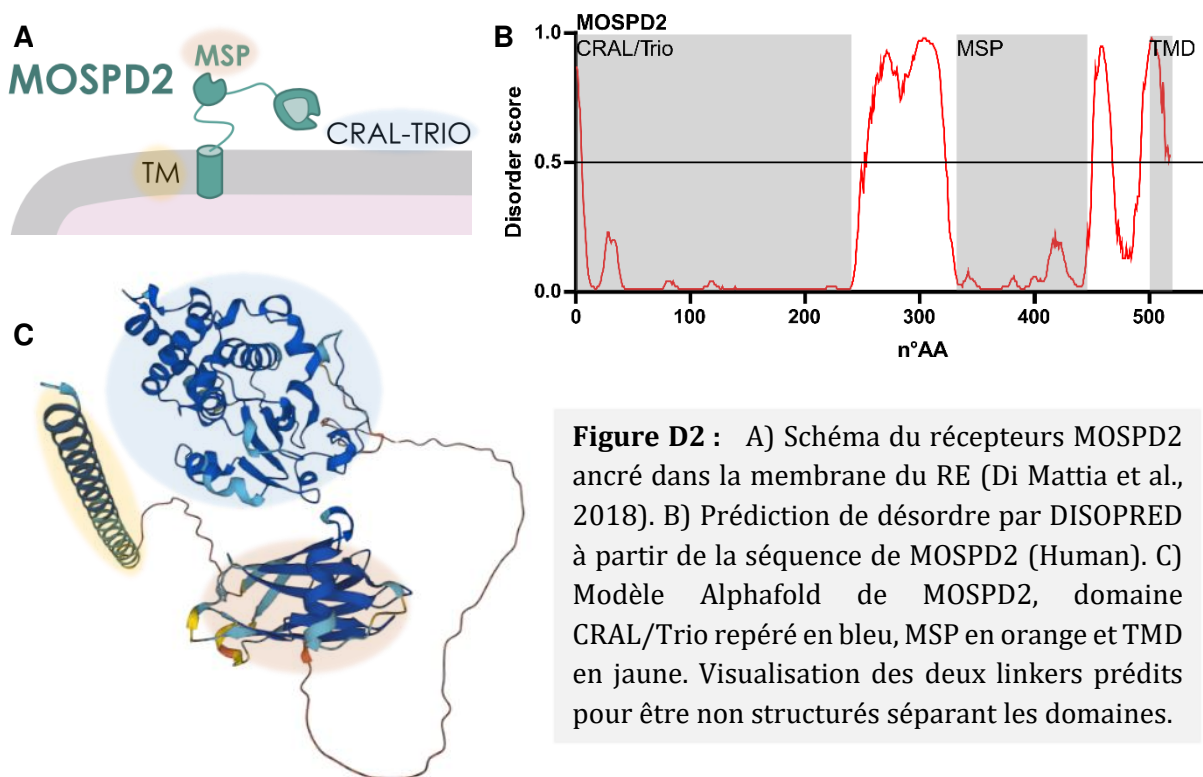
diminue la stabilité de l'environnement protéique et pourrait aussi justifier l'abondance des IDRs. Les MCSs RE/TGN considérés comme instables, ne sont pas les seuls concernés par le turnover du PI4P. En effet, d'autres MCSs évoqué dans ce manuscrit montrent également une dépendance au métabolisme des PIPs. Les protéines qui y sont impliquées pourraient donc être incluses ou exclues de ces sites en fonction de leur flexibilité. Entre autres, ce paramètre physique pourrait alors permettre à la cellule d'orchestrer la distribution des protéines. De toute évidence, un grand avantage du désordre intrinsèque est de contourner plusieurs contraintes imposées par les MCSs. En effet, un récepteur flexible peut être engagé dans des MCSs de largeur variable et ainsi s'adapter aux fluctuations intermembranaires (figura D1) (Jamecna et Antony, 2021).



**Figure D1 :** Attachement par des liens rigides comparé à un attachement par des IDRs. Les IDRs peuvent mieux s'adapter aux fluctuations de la membrane et peuvent occuper des MCSs peuplés d'une variété de tethers rigides ou non, alors que les tethers rigides imposent une distance intermembranaire et une stabilité (Jamecna et Antony, 2021).

D'autres récepteurs ayant un rôle commun avec les VAPs ont été décrits récemment. Par exemple, la protéine MOSPD2 qui comporte un domaine MSP, est ancrée au RE par son TMD et est impliquée dans la formation des MCSs entre le RE et les endosomes, les mitochondries et le Golgi grâce à son interaction avec les protéines contenant des motifs FFAT. Bien que 10 fois moins abondante, cette protéine semble jouer un rôle proche de celui de VAP-A. En plus de son domaine MSP elle possède le domaine CRAL/Trio qui serait impliqué dans le transport de lipides (Di Mattia et al., 2018). A elle seule, MOSPD2 pourrait remplir la fonction d'un complexe de type OSBP/VAP, c'est-à-dire assurer aussi bien l'attachement des membranes dans le MCS que le transfert de

lipides. Cependant, des recherches plus approfondies sont nécessaire pour vérifier cette hypothèse et définir les espèces lipidiques prises en charge par le domaine CRAL/Trio. D'autre part, le rôle des IDRs prédites de MOSPD2 n'a pas été exploré, des différences de flexibilité entre les MOSPDs et les VAPs pourraient être à l'origine de la répartition de ces récepteurs dans la cellule. En effet MOSPD2 possède un premier linker entre le domaine TRAL/Crio et le domaine MSP qui pourrait permettre le mouvement de son domaine TRAL/Crio et un second linker de 48 résidus entre le domaine MSP et le TMD qui pourrait servir de ressort adaptatif, à l'image des linkers de VAP-A (figure D2). D'autre part, cette protéine ne possède pas de coiled-coil, il semble



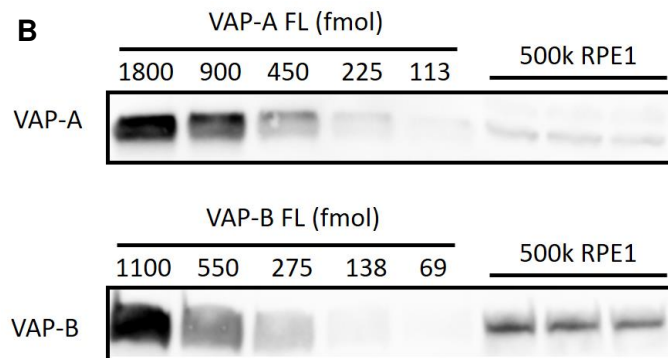
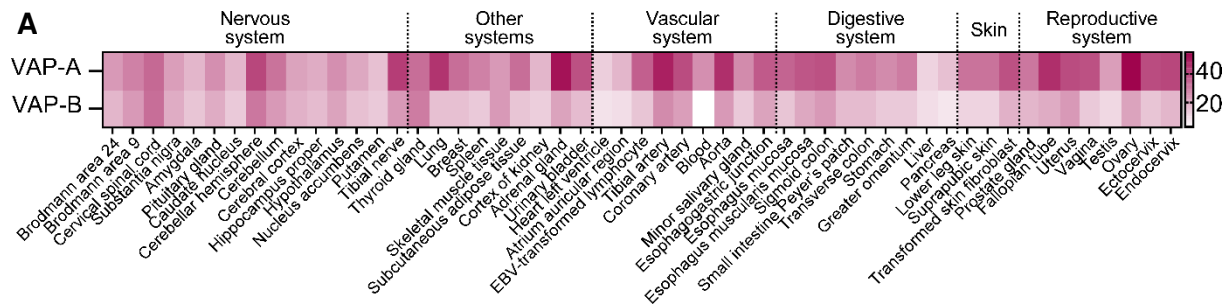
qu'elle fonctionne en monomère à l'inverse des VAPs, il serait intéressant de savoir si l'état oligomérique des récepteurs peut aussi impacter leur flexibilité, la stabilité des MCSs et la force des interactions avec leurs partenaires. Il est possible que VAP-A et VAP-B soient préférentiellement en interaction avec des partenaires dimériques comme OSBP. Les interactions faibles entre le domaine MSP et le motif FFAT pourraient ainsi être consolidées par la multiplication des liens. Dans ce cas, l'interaction VAP-A/VPS13A (qui est monomérique) pourrait être plus faible que l'interaction OSBP/VAP. RELCH, un autre récepteur pour OSBP qui interagit avec Rab11 au niveau de l'endosome de recyclage (Sobajima et al., 2018), possède aussi des IDRs



prédites. Cette caractéristique de flexibilité décrite pour VAP-A pourrait être étendue à d'autres types de récepteurs.

### **(b) Différences et ressemblances entre VAP-A et VAP-B**

Des études précédentes ont examiné le rôle de VAP-B dans les MCSs RE/mitochondrie, notamment en interaction avec PTPIP51 (De vos et al., 2012) mais rarement celui de VAP-A. Pourtant, VAP-A est abondamment présent dans ces MCSs. De manière surprenante, nos données montrent des implications divergentes de VAP-A et VAP-B sur les niveaux de CL et la morphologie des mitochondries (figure R9). Le KO de VAP-A entraîne un défaut de fusion accompagné d'une baisse du taux de CL et d'une morphologie particulière, tandis que le KO de VAP-B ne présente aucun effet sur les cellules RPE1. Il est important de noter que, contrairement à VAP-B, le KO de VAP-A est létal au stade embryonnaire chez la souris (Kabashi et al., 2013; Mccune et al., 2017), il est possible que l'un des deux récepteurs soit moins important que l'autre selon le type cellulaire. D'ailleurs, des différences d'expression géniques sont observables en fonction des tissus entre VAP-A et VAP-B, par exemple, il n'y a pas d'ARN messager de VAP-B détecté dans le sang. De manière générale, le gène VAP-A semble plus transcrit que VAP-B excepté dans le système nerveux où les expressions semblent équilibrées (figure D3). L'abondance protéique change en fonction du type cellulaire et selon les études le résultat obtenu est variable : parfois 30 fois moins de VAP-B que de VAP-A (Di Mattia et al., 2018), parfois un niveau équivalent dans des cellules Hela (Hein et al., 2015). J'ai donc évalué l'abondance de VAP-A et de VAP-B dans mon modèle cellulaire : les RPE1. Mes résultats indiquent qu'il y a environ 300 000 copies de VAP-B et 150 000 copies de VAP-A, ces abondances sont comparables (figure D3). Il semble donc que l'abondance relative de la protéine ne soit pas directement liée à leur « importance » dans la cellule.



**Figure D3 :** A) Séquençage des ARN de VAP-A et B d'une base de données de 53 tissus humain (Genotype-Tissue Expression (G-Tex) Project), unité arbitraire. B) Quantification de VAP-A et VAP-B endogènes dans des cellules RPE1 par western blot. Les standards proviennent de quantités connues de VAP-A ou VAP-B purifiées. Le lysat total de 500 000 RPE1 a été déposé sur chacune des 3 lignes puis les protéines ont été détectées à l'aide d'anticorps anti VAP-A ou VAP-B.

Les séquences de VAP-A et de VAP-B sont très proches (63% d'identité et 85% de similarité). VAP-B est légèrement plus courte. Les 82 % d'identité entre les deux domaines MSP expliquent que les interactomes de ces deux protéines se superposent. VAP-A et VAP-B sont organisée de la même façon, avec un domaine MSP, un TMD et deux linkers (IDRs) séparés par un domaine coiled-coil. Les différences de séquences se trouvent principalement au niveau des IDRs et du coiled-coil, dans la région « tige » (41,7 % d'identité de séquence) ceci peut expliquer que ces deux protéines ne s'organisent pas en hétérodimères (figure D4). Les variations dans la région de la « tige » de VAP peuvent aussi contribuer à des préférences d'interaction ou de localisation. La séquence des domaines transmembranaires des deux récepteurs sont également légèrement variables. Il est possible que ceux-ci soient adaptés à des contextes membranaires légèrement différents. Leur flexibilité pourrait également être différente, en effet les IDRs de VAP-B n'ont pas été caractérisées expérimentalement.

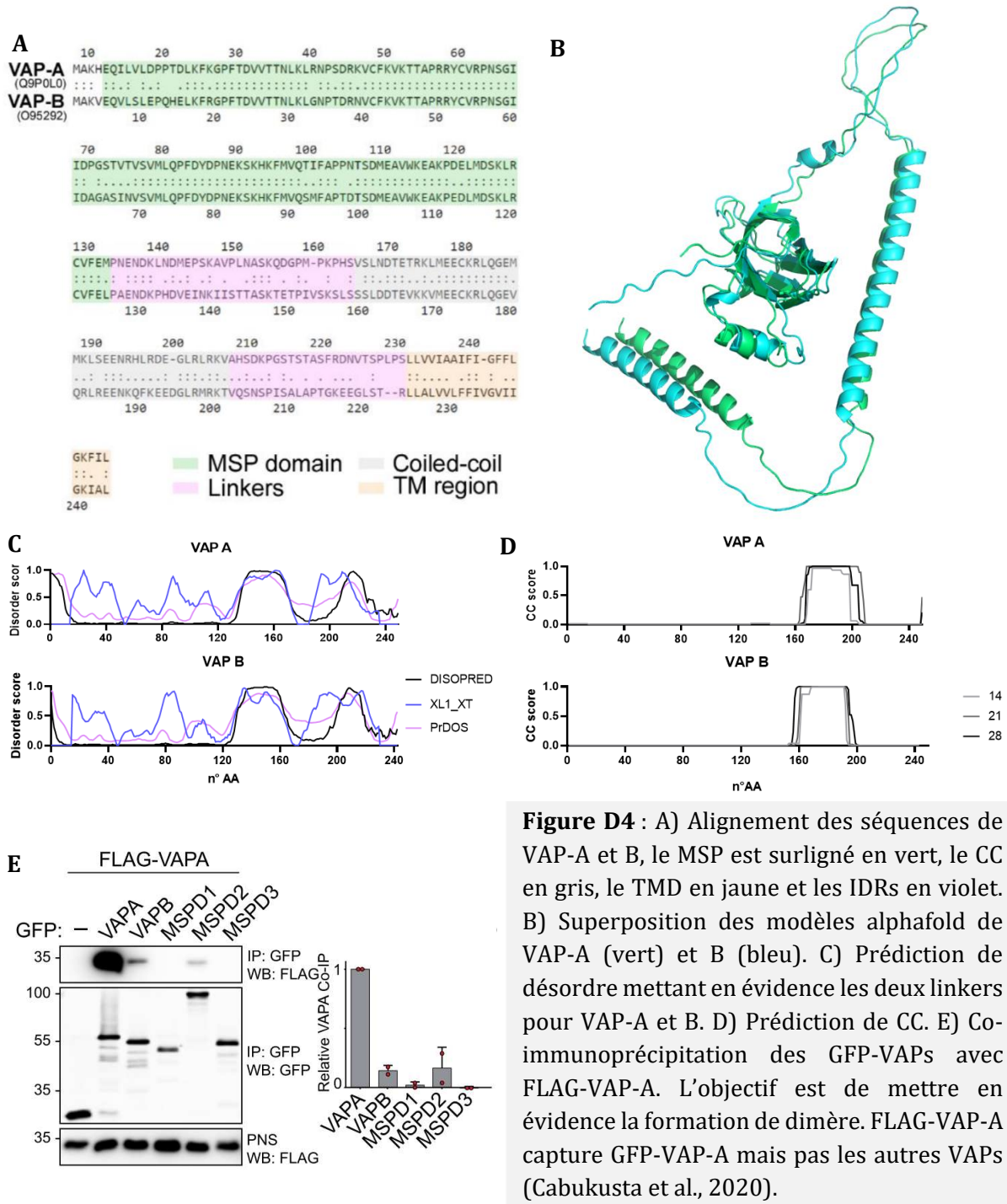
La raison pour laquelle il existe deux versions de VAP reste donc inconnue à ce jour. Discriminer des fonctions qui ne sont pas partagées par VAP-A et VAP-B sera le but d'études

ultérieures au laboratoire. Pour cela il faudra analyser les cellules VAP-B KO et trouver des défauts qui ne soient pas associés à la perte de VAP-A. Vérifier si VAP-A et/ou VAP-B sont capables de rétablir les défauts induits par KO de VAP-A ou VAP-B. Y compris le défaut de fusion mitochondriale et l'activité d'OSBP. Etant donné que les différences entre VAP-A et B se situent principalement au niveau de la région « tige » on pourrait se demander si les différences dans leur interactome proviennent de cette région et si les VAPs peuvent interagir avec d'autres protéines via cette région. En effet il a été montré que la protéine antivirale IFITM3 (Interferon-inducible transmembrane protein 3), dont l'expression est augmentée pendant l'infection, interagit avec VAP-A via sa région « tige » pour empêcher son association avec OSBP et inhiber la prolifération virale (Amini-Bavil-Olyaei et al., 2013). Cette observation ouvre un nouveau champ de partenaires probables pour les protéines VAPs en plus des interactants à motif FFAT.

Des protéines identifiées dans le VAPome ne sont pas communes à VAP-A et VAP-B : les Sorting nexins (SNX). Grâce à leur domaine BAR, elles sont impliquées dans la formation de vésicules destinées à la membrane pour le transport de cargos (Sun et al., 2020). A l'exception de SNX2 (Dong et al., 2016), ces protéines ne possèdent pas de motif FFAT. Elles sont retrouvées uniquement dans l'interactome de VAP-B, le mécanisme d'interaction et le rôle de cette interaction n'est pas connu (figure 87) (James and Kehlenbach, 2021). Le rôle des régions IDRs N-terminales des SNX-BARs dans l'assemblage et la fonction du complexe n'a pas non plus été exploré. De plus, certaines mutations connues sur VAP-B conduisent à un phénotype d'agrégation et à l'ALS8 (Kabashi et al., 2013), il serait primordial de disséquer celles qui se produisent dans la région « tige » de VAP-B.

A cela s'ajoute les protéines MOSPD et la forme longue de VAP-A. A ce jour, cette redondance reste incomprise. On pourrait penser qu'il s'agit d'une assurance qui protégerait la cellule de l'arrivée de mutations sur une protéine qui lui est essentielle, d'autant que la levure possédait déjà deux versions de VAP (Scs2 et Scs22). Cependant, chaque protéine ne peut substituer l'autre complètement. Dans les cellules RPE1 VAP-A KO, VAP-B ne peut reverser le défaut de fusion mitochondriale, et le double KO VAP-A et VAP-B n'est pas viable. Le linker 1 de

VAP-A L est plus long de 45 résidus, cette insertion pourrait apporter encore plus de flexibilité à VAP-A, le rôle de ce variant reste à explorer. Il est probable que chacun de ces récepteurs aient des partenaires, ou des missions qui leur sont spécifiques, régies par leur flexibilité ou par la séquence de leur région « tige », très peu étudiée jusqu'à présent (article 5, en révision).



**Figure D4 :** A) Alignement des séquences de VAP-A et B, le MSP est surligné en vert, le CC en gris, le TMD en jaune et les IDRs en violet. B) Superposition des modèles alphafold de VAP-A (vert) et B (bleu). C) Prédiction de désordre mettant en évidence les deux linkers pour VAP-A et B. D) Prédiction de CC. E) Co-immunoprécipitation des GFP-VAPs avec FLAG-VAP-A. L'objectif est de mettre en évidence la formation de dimère. FLAG-VAP-A capture GFP-VAP-A mais pas les autres VAPs (Cabukusta et al., 2020).

### (c) Espèces de CL affectées par le KO de VAP-A

Nos travaux indiquent que VAP-A agit comme un acteur clé dans la fusion mitochondriale, ce qui suggère un rôle physiologique jusqu'ici inconnu pour cette protéine. Nous avons observé des modifications morphologiques des mitochondries en l'absence de VAP-A, ou de ses interactants PTPIP51 et VPS13A, qui transfèrent le PA entre les membranes. Ces changements sont corrélés à une diminution des taux de CL dans les mitochondries. Des altérations similaires de la forme des mitochondries ont également été décrites chez la drosophile KO pour VPS13D (Anding et al., 2018). Après la synthèse des CL dans l'IMM, un remodelage des CL médié par la tafazzine se produit, ce qui entraîne la présence d'espèces polyinsaturées (Schlame and Xu, 2020). Nos résultats indiquent que les espèces qui diminuent de façon prédominante après l'élimination de VAP-A présentent des chaînes d'acyle gras de faible poids moléculaire et plus saturées (figure supplémentaire 4/Article 3). Ceci suggère que les espèces nouvellement synthétisées sont principalement affectées par le KO de VAP-A, et confirme le rôle de VAP-A dans la facilitation du transfert de PA, précurseur des CL, vers les mitochondries.

La CL est directement impliquée dans la fusion de la membrane interne des mitochondries par le biais d'interactions avec l'enzyme OPA1. A la membrane externe, la fusion médiée par la mitofusine est stimulée par l'enzyme MitoPLD qui hydrolyse la CL pour générer du PA, lequel a vraisemblablement des propriétés fusogènes en raison de sa petite tête polaire (Kameoka et al., 2018). Le silencing de la MitoPLD induit d'ailleurs une fragmentation des mitochondries qui ressemble à celle que nous observons dans les cellules VAP-A KO (Zhang et al., 2016). Nous avons montré que VAP-A est un acteur central de la fusion mitochondriale, contrôlant le métabolisme lipidique des mitochondries. Cependant, au niveau des MCSs RE/mitochondrie, le transfert de PA vers les mitochondries par VPS13A et PTPIP51 n'a pas été mesuré directement, et d'autres interactants de VAP-A comme MIGA2 peuvent également contribuer à ce transfert (Hong et al., 2022). Ces résultats pourraient donc être validés dans un contexte permettant la visualisation PA au niveau des mitochondries ou la mesure du transfert de PA *in situ*. D'autres dysfonctionnements mitochondriaux potentiels résultant de VAP-A KO, outre le défaut de fusion et la mitophagie n'ont

pas été abordés, nous aurions pu vérifier la respiration mitochondriale même si la morphologie des crêtes ne semblait pas affectée.

#### **(d) Rôles inexplorés de VAP-A**

Les récepteurs VAPs sont universels et présentent un large interactome qui n'est pas complètement exploré. Afin de mener notre étude, nous avons mis au point plusieurs lignées VAP-A KO grâce auxquelles nous avons étudié l'activité des MCSs RE/TGN et RE/mitochondrie. Cependant, VAP-A est impliquée dans l'élaboration d'autres MCSs, notamment avec la membrane plasmique, le lysosome, ou encore le peroxysome. Le KO de VAP-A pourrait donc avoir une incidence sur l'intégrité de ces MCSs et sur les transferts de lipides qui s'y produisent. Par exemple, il est connu qu'en interagissant avec ACBD5 via un motif FFAT, VAP-A et B participent à l'élongation de la membrane du peroxysome. Au même titre que les mitochondries, le silencing de VAP-A et/ou VAP-B affecte la morphologie des peroxysomes (Costello et al., 2017; Hua et al., 2017). Il serait intéressant de comparer la composition membranaire des peroxysomes lorsque les MCSs avec le RE sont détruits et de vérifier l'implication d'autres LTPs dans l'élongation de ces membranes. De plus, nous avons montré que le KO de VAP-A altère l'activité d'OSBP, elle-même indispensable au trafic vésiculaire post-golgien (Péresse et al., 2020). Grâce au système RUSH, il serait possible de mesurer l'implication de VAP dans la sécrétion.

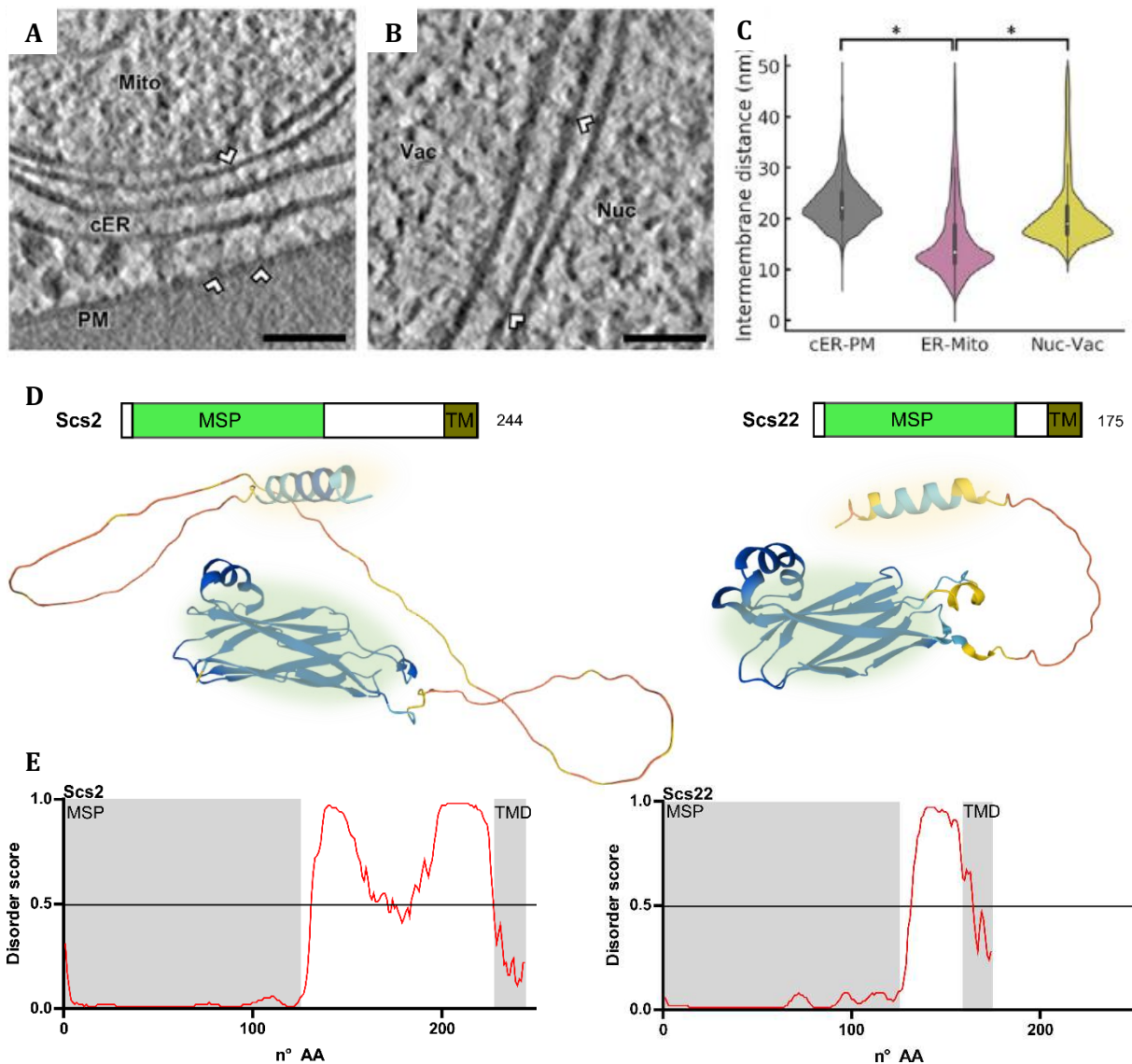
De façon plus exploratoire, il serait intéressant de disséquer l'implication de VAP-A dans la formation de MCSs entre le RE et les organelles sans membranes « P-bodies » récemment décrits pour être impliqués dans la fusion et la fission de ces compartiments (Lee et al., 2020).

#### **(e) Distances intermembranaires et fluctuations**

Nos travaux mettent en évidence des hétérogénéités moléculaires et fonctionnelles entre les MCSs RE/TGN et RE/mitochondrie, qui incluent très probablement des changements des distances intermembranaires couplés à la dynamique de leurs composants spécifiques. L'épaisseur d'un seul type de MCS, souvent observé par microscopie électronique dans des échantillons inclus dans une résine ou par cryo-EM *in situ*, montre de très grandes variations du

point de vue moléculaire (MCSs RE/Golgi de cellules Hela : 5 à 20 nm ; MCSs RE/mitochondrie de levure :  $16 \pm 7$  nm). Cependant ces mesures représentent des captures instantanées de ces systèmes qui sont en réalité dynamiques. Déterminer des fluctuations de distances inter membranaires avec une haute résolution spatio-temporelle serait utile pour décrire finement la structure et la dynamique des MCSs, en réalisant des expériences de FRET *in cellula* par exemple. En ce qui concerne la dynamique spécifique des MCSs RE/TGN, il reste à déterminer si VAP-A s'adapte au rythme imposé par le renouvellement de PI4P ou si c'est une question de géométrie fluctuante de la membrane. Chez la levure, des MCSs de tailles variables ont aussi été observés, parfois plus petits, jusqu'à 7 nm entre le RE cortical et la membrane plasmique lors de la surexpression de Tcb3 (Collado et al., 2019b)(Hoffmann et al., 2019). Scs2 et Scs22, les homologues des VAPs chez la levure, possèdent un domaine MSP et un TMD, ces deux derniers sont séparés par une IDR plus ou moins longue, contrairement à VAP-A et VAP-B, elles sont monomériques (figure D5). Les spécificités de ces protéines ne sont pas décrites, mais il est possible que chacune soit adaptée à des contextes distincts.

A première vue, on aurait pu considérer que VAP-A sL1/2 s'accumule au niveau des MCSs RE/mitochondrie en raison de sa plus petite taille par rapport à VAP-A WT, comme pour s'adapter à la taille de ses partenaires ou à une distance inter membranaire précise. Cependant, nous avons montré que VAP-A ACC, plus rigide et plus long, dont la taille correspond à celle de VAP-A WT, se concentre également au niveau des MCSs RE/mitochondrie, et que VAP-A sL1/2 se relocalise au niveau des MCSs RE/TGN lorsqu'ils sont artificiellement stabilisés. Ainsi, il est peu probable qu'un mécanisme de ségrégation médié par la taille se produise. Nous avons donc proposé un model



**Figure D5 :** A et B) Images de cryo-ET de MCSs chez *Saccharomyces Cerevisiae* révélant des densités protéiques de diverses morphologies comblant l'espace entre les membranes (repérés par les flèches blanches). PM : membrane plasmique, cER : reticulum cortical, Vac : vacuole, Nuc : Noyau. Echelle 50 nm. C) Graphiques en violon montrant la distribution des distances intermembranaires des MCSs cER/PM, RE/mitochondrie et noyau/vacuole. Les graphiques montrent la distribution complète des valeurs incluant tous les MCSs analysés (Collado et al., 2019b). D) Modèles AlphaFold des homologues de VAP chez la levure Scs2 et Scs22. Le domaine MSP est repéré en vert et le TMD en jaune. E) Prédiction de désordre DISOPRED pour les protéines Scs2 et Scs22.

selon lequel les IDR de VAP-A se comportent comme des ressorts moléculaires qui assurent sa flexibilité verticale et lui permettent de s'adapter à l'environnement. Les caractéristiques moléculaires qui assurent sa flexibilité permettent un ancrage adaptatif au niveau des MCSs, ce qui facilite l'adhésion membrane-membrane lorsque la distance inter membranaire fluctue. Notre

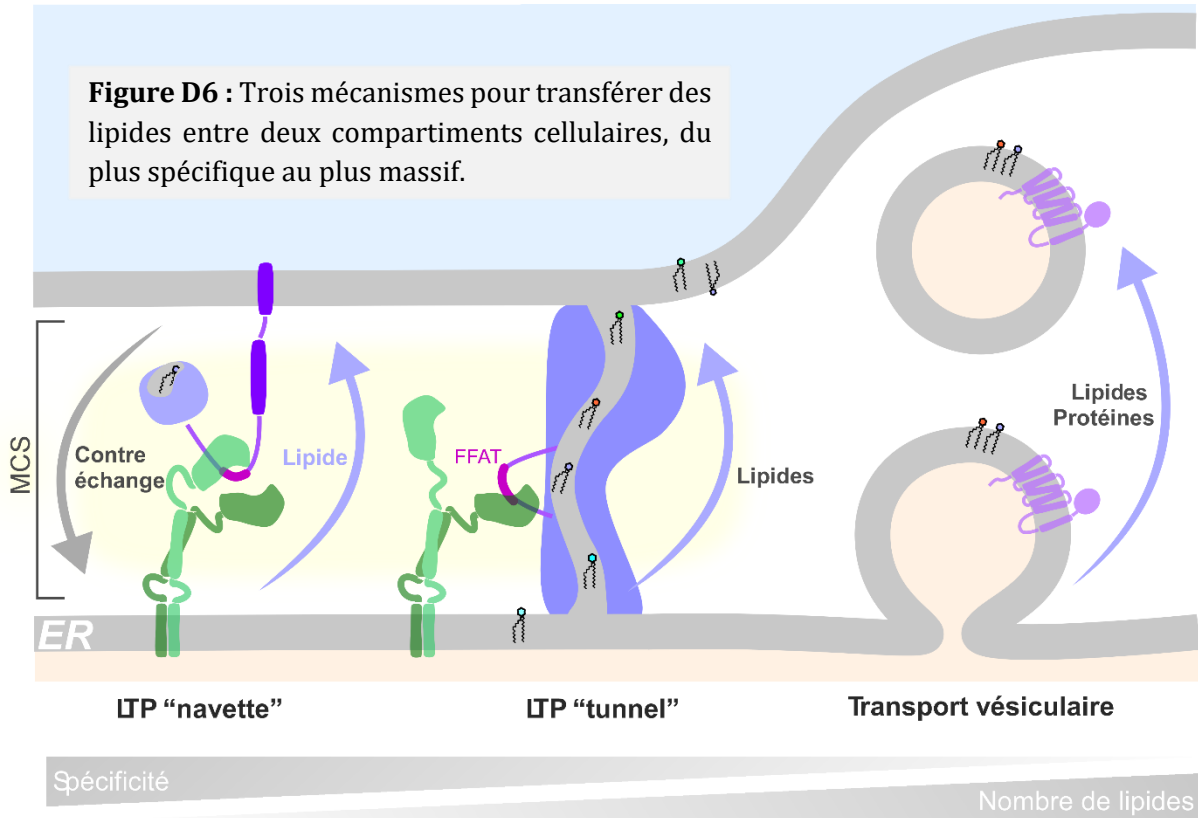


modèle (figure R15) montre qu'en raison de ses IDR flexibles, VAP-A fixe les membranes dans n'importe quel contexte de MCSs, y compris les MCSs RE/TGN, qui dépendent fortement du renouvellement de PI4P, soumis à des fluctuations, alors que VAP-A sL1/2 nécessite des contacts plus stables pour interagir efficacement avec ses partenaires. On pourrait en revanche se demander si réduire la taille des linkers de VAP-A impose une réduction de l'espace intermembranaire dans les MCSs RE/mitochondrie et si cette réduction artificielle de l'espace a une incidence fonctionnelle sur les partenaires engagés dans le site. De nombreuses questions restent ouvertes : la distance intermembranaire reste-t-elle imposée par des grandes protéines comme VPS13 ? Est-ce qu'une LTP « navette » comme PTPIP51 a besoin d'un espace minimal pour la mobilité de son domaine TPR et pour transférer normalement les lipides ? Quels sont les méthodes expérimentales qui pourraient être mises en place *in situ* pour mesurer précisément l'espace intermembranaire et le transfert de lipides entre les compartiments ?

#### **(f) Questions en suspens sur le transfert de lipides dans les MCSs**

Notre étude a permis de mettre en évidence que la qualité du partenaire n'était pas importante comparée à la stabilité du MCS pour la localisation du récepteur VAP-A. En effet, déplacer artificiellement OSBP à la surface des mitochondries favorise la localisation de VAP-A sL1/2 au niveau des MCSs RE/mitochondrie dans les cellules dépourvues de VPS13A et PTPIP51. Cependant, lorsque le mutant rigide VAP-A sL1/2 est déplacé dans les MCSs RE/mitochondrie, il peut être en interaction avec plusieurs partenaires ayant des structures variées. Nous n'avons aucune évidence qui montre que ce mutant de VAP-A interagit plus avec PTPIP51, qui a une structure proche d'OSBP, comprenant des régions flexibles et des domaines mobiles, qu'avec VPS13A, une protéine bien plus imposante qui traverse la totalité du MCS. Il semble que le KO de VPS13A ait un impact inférieur à celui de PTPIP51 sur la morphologie des mitochondries. Cependant, cette protéine est 100 fois moins abondante. Le positionnement de VAP-A par rapport à VPS13A pourrait nécessiter une certaine flexibilité, il est donc possible que le mutant VAP-A sL1/2 interagisse préférentiellement avec PTPIP51 à la mitochondrie. La cryo-EM *in situ* dans des MCSs RE/mitochondrie pourrait permettre de visualiser la répartition des différentes LTPs et





## 2. Conclusion

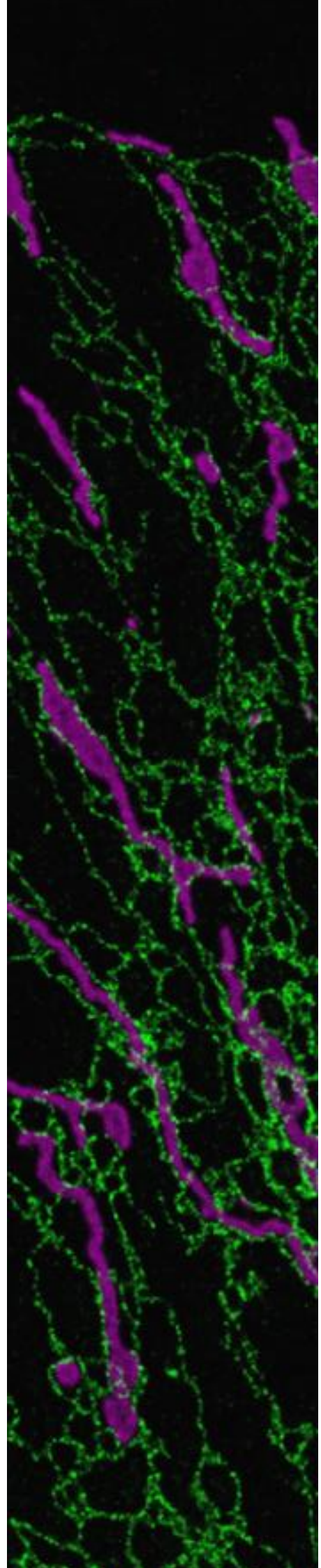
L'importance physiopathologique des MCSs est aujourd'hui bien établie, cependant les caractéristiques moléculaires des protéines impliquées dans leurs fonctions restent peu explorées. De nombreuses protéines qui sont enrichies aux MCSs contiennent des IDRs. Juste avant mon arrivée en thèse, notre équipe démontrait que l'IDR N-terminale d'OSBP, très riche en Gly/Ala/Pro, crée un grand volume d'exclusion, également appelé barrière entropique, permettant de réguler sa concentration dans les MCSs RE/TGN et d'accélérer sa mobilité latérale. Comme de nombreuses ORPs, ainsi que d'autres LTPs, contiennent des IDRs en N-ter (ou C-ter), ce mécanisme pourrait être général. Cependant, les séquences IDR de ces autres protéines présentent des variations par rapport à OSBP, dont la charge électrostatique, suggérant des mécanismes différents qui restent à ce jour à explorer.

Peu après cette étude, les analyses structurales de MCSs reconstitués avec VAP-A et N-PH-FFAT menées en collaboration avec l'équipe de Daniel Lévy ont montré l'organisation du domaine

central de dimérisation d'OSBP. Lors de cette même analyse, il a été observé que VAP-A pouvait, selon sa densité latérale, former des MCSs de distance intermembranaire variable (de 10 à 30 nm), suggérant qu'il s'agit d'une molécule flexible qui pourrait s'adapter à la taille de ses partenaires dans un MCS (de la Mora et al., 2021). Toutefois, à cette période, si l'interaction entre domaine MSP et motif FFAT est bien caractérisée structurellement, il n'y a pas de modèle moléculaire qui explique comment VAP interagit avec des centaines de cibles dans des MCSs si différents en termes de géométrie et de dynamique.

Mes travaux de thèse ont permis de démontrer l'existence et les propriétés de deux IDRs dans la séquence de VAP-A qui rendent la protéine flexible. En combinant différentes approches moléculaires et cellulaires, j'ai montré que ces IDRs assurent l'engagement et la fonction de VAP-A dans différents MCSs. En remplaçant VAP-A endogène par des constructions rigides, j'ai observé leur redistribution massive vers les MCSs RE/mitochondrie, qui sont stables, perturbant ainsi les flux lipidiques au niveau des MCSs RE/TGN, dont la durée de vie est courte. Ainsi, la flexibilité conformationnelle médiée par les IDRs de VAP-A assure sa plasticité et son engagement dans les MCSs. Notre étude apporte un concept novateur dans l'univers des MCSs en montrant que les protéines qui s'y trouvent doivent être adaptables, via des régions agissant comme des ressorts moléculaires. De plus, ces travaux attribuent une nouvelle fonction à des régions protéiques peu considérées durant des décennies.

# Références



## Partie F Références

- Abrisch, R.G., Gumbin, S.C., Wisniewski, B.T., Lackner, L.L., and Voeltz, G.K. (2020). Fission and fusion machineries converge at ER contact sites to regulate mitochondrial morphology. *J. Cell Biol.* 219. <https://doi.org/10.1083/jcb.201911122>.
- Adachi, Y., Itoh, K., Yamada, T., Cervený, K.L., Suzuki, T.L., Macdonald, P., Frohman, M.A., Ramachandran, R., Iijima, M., and Sesaki, H. (2016). Coincident Phosphatidic Acid Interaction Restrains Drp1 in Mitochondrial Division. *Mol. Cell* 63, 1034–1043. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.013>.
- Adachi, Y., Iijima, M., and Sesaki, H. (2018). An unstructured loop that is critical for interactions of the stalk domain of Drp1 with saturated phosphatidic acid. *Small GTPases* 0, 1–8. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1321614>.
- Adlakha, J., Hong, Z., Li, P., and Reinisch, K.M. (2022). Structural and biochemical insights into lipid transport by VPS13 proteins. *J. Cell Biol.* 221, 2003–2005. <https://doi.org/10.1083/jcb.202202030>.
- AhYoung, A.P., Jiang, J., Zhang, J., Dang, X.K., Loo, J.A., Zhou, Z.H., and Egea, P.F. (2015). Conserved SMP domains of the ERMES complex bind phospholipids and mediate tether assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E3179–E3188. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422363112>.
- Alberti, S., Gladfelter, A., and Mittag, T. (2019). Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell* 176, 419–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.035>.
- Alli-Balogun, G.O., and Levine, T.P. (2019). Regulation of targeting determinants in interorganelle communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 57, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.12.010>.
- Alpy, F., Rousseau, A., Schwab, Y., Legueux, F., Stoll, I., Wendling, C., Spiegelhalter, C., Kessler, P., Mathelin, C., Rio, M.C., et al. (2013). STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *J. Cell Sci.* 126, 5500–5512. <https://doi.org/10.1242/jcs.139295>.
- Altan-Bonnet, N. (2017). Lipid Tales of Viral Replication and Transmission. *Trends Cell Biol.* 27, 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.09.011>.
- Alvarez, L.A.J., Schwarz, U., Friedrich, L., Foelling, J., Hecht, F., and Roberti, M.J. (2021). TauSTED : pushing STED beyond its limits with lifetime.
- Amini-Bavil-Olyaei, S., Choi, Y.J., Lee, J.H., Shi, M., Huang, I.C., Farzan, M., and Jung, J.U. (2013). The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry. *Cell Host Microbe* 13, 452–464. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.006>.
- Ammar, M.R., Kassas, N., Chasserot-Golaz, S., Bader, M.F., and Vitale, N. (2013). Lipids in regulated exocytosis: What are they doing? *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 4, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00125>.
- Anding, A.L., Wang, C., Chang, T.K., Sliter, D.A., Powers, C.M., Hofmann, K., Youle, R.J., and Baehrecke, E.H. (2018). Vps13D Encodes a Ubiquitin-Binding Protein that Is Required for the Regulation of Mitochondrial Size and Clearance. *Curr. Biol.* 28, 287–295.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.064>.
- Antonio E. Rusinol, Zheng Cui, Ming H. Chen, and J.E.V. (1994). A Unique Mitochondria-associated Membrane Fraction from Rat Liver Has a High Capacity for Lipid Synthesis and Contains Pre-Golgi Secretory Proteins Including Nascent Lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 269. .
- Antonny, B., Bigay, J., and Mesmin, B. (2018). The Oxysterol-Binding Protein Cycle: Burning Off PI(4)P to Transport Cholesterol. *Annu. Rev. Biochem.* 1–29. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044924>.
- Asano, S.M., Gao, R., Wassie, A.T., Tillberg, P.W., Chen, F., and Boyden, E.S. (2018). Expansion Microscopy: Protocols for Imaging Proteins and RNA in Cells and Tissues. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 80, 1–41. <https://doi.org/10.1002/cpcb.56>.
- Balla, T. (2013). Phosphoinositides: Tiny Lipids With Giant Impact on Cell Regulation. *Physiol. Rev.* 93,

1019–1137. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2012>.

Balla, A., Tuymetova, G., Tsiomenko, A., Várnai, P., and Balla, T. (2005). A Plasma Membrane Pool of Phosphatidylinositol 4-Phosphate Is Generated by Phosphatidylinositol 4-Kinase Type-III Alpha: Studies with the PH Domains of the Oxysterol Binding Protein and FAPP1. *Mol. Biol. Cell* *16*, 1282–1295. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0578>.

Ban, T., Ishihara, T., Kohno, H., Saita, S., Ichimura, A., Maenaka, K., Oka, T., Mihara, K., and Ishihara, N. (2017). Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nat. Cell Biol.* *19*, 856–863. <https://doi.org/10.1038/ncb3560>.

Ban, T., Kohno, H., Ishihara, T., and Ishihara, N. (2018). Relationship between OPA1 and cardiolipin in mitochondrial inner-membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* *1859*, 951–957. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.05.016>.

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 II $\alpha$ . *Mol. Biol. Cell* *21*, 4141–4150. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-05-0424>.

Barman, B., Sung, B.H., Krystofiak, E., Ping, J., Ramirez, M., Millis, B., Allen, R., Prasad, N., Chetyrkin, S., Calcutt, M.W., et al. (2022). VAP-A and its binding partner CERT drive biogenesis of RNA-containing extracellular vesicles at ER membrane contact sites. *Dev. Cell* *57*, 974–994.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.03.012>.

Bean, B.D.M., Dziurdzik, S.K., Kolehmainen, K.L., Fowler, C.M.S., Kwong, W.K., Grad, L.I., Davey, M., Schluter, C., and Conibear, E. (2018). Competitive organelle-specific adaptors recruit Vps13 to membrane contact sites. *J. Cell Biol.* *217*, 3593–3607. <https://doi.org/10.1083/JCB.201804111>.

Belov, G.A., Nair, V., Hansen, B.T., Hoyt, F.H., Fischer, E.R., and Ehrenfeld, E. (2012). Complex Dynamic Development of Poliovirus Membranous Replication Complexes. *J. Virol.* *86*, 302–312. <https://doi.org/10.1128/jvi.05937-11>.

Bernhard, and Rouiller (1956). CLOSE TOPOGRAPHICAL RELATIONSHIP BETWEEN MITOCHONDRIA AND ERGASTOPLASM OF LIVER CELLS IN A DEFINITE PHASE OF CELLULAR ACTIVITY. *J. Cell Biol.* *2*. <https://doi.org/10.1083/jcb>.

Bian, X., Saheki, Y., and De Camilli, P. (2018). Ca<sup>2+</sup> releases E-Syt1 autoinhibition to couple ER-plasma membrane tethering with lipid transport. *EMBO J.* [https://doi.org/https://doi.org/insb.bib.cnrs.fr/10.15252/embj.201797359](https://doi.org/https://doi.org.insb.bib.cnrs.fr/10.15252/embj.201797359).

Bianchi, G., Mangiagalli, M., Barbiroli, A., Longhi, S., Santambrogio, C., Brocca, S., Bianchi, G., Mangiagalli, M., Barbiroli, A., Longhi, S., et al. (2022). Distribution of Charged Residues Affects the Average Size and Shape of Intrinsically Disordered Proteins To cite this version : HAL Id : hal-03640449 Distribution of Charged Residues Affects the Average Size and Shape of Intrinsically Disordered Proteins.

Bigay, J., and Antonny, B. (2012). Curvature, Lipid Packing, and Electrostatics of Membrane Organelles: Defining Cellular Territories in Determining Specificity. *Dev. Cell* *23*, 886–895. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.009>.

Bigay, J., Gounon, P., Roblneau, S., and Antonny, B. (2003). Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* *426*, 563–566. <https://doi.org/10.1038/nature02108>.

Bigay, J., Casella, J.F., Drin, G., Mesmin, B., and Antonny, B. (2005). ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J.* *24*, 2244–2253. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600714>.

Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., and Shaw, J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* *1*, 298–304. <https://doi.org/10.1038/13014>.

Boeynaems, S., Alberti, S., Fawzi, N.L., Mittag, T., Polymenidou, M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Shorter, J., Wolozin, B., Van Den Bosch, L., et al. (2018). Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. *Trends*

Cell Biol. 28, 420–435. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.004>.

Boncompain, G., Divoux, S., Gareil, N., De Forges, H., Lescure, A., Latreche, L., Mercanti, V., Jollivet, F., Raposo, G., and Perez, F. (2012). Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nat. Methods* 9, 493–498. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1928>.

Brandizzi, F., and Barlowe, C. (2013). Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 382–392. <https://doi.org/10.1038/nrm3588>.

Bullen, H.E., and Soldati-Favre, D. (2016). A central role for phosphatidic acid as a lipid mediator of regulated exocytosis in apicomplexa. *FEBS Lett.* 2469–2481. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12296>.

Burgett, A.W.G., Poulsen, T.B., Wangkanont, K., Anderson, D.R., Kikuchi, C., Shimada, K., Okubo, S., Fortner, K.C., Mimaki, Y., Kuroda, M., et al. (2011). Natural products reveal cancer cell dependence on oxysterol-binding proteins. *Nat. Chem. Biol.* 7, 639–647. <https://doi.org/10.1038/nchembio.625>.

Cabukusta, B., Berlin, I., van Elsland, D.M., Forkink, I., Spits, M., de Jong, A.W.M., Akkermans, J.J.L.L., Wijdeven, R.H.M., Janssen, G.M.C., van Veelen, P.A., et al. (2020). Human VAPome Analysis Reveals MOSPD1 and MOSPD3 as Membrane Contact Site Proteins Interacting with FFAT-Related FFNT Motifs. *Cell Rep.* 33, 108475. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108475>.

Cao, Y., Meng, S., Chen, Y., Feng, J., Gu, D., Yu, B., Li, Y., Yang, J., Liao, S., Chan, D.C., et al. (2017). MFN1 structures reveal nucleotide-triggered dimerization critical for mitochondrial fusion. *Nature* 1–5. <https://doi.org/10.1038/nature21077>.

Capasso, S., Sticco, L., Rizzo, R., Pirozzi, M., Russo, D., Dathan, N.A., Campelo, F., Galen, J., Hölttä-Vuori, M., Turacchio, G., et al. (2017). Sphingolipid metabolic flow controls phosphoinositide turnover at the trans - Golgi network. *EMBO J.* 36, 1736–1754. <https://doi.org/10.15252/embj.201696048>.

Caro, L.G., and Palade, G.E. (1964). PROTEIN SYNTHESIS, STORAGE, AND DISCHARGE IN THE PANCREATIC EXOCRINE CELL. *J. Cell Biol.* 20, 473–495. <https://doi.org/10.1083/jcb.20.3.473>.

Carravilla, P., Dasgupta, A., Zhurgenbayeva, G., Danylchuk, D.I., Klymchenko, A.S., Sezgin, E., and Eggeling, C. (2021). Long-term STED imaging of membrane packing and dynamics by exchangeable polarity-sensitive dyes. *Biophys. Reports* 1, 100023. <https://doi.org/10.1016/j.bpr.2021.100023>.

Chakrabarti, R., Ji, W.K., Stan, R. V., Sanz, J. de J., Ryan, T.A., and Higgs, H.N. (2018). INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division. *J. Cell Biol.* 217, 251–268. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709111>.

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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.571216>.

Chen, F., Tillberg, P.W., and Boyden, E.S. (2015). Expansion microscopy. *Science* (80-. ). 347, 543–548. <https://doi.org/10.1126/science.1260088>.

Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* 160, 189–200. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211046>.

Chen, H.J., Anagnostou, G., Chai, A., Withers, J., Morris, A., Adhikaree, J., Pennetta, G., and De Bellerocche, J.S. (2010). Characterization of the properties of a novel mutation in VAPB in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 285, 40266–40281. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.161398>.

Cho, B., Cho, H.M., Jo, Y., Kim, H.D., Song, M., Moon, C., Kim, H., Kim, K., Sesaki, H., Rhyu, I.J., et al. (2017). Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division. *Nat. Commun.* 8, 1–17. <https://doi.org/10.1038/ncomms15754>.

Choi, S.Y., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J., and Frohman, M.A. (2006). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 8, 1255–1262. <https://doi.org/10.1038/ncb1487>.

Cieri, D., Vicario, M., Giacomello, M., Vallese, F., Filadi, R., Wagner, T., Pozzan, T., Pizzo, P., Scorrano, L., Brini, M., et al. (2018). SPLICS: A split green fluorescent protein-based contact site sensor for narrow and wide



heterotypic organelle juxtaposition. *Cell Death Differ.* 25, 1131–1145. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0033-z>.

Cipolat, S., De Brito, O.M., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15927–15932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407043101>.

Clairfeuille, T., Norwood, S.J., Qi, X., Teasdale, R.D., and Collins, B.M. (2015). Structure and membrane binding properties of the endosomal tetratricopeptide repeat (TPR) domain-containing sorting nexins SNX20 and SNX21. *J. Biol. Chem.* 290, 14504–14517. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.650598>.

Clark, B.J. (2012). The mammalian START domain protein family in lipid transport in health and disease. *J. Endocrinol.* 212, 257–275. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0313>.

Cockcroft, S., and Lev, S. (2020). Mammalian PITPs at the Golgi and ER-Golgi Membrane Contact Sites. *Contact* 3, 251525642096417. <https://doi.org/10.1177/2515256420964170>.

Collado, J., Kalemanov, M., Martinez-Sanchez, A., Campelo, F., Baumeister, W., Stefan, C.J., and Fernandez-Busnadiego, R. (2019a). Tricalbin-Mediated Contact Sites Control ER Curvature to Maintain Plasma Membrane Integrity. *SSRN Electron. J.* 476–487. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3371409>.

Collado, J., Kalemanov, M., Campelo, F., Bourgoint, C., Thomas, F., Loewith, R., Martínez-Sánchez, A., Baumeister, W., Stefan, C.J., and Fernández-Busnadiego, R. (2019b). Tricalbin-Mediated Contact Sites Control ER Curvature to Maintain Plasma Membrane Integrity. *Dev. Cell* 51, 476-487.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.018>.

Costello, J.L., Castro, I.G., Hacker, C., Schrader, T.A., Metz, J., Zeuschner, D., Azadi, A.S., Godinho, L.F., Costina, V., Findeisen, P., et al. (2017). ACBD5 and VAPB mediate membrane associations between peroxisomes and the ER. *J. Cell Biol.* 216, 331–342. <https://doi.org/10.1083/jcb.201607055>.

Creighton, W.E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*. 2nd Edition, W.H. Freeman and Company, New York.

D'Ambrosio, J.M., Albanese, V., Lipp, N.F., Fleuriot, L., Debayle, D., Drin, G., and Copic, A. (2020). Osh6 requires Ist2 for localization to ER-PM contacts and efficient phosphatidylserine transport in budding yeast. *J. Cell Sci.* 133. <https://doi.org/10.1242/jcs.243733>.

D'Angelo, G., Polishchuk, E., Tullio, G. Di, Santoro, M., Campli, A. Di, Godi, A., West, G., Bielawski, J., Chuang, C.C., Van Der Spoel, A.C., et al. (2007). Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature* 449, 62–67. <https://doi.org/10.1038/nature06097>.

Darling, A.L., Liu, Y., Oldfield, C.J., and Uversky, V.N. (2018). Intrinsically Disordered Proteome of Human Membrane-Less Organelles. *Proteomics* 18, 1–12. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700193>.

Darwisch, W., von Spangenberg, M., Lehmann, J., Singin, Ö., Deubert, G., Kühl, S., Roos, J., Horstmann, H., Körber, C., Hoppe, S., et al. (2020). Cerebellar and hepatic alterations in ACBD5-deficient mice are associated with unexpected, distinct alterations in cellular lipid homeostasis. *Commun. Biol.* 3, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01442-x>.

David, Y., Castro, I.G., and Schuldiner, M. (2021). The Fast and the Furious: Golgi Contact Sites. *Contact* 4, 251525642110344. <https://doi.org/10.1177/25152564211034424>.

Davis, O.B., Shin, H.R., Lim, C.Y., Wu, E.Y., Kukurugya, M., Maher, C.F., Perera, R.M., Ordonez, M.P., and Zoncu, R. (2021). NPC1-mTORC1 Signaling Couples Cholesterol Sensing to Organelle Homeostasis and Is a Targetable Pathway in Niemann-Pick Type C. *Dev. Cell* 56, 260-276.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.11.016>.

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.

Deka, R.K., Brautigam, C.A., Goldberg, M., Schuck, P., Tomchick, D.R., and Norgard, M. V. (2012). Structural, bioinformatic, and in vivo analyses of two *treponema pallidum* Lipoproteins reveal a unique TRAP transporter. *J. Mol. Biol.* 416, 678–696. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.015>.

- Derré, I. (2015). Chlamydiae interaction with the endoplasmic reticulum: Contact, function and consequences. *Cell. Microbiol.* *17*, 959–966. <https://doi.org/10.1111/cmi.12455>.
- Derré, I., Swiss, R., and Agaisse, H. (2011). The lipid transfer protein CERT interacts with the Chlamydia inclusion protein IncD and participates to ER-Chlamydia inclusion membrane contact sites. *PLoS Pathog.* *7*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002092>.
- Dezi, M., Di Cicco, A., Bassereau, P., and Levý, D. (2013). Detergent-mediated incorporation of transmembrane proteins in giant unilamellar vesicles with controlled physiological contents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 7276–7281. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303857110>.
- Ding, W.X., and Yin, X.M. (2012). Mitophagy: Mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol. Chem.* *393*, 547–564. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0119>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.037>.
- Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80-. ). *346*, 1258096–1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>.
- Doyle, C.P., Timple, L., and Hammond, G.R. V (2022). Depletion of Plasma Membrane PI4P by ORP5 Requires Hydrolysis by SAC1 in Acceptor Membranes. 1–16. .
- Drin, G., Casella, J.F., Gautier, R., Boehmer, T., Schwartz, T.U., and Antonny, B. (2007). A general amphipathic  $\alpha$ -helical motif for sensing membrane curvature. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 138–146. <https://doi.org/10.1038/nsmb1194>.
- Du, Y., Chang, W., Gao, L., Deng, L., and Ji, W. (2023). Tex2 is required for lysosomal functions at TMEM55-dependent ER membrane contact sites. *J. Cell Biol.* *222*. <https://doi.org/10.1083/jcb.202205133>.
- Dudás, E.F., Huynen, M.A., Lesk, A.M., and Pastore, A. (2021). Invisible leashes: The tethering VAPs from infectious diseases to neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* *296*, 100421. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100421>.
- Dudek, J. (2017). Role of cardiolipin in mitochondrial signaling pathways. *Front. Cell Dev. Biol.* *5*, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00090>.
- Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M., and Obradović, Z. (2002). Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* *41*, 6573–6582. <https://doi.org/10.1021/bi012159+>.
- Dziurdzik, S.K., and Conibear, E. (2021). The vps13 family of lipid transporters and its role at membrane contact sites. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms22062905>.
- Egea, P.F. (2021). Mechanisms of Non-Vesicular Exchange of Lipids at Membrane Contact Sites: Of Shuttles, Tunnels and, Funnels. *Front. Cell Dev. Biol.* *9*, 1–25. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.784367>.
- Fernández-Busnadiego, R., Saheki, Y., and De Camilli, P. (2015). Three-dimensional architecture of extended synaptotagmin-mediated endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E2004–E2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503191112>.
- Von Filseck, J.M., Vanni, S., Mesmin, B., Antonny, B., and Drin, G. (2015). A phosphatidylinositol-4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes. *Nat. Commun.* *6*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms7671>.
- Francy, C.A., Clinton, R.W., Fröhlich, C., Murphy, C., and Mears, J.A. (2017). Cryo-EM Studies of Drp1 Reveal Cardiolipin Interactions that Activate the Helical Oligomer. *Sci. Rep.* *7*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11008-3>.
- Frey, T.G., and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01609-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01609-1).
- Freyre, C.A.C., Rauher, P.C., Ejsing, C.S., and Klemm, R.W. (2019). MIGA2 Links Mitochondria, the ER, and Lipid Droplets and Promotes De Novo Lipogenesis in Adipocytes. *Mol. Cell* 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.011>.

- Friedman, J.R., and Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. <https://doi.org/10.1038/nature12985>.
- Friedman, J.R., and Voeltz, G.K. (2011). The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biol.* *21*, 709–717. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.004>.
- Friedman, J.R., Webster, B.M., Mastronarde, D.N., Verhey, K.J., and Voeltz, G.K. (2010). ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* *190*, 363–375. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911024>.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science (80-. )*. *334*, 358–362. <https://doi.org/10.1126/science.1207385>.
- Fugmann, T., Hausser, A., Schöffler, P., Schmid, S., Pfizenmaier, K., and Olayioye, M.A. (2007). Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J. Cell Biol.* *178*, 15–22. <https://doi.org/10.1083/jcb.200612017>.
- Furuita, K., Jee, J., Fukada, H., Mishima, M., and Kojima, C. (2010). Electrostatic Interaction between Oxysterol-binding Protein and VAMP-associated Protein A Revealed by NMR and Mutagenesis Studies. *J. Biol. Chem.* *285*, 12961–12970. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082602>.
- 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. <https://doi.org/10.15252/embr.201541108>.
- Gambarotto, D., Zwettler, F.U., Le Guennec, M., Schmidt-Cernohorska, M., Fortun, D., Borgers, S., Heine, J., Schloetel, J.G., Reuss, M., Unser, M., et al. (2019). Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (U-ExM). *Nat. Methods* *16*, 71–74. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0238-1>.
- Gandre-Babbe, S., and van der Bliëk, A.M. (2008). The Novel Tail-anchored Membrane Protein Mff Controls Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2402–2412. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1287>.
- Gao, L., Aizaki, H., He, J.-W., and Lai, M.M.C. (2004). Interactions between Viral Nonstructural Proteins and Host Protein hVAP-33 Mediate the Formation of Hepatitis C Virus RNA Replication Complex on Lipid Raft. *J. Virol.* *78*, 3480–3488. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.7.3480-3488.2004>.
- Gao, Y., Xiong, J., Chu, Q.-Z., and Ji, W.-K. (2021). PDZD8 mediated lipid transfer at ER-LE/lys contacts is required for LE/lys positioning and neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* *jcs.255026*. <https://doi.org/10.1242/jcs.255026>.
- Gatta, A.T., and Levine, T.P. (2017). Piecing Together the Patchwork of Contact Sites. *Trends Cell Biol.* *27*, 214–229. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.010>.
- Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., and Drin, G. (2008). HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific  $\alpha$ -helical properties. *Bioinformatics* *24*, 2101–2102. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>.
- Ge, J., Bian, X., Ma, L., Cai, Y., Li, Y., and Yang, J. (2022). Stepwise membrane binding of extended synaptotagmins revealed by optical tweezers. *Nat. Chem. Biol.* *18*. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00914-3>.
- 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-biphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) and regulate its level at the plasma membrane. *Nat. Commun.* *8*. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00861-5>.
- Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., and Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *21*, 204–224. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>.
- Gim, M. (2018). The Many Faces of Amphipathic Helices. 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom8030045>.
- Gordon, D.E., Jang, G.M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., White, K.M., O’Meara, M.J., Rezelj, V. V., Guo, J.Z., Swaney, D.L., et al. (2020). A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* *583*, 459–468. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>.

- Guharoy, M., Pauwels, K., and Tompa, P. (2015). SnapShot: Intrinsic Structural Disorder. *Cell* 161, 1230-1230.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.024>.
- Guillén-Samander, A., Leonzino, M., Hanna, M.G., Tang, N., Shen, H., and De Camilli, P. (2021). VPS13D bridges the ER to mitochondria and peroxisomes via Miro. *J. Cell Biol.* 220, 2020.10.07.328906. <https://doi.org/10.1083/jcb.202010004>.
- Guillén-Samander, A., Wu, Y., Pineda, S.S., García, F.J., Eisen, J.N., Leonzino, M., Ugur, B., Kellis, M., Heiman, M., and De Camilli, P. (2022). A partnership between the lipid scramblase XK and the lipid transfer protein VPS13A at the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 119, 2022.03.30.486314. <https://doi.org/10.1073/pnas.2205425119>.
- Guo, Y., Li, D., Zhang, S., Yang, Y., Liu, J.-J., Wang, X., Liu, C., Milkie, D.E., Moore, R.P., Tulu, U.S., et al. (2018). Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales. *Cell* 175, 1430-1442.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.057>.
- 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. <https://doi.org/10.1083/jcb.201312072>.
- Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., and Nishijima, M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426, 803–809. <https://doi.org/10.1038/nature02188>.
- Hanada, K., Kumagai, K., Tomishige, N., and Yamaji, T. (2009). CERT-mediated trafficking of ceramide. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1791, 684–691. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.01.006>.
- Hanna, M.G., Suen, P.H., Wu, Y., Reinisch, K.M., and De Camilli, P. (2022). SHIP164 is a chorein motif lipid transfer protein that controls endosome–Golgi membrane traffic. *J. Cell Biol.* 221. <https://doi.org/10.1083/jcb.202111018>.
- Harayama, T., and Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>.
- Hein, M.Y., Hubner, N.C., Poser, I., Cox, J., Nagaraj, N., Toyoda, Y., Gak, I.A., Weisswange, I., Mansfeld, J., Buchholz, F., et al. (2015). A Human Interactome in Three Quantitative Dimensions Organized by Stoichiometries and Abundances. *Cell* 163, 712–723. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.053>.
- Hirabayashi, Y., Kwon, S.K., Paek, H., Pernice, W.M., Paul, M.A., Lee, J., Erfani, P., Raczkowski, A., Petrey, D.S., Pon, L.A., et al. (2017). ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca<sup>2+</sup> dynamics in mammalian neurons. *Science* (80-. ). 358, 623–630. <https://doi.org/10.1126/science.aan6009>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.09.019>.
- Höglinger, D., Burgoyne, T., Sanchez-Heras, E., Hartwig, P., Colaco, A., Newton, J., Futter, C.E., Spiegel, S., Platt, F.M., and Eden, E.R. (2019). NPC1 regulates ER contacts with endocytic organelles to mediate cholesterol egress. *Nat. Commun.* 10, 4276. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12152-2>.
- Holthuis, J.C.M., and Menon, A.K. (2014). Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* 510, 48–57. <https://doi.org/10.1038/nature13474>.
- Hong, Z., Adlakha, J., Wan, N., Guinn, E., Giska, F., Gupta, K., Melia, T.J., and Reinisch, K.M. (2022). Mitoguardin-2-mediated lipid transfer preserves mitochondrial morphology and lipid droplet formation. *J. Cell Biol.* 221. <https://doi.org/10.1083/jcb.202207022>.
- Hu, J., Lipowsky, R., and Weikl, T.R. (2013). Binding constants of membrane-anchored receptors and ligands depend strongly on the nanoscale roughness of membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 15283–15288. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305766110>.
- Hua, R., Cheng, D., Coyaud, É., Freeman, S., Di Pietro, E., Wang, Y., Vissa, A., Yip, C.M., Fairn, G.D., Braverman, N., et al. (2017). VAPs and ACBD5 tether peroxisomes to the ER for peroxisome maintenance and lipid homeostasis. *J. Cell Biol.* 216, 367–377. <https://doi.org/10.1083/jcb.201608128>.
- Huber, R., and Bennett, W.S. (1983). Functional significance of flexibility in proteins. *Pure Appl. Chem.* 54,

2489–2500. <https://doi.org/10.1351/pac198254122489>.

Huttlin, E.L., Ting, L., Bruckner, R.J., Gebreab, F., Gygi, M.P., Szpyt, J., Tam, S., Zarraga, G., Colby, G., Baltier, K., et al. (2015). The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell* *162*, 425–440. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.043>.

Huttlin, E.L., Bruckner, R.J., Paulo, J.A., Cannon, J.R., Ting, L., Baltier, K., Colby, G., Gebreab, F., Gygi, M.P., Parzen, H., et al. (2017). Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature* *545*, 505–509. <https://doi.org/10.1038/nature22366>.

Huttlin, E.L., Bruckner, R.J., Navarrete-Perea, J., Cannon, J.R., Baltier, K., Gebreab, F., Gygi, M.P., Thornock, A., Zarraga, G., Tam, S., et al. (2021). Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. *Cell* *184*, 3022–3040.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.011>.

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. <https://doi.org/10.1038/nature03923>.

Itzhak, D.N., Tyanova, S., Cox, J., and Borner, G.H.H. (2016). Global, quantitative and dynamic mapping of protein subcellular localization. *Elife* *5*, 1–36. <https://doi.org/10.7554/eLife.16950>.

Jamecna, D., and Antonny, B. (2021). Intrinsically disordered protein regions at membrane contact sites. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* *1866*, 159020. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.159020>.

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 DJamecna, D., Polidori, J., Mesmin, B., Dezi, M., Levy, D., Bigay, J., & Antonny, B. (2019). An Intrinsically Disordered Region in OSBP Acts as an Entropic Barrier t. *Dev. Cell* *49*, 220–234.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.02.021>.

James, C., and Kehlenbach, R.H. (2021). The Interactome of the VAP Family of Proteins: An Overview. *Cells* *10*, 1780. <https://doi.org/10.3390/cells10071780>.

James, C., Müller, M., Goldberg, M.W., Lenz, C., Urlaub, H., and Kehlenbach, R.H. (2019). Proteomic mapping by rapamycin-dependent targeting of APEX2 identifies binding partners of VAPB at the inner nuclear membrane. *J. Biol. Chem.* *294*, 16241–16254. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007283>.

Jeong, H., Park, J., Jun, Y., and Lee, C. (2017). Crystal structures of Mmm1 and Mdm12–Mmm1 reveal mechanistic insight into phospholipid trafficking at ER-mitochondria contact sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E9502–E9511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715592114>.

Johnson, B., Leek, A.N., Solé, L., Maverick, E.E., Levine, T.P., and Tamkun, M.M. (2018). Kv2 potassium channels form endoplasmic reticulum/plasma membrane junctions via interaction with VAPA and VAPB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E7331–E7340. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805757115>.

Johnson, B., Leek, A.N., and Tamkun, M.M. (2019). Kv2 channels create endoplasmic reticulum / plasma membrane junctions: a brief history of Kv2 channel subcellular localization. *Channels* *13*, 88–101. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1568824>.

Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bagny, R., Joyard, J., and Block, M.A. (2004). Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J. Cell Biol.* *167*, 863–874. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407022>.

Kabashi, E., El Oussini, H., Bercier, V., Gros-Louis, F., Valdmánis, P.N., Mcdearmid, J., Meijer, I.A., Dion, P.A., Dupre, N., Hollinger, D., et al. (2013). Investigating the contribution of VAPB/ALS8 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 2350–2360. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt080>.

Kagiwada, S., Hosaka, K., Murata, M., Nikawa, J.I., and Takatsuki, A. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* SCS2 gene product, a homolog of a synaptobrevin-associated protein, is an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum and is required for inositol metabolism. *J. Bacteriol.* *180*, 1700–1708. <https://doi.org/10.1128/jb.180.7.1700-1708.1998>.

Kaiser, S.E., Brickner, J.H., Reilein, A.R., Fenn, T.D., Walter, P., and Brunger, A.T. (2005). Structural basis of FFAT motif-mediated ER targeting. *Structure* *13*, 1035–1045. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.04.010>.

Kameoka, S., Adachi, Y., Okamoto, K., Iijima, M., and Sesaki, H. (2018). Phosphatidic Acid and Cardiolipin Coordinate Mitochondrial Dynamics. *Trends Cell Biol.* *28*, 67–76.

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.011>.

Kanekura, K., Nishimoto, I., Aiso, S., and Matsuoka, M. (2006). Characterization of amyotrophic lateral sclerosis-linked P56S mutation of vesicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB/ALS8). *J. Biol. Chem.* *281*, 30223–30233. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605049200>.

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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605032200>.

Kawasaki, A., Sakai, A., Nakanishi, H., Hasegawa, J., Taguchi, T., Sasaki, J., Arai, H., Sasaki, T., Igarashi, M., and Nakatsu, F. (2021). PI4P/PS countertransport by ORP10 at ER–endosome membrane contact sites regulates endosome fission. *J. Cell Biol.* *221*. <https://doi.org/10.1083/jcb.202103141>.

Kim, H., Lee, S., Jun, Y., and Lee, C. (2022). Structural basis for mitoguardin-2 mediated lipid transport at ER-mitochondrial membrane contact sites. *Nat. Commun.* *13*, 3702. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31462-6>.

Kim, S.H., Leal, S.S., Halevy, D. Ben, Gomes, C.M., and Lev, S. (2010). Structural requirements for VAP-B oligomerization and their implication in amyotrophic lateral sclerosis-associated VAP-B(P56S) neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* *285*, 13839–13849. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.097345>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.04.028>.

Kirmiz, M., Vierra, N.C., Palacio, S., and Trimmer, J.S. (2018). Identification of VAPA and VAPB as Kv2 channel-interacting proteins defining endoplasmic reticulum–plasma membrane junctions in mammalian brain neurons. *J. Neurosci.* *38*, 7562–7584. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0893-18.2018>.

Kobayashi, J., Arita, M., Sakai, S., Kojima, H., Senda, M., Senda, T., Hanada, K., and Kato, R. (2022). Ligand Recognition by the Lipid Transfer Domain of Human OSBP Is Important for Enterovirus Replication. *ACS Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00108>.

Kolesnick, R.N. (1991). Sphingomyelin and derivatives as cellular signals. *Prog. Lipid Res.* *30*, 1–38. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(91\)90005-p](https://doi.org/10.1016/0163-7827(91)90005-p).

Kooijman, E.E., Chupin, V., Fuller, N.L., Kozlov, M.M., De Kruijff, B., Burger, K.N.J., and Rand, P.R. (2005). Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* *44*, 2097–2102. <https://doi.org/10.1021/bi0478502>.

Kopec, K.O., Alva, V., and Lupas, A.N. (2010). Homology of SMP domains to the TULIP superfamily of lipid-binding proteins provides a structural basis for lipid exchange between ER and mitochondria. *Bioinformatics* *26*, 1927–1931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq326>.

Kornmann, B., and Walter, P. (2010). ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: Molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J. Cell Sci.* *123*, 1389–1393. <https://doi.org/10.1242/jcs.058636>.

Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2009). An ER-Mitochondria Tethering Complex Revealed by a Synthetic Biology Screen. *Science* (80-. ). *325*, 477–481. <https://doi.org/10.1126/science.1175088>.

Kornmann, B., Osman, C., and Walter, P. (2011). The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 14151–14156. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111314108>.

Korobova, F., Ramabhadran, V., and Higgs, H.N. (2013). An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2. *Science* (80-. ). *339*, 464–467. <https://doi.org/10.1126/science.1228360>.

Kors, S., Hacker, C., Bolton, C., Maier, R., Reimann, L., Kitchener, E.J.A., Warscheid, B., Costello, J.L., and Schrader, M. (2022a). Regulating peroxisome–ER contacts via the ACBD5-VAPB tether by FFAT motif phosphorylation and GSK3 $\beta$ . *J. Cell Biol.* *221*. <https://doi.org/10.1083/jcb.202003143>.

Kors, S., Kurian, S.M., Costello, J.L., and Schrader, M. (2022b). Controlling contacts—Molecular mechanisms

- to regulate organelle membrane tethering. *BioEssays* 2200151. <https://doi.org/10.1002/bies.202200151>.
- Kors, S., Costello, J.L., and Schrader, M. (2022c). VAP Proteins – From Organelle Tethers to Pathogenic Host Interactors and Their Role in Neuronal Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.895856>.
- Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes. *Science* (80-. ). 305, 858–862. <https://doi.org/10.1126/science.1099793>.
- Kovács, D., and Antonny, B. (2021). OSBP-mediated cholesterol associated cargo secretion transfer determines epithelial polarity and associated-cargo secretion. *BioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/tra.12243>.
- Kudo, N., Kumagai, K., Tomishige, N., Yamaji, T., Wakatsuki, S., Nishijima, M., Hanada, K., and Kato, R. (2008). Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 488–493. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709191105>.
- Kumagai, K., and Hanada, K. (2019). Structure, functions and regulation of CERT, a lipid-transfer protein for the delivery of ceramide at the ER–Golgi membrane contact sites. *FEBS Lett.* <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13511>.
- Kumagai, K., Yasuda, S., Okemoto, K., Nishijima, M., Kobayashi, S., and Hanada, K. (2005). CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *J. Biol. Chem.* 280, 6488–6495. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409290200>.
- Kumagai, K., Kawano, M., Shinkai-Ouchi, F., Nishijima, M., and Hanada, K. (2007). Interorganelle trafficking of ceramide is regulated by phosphorylation- dependent cooperativity between the PH and START domains of CERT. *J. Biol. Chem.* 282, 17758–17766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702291200>.
- Kumar, N., Leonzino, M., Hancock-Cerutti, W., Horenkamp, F.A., Li, P.Q., Lees, J.A., Wheeler, H., Reinisch, K.M., and De Camilli, P. (2018). VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites. *J. Cell Biol.* 217, 3625–3639. <https://doi.org/10.1083/jcb.201807019>.
- Kwong, J.Q., Beal, M.F., and Manfredi, G. (2006). The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. 1659–1675. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03990.x>.
- de la Mora, E., Dezi, M., Di Cicco, A., Bigay, J., Gautier, R., Manzi, J., Polidori, J., Castaño-Díez, D., Mesmin, B., Antonny, B., et al. (2021). Nanoscale architecture of a VAP-A-OSBP tethering complex at membrane contact sites. *Nat. Commun.* 12, 3459. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23799-1>.
- Labrousse, A.M., Zappaterra, M.D., Rube, D.A., and Van der Blik, A.M. (1999). C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell* 4, 815–826. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80391-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80391-3).
- Lackner, L.L., and Nunnari, J.M. (2009). The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1792, 1138–1144. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.11.011>.
- Ladinsky, M.S., Wu, C.C., McIntosh, S., McIntosh, J.R., and Howell, K.E. (2002). Structure of the golgi and distribution of reporter molecules at 20°C reveals the complexity of the exit compartments. *Mol. Biol. Cell* 13, 2810–2825. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-12-0593>.
- Lang, A.B., John Peter, A.T.A.T., Walter, P., and Kornmann, B. (2015). ER-mitochondrial junctions can be bypassed by dominant mutations in the endosomal protein Vps13. *J. Cell Biol.* 210, 883–890. <https://doi.org/10.1083/jcb.201502105>.
- Laporte, M.H., Klena, N., Hamel, V., and Guichard, P. (2022). Visualizing the native cellular organization by coupling cryofixation with expansion microscopy (Cryo-ExM). *Nat. Methods* 19, 216–222. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01356-4>.
- Lee, J.E., Westrate, L.M., Wu, H., Page, C., and Voeltz, G.K. (2016). Multiple dynamin family members

collaborate to drive mitochondrial division. *Nature* 540, 139–143. <https://doi.org/10.1038/nature20555>.

Lee, J.E., Cathey, P.I., Wu, H., Parker, R., and Voeltz, G.K. (2020). Endoplasmic reticulum contact sites regulate the dynamics of membraneless organelles. *Science* (80-. ). 367. <https://doi.org/10.1126/science.aay7108>.

Van Der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R.J., Daughdrill, G.W., Dunker, A.K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D.T., et al. (2014). Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.* 114, 6589–6631. <https://doi.org/10.1021/cr400525m>.

Lemmon, M.A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 99–111. <https://doi.org/10.1038/nrm2328>.

Leonzino, M., Reinisch, K.M., and De Camilli, P. (2021). Insights into VPS13 properties and function reveal a new mechanism of eukaryotic lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1866, 159003. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.159003>.

Levine, T.P. (2022). Sequence Analysis and Structural Predictions of Lipid Transfer Bridges in the Repeating Beta Groove (RBG) Superfamily Reveal Past and Present Domain Variations Affecting Form, Function and Interactions of VPS13, ATG2, SHIP164, Hobbit and Tweek. *Contact* 5, 251525642211343. <https://doi.org/10.1177/25152564221134328>.

Levine, T.P., and Munro, S. (1998). The pleckstrin homology domain of oxysterol-binding protein recognises a determinant specific to Golgi membranes. *Curr. Biol.* 8, 729–739. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70296-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70296-9).

Li, P., Lees, J.A., Lusk, C.P., and Reinisch, K.M. (2020). Cryo-EM reconstruction of a VPS13 fragment reveals a long groove to channel lipids between membranes. *J. Cell Biol.* 219. <https://doi.org/10.1083/jcb.202001161>.

Lim, C.Y., Davis, O.B., Shin, H.R., Zhang, J., Berdan, C.A., Jiang, X., Counihan, J.L., Ory, D.S., Nomura, D.K., and Zoncu, R. (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. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0391-5>.

Lindhout, F.W., Cao, Y., Kevenaar, J.T., Bodzeta, A., Stucchi, R., Boumpoutsari, M.M., Katrukha, E.A., Altelaar, M., MacGillavry, H.D., and Hoogenraad, C.C. (2019). VAP-SCRN1 interaction regulates dynamic endoplasmic reticulum remodeling and presynaptic function. *EMBO J.* 38. <https://doi.org/10.15252/emboj.2018101345>.

Liu, L.K., Choudhary, V., Toulmay, A., and Prinz, W.A. (2017). An inducible ER-Golgi tether facilitates ceramide transport to alleviate lipotoxicity. *J. Cell Biol.* 216, 131–147. <https://doi.org/10.1083/jcb.201606059>.

Liu, Y., Kahn, R.A., and Prestegard, J.H. (2014). Interaction of fapp1 with Arf1 and PI4P at a membrane surface: An example of coincidence detection. *Structure* 22, 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.12.011>.

Loewen, C.J.R., and Levine, T.P. (2005). A highly conserved binding site in vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) for the FFAT motif of lipid-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 280, 14097–14104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500147200>.

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. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg201>.

Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450, 376–382. <https://doi.org/10.1038/nature06265>.

Lua, S., Qin, H., Lim, L., Shi, J., Gupta, G., and Song, J. (2011). Structural, stability, dynamic and binding properties of the ALS-causing T46I mutant of the hVAPB MSP domain as revealed by NMR and MD simulations. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027072>.

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. <https://doi.org/10.1038/nature12430>.



- Maeda, S., Otomo, C., and Otomo, T. (2019). The autophagic membrane tether ATG2A transfers lipids between membranes. *Elife* 8, 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.45777>.
- Maekawa, M. (2017). Domain 4 (D4) of perfringolysin O to visualize cholesterol in cellular membranes - The update. *Sensors (Switzerland)* 17, 1–14. <https://doi.org/10.3390/s17030504>.
- Maekawa, M., and Fairn, G.D. (2015). Complementary probes reveal that phosphatidylserine is required for the proper transbilayer distribution of cholesterol. *J. Cell Sci.* 128, 1422–1433. <https://doi.org/10.1242/jcs.164715>.
- Mahajan, M., Bharambe, N., Shang, Y., Lu, B., Mandal, A., Mohan, P.M., Wang, R., Boatz, J.C., Galvez, J.M.M., Shnyrova, A. V., et al. (2021). NMR identification of a conserved Drp1 cardiolipin-binding motif essential for stress-induced mitochondrial fission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, 1–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023079118>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.11.004>.
- Manni, M.M., Tiberti, M.L., Pagnotta, S., Barelli, H., Gautier, R., and Antonny, B. (2018). Acyl chain asymmetry and polyunsaturation of brain phospholipids facilitate membrane vesiculation without leakage. *Elife* 7, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.34394>.
- Manor, U., Bartholomew, S., Golani, G., Christenson, E., Kozlov, M., Higgs, H., Spudich, J., and Lippincott-Schwartz, J. (2015). A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. *Elife* 4, 1–27. <https://doi.org/10.7554/eLife.08828>.
- Matthies, D., Bae, C., Toombes, G.E.S., Fox, T., Bartesaghi, A., Subramaniam, S., and Swartz, K.J. (2018). Single-particle cryo-EM structure of a voltage-activated potassium channel in lipid nanodiscs. *Elife* 7, 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.37558>.
- Di Mattia, T., Wilhelm, L.P., Ikhlef, S., Wendling, C., Spehner, D., Nominé, Y., Giordano, F., Mathelin, C., Drin, G., Tomasetto, C., et al. (2018). Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO Rep.* 19. <https://doi.org/10.15252/embr.201745453>.
- Di Mattia, T., Martinet, A., Ikhlef, S., McEwen, A.G., Nominé, Y., Wendling, C., Poussin-Courmontagne, P., Voilquin, L., Eberling, P., Ruffenach, F., et al. (2020). FFAT motif phosphorylation controls formation and lipid transfer function of inter-organelle contacts. *EMBO J.* 39, 1–29. <https://doi.org/10.15252/embj.2019104369>.
- Mccune, B.T., Tang, W., Lu, J., Eaglesham, J.B., Thorne, L., Krezel, A.M., and Virgin, W. (2017). Noroviruses Co-opt the Function of Host Proteins VAPA and VAPB for Replication. *MBio* 8, 1–17. .
- Melia, T.J., and Reinisch, K.M. (2022). A possible role for VPS13-family proteins in bulk lipid transfer, membrane expansion and organelle biogenesis. *J. Cell Sci.* 135. <https://doi.org/10.1242/jcs.259357>.
- Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J., Lacas-Gervais, S., Drin, G., and Antonny, B. (2013). A Four-Step Cycle Driven by PI(4)P Hydrolysis Directs Sterol/PI(4)P Exchange by the ER-Golgi Tether OSBP. *Cell* 155, 830–843. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.056>.
- Mesmin, B., Bigay, J., Polidori, J., Jamecna, D., Lacas-Gervais, S., and Antonny, B. (2017). Sterol transfer, PI4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP. *EMBO J.* 36, 3156–3174. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2018.10.002>.
- Mikitova, V., and Levine, T.P. (2012). Analysis of the key elements of FFAT-like motifs identifies new proteins that potentially bind VAP on the ER, including two AKAPs and FAPP2. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030455>.
- Miserey-Lenkei, S., Trajkovic, K., D'Ambrosio, J.M., Patel, A.J., Čopič, A., Mathur, P., Schauer, K., Goud, B., Albanèse, V., Gautier, R., et al. (2021). A comprehensive library of fluorescent constructs of SARS-CoV-2 proteins and their initial characterisation in different cell types. *Biol. Cell* 113, 311–328.

<https://doi.org/10.1111/boc.202000158>.

Möckl, L., Lamb, D.C., and Bräuchle, C. (2014). Super-resolved Fluorescence Microscopy: Nobel Prize in Chemistry 2014 for Eric Betzig, Stefan Hell, and William E. Moerner. *Angew. Chemie Int. Ed.* *53*, 13972–13977. <https://doi.org/10.1002/anie.201410265>.

Mogelsvang, S., Marsh, B.J., Ladinsky, M.S., and Howell, K.E. (2004). Predicting function from structure: 3D structure studies of the mammalian golgi complex. *Traffic* *5*, 338–345. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9219.2004.00186.x>.

Moser von Filseck, J., Čopič, A., Delfosse, V., Vanni, S., Jackson, C.L., Bourguet, W., and Drin, G. (2015). Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science* (80-. ). *349*, 432–436. <https://doi.org/10.1126/science.aab1346>.

Murley, A., Lackner, L.L., Osman, C., West, M., Voeltz, G.K., Walter, P., and Nunnari, J. (2013). ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *Elife* *2013*, 1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.00422>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.02.009>.

Naito, T., and Saheki, Y. (2021). GRAMD1-mediated accessible cholesterol sensing and transport. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* *1866*, 158957. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2021.158957>.

Naito, T., Ercan, B., Krshnan, L., Triebel, A., Koh, D.H.Z., Wei, F.-Y., Tomizawa, K., Torta, F.T., Wenk, M.R., and Saheki, Y. (2019). Movement of accessible plasma membrane cholesterol by GRAMD1 lipid transfer protein complex. *Elife* *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.51401>.

Nakatsu, F., and Kawasaki, A. (2021). Functions of Oxysterol-Binding Proteins at Membrane Contact Sites and Their Control by Phosphoinositide Metabolism. *Front. Cell Dev. Biol.* *9*, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.664788>.

Neefjes, J., and Cabukusta, B. (2021). What the VAP: The Expanded VAP Family of Proteins Interacting With FFAT and FFAT-Related Motifs for Interorganellar Contact. *Contact* *4*, 251525642110122. <https://doi.org/10.1177/25152564211012246>.

Neuman, S.D., Jorgensen, J.R., Cavanagh, A.T., Smyth, J.T., Selegue, J.E., Emr, S.D., and Bashirullah, A. (2022a). The Hob proteins are novel and conserved lipid-binding proteins at ER–PM contact sites. *J. Cell Sci.* *135*. <https://doi.org/10.1242/jcs.259086>.

Neuman, S.D., Levine, T.P., and Bashirullah, A. (2022b). A novel superfamily of bridge-like lipid transfer proteins. *Trends Cell Biol.* *32*, 962–974. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.03.011>.

Nguyen, T.T., and Voeltz, G.K. (2022). An ER phospholipid hydrolase drives ER-associated mitochondrial constriction for fission and fusion. *Elife* *11*, 1–30. <https://doi.org/10.7554/eLife.84279>.

Niko, Y., Didier, P., Mely, Y., Konishi, G., and Klymchenko, A.S. (2016). Bright and photostable push-pull pyrene dye visualizes lipid order variation between plasma and intracellular membranes. *Sci. Rep.* *6*, 18870. <https://doi.org/10.1038/srep18870>.

Nishimura, A.L., Mitne-Neto, M., Silva, H.C.A., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J.R.M., Gillingwater, T., Webb, J., et al. (2004). A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* *75*, 822–831. <https://doi.org/10.1086/425287>.

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. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9876>.

Obara, C.J., Nixon-abell, J., Moore, A.S., Hoffman, D.P., Shtengel, G., Xu, C.S., Schaefer, K., Pasolli, A., Masson, J., Hess, H.F., et al. (2022). Motion of single molecular tethers reveals dynamic subdomains at ER-mitochondria contact sites Janelia Research Campus , Howard Hughes Medical Institute , Ashburn , VA 20147 Neurogenetics Branch , National Institute of Neurological Disorders and Stroke ,. 1–26. .

- Ohvo-Rekilä, H. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* *41*, 66–97. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00020-0).
- 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. <https://doi.org/10.1139/o03-088>.
- Osawa, T., Kotani, T., Kawaoka, T., Hirata, E., Suzuki, K., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., and Noda, N.N. (2019). Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *26*, 281–288. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0203-4>.
- Oudshoorn, D., Rijs, K., Limpens, R.W.A.L., Groen, K., Koster, A.J., Snijder, E.J., Kikkert, M., and Bárcena, M. (2017). Expression and cleavage of middle east respiratory syndrome coronavirus nsp3-4 polyprotein induce the formation of double-membrane vesicles that mimic those associated with coronaviral RNA replication. *MBio* *8*, 1–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01658-17>.
- Paillasson, S., Stoica, R., Gomez-Suaga, P., Lau, D.H.W., Mueller, S., Miller, T., and Miller, C.C.J. (2016). There's Something Wrong with my MAM; the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases. *Trends Neurosci.* *39*, 146–157. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.01.008>.
- Park, J.S., Thorsness, M.K., Policastro, R., McGoldrick, L.L., Hollingsworth, N.M., Thorsness, P.E., and Neiman, A.M. (2016). Yeast Vps13 promotes mitochondrial function and is localized at membrane contact sites. *Mol. Biol. Cell* *27*, 2435–2449. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-02-0112>.
- Patel, A., Lee, H.O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M.Y., Stoykov, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T.M., et al. (2015). A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell* *162*, 1066–1077. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.047>.
- Péresse, T., Kovacs, D., Subra, M., Bigay, J., Tsai, M.C., Polidori, J., Gautier, R., Desrat, S., Fleuriot, L., Debayle, D., et al. (2020). Molecular and cellular dissection of the oxysterol-binding protein cycle through a fluorescent inhibitor. *J. Biol. Chem.* *295*, 4277–4288. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012012>.
- Peretti, D., Dahan, N., Shimoni, E., Hirschberg, K., and Lev, S. (2008). Coordinated Lipid Transfer between the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Complex Requires the VAP Proteins and Is Essential for Golgi-mediated Transport. *Mol. Biol. Cell* *19*, 3871–3884. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>.
- Peretti, D., Kim, S., Tufi, R., and Lev, S. (2020). Lipid Transfer Proteins and Membrane Contact Sites in Human Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* *7*, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00371>.
- Pérez-Sancho, J., Tilsner, J., Samuels, A.L., Botella, M.A., Bayer, E.M., and Rosado, A. (2016). Stitching Organelles: Organization and Function of Specialized Membrane Contact Sites in Plants. *Trends Cell Biol.* *26*, 705–717. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.007>.
- 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. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-01-0060>.
- Phillips, M.J., and Voeltz, G.K. (2016). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 69–82. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.8>.
- Pinot, M., Vanni, S., Pagnotta, S., Lacas-Gervais, S., Payet, L.A., Ferreira, T., Gautier, R., Goud, B., Antonny, B., and Barelli, H. (2014). Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science* (80- ). *345*, 693–697. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1255288/SUPPL\\_FILE/PINOT.SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1255288/SUPPL_FILE/PINOT.SM.PDF).
- Pizzuto, M., and Pelegrin, P. (2020). Cardiolipin in Immune Signaling and Cell Death. *Trends Cell Biol.* *30*, 892–903. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.09.004>.
- Porter, K.R., Palade, G. (1957). Studies on the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *3*. <https://doi.org/https://doi-org.insb.bib.cnrs.fr/10.1083/jcb.3.2.269>.
- Potting, C., Tatsuta, T., König, T., Haag, M., Wai, T., Aaltonen, M.J., and Langer, T. (2013). TRIAP1/PRELI complexes prevent apoptosis by mediating intramitochondrial transport of phosphatidic acid. *Cell Metab.* *18*, 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.07.008>.
- 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. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0180-9>.

Qin, H., Lim, L., Wei, Y., Gupta, G., and Song, J. (2013). Resolving the paradox for protein aggregation diseases: a common mechanism for aggregated proteins to initially attack membranes without needing aggregates. *F1000Research* *2*, 221. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-221.v1>.

Radulovic, M., Wenzel, E.M., Gilani, S., Holland, L.K., Lystad, A.H., Phuyal, S., Olkkonen, V.M., Brech, A., Jäättelä, M., Maeda, K., et al. (2022). Cholesterol transfer via endoplasmic reticulum contacts mediates lysosome damage repair. *EMBO J.* *41*, 1–18. <https://doi.org/10.15252/embj.2022112677>.

Rangaraju, V. (2023). VAP spatially stabilizes dendritic mitochondria to locally fuel synaptic plasticity. *BioRxiv Cell Biol.*

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. <https://doi.org/10.1083/jcb.116.2.307>.

Rigaud, J.L. (1997). Bio-Beads: An efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. *J. Struct. Biol.* *118*, 226–235. .

Rigaud, J.L., and Lévy, D. (1995). Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* *1231*, 223–246. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)72004-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)72004-7).

Roberts, B.L., Severance, Z.C., Bensen, R.C., Le, A.T., Kothapalli, N.R., Nuñez, J.I., Ma, H., Wu, S., Standke, S.J., Yang, Z., et al. (2019a). Transient Compound Treatment Induces a Multigenerational Reduction of Oxysterol-Binding Protein (OSBP) Levels and Prophylactic Antiviral Activity. *ACS Chem. Biol.* *14*, 276–287. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00984>.

Roberts, B.L., Severance, Z.C., Bensen, R.C., Le-McClain, A.T., Malinky, C.A., Mettenbrink, E.M., Nuñez, J.I., Reddig, W.J., Blewett, E.L., and Burgett, A.W.G. (2019b). Differing activities of oxysterol-binding protein (OSBP) targeting anti-viral compounds. *Antiviral Res.* *170*, 104548. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104548>.

Romeo, G.R., and Kazlauskas, A. (2008). Oxysterol and diabetes activate STAT3 and control endothelial expression of profilin-1 via OSBP1. *J. Biol. Chem.* *283*, 9595–9605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710092200>.

Romero, P., Obradovic, Z., Kissinger, C., Villafranca, J.E., and Dunker, A.K. (1997). Identifying disordered regions in proteins from amino acid sequence. *IEEE Int. Conf. Neural Networks - Conf. Proc.* *1*, 90–95. <https://doi.org/10.1109/ICNN.1997.611643>.

Roulin, P.S., Lötzerich, M., Torta, F., Tanner, L.B., Van Kuppeveld, F.J.M., Wenk, M.R., and Greber, U.F. (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. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.003>.

Ruff, K.M., and Pappu, R. V. (2021). AlphaFold and Implications for Intrinsically Disordered Proteins. *J. Mol. Biol.* *433*, 167208. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167208>.

Russ, W.P., and Engelman, D.M. (2000). The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol.* *296*, 911–919. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3489>.

Rzepnikowska, W., Flis, K., Kaminska, J., Grynberg, M., Urbanek, A., Ayscough, K.R., and Zoladek, T. (2017). Amino acid substitution equivalent to human chorea-acanthocytosis I2771R in yeast Vps13 protein affects its binding to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Hum. Mol. Genet.* *26*, 1497–1510. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx054>.

Saheki, Y., Bian, X., Schauder, C.M., Sawaki, Y., Surma, M.A., Klose, C., Pincet, F., Reinisch, K.M., and De Camilli, P. (2016). Control of plasma membrane lipid homeostasis by the extended synaptotagmins. *Nat. Cell Biol.* *18*, 504–515. <https://doi.org/10.1038/ncb3339>.

- de Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payraastre, 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. <https://doi.org/10.1083/jcb.201104062>.
- Saito, S., Matsui, H., Kawano, M., Kumagai, K., Tomishige, N., Hanada, K., Echigo, S., Tamura, S., and Kobayashi, T. (2008). Protein phosphatase 2C $\epsilon$  is an endoplasmic reticulum integral membrane protein that dephosphorylates the ceramide transport protein CERT to enhance its association with organelle membranes. *J. Biol. Chem.* *283*, 6584–6593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707691200>.
- Salvador-Gallego, R., Hoyer, M.J., and Voeltz, G.K. (2017). SnapShot: Functions of Endoplasmic Reticulum Membrane Contact Sites. *Cell* *171*, 1224.e1-1224.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.005>.
- Schauder, C.M., Wu, X., Saheki, Y., Narayanaswamy, P., Torta, F., Wenk, M.R., De Camilli, P., and Reinisch, K.M. (2014). Structure of a lipid-bound extended synaptotagmin indicates a role in lipid transfer. *Nature* *510*, 552–555. <https://doi.org/10.1038/nature13269>.
- Schlame, M., and Xu, Y. (2020). The Function of Tafazzin, a Mitochondrial Phospholipid–Lysophospholipid Acyltransferase. *J. Mol. Biol.* *432*, 5043–5051. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.03.026>.
- Schlame, M., Acehan, D., Berno, B., Xu, Y., Valvo, S., Ren, M., Stokes, D.L., and Epan, R.M. (2012). The physical state of lipid substrates provides transacylation specificity for tafazzin. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 862–869. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1064>.
- Schrader, M., Costello, J.L., Godinho, L.F., Azadi, A.S., and Islinger, M. (2016). Proliferation and fission of peroxisomes - An update. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1863*, 971–983. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.024>.
- Schroeder, L.K., Barentine, A.E.S., Merta, H., Schweighofer, S., Zhang, Y., Baddeley, D., Bewersdorf, J., and Bahmanyar, S. (2019). Dynamic nanoscale morphology of the ER surveyed by STED microscopy. *J. Cell Biol.* *218*, 83–96. <https://doi.org/10.1083/jcb.201809107>.
- Scorrano, L., De Matteis, M.A., Emr, S., Giordano, F., Hajnóczky, G., Kornmann, B., Lackner, L.L., Levine, T.P., Pellegrini, L., Reinisch, K., et al. (2019). Coming together to define membrane contact sites. *Nat. Commun.* *10*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09253-3>.
- Sesaki, H., Southard, S.M., Yaffe, M.P., and Jensen, R.E. (2003). Mgm1p, a Dynamin-related GTPase, Is Essential for Fusion of the Mitochondrial Outer Membrane. *Mol. Biol. Cell* *14*, 2342–2356. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-12-0788>.
- Shaib, A.H., Chouaib, A.A., Imani, V., Chowdhury, R., Georgiev, S.V., Mougios, N., Monga, M., Reshetniak, S., Mihaylov, D., Chen, H., et al. (2022). Expansion microscopy at one nanometer resolution.
- Shen, J.L., Fortier, T.M., Zhao, Y.G., Wang, R., Burmeister, M., and Baehrecke, E.H. (2021). Vmp1, Vps13D, and Marf/Mfn2 function in a conserved pathway to regulate mitochondria and ER contact in development and disease. *Curr. Biol.* *31*, 3028–3039.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.062>.
- Shibata, Y., Voeltz, G.K., and Rapoport, T.A. (2006). Rough Sheets and Smooth Tubules. *Cell* *126*, 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.019>.
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W.A., Palazzo, A.F., Kozlov, M.M., and Rapoport, T.A. (2010). Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell* *143*, 774–788. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.007>.
- Shirane, M., Wada, M., Morita, K., Hayashi, N., Kunitatsu, R., Matsumoto, Y., Matsuzaki, F., Nakatsumi, H., Ohta, K., Tamura, Y., et al. (2020). Protrudin and PDZD8 contribute to neuronal integrity by promoting lipid extraction required for endosome maturation. *Nat. Commun.* *11*. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18413-9>.
- Siegfried, H. (2023). The ER tether VAPA is required for proper cell motility and anchors ER-PM contact sites to focal adhesions. *BioRxiv Cell Biol.* <https://doi.org/10.1101/2022.10.17.512434>.
- Skehel, P.A., Martin, K.C., Kandel, E.R., and Bartsch, D. (1995). A VAMP-binding protein from *Aplysia* required for neurotransmitter release. *Science* (80-. ). *269*, 1580–1583. <https://doi.org/10.1126/science.7667638>.
- Skehel, P.A., Fabian-Fine, R., and Kandel, E.R. (2000). Mouse VAP33 is associated with the endoplasmic

- reticulum and microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 1101–1106. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.1101>.
- Slee, J.A., and Levine, T.P. (2019). Systematic Prediction of FFAT Motifs Across Eukaryote Proteomes Identifies Nucleolar and Eisoosome Proteins With the Predicted Capacity to Form Bridges to the Endoplasmic Reticulum. *Contact* *2*, 251525641988313. <https://doi.org/10.1177/2515256419883136>.
- Sleight, R.G., and Pagano, R.E. (1983). Rapid appearance of newly synthesized phosphatidylethanolamine at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* *258*, 9050–9058. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)44630-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)44630-8).
- 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.* *jcb.201709123*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709123>.
- Sokoya, T., Parolek, J., Foged, M.M., Danylchuk, D.I., Bozan, M., Sarkar, B., Hilderink, A., Philippi, M., Botto, L.D., Terhal, P.A., et al. (2022). Pathogenic variants of sphingomyelin synthase SMS2 disrupt lipid landscapes in the secretory pathway. *Elife* *11*, 1–35. <https://doi.org/10.7554/eLife.79278>.
- Song, Z., Ghochani, M., Mccaffery, J.M., Frey, T.G., and Chan, D.C. (2009). Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion. *20*, 3525–3532. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>.
- St-germain, J.R., Astori, A., Samavarchi-tehrani, P., and Abdouni, H. (2020). A SARS-CoV-2 BioID-based virus-host membrane protein interactome and virus peptide compendium. <https://doi.org/10.1101/2020.08.28.269175>.
- Staehelein, L.A. (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* *11*, 1151–1165. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11061151.x>.
- Stephan, T., Brüser, C., Deckers, M., Steyer, A.M., Balzarotti, F., Barbot, M., Behr, T.S., Heim, G., Hübner, W., Ilgen, P., et al. (2020). MICOS assembly controls mitochondrial inner membrane remodeling and crista junction redistribution to mediate cristae formation. *EMBO J.* *39*. <https://doi.org/10.15252/embj.2019104105>.
- Stoica, R., De Vos, K.J., Paillusson, S., Mueller, S., Sancho, R.M., Lau, K.F., Vizcay-Barrena, G., Lin, W.L., Xu, Y.F., Lewis, J., et al. (2014). ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat. Commun.* *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4996>.
- Stoica, R., Paillusson, S., Gomez-Suaga, P., Mitchell, J.C., Lau, D.H., Gray, E.H., Sancho, R.M., Vizcay-Barrena, G., De Vos, K.J., Shaw, C.E., et al. (2016). ALS / FTD -associated FUS activates GSK -3 $\beta$  to disrupt the VAPB – PTPIP 51 interaction and ER –mitochondria associations. *EMBO Rep.* *17*, 1326–1342. <https://doi.org/10.15252/embr.201541726>.
- Strating, J.R., and van Kuppeveld, F.J. (2017). Viral rewiring of cellular lipid metabolism to create membranous replication compartments. *Curr. Opin. Cell Biol.* *47*, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.005>.
- Strating, J.R.P.M., van der Linden, L., Albuлесcu, L., Bigay, J., Arita, M., Delang, L., Leyssen, P., van der Schaar, H.M., Lanke, K.H.W., Thibaut, H.J., et al. (2015). Itraconazole inhibits enterovirus replication by targeting the oxysterol-binding protein. *Cell Rep.* *10*, 600–615. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.054>.
- Subra, M., Antonny, B., and Mesmin, B. (2023a). ScienceDirect New insights into the OSBP – VAP cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* *82*, 102172. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102172>.
- Subra, M., Dezi, M., Bigay, J., Lacas-Gervais, S., Di Cicco, A., Araújo, A.R.D., Abélanet, S., Fleuriot, L., Debayle, D., Gautier, R., et al. (2023b). VAP-A intrinsically disordered regions enable versatile tethering at membrane contact sites. *Dev. Cell* *58*, 121-138.e9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.12.010>.
- Sugiki, T., Egawa, D., Kumagai, K., Kojima, C., Fujiwara, T., Takeuchi, K., Shimada, I., Hanada, K., and Takahashi, H. (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. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002465>.
- Sugiura, A., McLelland, G., Fon, E.A., and McBride, H.M. (2014). A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J.* *33*, 2142–2156.

<https://doi.org/10.15252/emj.201488104>.

Sun, D., Varlakhanova, N. V., Tornabene, B.A., Ramachandran, R., Zhang, P., and Ford, M.G.J. (2020). The cryo-EM structure of the SNX–BAR Mvp1 tetramer. *Nat. Commun.* *11*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15110-5>.

Suzuki, H., and Matsuoka, M. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant VAPB enhances TDP-43-induced motor neuronal toxicity. *J. Neurochem.* *119*, 1099–1107. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07491.x>.

Tan, J.X., and Finkel, T. (2022). A phosphoinositide signalling pathway mediates rapid lysosomal repair. *Nature* *609*. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05164-4>.

Tatsuta, T., and Langer, T. (2017). Intramitochondrial phospholipid trafficking. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* *1862*, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.08.006>.

Tatsuta, T., Scharwey, M., and Langer, T. (2014). Mitochondrial lipid trafficking. *Trends Cell Biol.* *24*, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.011>.

Terasaki, M., Chen, L.B., and Fujiwara, K. (1986). Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J. Cell Biol.* *103*, 1557–1568. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.4.1557>.

Thaler, R., Rumpler, M., Spitzer, S., Klaushofer, K., and Varga, F. (2011). Mospd1, a new player in mesenchymal versus epidermal cell differentiation. *J. Cell. Physiol.* *226*, 2505–2515. <https://doi.org/10.1002/jcp.22595>.

Theillet, F.-X., Kalmar, L., Tompa, P., Han, K.-H., Selenko, P., Dunker, A.K., Daughdrill, G.W., and Uversky, V.N. (2013). The alphabet of intrinsic disorder. *Intrinsically Disord. Proteins* *1*, e24360. <https://doi.org/10.4161/idp.24360>.

Tiberti, M.L., Antonny, B., and Gautier, R. (2020). The transbilayer distribution of polyunsaturated phospholipids determines their facilitating effect on membrane deformation. *Soft Matter* *16*, 1722–1730. <https://doi.org/10.1039/c9sm02107h>.

Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., and Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *0*, 341–360. .

Tilsner, J., Nicolas, W., Rosado, A., and Bayer, E.M. (2016). Staying Tight: Plasmodesmal Membrane Contact Sites and the Control of Cell-to-Cell Connectivity in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *67*, 337–364. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111840>.

Tomishige, N., Kumagai, K., Kusuda, J., Nishijima, M., and Hanada, K. (2009). Casein kinase I $\gamma$ 2 down-regulates trafficking of ceramide in the synthesis of sphingomyelin. *Mol. Biol. Cell* *20*, 348–357. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-07-0669>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.05.007>.

Tong, J., Manik, M.K., Yang, H., and Im, Y.J. (2016). Structural insights into nonvesicular lipid transport by the oxysterol binding protein homologue family. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* *1861*, 928–939. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.01.008>.

Toulmay, A., Whittle, F.B., Yang, J., Bai, X., Diarra, J., Banerjee, S., Levine, T.P., Golden, A., and Prinz, W.A. (2022). Vps13-like proteins provide phosphatidylethanolamine for GPI anchor synthesis in the ER. *J. Cell Biol.* *221*. <https://doi.org/10.1083/jcb.202111095>.

Udagawa, O., Ito, C., Ogonuki, N., Sato, H., Lee, S., Tripvanuntakul, P., Ichi, I., Uchida, Y., Nishimura, T., Murakami, M., et al. (2014). Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking ORP4, a sterol-binding protein in the OSBP-related protein family. *Genes to Cells* *19*, 13–27. <https://doi.org/10.1111/gtc.12105>.

Uversky, V.N., Oldfield, C.J., and Dunker, A.K. (2008). Intrinsically disordered proteins in human diseases: Introducing the D<sup>2</sup> concept. *Annu. Rev. Biophys.* *37*, 215–246. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125924>.

- Valm, A.M., Cohen, S., Legant, W.R., Melunis, J., Hershberg, U., Wait, E., Cohen, A.R., Davidson, M.W., Betzig, E., and Lippincott-Schwartz, J. (2017). Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature* *546*, 162–167. <https://doi.org/10.1038/nature22369>.
- Valverde, D.P., Yu, S., Boggavarapu, V., Kumar, N., Lees, J.A., Walz, T., Reinisch, K.M., and Melia, T.J. (2019). ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis. *J. Cell Biol.* *218*, 1787–1798. <https://doi.org/10.1083/JCB.201811139>.
- Vamparys, L., Gautier, R., Vanni, S., Bennett, W.F.D., Tieleman, D.P., Antonny, B., Etchebest, C., and Fuchs, P.F.J. (2013). Conical Lipids in Flat Bilayers Induce Packing Defects Similar to that Induced by Positive Curvature. *Biophysj* *104*, 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3836>.
- Vance, J.E. (1988). Compartmentalization and differential labeling of phospholipids of rat liver subcellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* *963*, 10–20. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(88\)90332-3](https://doi.org/10.1016/0005-2760(88)90332-3).
- Vance, J.E. (1990). Phospholipid Synthesis in a Membrane Fraction Associated with Mitochondria. *J. Biol. Chem.* *265*.
- Vance, J.E. (2015). Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells. *Traffic* *16*, 1–18. <https://doi.org/10.1111/tra.12230>.
- Venditti, R., Rega, L.R., Masone, M.C., Santoro, M., Polishchuk, E., Sarnataro, D., Paladino, S., D’Auria, S., Varriale, A., Olkkonen, V.M., et al. (2019). Molecular determinants of ER–Golgi contacts identified through a new FRET–FLIM system. *J. Cell Biol.* *218*, 1055–1065. <https://doi.org/10.1083/jcb.201812020>.
- Villani, M., Subathra, M., Im, Y. Bin, Choi, Y., Signorelli, P., del Poeta, M., and Luberto, C. (2008). Sphingomyelin synthases regulate production of diacylglycerol at the Golgi. *Biochem. J.* *414*, 31–41. <https://doi.org/10.1042/BJ20071240>.
- Vincent, T.L., Green, P.J., and Woolfson, D.N. (2013). LOGICOIL - Multi-state prediction of coiled-coil oligomeric state. *Bioinformatics* *29*, 69–76. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts648>.
- Voeltz, G.K., Rolls, M.M., and Rapoport, T.A. (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* *3*, 944–950. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf202>.
- Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., and Rapoport, T.A. (2006). A Class of Membrane Proteins Shaping the Tubular Endoplasmic Reticulum. *Cell* *124*, 573–586. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.047>.
- Volpatti, J.R., Al-Maawali, A., Smith, L., Al-Hashim, A., Brill, J.A., and Dowling, J.J. (2019). The expanding spectrum of neurological disorders of phosphoinositide metabolism. *DMM Dis. Model. Mech.* *12*. <https://doi.org/10.1242/dmm.038174>.
- Vormittag, S., Hüsler, D., Haneburger, I., Kroniger, T., and Anand, A. (2022). The Legionella -driven PtdIns ( 4 ) P gradient at LCV-ER membrane contact sites promotes Vap- , OSBP- and Sac1-dependent pathogen vacuole remodeling. *41*.
- De vos, K.J., Mórotz, G.M., Stoica, R., Tudor, E.L., Lau, K.F., Ackerley, S., Warley, A., Shaw, C.E., and Miller, C.C.J. (2012). VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 1299–1311. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr559>.
- Vreken, P., Valianpour, F., Nijtmans, L.G., Grivell, L.A., Plecko, B., Wanders, R.J.A., and Barth, P.G. (2000). Defective remodeling of cardiolipin and phosphatidylglycerol in Barth syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *279*, 378–382. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3952>.
- Wakana, Y., Kotake, R., Oyama, N., Murate, M., Kobayashi, T., Arasaki, K., Inoue, H., and Tagaya, M. (2015). CARTS biogenesis requires VAP-lipid transfer protein complexes functioning at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *Mol. Biol. Cell* *26*, 4686–4699. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-08-0599>.
- Wanders, R.J.A., and Waterham, H.R. (2006). Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 295–332. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133329>.
- 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.



<https://doi.org/10.1042/0264-6021:3610461>.

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*, 1373-1385.e11. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.002>.

Wang, J., Dye, B.T., Rajashankar, K.R., Kurinov, I., and Schulman, B.A. (2009). Insights into anaphase promoting complex TPR subdomain assembly from a CDC26-APC6 structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 987-989. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1645>.

Wang, J., Choi, J., Holehouse, A.S., Lee, H.O., Zhang, X., Jahnel, M., Maharana, S., Lemaitre, R., Pozniakovsky, A., Drechsel, D., et al. (2018). A Molecular Grammar Governing the Driving Forces for Phase Separation of Prion-like RNA Binding Proteins. *Cell* *174*, 688-699.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.006>.

Wang, P.Y., Weng, J., and Anderson, R.G.W. (2005). OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK1/2 activation. *Science* (80-. ). *307*, 1472-1476. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1107710/SUPPL\\_FILE/WANG\\_SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1107710/SUPPL_FILE/WANG_SOM.PDF).

Wang, P.Y., Weng, J., Lee, S., and Anderson, R.G.W. (2008). The N terminus controls sterol binding while the C terminus regulates the scaffolding function of OSBP. *J. Biol. Chem.* *283*, 8034-8045. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707631200>.

Weir, M.L., Klip, A., and Trimble, W.S. (1998). Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): A broadly expressed protein that binds to VAMP. *Biochem. J.* *333*, 247-251. <https://doi.org/10.1042/bj3330247>.

Westrate, L.M., Lee, J.E., Prinz, W.A., and Voeltz, G.K. (2015). Form follows function: The importance of endoplasmic reticulum shape. *Annu. Rev. Biochem.* *84*, 791-811. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072711-163501>.

Wieckowski, M.R.M.R., Giorgi, C., Lebedzinska, M., Duszynski, J., and Pinton, P. (2009). Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat. Protoc.* *4*, 1582-1590. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.151>.

Williams, J.A., and Ding, W.X. (2018). Mechanisms, pathophysiological roles and methods for analyzing mitophagy - Recent insights. *Biol. Chem.* *399*, 147-178. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0228>.

Wong, L.H., and Levine, T.P. (2016). Lipid transfer proteins do their thing anchored at membrane contact sites . . . but what is their thing? *Biochem. Soc. Trans.* *44*, 517-527. <https://doi.org/10.1042/BST20150275>.

Wong, L.H., Gatta, A.T., and Levine, T.P. (2019). Lipid transfer proteins: the lipid commute via shuttles, bridges and tubes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 85-101. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0071-5>.

Woolfson, D.N. (2005). The design of coiled-coil structures and assemblies. *Adv. Protein Chem.* *70*, 79-112. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70004-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70004-8).

Wozny, M.R., Luca, A. Di, Morado, D.R., Picco, A., Hoffmann, P.C., Miller, E.A., Vanni, S., and Kukulski, W. (2022). Supramolecular architecture of the ER-mitochondria encounter structure in its native environment. *BioRxiv* 1-26. <https://doi.org/10.1101/2022.04.12.488000>.

Wozny, M.R., Di Luca, A., Morado, D.R., Picco, A., Khaddaj, R., Campomanes, P., Ivanović, L., Hoffmann, P.C., Miller, E.A., Vanni, S., et al. (2023). In situ architecture of the ER-mitochondria encounter structure. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06050-3>.

Wu, H., Carvalho, P., and Voeltz, G.K. (2018). Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *Science* *361*. <https://doi.org/10.1126/science.aan5835>.

Wüstner, D., Lund, F.W., Röhrli, C., and Stangl, H. (2016). Potential of BODIPY-cholesterol for analysis of cholesterol transport and diffusion in living cells Memorial Issue to Robert Bittman in Chemistry and Physics of Lipids. *Chem. Phys. Lipids* *194*, 12-28. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.08.007>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.03.052>.

- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201191200>.
- Xu, L., Wang, X., Zhou, J., Qiu, Y., Shang, W., Liu, J.P., Wang, L., and Tong, C. (2020). Miga-mediated endoplasmic reticulum– mitochondria contact sites regulate neuronal homeostasis. *Elife* *9*, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.56584>.
- Yan, L., Qi, Y., Huang, X., Yu, C., Lan, L., Guo, X., Rao, Z., Hu, J., and Lou, Z. (2018). Structural basis for GTP hydrolysis and conformational change of MFN1 in mediating membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *25*, 233–243. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0034-8>.
- Yang, Z., Zhao, X., Xu, J., Shang, W., and Tong, C. (2018). A novel fluorescent reporter detects plastic remodeling of mitochondria-ER contact sites. *J. Cell Sci.* *131*. <https://doi.org/10.1242/jcs.208686>.
- Yeo, H.K., Park, T.H., Kim, H.Y., Jang, H., Lee, J., Hwang, G.-S., Ryu, S.E., Park, S.H., Song, H.K., Ban, H.S., et al. (2021). Phospholipid transfer function of PTPIP51 at mitochondria-associated ER membranes. *EMBO Rep.* *e51323*. <https://doi.org/10.15252/embr.202051323>.
- Yoshii, S.R., Kishi, C., Ishihara, N., and Mizushima, N. (2011). Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* *286*, 19630–19640. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.209338>.
- Yu, H., Liu, Y., Gulbranson, D.R., Paine, A., Rathore, S.S., and Shen, J. (2016). Extended synaptotagmins are Ca<sup>2+</sup>-dependent lipid transfer proteins at membrane contact sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 4362–4367. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517259113>.
- Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: Transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* *294*, 1–14. <https://doi.org/10.1042/bj2940001>.
- Zagotta, W.N., Hoshi, T., and Aldrich, R.W. (1990). Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* (80-. ). *250*, 568–571. <https://doi.org/10.1126/science.2122520>.
- Zamponi, E., Meehl, J.B., and Voeltz, G.K. (2022). The ER ladder is a unique morphological feature of developing mammalian axons. *Dev. Cell* *57*, 1369–1382.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.05.002>.
- Zeng, B., and Zhu, G. (2006). Two distinct oxysterol binding protein-related proteins in the parasitic protist *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *346*, 591–599. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.165>.
- Zeniou-Meyer, M., Zabari, N., Ashery, U., Chasserot-Golaz, S., Haeberle, A.M., Demais, V., Bailly, Y., Gottfried, I., Nakanishi, H., Neiman, A.M., et al. (2007). Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J. Biol. Chem.* *282*, 21746–21757. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702968200>.
- Zewe, J.P., Wills, R.C., Sangappa, S., Goulden, B.D., and Hammond, G.R.V. (2018). SAC1 degrades its lipid substrate Ptdins4P in the endoplasmic reticulum to maintain a steep chemical gradient with donor membranes. *Elife* *7*, 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.35588>.
- Zhai, L. (2022). Structural insights into bacterial sterol transport. *BioRxiv* <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2022.05.15.491920>.
- Zhang, Y., Liu, X., Bai, J., Tian, X., Zhao, X., Liu, W., Duan, X., Shang, W., Fan, H.Y., and Tong, C. (2016). Mitoguardin Regulates Mitochondrial Fusion through MitoPLD and Is Required for Neuronal Homeostasis. *Mol. Cell* *61*, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.017>.
- Zhang, Z., Kulkarni, K., Hanrahan, S.J., Thompson, A.J., and Barford, D. (2010). The APC/C subunit Cdc16/Cut9 is a contiguous tetratricopeptide repeat superhelix with a homo-dimer interface similar to Cdc27. *EMBO J.* *29*, 3733–3744. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.247>.
- Zhao, Y.G., Liu, N., Miao, G., Chen, Y., Zhao, H., and Zhang, H. (2018). The ER Contact Proteins VAPA/B Interact with Multiple Autophagy Proteins to Modulate Autophagosome Biogenesis. *Curr. Biol.* *28*, 1234–1245.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.002>.

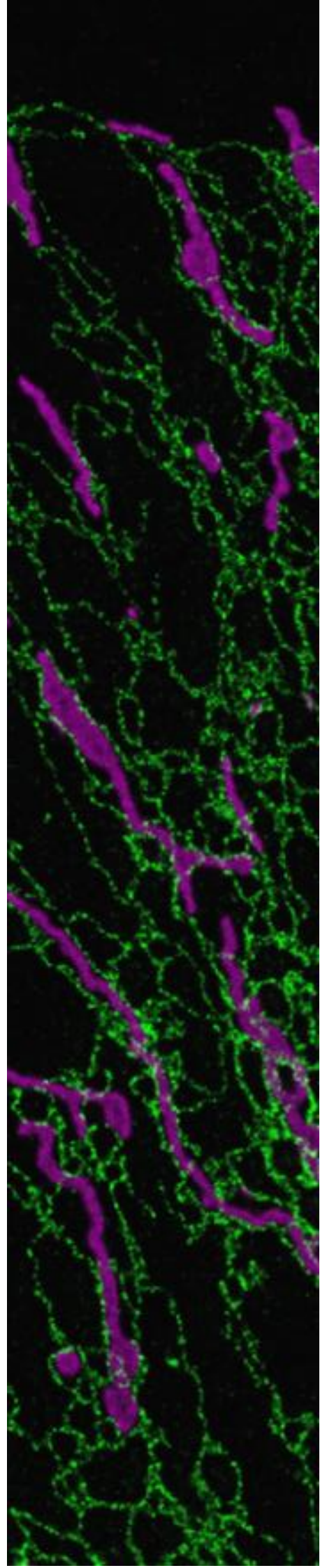
Zhou, Morals-Cabral, Mann, and MacKinnon (2000). Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411, 657–661. .

Zimmer, S., Stocker, A., Sarbolouki, M.N., Spycher, S.E., Sassoon, J., and Azzi, A. (2000). A novel human tocopherol-associated protein: Cloning, in vitro expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* 275, 25672–25680. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000851200>.

Zouiouich, M., Di Mattia, T., Martinet, A., Eichler, J., Wendling, C., Tomishige, N., Grandgirard, E., Fuggetta, N., Fromental-Ramain, C., Mizzon, G., et al. (2022). MOSPD2 is an endoplasmic reticulum–lipid droplet tether functioning in LD homeostasis. *J. Cell Biol.* 221. <https://doi.org/10.1083/jcb.202110044>.

Zurek, N., Sparks, L., and Voeltz, G. (2011). Reticulon short hairpin transmembrane domains are used to shape ER tubules. *Traffic* 12, 28–41. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01134.x>.

# Annexes



## Partie G : Annexes (articles)

Article 1 : Péresse T, Kovacs D, **Subra M**, Bigay J, Tsai MC, Polidori J, Gautier R, Desrat S, Fleuriot L, Debayle D, Litaudon M, Pham VC, Bignon J, Antonny B, Roussi F, Mesmin B. Molecular and cellular dissection of the oxysterol-binding protein cycle through a fluorescent inhibitor. *J Biol Chem.* **2020** Mar 27;295(13):4277-4288. doi: 10.1074/jbc.RA119.012012.

Article 2 : Miserey-Lenkei S, Trajkovic K, D'Ambrosio JM, Patel AJ, Čopič A, Mathur P, Schauer K, Goud B, Albanèse V, Gautier R, **Subra M**, Kovacs D, Barelli H, Antonny B. A comprehensive library of fluorescent constructs of SARS-CoV-2 proteins and their initial characterisation in different cell types. *Biol Cell.* **2021** Jul;113(7):311-328. doi: 10.1111/boc.202000158. Epub 2021 May 10.

Article 3 : **Subra M**, Dezi M, Bigay J, Lacas-Gervais S, Di Cicco A, Dias Araújo AR, Abélanet S, Fleuriot L, Debayle D, Gautier R, Patel A, Roussi F, Antonny B, Lévy D, Mesmin B. VAP-A intrinsically disordered regions enable versatile tethering at membrane contact sites. *Dev. Cell* 58, 121-138.e9. doi: 10.1016/j.devcel.2022.12.010.

Article 4 : **Subra M**, Antonny, B, and Mesmin, B. New insights into the OSBP – VAP cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 82, 102172. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102172>.

Article 5 : Revue en cours de révision. **Subra M**, Grimanelli Z, Gautier R, Mesmin B. *Stranger Twins*: A tale of resemblance and contrast between VAP proteins. **2023** *Contact*.

Article 6 : Nouvelle acceptée. **Subra M**, Mesmin B. La protéine VAP-A : fil conducteur de la communication entre organelles. *Médecine/Sciences* n° 6-7, vol. 39, juin-juillet **2023**. <https://doi.org/10.1051/medsci/2023085>.



# Molecular and cellular dissection of the oxysterol-binding protein cycle through a fluorescent inhibitor

Received for publication, November 21, 2019, and in revised form, February 9, 2020. Published, Papers in Press, February 19, 2020, DOI 10.1074/jbc.RA119.012012

Tiphaine Péresse<sup>†1</sup>, David Kovacs<sup>§</sup>, Mélody Subra<sup>§</sup>, Joëlle Bigay<sup>§</sup>, Meng-Chen Tsai<sup>§</sup>, Joël Polidori<sup>§</sup>,  
Romain Gautier<sup>§</sup>, Sandy Desrat<sup>‡</sup>, Lucile Fleuriot<sup>§</sup>, Delphine Debayle<sup>§</sup>, Marc Litaudon<sup>‡</sup>, Van-Cuong Pham<sup>¶</sup>,  
Jérôme Bignon<sup>‡</sup>, Bruno Antony<sup>§</sup>, Fanny Roussi<sup>‡2</sup>, and Bruno Mesmin<sup>§3</sup>

From the <sup>†</sup>Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France, the <sup>§</sup>Université Côte d'Azur, Inserm, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France, and the <sup>¶</sup>Advanced Center for Bioorganic Chemistry of the Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, 8404, Cauyay, Hanoi, Vietnam

Edited by Dennis R. Voelker

ORPphilins are bioactive natural products that strongly and selectively inhibit the growth of some cancer cell lines and are proposed to target intracellular lipid-transfer proteins of the oxysterol-binding protein (OSBP) family. These conserved proteins exchange key lipids, such as cholesterol and phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P), between organelle membranes. Among ORPphilins, molecules of the schweinfurthin family interfere with intracellular lipid distribution and metabolism, but their functioning at the molecular level is poorly understood. We report here that cell line sensitivity to schweinfurthin G (SWG) is inversely proportional to cellular OSBP levels. By taking advantage of the intrinsic fluorescence of SWG, we followed its fate in cell cultures and show that its incorporation at the *trans*-Golgi network depends on cellular abundance of OSBP. Using *in vitro* membrane reconstitution systems and cellular imaging approaches, we also report that SWG inhibits specifically the lipid transfer activity of OSBP. As a consequence, post-Golgi trafficking, membrane cholesterol levels, and PI(4)P turnover were affected. Finally, using intermolecular FRET analysis, we demonstrate that SWG directly binds to the lipid-binding cavity of OSBP. Collectively these results describe SWG as a specific and intrinsically fluorescent pharmacological tool for dissecting OSBP properties at the cellular and molecular levels. Our findings indicate that SWG binds OSBP with nanomolar affinity, that this binding is sensitive to the membrane environment, and that SWG inhibits the OSBP-catalyzed lipid exchange cycle.

ORPphilins are small natural bioactive molecules that have strong inhibitory activities on the growth of several human cancer cell lines. Despite their structural diversity, these compounds may have a related mechanism of action because they present a similar sensitivity profile on the NCI-60 cancer cell panel (1). It is proposed that ORPphilins directly target oxysterol-binding protein (OSBP)<sup>4</sup> and OSBP-related protein 4 (ORP4), which are two members of a conserved family of lipid-transfer proteins that transport key lipids such as cholesterol or phosphatidylserine between intracellular membranes (2, 3). OSBP is a cytosolic protein containing an N-terminal region capable of bridging the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) to that of the *trans*-Golgi network (TGN), and a C-terminal OSBP-related domain (ORD) responsible for the lipid transfer activity (4). We have previously demonstrated that OSBP directs cholesterol transport from the ER to the TGN through coupled counter-exchange and hydrolysis of the phosphoinositide PI(4)P at membrane contact sites between these two organelles (5). By using the ORPphilin OSW-1 on cells whose endogenous level of OSBP exceeds that of ORP4 by 2 orders of magnitude, we have shown that OSBP activity makes a major contribution to the intracellular trafficking of cholesterol (6). As a result, OSBP impacts on the physicochemical properties of cellular membranes. The other potential target of ORPphilins, ORP4, is the closest OSBP ortholog and is also described as a cholesterol/PI(4)P exchanger (7), among other assigned roles (8). However, ORP4 is virtually absent from most tissues except the brain, testis, and some transformed tissues, whereas OSBP is ubiquitously expressed.

Among the ORPphilins described by Burgett *et al.* (1) are the small molecules schweinfurthin A and B, which were shown to compete with oxysterol binding to OSBP and ORP4. Interestingly, however, unlike other ORPphilins, the affinity of these compounds was 40 times higher for OSBP than for ORP4, sug-

This work was supported by the CNRS, Inserm, Agence Nationale de la Recherche Grants ANR-15-CE11-0027-02 and ANR-11-LABX-0028-01, SATT Paris-Saclay (Project Glioved), and the International Associated Laboratory (LIA NATROCHEMLAB) between the CNRS (ICSN, France) and the VAST (Institute of Marine Biochemistry, Vietnam), Fondation pour la Recherche Médicale Convention Grant DEQ20180339156 Equipes FRM 2018 (to B. A.), and a Ph.D. fellowship from the Université Côte d'Azur (to M. S.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

This article contains Figs. S1–S5 and “Experimental procedures”.

<sup>1</sup> Present address: Département de Chimie, Ecole Normale Supérieure, Université PSL, Sorbonne Université, CNRS, Paris, France.

<sup>2</sup> To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33-1698231211; E-mail: fanny.roussi@cnrs.fr.

<sup>3</sup> To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33-493957767; Fax: 33-493957708; E-mail: mesmin@ipmc.cnrs.fr.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: OSBP, oxysterol-binding protein; ER, endoplasmic reticulum; TGN, *trans*-Golgi network; ORP, OSBP-related protein; ORD, OSBP-related domain; SWG, Schweinfurthin G; PI(4)P, phosphatidylinositol 4-phosphate; DHE, dehydroergosterol; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; SBP, streptavidin-binding peptide; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; dansyl, 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; PS, phosphatidylserine; PI, phosphatidylinositol; NBD, 12-(*N*-methyl-*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)).

## OSBP targeting by a fluorescent inhibitor

gesting that schweinfurthins have a better binding specificity to OSBP (1). It has also been shown that cell treatment with schweinfurthin A could shift OSBP localization to the Golgi area (1). The compounds from the schweinfurthin series (including vedelianin and schweinfurthins A-Q) are natural prenylated stilbenes isolated from the leaves or fruits of different species of the tropical genus *Macaranga* (9–14). Schweinfurthins harboring a hexahydroxanthene moiety are promising because they have a powerful and selective antiproliferative activity against some human cancer cell lines (10, 15). For example, schweinfurthins show  $GI_{50}$  values in the nanomolar range on cell lines derived from glioblastomas, whereas they have only limited activity on lung cancer cell lines, such as A549 (13, 16). However, this differential cytotoxicity is still poorly understood (15). Previous studies on the mechanism of action of these drugs have shown that they interfere with intracellular trafficking and lipid metabolism. For instance, the compound 3-deoxyschweinfurthin B reduced cellular cholesterol levels by decreasing its synthesis and increasing its export (17). Likewise, treatment with schweinfurthin G (hereafter abbreviated as SWG) resulted in the disruption of the TGN and the depletion from the cell surface of some lipids (GM1, sphingomyelin, and cholesterol) known to promote membrane order and domain formation (18). In these conditions, the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway was down-regulated (18).

At the molecular level, do schweinfurthins bind directly to OSBP? A biotinylated analogue of SWG has been shown to bind to OSBP, ORP1L, and ORP1S, albeit with low affinities (in the micromolar range) (18), which contrasted with the nanomolar concentrations needed to observe a cellular effect. More surprisingly, a bioactive fluorescently-tagged SWG showed a punctate intracellular distribution (18, 19), partially localized with an endosomal marker, but far from the ER/TGN interface where OSBP concentrates. Nevertheless, an interesting relationship between schweinfurthins and OSBP has been established by the fact that OSBP knockdown sensitizes cells to schweinfurthins, and conversely, that OSBP overexpression increases their resistance to schweinfurthins (1).

Altogether, these previous observations suggest that schweinfurthins may have an inhibitory effect on OSBP, but whether this effect is direct or indirect is not well-characterized. Here we dissect the fine interaction of the highly active compound SWG with OSBP using *in vitro* reconstitution of membrane systems and cellular imaging approaches. We reveal and take advantage of the fact that SWG has intrinsic fluorescence properties. This allows us first to track SWG within cells with good spatial and temporal precision, and second to perform OSBP binding kinetics. We report the nanomolar affinity of SWG for OSBP, its sensitivity to membrane interfacial environment, and provide evidence that SWG is able to inhibit the entire lipid exchange cycle catalyzed by OSBP by entering its ORD domain.

## Results

### OSBP expression level correlates with SWG sensitivity

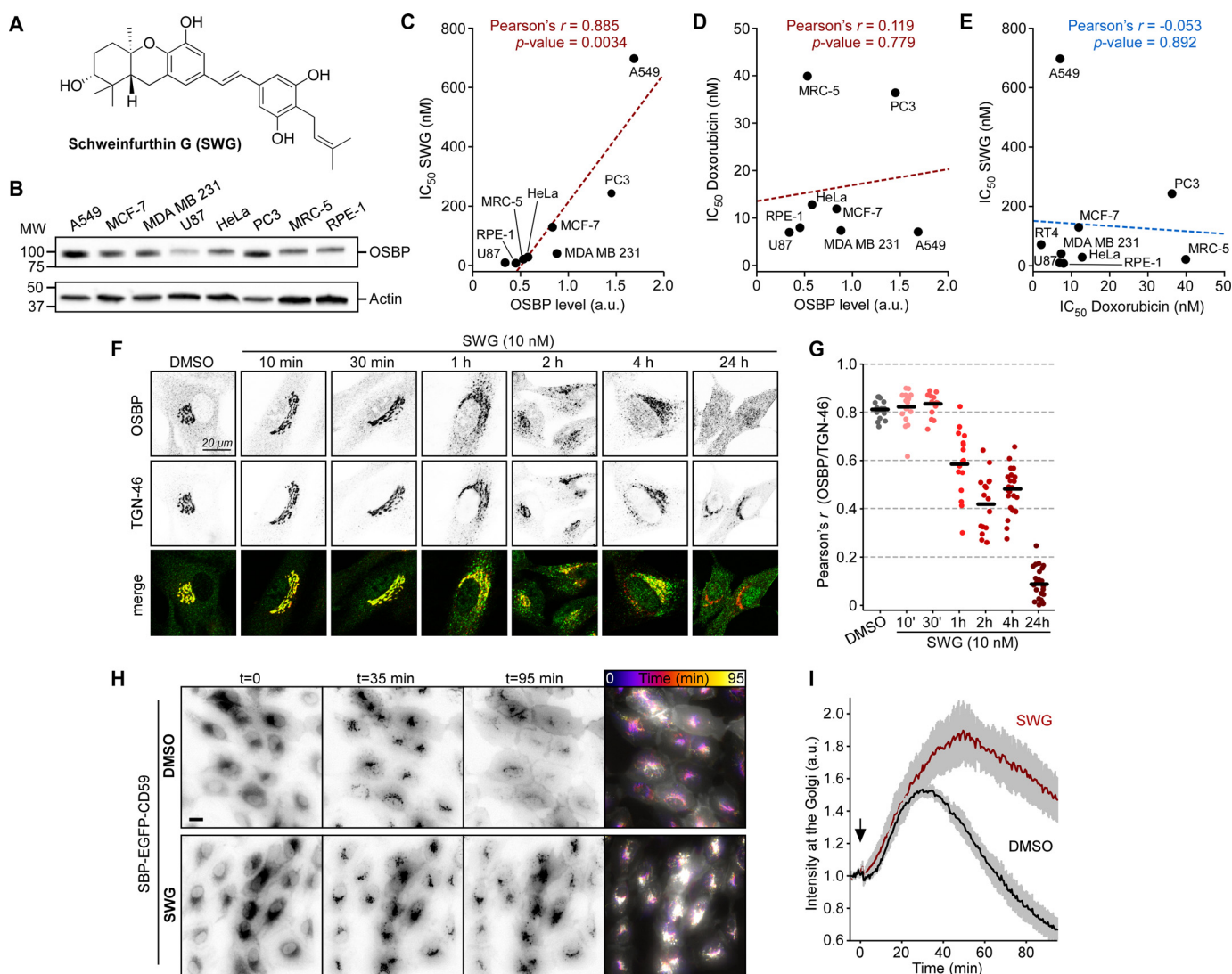
The specific cytotoxicity of schweinfurthins for a subset of NCI-60 cancer cell lines is not explained so far. Understanding what differentiates cell lines that do not respond identically to

SWG would allow a more detailed molecular analysis of its activity (Fig. 1A). Previous data have shown that modulating the cellular level of OSBP (via knockdown or overexpression) could influence the sensitivity of cells to schweinfurthins (1). We therefore thought that the differential cytotoxicity to schweinfurthins observed between various cell lines could be due to their divergent levels of OSBP expression. We then compared OSBP expression in a panel of several cancer cell lines, to which we added the immortalized retinal pigmented epithelial cell line (hTERT-RPE1; hereafter RPE1) that we previously identified as sensitive for OSW-1 (6), and measured their sensitivity to SWG. We found that the OSBP level varies up to 5-fold between these cell lines (Fig. 1B). OSBP expression is relatively low in human primary glioblastoma cell line U87 MG, as well as in RPE1, whereas it is higher in PC3 (human prostate cancer cell line) and maximal in A549 cells (adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells). We then performed viability tests after treatments with increasing doses of SWG for 72 h, and plotted the half-maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) obtained for each cell line according to their OSBP level (Fig. 1C). We observed that the sensitivity to SWG is inversely proportional to the cellular level of OSBP, that is, high expression correlated with resistance. As a control, we used doxorubicin, a compound not related to ORPphilins known to target DNA metabolism. In this case, we do not observe any correlation between OSBP expression level and doxorubicin sensitivity (Fig. 1D), and confirmed that the sensitivity profile for doxorubicin is different from that of SWG (Fig. 1E). These results indicate that OSBP has a protective effect against the cytotoxic activity of SWG. Note that a good correlation between sensitivity/resistance and expression level generally defines drugs with a single protein target (20).

### SWG modulates TGN to PM trafficking

Because OSBP is most likely the target of SWG, we next wanted to monitor OSBP intracellular distribution over time after adding SWG. We used RPE-1 cells because they are highly sensitive to SWG and have a wide and extensively tubulated TGN that is well-adapted to imaging. Fig. 1, F and G, show that in control cells, endogenous OSBP is predominantly co-localized with the TGN marker TGN-46, and weakly present in the cytosol. Upon short treatments with low doses of SWG, we noticed that this cytosolic fraction of OSBP shifted partially to the TGN (Fig. S1, A and B). In contrast, more prolonged treatments with SWG lead to the gradual dissociation of OSBP from the TGN, as judged by Pearson's correlation coefficient measurements over time (Fig. 1G), until it became mostly cytosolic after 24 h of treatment. We verified that this effect was not correlated to change in the amounts of OSBP or TGN-46 in response to SWG treatment (Fig. S1C). In agreement with previous observations, long treatments with SWG also lead to TGN disruption (18). In particular, the TGN loses its characteristic tubular morphology and becomes partly dispersed (Fig. S1, D and E). These short- and long-term effects, first on OSBP distribution and then on TGN morphology, suggest that SWG could quickly and durably affect Golgi trafficking.

To further analyze the effect of SWG on the secretory pathway, we sought to monitor the intracellular transport of



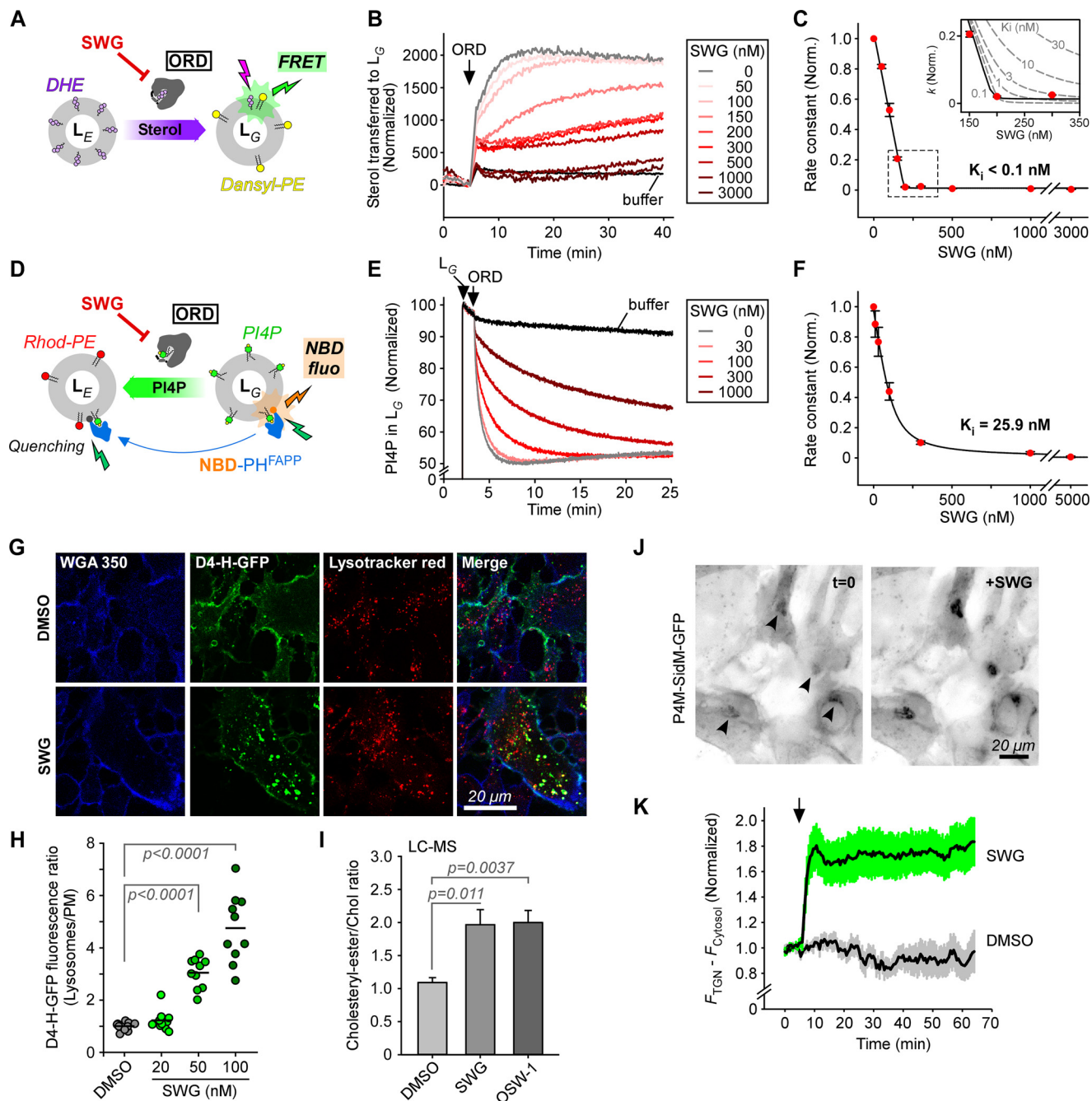
**Figure 1. Characterization of SWG sensitivity and effects on TGN trafficking.** *A*, structure of Schweinfurthin G (SWG). *B*, the immunoblot shows the relative level of endogenous OSBP expression in the indicated cell lines. *C* and *D*, measurements of cell viability ( $IC_{50}$  values) for the different cell lines treated with SWG (*C*) or doxorubicin (*D*) are plotted as a function of the normalized OSBP expression level found in each cell line. *E*, the sensitivity profile for SWG is plotted as a function of that for doxorubicin for each cell line used. The indicated Pearson's correlation values ( $r$ ) and  $p$  values were determined using SigmaPlot. *F*, RPE-1 cells cultured for 24 h were treated with DMSO or SWG as indicated. Cells were then fixed, permeabilized, and processed for immunofluorescence to assess the localization of endogenous OSBP and TGN-46. Confocal microscopy images are single optical sections. *G*, evolution of the Pearson's correlation coefficient between OSBP and TGN-46 upon SWG treatment over time, or DMSO as control. Measurements were performed on 15–25 cells for each condition, from 3 independent experiments with the mean values indicated by the black lines. *H*, time-lapse imaging of RPE-1 cells stably expressing SBP-EGFP-CD59 incubated with biotin and, as indicated, DMSO or SWG (50 nM), for the indicated time. Real-time images were acquired using a wide-field microscope at 2 frames/min. Temporal projections (right image) were performed on entire stacks of images. *I*, normalized intensity of SBP-EGFP-CD59 at the Golgi. Data are mean  $\pm$  S.E. ( $n = 4$ ). Scale bars, 20  $\mu$ m.

a newly synthesized protein from the ER to the plasma membrane via the Golgi. We therefore used the RUSH system, which allows to trigger the secretion of a cargo (here, the CD59 protein) fused with a streptavidin-binding peptide (SBP) by simply adding biotin to the culture medium (21). Because CD59 is also coupled to GFP, we could track and quantify its trafficking by live cell imaging. Experiments performed with control cells at 37  $^{\circ}$ C in DMEM/F-12 medium showed that CD59 initially retained in the ER ( $t = 0$ ) crosses the Golgi apparatus within 35 min after biotin addition, and finally reaches the plasma membrane after 90 min (Fig. 1H). Fig. 1I illustrates this wave of secretion by showing the fluorescence intensity in the Golgi region at each time point. Adding SWG does not affect the arrival of CD59 at the Golgi,

but strongly delays its exit. This is particularly visible in the temporal projection (Fig. 1H, right panel) showing that CD59 accumulates massively in the perinuclear region over time. Next, we performed RUSH assay with cells treated with siRNA against OSBP or with control siRNA (Fig. S2A). Interestingly, the silencing of OSBP could partially recapitulate the effect observed with SWG: it does not modify the entry of CD59 at the Golgi, but delays its exit (Fig. S2B). Altogether, these experiments suggest that SWG affects the formation of post-Golgi (but not pre-Golgi) transport intermediates, probably by targeting directly OSBP. Indeed, OSBP transfers cholesterol from the ER to the TGN via membrane contact sites, whereas bypassing the *cis*-Golgi (22), it is therefore in the best position to mediate the effects of SWG.



## OSBP targeting by a fluorescent inhibitor



**Figure 2. SWG is a potent inhibitor of the OSBP lipid exchange cycle and affects cellular lipid distribution.** *A*, experimental strategy for sterol-transfer assay. *B*, DHE transfer assay between  $L_E$  ( $130 \mu\text{M}$ ) and  $L_G$  ( $130 \mu\text{M}$ ) in the presence of OSBP ORD domain ( $0.2 \mu\text{M}$ ) with increasing amounts of SWG. *C*, inhibitory effect of SWG on DHE transfer mediated by the OSBP ORD domain. The graph represents normalized rate constants obtained from fitting curves such as in *B* from three independent experiments, as a function of SWG concentration. The curve is fitted with a quadratic equation, which gives the  $K_i$  (see “Experimental procedures”). The inset shows an enlarged view of the curve from the boxed region, and fits for theoretical  $K_i$  of 0.1, 1, 3, 10, and 30 nM (dashed lines). *D*, PI(4)P transfer assay. *E*, PI(4)P transfer measurement between  $L_G$  ( $300 \mu\text{M}$ ) and  $L_E$  ( $300 \mu\text{M}$ ) in the presence of NBD-PH<sup>FAPP</sup> ( $0.3 \mu\text{M}$ ) and OSBP ORD domain ( $0.1 \mu\text{M}$ ) with increasing amounts of SWG. *F*, inhibitory effect of SWG on PI(4)P transfer. Results are mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). *G*, confocal images of RPE-1 stably expressing D4-H-GFP and either treated with SWG (100 nM) or DMSO for 16 h. Thereafter, the cells were fixed and labeled with WGA-Alexa Fluor 350 (plasma membrane marker) and LysoTracker Red (lysosomal marker). *H*, D4-H-GFP fluorescence intensity ratio (lysosome/PM) from  $n = 10$  measurements for each concentration condition. Significance tested with an unpaired *t* test. *I*, cholesteryl ester/cholesterol ratio measured by LC-MS from lipid extracts of RPE-1 treated with SWG (50 nM) or OSW-1 (20 nM) for 2 h. Results are mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). *J*, time-lapse microscopy of P4M-SidM-GFP at the TGN (the specific P4M-SidM-GFP level at the TGN shown is obtained by subtracting the cytosol value from the TGN value). The arrow indicates SWG addition into the cell medium. Data are mean  $\pm$  S.E. ( $n = 6$ ).

### SWG inhibits OSBP lipid-exchange activity

To directly assess the effect of SWG on the lipid-transfer activity of OSBP, we conducted *in vitro* liposome-based reconstitution experiments. We first monitored the transfer of a cho-

lesterol fluorescent analogue (dehydroergosterol, DHE) from liposomes mimicking the ER ( $L_E$ ) to liposomes mimicking the Golgi ( $L_G$ ) (Fig. 2*A*). To facilitate the analysis, we used a short OSBP construct (residues 401–807), corresponding to the

ORD domain, which rapidly transfers DHE between liposomes (Fig. 2B, gray trace). We observed that this rate decreased drastically as we increased the concentration of SWG in the reaction mix (Fig. 2B). SWG blocked ORD-catalyzed transfer of DHE with an apparent  $K_i$  of  $<0.1$  nM (Fig. 2C), suggesting that SWG binds to the ORD domain of OSBP with a very high affinity. Note that because of this tight binding, the concentration dependence reflects the ratio of [SWG] to [ORD] and is different from a typical situation in which [Inhibitor]  $\gg$  [Enzyme].

Next, we measured the transfer of PI(4)P by the ORD from  $L_G$  to  $L_E$  liposomes using a specific probe (PH<sup>FAPP</sup>) labeled with a NBD molecule, as previously described (5) (Fig. 2D). The fluorescence of the probe was high at the surface of  $L_G$  liposomes, but was subsequently quenched as the probe followed PI(4)P relocation to  $L_E$  liposomes doped with rhodamine lipids (Fig. 2E). As with sterol transfer, SWG decreased the PI(4)P transfer rate in a dose-dependent manner, indicating that this drug inhibits the two transfer steps of the OSBP cycle.

We have previously shown that OSBP contributes significantly to the intracellular sterol distribution and influences the lipid order gradient between membranes along the secretory pathway (6). For this purpose, OSBP consumes massive amounts of PI(4)P at the TGN. We therefore tested whether SWG affects cholesterol distribution and PI(4)P turnover in cells. To do this, we first used RPE-1 cells stably expressing the probe D4-H-GFP derived from the perfringolysin O  $\theta$  toxin of *Clostridium perfringens*, which specifically recognizes cholesterol from 20 mol % in membranes. Previous work has shown that D4-H decorates mainly the plasma membrane at steady state, but that following cholesterol depletion (e.g. caused by the extracellular addition of methyl- $\beta$ -cyclodextrin), it translocates to endosomal compartments (23). Accordingly, we found that D4-H-GFP was mostly at the plasma membrane (positive for WGA) in control cells (Fig. 2G). Then, upon treatment with SWG, D4-H-GFP moved partially to endo-lysosomes in a dose-dependent manner, indicating that cholesterol levels dropped at the plasma membrane (Fig. 2H). To further examine whether SWG affects other pools of cholesterol, we measured the cholesteryl ester/cholesterol ratio by LC/MS. Indeed, we suspected that, by inhibiting OSBP, SWG could lead to excessive amounts of cholesterol in the ER, which would foster its esterification and incorporation into lipid droplets. As shown in Fig. 2I, a 2-h treatment with 100 nM SWG significantly increased the cholesteryl ester/cholesterol ratio, by about 2-fold, as compared with control DMSO-treated cells. As a comparison, we also tested OSW-1, another OSBP inhibitor, which provided a similar effect. Therefore, these two drugs seem to promote cholesterol esterification, which is consistent with a blockage of OSBP activity. Because OSBP continuously consumes PI(4)P at the TGN, its pharmacological inhibition should protect a substantial fraction of PI(4)P, as previously reported (6). To verify this, we monitored the distribution of the PI(4)P probe P4M-SidM coupled to a fluorophore by live cell imaging. P4M-SidM-GFP stably expressed in RPE-1 cells was mostly cytosolic and decorated slightly the TGN, in control cells (Fig. 2J). However, the addition of SWG caused a sudden 2-fold increase in TGN-associated P4M-SidM-GFP fluorescence, suggesting that the drug is capable of rapidly crossing cell membranes and acting

on the PI(4)P pool of the TGN (Fig. 2, J and K). Altogether, these experiments suggest that SWG affects membrane cholesterol levels at multiple steps along the secretory pathway, which coincides with an increase in the level of PI(4)P at the Golgi, suggesting that OSBP is the key cellular target of SWG. Consistently, OSBP silencing also alters cholesterol and PI(4)P distribution significantly as previously reported (6), and as shown in Fig. S2, C and D.

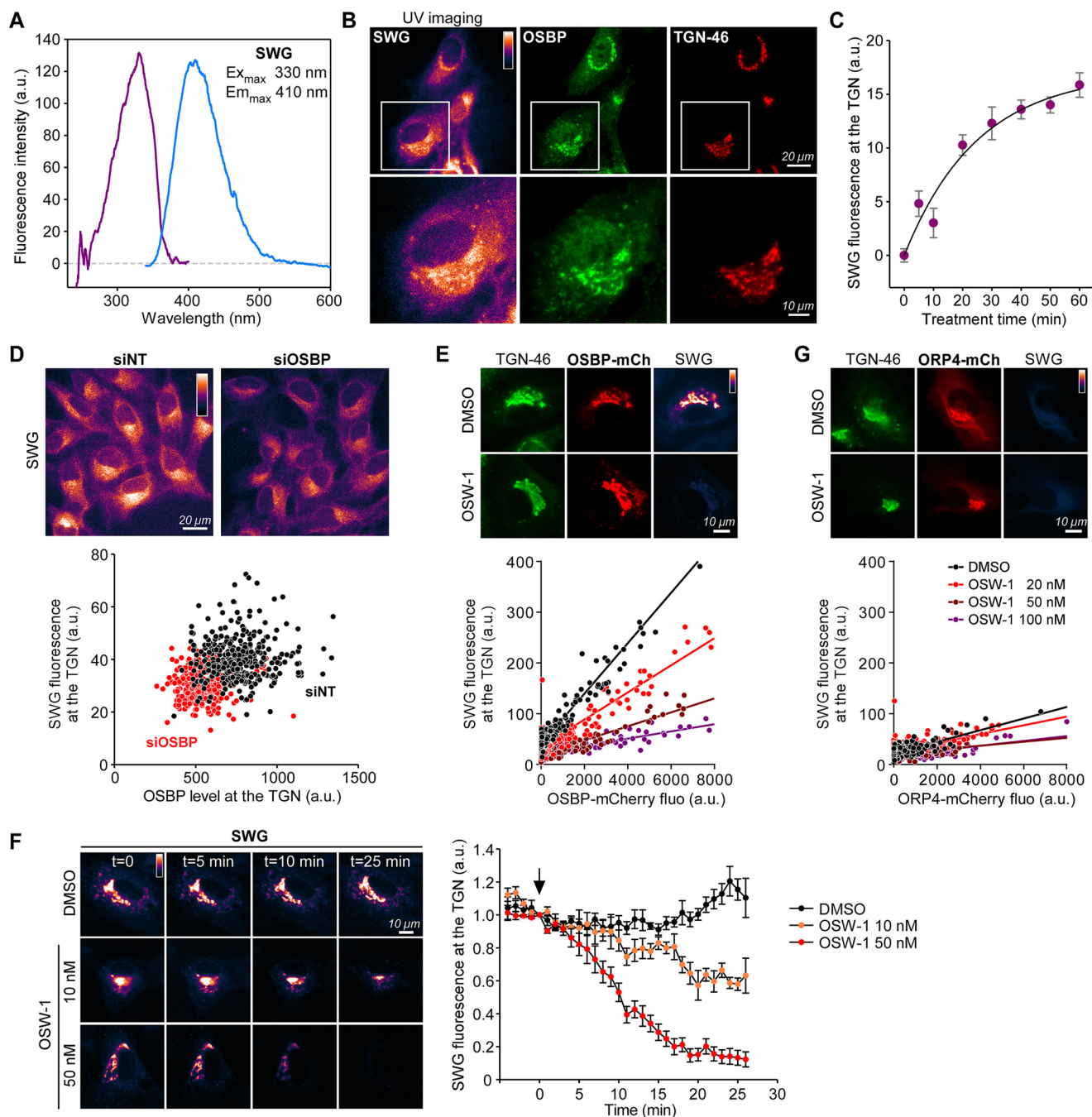
By controlling the turnover of PI(4)P at the Golgi, OSBP regulates its own membrane attachment and ER-TGN contact formation (5). It is therefore possible that SWG facilitates organelle tethering by inhibiting OSBP. To verify this, we used cells overexpressing mCherry-OSBP, GFP-VAP-A, and a TGN marker, TagBFP- $\beta$ GalT1. We observed that following the addition of SWG, not only OSBP, but also VAP-A, translocate rapidly and massively to the perinuclear region, suggesting that SWG promotes the formation of ER-TGN contact sites (Fig. S3, A and B). Note that this observation corroborates our data showing that endogenous OSBP shifted to the TGN after a short treatment of SWG (Fig. S1A). This effect is probably due to the inhibition of OSBP-exchange activity, but it cannot be excluded that SWG also affects structural determinants of contact sites.

### Imaging SWG reveals its specificity for OSBP

We suspected that SWG could be intrinsically fluorescent because its stilbene motif comprises several conjugated double bonds (Fig. 1A). To test this, we performed fluorimetric analysis of the drug in a saline buffer. As shown in Fig. 3A, SWG exhibited excitation and emission spectra in the near UV range, with excitation and emission peaks at 330 and 410 nm, respectively. We then sought to visualize SWG in a cellular context via its intrinsic fluorescence. Using an imaging system adapted to UV, we directly assessed SWG subcellular distribution in RPE-1 cells after a 30-min treatment at 37 °C with 1  $\mu$ M of the drug. Remarkably, SWG was enriched exactly where OSBP is located, that is, in the TGN region marked by TGN-46 (Fig. 3B). Outside the TGN, SWG showed a weaker and diffused signal, as it likely labels membranes due to its partial hydrophobicity. Importantly, SWG distribution contrasted with that of a previously reported fluorescent SWG derivative (called SG-Fluor), consisting of SWG tagged with an additional fluorescent group, which decorated endosomal compartments (18). We next monitored the incorporation of SWG into the TGN over time (Fig. S3C and S4A). Interestingly, after 5–10 min of incubation, SWG fluorescence was already visible in the perinuclear region, suggesting that SWG rapidly crosses the plasma membrane. This was confirmed by experiments showing that SWG could readily diffuse through giant plasma membrane vesicles (Fig. S4, C and D). The gradual increase ( $t_{1/2} = 25$  min) of SWG at the TGN level coincided with the recruitment of OSBP in the same region over time (Fig. 3C and Fig. S4B).

We reasoned that if SWG binds specifically to OSBP, the cellular SWG fluorescence intensity should reflect properly the abundance of OSBP. We therefore assessed SWG fluorescence in cells in which OSBP was either silenced or overexpressed (Fig. 3, D and E). We treated RPE-1 cells with siRNA directed against OSBP or with control siRNA for 72 h and then incu-

## OSBP targeting by a fluorescent inhibitor



**Figure 3. Direct fluorescent imaging of SWG in cells provides evidence of its specificity for OSBP.** *A*, excitation and emission spectra of SWG. *B*, epifluorescence images of RPE-1 cells labeled with SWG ( $1 \mu M$ ) for 30 min in growth medium at  $37^\circ C$ , fixed, permeabilized, and processed for immunofluorescence to assess the localization of endogenous OSBP and TGN-46. Scale bar:  $20 \mu m$ . *C*, SWG fluorescence intensity at the TGN over time. Data are mean  $\pm$  S.E. ( $n = 10$ ). *D*, RPE-1 cells were treated either with control siRNA (siNT) or siRNA against OSBP, then processed as in *B*. Top, representative epifluorescence images of SWG. Bottom, SWG fluorescence at the TGN as a function of OSBP cellular levels, as determined by immunofluorescence quantification. Measurements were performed on more than 300 cells for each condition. *E*, top: epifluorescence images of RPE-1 transfected with OSBP-mCherry for 18 h, labeled with SWG ( $1 \mu M$ ) for 30 min in the presence of OSW-1 (100 nM) or DMSO as control, then immunolabeled with anti-TGN-46. Bottom: SWG fluorescence intensity at the TGN as a function of OSBP-mCherry expression levels in the presence of the indicated amount of OSW-1. Measurements were performed on 200–325 cells for each condition. *F*, RPE-1 cells were transfected with ORP4-mCherry for 18 h and treated as in *E*. *G*, left: time-lapse microscopy of RPE-1 cells overexpressing OSBP-mCherry, labeled with SWG ( $1 \mu M$ ) for 30 min, and treated with OSW-1 or DMSO as indicated. Right, normalized levels of SWG at the TGN. The arrow indicates addition of drugs into the cell medium. Data are mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ).

bated the cells with  $1 \mu M$  SWG for 30 min. Although silencing efficiency was variable among cells (Fig. 3*D*, bottom panel), SWG fluorescence at the TGN was generally much less intense in silenced cells as compared with control cells, indicating that SWG is poorly recruited when low amounts of OSBP are present. Conversely, in OSBP-overexpressing cells, SWG was

extremely enriched at the TGN and co-localized with OSBP-mCherry and TGN-46 (Fig. 3*E*). The level of SWG fluorescence in the cells almost perfectly correlated with that of OSBP-mCherry, suggesting that incorporation of SWG at the TGN is attributable to OSBP. To further verify this hypothesis, we treated the cells with SWG and an increasing dose of OSW-1.

This compound also binds to OSBP but is not fluorescent, so it should compete with SWG for OSBP. OSW-1 prevented the TGN labeling by SWG in a dose-dependent manner. The addition of 20, 50, and 100 nM OSW-1 caused a reduction in the amount of SWG at the TGN by 1.9, 3.6, and 7-fold, respectively (Fig. 3E, bottom panel). Alternatively, we first labeled cells overexpressing OSBP-mCherry with SWG and then added the competitor OSW-1 (Fig. 3F). By time lapse imaging experiments, we observed that OSW-1 gradually chased out SWG from the TGN in a dose-dependent manner ( $t_{1/2} = 9.2 \pm 0.7$  min with 50 nM OSW-1), further indicating that the retention of SWG at the TGN is most likely related only to OSBP.

ORPphilins were initially described as being able to bind to OSBP and ORP4, but schweinfurthins A and B exhibited a clear preference for OSBP over ORP4 (1). To assess SWG specificity for OSBP over ORP4, we overexpressed ORP4-mCherry instead of OSBP-mCherry and performed treatment with SWG for imaging (Fig. 3G). ORP4 did not facilitate SWG recruitment, thus demonstrating that SWG selectively targets OSBP.

### Biochemical characterization of SWG

Because SWG rapidly penetrates into cells to target OSBP (Fig. S4), we hypothesized that SWG is able to passively interact with membranes due to its partial hydrophobicity. To characterize the interactions of SWG with both membranes and OSBP, we performed *in vitro* fluorescence measurements of SWG. Spectral analysis revealed that when the drug was switched from an aqueous medium to polar solvents (such as methanol or acetonitrile), its fluorescence increased and this effect was accompanied by a blue shift (Fig. 4A). Interestingly, adding detergent micelles (Thesit<sup>®</sup>; green curves) or liposomes (Fig. 4B, blue curve) further increased the fluorescent signal and structured SWG emission spectrum, indicating that SWG fluorescence is even more sensitive to interfacial environments.

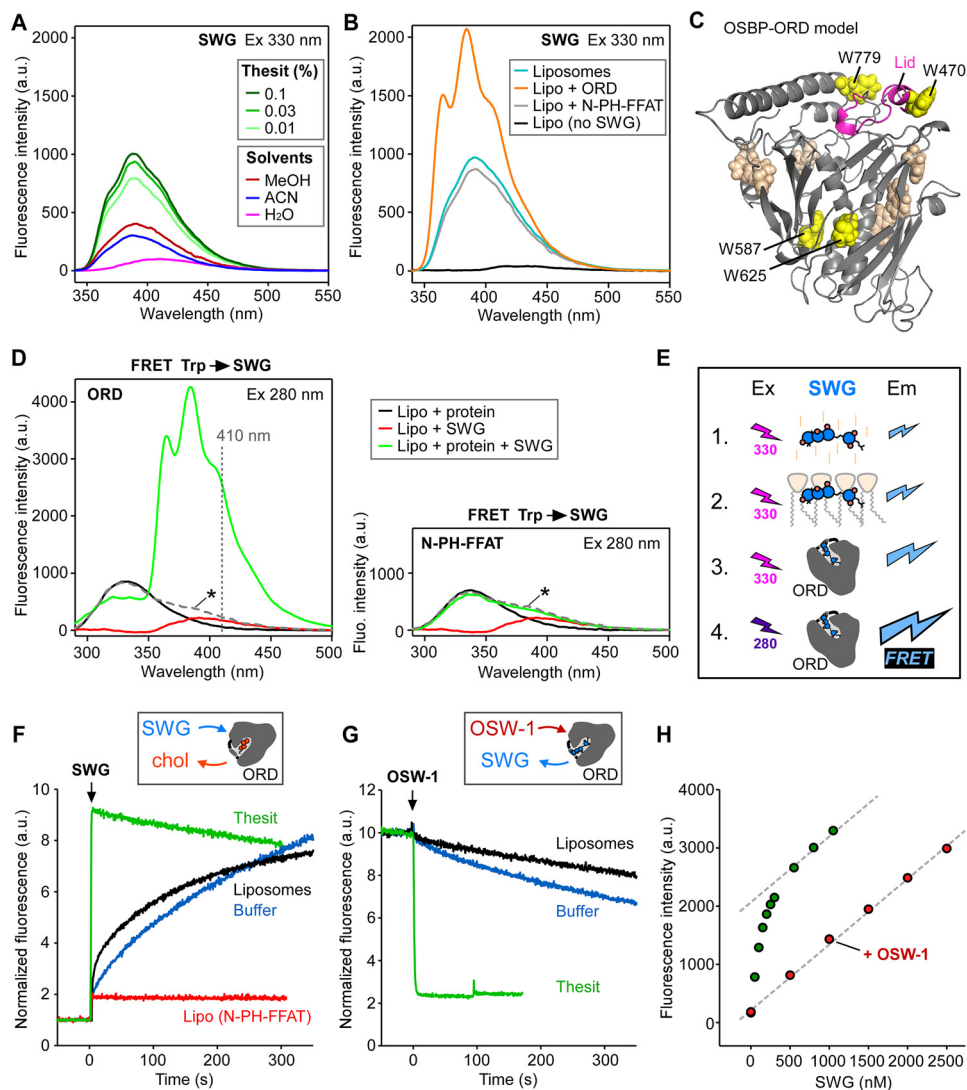
We reasoned that SWG could also experience a change in environment if it enters in the hydrophobic cavity of the ORD of OSBP. We added OSBP constructs to a mixture containing 200 nM SWG and liposomes (0.1 mg/ml), and recorded SWG emission spectra upon excitation at 330 nm (Fig. 4B). Remarkably, the addition of ORD (200 nM) more than doubled the fluorescence intensity of SWG as compared with liposomes alone. In contrast, adding 200 nM of the N-PH-FFAT construct, *i.e.* the N-terminal region of OSBP, did not promote any fluorescence change. These results strongly suggest that the drug inserts into the binding cavity of the ORD. To further characterize the contact between SWG and OSBP, we performed the 3D structure prediction of the ORD of OSBP by homology modeling, based on the crystal structure of the yeast OSBP-related protein Osh1 (24), which also exchanges sterol for PI(4)P (Fig. 4C). We noticed that several tryptophan residues are close to the cavity of the ORD (indicated in yellow) and thus in good position to form fluorescence resonance energy transfer (FRET) pairs with SWG. To test this hypothesis, we mixed liposomes with the ORD, with SWG, or with a mixture of ORD and SWG, and performed spectral analysis upon tryptophan excitation at 280 nm (Fig. 4D). As expected, a tryptophan fluorescence signal peaking at  $\sim 340$  nm was observed when the

ORD was employed alone (*black line*), whereas the signal obtained with SWG alone (*red line*) was weak because it is poorly excited at 280 nm (Fig. 3A). Strikingly, when both the ORD and SWG were present, we observed a massive FRET signal (*green line*) with peaks characteristic of SWG (as seen in Fig. 4B). The FRET signal was much higher than the theoretical sum of the signals obtained with the ORD or SWG separately (*dashed gray line*). The FRET signal was also 2-fold greater than the SWG fluorescent signal obtained upon direct excitation at 330 nm under the same conditions. The apparition of FRET was concomitant with partial quenching of tryptophan emission at 340 nm. Altogether, these results provide evidence that SWG interacts with the ORD of OSBP by entering in its lipid-binding pocket, and also suggest that FRET between the ORD and SWG is a useful tool to probe this interaction (Fig. 4E).

### Kinetics of SWG binding to the ORD

We took advantage of the large FRET signal to monitor the binding and dissociation kinetics of SWG to the ORD. We first mixed SWG with ORD (200 nM each) and measured the changes in fluorescence over time at 410 nm, which is the most specific FRET wavelength, upon tryptophan excitation at 280 nm. As shown in Fig. 4F, SWG binding to the ORD was faster when liposomes (1 mg/ml) were present in the cuvette than simply in buffer alone (compare the *black* and *blue* curves). As a control, we replaced the ORD by the N-terminal half of OSBP (residues 1–408, N-PH-FFAT) and observed no change in fluorescence (*red curve*). Interestingly, addition of detergent micelles (Thesit<sup>®</sup>) caused the reaction to be completed in about 2 s (*green curve*, see also Fig. S5A), suggesting that the association rate of SWG with the ORD is very fast ( $k_{on} > 2 \text{ s}^{-1}$ ) in the presence of an interfacial environment. The effect of membranes or micelles can be explained by the fact that the ORD is purified with a cholesterol molecule in its binding pocket, as shown by mass spectrometric analysis (Fig. S5B). The presence of a membrane interface likely facilitates the dissociation of cholesterol from the ORD, thereby allowing SWG entry. Our results in Fig. 3F suggest that SWG could be removed by OSW-1 from their binding site, so we next monitored the effect of OSW-1 addition (in slight excess; 500 nM) on SWG-loaded ORD in the same conditions as in Fig. 4F, *i.e.* in buffer supplemented or not with liposomes or micelles. With micelles, the rate of dissociation of SWG from the ORD was very fast ( $k_{off} > 2 \text{ s}^{-1}$ ), in contrast, SWG exit from the ORD in buffer alone or in the presence of liposomes was rather slow (Fig. 4G). Finally, to further analyze the interaction of SWG with the ORD of OSBP, we performed equilibrium measurements using FRET. Fig. 4H shows a titration experiment in which we added increasing amounts of SWG to a mixture containing the ORD (200 nM) and 0.1% Thesit<sup>®</sup>. Below 200 nM, the stepwise addition of SWG induced a large FRET signal. Thereafter, the apparent increase in fluorescence was no longer due to FRET but to SWG direct fluorescence. To reveal the saturation of the FRET signal, we repeated the same experiment, but in the presence of OSW-1 (200 nM) to block the ORD. In this case, the increase in fluorescence came only from SWG increments in the mixture and not from FRET. Fitting the dose-response curve after correction of the nonspecific signal indicated an apparent affinity of SWG for

## OSBP targeting by a fluorescent inhibitor



**Figure 4. The fluorescence properties of SWG are influenced by its environment.** *A*, emission spectra of SWG (200 nm) upon excitation at 330 nm in various solvents or in the presence of the indicated amount of detergent in water (*green curves*). *B*, emission spectra of SWG (200 nm) in the presence of liposomes (0.1 mg/ml), with or without the addition of ORD (200 nm) or N-PH-FFAT (200 nm) in HKM buffer. The *black curve* represents the signal obtained with liposomes without SWG. *C*, homology modeling of the ORD domain of OSBP. Tryptophan residues (represented as *spheres*) are colored in *yellow* when close to the lipid-binding cavity. The lid of the ORD is colored in *pink*. *D*, spectra analysis upon tryptophan excitation at 280 nm. The protein added was either the ORD (200 nm, *left panel*) or the N-PH-FFAT construct (200 nm, *right panel*) in HKM buffer, in the presence of liposomes (0.1 mg/ml), with or without the addition of SWG (200 nm). The *dashed curves* (*asterisk*) represent the theoretical sum of the fluorescence values from *black* and *red curves*. *E*, sketch summarizing the effects of the local environment on SWG fluorescence intensity. *F*, time course of SWG (200 nm) binding into the ORD (200 nm) as measured by FRET (excitation 280 nm; emission 410 nm). When indicated, the reaction was performed in the presence of Thesit® (0.1%, *green curve*), liposomes (0.1 mg/ml, *black curve*), or in HKM buffer alone (*blue curve*). In a control experiment, the ORD was replaced with N-PH-FFAT (200 nm, *red curve*). *G*, time course of SWG (200 nm) release from the ORD (200 nm) using OSW-1 (500 nm). The conditions are the same as in *F*. *H*, binding of SWG to ORD measured by FRET. The sample initially contained the ORD (200 nm) in Thesit® (0.1%), to which an increasing amount of SWG was added (*green dots*). When indicated, the initial sample was supplemented with 200 nm OSW-1 (*red dots*).

the ORD in the presence of detergent micelles of  $K_d = 35.5$  nM. This affinity is much lower than the  $K_i$  observed in cholesterol-exchange assays performed with liposomes (Fig. 2C) suggesting that the micellar environment unlocks the ORD, hence leading to a decrease in affinity and to a dramatic acceleration in the dissociation kinetics of ORD ligands.

### Discussion

The discovery of ORPphilins is an important step for the study of ORPs, highlighting the importance of these proteins in cancer, and providing pharmacological tools to characterize their molecular activities and physiological functions. ORPphilins include compounds with a variety of structures, comprising

OSW-1, cephalostatin, stelletin, and schweinfurthin subfamilies (1). Although they are described to have the same intracellular targets (OSBP and ORP4), their differential affinity and the way they interact with the cellular environment could have different functional and physiological consequences.

The present work addresses several properties of SWG, a natural product of the schweinfurthin family, which displays antiproliferative activities for specific tumor-derived cell lines. By using a combination of reconstitutions on artificial membranes and cellular approaches, we show that SWG binds directly to the ORD domain of OSBP. This binding prevents the lipid-exchange cycle of OSBP, *i.e.* PI(4)P consumption and cholesterol transfer, and promotes ER-TGN contact site stabiliza-

tion. As a result, post-Golgi trafficking and plasma membrane cholesterol levels are severely affected.

We showed that when there are more or less copies of OSBP present in a cell type, a higher or lower SWG concentration is required, respectively, to mediate a cytotoxic effect (Fig. 1C). This probably reflects a buffering effect: SWG concentration must be adjusted to reduce total OSBP activity below a critical threshold for cell viability. Consistently, it is reported that OSBP overexpression confers cell resistance to schweinfurthins, whereas OSBP silencing sensitizes cells to these drugs (1). First, this excludes a potential toxic effect due to excessive ER-TGN membrane tethering triggered by SWG, because in this case, cytotoxicity would increase with overexpression of OSBP. Second, this may explain the specific cytotoxicity of these drugs for a subset a cancer cell lines. In the future, it would be interesting to verify whether cell sensitivity to various ORPphilins could be predicted according to tissue concentration of OSBP.

High levels of cholesterol in the ER usually leads to two cellular responses: the rapid esterification of excess cholesterol followed by its incorporation into lipid droplets (25), and a slower transcriptional response mediated by the cholesterol homeostatic regulatory machinery (26), including the transcription factors sterol regulatory element-binding protein (SREBP) and liver X-receptor, which stop cholesterol biosynthesis and uptake, and promote its export from the cell. The addition of SWG blocks cholesterol fluxes through OSBP coming from the ER. As a result, we showed an increased cholesterol esterification. Interestingly, previous work has revealed that treatment with 3-deoxyschweinfurthin B induces changes in the expression of genes related to cholesterol homeostasis controlled by SREBP and liver X-receptor (17). Because these regulators are coupled to cholesterol-sensing mechanisms localized at the ER, it is possible that inhibiting OSBP triggers such a homeostatic response. Further studies would be needed, however, to address the direct involvement of the OSBP cycle in cholesterol sensing at the ER (e.g. through the SCAP/SREBP-2 pathway).

Fluorescent probes are instrumental for tracking biomolecules with good spatio-temporal resolution in living cells by imaging. In particular, the use of fluorescently tagged drugs can shed light on their specific interactions with cellular receptors, and provide molecular insights into pharmacological mechanisms. The major drawback of adding a large fluorescent moiety to compounds is that it can alter their pharmacological properties by modifying their chemical properties and/or their cellular distribution. Several studies have been conducted to make some ORPphilins fluorescent to visualize them in cells. A fluorescent OSW-1 analogue, labeled with the 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-*N*-methylamino)-2,1,3-benzoxadiazolyl (DBD) group, was shown to distribute at the Golgi and to a lesser extent at the ER, and retains anti-proliferative properties (27). For schweinfurthins, fluorescent probes with differential activity between cell lines have been synthesized, such as schweinfurthin B and F modified by a *p*-nitro stilbene group, showing fluorescence in the visible spectrum (19). However, these analogues localized to punctate structures that do not resemble the Golgi compartment. Similarly, a fluorescent probe consisting of SWG with an additional *p*-nitro stilbene group (called SG-Fluor) was localized to punctate structures

that overlapped with the endosomal marker LAMP1 (18). This seems not consistent with the subcellular distribution of OSBP, which is mainly found at the TGN and weakly localized to endosomes. In the present study, we exploited the intrinsic fluorescence properties of SWG in imaging and in membrane reconstitution assays. By using a UV-sensitive imaging system, we were able to observe directly SWG in its intracellular site of action, that is, at the TGN. We showed that when OSBP cellular abundance was adjusted (via silencing or overexpression), the cellular incorporation of SWG was modified accordingly, suggesting a high specificity of the drug for OSBP. We also showed that variations in ORP4 levels had little or no impact on SWG cell labeling. These results indicate that SWG is selective toward OSBP. This is consistent with earlier findings showing that schweinfurthin A had a better binding specificity to OSBP as compared with ORP4 (1).

The ORD domain of several ORP/Osh proteins, including OSBP, comprises tryptophans close to the lipid-binding pocket (Fig. 4C). In a previous study, we showed that FRET could be measured between tryptophans of Osh4 and the intrinsically fluorescent sterol DHE once bound in the pocket (28). Here, we took advantage of the fluorescence properties of SWG, which absorption-emission spectra partly overlap with that of DHE, to perform equilibrium and kinetics measurements by using FRET between tryptophans of OSBP ORD and SWG. We have shown that the association and dissociation rates of SWG from the ORD domain were very fast ( $>2 \text{ s}^{-1}$ ). More specifically, SWG entry in the ORD was facilitated when membranes (or micelles) are present, which is probably because the ORD is co-purified with a cholesterol molecule bound in the pocket. Our hypothesis is that the ORD must first interact with the membrane to allow cholesterol exit so that SWG can then enter the pocket. Understanding this mechanism will, however, require further investigation.

Finally, this work invites a comparison between the OSBP-targeting compounds SWG and OSW-1. Both drugs strongly inhibit OSBP-catalyzed lipid transfer with  $K_i < 1 \text{ nM}$  and promote ER-TGN contact site formation (6). We have shown that OSW-1 prevents TGN labeling by SWG when both drugs are added simultaneously to the cells, and that SWG can be removed from the TGN when OSW-1 is added afterward, even at low doses. Last, OSW-1 could displace SWG from purified OSBP ORD *in vitro*. These results suggest that OSW-1 has a stronger affinity for the ORD than SWG, and/or OSW-1 dissociates more slowly from the ORD. In this regard, we reported an apparent affinity of SWG for the ORD in the presence of detergent micelles of  $K_d \sim 35 \text{ nM}$ , which is rather low compared with the measured  $K_i$ . Akin to what has been observed recently on Osh6 (29), the ORD lid is probably unlocked by the interfacial micellar environment, hence leading to faster exchange kinetics and lower affinities. Further studies of the kinetics of SWG binding to or dissociation from the ORD with liposomes of defined composition should give information on the interfacial interactions involved in lipid exchange. The lack of fluorescence of OSW-1, and its too high affinity for the ORD, makes this inhibitor an almost irreversible ligand and therefore less suited for mechanistic investigations than SWG.

## OSBP targeting by a fluorescent inhibitor

Because most ORPphilins (including OSW-1) interact with both OSBP and ORP4, it has been suggested that their anti-proliferative effect is due to ORP4 targeting and not OSBP (7). Indeed, high expression of ORP4 in immortalized cell lines, and in leukemia, leads to cell proliferation (30, 31). Moreover, a ~90% reduction in the OSBP level does not alter cell proliferation (1). Intriguingly, our data suggest that SWG, which is a potent inhibitor of cell proliferation, selectively targets OSBP and not ORP4. In addition, our study provides a correlation between the level of OSBP expression and the differential sensitivity to SWG, suggesting that OSBP is a potential mediator of cell proliferation. Interestingly, a recent study has shown the direct activation of mTORC1 by OSBP-mediated cholesterol transfer, thereby clearly defining a link between OSBP activity and cell growth signaling (32). SWG might provide a useful tool to dissect this pathway.

### Experimental procedures

#### Plant material and SWG isolation

The green fruits of *Macaranga tanarius* were collected in June 2014 at A Luoi, Thua Thiên-Huê Province, Vietnam, and authenticated by N. T. Cuong and D. D. Cuong. A voucher specimen (VN-2371) has been deposited at the Herbarium of the Institute of Ecology and Biological Resources of the Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam. Isolation of SWG was performed as previously described (33). SWG stock in DMSO was kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Solutions containing SWG were prepared fresh for every experiment.

#### Cell culture

hTERT-RPE1 cells (ATCC) were cultured in DMEM/F-12 with GlutaMAX (Gibco) containing 10% fetal calf serum, 1% antibiotics (Zell Shield, Minerva Biolabs) and were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  humidified atmosphere. RPE1 cells stably expressing EGFP-D4H were selected using G418 (Sigma). Surviving colonies were isolated using cloning cylinders (Bel-Art), expanded, and further sorted by FACS (FACSAria III, BD Biosciences). RPE1 cells stably expressing EGFP-D4H or EGFP-P4M-SidM (6) were cultured in medium supplemented with G418 (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). For microscopy, cells were seeded at suitable density to reach 50–90% confluence on the day of imaging.

#### Cell viability assay

Cells were seeded at 3000 cells/well-density into white wall 96-well-plates then treated on the following day with either SWG or doxorubicin. After 72 h treatment, cell viability was measured using CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) and the luminescence was detected in a FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech). Viability values of DMSO-treated cells were considered as 100%, then surviving curves and  $\text{IC}_{50}$  values were determined using GraphPad Prism 7.0 software.

#### RUSH secretion assay

RPE-1 cells stably expressing streptavidin-KDEL (hook) and SBP-EGFP-CD59 (reporter) (gift from G. Boncompain, S. Miserey-Lenkei, and F. Perez) were used for RUSH assays. Time-lapse imaging was performed at  $37^{\circ}\text{C}$  and secretion was triggered by the addition of 80  $\mu\text{M}$  biotin.

#### Protein expression and purification

The human OSBP ORD fragment (401–807) with a C-terminal His<sub>6</sub> tag was purified from baculovirus-infected Sf9 cells. For cloning and protein expression, see supporting “Experimental procedures”. Cell pellets were resuspended in lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, EDTA-free protease inhibitors and phosphatases inhibitors) and lysed with a Dounce homogenizer. After ultracentrifugation (125,000  $\times g$ ), OSBP-ORD from the supernatant was adsorbed on an HisPur<sup>TM</sup> Cobalt Resin (Thermo Scientific), submitted to 3 washes with lysis buffer supplemented with 800, 550, and 300 mM NaCl, respectively, and then eluted with 250 mM imidazole-containing buffer. OSBP-ORD fractions were pooled, concentrated on Amicon Ultra (cut-off 30 kDa), then purified on a Sephacryl S300 HK16/70 column (GE Healthcare) using an AKTÄ chromatography system (GE Healthcare). All steps were performed at  $4^{\circ}\text{C}$ . The purified protein fractions were pooled, concentrated, supplemented with 10% glycerol, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The preparations of NBD-PH<sup>FAPP</sup> and OSBP N-PH-FFAT (1–408 fragment) have been described previously (5, 34).

#### Sterol transfer assay

The lipid compositions of the ER and Golgi liposomes were PC, PE, PS, PI, dansyl-PE (64/19/5/12/10 mol %) and PC, PE, PS, PI, DHE (61.5/19/5/12/2.5 mol %). Measurements in triplicate were carried out in a TECAN Infinite M1000 Pro Microplate Reader using 96-well-microplates (200  $\mu\text{l}/\text{well}$ ) equilibrated at  $37^{\circ}\text{C}$ , with the following settings: excitation 310/5 nm, emission 525/5 nm. Each well initially contained Golgi liposomes (130  $\mu\text{M}$  lipid), ORD (0.2  $\mu\text{M}$ ), and SWG (as indicated) in 50 mM HEPES, pH 7.2, 120 mM potassium acetate, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (HKM buffer). ER liposomes (130  $\mu\text{M}$  lipid) were then added at the indicated time. Maximal exchange was controlled with 1 mM methyl- $\beta$ -cyclodextrin.

#### Data analysis

The signal was first corrected from SWG intrinsic fluorescence, then curves were fitted either with a linear equation (for slow kinetics when SWG is  $>200$  nM) or an exponential equation to determine the apparent kinetic constant,  $k$ . Because SWG has a strong affinity for ORD, the concentration of free SWG cannot be approximated to the total concentration of SWG. Therefore, the inhibition curve was fitted with a quadratic equation to obtain  $K_i$ .

$$k = \frac{k_{\max}}{[\text{ORD}]} \times \left( [\text{ORD}] - \frac{1}{2} \{ [\text{ORD}] + K_i + [\text{SWG}] - \sqrt{([\text{ORD}] + K_i + [\text{SWG}]^2 - 4[\text{ORD}][\text{SWG}])} \right) \quad (\text{Eq. 1})$$

#### PI(4)P transfer assay

The lipid composition of the ER and Golgi liposomes were PC, PE, PS, PI, rhodamine-PE, cholesterol (64/19/5/10/2/15 mol%), and PC, PE, PS, PI, PI(4)P (64/19/5/10/2 mol %). Measurements were carried out in a Jasco FP-8300 spectrofluorimeter using a cylindrical quartz cuvette (600  $\mu\text{l}$ ) equilibrated at

37 °C and equipped with a magnetic bar for continuous stirring. The cuvette initially contained NBD-PH<sup>FAPP</sup> (300 nM) in HKM buffer. NBD emission was measured at 510 nm (excitation 460 nm). Golgi liposomes (300 μM lipid), ER liposomes (300 μM lipid), and ORD (0.1 μM) were then sequentially added at the indicated times.

### Microscopy

Widefield microscopy was performed using an Olympus IX83 inverted microscope equipped with a Z-drift compensator, a scanning stage SCAN IM (Märzhäuser), and an iXon3 camera (Andor). For time-lapse imaging, cells plated in 35-mm μ-Dish (Ibidi) were mounted in a stage chamber set at 37 °C (Okolab). TagBFP, EGFP, and mCherry were observed using Chroma fluorescence filter sets (reference 49,000, 39,002, and 39,010). Multidimensional acquisition and analysis was performed with MetaMorph software (Molecular Devices). Cells were placed in an appropriate initial volume of medium (phenol red-free, HEPES; Gibco) so that homogenous mixing of compounds (freshly diluted before use at ×2–5 concentration) was achieved upon subsequent additions during the time course measurements. Confocal microscopy was performed with a Zeiss LSM 780 microscope operated with ZEN software using a Plan-Apochromat ×63/1.4 Oil objective (Carl Zeiss).

### SWG fluorescence imaging

RPE-1 cells labeled with SWG were placed in phenol red-free DMEM/F-12 with HEPES (Gibco) and observed using an IX83 inverted microscope (Olympus) equipped with an iXon3 blue-optimized EMCCD camera (Andor) and an UPlanSApo ×60/1.35 oil objective (Olympus). SWG was imaged using Semrock BrightLine filters (320/40 nm band-pass filter, 347-nm dichroic beam splitter, and 390/40 nm band pass filter).

### SWG fluorescence spectroscopy

SWG excitation (excitation 230–400/1 nm; emission 410/5 nm), SWG emission (excitation 330/1 nm; emission 340–600/5 nm) or FRET (excitation 280/1 nm; emission 340–600/5 nm) spectra were carried out in a Jasco FP-8300 spectrofluorimeter using a cylindrical quartz cuvette (600 μl) equilibrated at 37 °C and equipped with a magnetic bar for continuous stirring. SWG (200 nM) emission spectra were measured in diverse environments as indicated. When indicated, ORD was added at 200 nM and liposomes (100% egg PC) at 0.1 mg/ml. Kinetics FRET measurements were performed with settings excitation 280/1 nm and emission 410/5 nm.

*Author contributions*—T. P. data curation; T. P., D. K., M. S., J. Bigay, M.-C. T., J. P., F. R., and B. M. formal analysis; T. P., B. A., F. R., and B. M. validation; T. P., D. K., M. S., J. Bigay, M.-C. T., S. D., J. Bignon, B. A., F. R., and B. M. investigation; T. P., D. K., J. Bigay, M.-C. T., J. P., R. G., S. D., L. F., D. D., M. L., V. C. P., J. Bignon, and F. R. methodology; M. L. and V. C. P. resources; J. Bignon, B. A., F. R., and B. M. supervision; B. A. and B. M. funding acquisition; B. A., F. R., and B. M. writing-review and editing; F. R. and B. M. conceptualization; B. M. writing-original draft.

*Acknowledgments*—We thank S. Abélanet, F. Brau, J. Cazareth, and N. Leroudier (IPMC, Valbonne) for technical assistance; D. Lévy (Institut Curie, Paris), T. Virolle (Institut de Biologie Valrose, Nice), and M. Gutmann (SATT, Paris Saclay) for fruitful discussions; and S. Miserey-Lenkei, G. Boncompain, and F. Perez (Institut Curie, Paris) for sharing the RUSH cell lines.

### References










- Burgett, A. W., Poulsen, T. B., Wangkanont, K., Anderson, D. R., Kikuchi, C., Shimada, K., Okubo, S., Fortner, K. C., Mimaki, Y., Kuroda, M., Murphy, J. P., Schwab, D. J., Petrella, E. C., Cornella-Taracido, I., Schirle, M., Tallarico, J. A., and Shair, M. D. (2011) Natural products reveal cancer cell dependence on oxysterol-binding proteins. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 639–647 [CrossRef Medline](#)
- 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 [CrossRef Medline](#)
- Kentala, H., Weber-Boyvat, M., and Olkkonen, V. M. (2016) OSBP-related protein family: mediators of lipid transport and signaling at membrane contact sites. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **321**, 299–340 [CrossRef Medline](#)
- Antonny, B., Bigay, J., and Mesmin, B. (2018) The oxysterol-binding protein cycle: burning off PI(4)P to transport cholesterol. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 809–837 [CrossRef Medline](#)
- Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J., Lacas-Gervais, S., Drin, G., and Antonny, B. (2013) A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell* **155**, 830–843 [CrossRef Medline](#)
- Mesmin, B., Bigay, J., Polidori, J., Jamecna, D., Lacas-Gervais, S., and Antonny, B. (2017) Sterol transfer, PI4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP. *EMBO J.* **36**, 3156–3174 [CrossRef Medline](#)
- 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 [CrossRef Medline](#)
- Zhong, W., Xu, M., Li, C., Zhu, B., Cao, X., Li, D., Chen, H., Hu, C., Li, R., Luo, C., Pan, G., Zhang, W., Lai, C., Wang, T., Du, X., Chen, H., Xu, G., Olkkonen, V. M., Lei, P., Xu, J., and Yan, D. (2019) ORP4L extracts and presents PIP<sub>2</sub> from plasma membrane for PLCβ3 catalysis: targeting it eradicates leukemia stem cells. *Cell Rep.* **26**, 2166–2177.e9 [CrossRef Medline](#)
- Thoisson, O., Hnawia, E., Guiéritte-Voegelein, F., and Sévenet, T. (1992) Vedelianin, a hexahydroxanthene derivative isolated from *Macaranga vedeliana*. *Phytochemistry* **31**, 1439–1442 [CrossRef](#)
- Beutler, J. A., Shoemaker, R. H., Johnson, T., and Boyd, M. R. (1998) Cytotoxic geranyl stilbenes from *Macaranga schweinfurthii*. *J. Nat. Prod.* **61**, 1509–1512 [CrossRef Medline](#)
- Beutler, J. A., Jato, J., Cragg, G. M., and Boyd, M. R. (2000) Schweinfurthin D, a cytotoxic stilbene from *Macaranga schweinfurthii*. *Nat. Prod. Lett.* **14**, 399–404 [CrossRef](#)
- Klausmeyer, P., Van Que, N., Jato, J., McCloud, T. G., and Beutler, J. A. (2010) Schweinfurthins I and J from *Macaranga schweinfurthii*. *J. Nat. Prod.* **73**, 479–481 [CrossRef Medline](#)
- Yoder, B. J., Cao, S., Norris, A., Miller, J. S., Ratovoson, F., Razafitsalama, J., Andriantsiferana, R., Rasamison, V. E., and Kingston, D. G. (2007) Anti-proliferative prenylated stilbenes and flavonoids from *Macaranga alnifolia* from the Madagascar rainforest. *J. Nat. Prod.* **70**, 342–346 [CrossRef Medline](#)
- Péresse, T., Jézéquel, G., Allard, P. M., Pham, V. C., Huong, D. T. M., Blanchard, F., Bignon, J., Lévaïque, H., Wolfender, J. L., Litaudon, M., and Roussi, F. (2017) Cytotoxic prenylated stilbenes isolated from *Macaranga tanarius*. *J. Nat. Prod.* **80**, 2684–2691 [CrossRef Medline](#)
- Koubek, E. J., Weissenrieder, J. S., Neighbors, J. D., and Hohlfeld, R. J. (2018) Schweinfurthins: lipid modulators with promising anticancer activity. *Lipids* **53**, 767–784 [CrossRef Medline](#)



## OSBP targeting by a fluorescent inhibitor

16. Turbyville, T. J., Gürsel, D. B., Tuskan, R. G., Walrath, J. C., Lipschultz, C. a., Lockett, S. J., Wiemer, D. F., Beutler, J. A., and Reilly, K. M. (2010) Schweinfurthin A selectively inhibits proliferation and Rho signaling in glioma and neurofibromatosis type 1 tumor cells in a NF1-GRD-dependent manner. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 1234–1243 [CrossRef Medline](#)
17. Kuder, C. H., Weivoda, M. M., Zhang, Y., Zhu, J., Neighbors, J. D., Wiemer, D. F., and Hohl, R. J. (2015) 3-Deoxyschweinfurthin B lowers cholesterol levels by decreasing synthesis and increasing export in cultured cancer cell lines. *Lipids* **50**, 1195–1207 [CrossRef Medline](#)
18. Bao, X., Zheng, W., Hata Sugi, N., Agarwala, K. L., Xu, Q., Wang, Z., Tendyke, K., Lee, W., Parent, L., Li, W., Cheng, H., Shen, Y., Taylor, N., Dezso, Z., *et al.* (2015) Small molecule schweinfurthins selectively inhibit cancer cell proliferation and mTOR/AKT signaling by interfering with trans-Golgi-network trafficking. *Cancer Biol. Ther.* **16**, 589–601 [CrossRef Medline](#)
19. Topczewski, J. J., Kuder, C. H., Neighbors, J. D., Hohl, R. J., and Wiemer, D. F. (2010) Fluorescent schweinfurthin B and F analogs with anti-proliferative activity. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 6734–6741 [CrossRef](#)
20. Palmer, A. C., and Kishony, R. (2014) Opposing effects of target overexpression reveal drug mechanisms. *Nat. Commun.* **5**, 4296 [CrossRef Medline](#)
21. Boncompain, G., Divoux, S., Gareil, N., de Forges, H., Lescure, A., Latreche, L., Mercanti, V., Jollivet, F., Raposo, G., and Perez, F. (2012) Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nat. Methods* **9**, 493–498 [CrossRef Medline](#)
22. 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 [CrossRef Medline](#)
23. Maekawa, M., and Fairn, G. D. (2015) Complementary probes reveal that phosphatidylserine is required for the proper transbilayer distribution of cholesterol. *J. Cell Sci.* **128**, 1422–1433 [CrossRef Medline](#)
24. 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 [CrossRef Medline](#)
25. Lange, Y., Ye, J., Rigney, M., and Steck, T. L. (1999) Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J. Lipid Res.* **40**, 2264–2270 [Medline](#)
26. Radhakrishnan, A., Goldstein, J. L., McDonald, J. G., and Brown, M. S. (2008) Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab.* **8**, 512–521 [CrossRef Medline](#)
27. Yamada, R., Takeshita, T., Hiraizumi, M., Shinohe, D., Ohta, Y., and Sakurai, K. (2014) Fluorescent analog of OSW-1 and its cellular localization. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 1839–1842 [CrossRef](#)
28. 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 [CrossRef Medline](#)
29. 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 [CrossRef Medline](#)
30. Li, J. W., Xiao, Y. L., Lai, C. F., Lou, N., Ma, H. L., Zhu, B.-Y., Zhong, W.-B., and Yan, D.-G. (2016) Oxysterol-binding protein-related protein 4L promotes cell proliferation by sustaining intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in cervical carcinoma cell lines. *Oncotarget* **7**, 65849–65861 [Medline](#)
31. Zhong, W., Yi, Q., Xu, B., Li, S., Wang, T., Liu, F., Zhu, B., Hoffmann, P. R., Ji, G., Lei, P., Li, G., Li, J., Li, J., Olkkonen, V. M., and Yan, D. (2016) ORP4L is essential for T-cell acute lymphoblastic leukemia cell survival. *Nat. Commun.* **7**, 12702 [CrossRef Medline](#)
32. Lim, C. Y., Davis, O. B., Shin, H. R., Zhang, J., Berdan, C. A., Jiang, X., Counihan, J. L., Ory, D. S., Nomura, D. K., and Zoncu, R. (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 [CrossRef Medline](#)
33. Allard, P.-M., Péresse, T., Bisson, J., Gindro, K., Marcourt, L., Pham, V. C., Roussi, F., Litaudon, M., and Wolfender, J.-L. (2016) Integration of molecular networking and *in silico* MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Anal. Chem.* **88**, 3317–3323 [CrossRef Medline](#)
34. 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 [Medline](#)

# A comprehensive library of fluorescent constructs of SARS-CoV-2 proteins and their initial characterisation in different cell types

Stéphanie Miserey-Lenkei<sup>1,2</sup> , Katarina Trajkovic<sup>1,2</sup> , Juan Martín D'Ambrosio<sup>2,3</sup>, Amanda J Patel<sup>2</sup>, Alenka Čopič<sup>1,3</sup> , Pallavi Mathur<sup>\*</sup>, Kristine Schauer<sup>\*\*4</sup> , Bruno Goud<sup>\*</sup>, Véronique Albanèse<sup>‡</sup> , Romain Gautier<sup>§</sup> , Melody Subra<sup>§</sup>, David Kovacs<sup>§</sup> , Hélène Barelli<sup>§1,5</sup>  and Bruno Antonny<sup>§1,5</sup> 

<sup>\*</sup>Department of Cell Biology and Cancer, Institut Curie, PSL Research University, Sorbonne Université, CNRS, UMR144, Paris F-75005, France, <sup>†</sup>Mediterranean Institute for Life Sciences (MedILS), Split 21000, Croatia, <sup>‡</sup>Institut Jacques Monod, Université de Paris, CNRS, UMR7592, Paris F-75006, France, and <sup>§</sup>Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université Côte d'Azur et CNRS, UMR7275, Valbonne F-06560, France

**Background Information.** Comprehensive libraries of plasmids for SARS-CoV-2 proteins with various tags (e.g., Strep, HA, Turbo) are now available. They enable the identification of numerous potential protein–protein interactions between the SARS-CoV-2 virus and host proteins.

**Results.** We present here a large library of SARS CoV-2 protein constructs fused with green and red fluorescent proteins and their initial characterisation in various human cell lines including lung epithelial cell models (A549, BEAS-2B), as well as in budding yeast. The localisation of a few SARS-CoV-2 proteins matches their proposed interactions with host proteins. These include the localisation of Nsp13 to the centrosome, Orf3a to late endosomes and Orf9b to mitochondria.

**Conclusions and Significance.** This library should facilitate further cellular investigations, notably by imaging techniques.



Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed: (email: smiserey@curie.fr, katarina.trajkovic@medils.hr, alenka.copic@ijm.fr, barelli@ipmc.cnrs.fr, antonny@ipmc.cnrs.fr)

<sup>2</sup>These are the co-first authors.

<sup>3</sup>Present address: Montpellier Cell Biology Research Center, CNRS & Université de Montpellier, UMR 5237, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France.

<sup>4</sup>Present address: Inserm U1279, Gustave Roussy Institute, Université Paris-Saclay, Villejuif, France.

<sup>5</sup>These are the co-last authors.

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

**Key words:** Intracellular compartmentalisation, Light microscopy, Membranes, Molecular interactions, Viruses.

**Abbreviations:** COVID-19, coronavirus disease of 2019; ER, endoplasmic reticulum; ERGIC, endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment; GFP,

## Introduction

As most RNA viruses, SARS-CoV-2 virus utilises multiple protein–protein interactions with host factors to subvert cellular functions. Notably, SARS-CoV-2 infection and replication involve the sequential use of several organelles of the endocytic and secretory pathways (Sicari et al., 2020). These include interaction of the viral Spike protein with cell

green fluorescent protein; GM130, Golgi Matrix Protein 130; HSP90B1, Heat shock protein 90kDa beta member 1; SARS-CoV-2, Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; TGN, Trans Golgi Network

receptors and its cleavage by the proteases for virion fusion with the cellular membranes (Shang et al., 2020), subversion of the endoplasmic reticulum (ER) membrane to promote the formation of the replication organelle (Klein et al., 2020), interaction with the ER–Golgi intermediate compartment for virion formation (Klein et al., 2020) and final egress of the newly assembled virions through lysosome-like organelles (Ghosh et al., 2020).

The 30 kB genome of SARS-CoV-2 codes for 14 open reading frames. Two of them, Orf1a and Orf1ab, code for alternative long polypeptides, which give rise to 16 individual non-structural proteins (Nsp1–16) upon auto-cleavage (Bar-On et al., 2020). Some of these proteins are directly involved in replication of the viral genome, most prominently the Nsp7–8–12 replicase complex and the Nsp13 helicase (Subissi et al., 2014; Chen et al., 2020; Hillen et al., 2020). Others, such as Nsp3, 4 and 6, are transmembrane proteins that promote the formation of the replication organelle, which is a double-membrane vesicular structure (Angelini et al., 2013; Oudshoorn et al., 2017; Snijder et al., 2020). Four Orfs code for the structural proteins of the virions: spike (S), which binds surface receptors on cells (angiotensin-converting enzyme 2), nucleocapsid protein (N), which is responsible for genome packaging, and two membrane proteins (E and M). A set of very small Orfs code for polypeptides involved in the final steps of virion formation (*e.g.*, Orf3a and Orf9b).

Affinity-based techniques coupled to mass spectrometry have enabled the identification of putative host cell targets of SARS-CoV-2 proteins (Gordon et al., 2020a; Stukalov et al., 2020). In one study, 26 proteins of SARS-CoV-2 virus have been cloned as Strep fusions and individually expressed in HEK293 cells, leading to the identification of about 300 potential host cell protein targets (Gordon et al., 2020a). In another study, the individual SARS-CoV-2 proteins were HA-tagged and expressed as baits in the type II pulmonary epithelial cell line A549 (Stukalov et al., 2020). In addition to identifying host protein targets of SARS-CoV-2, this study also reported changes in the host cell proteome and in post-translational modifications of the cellular proteins. To circumvent the limitation of immunoprecipitation experiments, which best capture high affinity soluble protein complexes, a second approach

based on proximity-dependent biotinylation (BioID) has been recently presented, further extending the repertoire of the interactants of the individual SARS-CoV-2 proteins (Laurent et al., 2020; St-Germain et al., 2020). A third approach employed CRISPR-Cas9 technology to knock out all putative host interactants in order to determine their effect on viral infection (Hoffmann et al., 2020). The advantage of these systematic comprehensive studies is in that they enable identification of putative druggable pathways, pointing to existing approved drugs that could be repurposed to combat the current worldwide pandemic.

Complementary information can be gained by imaging studies of the cellular localisation and dynamics of viral proteins. Given that individually expressed SARS-CoV-2 proteins interact with a number of organelle-specific proteins, it can be expected that these viral proteins might localise to and exert their function at the respective organelles. For instance, Nsp7 and Nsp13, viral proteins involved in genome replication, interact with small G proteins of the Rab family or with golgins and hence could localise to the Golgi and/or could influence Golgi morphology or function. In addition, since many SARS-CoV-2 proteins form protein complexes (*e.g.*, Nsp7/8/12; Nsp10/14) (Ma et al., 2015; Chen et al., 2020; Hillen et al., 2020), combined expression of such proteins might be necessary for *in vitro* recapitulation of their behaviour. Thus, having a repertoire of expression plasmids with different tags, including fluorescent ones, should facilitate imaging studies and cellular investigations in general.

Here, we present a large library of SARS-CoV-2 proteins tagged with either green or red fluorescent proteins and their initial characterisation in several cell lines. These lines were chosen either to mimic the cell types affected by the virus in COVID-19 patients (*e.g.*, A549, BEAS-2B and Caco-2) or for their use as established models for the understanding of basic cellular function (*e.g.*, HeLa, HEK293 and hTert-RPE1). To test for direct protein–membrane interactions or for interactions with evolutionarily highly conserved proteins, some of the SARS-CoV-2 proteins were expressed in the unicellular model *Saccharomyces cerevisiae*. In addition to assessing the localisation of individual SARS-Cov-2 proteins or protein complexes, our microscopy-based approach

Table 1 | List of the constructs

Protein	Origin	Tag Cter pEGFPN1	Tag Nter pEGFPC1	Tag Cter pmCherryN1
<b>Nsp3</b>	Pasteur Institute	X		X
<b>Nsp4</b>	UCSF Streptag II	X		X
<b>Nsp6</b>	Pasteur Institute	X		X
<b>Nsp7</b>	UCSF Streptag II	X	X	X
<b>Nsp8</b>	UCSF Streptag II	X	X	
<b>Nsp10</b>	UCSF Streptag II	X		X
<b>Nsp12</b>	UCSF Streptag II	X	X	
<b>Nsp13</b>	UCSF Streptag II	X		X
<b>Nsp14</b>	UCSF Streptag II	X		X
<b>Nsp15</b>	UCSF Streptag II		X	
<b>ORF3a</b>	UCSF Streptag II	X		X
<b>ORF9b</b>	UCSF Streptag II		X	
<b>COV E</b>	UCSF Streptag II		X	
<b>COV M</b>	UCSF Streptag II		X	

uncovers morphological and functional changes that can be induced by SARS-CoV-2 in the host cell.

## Results

### Construct design

All fluorescent fusion constructs were prepared from the Strep-Tag SARS-CoV-2 plasmid library described in Gordon et al. (2020a) except Nsp3, which was from a collection of SARS-CoV-2 constructs in Gateway-compatible entry vectors (Kim et al., 2020). For most proteins, we prepared both GFP and mCherry fusion constructs to facilitate co-localisation and dual expression studies (Table 1). In addition to mammalian expression vectors, we constructed plasmids for expression of SARS-CoV-2 proteins in *S. cerevisiae* (Table S1). All constructs have been deposited to *Addgene*.

We used existing structural information on the SARS-CoV-2 proteins or their SARS-CoV-1 or MERS orthologues to check the relative positions of the N- and C-termini in order to introduce the fluorescent tag on the most accessible end (Table 1). In the absence of any information or of an obvious preference, the fluorescent protein was fused at the C-terminus (Table 1). The proteins with an N-terminal tag were Nsp8, a small subunit of the replicase complex (Nsp7/8/12), Nsp15, a uridine-specific endoribonuclease essential for viral RNA synthesis, and Orf9b, a very small protein that forms a dimer in

the case of SARS-CoV (Meier et al., 2006). For the helicase Nsp13 (Hao et al., 2017), which has been suggested as a promising candidate for pharmacological targeting, we prepared both N-ter and C-ter fusion forms.

To study SARS-Cov-2 proteins in the cellular environment, we expressed single viral proteins in various cell types, including the model lung epithelial cell line A549, as well as co-expressed proteins that are known to form complexes (e.g., Nsp7, Nsp8 and Nsp12) or to act together on membranes (e.g., Nsp3, Nsp4 and Nsp6). Overall, the transfection efficiency and expression levels varied greatly among different constructs and sometimes among different cell lines. Some viral proteins had tendency to form aggregates and induced cytotoxicity at high expression levels. Table 2 summarises these general features.

### Nsp3, Nsp4 and Nsp6

Nsp3, Nsp4 and Nsp6 are the three non-structural transmembrane proteins of the SARS-CoV-2 virus. They are involved in the formation of the replication organelle, which has the shape of a double-membrane vesicle and is derived mostly from the ER. Previous studies performed with the cognate proteins of the MERS and SARS-CoV-1 coronavirus have shown that Nsp3 and Nsp4 are necessary and sufficient for double-membrane vesicle formation, whereas Nsp6 has a facilitating role in this process (Oudshoorn et al., 2017).

In A549 cells, individually expressed Nsp3-GFP showed a characteristic ER network distribution pattern (co-localisation with the ER marker HSP90B1/Grp94/endoplasmic) with some large extensions (Figure 1A). No co-localisation was observed with autophagosome or MVB/exosome markers (Figure S1A). Individually, Nsp4-GFP and Nsp6-GFP were poorly expressed (Figure S1B). However, co-expression of Nsp3-GFP, Nsp4-mCh and Nsp6-mCh increased the expression levels for the two latter proteins. The three proteins extensively co-localised and largely affected the reticular organisation of the ER, which displayed extended structures (Figure 1B). In line with morphological changes of the ER, the staining of the ER master chaperone HSP90B1 diminished with the level of triple Nsp3/4/6 expression (Figure S1C).

**Table 2 | Main expression and localisation features of the SARS-CoV-2 constructs**

Protein	Function	Cell tested	Expression	Main localisation	Secondary localisation/ cellular effect	In <i>S. cerevisiae</i>	Figures
<b>Nsp3</b>	Replication organelle	A549, BEAS-2B, Caco-2, HEK293	High in A549, low in other lines	ER in A549	Toxic		1
<b>Nsp4</b>	Replication organelle	A549, HeLa, Caco-2, BEAS-2B, HEK293, hTert-RPE1	Very low				S1
<b>Nsp6</b>	Replication organelle	A549, BEAS-2B, Caco-2, HEK293	Very low in A549, high in other lines	Perinuclear structures, reticular on the periphery	Toxic		S1
<b>Nsp3+4+6</b>		A549	High	All on the ER	ER deformation		1
<b>Nsp7</b>	RdRp	A549, HeLa, Caco-2, BEAS-2B, HEK293	High	Cytosol	Puncta		2, S2
<b>Nsp8</b>	RdRp	A549, HeLa, Caco-2, BEAS-2B, HEK293	High	Cytosol	Puncta		2, S2
<b>Nsp12</b>	RdRp	A549, BEAS-2B, Caco-2, HEK293	Low	Cytosol	Golgi fragmentation		2, S2
<b>Nsp7+8</b>		A549		Same as alone			2
<b>Nsp10</b>	ExoN	A549, HeLa, Caco-2, BEAS-2B	Medium	Cytosol	Toxic	endocytic puncta	3, 4, S3
<b>Nsp14</b>	ExoN	A549, HeLa, Caco-2, BEAS-2B, HEK293	Very low	Cytosol		cytosol	3, 4, S3
<b>Nsp10+14</b>				Cytosol	Puncta		3, 4
<b>Nsp13</b>	Helicase	A549, HeLa, Caco-2, BEAS-2B, HEK293	Very low to low	Cytosol	Centrosome and Golgi/Golgi fragmentation	cytosol	5, S4
<b>Nsp15</b>		A549	High	Cytosol		Cytosol	S5
<b>ORF3a</b>		A549, HeLa, Caco-2, BEAS-2B, hTert-RPE1	High	Late endosomes	Toxic at high expression levels	Vacuole and ER	6, S6
<b>ORF9b</b>		A549, HeLa, Caco-2, BEAS-2B, hTert-RPE1	High	Mitochondria	Cytosol	Cytosol	7, S7
<b>ORF3a+9b</b>			High	Same as alone			7
<b>E</b>	Envelope protein	A549, HeLa, Caco-2, BEAS-2B	High	ER	Toxic		8, S8

### Nsp7, Nsp8 and Nsp12

Nsp12 with its accessory subunits Nsp7 and Nsp8 is a central SARS-CoV-2 enzyme responsible for the replication and transcription of the viral genome through its RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) activity. According to the previously solved structure of the replicase complex, Nsp12 forms a stoichiometric complex with one Nsp7 and two Nsp8 subunits (Chen et al., 2020; Hillen et al., 2020). Interactome studies in HEK293 cells showed that individually expressed Nsp7 interacted with numerous host proteins including multiple members of the Rab GTPase family (Gordon et al., 2020a). We expressed Nsp7, Nsp8 or Nsp12 fused with GFP or mCherry at their N or C-termini in A549 cells (Figure 2A) as well as in other cell lines (BEAS-2B,

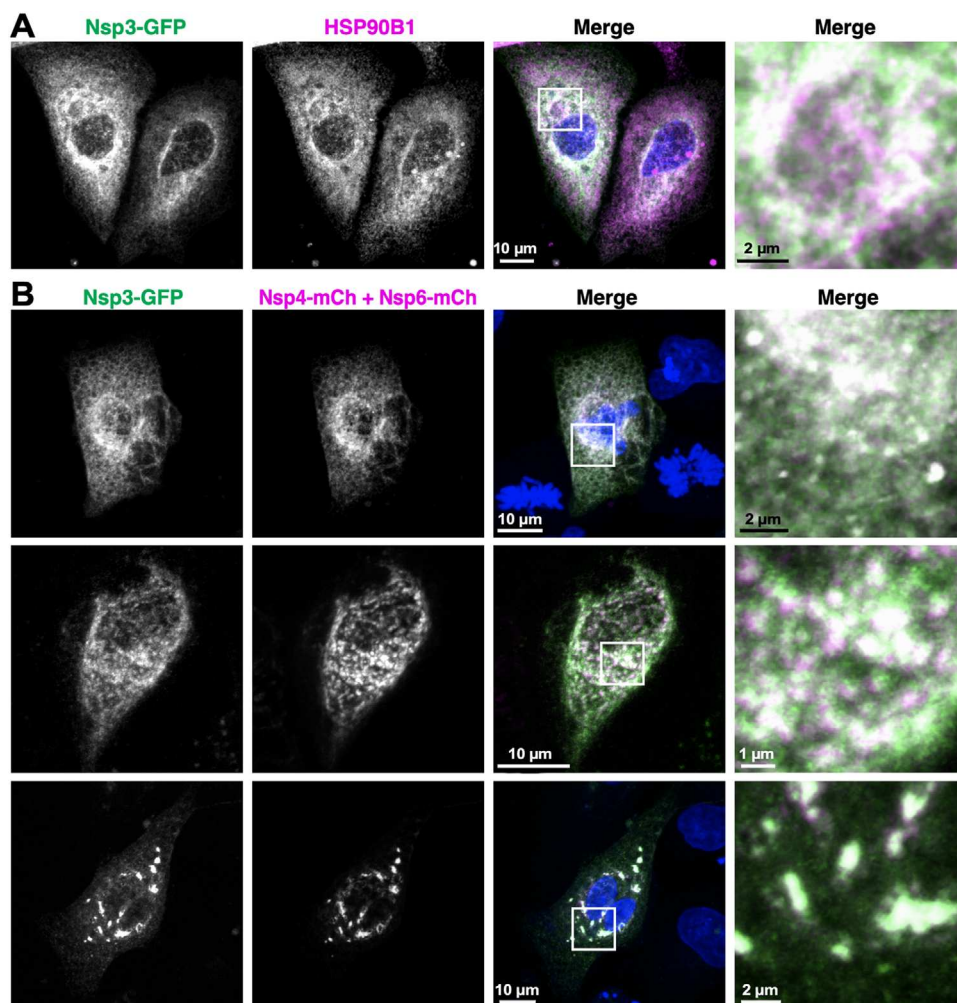
Caco-2, HEK293, HeLa; Figure S2). All fusion proteins appeared essentially cytosolic although some small puncta were occasionally observed (Figures 2A and S2). Some Golgi fragmentation could be observed in Nsp12-expressing cells, as demonstrated by the Golgi marker GM130 (Figure 2A). Dual expression of Nsp7-mCherry and GFP-Nsp8 (Figure 2B) or of Nsp7-mCherry and Nsp12-GFP (Figure 2B) did not affect the localisation patterns of these proteins as compared with their single expressions.

### Nsp10 and Nsp 14

Nsp14 is a bifunctional enzyme composed of an exonuclease domain and a SAM-dependent methyltransferase domain (Ma et al., 2015). It forms a complex with Nsp10, a zinc-finger protein of 139

**Figure 1 | Nsp3, Nsp4 and/or Nsp6 fluorescent fusions in A549 cells**

(A) Co-localisation of Nsp3-GFP with the ER markers HSP90B1 in A549 cells. (B) Co-localisation of Nsp3-GFP with Nsp4-mCherry and Nsp6-mCherry in A549 cells. The ER appears either intact (upper row) or deformed into patchy structures (lower rows). (C) Some cells expressing high level of Nsp3-GFP, Nsp4-mCherry and Nsp6-mCherry lose proper HSP90B1 staining. All images were acquired with a confocal microscope and were analysed using Volocity software. Representative Z projections images from three different experiments. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ , 1 or 2  $\mu\text{m}$  (zoomed images).



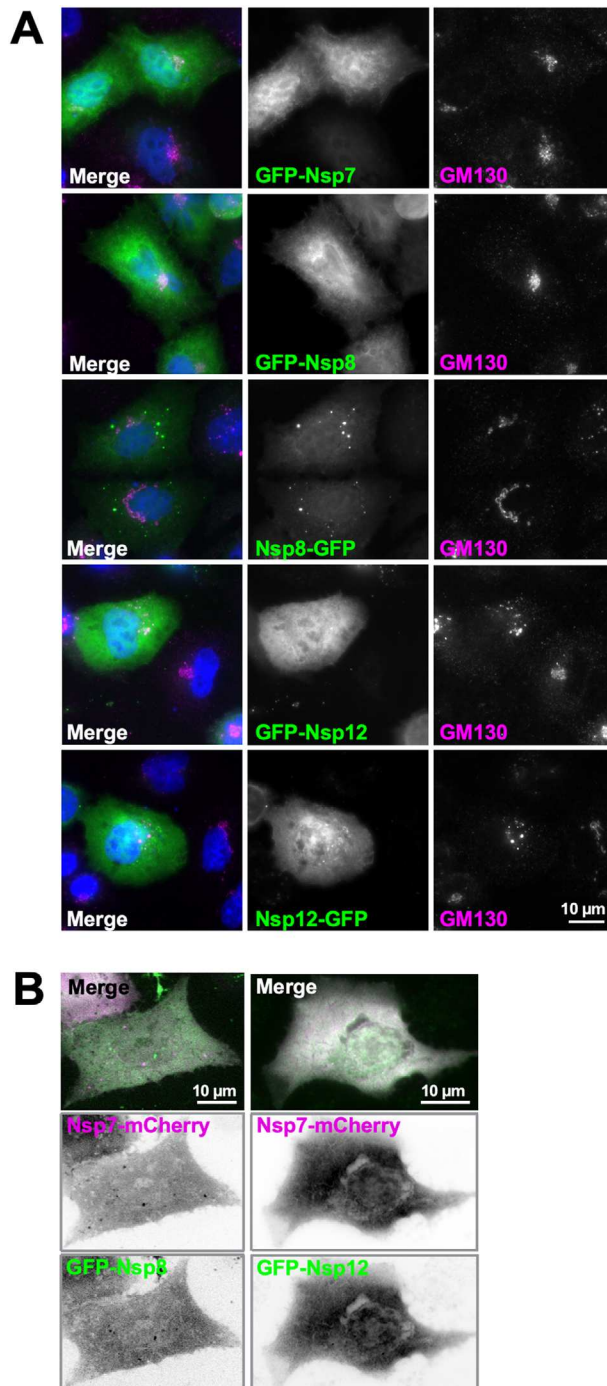
amino acids that is required for viral replication. Nsp10 has been proposed to interact with the clathrin-AP2 machinery and the ERGIC network. We expressed Nsp10-GFP and/or Nsp14-mCherry in A549 cells (Figure 3), in other mammalian cell lines (Figure S3A), or in yeast (Figure 4). In mammalian cells, individually expressed Nsp10-GFP or Nsp14-mCherry appeared mostly cytosolic (Figures 3A and S3A and S3B). When co-expressed, Nsp10-GFP and Nsp14-mCherry remained mostly

cytosolic with slight co-localisation with clathrin (Figure 3B, arrow) but no obvious co-localisation with the Ergic-53 marker (Figure S3C), although large structures and puncta positive for the two proteins could be observed (Figures 3B and S3C).

In the yeast *S. cerevisiae*, Nsp10-GFP displayed a punctate pattern (Figure 4A). Some yeast cells displayed bright and heterogeneous Nsp10-GFP puncta, which may represent protein aggregates. Other cells with a higher cytosolic signal showed

**Figure 2 | Nsp7, Nsp8 and/or Nsp12 fluorescent fusions in A549 cells**

(A) A549 cells were transfected with GFP-Nsp7, GFP-Nsp8, Nsp8-GFP, GFP-Nsp12 or Nsp12-GFP, fixed and stained with the Golgi Marker GM130. Representative images are shown. (B) A549 cells were co-transfected with Nsp7-mCherry and GFP-Nsp8 or with Nsp7-mCherry and GFP-Nsp12. Representative images are shown. Bars = 10  $\mu$ m.



puncta that were smaller, more uniform and localised close to the cell cortex. This pattern was not influenced by co-expression of Nsp14-mCherry, which was only cytosolic (Figure 4A). The cortical Nsp10-GFP puncta resembled endocytic patches; indeed, they showed partial co-localisation with endocytic proteins Ede1 and Sac6 (Kaksonen et al., 2005), but not with TGN or endosomal markers (Figure 4B). Moreover, time-lapse imaging revealed that the Nsp10-GFP puncta were highly mobile and moved partly together with Ede1 (Figure 4B). This phenotype might indicate an interaction between Nsp10 and an evolutionary-conserved feature of the clathrin machinery.

### Nsp13

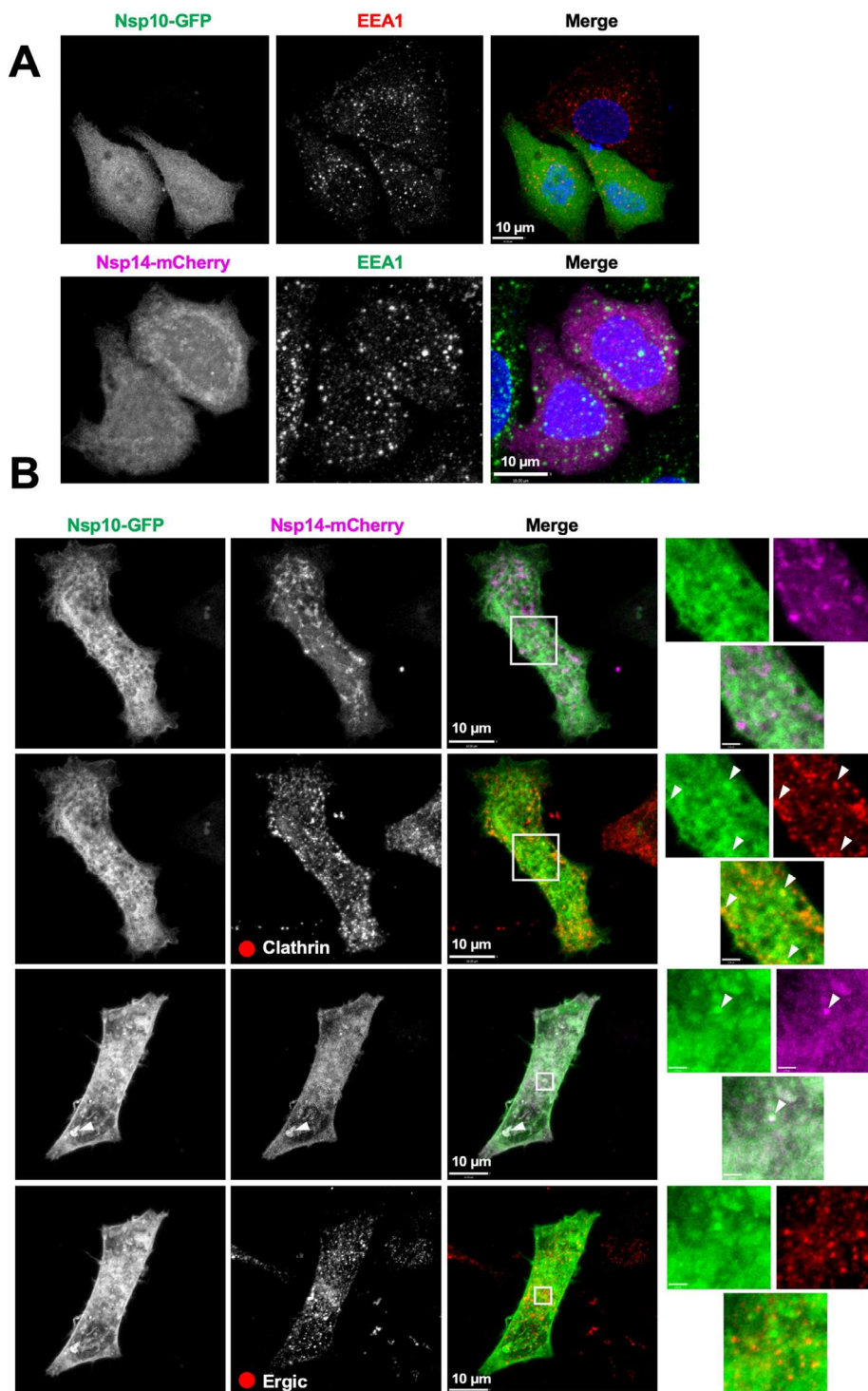
The analysis of the SARS-CoV-2 interactome in HEK293 cells revealed that the helicase Nsp13 interacted with a number of Golgi-associated proteins (golgins) as well as with centrosomal proteins (Gordon et al., 2020a). We found that Nsp13-GFP was mostly cytosolic in A549 cells (Figure 5A) as well as in all tested cells including yeast (Figures S4A and S4B). However, a fraction of Nsp13-GFP clearly associated with the centrosome as visualised by anti- $\gamma$  tubulin or anti-FGFR1OP antibodies (Figure 5A). In a few cells, we observed faint co-localisation of Nsp13-GFP or Nsp13-mCherry with Golgi markers (Figure 5B, arrow heads). In addition, the expression of Nsp13 strongly affected the Golgi structure in some cells, with fragmentation of the cis, median, and trans side as assessed by Golgi markers GM130, GalNacT2 and TGN46, respectively (Figures 5B and S4C). Altogether, these cell localisation studies on Nsp13 underscore the relevance of its interactions with centrosome and Golgi proteins suggested by both affinity- and proximity-based interactome approaches (Laurent et al., 2020; Gordon et al., 2020a).

### Nsp15

Nsp15 is an endonuclease that cleaves single- or double-strand RNAs after uridines (Subissi et al., 2014; Kim et al., 2020). In proteomic analysis, Nsp15 has been shown to interact with Arf6 (Gordon et al., 2020a), a small G protein that resides at the plasma membrane and on endocytic structures. However, this interaction was not confirmed by proximity-based approaches.

**Figure 3 | Nsp10 and/or Nsp14 fluorescent fusions are soluble in mammalian cells**

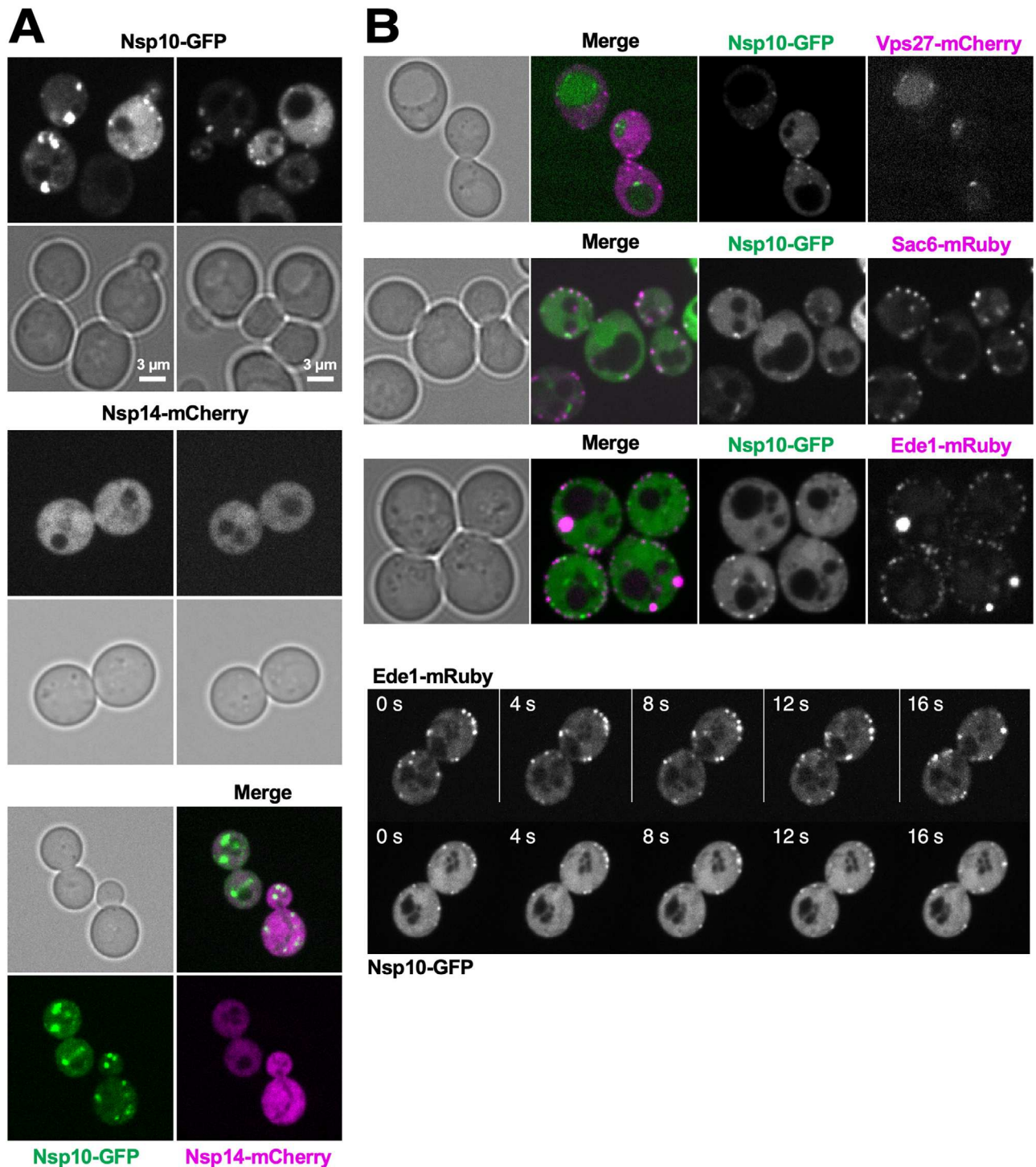
(A) Individually expressed Nsp10-GFP and Nsp14-mCherry are cytosolic in A549 cells. (B) Co-expressed Nsp10-GFP and Nsp14-mCherry remained mostly cytosolic with slight co-localisation with clathrin (arrow heads) but no obvious co-localisation with the ERGIC-53 marker. Large structures and puncta positive for the two proteins could also be observed (arrow heads). All images were acquired with a confocal microscope and were analysed using Volocity software. Representative Z projections images from three different experiments. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$  (zoomed images).





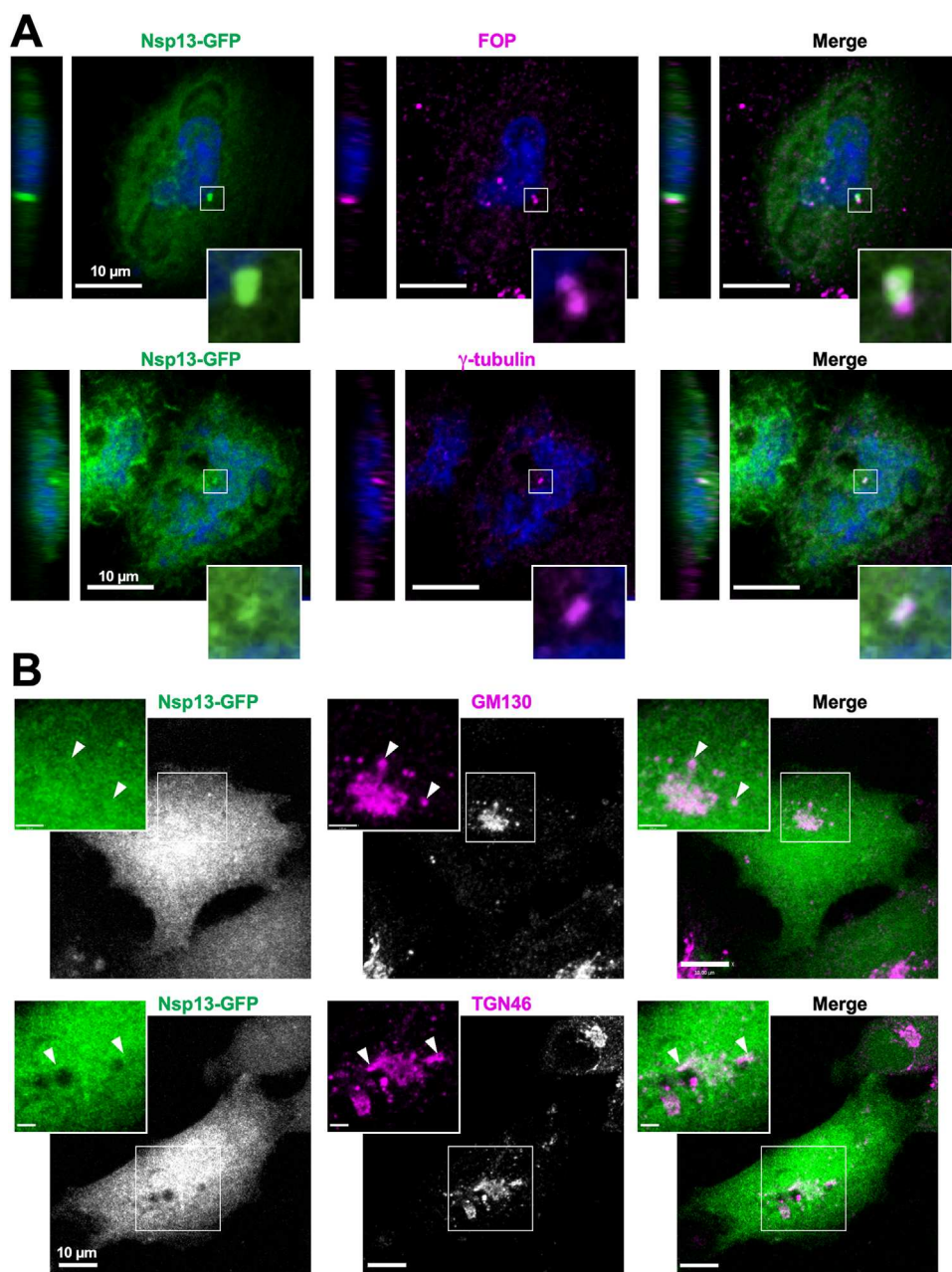
**Figure 4 | Nsp10-GFP co-localises with endocytic markers in yeast**

(A) In *S. cerevisiae* individually expressed Nsp10-GFP forms puncta, whereas Nsp14-mCherry is cytosolic. These features are preserved when Nsp10-and Nsp14-mCherry are co-expressed. (B) Some Nsp10-GFP puncta are dynamic and are positive for the endocytic markers epsin (Ede1-mRuby) or Sac6-mRuby. Imaging: spinning disk microscopy; bars = 3  $\mu\text{m}$ .



**Figure 5 | Nsp13-GFP is mostly soluble but a fraction co-localises with the centrosome**

(A) In A549 cells, Nsp13-GFP is mostly cytosolic but a fraction associates with the centrosome as revealed by antibodies against gamma tubulin or FGFR10P. (B) In some cells expressing Nsp13-GFP, Golgi markers become scattered (arrow heads), showing a fragmentation of the Golgi apparatus. All images were acquired with a confocal microscope and were analysed using Volocity software. Representative Z projection images from four different experiments. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$  (zoomed images).



In our experiments, Nsp15 was found cytosolic in A549 cells (Figure S5A) as well as in yeast (Figure S5B).

### Orf3a

Orf3a contains three transmembrane helices followed by a long cytosolic tail containing a Yxx $\phi$  endocytic

motif (Tan et al., 2004). Orf3a self-assembles as a dimer in lipid membranes, forming a non-selective cation channel (Kern et al., 2020). In all tested mammalian cell lines, we observed a vesicular pattern of Orf3a-mCherry (Figures 6A–6D and S6A). In A549 cells, Orf3a-mCherry co-localised with late endocytic compartments (Figures 6A, 6B and S6B). These compartments were highly mobile, as assessed by time-lapse multicolour imaging (Figure 6B; arrows, bottom panel). Orf3a-mCherry also partly co-localised with GM130 (Golgi marker) as well as LC3 (autophagosome marker) (Figure 6C), in line with recent work showing that Orf3a changes the balance between autophagosome formation and autophagosome maturation (Qu et al., 2020). Late endosomal and Golgi localisation of Orf3a is in agreement with studies on Orf3a of the related SARS-CoV-1 virus (Freundt et al., 2010; Yue et al., 2018). Interestingly, Orf3a-mCherry expression led to changes in endosomal morphology, with enlargement not only of Orf3a-containing late endosomes, but also of the early endosomes that did not co-localise with Orf3a (Figures 6D and S6C). These data suggest possible perturbation of the entire endocytic pathway by Orf3a.

The preference of Orf3a for late endosomal compartment was preserved even in yeast, where Orf3a-mCherry could be observed decorating the vacuolar membrane (as revealed with Vph1-GFP) (Figure 6E). Some Orf3a was also observed at the ER (visualised by Sec63-GFP; Figure 6E) but not at the Golgi (Sec7-GFP; Figure S6D) and at Golgi-to-vacuole transport intermediates (Vps17-GFP; Figure S6D). We suspect that some Orf3a was retained in the ER due to difficulties in folding. In agreement, the localisation of Orf3a largely shifted towards the vacuole in aged yeast cells, and we observed no co-localisation with lipid droplets (Figure S6D).

### Orf9b

SARS-CoV-2 Orf9b-GFP fusion protein displayed a typical mitochondrial pattern in all tested cell lines (A549, BEAS-2B, Caco-2 and HeLa) (Figures 7A and S7A), and was specifically associated with mitochondria in A549 cells as assessed by its co-localisation with the mitochondrial marker Tom20 (Figure 7A), Mitotracker and DsRed-Mito-7 (Figure S7B), similarly to what has been described for the cognate protein Orf9b from SARS-CoV-1 (Shi et al.,

2014). Recent investigations indicate that Orf9b from SARS-CoV-2 interacts with the mitochondrial protein TOM70 (Jiang et al., 2020; Kreimendahl and Rassow, 2020). Consistent with this observation, mutating an Orf9b residue in the interacting region with TOM70 (Gordon et al., 2020) (L52D) abolished the mitochondrial localisation of Orf9b (Figures 7A and S7C). We also noticed that the mitochondrial fraction of Orf9b decreased when it was expressed at a higher level. This effect was probably due to titration of endogenous TOM70 by over-expressed Orf9b at the mitochondria surface.

We then co-expressed Orf3a-mCherry and Orf9b-GFP aiming to see whether they influence each other's localisation. The combined expression of the two proteins did not change their overall localisation patterns as compared with single expressions, although we did observe motile structures co-labelled with the two markers by time-lapse multicolour imaging (Figure 7B, arrows).

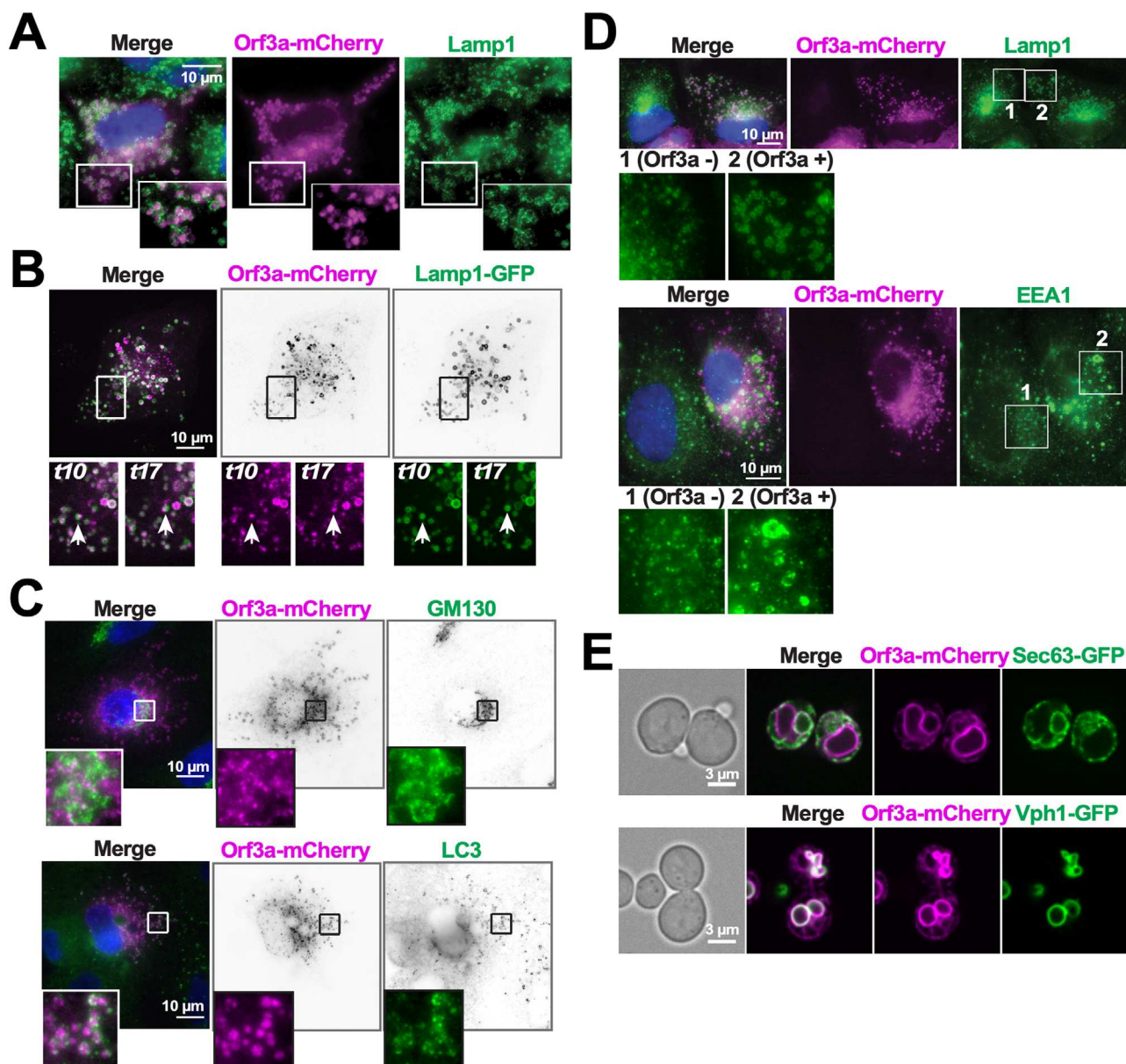
Because the structure of isolated Orf9b strongly differs from the structure of Orf9b in complex with TOM70 and a direct mechanism for lipid membrane recognition has been suggested (Meier et al., 2006), we next tested whether Orf9b associated with mitochondria via protein–protein or protein–lipid interactions. To this end, we expressed Orf9b-GFP in *S. cerevisiae*, which harbours a TOM70 protein homologue (Chan et al., 2006; Kreimendahl and Rassow, 2020). Here, Orf9b-GFP appeared entirely soluble (Figure 7C), suggesting that mitochondrial localisation of Orf9b relies on a specific interaction between Orf9b and human TOM70 and not on direct interaction with the lipid bilayer.

### Envelope protein (E)

Protein E is a very short (75 aa) single-pass trans-membrane protein, which forms a pentameric ion channel in lipid membranes, thereby acting as a viroporin (Mandala et al., 2020). E proteins of other coronaviruses function in viral assembly and release. To reduce interference in protein E trafficking, which involves motifs in its C-terminal cytosolic part, we fused GFP to the short N-terminal luminal region of protein E. In all tested cell lines and even at low level of expression, SARS-CoV-2 GFP-E showed reticular pattern (Figure S8A) and co-localised with ER markers in A549 cells (Figure 8 and S8B). We also observed deformation of the ER

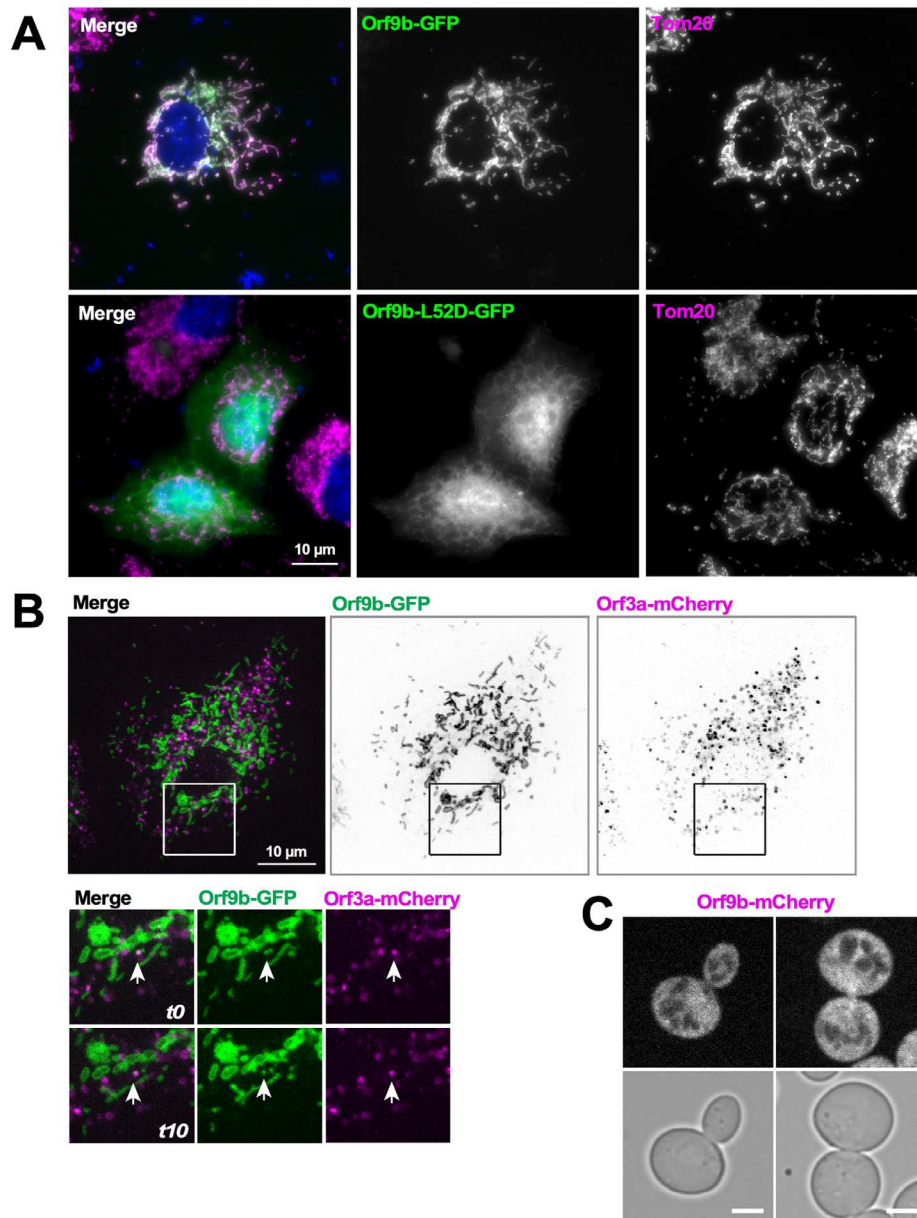
**Figure 6 | Fluorescent-fusion forms of Orf3a localises to late endocytic compartments in mammalian cells and in yeast**

(A) A549 cells expressing Orf3a-mCherry were immunolabelled with an antibody against the late endosomal markers Lamp1 and imaged by wide-field microscopy. (B) Real-time spinning disk microscopy of A549 cells co-expressing Orf3a-mCherry and Lamp1-GFP. Pictures were acquired at the indicated time. Higher magnifications of the images are shown. Arrows point to a moving structure where Orf3a-mCherry and Lamp1-GFP are co-localised. (C) A549 cells were transfected with Orf3a-mCherry and stained with the Golgi marker GM130 and the autophagosome marker LC3. Higher magnifications of the images are shown. (D) Wide-field images of A549 cells transfected with Orf3a-mCherry and analysed by immunofluorescence for endosomal markers. The cells expressing Orf3a showed enlarged endocytic structures as compared with naïve cells. (E) Spinning disk microscopy images of *S. cerevisiae* cells expressing Orf3a-mCherry. The fluorescent construct shows strong co-localisation with a vacuole marker (Vph1-mCherry) and moderate co-localisation with an ER marker (Sec63-GFP). Bars = 10  $\mu\text{m}$  (A–D) or 3  $\mu\text{m}$  (E).



**Figure 7 | Orf9b-GFP localises to mitochondria in mammalian cells**

(A) A549 cells were transfected with Orf9b-GFP or Orf9b-L52D-GFP mutant and immunolabeled with the mitochondrial marker Tom20. Representative images are shown. (B) A549 cells were co-transfected with Orf9b-GFP and Orf3a-mCherry and imaged using time-lapse multicolour imaging. Real time pictures were acquired using a spinning disk microscope and pictures were acquired at the indicated time. Higher magnifications of the images are shown. Arrows point to a moving structure where Orf3a-mCherry and Orf9b-GFP co-localise (C). In *S. cerevisiae* Orf9b-GFP is soluble. Bars: 10  $\mu\text{m}$  (A and B) and 3  $\mu\text{m}$  (C).

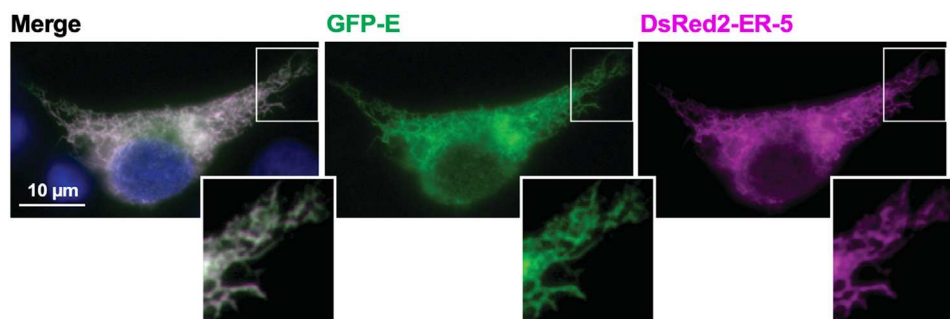


and cytotoxicity in cells expressing high levels of SARS-CoV-2 E protein. Given the very small size of E and its tight pentameric structure, we cannot exclude that the GFP moiety affects its assembly

and trafficking fate. Recent studies indicate an interplay between E, S and M proteins of SARS-CoV-2 for their trafficking and maturation (Boson et al., 2021).

**Figure 8 | SARS-CoV-2 E protein localises to ER**

Wild-field microscopy images showing co-localisation of GFP-E with the ER marker DsRed2-ER-5 in A549 cells. Bar: 10  $\mu$ m.



## Discussion

The identification of potential interactions between individual SARS-CoV-2 proteins and mammalian proteins by affinity- or proximity-based proteomic analysis (Laurent et al., 2020; St-Germain et al., 2020; Stukalov et al., 2020; Gordon et al., 2020a) suggests hypothesis for the cellular pathways that might be targeted to interfere with viral infection or replication. The fluorescent constructs generated and described in this study should aid at exploring these interactions in different cellular context, should it be at the scale of individual proteins or in more integrated studies with several viral proteins working in concert. Of note, SARS-CoV-2 constructs with a Flag tag and thus suitable for immunofluorescence are now also available (Zhang et al., 2020). We used our preliminary microscopy observations with some of the SARS-CoV-2 fluorescent constructs to test the relevance of some of the reported interactions, notably with regard to the attachment to or remodelling of membrane compartments. Because the general features of the secretory pathway are conserved in eukaryotes, we also tested the localisation of some SARS-CoV-2 proteins in budding yeast. Figure 9 summarises our major observations. The cellular localisation of a few SARS-CoV-2 proteins is in agreement with previous proteomic studies (*e.g.*, Nsp13, Orf9b). However, many SARS-CoV-2 fluorescent fusions appear essentially soluble.

A striking feature of the interactome map of individual SARS-CoV-2 proteins is pairing of the viral proteins involved in genome replication (*e.g.*, Nsp7 and Nsp13) with organelle-specific proteins, such as small G proteins of the Rab family, golgins or cen-

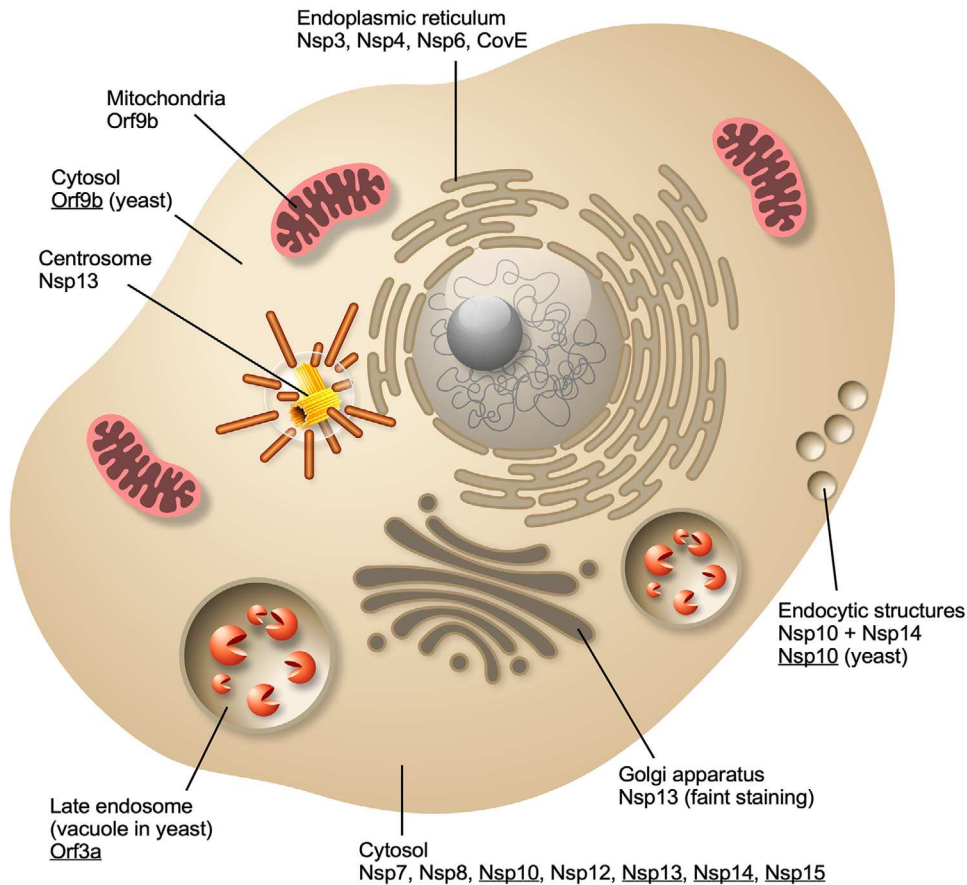
trosomal proteins. Such interactions raise questions about the position of the replication machinery during cell infection, and most notably about the topological constraints imposed by the formation of the replication organelle on the virus replication (Snijder et al., 2020; Wolff et al., 2020). When the enzymes involved in RNA replication and transcription are encapsulated in a double-membrane vesicle, they cannot have access to other organelles. However, this consideration is not valid at other stages, when Orf1a and Orf1ab, which include the replicase complex, are themselves translated in the cytosol before formation of the double-membrane replication organelle (Snijder et al., 2020). Therefore, a temporal map of the interactions between SARS-CoV-2 and host proteins is needed.

The cell transfection experiments presented here indicate that many Nsp proteins involved in SARS-CoV-2 replication and transcription (*e.g.*, Nsp7, Nsp8, Nsp12, Nsp15) are intrinsically soluble. A notable exception is Nsp13, which associates with the centrosome. The observations that Nsp10 co-localises with endocytic foci in yeast and that co-expressed Nsp10 and Nsp14 partially co-localised with clathrin in A549 cells are intriguing because interaction between Nsp10 and the clathrin adaptor AP-2 subunits have been observed by proteomics (Gordon et al., 2020a). It is possible that this interaction is preserved in yeast. It remains to be explored whether Nsp10 and Nsp14 affect endocytosis.

The most notable membrane interactions of the viral proteins identified in this study were those of Nsp3/4/6 and E with the ER, Orf3a with late endosomes and Orf9b with mitochondria. These

**Figure 9 | General scheme of the localisation of the SARS-CoV-2 fusion proteins in mammalian cells**

For the proteins tested in yeast, the agreement/disagreement with the observations made in mammalian cells is also indicated.



observations illustrate the complex rewiring of cellular membranes upon infection by the virus. The impact of Orf3a on late endosomal compartments in mammalian cells is particularly striking. The fact that Orf3a localises to the corresponding compartment (the vacuole) when expressed in budding yeast suggests the possibility for high-throughput drug screening assays using this simple model organism. Due to its widespread effects in cells, Orf3a has been suggested as a promising therapeutic target (Zhong et al., 2006; Kern et al., 2020).

Localisation of SARS-CoV-2 E at the ER was somewhat surprising, given that E proteins of other coronaviruses mostly localise to the ERGIC and the Golgi (Schoeman and Fielding, 2019), except for the avian infection bronchitis virus E protein, which, in addition to the Golgi, has been detected at the

ER, likely due to its C-ter retention signal (Corse and Machamer, 2000; Lim and Liu, 2001). ER localisation of SARS-CoV-2 E is unlikely to be due to protein–protein interactions since its interaction partners do not seem to include ER-resident proteins (Gordon et al., 2020a). Other possibilities include the presence of an ER-retention signal within the protein, as well as retention in the ER due to misfolding or the presence of the EGFP tag.

Several viral proteins were cytotoxic and showed specific effects on the compartment where they were localised. For instance, we observed deformations of the ER upon expression of Nsp3/4/6 and CovE and Golgi fragmentation in the presence of Nsp12 and Nsp13. Interestingly, in cells expressing late endosome-localised Orf3a, we observed morphological alterations not only in late, but also in early

endosomes, suggesting that at least some viral proteins may exert wide-spread effects beyond their immediate vicinity in the cell.

## Materials and methods

### Mammalian cell expression

A549, HeLa, HEK293, Caco-2, BEAS-2B and hTert-RPE1 cell lines were used for testing the localisation of SARS-Cov-2 proteins. All cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium or in DMEM/F12 (Gibco) supplemented with 10 % foetal calf serum. Transfections were done using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) or Lipofectamine 3000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Media was replaced 6 hours post-transfection and cells were incubated for a total of 24 or 48 h.

### Yeast manipulations, strains and plasmid construction

Yeast manipulations were performed using standard methods and growth conditions (Dunham and Gartenberg, 2015). All plasmids used in this study are listed in Table S1. In-Fusion HD Cloning Plus kit (Takara Bio) was used according to the supplier instructions. Briefly, individual PCR products corresponding to coding sequences of the viral proteins (Nsp10, Nsp13, Nsp14, Nsp15, Orf3a and Orf9b) were cloned into a low-copy (CEN) plasmid containing the medium-strength ADHI1-promotor and a gene for fluorescent protein (C-ter-GFP, N-ter-mCherry or C-ter-mCherry), upon linearisation by a restriction enzyme. All resulting plasmids were verified by DNA sequencing. Plasmids were transformed either into a wild-type yeast strain or, for co-localisation analyses, into strains expressing endogenously tagged yeast proteins. Yeast strains are listed in Table S2. Gene chromosome-tagging was performed by homologous recombination and confirmed by PCR on genomic DNA. The tagging with mRuby2 was performed using the plasmid pFa-mRuby::HIS5 (Lee et al., 2013).

### Immunofluorescence

Cell fixation was performed with 3% or 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) for 15 min at room temperature or with methanol for 2 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ . For permeabilisation, cells were incubated in PBS supplemented with 2 g/l BSA and 0.5 g/l saponin for 10 min at room temperature. For staining with antibodies against EEA1, Lamp1, M6PR and calnexin, cells were permeabilised with 0.05 % Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature.

Primary antibodies used in this study were mouse anti-GM130 (BD Biosciences; ref 610823 and Roche, ref 11814460001), rabbit anti-GalNacT2 (Sigma; HPA01122), sheep anti-TGN46 (Biorad; ahp500g), mouse anti ERGIC-53 (Santa Cruz; sc-398777), mouse anti-HSP90B1 (Sigma; AMAb91019), rabbit anti-Tom20 (Santa Cruz; sc-11415), mouse anti-EEA1 (BD Transduction Laboratories; 610456 or 610457), anti-Lamp1 (Santa Cruz; sc-20011), anti-M6PR (Abcam; ab134153), anti-calnexin (Millipore; MAB 3126), mouse anti-Tsg101 (GeneTex; GTX70255). Mouse anti-clathrin antibodies were a kind gift from Michel Franco. Mitochondria were labelled using Mitotracker<sup>TM</sup> Red CMX Ros (Invitrogen; M7512). For co-localisation studies, particular organelles were

visualised by co-expressing fluorescent organelle markers (Rab7-GFP (Addgene #28047), DsRed2-Mito-7 (Addgene #55838) or DsRed2-ER-5 (Addgene #55836)). Alexa-Secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratory.

Coverslips were mounted in Mowiol and examined with the following microscopes:

- (1) An inverted LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss, France) equipped with a 63X oil immersion objective lens (numerical aperture NA 1.4). Z-series of 16–20 images were compressed into two dimensions using the maximum projection of Volocity software (Figures 1, 3, 5, S1, S3B, S3C, S4C and S5A).
- (2) A 3D deconvolution microscope (Leica DM-RXA2), equipped with a piezo z-drive (Physik Instrument) and a  $100\times 1.4\text{NA-PL-APO}$  objective lens for optical sectioning. 3D or 1D multicolour image stacks were acquired using the Metamorph software (MDS) through a cooled CCD-camera (Photometrics Coolsnap HQ) (Figures 2A, 2B, 6C and 7A).
- (3) A Zeiss Axio Observer microscope with a EC Plan NE-OFLUAR 100x/1.3 Oil Ph3 objective. Images were acquired by a Zeiss AxioCam 506 mono camera using a ZEN blue software (Figures S2, S3A, S4A, 6A, 6D, S6A–S6C, S7, 8 and S8).

### Live cell imaging of the mammalian cells

Spinning-disk confocal time-lapse imaging was done at  $37^{\circ}\text{C}$  in a thermostat-controlled chamber using an Eclipse 80i microscope (Nikon) equipped with spinning disk confocal head (Perkin), a 100x objective and either a Ultra897 iXon camera (Andor) or CoolSnapHQ2 camera (Roper Scientific). Corresponding time-lapse images are displayed in Figures 2B, 6B and 7B.

### Fluorescence microscopy in yeast

Yeast cells were grown for 14–24 h at  $30^{\circ}\text{C}$  in an appropriate minimal medium to maintain plasmid selection. Cells were harvested by centrifugation in mid-logarithmic phase ( $\text{OD}_{600} = 0.5\text{--}0.8$ ) or, exceptionally, in stationary phase ( $\text{OD}_{600} = 4\text{--}6$ ) and prepared for viewing on glass slides. Imaging was performed at room temperature using an Axio Observer Z1 microscope (Zeiss), equipped with an oil immersion plan apochromat 100x objective NA 1.4, an sCMOS PRIME 95 camera (Photometrics) and a spinning-disk confocal system CSU-X1 (Yokogawa). GFP-tagged proteins and mCherry- or mRuby-tagged proteins were visualised with a GFP Filter 535AF45 and an RFP Filter 590DF35, respectively. Images were acquired with MetaMorph 7 software (Molecular Devices) and processed with ImageJ (NIH, MD).

### Author contribution

A.P. prepared the mammalian constructs with the help of R.G., M.S. and D.K. J.M.D. prepared the yeast constructs. H.B. analysed Nsp3, Nsp4, Nsp6, Nsp10, Nsp13, Nsp14, Nsp15 constructs in A549 by confocal microscopy. S.M.L. analysed Nsp7, Nsp8, Nsp12, Orf3a and Orf9b in A549 with the help



of P.M. and K.S. by 3D- and live-cell imaging. M.S. analysed Nsp4 and Nsp6 in RPE1 cells. K.T. analysed the constructs in different mammalian cell lines by wide-field fluorescence microscopy. J.M.D. and A.C. analysed the constructs in yeast cells by spinning-disk microscopy. V.A. contributed yeast strains and participated in yeast project design. B.A., H.B., A.C., B.G., S.M.L., A.P., K.S. and K.T. wrote and edited the manuscript. B.A. coordinated the project.

## Acknowledgements

We thank Nevan Krogan and David Gordon (UCSF) for the SARS-CoV-2 library of Strep-Tag plasmids. We thank Yves Jacob (Institut Pasteur) for the Nsp3 construct. We thank Pascal Barbry, Laure Emmanuelle Zaragossi, Roger Rezzonico, Gaëlle Boncompain, Franck Perez, Pierre Simonin, and Sébastien Léon for their help and advice, Bernard Mari for sharing A549 cell line and Franck Aguila for help with the figures. We thank Sanda Raic from MedILS for technical assistance. We acknowledge the IPMC imaging facility, member of IBI SA, IJM ImagoSeine facility, member of IBI SA and the France-BioImaging infrastructure (ANR-10-INBS-04) and the Cell and Tissue Imaging Facility (PICT-IBI SA), Institut Curie, member of the France-BioImaging Infrastructure (ANR10-INBS-04). Imaging by Zeiss Axio Observer microscope was supported by the project STIM - REI (KK.01.1.1.01.0003 - European Union - the Operational Programme Competitiveness and Cohesion 2014-2020). We thank Jean Louis Nahon (IPMC) and Franck Perez (IC) for having facilitated our benchwork during the pandemia and F Aguila for help with figure preparation. H.B. is supported by Inserm. This work is funded in part by a CNRS grant to support research on COVID-19 (to B.G.).

## Conflict of interest statement

The authors have declared no conflict of interest.

## References

Angelini, M. M., Akhlaghpour, M., Neuman, B. W. and Buchmeier, M. J. (2013) Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio* **4** (4), e00524-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00524-13>.

Bar-On, Y. M., Flamholz, A., Phillips, R. and Milo, R. (2020) SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *eLife* **9**, e57309. <https://doi.org/10.7554/eLife.57309>.

Boson, B., Legros, V., Zhou, B., Siret, E., Mathieu, C., Cosset, F.-L., Lavillette, D. and Denolly, S. (2021) The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles. *J. Biol. Chem.* **296**, 100111.

Chan, N. C., Likić, V. A., Waller, R. F., Mulhern, T. D. and Lithgow, T. (2006) The C-terminal TPR domain of Tom70 defines a family of mitochondrial protein import receptors found only in animals and fungi. *J. Mol. Biol.* **358**, 1010-1022.

Chen J., Malone B., Llewellyn E., Grasso M., Shelton P. M. M., Olinares P. D. B., Maruthi K., Eng E. T., Vatanbaslar H., Chait B. T., Kapoor T. M., Darst S. A., Campbell E. A. (2020) Structural Basis for Helicase-Polymerase Coupling in the SARS-CoV-2 Replication-Transcription Complex. *Cell*, **182** (6), 1560-1573.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.033>.

Corse, E. and Machamer, C. E. (2000) Infectious bronchitis virus E protein is targeted to the Golgi complex and directs release of virus-like particles. *J. Virol.* **74**, 4319-4326.

Dunham, M. J., Gartenberg, M. R. & Brown, G. W. (2015) *Methods in Yeast Genetics and Genomics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor, NY 11724: CSHL Press.

Ghosh S., Dellibovi-Ragheb T. A., Kerviel A., Pak E., Qiu Q., Fisher M., Takvorian P. M., Bleck C., Hsu V. W., Fehr A. R., Perlman S., Achar S. R., Straus M. R., Whittaker G. R., de Haan C. A. M., Kehrl J., Altan-Bonnet G., Altan-Bonnet N. (2020)  $\beta$ -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell*, **183** (6), 1520-1535.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.039>.

Gordon D. E., Jang G. M., Bouhaddou M., Xu J., Obernier K., White K. M., O'Meara M. J., Rezelj V. V., Guo J. Z., Swaney D. L., Tummino T. A., Hüttenhain R., Kaake R. M., Richards A. L., Tutuncuoglu B., Foussard H., Batra J., Haas K., Modak M., Kim M., Haas P., Polacco B. J., Braberg H., Fabius J. M., Eckhardt M., Soucheray M., Bennett M. J., Cakir M., McGregor M. J., Li Q., Meyer B., Roesch F., Vallet T., Mac Kain A., Miorin L., Moreno E., Naing Z. Z. C., Zhou Y., Peng S., Shi Y., Zhang Z., Shen W., Kirby I. T., Melnyk J. E., Chorba J. S., Lou K., Dai S. A., Barrio-Hernandez Inigo, Memon D., Hernandez-Armenta C., Lyu J., Mathy C. J. P., Perica T., Pilla K. B., Ganesan S. J., Saltzberg D. J., Rakesh R., Liu X., Rosenthal S. B., Calviello L., Venkataramanan S., Liboy-Lugo J., Lin Y., Huang X.-P., Liu Y. F., Wankowicz S. A., Bohn M., Safari M., Ugur F. S., Koh C., Savar N. S., Tran Q. D., Shengjuler D., Fletcher S. J., O'Neal M. C., Cai Y., Chang J. C. J., Broadhurst D. J., Klippsten S., Sharp P. P., Wenzell N. A., Kuzuoglu-Ozturk D., Wang H.-Y., Trenker R., Young J. M., Cavero D. A., Hiatt J., Roth T. L., Rathore U., Subramanian A., Noack J., Hubert M., Stroud R. M., Frankel A. D., Rosenberg O. S., Verba K. A., Agard D. A., Ott M., Emerman M., Jura N., von Zastrow M., Verdini E., Ashworth A., Schwartz O., d'Enfert C., Mukherjee S., Jacobson M., Malik H. S., Fujimori D. G., Ideker T., Craik C. S., Floor S. N., Fraser J. S., Gross J. D., Sali A., Roth B. L., Ruggero D., Taunton J., Kortemme T., Beltrao P., Vignuzzi M., Garcia-Sastre A., Shokat K. M., Shoichet B. K., Krogan N. J. (2020) A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, **583** (7816), 459-468. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>.

Gordon D. E., Hiatt J., Bouhaddou M., Rezelj V. V., Ulferts S., Braberg H., Jureka A. S., Obernier K., Guo J. Z., Batra J., Kaake R. M., Weckstein A. R., Owens T. W., Gupta M., Pourmal S., Titus E. W., Cakir M., Soucheray M., McGregor M., Cakir Z., Jang G., O'Meara M. J., Tummino T. A., Zhang Z., Foussard H., Rojc A., Zhou Y., Kuchenov D., Hüttenhain R., Xu J., Eckhardt M., Swaney D. L., Fabius J. M., Ummadi M., Tutuncuoglu B., Rathore U., Modak M., Haas P., Haas K. M., Naing Z. Z. C., Pulido E. H., Shi Y., Barrio-Hernandez I., Memon D., Petsalaki E., Dunham A., Marrero

- M. C., Burke D., Koh C., Vallet T., Silvas J. A., Azumaya C. M., Billesbølle C., Briot A. F., Campbell M. G., Diallo A., Dickinson M. S., Diwanji D., Herrera N., Hoppe N., Kratochvil H. T., Liu Y., Merz G. E., Moritz M., Nguyen H. C., Nowotny C., Puchades C., Rizo A. N., Schulze-Gahmen U., Smith A. M., Sun M., Young I. D., Zhao J., Asarnow D., Biel J., Bowen A., Braxton J. R., Chen J., Chio C. M., Chio U. S., Deshpande I., Doan L., Faust B., Flores S., Jin M., Kim K., Lam V. L., Li F., Li J., Li Y.-L., Li Y., Liu X., Lo M., Lopez K. E., Melo A. A., Moss F. R., Nguyen P., Paulino J., Pawar K. I., Peters J. K., Pospiech T. H., Safari M., Sangwan S., Schaefer K., Thomas P. V., Thwin A. C., Trenker R., Tse E., Tsui T. K. M., Wang F., Whitis N., Yu Z., Zhang K., Zhang Y., Zhou F., Saltzberg D., Hodder A. J., Shun-Shion A. S., Williams D. M., White K. M., Rosales R., Kehrler T., Miorin L., Moreno E., Patel A. H., Rihn S., Khalid M. M., Vallejo-Gracia A., Fozouni P., Simoneau C. R., Roth T. L., Wu D., Karim M. A., Ghousaini M., Dunham I., Berardi F., Weigang S., Chazal M., Park J., Logue J., McGrath M., Weston S., Haupt R., Hastie C. J., Elliott M., Brown F., Burness K. A., Reid E., Dorward M., Johnson C., Wilkinson S. G., Geyer A., Giesel D. M., Baillie C., Raggett S., Leech H., Toth R., Goodman N., Keough K. C., Lind A. L., Klesh R. J., Hemphill K. R., Carlson-Stevermer J., Oki J., Holden K., Maures T., Pollard K. S., Sali A., Agard D. A., Cheng Y., Fraser J. S., Frost A., Jura N., Kortemme T., Manglik A., Southworth D. R., Stroud R. M., Alessi D. R., Davies P., Frieman M. B., Ideker T., Abate C., Jouvenet N., Kochs G., Shoichet B., Ott M., Palmarini M., Shokat K. M., Garcia-Sastre A., Rassen J. A., Grosse R., Rosenbrog O. S., Verba K. A., Basler C. F., Vignuzzi M., Peden A. A., Beltrao P., Krogan N. J., (2020) Comparative host-coronavirus protein interaction networks reveal pan-viral disease mechanisms. *Science*, **370** (6521), eabe9403. <https://doi.org/10.1126/science.abe9403>.
- Hao, W., Wojdyla, J. A., Zhao, R., Han, R., Das, R., Zlatev, I., Manoharan, M., Wang, M. and Cui, S. (2017) Crystal structure of Middle East respiratory syndrome coronavirus helicase. *PLoS Pathog.* **13**, e1006474.
- Hillen, H. S., Kobic, G., Farnung, L., Dienemann, C., Tegunov, D. and Cramer, P. (2020) Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. *Nature* **584**, 154–156.
- Hoffmann H. H., Sánchez-Rivera F. J., Schneider W. M., Luna J. M., Soto-Feliciano Y. M., Ashbrook A. W., Le Pen J., Leal A. A., Ricardo-Lax I., Michailidis E., Hao Y., Stenzel A. F., Peace A., Zuber J., Allis C. D., Lowe S. W., MacDonald M. R., Poirier J. T., Rice C. M. (2021) Functional interrogation of a SARS-CoV-2 host protein interactome identifies unique and shared coronavirus host factors. *Cell Host & Microbe*, **29** (2), 267–280.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.12.009>.
- Jiang H.-W., Zhang H.-N., Meng Q.-F., Xie J., Li Y., Chen H., Zheng Y.-X., Wang X.-N., Qi H., Zhang J., Wang P.-H., Han Z.-G., Tao S.-C. (2020) SARS-CoV-2 ORF9b suppresses type I interferon responses by targeting TOM70. *Cellular & Molecular Immunology*, **17** (9), 998–1000. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0514-8>.
- Kaksonen, M., Toret, C. P. and Drubin, D. G. (2005) A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* **123**, 305–320.
- Kern, D. M., Sorum, B., Hoel, C. M., Sridharan, S., Remis, J. P., Toso, D. B. and Brohawn, S. G. (2020) Cryo-EM structure of the SARS-CoV-2 3a ion channel in lipid nanodiscs. *bioRxiv*, **6** (17), 156554. <https://doi.org/10.1101/2020.06.17.156554>.
- Kim D.-K., Knapp J. J., Kuang D. A., Chawla A., Cassonnet P., Lee H., Sheykhkarimli D., Samavarchi-Tehrani P., Abdouni H., Rayhan A., Li R., Pogoutse O., Coyaud É., van der Werf S., Demeret C., Gingras A.-C., Taipale M., Raught B., Jacob Y., Roth F. P. (2020) A Comprehensive, Flexible Collection of SARS-CoV-2 Coding Regions. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, **10** (9), 3399–3402. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401554>.
- Klein, S., Cortese, M., Winter, S. L., Wachsmuth-Melm, M., Neufeldt, C. J., Cerikan, B., Stanifer, M. L., Boulant, S., Bartenschlager, R. and Chlanda, P. (2020) SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat. Commun.* **11**, 5885–10.
- Kreimendahl S., Rassow J. (2020) The Mitochondrial Outer Membrane Protein Tom70-Mediator in Protein Traffic, Membrane Contact Sites and Innate Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, **21** (19), 7262. <https://doi.org/10.3390/ijms21197262>.
- Laurent, E. M. N. *et al.* (2020) Global BioID-based SARS-CoV-2 proteins proximal interactome unveils novel ties between viral polypeptides and host factors involved in multiple COVID19-associated mechanisms. *bioRxiv* **2020.08.28.272955**. <https://doi.org/10.1101/2020.08.28.272955>.
- Lee, S., Lim, W. A. and Thorn, K. S. (2013) Improved blue, green, and red fluorescent protein tagging vectors for *S. cerevisiae*. *PLoS One* **8**, e67902.
- Lim, K. P. and Liu, D. X. (2001) The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 17515–17523.
- Ma, Y., Wu, L., Shaw, N., Gao, Y., Wang, J., Sun, Y., Lou, Z., Yan, L., Zhang, R. and Rao, Z. (2015) Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 9436–9441.
- Mandala V. S., McKay M. J., Shcherbakov A. A., Dregni A. J., Kolocouris A., Hong M. (2020) Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nat Struct Mol Biol*, **27** (12), 1202–1208. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00536-8>.
- Meier, C., Aricescu, A. R., Assenberg, R., Aplin, R. T., Gilbert, R. J. C., Grimes, J. M. and Stuart, D. I. (2006) The crystal structure of ORF-9b, a lipid binding protein from the SARS coronavirus. *Struct. Fold. Des.* **14**, 1157–1165.
- Oudshoorn, D., Rijs, K., Limpens, R. W. A. L., Groen, K., Koster, A. J., Snijder, E. J., Kikkert, M. and Bärceña, M. (2017) Expression and cleavage of middle east respiratory syndrome coronavirus nsp3-4 polyprotein induce the formation of double-membrane vesicles that mimic those associated with coronaviral RNA replication. *mBio* **8**(6), e01658-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01658-17>.
- Qu, Y. *et al.* (2020) ORF3a mediated-incomplete autophagy facilitates SARS-CoV-2 replication. *bioRxiv* **11** (12), 380709. <https://doi.org/10.1128/mBio.01658-17>.
- Schoeman, D. and Fielding, B. C. (2019) Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology*, **16**, 69–22.
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A. and Li, F. (2020) Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 11727–11734.
- Shi, C.-S., Qi, H.-Y., Boularan, C., Huang, N.-N., Abu-Asab, M., Shelhamer, J. H. and Kehrl, J. H. (2014) SARS-coronavirus open reading frame-9b suppresses innate immunity by targeting mitochondria and the MAVS/TRAF3/TRAF6 signalosome. *J. Immunol.* **193**, 3080–3089.
- Sicari, D., Chatziannou, A., Koutsandreas, T., Sitia, R. and Chevet, E. (2020) Role of the early secretory pathway in SARS-CoV-2 infection. *J. Cell Biol.* **219**, e202006005.
- Snijder, E. J., Limpens, R. W. A. L., de Wilde, A. H., de Jong, A. W. M., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Maier, H. J., Faas, F. F. G. A., Koster, A. J. and Bärceña, M. (2020) A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLoS Biol.* **18**, e3000715.
- St-Germain, J. R., Astori, A., Samavarchi-Tehrani, P., Abdouni, H., Macwan, V., Kim, D.-K., Knapp, J. J., Roth, F. P., Gingras, A.-C.

- and Raught, B. (2020) A SARS-CoV-2 BioID-based virus-host membrane protein interactome and virus peptide compendium: new proteomics resources for COVID-19 research. *bioRxiv* **2020.08.28**, 269175. <https://doi.org/10.1101/2020.08.28.269175>.
- Stukalov, A. & *et al.* (2020) Multi-level proteomics reveals host-perturbation strategies of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *bioRxiv* **2020.06.17**, 156455. <https://doi.org/10.1101/2020.06.17.156455>.
- Subissi, L., Imbert, I., Ferron, F., Collet, A., Coutard, B., Decroly, E. and Canard, B. (2014) SARS-CoV ORF1b-encoded nonstructural proteins 12–16: replicative enzymes as antiviral targets. *Antiviral Res.* **101**, 122–130.
- Tan, Y.-J., Teng, E., Shen, S., Tan, T. H. P., Goh, P.-Y., Fielding, B. C., Ooi, E.-E., Tan, H.-C., Lim, S. G. and Hong, W. (2004) A novel severe acute respiratory syndrome coronavirus protein, U274, is transported to the cell surface and undergoes endocytosis. *J. Virol.* **78**, 6723–6734.
- Wolff G., Limpens R. W. A. L., Zevenhoven-Dobbe J.C., Laugks U., Zheng S., de Jong A. W. M., Koning R. I., Agard D. A., Grūnewald K., Koster A. J., Snijder E. J., Bárcena M. (2020) A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. *Science*, **369** (6509), 1395–1398. <https://doi.org/10.1126/science.abd3629>.
- Zhang, J., Cruz-cosme, R., Zhuang, M.-W., Liu, D., Liu, Y., Teng, S., Wang, P.-H. and Tang, Q. (2020) A systemic and molecular study of subcellular localization of SARS-CoV-2 proteins. *bioRxiv* **2020.08.02**, 233023. <https://doi.org/10.1101/2020.08.02.233023>.
- Zhong, X., Guo, Z., Yang, H., Peng, L., Xie, Y., Wong, T.-Y., Lai, S.-T. and Guo, Z. (2006) Amino terminus of the SARS coronavirus protein 3a elicits strong, potentially protective humoral responses in infected patients. *J. Gen. Virol.* **87**, 369–373.
- Freundt E. C., Yu L., Goldsmith C. S., Welsh S., Cheng A., Yount B., Liu W., Frieman M. B., Buchholz U. J., Screaton G. R., Lippincott-Schwartz J., Zaki S. R., Xu X.-N., Baric R. S., Subbarao K., Lenardo M. J. (2010) The Open Reading Frame 3a Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Promotes Membrane Rearrangement and Cell Death. *J. Virol.*, **84** (2), 1097–1109. <https://doi.org/10.1128/jvi.01662-09>.
- Yue Y., Nabar N. R., Shi C.-S., Kamenyeva O., Xiao X., Hwang I.-Y., Wang M., Kehrl J. H. (2018) SARS-Coronavirus Open Reading Frame-3a drives multimodal necrotic cell death. *Cell Death & Disease*, **9** (9), <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0917-y>.

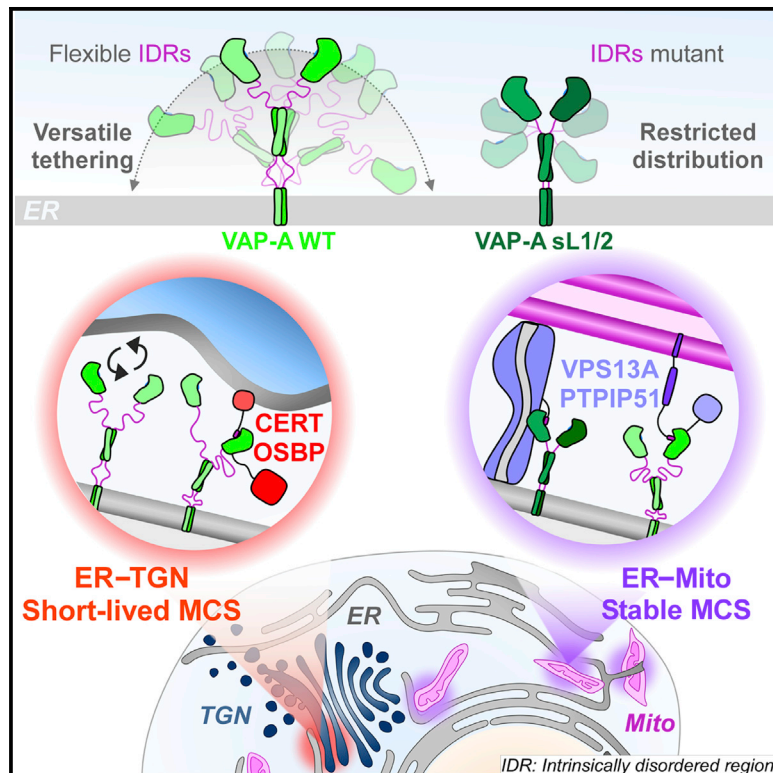
---

Received: 22 December 2020; Revised: 17 February 2021; Accepted: 18 February 2021; Accepted article online: 5 March 2021

# Developmental Cell

## VAP-A intrinsically disordered regions enable versatile tethering at membrane contact sites

### Graphical abstract



### Authors

Mélody Subra, Manuela Dezi, Joëlle Bigay, ..., Bruno Antony, Daniel Lévy, Bruno Mesmin

### Correspondence

mesmin@ipmc.cnrs.fr

### In brief

How the universal ER receptor VAP-A interacts with hundreds of targets in membrane contact sites (MCSs) that are so different in geometry and lifetime is unknown. Subra et al. demonstrate that VAP-A achieves this function owing to flexible intrinsically disordered regions, which ensures membrane tethering plasticity and efficiency at MCSs.

### Highlights

- VAP-A has two IDRs responsible for its flexibility
- VAP-A IDRs condition its engagement to different MCSs
- VAP-A controls LTP-dependent cardiolipin buildup and mitochondrial fusion
- Flexible IDRs are important to adapt VAP-A function to short-lived ER-Golgi MCS



## Article

# VAP-A intrinsically disordered regions enable versatile tethering at membrane contact sites

Mélody Subra,<sup>1</sup> Manuela Dezi,<sup>2</sup> Joëlle Bigay,<sup>1</sup> Sandra Lacas-Gervais,<sup>3</sup> Aurélie Di Cicco,<sup>2</sup> Ana Rita Dias Araújo,<sup>1</sup> Sophie Abélanet,<sup>1</sup> Lucile Fleuriot,<sup>1</sup> Delphine Debayle,<sup>1</sup> Romain Gautier,<sup>1</sup> Amanda Patel,<sup>1</sup> Fanny Roussi,<sup>4</sup> Bruno Antony,<sup>1</sup> Daniel Lévy,<sup>2</sup> and Bruno Mesmin<sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Université Côte d'Azur, Inserm, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France

<sup>2</sup>Institut Curie, Université PSL, Sorbonne Université, CNRS UMR168, Laboratoire Physico-Chimie Curie, 75005 Paris, France

<sup>3</sup>Université Côte d'Azur, Centre Commun de Microscopie Appliquée, Parc Valrose, 06000 Nice, France

<sup>4</sup>Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

<sup>5</sup>Lead contact

\*Correspondence: mesmin@ipmc.cnrs.fr

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.12.010>

## SUMMARY

Membrane contact sites (MCSs) are heterogeneous in shape, composition, and dynamics. Despite this diversity, VAP proteins act as receptors for multiple FFAT motif-containing proteins and drive the formation of most MCSs that involve the endoplasmic reticulum (ER). Although the VAP-FFAT interaction is well characterized, no model explains how VAP adapts to its partners in various MCSs. We report that VAP-A localization to different MCSs depends on its intrinsically disordered regions (IDRs) in human cells. VAP-A interaction with PTPIP51 and VPS13A at ER-mitochondria MCS conditions mitochondria fusion by promoting lipid transfer and cardiolipin buildup. VAP-A also enables lipid exchange at ER-Golgi MCS by interacting with oxysterol-binding protein (OSBP) and CERT. However, removing IDRs from VAP-A restricts its distribution and function to ER-mitochondria MCS. Our data suggest that IDRs do not modulate VAP-A preference toward specific partners but do adjust their geometry to MCS organization and lifetime constraints. Thus, IDR-mediated VAP-A conformational flexibility ensures membrane tethering plasticity and efficiency.

## INTRODUCTION

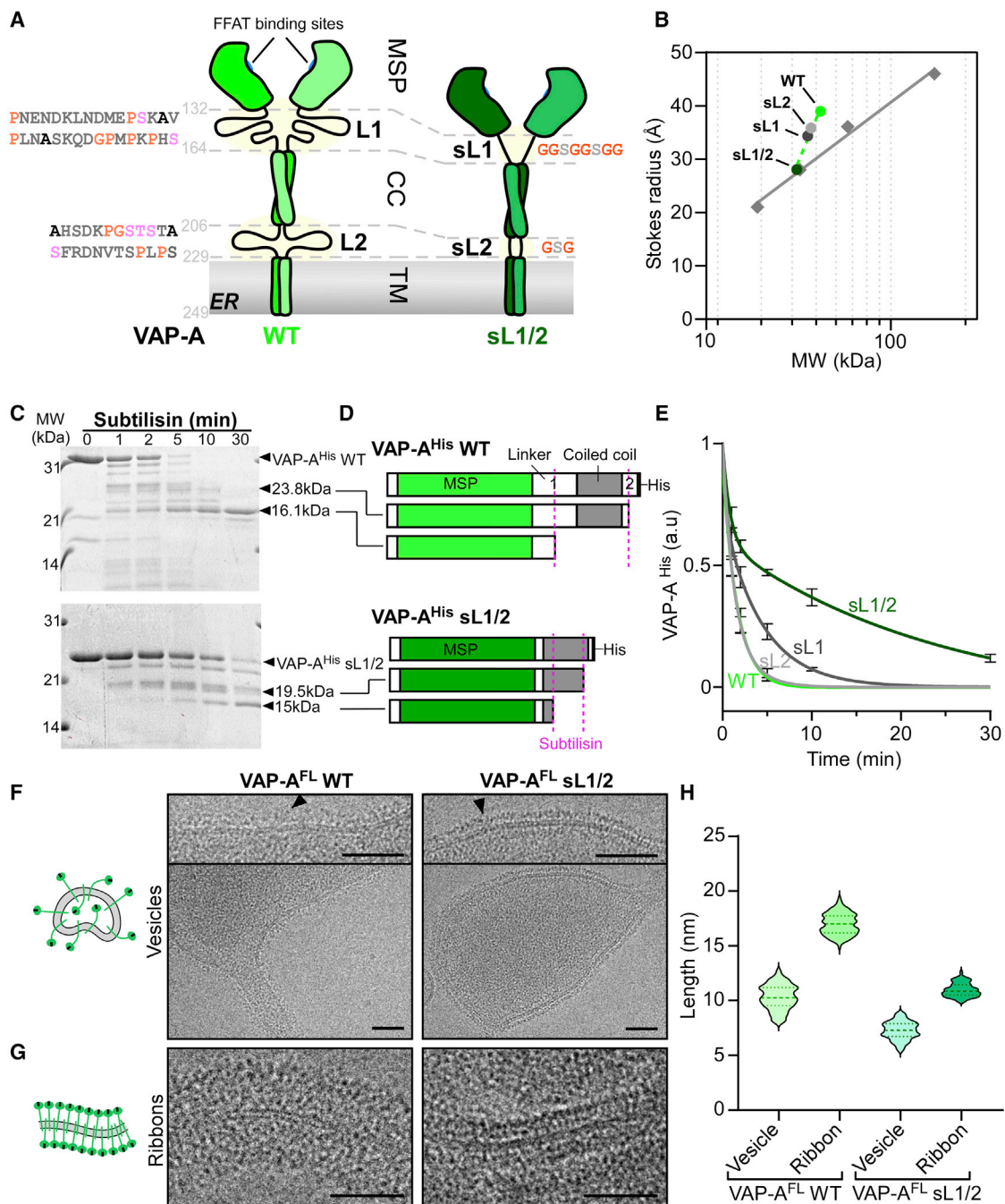
A prominent mechanism of communication between subcellular compartments is to bring them in contact. These membrane contact sites (MCSs) have different functions, such as lipid transfer, calcium signaling, and organelle dynamics.<sup>1</sup> MCS dysfunction is involved in a number of human diseases, including cancer, obesity, and neurological disorders.<sup>2</sup> In addition, many viruses exploit MCS components for their assembly in cells.<sup>3</sup> MCSs are ubiquitous, but heterogeneous in shape, composition, and dynamics, with intermembrane distances ranging from 15 to 45 nm and a lifetime of less than a minute to a few hours. For example, contacts between the endoplasmic reticulum (ER) and the *trans*-Golgi network (TGN) (abbreviated here as ER-Golgi MCS) are short lived because they involve the rapid turnover of several tethering components in the context of continuous TGN membrane remodeling.<sup>4,5</sup> Previously, we demonstrated that oxysterol-binding protein (OSBP) directs cholesterol transport from the ER to the TGN through counter-exchange and hydrolysis of the phosphoinositide phosphatidylinositol-4-phosphate (PI(4)P) at MCS between these two organelles.<sup>6,7</sup> Since PI(4)P also serves as a TGN anchor for several lipid-transfer proteins (LTPs), the lipid exchange activity of OSBP modulates membrane tethering. Furthermore, recent find-

ings showed that OSBP contains an N-terminal intrinsically disordered region (IDR), which prevents protein crowding at ER-Golgi MCS and facilitates lateral protein movements,<sup>8</sup> suggesting that OSBP is also well equipped to meet the transient nature of these contacts.

In contrast to ER-Golgi MCS, live-cell imaging studies indicate that contacts between the ER and mitochondria (hereafter ER-Mito MCS) are stable and persist over time despite the dynamics experienced by these organelles.<sup>9–12</sup> ER-Mito MCSs are well described for their involvement in mitochondria fission and fusion by enabling the accumulation of dedicated protein machinery at precise sites between the facing membranes<sup>13</sup> and by stabilizing mitochondria all along these processes.<sup>10</sup> Since ER-Mito MCSs are also hubs for lipid trafficking,<sup>14,15</sup> a related question is whether they help shape a membrane environment conducive to fission or fusion reactions.

Despite the heterogeneous stability of MCSs, the ubiquitously expressed vesicle-associated membrane protein-associated proteins (VAPs) are common major players for generating tethers between the ER and other compartments.<sup>1,16,17</sup> VAPs form a family of evolutionarily conserved proteins that are involved in several functions at MCSs, including lipid transport and homeostasis, and organelle trafficking.<sup>18–21</sup> The abundant ER-anchored type II membrane protein VAP-A, and its close





**Figure 1. VAP-A linkers are intrinsically disordered regions responsible for their flexibility**

(A) Schemes of human VAP-A featuring linker regions (L1, L2) with detailed amino acid sequences, as well as the mutant construct with short linker 1 and 2 (VAP-A sL1/2).

(B) Gel filtration analysis of VAP-A<sup>His</sup> constructs with WT, sL1, sL2, or sL1/sL2 linkers. Stokes radius versus molecular mass (MW) of VAP-A constructs (circles) and folded standards (squares). The dependence of Stokes radius values on the relative molecular masses of VAP-A constructs deviates from that of globular proteins, indicating that VAP-A linkers are IDRs. Note that the interception of the two lines coincides with the sL1/2 construct.

(C and D) Subtilisin digestion of VAP-A<sup>His</sup> WT or sL1/2 analyzed by SDS-PAGE and Sypro-orange staining. Arrowheads indicate major VAP-A fragments identified by mass spectrometry. VAP-A sL1/2 shows a stronger resistance to subtilisin cleavage.

(E) Fraction of VAP-A<sup>His</sup> constructs remaining upon subtilisin addition over time. Results are means of 3 independent experiments ± SEM.

(legend continued on next page)

homolog VAP-B, which mutations are associated with motor neuron diseases,<sup>22</sup> contain an N-terminal major sperm protein (MSP) domain that binds to numerous proteins containing a FFAT (two phenylalanines in an acidic tract) or FFAT-like motif,<sup>23,24</sup> a central region with a predicted coiled-coiled domain responsible for dimerization, and a C-terminal transmembrane domain. VAP-A/B are used extensively as anchors by LTPs to create bridges between membranes and exchange lipids between them, such as the VAP-OSBP complex at ER-Golgi MCS,<sup>6,25</sup> or the VAP-protein tyrosine phosphatase-interacting protein 51 (PTPIP51) complex at ER-Mito MCS.<sup>26,27</sup> VAP-A/B may also bind to multiple interactors within a single MCS.<sup>28</sup>

The structural basis of the MSP-FFAT interaction is well characterized by X-ray and NMR<sup>29,30</sup>; however, it is unclear how VAP adapts to partners having a wide range of structures and functions and is involved in MCSs of contrasting dynamics. Because VAP-A is a highly flexible protein that can tune its length to form MCSs of adjustable thickness, from 10 to 30 nm, *in vitro*,<sup>31</sup> it is possible that VAP-A accommodates different partners and/or supports membrane tethering in various MCS contexts through molecular properties beyond the MSP-FFAT interaction.

Here, we investigate the impact of VAP-A flexibility on the function and dynamics of MCSs. We show that downstream of the MSP domain, VAP-A contains two stretchable IDRs that link its folded domains together. These linkers make VAP-A flexible to ensure its engagement and function at different MCSs: VAP-A supports OSBP- and CERT-mediated lipid exchange at ER-Golgi MCSs, whereas it plays an important and previously uncharacterized role at ER-Mito MCS by promoting cardiolipin (CL) buildup in mitochondria and mitochondrial fusion. By replacing endogenous VAP-A with a construct lacking flexible IDRs, we show that it massively redistributes to ER-Mito MCSs, thereby affecting lipid flux at ER-Golgi MCS. This shift is due to the incompatibility between a rigid tether and the high turnover experienced by ER-Golgi MCSs. Thus, IDRs contribute to the function of VAP as a general and versatile ER receptor at MCS.

## RESULTS

### VAP-A linkers are IDRs

We previously demonstrated that full-length VAP-A reconstituted into liposomes extends its MSP to varying heights from the membrane depending on protein density.<sup>31</sup> Using *in vitro* reconstituted MCSs, we also showed that VAP-A conformational change is coupled to the size of its interactor, i.e., VAP-A is tilted when in complex with OSBP but exhibits a straighter conformation with a shorter OSBP construct, N-PH-FFAT, lacking the bulky OSBP-related domain (ORD). These data suggest that VAP-A is well equipped to adapt vertically to a large spectrum of interactors of different structures.<sup>31</sup> We noticed that downstream to its MSP, VAP-A contains two linker regions (hereafter termed L1 and L2) of 32 and 24 residues, flanking its coiled-coil

domain (Figure 1A). These sequences, which might provide VAP-A with flexibility, show lower amino acid conservation than the MSP, coiled-coil, and transmembrane (TM) domains but are consistently present across species (Figure S1A). Different algorithms predict VAP-A linkers to be IDRs, which is also suggested by the AlphaFold structure prediction (Figures S1A and S1B). Additionally, molecular dynamics (MD) simulations indicated that these linkers were extremely mobile and showed high bending capacity (Figures S1A and S1B).

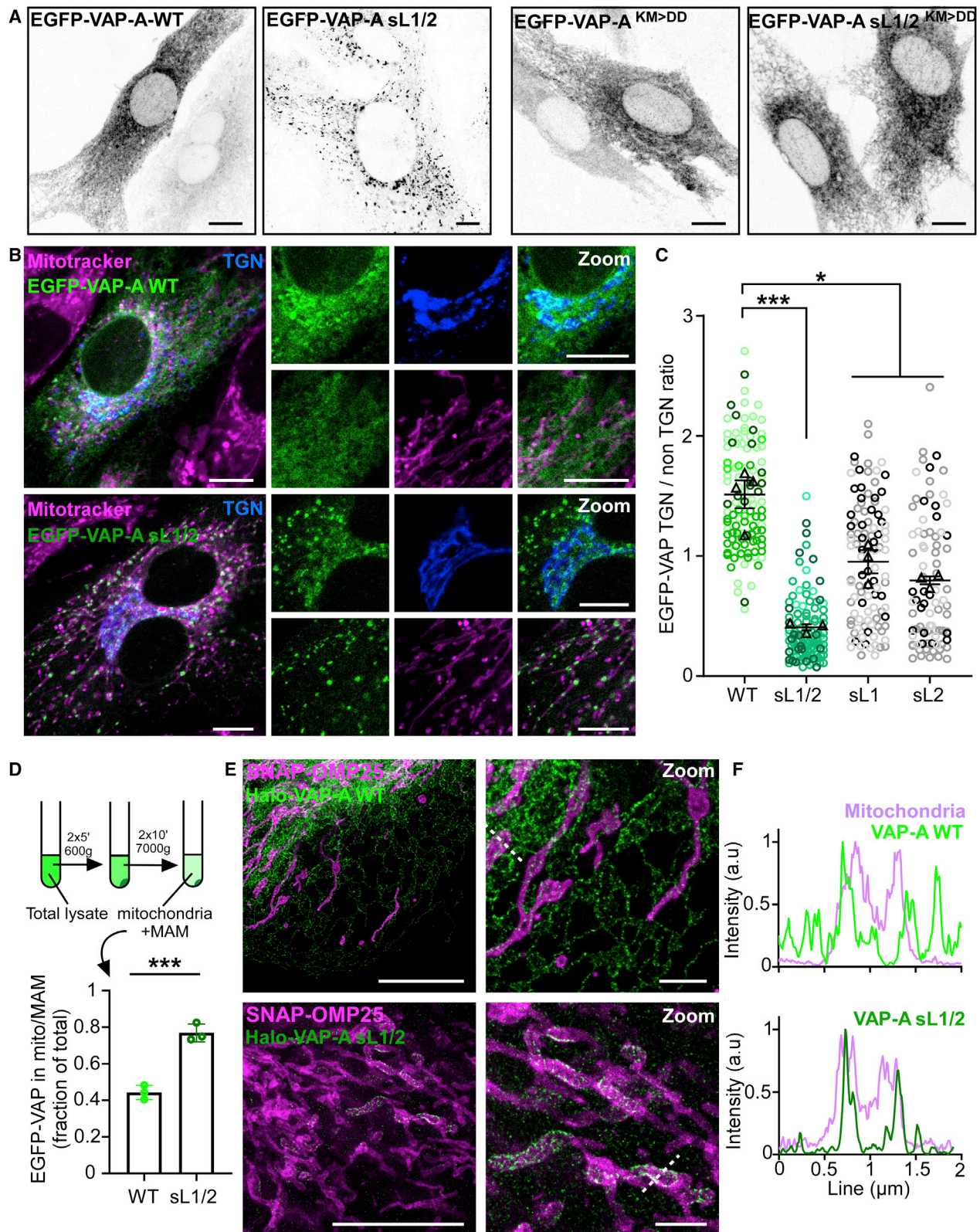
To gain insight into the conformational properties provided by VAP-A linkers, we built several VAP-A constructs in which we replaced the original linkers with much shorter ones, comprising only GGSGGG (8 aa, sL1) and GSG (3 aa, sL2) (Figure 1A). Considering that IDRs have larger hydrodynamic dimensions than folded domains of the same amino acid length, we examined the influence of both linkers on protein size by gel filtration chromatography. To simplify the analysis, we used VAP-A constructs with a 6×His-tag replacing the C-terminal TM domain (VAP<sup>His</sup> WT, sL1, sL2, and sL1/2). The linkers largely impacted VAP<sup>His</sup> size, increasing the Stokes radius by up to ~1.1 nm (VAP<sup>His</sup> WT versus sL1/2) (Figure 1B). VAP<sup>His</sup> sL1 and sL2 showed intermediate sizes and, along with the WT, followed a slope steeper than that established with folded globular standards, which is consistent with an increased hydrodynamic volume resulting from IDRs. Next, we conducted limited proteolysis experiments on VAP-A<sup>His</sup> constructs using subtilisin, which preferentially cleaves flexible loop regions (Figures 1C–1E). VAP-A<sup>His</sup> WT was rapidly digested ( $t_{1/2} = 1.13$  min) upon subtilisin addition, whereas VAP-A<sup>His</sup> sL1/2 was much more resistant ( $t_{1/2} = 16.9$  min) (Figures 1C and 1E). As determined by mass spectrometry, two major fragments derived from VAP-A<sup>His</sup> WT resulted from cleavages in the L1 and L2 regions (Figure 1D). By contrast, cleavages of VAP-A<sup>His</sup> sL1/2 occurred in the coiled-coil region, consistent with the slower proteolysis of this construct. We also noticed a higher sensitivity to subtilisin of VAP-A<sup>His</sup> sL2 compared with sL1 (Figure 1E), likely because L1 is longer than L2, and thus, an easier target for the protease. Taken together, these data demonstrate that VAP-A linkers are IDRs.

### The linkers of VAP are responsible for its flexibility but do not impact FFAT binding *in vitro*

We purified and reconstituted the full-length forms of VAP-A WT and sL1/2 (VAP-A<sup>FL</sup> WT and sL1/2) in liposomes and visualized them by cryo-EM (Figures 1F and 1G). Electron densities of proteins extending from membranes were visible as dark dots corresponding to the MSP domain. As previously described, MSP domains extended at variable distances from the membrane due to VAP-A<sup>FL</sup> WT flexibility (Figures 1F–1H),<sup>31</sup> as predicted (Figures S1A and S1B). By contrast, MSP domains of the sL1/2 version were clearly resolved from vesicle surfaces (Figure 1F, right), forming a continuous band of electron density evenly distant from the bilayer, suggesting that the proteins are rigid

(F and G) Representative cryo-EM images of reconstituted VAP-A<sup>FL</sup> WT or sL1/2 into proteoliposomes at high protein density (lipid/protein ratio of 70 mol/mol) leading to the formation of spherical or slightly deformed vesicles (F), or ribbon-like membrane fragments with proteins distributed on both sides of the bilayer (G). Zoomed views of electron densities corresponding to VAP-A WT or sL1/2 (arrowheads) at the vesicle surface are shown in the insets. Bars, 50 nm.

(H) Violin plots showing the length distribution of the extramembrane domains of VAP-A. Horizontal dashed lines indicate mean values and SD. 25 vesicles ( $n = 122$  measurements, 19 images) and 25 ribbons ( $n = 119$ , 15 images) with VAP-A WT were analyzed; 35 vesicles ( $n = 131$ , 30 images) and 25 ribbons ( $n = 113$ , 14 images) with VAP-A sL1/2 were analyzed.



**Figure 2. VAP-A linker mutant sL1/2 localizes mainly at contacts between the ER and mitochondria**

(A) Confocal images of RPE1 VAP-A KO cells transfected with EGFP-VAP-A WT or sL1/2 showing differential localization between the two constructs (left panels). FFAT-binding mutant EGFP-VAP-A<sup>KM>DD</sup> shows no redistribution upon linker removal (right panels).

(legend continued on next page)



and adopt a similar orientation with respect to the plane of the membrane. Accordingly, VAP-A<sup>FL</sup> sL1/2 exhibited more regular lengths extending from vesicle membranes ( $7.3 \pm 1.5$  nm) compared with WT ( $10 \pm 2$  nm) (Figure 1H). Strikingly, in membrane regions of high protein density forming ribbon-like fragments, VAP-A<sup>FL</sup> sL1/2 showed a highly ordered organization, allowing us to observe sharp dark spots aligned parallel to the membrane (Figure 1G, right). The extramembraneous domains extended to  $11 \pm 1.6$  nm compared with  $17 \pm 2.4$  nm for VAP-A<sup>FL</sup> WT (Figure 1H). Considering that the total length of the structured regions of VAP-A (MSP plus coiled coil) is only 10–11 nm as predicted by AlphaFold, these results indicate that VAP-A<sup>FL</sup> sL1/2 is poorly flexible.

To test whether removing the linkers impacted VAP-A binding to FFAT-containing proteins, we mixed the tethering region of OSBP (N-PH-FFAT) with liposomes containing PI(4)P and with VAP-A<sup>His</sup> WT or mutants and recovered the liposomes and associated proteins by flotation. All VAP-A linker mutants showed the same ability to bind N-PH-FFAT as WT (Figure S1C). Moreover, an excess of FFAT peptide competed with N-PH-FFAT binding to both VAP-A<sup>His</sup> WT and mutants, indicating that VAP-A linkers do not directly influence MSP-FFAT interaction.

Next, we performed cryo-EM imaging of reconstituted MCSs in which VAP-A<sup>FL</sup> WT or sL1/2 proteoliposomes were mixed with lipid nanotubes doped with 4 mol % PI(4)P and decorated with N-PH-FFAT (Figure S1D). Reminiscent of what we observed with VAP-A<sup>FL</sup> WT,<sup>31</sup> vesicles were flattened along the lipid nanotubes upon contact formation with sL1/2, and we clearly identified protein densities between the apposed membranes, indicating the formation of tethers. Then, we measured PI(4)P transfer by OSBP from Golgi-like liposomes to proteoliposomes containing either VAP-A<sup>FL</sup> WT or sL1/2. VAP-A<sup>FL</sup> sL1/2 facilitated PI(4)P transfer between membranes at transport rates comparable with that obtained with the WT ( $1.9 \pm 0.2$  versus  $1.7 \pm 0.1$  PI4P/min/OSBP with VAP-A<sup>FL</sup> sL1/2 and WT, respectively; Figure S1E).

We concluded that the two linkers allow VAP-A to adopt a range of conformations but are not involved in the ability of VAP-A to interact with FFAT-containing proteins.

### VAP-A linkers condition its engagement with different MCSs

To assess the role of VAP-A flexible linkers in cells, we first established a VAP-A knockout (KO) RPE1 cell line by CRISPR-Cas9 (Figures S2A and S2B). We reasoned that VAP-A KO cells should help perform rescue experiments by avoiding potential heterodimerization between expressed VAP-A mutants and endogenous proteins. In KO cells, transiently expressed VAP-A WT tagged with the green fluorescent protein EGFP decorated the entire ER network, as expected (Figure 2A). We noticed that EGFP-

VAP-A WT also concentrated slightly in discrete ER subdomains, which may correspond to MCSs with other organelles, including the TGN (Figures 2B and 2C), in agreement with previous observations.<sup>6,32</sup> By contrast, the subcellular localization of EGFP-VAP-A sL1/2 was dramatically shifted to large punctate structures dispersed throughout the cytoplasm (Figures 2A and 2B). These structures overlapped with a mitochondria marker, suggesting massive recruitment of EGFP-VAP-A sL1/2 to ER-Mito MCSs, at the expense of ER-Golgi MCSs (Figure 2C). However, when EGFP-VAP-A sL1/2 was further modified to prevent FFAT-motif binding (KM>DD mutation), it was no longer restricted to the mitochondria vicinity but was found throughout the ER network (Figure 2A). This distribution resembled that of EGFP-VAP-A<sup>KM>DD</sup>, thereby suggesting that EGFP-VAP-A sL1/2 location near mitochondria depends on FFAT-containing interactors. We also verified that the massive shift driven by the sL1/2 mutation was not due to a regulatory defect: VAP-A linkers have putative Ser/Thr phosphorylation sites of unknown function.<sup>33</sup> Nevertheless, their mutation had no effect on EGFP-VAP-A localization (Figure S2C).

We performed subcellular organelle fractionation from VAP-A KO cells stably expressing EGFP-VAP-A WT or sL1/2 to isolate mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs).<sup>34</sup> We then measured the green fluorescence of this fraction compared with that of the lysate (Figure 2D). Although ca. 40% of the signal was recovered in the Mito/MAM fraction of cells expressing EGFP-VAP-A WT, the signal almost doubled when using EGFP-VAP-A sL1/2 expressing cells. Stimulated emission depletion (STED) imaging indicated that VAP-A sL1/2 tagged at its N terminus with a Halo-tag was specifically recruited to regions closely apposed to outer mitochondrial membranes (OMMs) (marked by SNAP-OMP25), whereas Halo-VAP-A WT largely decorated ER tubules (Figures 2E, 2F, and S2D). These experiments confirmed that VAP-A sL1/2 populates ER-Mito MCSs to a very large extent.

Compared with VAP-A sL1/2, the sL1 and sL2 mutants may retain some degree of conformational freedom, which should impact their subcellular distribution. As expected, the EGFP-VAP-A sL1 and sL2 constructs decorated the entire ER but, unlike the WT version, they concentrated in the vicinity of mitochondria and were weakly recruited at ER-Golgi MCS (Figures 2C and S2E). We also observed that EGFP-VAP-A sL1/2 localization at ER-Mito MCS was attenuated when introduced into RPE1 WT cells instead of VAP-A KO cells or co-transfected with mCherry-VAP-A WT (Figures S2F and S2G). These specific contexts presumably promote the formation of heterodimers that are partially flexible.

Taken together, these results suggest that the flexibility of VAP-A provided by its linkers is necessary for its engagement in various MCSs including ER-Golgi MCS.

(B) Cells transfected as in (A) were then stained with Mitotracker red (magenta), fixed, permeabilized, and processed for immunofluorescence to assess the localization of the TGN (anti-TGN46 followed by staining with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies; blue) and imaged by confocal microscopy.

(C) Superplot showing the quantification of EGFP-VAP-A constructs enrichment at the TGN area (ER-Golgi MCS). In total, 80–120 cells were analyzed from 3 to 4 independent experiments. Horizontal bars are mean  $\pm$  SEM.

(D) Fraction of EGFP-VAP-A retrieved in purified mitochondria extract, including MAM, from cell lysate. The scheme describes the mitochondria isolation process from RPE1 VAP-A KO cell lines stably expressing EGFP-VAP-A WT or sL1/2. The graph represents the mean of 3 independent experiments  $\pm$  SEM.

(E) STED microscopy images of RPE-1 cells KO for VAP-A, co-transfected with Halo-VAP-A WT or sL1/2 (green) with the mitochondria marker SNAP-OMP25 (magenta), and labeled with STED-compatible dyes before fixation. The bottom images show the recruitment of Halo-VAP-A sL1/2 around mitochondria.

(F) Fluorescence intensity of the two markers along the dashed lines from the zoomed images in (E). Scale bars, 10  $\mu$ m; 2  $\mu$ m in zoomed views.

### VAP-A linkers support lipid exchanges driven by OSBP and CERT at ER-Golgi MCS

Several LTPs containing a FFAT motif, such as the cholesterol/PI(4)P exchanger OSBP and the ceramide-transfer protein (CERT), are recruited by VAPs at ER-Golgi MCS.<sup>25,35</sup> These LTPs encompass a PH domain specific for PI(4)P, helping them to target the TGN.<sup>36,37</sup> As a result, their lipid transfer activities are tightly coupled to PI(4)P turnover.<sup>7,38</sup> Evidence suggests that these VAP-dependent lipid fluxes support TGN membrane remodeling and maintain TGN-to-plasma membrane (PM) vesicular traffic.<sup>4,39</sup> To test whether VAP-A linkers are required for functional tethering at ER-Golgi MCS, we first assessed the subcellular localization of endogenous OSBP in WT versus VAP-A KO cells and in VAP-A KO cells stably expressing either EGFP-VAP-A WT or sL1/2 (Figure 3A). OSBP was found predominantly cytosolic in WT cells, as expected, due to its PI(4)P exchange activity, which facilitates PI(4)P hydrolysis by Sac1 at the ER and thus weakens its attachment to the TGN.<sup>6</sup> Knocking-out VAP-A largely shifted OSBP from the cytosol to the TGN, suggesting a higher PI(4)P level at the TGN resulting from decreased OSBP activity (Figures 3A and 3B). Consistently, this effect could be mimicked by a 30-min treatment with 50 nM Schweinfurthin G (SWG), a recently described OSBP inhibitor (Figures 3B and S3A).<sup>40</sup> In this case, OSBP recruitment to the TGN was even stronger than in VAP-A KO cells, which presumably retain partial OSBP activity due to the presence of VAP-B (Figure S2A). In rescue experiments, the cytosolic localization of OSBP was completely restored upon EGFP-VAP-A WT expression, but not with the sL1/2 construct (Figures 3A and 3B), suggesting that this mutant does not facilitate OSBP-catalyzed lipid exchange.

OSBP contributes significantly to intracellular cholesterol transport by consuming massive amounts of PI(4)P.<sup>7</sup> We tested whether both PI(4)P turnover and cholesterol distribution were affected when replacing VAP-A WT with sL1/2. We observed that the PI(4)P probe iRFP-P4M was strongly recruited to the TGN when transfected into cells deficient for VAP-A expression (Figures 3C and 3D), indicating a much larger PI(4)P pool compared with WT cells, in agreement with previous reports.<sup>18,41</sup> The P4M signal at the TGN decreased sharply when cells were rescued with EGFP-VAP-A WT, but not with sL1/2. To assess cholesterol distribution, we used UV-sensitive microscopy to image cells labeled with the fluorescent analog of cholesterol, cholestatrienol (CTL). CTL was abundant in perinuclear regions positive for the TGN marker  $\beta$ GalT1 in VAP-A WT cells; however, no significant CTL enrichment at the TGN could be detected in VAP-A KO cells or when rescued by EGFP-VAP-A sL1/2 (Figures 3E and 3F). As an alternative method, we used the probe D4H,<sup>42</sup> which binds PM when cholesterol concentration exceeds 20 mol % of PM lipids. We previously reported that treating cells with SWG triggered D4H movement from PM to endo-lysosomes, indicating that cholesterol levels dropped at PM upon OSBP inhibition.<sup>40</sup> We observed a similar decrease in D4H-mCherry staining of the PM in VAP-A KO cells compared with WT cells (Figures S3B and S3C). This effect could not be rescued by EGFP-VAP-A sL1/2 expression. Thus, the linkers have a critical role in VAP-A function as a receptor of OSBP at ER-Golgi MCSs. To further test OSBP/VAP-A interaction, we monitored VAP-A KO cells co-expressing OSBP-mCherry and EGFP-

VAP-A WT or sL1/2 by live cell imaging upon SWG treatment (Figures S3D and S3E). In response to PI(4)P buildup at the TGN triggered by SWG, OSBP-mCherry and EGFP-VAP-A WT concentrated rapidly to ER-Golgi MCS,<sup>40</sup> whereas no translocation of EGFP-VAP-A sL1/2 was observed, thereby indicating the lack of VAP-A sL1/2 engagement with OSBP.

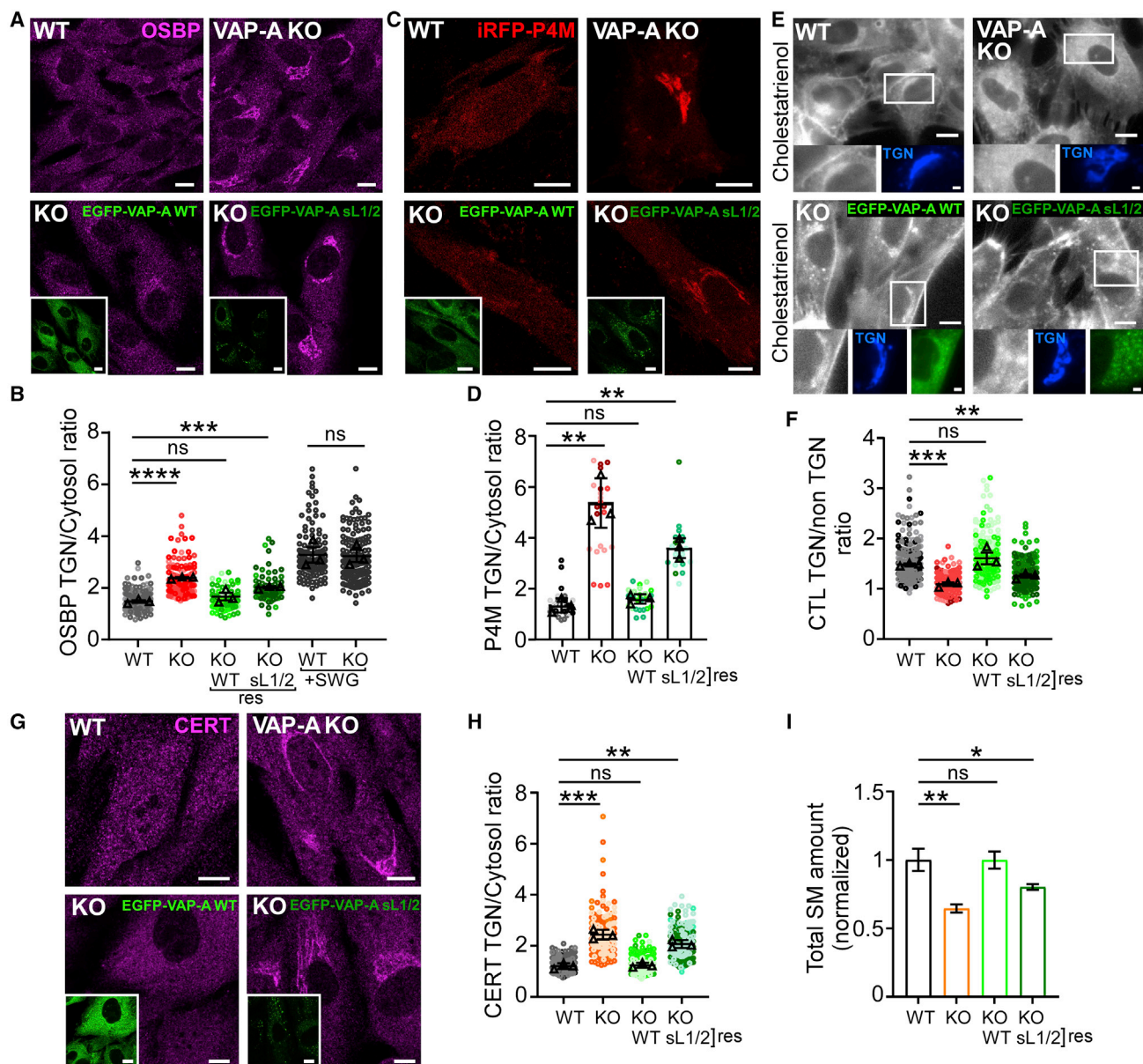
Replacing endogenous VAP-A by EGFP-VAP-A sL1/2 might also impair CERT activity, as this LTP carries similar membrane targeting determinants to OSBP.<sup>35,36</sup> CERT transports newly synthesized ceramide from the ER to the TGN, where ceramide is converted to sphingomyelin (SM).<sup>37</sup> To test the requirement of VAP-A linkers on CERT function, we evaluated its subcellular localization. Reminiscent of OSBP distribution, endogenous CERT showed mainly a cytoplasmic signal (Figure 3G), as previously described.<sup>43</sup> By contrast, CERT showed strong perinuclear accumulation in the absence of VAP-A, which could be rescued by EGFP-VAP-A WT but not by sL1/2 expression (Figures 3G and 3H). Interestingly, CERT relocation coincided with a significant decrease in SM amounts, as determined by mass spectrometry analyses (Figure 3I), suggesting that CERT was mostly bound to the TGN membrane experiencing PI(4)P buildup but less engaged in functional ER-Golgi MCS.

Together, these data indicate a key role for VAP-A flexible linkers in the functional engagement of VAP-A with OSBP and CERT at ER-Golgi MCSs.

### Loss of VAP-A disrupts mitochondria morphology and fusion capacity

Since VAP-A sL1/2 shows a preference for ER-Mito MCSs, we sought to examine the role of VAP-A in these MCSs. Evidence indicates that VAP-A and VAP-B interact at ER-Mito MCSs with several LTPs, including the OMM-anchored protein PTPIP51,<sup>27,44</sup> which transfers the lipid phosphatidic acid (PA) between membranes,<sup>26</sup> and the channel-like proteins VPS13A and D.<sup>45,46</sup> VPS13A binds and transfers several phospholipids including PA.<sup>47</sup> Considering that supplying PA to mitochondria supports the synthesis of CL, a key lipid of mitochondria,<sup>48</sup> we reasoned that VAP-A might contribute to mitochondrial morphology and dynamics. To test this hypothesis, we transfected WT or VAP-A KO cells with a general ER marker (Sec61 $\beta$ -Halo) along with the OMM protein SNAP-OMP25 and performed staining with STED-compatible membrane-permeable dyes. Super-resolution imaging of WT cells showed long tubular mitochondria extending throughout the cytoplasm and making multiple contacts with the ER (Figure 4A). By contrast, mitochondria in VAP-A KO cells were mostly fragmented and showed enlarged spherical shapes. However, ER contacts with round mitochondria could be detected, indicating that VAP-A is not mandatory for the formation of ER-Mito MCS.

Changes in mitochondrial shape not only often result from unbalanced organelle fusion and fission events<sup>49</sup> but also occur during mitophagy. To test these possibilities, we first assessed the distribution of the autophagic marker LC3, which is either cytosolic in the absence of autophagy or is recruited to form autophagosomes. By expressing and imaging EGFP-LC3 in WT and VAP-A KO cells, we observed a similar and mostly diffuse distribution of EGFP-LC3 (Figure S4A), distinct from that obtained upon CCCP-induced mitophagy, thereby excluding that the lack of VAP-A is associated to mitophagy. Next, we used

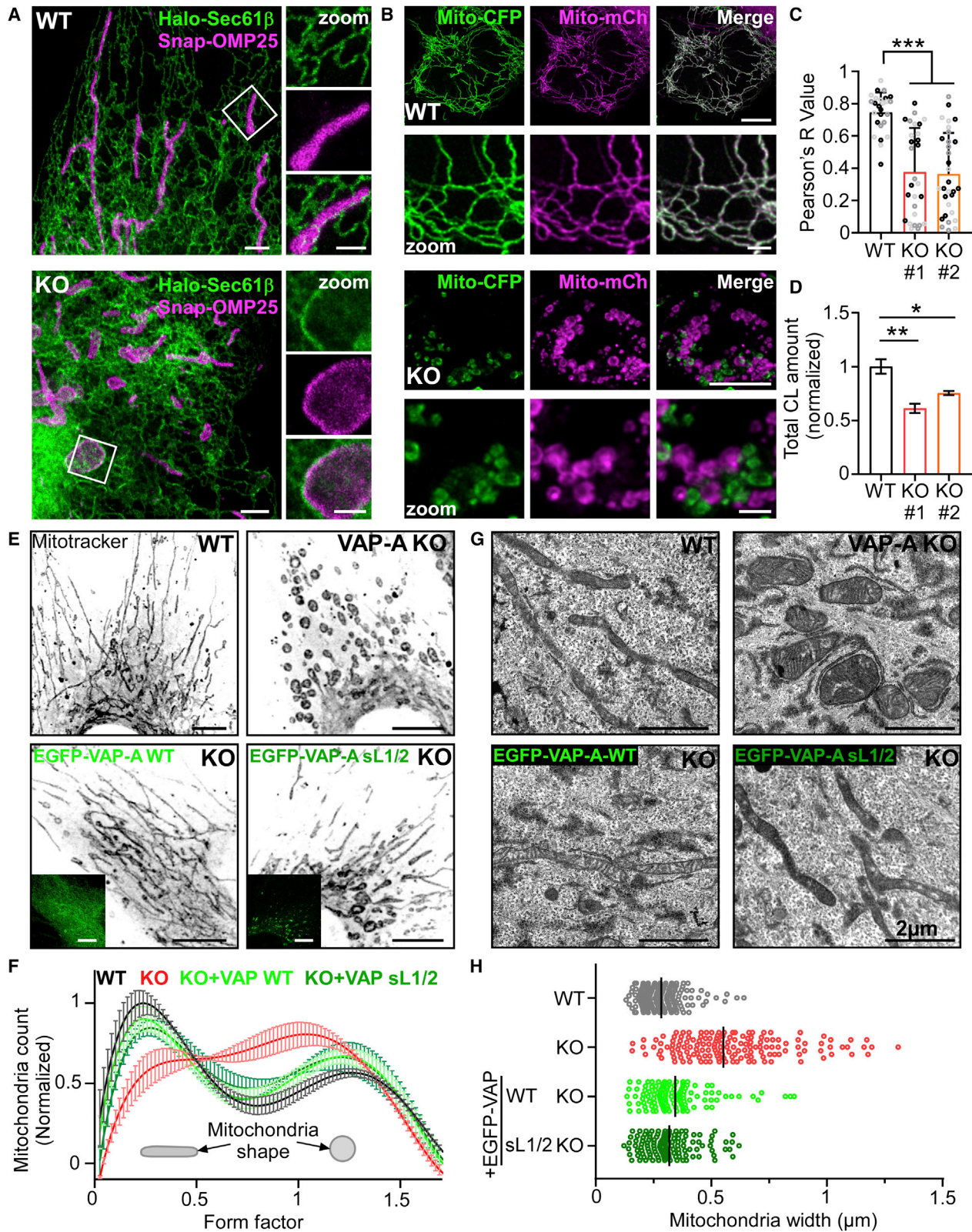


**Figure 3. VAP-A sL1/2 does not promote OSBP and CERT-mediate lipid transport**

(A) Confocal images of endogenous OSBP visualized by immunofluorescence staining in RPE1 cells WT or KO for VAP-A. When indicated, VAP-A KO cells were stably expressing EGFP-VAP-A WT or sL1/2. OSBP is strongly recruited to the perinuclear region in KO cells or when rescued with EGFP-VAP-A sL1/2. (B) Superplot quantifying OSBP recruitment to the TGN (res: rescue). Horizontal lines are means  $\pm$  SEM from 3 independent experiments ( $\sim$ 150 cells analyzed). (C) Confocal images of the PI(4)P probe iRFP-P4M transiently transfected in cells from the same conditions as in (A). (D) Quantification of iRFP-P4M recruitment at the perinuclear region ( $\sim$ 30 cells analyzed from 3 independent experiments). Lines are means  $\pm$  SEM. (E) Widefield images of cells as in (A), transfected with TagBFP- $\beta$ GalT1, and pulse-chased with cholestatrienol (CTL). Note the weak CTL labeling of the TGN in VAP-A KO cells, or rescued with VAP-A sL1/2. (F) Superplot showing CTL accumulation at the TGN ( $n = 200$ – $300$  cells analyzed, with mean of 3 independent experiments  $\pm$  SEM). (G) Same as in (A), except that endogenous CERT is visualized. (H) Superplot showing CERT recruitment at the perinuclear area. Data are the mean of 3 independent experiments  $\pm$  SEM (200–220 cells analyzed per condition). (I) Quantification of total SM amount by LC-MS/MS from RPE1 cells WT, KO, or rescued with VAP-A WT or sL1/2. Peak areas were normalized to the control condition. Data are the mean of 4 independent experiments  $\pm$  SEM. Scale bars, 10  $\mu$ m; 2  $\mu$ m in zoomed views.

live-cell confocal microscopy to determine whether spherical mitochondria in VAP-A KO cells resulted from aberrant mitochondrial membrane dynamics. In WT cells, we observed

frequent events of fusion and fission of mitochondria (Figure S4B). By contrast, although fission occurred, no mitochondrial fusion events could be detected in VAP-A KO cells during



(legend on next page)

the time course of the experiment (Figure S4B; Video S1). To quantify mitochondrial fusion activity, we used polyethylene glycol (PEG) to generate hybrids between cells differentially transfected with either mitochondria-targeted CFP (Mito-CFP) or mCherry (Mito-mCherry). When WT cells were examined 16 h after PEG treatment, all cell hybrids showed co-localization of fluorescence signals, indicating mitochondrial fusion (Figure 4B). By contrast, a significant fraction of VAP-A KO cell hybrids contained two populations of single-color mitochondria (Figures 4B, bottom, and 4C). Thus, cells lacking VAP-A showed reduced ability to drive mitochondrial fusion.

Because PA and CL have important roles in mitochondrial fusion, we suspected that altered fusion in VAP-A KO cells might correlate with aberrant lipid transfer and metabolism. We quantified total CL amounts in WT and in two independent VAP-A KO RPE1 cell lines by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Compared with WT cells, CL levels decreased massively, by 43% and 25%, depending on the VAP-A-deficient cell line (Figure 4D). PA could not be detected by lipidomic analysis, most likely due to its highly transient nature in RPE1 cells.

These experiments indicate that VAP-A contributes to the regulation of mitochondrial fusion and morphology and suggest a role of VAP-A in controlling LTP-dependent PA transfer at ER-Mito MCS, which eventually leads to CL synthesis.

#### IDRs of VAP-A are not required for its function at ER-Mito MCS

Next, we investigated whether VAP-A sL1/2 was functional at ER-Mito MCS. Given that mitochondria shape was clearly different between WT and VAP-A KO cells (i.e., branched tubules versus spheres, Figure 4A), we measured these changes using geometric parameters for precise rescue analysis. We stained mitochondria with a red fluorescent marker and performed confocal imaging of WT, VAP-A KO, and VAP-A KO cell lines stably expressing either EGFP-VAP-A WT or sL1/2 (Figure 4E). As aforementioned, compared with WT cells, mitochondria were predominantly spherical in VAP-A KO cells. Strikingly, both EGFP-VAP-A WT and sL1/2 reversed this phenotype by restoring the population of mitochondria with an elongated and branched shape at the expense of the spherical population (Figure 4F). Electron microscopy analysis confirmed these findings (Figures 4G and 4H). We also compared the impact of VAP-A KO and rescues with either EGFP-VAP-A WT or sL1/2 on the levels of various CL species by lipidomics analysis. The most sig-

nificant decreases upon VAP-A KO concerned CL species with a fatty acid composition of low molecular weights (Figure S4C). Their levels were substantially rescued with either VAP-A WT or sL1/2 expression.

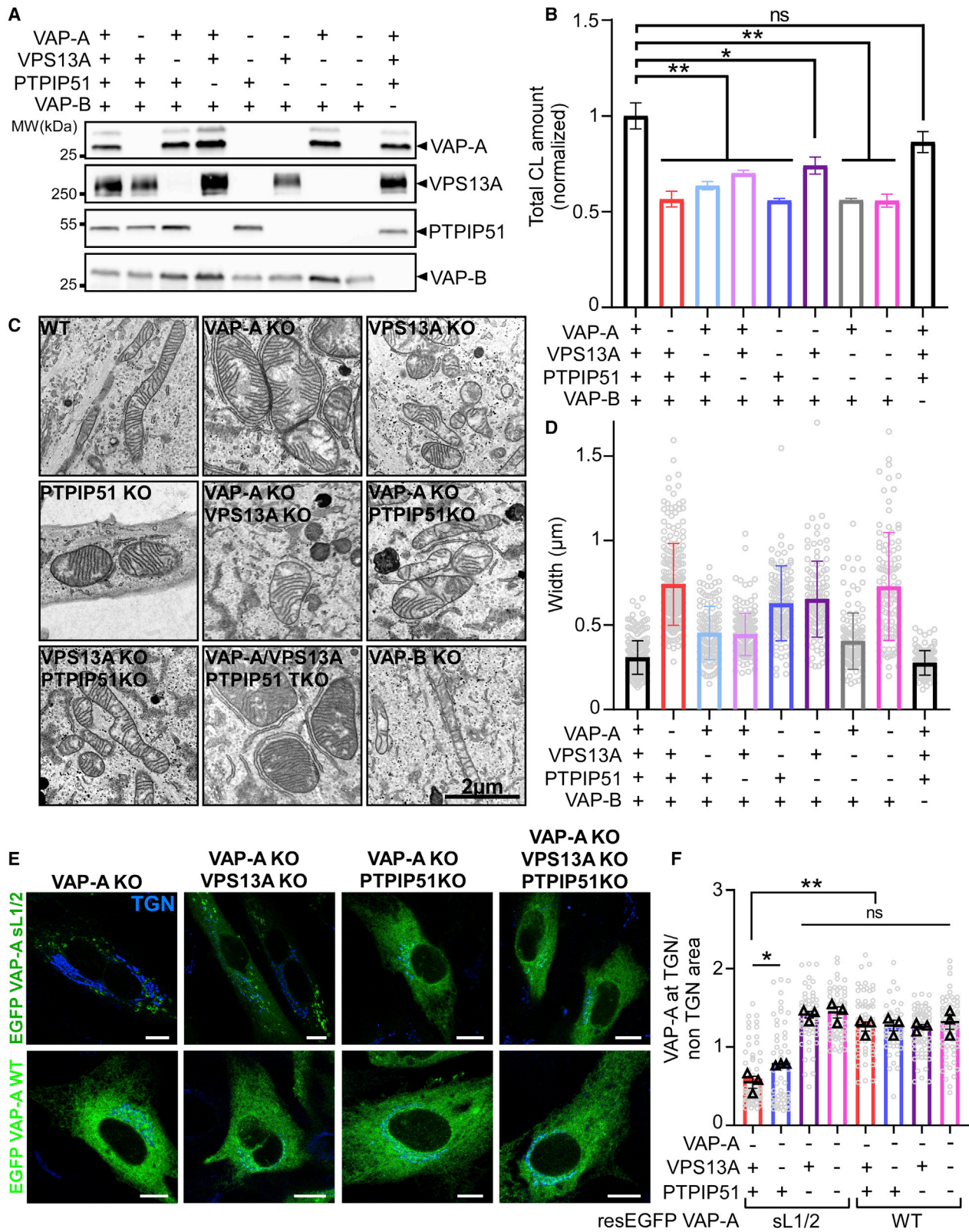
#### VAP-A interactors VPS13A and PTPIP51 maintain mitochondrial CL levels and morphology

We suspected that VPS13A and PTPIP51, which enable PA transfer between membranes, may contribute to the VAP-A-dependent phenotype. We used CRISPR-Cas9-mediated gene KO to abolish cellular expression of VAP-A, VPS13A, and PTPIP51 individually or in combination (Figures 5A, S5A, S5B) and measured CL amounts in the corresponding cell lines. In good agreement with a previous study showing a reduced CL level in cells silenced for PTPIP51,<sup>26</sup> we observed that not only PTPIP51 KO, but also VPS13A KO, resulted in a decline of CL (by 30% and 36%, respectively; Figure 5B). Of note, VPS13A/PTPIP51 double KO (DKO) produced a stronger effect, reminiscent of that obtained upon VAP-A KO (i.e., a decrease in CL of ~45%), whereas no further drop in CL levels was measured in VAP-A/VPS13A/PTPIP51 triple KO (TKO) cells. VPS13A and PTPIP51 might thus form two pathways that converge on VAP-A. We next analyzed the mitochondria morphology in these different KO cell lines by electron microscopy. As expected, mitochondria showed inflated spherical shapes in cells knocked out for VAP-A alone or in combination with VPS13A and/or PTPIP51 (Figures 5C and 5D). However, a milder phenotype was observed in VPS13A KO and PTPIP51 KO cells. In addition, since VAP-A and VAP-B have similar abundance in RPE1 cells (Figure S5C), we also established a cell line KO for VAP-B (Figures 5A and S5A). In contrast to what we observed with VAP-A KO, we found no significant change in CL levels in VAP-B KO cells and no alteration in the shape of mitochondria. Overall, our results indicate that the impact of VAP-A on CL levels and on mitochondria morphology is largely mediated by the FFAT-containing LTPs VPS13A and PTPIP51.

To test whether VPS13A and PTPIP51 account for the localization of VAP-A sL1/2 at ER-Mito MCSs (Figure 2B), we monitored EGFP-VAP-A sL1/2 distribution in VAP-A KO cells lacking VPS13A and/or PTPIP51 expression. As shown in Figure 5E, the sL1/2 construct was no longer restricted to the vicinity of mitochondria in VAP-A/VPS13A DKO, VAP-A/PTPIP51 DKO, and VAP-A/VPS13A/PTPIP51 TKO cells. The effect was more striking in the last two conditions where EGFP-VAP-A sL1/2 re-located all over the ER, reminiscent of EGFP-VAP-A WT

#### Figure 4. VAP-A plays a key role in mitochondrial morphology and fusion, regardless of its flexibility

- (A) Representative STED images of WT or VAP-A KO cells expressing Halo-Sec61 $\beta$  (ER marker, green) and SNAP-OMP25 (magenta). Right, magnification of contact regions between the ER and mitochondria.
- (B) PEG fusion assay of cells expressing mitochondrial markers in fusion with CFP or mCherry. WT RPE1 hybrid cells show extensive mitochondrial fusion (upper panels), whereas VAP-A KO hybrids contain mainly unfused round mitochondria (lower panels).
- (C) Pearson's coefficient colocalization measurements between Mito-CFP and Mito-mCherry. Data are the mean of 3 independent experiments  $\pm$  SEM (n = ~30 fusion events analyzed).
- (D) Quantification of total CL by LC-MS/MS of RPE1 cells WT or KO for VAP-A. Peak areas were normalized to the control condition (data are the mean of 4 independent experiments  $\pm$  SEM).
- (E) Confocal images of WT, VAP-A KO, or VAP-A KO cells stably expressing EGFP-VAP-A WT or sL1/2, stained with Mitotracker red.
- (F) Automated quantification of mitochondrial morphology (form factor) distribution. n = ~9,000 mitochondria analyzed. Data are means  $\pm$  SD.
- (G) Thin-section EM of cells from the same conditions as in (E). VAP-A WT or sL1/2 expression rescued the mitochondrial morphology defects observed in VAP-A KO cells.
- (H) Measurement of mitochondrial width from EM images. One point corresponds to one mitochondrion. Scale bars, 10  $\mu$ m; 2  $\mu$ m in zoomed views.



(legend on next page)

distribution (Figure 5F). Thus, VPS13A and PTPIP51 are key partners of VAP-A at ER-Mito MCSs and the primary interactors of VAP-A sL1/2.

### VAP-A flexibility enables versatile organelle tethering

We hypothesized that VAP-A sL1/2 preference for ER-Mito MCSs was due to its lower flexibility compared with WT. However, given that VAP-A sL1/2 is also shorter than the WT by up to ~6 nm according to cryo-EM image analysis (Figures 1F–1H), this effect might also result from its limited span. To test this possibility, we designed a rigid but longer VAP-A construct, with a size matching that of the WT. The VAP-A coiled-coil region (res. 165–206), which comprises 6 heptads and should extend over a distance of 5.9 nm (considering a translation of 1.4 Å/residue in a coiled coil), was replaced by a longer artificial coiled coil (ACC) of 12 heptads (i.e., forming a rigid rod of ~11.8 nm) in the VAP-A sL1/2 construct (Figures 6A and S6A). We then compared the subcellular distribution of VAP-A ACC with that of the WT and sL1/2 constructs. Strikingly, transiently expressed EGFP-VAP-A ACC in VAP-A KO cells strongly concentrated to ER sub-regions that overlapped with a mitochondria marker (Figure 6B), similar to EGFP-VAP-A sL1/2. We next analyzed the subcellular localization of endogenous OSBP in VAP-A KO cells upon rescue with the different VAP-A constructs, as in Figures 3A and 3B. As observed with EGFP-VAP-A sL1/2, the expression of EGFP-VAP-A ACC could not reverse OSBP accumulation at the TGN in VAP-A KO cells (Figures 6C and 6D), indicating that these VAP-A mutants have limited function at ER-Golgi MCSs.

We reasoned that if the linkers of VAP-A enable its function at multiple MCSs owing to their flexibility, their replacement by unrelated IDR sequences of the same length, or by a longer flexible sequence, should have little impact on VAP-A localization and function. We designed two different VAP-A mutants in which we replaced the original linkers either by sequences that are inverted with respect to the WT (VAP-A iL1/2), or by Gly/Ser-rich sequences of the same length (VAP-A uL1/2) (Figure S6A). We also exploited the sequence of a natural isoform of VAP-A, produced by alternative splicing (VAP-A Long), which harbors 45 additional residues in the first linker. The inserted sequence is predicted to be unstructured (Figures S6A and S6B), thus forming an extra-long flexible linker 1. As shown in Figures 6B and S6C, EGFP-VAP-A iL1/2, uL1/2 as well as EGFP-VAP-A Long were found throughout the ER network when expressed in VAP-A KO cells, resembling the distribution of EGFP-VAP-A WT. In addition, all flexible constructs restored the cytosolic localization of OSBP in VAP-A KO cells, suggesting VAP-A function rescue at ER-Golgi MCSs (Figures 6C and 6D).

These experiments demonstrate that the unstructured and flexible nature of VAP-A IDRs, rather than their exact sequence, are key parameters to enable versatile organelle tethering by VAP-A.

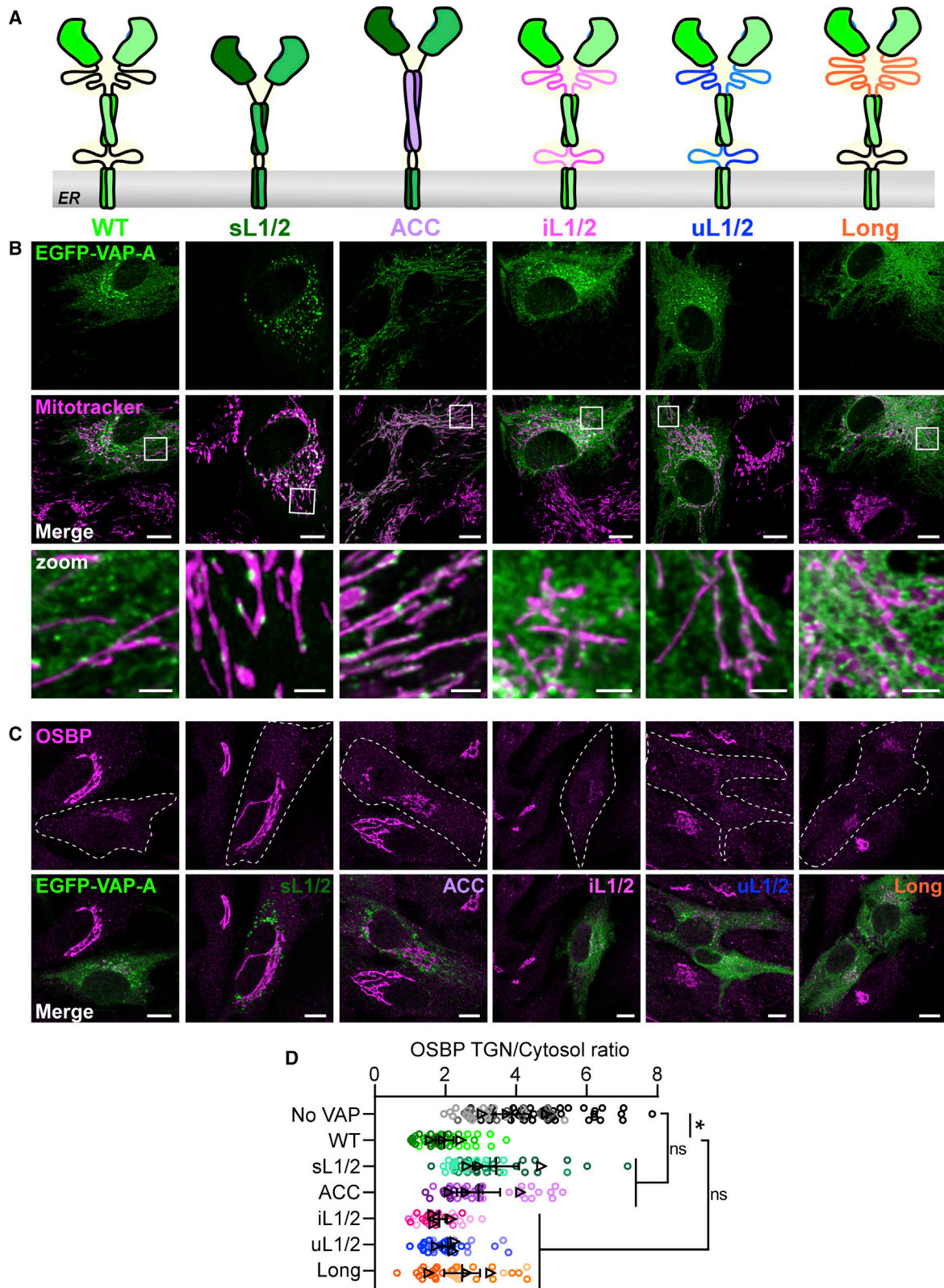
### Flexible linkers enable VAP-A to adapt its function to short lived-MCS

Owing to its flexibility, VAP-A could accommodate partners of different sizes and/or structures, whereas a more rigid tether would have a limited interaction range. Alternatively, VAP-A might promote membrane tethering at many MCSs, whereas a rigid form might be selective to long-lived MCS, regardless of the exact interactor nature. To test these hypotheses, we first considered reducing the dynamics of ER-Golgi MCSs, which are transient in nature. This can be achieved by overexpressing the PH-FFAT fragment of OSBP, which by interacting with VAP-A produces membrane bridges that persist over time.<sup>6,39</sup> As depicted in Figure 7A, EGFP-VAP-A WT concentrated at the perinuclear area upon PH-FFAT-mCherry expression. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) indicated that PH-FFAT and VAP-A exchanged very slowly from these regions, which is consistent with stable membrane tethering at ER-Golgi MCSs (Figures 7B and S7A). Strikingly, PH-FFAT-mCherry also induced robust relocation of EGFP-VAP-A sL1/2, which no longer decorated ER-Mito MCS (Figure 7A). As a control, we introduced a point mutation in PH-FFAT-mCherry (R108L) that strongly reduces its affinity for PI(4)P but does not abrogate Golgi targeting.<sup>6,50</sup> As expected, PH-FFAT-mCherry R108L recovery was much faster (~3-fold) than the corresponding WT construct by FRAP (Figure 7B), indicating that ER-Golgi MCSs were poorly stabilized in this case. Although EGFP-VAP-A WT was efficiently relocated to the perinuclear region by PH-FFAT-mCherry R108L, EGFP-VAP-A sL1/2 was not and, instead, was distributed predominantly at ER-Mito MCSs (Figures 7A and 7C).

To further demonstrate that the lack of flexible linkers restricts the ability of VAP-A to adapt to different MCSs rather than different partners, we sought to attach a Golgi-specific VAP-A interactor to mitochondria in cells lacking the mitochondria-specific VAP-A interactors VPS13A and PTPIP51. For this, we designed a mCherry-tagged OSBP construct in which its N-terminal segment comprising the PH domain (OSBP res. 1–178) was replaced by the TM domain of PTPIP51 (res. 1–43) (Figure 7D). Confocal imaging confirmed that the OSBP chimera (Mito-OSBP-mCherry) relocated to mitochondria in VAP-A/VPS13A/PTPIP51 TKO cells (Figure 7E). Thereafter, EGFP-VAP-A sL1/2 subcellular distribution was assessed. Strikingly, it was no longer distributed throughout the ER but concentrated near mitochondria in the presence of Mito-OSBP-mCherry, as measured by the strong

### Figure 5. Mitochondrial shape and CL levels are affected in cells lacking VAP-A interactors VPS13A and PTPIP51

- (A) Western-blot analysis of different CRISPR-Cas9 KO RPE1 cell lines.  
 (B) Quantification of total CL amount by LC-MS/MS of each KO cell line. Peak areas were normalized to the control condition. Data are the mean of 4 independent experiments ± SEM.  
 (C) Thin-section EM of the different KO cell lines emphasizing mitochondrial morphology. VPS13A and/or PTPIP51 KO cells display round and inflated mitochondria. VAP-B KO cells display elongated mitochondria resembling that of WT cells.  
 (D) Graph showing mitochondrial width, measured for each condition. One point corresponds to one mitochondrion. Data are means ± SD.  
 (E) Confocal images of cells KO for the indicated proteins and transiently transfected with EGFP-VAP-A sL1/2 or WT. The absence of VPS13A and especially PTPIP51 results in the redistribution of EGFP-VAP-A sL1/2.  
 (F) Quantification of EGFP-VAP-A enrichment at the TGN region. Data are the mean of 3 independent experiments ± SEM (n = ~60 cells analyzed). Scale bars, 10 μm; 2 μm in zoomed views.



(legend on next page)



increase in Pearson's coefficient between EGFP-VAP-A sL1/2 and the OMM marker TOM20 (Figures 7E–7G, S7B, and S7C).

Taken together, the two experimental strategies shown in Figure 7 indicate that rigid VAP-A sL1/2 preferentially concentrates in MCS with greater stability, whereas the flexible linkers of VAP-A allow its engagement in highly dynamic MCSs, notably short-lived ER-Golgi MCS.

## DISCUSSION

We identified two linker regions in VAP-A as key elements controlling its tethering activity. These regions appear to be unstructured as judged by their proteolytic sensitivity and their behavior in gel filtration and MD simulations. This is consistent with the fact that VAP-A length is variable according to its membrane density.<sup>31</sup> Remarkably, cryo-EM visualization of a construct with both linker regions replaced by short tracts (VAP-A sL1/2) indicated that it is more rigid than the WT form. Although VAP sL1/2 retains its intrinsic capacity to interact with FFAT-containing proteins, a major observation was its massive relocalization to ER-Mito MCS at the expense of ER-Golgi MCS. As a result, the function of VAP-dependent LTPs OSBP and CERT in Golgi lipid traffic was impaired, whereas VAP-A sL1/2 could recapitulate VAP-A WT function at ER-Mito MCS. These include supporting CL metabolism and mitochondrial fusion capacity through interactions with PTPIP51 and VPS13A.

Many proteins enriched at MCS contain segments predicted to be IDRs<sup>51,52</sup>; however, their roles and impact on protein dynamics remain largely unexplored. When unfolded linker regions are long enough, such as in Ist2, one of their main functions could be to span interorganellar gaps to form a molecular bridge between membranes.<sup>53,54</sup> Alternatively, short linkers may restrict the action range of catalytic domains. Such a mechanism prevents Sac1 from hydrolyzing PI(4)P in *trans* at MCS.<sup>55</sup> We recently showed that the long N-terminal IDR of OSBP decreases protein density at MCS and facilitates protein lateral movements.<sup>8</sup> With the example of VAP-A, this study reveals a key role for IDRs at MCS: to enable membrane tethering at several MCSs showing different dynamics.

At first sight, one can simply consider that VAP-A sL1/2 accumulates at ER-Mito MCS due to its smaller size compared with VAP-A WT, such as to adapt to its partners' sizes or to a precise intermembrane distance. However, we showed that the longer rigid VAP-A ACC, with a size matching that of WT, also concentrated at ER-Mito MCS and that VAP-A sL1/2 relocated back at ER-Golgi MCS when such MCSs are artificially stabilized. Alternatively, positioning OSBP at the mitochondria surface promoted VAP-A sL1/2 localization at ER-Mito MCS in cells lacking VPS13A and PTPIP51. Thus, a size-mediated segregation mechanism is unlikely to occur. Akin to adhesion molecules mechanics at

cell-cell contacts,<sup>56,57</sup> we propose that VAP-A IDRs behave as molecular springs that ensure their vertical flexibility to provide adaptive tethering at MCS, which would facilitate membrane-membrane adhesion when intermembrane distance fluctuates. The model in Figure 7H shows that owing to its flexible IDRs, VAP-A tethers membranes in any MCS contexts, including ER-Golgi MCSs, which are highly dependent on PI(4)P turnover and thus subjected to fluctuations, whereas VAP-A sL1/2 requires more stable contacts to efficiently interact with partners. Of note, simulations of coarse-grained membrane apposition systems have shown that rigid membrane-anchored receptors and ligands are more prone to dissociation when membrane shape fluctuations increase.<sup>58</sup> Apart from ER-Golgi MCS, other MCSs also show a dependence on phosphoinositide metabolism, which may lead to rapid membrane association and dissociation events. According to their relative stiffness, tethers may be included in or excluded from such MCSs.

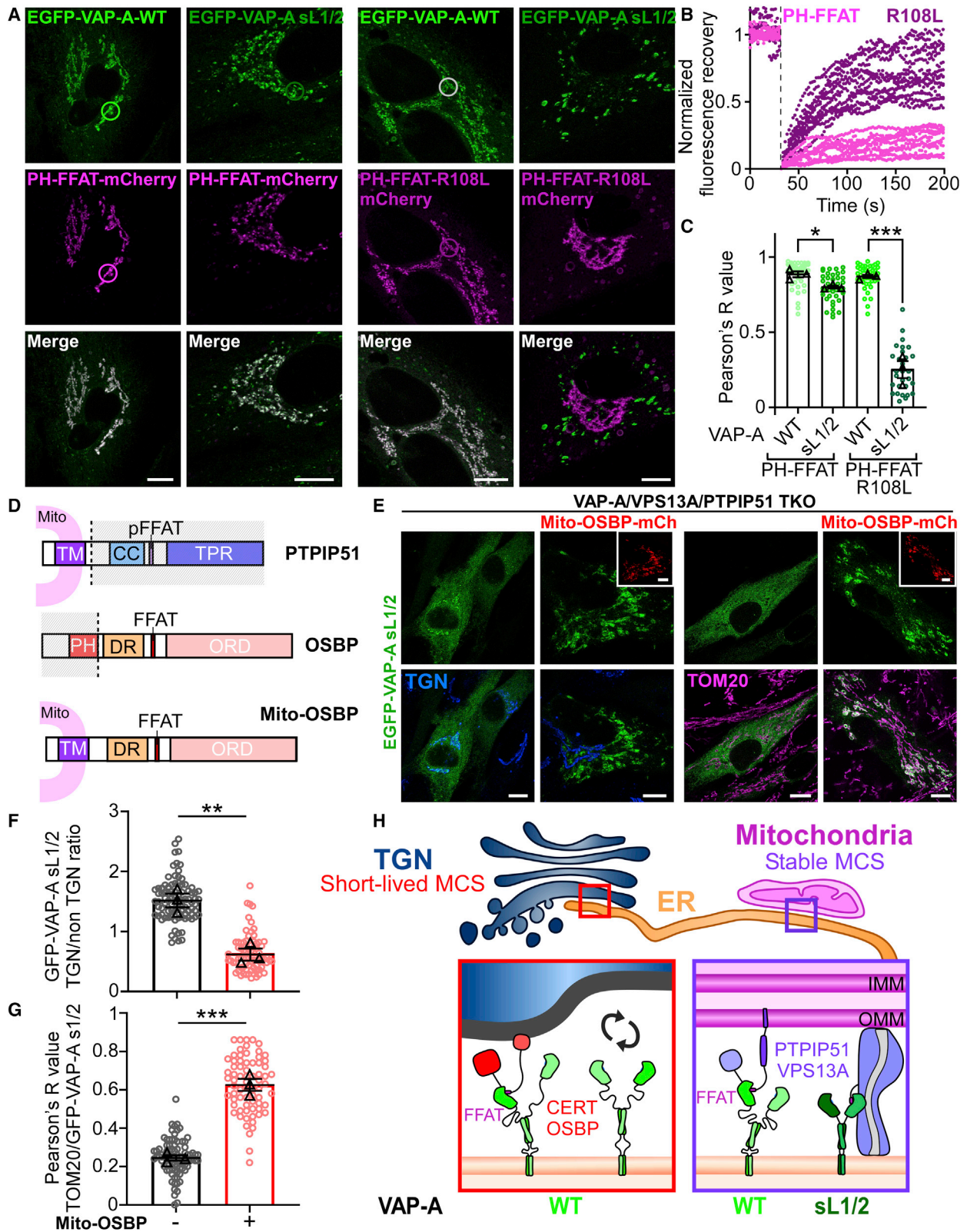
Our work indicates that VAP-A acts as a key player in mitochondrial fusion, suggesting a hitherto unknown physiological role for this general ER receptor. We observed that mitochondria morphological changes in the absence of VAP-A, or of its interactors PTPIP51 and VPS13A, which transfer PA between membranes, correlated with a drastic decrease in mitochondrial CL content. Interestingly, similar mitochondrial shape alterations were also reported in *Drosophila* KO for VPS13D.<sup>59</sup> Following CL synthesis in the IMM, tafazzin-mediated CL remodeling occurs, which results in polyunsaturated species.<sup>60</sup> Our lipidomic analyzes indicated that the CL species that predominantly decreased upon VAP-A KO exhibit low molecular weight and more saturated fatty acyl chains (Figure S4C). This might suggest that neosynthesized species are primarily affected, thereby supporting the role of VAP-A in facilitating the transfer of PA, the precursor of CL, to mitochondria.

CL is directly involved in mitochondrial inner membrane fusion through interactions with OPA1,<sup>61</sup> and at the outer membrane, mitofusin-mediated fusion is stimulated by the enzyme MitoPLD that hydrolyzes CL to generate PA,<sup>62</sup> which has presumably fusogenic properties due to its small polar head. Of note, MitoPLD downregulation also induced a mitochondrial fragmentation phenotype reminiscent of VAP-A KO. Moreover, Mitoguardin (MIGA) proteins stabilize MitoPLD to promote mitochondrial fusion.<sup>63</sup> Interestingly, MIGA2 interacts with VAP through a FFAT motif and thus participates in ER-Mito tethering.<sup>64</sup> These elements taken together place VAP-A as a central factor controlling mitochondria lipid metabolism and membrane dynamics.

Previous studies have mostly examined the role of VAP-B at ER-Mito MCSs, rarely that of VAP-A. However, VAP-A is abundantly present in these MCSs. Surprisingly, our data show divergent implications of VAP-A and VAP-B on CL levels and

### Figure 6. Rigid VAP-A constructs show different MCS preferences than flexible constructs

- (A) Schemes of VAP-A WT, the rigid constructs VAP-A sL1/2 and ACC, the flexible constructs with inverted linkers (VAP-A iL1/2), unrelated linkers (VAP-A uL1/2) and the natural long isoform of VAP-A (VAP-A long).  
 (B) Confocal images of RPE1 VAP-A KO cells transiently transfected with EGFP-tagged VAP-A WT or mutant and stained with Mitotracker red (magenta), showing differential localization according to their flexibility.  
 (C) VAP-A KO cells transfected as in (B) were fixed, permeabilized, and processed for immunofluorescence to assess OSBP distribution.  
 (D) Superplot quantifying OSBP recruitment to the TGN area. Vertical lines are means  $\pm$  SEM from 3 independent experiments ( $\sim$ 30 cells analyzed). Scale bars, 10  $\mu$ m; 2  $\mu$ m in zoomed views.



**Figure 7. VAP-A sL1/2 shows a preference for stable MCSs, regardless of its interactors**

(A) Confocal images of VAP-A KO RPE1 stably expressing EGFP-VAP-A WT or sL1/2, transfected with PH-FFAT-mCherry or PH-FFAT-R108L-mCherry. (B) FRAP analysis of PH-FFAT-mCherry WT or R108L from cells coexpressing EGFP-VAP-A WT. 10 cells were analyzed in 2 independent experiments.

(legend continued on next page)

mitochondrial morphology (Figures 5B–5D), although they have comparable expression levels. Of note, unlike VAP-B, VAP-A KO is embryonic lethal in mice.<sup>65,66</sup> Although the MSP domains of VAP-A and VAP-B are nearly identical, their linkers and predicted coiled coils are substantially different (41.7% sequence identity, compared with 82.2% for MSP) (Figures S7D and S7E). Variations in VAP “stem” region may contribute to interaction/localization preferences. Whether VAP-A has functions that are not shared with VAP-B is an important issue for further studies.

Our work highlights molecular and functional heterogeneities between ER-Golgi and ER-Mito MCSs, which most likely include changes in intermembrane distances fluctuations coupled with the dynamics of their specific components. The thickness of a single MCS type, often observed by EM in resin-embedded samples or by *in situ* cryo-EM, shows very large variations from the molecular point of view (HeLa ER-Golgi MCS: 5–20 nm; yeast ER-Mito MCS:  $16 \pm 7$  nm),<sup>67,68</sup> as they likely represent snapshots of transient states. Determining intermembrane distance fluctuations with high spatio-temporal resolution will be helpful to finely describe MCS structure and dynamics.

### Limitations of the study

At ER-Mito MCS, PA transfer to mitochondria by VAP-A interactors VPS13A and PTP51 was not measured directly, and other VAP-A interactors may also contribute to this transfer. Future work should validate these findings in a setting that enables visualization or measurement of PA at mitochondria. The potential mitochondrial dysfunctions resulting from VAP-A KO besides a fusion defect have not been addressed. As for the specific dynamics of ER-Golgi MCS, it remains to be determined whether VAP-A is adapted to their rapid recycling mirroring PI(4)P turnover or whether it is a matter of the geometry of the fluctuating membrane.

### STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Materials availability
  - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Cell culture

### METHOD DETAILS

- Plasmids
- Cell transfection
- Protein expression and purification
- Analytical gel filtration
- Limited proteolysis
- Liposome preparation
- Full length VAP-A reconstitution into proteoliposomes
- Cryo-EM experiments
- Formation of *in vitro* MCS
- Liposome flotation assay
- *In vitro* lipid transfer assay
- CRISPR/Cas9 knock-out
- Cell staining and imaging
- Mitochondria purification
- Mitophagy assay
- CTL synthesis and imaging
- Widefield time-lapse imaging
- PEG fusion assay
- Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) assay
- Stimulated emission depletion microscopy (STED)
- Transmission electron microscopy (TEM)
- Mass spectrometry
- MD simulations of dimer models

### QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.12.010>.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank F. Brau, N. Leroudier (IPMC, Valbonne), and J. Manzi (Institut Curie, Paris) for technical assistance; Z. Grimanelli, A. Lamy, L. Velut, R. Charreire, V. Lejal, C. Watine, and S. Goffart (Polytech Nice Sophia engineer school) for providing useful tools and scripts; K. Schauer (IGR, Paris) for discussions; F. Bottanelli (FU Berlin), F. Alpy (IGBMC, Illkirch), E. Honoré (IPMC, Valbonne), and J.M. Verbavatz (JIM, Paris) for plasmids, and all members of the Antony and Lévy labs for their insights. We thank the IPMC Imaging and Cytometry facility, part of the MICA platform (GIS IBiSA), and the Cell and Tissue Imaging core facility (PICT IBiSA), Institut Curie, member of the French National Research Infrastructure France-Biolmaging (ANR-10-INBS-04). This work was supported by the CNRS, the Inserm, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE13-0021-01) (to B.M., D.L., and F.R.), the ERC (Synergy #856404) (to B.A.), and the “Investments for the Future” program LABEX SIGNALIFE (ANR-11-LABX-0028-01). M.S. was supported by a PhD fellowship from the Université Côte d’Azur through the IDEX UCAJedi program (ANR-15-IDEX-01), and by the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20 2204015217).

(C) Colocalization test between EGFP-VAP-A WT or sL1/2 and PH-FFAT-mCherry WT or R108L. Data represent means of 3 experiments  $\pm$  SEM (~50 cells analyzed).

(D) Domain organization of PTP51, OSBP, and Mito-OSBP.

(E) Confocal images of RPE1 KO for VAP-A, VPS13A, and PTP51, transiently expressing EGFP-VAP-A sL1/2 and Mito-OSBP-mCherry (red, when indicated), further processed for immunofluorescence to detect either the TGN (anti-TGN46, blue) or mitochondria (anti-TOM20, magenta).

(F) Quantification of EGFP-VAP-A sL1/2 enrichment at the TGN area. Data are the mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments (~90 cells analyzed).

(G) Pearson’s colocalization test between TOM20 and EGFP-VAP-A sL1/2 depending on Mito-OSBP-mCherry expression (mean of 3 independent experiments  $\pm$  SEM; 85 cells analyzed).

(H) Model showing that flexible linkers enable VAP-A to explore a larger conformational space to capture partners and thus adapt its function to various types of MCS including short-lived ER-Golgi MCS, whereas a rigid VAP-A mutant is restricted to stable MCSs.

Scale bars, 10  $\mu$ m; 2  $\mu$ m in zoomed views.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

B.M. and D.L. conceived the study. B.M., M.S., and D.L. designed experiments. M.S. performed experiments. M.D., J.B., and B.M. purified proteins. A.D.C., M.D., and D.L. performed cryo-EM imaging and analysis. S.L.-G. performed EM imaging of cell samples. M.S. and S.A. performed STED imaging. A.R.D.A., L.F., and D.D. performed lipidomics and mass spectrometry measurements. R.G. performed molecular dynamics simulations. F.R. synthesized CTL. B.A. and A.P. provided advice on experimental design. B.M. and M.S. wrote the manuscript. B.M., B.A., and D.L. reviewed and edited the manuscript.

## DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

## INCLUSION AND DIVERSITY

We support inclusive, diverse, and equitable conduct of research.

Received: May 24, 2022

Revised: October 21, 2022

Accepted: December 20, 2022

Published: January 23, 2023

## REFERENCES

- Wu, H., Carvalho, P., and Voeltz, G.K. (2018). Here, there, and everywhere: the importance of ER membrane contact sites. *Science* 361, eaan5835. <https://doi.org/10.1126/science.aan5835>.
- Prinz, W.A., Toulmay, A., and Balla, T. (2020). The functional universe of membrane contact sites. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 7–24. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0180-9>.
- Wong, L.H., Edgar, J.R., Martello, A., Ferguson, B.J., and Eden, E.R. (2021). Exploiting connections for viral replication. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 640456. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640456>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2018.10.002>.
- David, Y., Castro, I.G., and Schuldiner, M. (2021). The fast and the furious: Golgi contact sites. *Contact (Thousand Oaks)* 4, 1–15. <https://doi.org/10.1177/25152564211034424>.
- Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J., Lacas-Gervais, S., Drin, G., and Antonny, B. (2013). A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER–Golgi tether OSBP. *Cell* 155, 830–843. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.056>.
- Mesmin, B., Bigay, J., Polidori, J., Jamecna, D., Lacas-Gervais, S., and Antonny, B. (2017). Sterol transfer, PI4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP. *EMBO J.* 36, 3156–3174. <https://doi.org/10.15252/embj.201796687>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.02.021>.
- Friedman, J.R., Webster, B.M., Mastronarde, D.N., Verhey, K.J., and Voeltz, G.K. (2010). ER sliding dynamics and ER–mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* 190, 363–375. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911024>.
- Guo, Y., Li, D., Zhang, S., Yang, Y., Liu, J.J., Wang, X., Liu, C., Milkie, D.E., Moore, R.P., Tulu, U.S., et al. (2018). Visualizing intracellular organelle and cytoskeletal interactions at nanoscale resolution on millisecond time-scales. *Cell* 175, 1430–1442.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.057>.
- Rowland, A.A., and Voeltz, G.K. (2012). Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 607–625. <https://doi.org/10.1038/nrm3440>.
- Lewis, S.C., Uchiyama, L.F., and Nunnari, J. (2016). ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science* 353, aaf5549. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5549>.
- Abrisch, R.G., Gumbin, S.C., Wisniewski, B.T., Lackner, L.L., and Voeltz, G.K. (2020). Fission and fusion machineries converge at ER contact sites to regulate mitochondrial morphology. *J. Cell Biol.* 219, e201911122. <https://doi.org/10.1083/jcb.201911122>.
- Vance, J.E. (2014). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 595–609. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.11.014>.
- Petrungaro, C., and Kornmann, B. (2019). Lipid exchange at ER-mitochondria contact sites: a puzzle falling into place with quite a few pieces missing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 57, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2018.11.005>.
- Eisenberg-Bord, M., Shai, N., Schuldiner, M., and Bohnert, M. (2016). A tether is a tether is a tether: tethering at membrane contact sites. *Dev. Cell* 39, 395–409. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.10.022>.
- Alli-Balogun, G.O., and Levine, T.P. (2019). Regulation of targeting determinants in interorganelle communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 57, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2018.12.010>.
- Dong, R., Saheki, Y., Swarup, S., Lucast, L., Harper, J.W., and De Camilli, P.D. (2016). Endosome-ER contacts control actin nucleation and retromer function through VAP-dependent regulation of PI4P. *Cell* 166, 408–423. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.037>.
- Raiborg, C., Wenzel, E.M., Pedersen, N.M., Olsvik, H., Schink, K.O., Schultz, S.W., Vietri, M., Nisi, V., Bucci, C., Brech, A., et al. (2015). Repeated ER–endosome contacts promote endosome translocation and neurite outgrowth. *Nature* 520, 234–238. <https://doi.org/10.1038/nature14359>.
- Hua, R., Cheng, D., Coyaud, É., Freeman, S., Di Pietro, E.D., Wang, Y., Vissa, A., Yip, C.M., Fair, G.D., Braverman, N., et al. (2017). VAPs and ACBD5 tether peroxisomes to the ER for peroxisome maintenance and lipid homeostasis. *J. Cell Biol.* 216, 367–377. <https://doi.org/10.1083/jcb.201608128>.
- Wijdeven, R.H., Janssen, H., Nahidiazar, L., Janssen, L., Jalink, K., Berlin, I., and Neefjes, J. (2016). Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway. *Nat. Commun.* 7, 11808. <https://doi.org/10.1038/ncomms11808>.
- Dudás, E.F., Huynen, M.A., Lesk, A.M., and Pastore, A. (2021). Invisible leashes: the tethering VAP proteins from infectious diseases to neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 296, 100421. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100421>.
- 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. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg201>.
- Di Mattia, T.D., Martinet, A., Ikhlef, S., McEwen, A.G., Nominé, Y., Wendling, C., Poussin-Courmontagne, P., Voilquin, L., Eberling, P., Ruffenach, F., et al. (2020). FFAT motif phosphorylation controls formation and lipid transfer function of inter-organelle contacts. *EMBO J.* 39, e104369. <https://doi.org/10.15252/embj.2019104369>.
- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201191200>.
- Yeo, H.K., Park, T.H., Kim, H.Y., Jang, H., Lee, J., Hwang, G.S., Ryu, S.E., Park, S.H., Song, H.K., Ban, H.S., et al. (2021). Phospholipid transfer function of PTPIP51 at mitochondria-associated ER membranes. *EMBO Rep.* 22, e51323. <https://doi.org/10.15252/embr.202051323>.
- Stoica, R., De Vos, K.J.D., Paillusson, S., Mueller, S., Sancho, R.M., Lau, K.-F., Vizcay-Barrena, G., Lin, W.-L., Xu, Y.-F., Lewis, J., et al. (2014). ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB–PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat. Commun.* 5, 3996. <https://doi.org/10.1038/ncomms4996>.

28. Peretti, D., Dahan, N., Shimoni, E., Hirschberg, K., and Lev, S. (2008). Coordinated lipid transfer between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex requires the VAP proteins and is essential for Golgi-8mediated transport. *Mol. Biol. Cell* *19*, 3871–3884. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-05-0498>.
29. Kaiser, S.E., Brickner, J.H., Reilein, A.R., Fenn, T.D., Walter, P., and Brunger, A.T. (2005). Structural basis of FFAT motif-mediated ER targeting. *Structure* *13*, 1035–1045. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.04.010>.
30. Furuita, K., Jee, J., Fukada, H., Mishima, M., and Kojima, C. (2010). Electrostatic interaction between oxysterol-binding protein and VAMP-associated protein A revealed by NMR and mutagenesis studies. *J. Biol. Chem.* *285*, 12961–12970. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082602>.
31. de la Mora, E., Dezi, M., Di Cicco, A.D., Bigay, J., Gautier, R., Manzi, J., Polidori, J., Castaño-Diez, D., Mesmin, B., Antonny, B., et al. (2021). Nanoscale architecture of a VAP-A-OSBP tethering complex at membrane contact sites. *Nat. Commun.* *12*, 3459. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23799-1>.
32. 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. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.03.052>.
33. Cockcroft, S., and Lev, S. (2020). Mammalian PITPs at the Golgi and ER-Golgi membrane contact sites. *Contact* *3*. <https://doi.org/10.1177/2515256420964170>.
34. Wieckowski, M.R., Giorgi, C., Lebedzinska, M., Duszynski, J., and Pinton, P. (2009). Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat. Protoc.* *4*, 1582–1590. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.151>.
35. 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605032200>.
36. 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. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00779-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00779-0).
37. Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., and Nishijima, M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* *426*, 803–809. <https://doi.org/10.1038/nature02188>.
38. Capasso, S., Sticco, L., Rizzo, R., Pirozzi, M., Russo, D., Dathan, N.A., Campelo, F., van Galen, J., Hölttä-Vuori, M., Turacchio, G., et al. (2017). Sphingolipid metabolic flow controls phosphoinositide turnover at the trans-Golgi network. *EMBO J.* *36*, 1736–1754. <https://doi.org/10.15252/embj.201696048>.
39. Wakana, Y., Kotake, R., Oyama, N., Murate, M., Kobayashi, T., Arasaki, K., Inoue, H., and Tagaya, M. (2015). CARTS biogenesis requires VAP–lipid transfer protein complexes functioning at the endoplasmic reticulum–Golgi interface. *Mol. Biol. Cell* *26*, 4686–4699. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-08-0599>.
40. Péresse, T., Kovacs, D., Subra, M., Bigay, J., Tsai, M.-C., Polidori, J., Gautier, R., Desrat, S., Fleuriot, L., Debayle, D., et al. (2020). Molecular and cellular dissection of the oxysterol-binding protein cycle through a fluorescent inhibitor. *J. Biol. Chem.* *295*, 4277–4288. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012012>.
41. Venditti, R., Masone, M.C., Rega, L.R., Di Tullio, G.D., Santoro, M., Polishchuk, E., Serrano, I.C., Olkkonen, V.M., Harada, A., Medina, D.L., et al. (2019). The activity of Sac1 across ER–TGN contact sites requires the four-phosphate-adaptor-protein-1. *J. Cell Biol.* *218*, 783–797. <https://doi.org/10.1083/jcb.201812021>.
42. Maekawa, M., and Fairn, G.D. (2015). Complementary probes reveal that phosphatidylserine is required for the proper transbilayer distribution of cholesterol. *J. Cell Sci.* *128*, 1422–1433. <https://doi.org/10.1242/jcs.164715>.
43. 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. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-01-0060>.
44. De Vos, K.J.D., Mórotz, G.M., Stoica, R., Tudor, E.L., Lau, K.F., Ackerley, S., Warley, A., Shaw, C.E., and Miller, C.C.J. (2012). VAPB interacts with the mitochondrial protein PTP1P51 to regulate calcium homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 1299–1311. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr559>.
45. Li, P., Lees, J.A., Lusk, C.P., and Reinisch, K.M. (2020). Cryo-EM reconstruction of a VPS13 fragment reveals a long groove to channel lipids between membranes. *J. Cell Biol.* *219*, e202001161. <https://doi.org/10.1083/jcb.202001161>.
46. Leonzino, M., Reinisch, K.M., and Camilli, P.D. (2021). Insights into VPS13 properties and function reveal a new mechanism of eukaryotic lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Biol. Lipids* *1866*, 159003. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.159003>.
47. Kumar, N., Leonzino, M., Hancock-Cerutti, W., Horenkamp, F.A., Li, P., Lees, J.A., Wheeler, H., Reinisch, K.M., and De Camilli, P.D. (2018). VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites. *J. Cell Biol.* *217*, 3625–3639. <https://doi.org/10.1083/jcb.201807019>.
48. Kameoka, S., Adachi, Y., Okamoto, K., Iijima, M., and Sesaki, H. (2018). Phosphatidic acid and cardiolipin coordinate mitochondrial dynamics. *Trends Cell Biol.* *28*, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.011>.
49. Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., and Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *21*, 204–224. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>.
50. Levine, T.P., and Munro, S. (1998). The pleckstrin homology domain of oxysterol-binding protein recognises a determinant specific to Golgi membranes. *Curr. Biol.* *8*, 729–739. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70296-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70296-9).
51. Jamecna, D., and Antonny, B. (2021). Intrinsically disordered protein regions at membrane contact sites. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* *1866*, 159020. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.159020>.
52. Gatta, A.T., and Levine, T.P. (2017). Piecing together the patchwork of contact sites. *Trends Cell Biol.* *27*, 214–229. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.010>.
53. 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. <https://doi.org/10.1111/tra.12243>.
54. D’Ambrosio, J.M., Albanèse, V., Lipp, N.-F., Fleuriot, L., Debayle, D., Drin, G., and Čopić, A. (2020). Osh6 requires Ist2 for localization to ER–PM contacts and efficient phosphatidylserine transport in budding yeast. *J. Cell Sci.* *133*, jcs243733. <https://doi.org/10.1242/jcs.243733>.
55. Zewe, J.P., Wills, R.C., Sangappa, S., Goulden, B.D., and Hammond, G.R. (2018). SAC1 degrades its lipid substrate PtdIns4P in the endoplasmic reticulum to maintain a steep chemical gradient with donor membranes. *eLife* *7*, e35588. <https://doi.org/10.7554/eLife.35588>.
56. Jeppesen, C., Wong, J.Y., Kuhl, T.L., Israelachvili, J.N., Mullah, N., Zalipsky, S., and Marques, C.M. (2001). Impact of polymer tether length on multiple ligand-receptor bond formation. *Science* *293*, 465–468. <https://doi.org/10.1126/science.293.5529.465>.
57. Li, L., Stumpf, B.H., and Smith, A.S. (2021). Molecular biomechanics controls protein mixing and segregation in adherent membranes. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, 3699. <https://doi.org/10.3390/ijms22073699>.
58. Hu, J., Lipowsky, R., and Weikel, T.R. (2013). Binding constants of membrane-anchored receptors and ligands depend strongly on the nanoscale roughness of membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *110*, 15283–15288. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305766110>.
59. Anding, A.L., Wang, C., Chang, T.-K., Sliter, D.A., Powers, C.M., Hofmann, K., Youle, R.J., and Baehrecke, E.H. (2018). Vps13D encodes a ubiquitin-binding protein that is required for the regulation of mitochondrial size and

- clearance. *Curr. Biol.* 28, 287–295.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.064>.
60. Schlame, M., and Xu, Y. (2020). The function of tafazzin, a mitochondrial phospholipid-lysophospholipid acyltransferase. *J. Mol. Biol.* 432, 5043–5051. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.03.026>.
61. Ban, T., Ishihara, T., Kohno, H., Saita, S., Ichimura, A., Maenaka, K., Oka, T., Mihara, K., and Ishihara, N. (2017). Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nat. Cell Biol.* 19, 856–863. <https://doi.org/10.1038/ncb3560>.
62. Choi, S.Y., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J., and Frohman, M.A. (2006). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 8, 1255–1262. <https://doi.org/10.1038/ncb1487>.
63. Zhang, Y., Liu, X., Bai, J., Tian, X., Zhao, X., Liu, W., Duan, X., Shang, W., Fan, H.-Y., and Tong, C. (2016). Mitoguardin regulates mitochondrial fusion through MitoPLD and is required for neuronal homeostasis. *Mol. Cell* 61, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.017>.
64. Freyre, C.A.C., Rauher, P.C., Ejsing, C.S., and Klemm, R.W. (2019). MIGA2 links mitochondria, the ER, and lipid droplets and promotes de novo lipogenesis in adipocytes. *Mol. Cell* 76, 811–825.e14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.011>.
65. Kabashi, E., El Oussini, H.E., Bercier, V., Gros-Louis, F., Valdmans, P.N., McDearmid, J., Meijer, I.A., Dion, P.A., Dupre, N., Hollinger, D., et al. (2013). Investigating the contribution of VAPB/ALS8 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2350–2360. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt080>.
66. McCune, B.T., Tang, W., Lu, J., Eaglesham, J.B., Thorne, L., Mayer, A.E., Condiff, E., Nice, T.J., Goodfellow, I., Krezel, A.M., et al. (2017). Noroviruses co-opt the function of host proteins VAPA and VAPB for replication via a phenylalanine-phenylalanine-acidic-tract-motif mimic in nonstructural viral protein NS1/2. *mBio* 8, e00668-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00668-17>.
67. Venditti, R., Rega, L.R., Masone, M.C., Santoro, M., Polishchuk, E., Sarnataro, D., Paladino, S., D'Auria, S., Varriale, A., Olkkonen, V.M., et al. (2019). Molecular determinants of ER–Golgi contacts identified through a new FRET–FLIM system. FRET-based analysis of ER–TGN contact sites. *J. Cell Biol.* 218, 1055–1065. <https://doi.org/10.1083/jcb.201812020>.
68. Collado, J., Kalemanov, 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. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.018>.
69. Modzel, M., Lund, F.W., and Wüstner, D. (2017). Cholesterol homeostasis, methods and protocols. *Methods Mol. Biol.* 1583, 111–140. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6875-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6875-6_10).
70. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Rabbit anti OSBP	Atlas Antibodies	Cat# HPA039227; RRID: AB_2676401
Rabbit anti VPS13A	Atlas Antibodies	Cat# HPA021652; RRID: AB_1858759
Rabbit anti RMDN3 (PTPIP51)	Atlas Antibodies	Cat# HPA009975; RRID: AB_1078811
Rabbit anti CERT (COL4A3BP)	Atlas Antibodies	Cat# HPA035645; RRID: AB_10600700
Rabbit anti VAP-A	Atlas Antibodies	Cat# HPA009174; RRID: AB_1080549
Rabbit anti VAP-B	Atlas Antibodies	Cat# HPA013144; RRID: AB_1858717
Rabbit anti Tubulin- $\alpha$	Sigma-Aldrich	Cat# Sab4500087; RRID: AB_10743646
Mouse anti Tom20	Santa Cruz	Cat# sc-17764; RRID: AB_628381
Sheep polyclonal anti human TGN46	BIORAD	Cat# AHP500G; RRID: AB_323104
Secondary Alexa Fluor-conjugated	Thermo Fisher Scientific	Cat# A32723; RRID: AB_2633275
HRP-conjugated secondary	Jackson ImmunoResearch Labs	Cat# 111-035-047; RRID: AB_2337940
<b>Bacterial strains</b>		
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	IPMC resources	N/A
XL10-gold ultracompetent cells	Agilent	Cat# 200315
<b>Chemicals, peptides and recombinant proteins</b>		
Jenelia Fluor 646 HaloTag-Ligand	Promega	Cat# GA112A
SNAP-Cell TMR Star	NEB	Cat# S9105S
WGA-Texas Red-X conjugated	Invitrogen	Cat# W7024
Mito Tracker-Red CMX Ros	Invitrogen	Cat# M7512
G418	Sigma-Aldrich	Cat# G8168
Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine (CCCP)	EMD Millipore Merck	Cat# 215911
Protease Subtilisin Carlsberg	Sigma-Aldrich	Cat# P-5380
E64D	Sigma-Aldrich	Cat# E8640
Pepstatin A	Sigma-Aldrich	Cat# P-5318
FFAT peptide	Proteogenix (Oberhausbergen, France)	N/A
Polyethylene Glycol 1500 (PEG 1500)	Roche	Cat# 10783641001
Egg PC	Avanti Polar Lipids	Cat# 840051C
Brain PS	Avanti Polar Lipids	Cat# 840032C
Brain PI(4)P	Avanti Polar Lipids	Cat# 840045X
Liver PE	Avanti Polar Lipids	Cat# 840026C
Liver PI	Avanti Polar Lipids	Cat# 840042C
Rhodamine-PE	Avanti Polar Lipids	Cat# 810158C
DGS-NTA(Ni)	Avanti Polar Lipids	Cat# 790404P
Cholesterol	Sigma	Cat# C8667
Anapoe-X-100 (Triton X100)	Anatrace	Cat# APX100
N-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM)	Anatrace	Cat# D310A
Lacey carbon electron microscopy grids	Ted Pella (USA)	N/A
Bio-beads SM-2 Adsorbent Media	BIORAD	Cat# 152-3920
Complete-EDTA-free protease inhibitor	Roche	Cat# 05056489001
Alt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3	IDT Dna	Cat# 1081061
Alt-R® Cas9 Electroporation Enhancer	IDT Dna	Cat# 1075916
Sg RNA	IDT Dna	N/A
STED mounting medium	Abberior GmbH, Göttingen	Cat# MM-2013
Abberior Mount Solid Antifade		

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Critical commercial assays</b>		
Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V	Lonza	Cat# VCA-1003
QuickChange Lightning Site-directed mutagenesis kit	Agilent technologies	Cat# 210519-5
<b>Deposited data</b>		
Raw data related to <a href="#">Figures 5A and S2B</a>	Mendeley Data: <a href="https://doi.org/10.17632/846czv6kyy.1">https://doi.org/10.17632/846czv6kyy.1</a>	N/A
<b>Experimental models: Cell lines</b>		
hTERT-RPE1	ATCC	Cat# CRL-4000
SF9	From lab	N/A
<b>Recombinant DNA</b>		
pET21b-VAP-A-WT-6His (8-230)	This study	N/A
pET21b -VAP-A-sL1-6His	This study	N/A
pET21b -VAP-A-sL2-6His	This study	N/A
pET21b -VAP-A-sL1/2-6His	This study	N/A
pET16b-StrepII.TEV.OSBP N-PH-FFAT (1-408)	Jamenca et al. <sup>8</sup>	N/A
pENTR/D-OSBP FL (1-807)-SThr-6His	Mesmin et al. <sup>6</sup>	N/A
pET21b -Sac1-6His	Mesmin et al. <sup>6</sup>	N/A
pGEX-4T3-PH-FAPP1 (C37S/C94S/T13C/T100S)	Mesmin et al. <sup>6</sup>	N/A
pET16b -His-Strep-TEV-VAP-A WT (8-249)	This study	N/A
pET16b -His-Strep-TEV-VAP-B WT	This study	N/A
pET16b -His-Strep-TEV-VAP-A sL1/2	This study	N/A
pEGFP-C1-VAP-A WT (2-249)	F. Alpy	N/A
pmCherry-C1-VAP-A WT (2-249)	This study	N/A
pHTN-VAP-A WT (2-249)	This study	N/A
pEGFP-C1-VAP-A sL1	This study	N/A
pEGFP-C1-VAP-A sL2	This study	N/A
pEGFP-C1-VAP-A sL1/2	This study	N/A
pHTN-VAP-A sL1/2	This study	N/A
pEGFP-C1-VAP-A WT <sup>KM&gt;DD</sup>	F. Alpy	N/A
pEGFP-C1-VAP-A sL1/2 <sup>KM&gt;DD</sup>	This study	N/A
pEGFP-C1-VAP-A WT np	This study	N/A
pEGFP-C1-VAP-A uL1/2	This study	N/A
pEGFP-C1-VAP-A iL1/2	This study	N/A
pEGFP-C1-VAP-A Long	J.M. Verbavatz	N/A
pTagBFP-N-β-1,4-Galactosyltransferase-1 (1-82)	Mesmin et al. <sup>7</sup>	N/A
piRFP-N1-P4M-SidM	Addgene	#51470
pmCherry-N1-OSBP (1-807)	Jamenca et al. <sup>8</sup>	N/A
pmCherry-N1-PTPIP51 (1-470)	This study	N/A
pmCherry-C1-OSBP <sup>HHK&gt;AAA</sup> (1-807)	Mesmin et al. <sup>6</sup>	N/A
pmCherry-C1-D4H	This study	N/A
pHTN-Sec61β	F.Bottanelli	N/A
pSNAP-Sec61β	F.Bottanelli	N/A
pSNAP-OMP25	F.Bottanelli	N/A
pCFP-N1-Mito	E.Honoré	N/A
pmCherry-N1-Mito	This study	N/A

(Continued on next page)



REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
pEGFP-LC3	Addgene	#11546
pmCherry-N1-PH-FFAT (76-408)	Mesmin et al. <sup>6</sup>	N/A
pmCherry-N1-PH-FFAT-R108L (76-408)	Mesmin et al. <sup>6</sup>	N/A
pmCherry-N1-Mito-OSBP	This study	N/A
<b>Software and algorithms</b>		
Clustal Omega/ Jalview	<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>	N/A
Predictor of natural disorder regions XL1-XT	<a href="http://www.pondr.com/">http://www.pondr.com/</a>	N/A
Predictor of natural disorder regions DISOPRED3	<a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/</a>	N/A
Predictor of natural disorder regions PrDOS	<a href="https://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi">https://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi</a>	N/A
Predictor of coiled-coil regions COILS	<a href="https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_lupas.html">https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_lupas.html</a>	N/A
Pairwise sequence alignment tool LALIGN	<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/</a>	N/A
Fiji	NIH, USA	N/A
OMERO	U Dundee & Open Microscopy Environment	N/A
Metamorph version 7.8.9.0	Molecular Devices LLC	N/A
Prism 8.4.3	GraphPad Software	N/A
Canvas X	ACD system	N/A
Huygens Core version 21.04 Huygens Remote Manager version 3.7 (deconvolution)	Scientific Volume Imaging	CMLE algorithm
CellProfiler	Broad Institute	N/A
LAS X software 3.5.6.21594	Leica Microsystems	N/A
Lasergene 17	DNASTAR, Inc.	N/A

## RESOURCE AVAILABILITY

### Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Bruno Mesmin ([mesmin@ipmc.cnrs.fr](mailto:mesmin@ipmc.cnrs.fr)).

### Materials availability

Plasmids generated in this study will be made available through requests to the [lead contact](#).

### Data and code availability

- Data including all raw image files reported in this paper will be shared by the [lead contact](#) upon request. Raw data from [Figures 5A](#) and [S2B](#) were deposited on Mendeley and are publicly available as of the date of publication. DOIs are listed in the [key resources table](#).
- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this work paper is available from the [lead contact](#) upon request.

## EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

### Cell culture

#### *hTERT-RPE1 cells*

Human immortalized retinal pigmented epithelial cells (hTERT-RPE1, ATCC Cat# CRL-4000; hereafter RPE1) were used as cellular model. RPE1 are genetically stable, lack transformed phenotypes, and are commonly used to study intracellular membrane traffic and dynamics. They were cultured in DMEM/F12 (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% antibiotics (Zell Shield) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere.

#### *Insect (Spodoptera frugiperda) SF9 cells*

SF9 cells were cultured at 27°C in SF-900 II media (Gibco) supplemented with 1.5% FCS in absence of antibiotic.

## METHOD DETAILS

### Plasmids

To reduce VAP-A flexibility while preserving the rotation and dimerization properties of the protein, the flexible linkers between MSP and CC (L1; aa. 133-164) and between CC and TM domains (L2; aa. 207-230) were replaced by short Gly/Ser-rich sequences GGSGGSGG (sL1) and GSG (sL2). Mutagenesis was performed from three starting vectors: pEGFP-C1 VAP-A (FL; 1-249), pET21b+ VAP-A His6 (8-230) and pET16b His6-StrepII-TEV VAP-A (8-249) by Eurofins Genomics. Mutagenesis to obtain pEGFP-C1 VAP-A ACC, uL1/2 and iL1/2 was carried out by Proteogenix. The chimeric construct Mito-OSBP was cloned into a pmCherry N1 vector. For this, the transmembrane domain of PTPIP51 (aa. 1-43) was created by annealing two long primers covering the entire sequence and OSBP fragment [179-807] was amplified by a PCR reaction. Both fragments had an additional end that hybridizes each other. A second PCR was done with both templates and oligos containing NheI and BamHI restriction sites. The final insert was digested as well as the vector before ligation and transformation into XL10 Gold cells. Other constructs from this study were obtained using the restriction enzyme cloning method. Point mutations to obtain EGFP-VAP-A sL1/2 KM>DD and EGFP-VAP-A np were performed using the Quickchange lightning mutagenesis kit (Agilent). For VAP-A sL1/2 KM>DD, Lys 94 and Met 96 were replaced by Asp; for VAP-A np, Ser 145, 164, 214, 216, 219 and the Thr 215 were replaced by Ala. All plasmid constructs were sequenced, and analyzed with DNASTAR Lasergene software.

### Cell transfection

RPE1 cells were transfected by electroporation with Nucleofector solution V (Lonza) using the Amaxa Nucleofector device (X-01 program) (Lonza) for 24-48 h. RPE1 cells stably expressing EGFP-VAP were selected using G418 (500 mg/mL) (Sigma). Surviving colonies were isolated using cloning cylinders (Bel-Art). For microscopy, cells were seeded at suitable density to reach 50-90% confluence on the day of imaging on ibiTreat  $\mu$ -Slides (Ibidi) or in uncoated glass coverslip for STED experiments.

### Protein expression and purification

Full length human VAP-A WT and sL1/2 expression were performed in C41 (DE3) *E. coli* strain in presence of 0.5 mM IPTG for 4 h at 30°C, and purified according to de la Mora et al.<sup>31</sup> VAP expressing cells were collected, lysed through a cell disruptor and centrifuged to purify membranes. Then, membranes were solubilized for 2h at 4°C with N-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM):protein ratio of 2.5 (w/w) and then centrifuged to collect solubilized proteins. VAP-A WT and sL1/2 were purified on Strep Tactin beads (IBA superflow sepharose) in batch. Eluted proteins were incubated overnight with TEV protease to eliminate the double tag, followed by purification on a Superdex 200 (GE healthcare) size exclusion chromatography in Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, DDM 30 mM, 10% glycerol. Purified proteins were collected at concentration ranging from 1.5 to 2 mg/mL without any additional concentration step, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Full length human VAP-B was purified using the same method.

OSBP N-PH-FFAT, Sac1<sup>His</sup> and VAP-A<sup>His</sup> WT, sL1, sL2 and SL1/2 constructs, sub-cloned into pET-21b, were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified as previously described.<sup>6,8</sup> N-PH-FFAT had a N-terminal 6xHis tag-StrepII-TEV site, VAP-A<sup>His</sup> constructs and Sac1<sup>His</sup> (1-522) had a C-terminal 6xHis-tag replacing protein transmembrane region. After protein expression, bacteria were lysed in a cell disruptor at 1600 psi and incubated for 30 min on ice with DNase and MgCl<sub>2</sub> (5mM) before ultracentrifugation (125,000 $\times$ g). Proteins were purified using HisPur<sup>TM</sup> Cobalt Resin (Thermo Scientific). For N-PH-FFAT, protein fractions were pooled and cleaved with TEV protease overnight at 4°C. Digested proteins were purified on SourceQ HR 10/10 column (GE Healthcare) with a 0-1M NaCl gradient in 25mM Tris pH7.5 followed by a Sephacryl S200 HK16/70 column (GE Healthcare) equilibrated in 25mM Tris pH7.5, 120 mM NaCl, 2mM DTT, using an AKTA purifier system (GE Healthcare). For VAP<sup>His</sup> constructs and Sac1<sup>His</sup>, eluted protein fractions were pooled, concentrated and further purified on a Sephacryl S200 HR/XK 16/70 column (GE Healthcare) equilibrated in 25 mM Tris pH 7.5, 120 mM NaCl, 1 mM DTT.

PH-FAPP1 in pGEX-4T3, modified by point mutagenesis (C37S, C94S, T13C, T100S) for specific NBD labeling of C13, was expressed as a GST fusion protein in *E. coli* and purified according to Mesmin et al.<sup>6</sup> on Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare), cleaved by thrombin at 4°C overnight and next purified by gel filtration on a Sephacryl S300 HR XK16-70 column in 50 mM Tris, pH 7.4, 120 mM NaCl and 2 mM DTT. For NBD labelling, purified PH-FAPP1 was first passed on a NAP-10 column (GE Healthcare) to remove DTT and then mixed 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. The free probe was removed by gel filtration on a Sephacryl S200 HR XK16-70 column.

Full length (1-807) OSBP was purified from baculovirus-infected SF9 cell according to Mesmin et al.<sup>6</sup> The construct was created by subcloning PCR-amplified DNA into pENTR/D-Topo vector (Invitrogen), followed by insertion of a thrombin site at the end of the OSBP sequence. The PCR fragment was then inserted by recombination into linearized BaculoDirect vector (C-terminal V5 and His-tagged), and transfected into SF9 cells. OSBP with a C-ter 6xHis tag was produced in Sf9 cells, which were infected with baculovirus at MOI of 0.1 for 1h at room temperature, suspended in 500-1000 mL of Sf-900 II media supplemented with 1.5% FCS and incubated with mixing at 27°C for 72 h. Thereafter, cells were collected by centrifugation at 300 $\times$ g for 10 min and pellets were stored at -20°C. Cell pellets were resuspended in lysis buffer (20 mM Tris pH 7.5, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, EDTA-free protease inhibitors and phosphatases inhibitors) and lysed with Dounce homogenizer. After ultracentrifugation (125,000 $\times$ g), OSBP from the supernatant was adsorbed on an HisPur<sup>TM</sup> Cobalt Resin (Thermo Scientific), submitted to 3 washes with lysis buffer supplemented with 800, 550, and 300 mM NaCl, respectively, and then eluted with 250 mM imidazole-containing buffer. OSBP fractions were pooled,

concentrated on Amicon Ultra (cut-off 30 kDa), and submitted to thrombin cleavage for 1 h at 25°C to eliminate the His tag, then purified on a Sephacryl S300 HK16/70 column (GE Healthcare). All steps were performed at 4°C. Purified proteins were concentrated, supplemented with 10% glycerol, flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

### Analytical gel filtration

Purified VAP-A<sup>His</sup> constructs (100  $\mu$ L, 30  $\mu$ M) were applied on a Supedex 75 column and eluted at a flow rate of 0.5 mL/min in 25 mM Tris pH 7.5, 120 mM NaCl and 1 mM DTT. The column was calibrated using the following standards (MW/Stokes radius): Alcohol Dehydrogenase (150 kDa/46 Å), Bovine Serum Albumin (67 kDa/36.1 Å), Ovalbumin (43 kDa/28 Å), Carbonic Anhydrase (29 kDa/21 Å). The elution volume and Stokes radius of the standards were used to establish a first calibration curve, from which the Stokes radius of the VAP<sup>His</sup> constructs were determined. Thereafter, the Stokes radius was plotted as a function of MW for both protein standards and for VAP-A<sup>His</sup> constructs.

### Limited proteolysis

VAP-A<sup>His</sup> WT, sL1, sL2 or sL1/2 (4  $\mu$ M) were mixed in 50 mM HEPES pH 7.4, 120 mM K acetate, 1 mM MgCl<sub>2</sub> (HKM) buffer. Subtilisin (1  $\mu$ g/mL) was added at time zero, and, at the indicated times the reaction was stopped by adding 0.5  $\mu$ M Phenylmethylsulfonyl fluoride. The samples were analyzed by SDS PAGE with Sypro-Orange staining and by liquid chromatography coupled to a mass spectrometer equipped with a heated electrospray ionization (HESI) probe. HPLC was performed using a Dionex U3000 RSCL Instrument (ThermoFisher Scientific). Protein analysis was performed on a Synchronis C18 column at flow rate of 300  $\mu$ L/min. The elution program was based on water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) both containing 0.1% formic acid (v/v): 0 min 3% B, 25 min 60% B, 28 min 95% B. The Q-exactive *plus* spectrometer controlled by the Xcalibur software was operating in electrospray positive mode. Typical ESI conditions were as follows: electrospray voltage 4 kV; capillary temperature 320°C, probe temperature 325°C, sheath gas flow 40U and auxiliary gas 10U. The MS scan was acquired in the 400 to 1900 m/z range with the resolution set to 140,000. Data analysis was performed with Biopharma Finder 3.2 and intact protein spectra was automatically deconvoluted with Default-Auto Xtract.

### Liposome preparation

Lipids in chloroform or in chloroform/methanol (2:1) in the case of mixtures containing PI(4)P were mixed at the desired molar ratio and the solvent was removed in a rotary evaporator. Lipid films were hydrated in 50 mM HEPES pH 7.4, 120 mM K acetate (HK buffer, which was degassed before use) to reach a concentration of 2 mM. The suspensions were then frozen in liquid nitrogen and thawed in a water bath (37°C) five times. Liposomes were extruded through 0.1  $\mu$ m pore size polycarbonate filters using hand extruder (Avanti Polar Lipids) and were used within 1-2 days.

### Full length VAP-A reconstitution into proteoliposomes

VAP-A<sup>FL</sup> WT or sL1/2 were reconstituted by detergent removal using BioBeads as described previously in lipid mixture containing egg phosphatidylcholine (PC) and brain phosphatidylserine (PS) (95/5 mol%) for cryo-EM experiment or egg PC, brain PS, DGS NTA(Ni), cholesterol (93/5/2/10 mol%) for *in vitro* lipid transfer assay. As previously described,<sup>31</sup> DDM solubilized VAP-A was mixed at room temperature with liposomes solubilized in Triton X100 (detergent/lipid ratio of 2.5 w:w), in 50  $\mu$ L during 15 min. Thereafter, detergent was removed by successive additions of wet BioBeads, at BioBeads/detergent ratio of 10 w:w (for 2 h), 20 w:w (for 1 h), 20 w:w (for 1 h) at room temperature. All these steps were done in a 2-mL Eppendorf tube under gentle mixing with a small magnetic stir bar. The reconstitution buffer contained 1 mg/mL lipid, 2.5 mg/mL Triton X100 in HK. Protein was added at LPR ranging from 70 to 2800 mol/mol depending on experiment. All the reconstitutions were tested by flotation assay. Reconstitutions of VAP-A sL1/2 for cryo-EM experiment were performed with addition of 400 mM KCl to prevent the formation of multilayered vesicles and increase the homogeneous distribution of proteins in vesicles. After reconstitution, proteoliposomes were kept at 4°C and used within 2 days.

### Cryo-EM experiments

Lacey carbon 300 mesh grids (Ted Pella, USA) were used in all cryo-EM experiments. Blotting was carried out on the opposite side from the liquid drop and plunge frozen in liquid ethane (EMGP, Leica, Germany). Cryo-EM images were acquired with a Tecnai G2 (ThermoFisher) Lab6 microscope operated at 200 kV and equipped with a 4kx4k CMOS camera (F416, TVIPS). Image acquisition was performed under low dose conditions of 10 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup> at a magnification of 50,000 $\times$  with a pixel size of 2.1 Å/px.

### Formation of *in vitro* MCS

VAP-A<sup>FL</sup>/N-PH-FFAT MCS were formed directly on the cryo-EM grid at room temperature according to de la Mora et al.<sup>31</sup> VAP-A proteoliposomes were diluted at 0.05 mg/mL in HK buffer. Lipid nanotubes containing C24:1 Galactosyl( $\beta$ ) Ceramide, egg PC, brain PS, brain PI(4)P (80/10/ 5/5 mol%) were diluted at 0.15 mg/mL and mixed with N-PH-FFAT at LPR 70 mol/mol. A 2  $\mu$ L drop of N-PH-FFAT tubes was immediately loaded onto the grid and left to incubate for  $\sim$ 1 min, followed by the addition of 2  $\mu$ L VAP-A<sup>FL</sup> WT of sL1/2 proteoliposomes. After 30 sec incubation, the grid was blotted and immediately flash frozen.

### Liposome flotation assay

Liposomes containing egg PC, brain PS, liver PE, Rhodamine-PE and PI(4)P (62/5/17/2/4%) (1 mM) and N-PH-FFAT (1  $\mu$ M) were incubated for 5 min in HKM buffer at room temperature in a Beckman polycarbonate centrifuge tube. 1  $\mu$ M of VAP-A<sup>His</sup> was added

with or without preincubation with FFAT peptide 5 min at room temperature (WCSGKGDMSDEDDENEFFDAPEIITMPENLGH, Pro-teogenix, Oberhausbergen, France). The 150  $\mu$ L mixture was incubated 10 min at 37°C under agitation and mixed with HK buffer supplemented with 60% sucrose (100  $\mu$ L) and then overlaid with an intermediate sucrose solution made of HK buffer with 24% sucrose (200  $\mu$ L) and a layer (50  $\mu$ L) of HKM buffer. After centrifugation at 55,000 rpm in a TLS 55 (Beckman) swing rotor for 90 min at 25°C, three fractions (bottom, medium, and top) of 250, 150 and 100  $\mu$ L were collected and analyzed by SDS-PAGE using Sypro-Orange staining.

### In vitro lipid transfer assay

PI(4)P-transfer assays were performed as described previously using purified recombinant proteins and liposomes mimicking ER and Golgi membranes.<sup>6</sup> All measurements were carried out in a Jasco FP-8300 spectrofluorimeter using a cylindrical quartz cuvette (600  $\mu$ L) equilibrated at 37°C and equipped with a magnetic bar for continuous stirring. Golgi-like donor (Ld) liposomes were prepared with egg PC, liver PE, liver PI, brain PS, brain PI(4)P (64/17/8/5/4 mol%), supplemented with 2 mol % Rho-PE and filter-extruded at 0.1  $\mu$ m pore-size. ER-like acceptor VAP-A<sup>FL</sup> proteoliposomes (La) were reconstituted at LPR 1300 mol:mol in egg PC, brain PS, DGS NTA(Ni) (93/5/2 mol%), supplemented with 10 mol% cholesterol. The sample initially contained NBD-PH-FAPP1 (100 nM) and Ld (250  $\mu$ M) in HKM buffer. La (250  $\mu$ M) containing VAP-A<sup>FL</sup> (150 nM), OSBP (0.1  $\mu$ M) and Sac1<sup>His</sup> (0.1  $\mu$ M) were then sequentially added at the indicated times. PI(4)P transport was followed by measuring the NBD emission measured at 530 ( $\pm$ 10) nm upon excitation at 460 ( $\pm$ 1) nm.

### CRISPR/Cas9 knock-out

Ribonucleoprotein complexes were prepared by mixing 1.2  $\mu$ L sgRNA (1  $\mu$ M) and 1.7  $\mu$ L of recombinant HiFi Cas9 Nuclease (62  $\mu$ M) (IDT DNA) in phosphate-buffered saline (PBS) (5  $\mu$ L total volume). Upon incubation (20 min at room temperature), the complexes were then mixed with 2  $\mu$ L of Cas9 Electroporation Enhancer (IDT DNA) and 10<sup>6</sup> RPE1 cells before electroporation using the Amaxa Nucleofector device. After 48 h, single cell seeding was performed in 96 well-plates. Edition of each clone was analyzed by sequencing and Western blot using Rabbit anti-VAP-A, VAP-B, VPS13A, PTPIP1 (RMDN3) and  $\alpha$ -Tubulin primary antibody (Atlas antibodies) and HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Labs). 5'-3' sequences of crRNA used in this study (sgRNA : crRNA and trRNA complex. TrRNA was determined by IDT DNA to adapt to Cas9 Nuclease): VAP-A, TGAAGACTACAGCACCT CGCCGG; VAP-B, TGAAGACTACAGCACCCACGTAGG; VPS13A, GACGTGTTGAACCGTCTTGGG; and PTPIP51, TGAAGTCTG C GTATAGTCCAGGG.

### Cell staining and imaging

For immunofluorescence, cells cultured in on  $\mu$ -slides (Ibidi) were washed once with PBS then fixed with paraformaldehyde (3%) and glutaraldehyde (0.1%) in PBS for 10 min. Fixed cells were soaked in PBS supplemented with NH<sub>4</sub>Cl (50 mM) for 10 min, and then permeabilized in permeabilization buffer (Saponin 0.05 %, BSA 0.2 %, PBS) during 45 min at RT°. Cells were then immuno-labeled with primary antibodies (rabbit anti-OSBP or CERT (Atlas antibodies), mouse anti-TOM20 (Santacruz) or sheep anti-TGN46 (Biorad), diluted in permeabilization buffer) for 2 h at RT°, washed 3 times with permeabilization buffer, further incubated with secondary Alexa Fluor-conjugated antibodies (Invitrogen; diluted in permeabilization buffer) for 30 min at RT°, and rinsed. For PM staining, Wheat Germ Agglutinin (WGA) coupled to Alexa Fluor 647 (Invitrogen) in PBS was apply at 5  $\mu$ g/mL on fixed unpermeabilized cells for 10 min before 2 washes in PBS. Mitotracker Red (Invitrogen) staining was performed at 500 nM on living cells in growth medium during 30 min at 37°C, and then washed twice.

Confocal images were acquired using a Leica SP8 STED 3X (Leica Microsystems, Nanterre) equipped with a pulsed white light laser. All images were acquired through a 63x/1.4 NA Oil objective using the LAS X software (Leica Microsystems). Confocal images have a  $\sim$ 100 nm pixel size.

### Mitochondria purification

Mitochondria with MAM were isolated according to Wieckowski et al.<sup>34</sup> 4 million VAP-A KO RPE-1 cells expressing EGFP-VAP-A WT or sL1/2 were collected and pelleted at 600 $\times$ g for 5 min in PBS. Cells were then resuspended in 1 mL of PBS supplemented with CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM and MgCl<sub>2</sub> 1.06 mM, and centrifugated at 600 $\times$ g 5 min at 4°C. Cell lysis was then performed in 2 mL of ice-cold Buffer-1 (225 mM Mannitol, 75 mM Sucrose, 0.1 mM EDTA and 30 mM Tris HCl pH 7.4) using a pre-chilled 2-mL Dounce homogenizer. Homogenization steps were carried out at 4°C. Cell disruption was controlled under a microscope: after  $\sim$ 500 passes of the pestle, >80% of cells were broken. At this step, total GFP-fluorescence per tube was measured using a Fusion FX imager (Vilber). The lysate was then centrifuged twice at 600 $\times$ g for 5 min at 4°C in order to eliminate unbroken cells and nuclei. The supernatant was centrifuged at 7000 $\times$ g for 10 min at 4°C, and the resulting pellet was resuspended in 1 mL of ice-cold Buffer-2 (225 mM Mannitol, 75 mM Sucrose and 30 mM Tris HCl pH 7.4) before a new centrifugation step at 7000 $\times$ g 10 min, 4°C. The pellet containing mitochondria and MAM was resuspended in 2 mL of ice-cold Buffer-2 and GFP-fluorescence was measured again. This suspension was finally centrifuged for 10 min at 10,000 $\times$ g 4°C and crude mitochondrial pellet was resuspended in RIPA buffer for Western blot analysis to control mitochondria enrichment.

### Mitophagy assay

EGFP-Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) was used to monitor autophagy by visualizing its recruitment to autophagosomes. RPE1 WT or KO for VAP-A were transfected with EGFP-LC3 and plated in  $\mu$ -slide (Ibidi) for 24 h. Cells were then treated with DMSO or Carbonyl Cyanide *m*-Chlorophenylhydrazine (CCCP) and proteases inhibitors (E64D and Pepstatin A 10  $\mu$ M) for 2 h in growth medium. The last 30 min of treatment included Mitotracker Red labelling. After two PBS washes, cells were fixed with 4% PFA and 0.1% glutaraldehyde before imaging.

### CTL synthesis and imaging

Cholesta-5,7,9(11)-trien-3 $\beta$ -ol (cholestatrienol, CTL) was synthesized in three steps from 7-dehydrocholesterol. For 7-dehydrocholesteryl-3-*o*- $\beta$ -acetate synthesis, 7-dehydrocholesterol (1.00 g, 2.60 mmol) was refluxed at 140°C in 5 mL acetic anhydride (52 mmol) until complete dissolution (i.e., approximately 1.5 h). After removal of acetic anhydride *in vacuo*, 10 mL distilled water and 10 mL heptane were added. The organic phase was washed twice with water then brine, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane and ethyl acetate (from 100:1 to 70:30). Dehydrocholesteryl-3-*o*- $\beta$ -acetate (660 mg, 60% yield) was isolated as white crystals. Next, for Cholesta-5,7,9(11)-trien-3 $\beta$ -yl acetate synthesis, a solution of dehydrocholesteryl-3-*o*- $\beta$ -acetate (460 mg) in ethanol (27 mL), was heated to reflux, and then mercuric acetate (1 g), dissolved in a mixture of ethanol (16 mL) and acetic acid (550 mL) was added. The reaction mixture was refluxed for 30 min, then stirred at room temperature for 16 h. The solvents were evaporated to dryness, and after addition of chloroform (10 mL), the solution was filtered through Celite. The organic phase was washed successively with a saturated solution of sodium carbonate, water and brine, then dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane and ethyl acetate (from 100:1 to 70:30) to give pure cholesta-5,7,9(11)-trien-3 $\beta$ -yl acetate (230 mg, 50% yield) as white crystals. Finally, Cholesta-5,7,9(11)-trien-3 $\beta$ -ol was obtained following the procedure described by Modzel et al.<sup>69</sup> and was ultimately purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane and ethyl acetate (from 100:1 to 50:50) then precipitated in acetonitrile to give a pure white solid (61 mg, 30% yield) that was stored in the dark under argon, at -80 °C.

For cell labelling with CTL, cells were seeded in  $\mu$ -slides 35mm dishes (Ibidi), transiently transfected with TagBFP- $\beta$ GalT1 for 24 h, and then incubated with CTL in complex with MCD (1:5 ratio) for 1 min at 37°C before three rapid washes with warm DMEM/F12 medium. For imaging, dishes were mounted in a stage chamber set at 37°C (Okolab) and cells were observed using an IX83 inverted microscope (Olympus) equipped with an iXon3 blue-optimized EMCCD camera (Andor) and an UPlanSApo 60X/1.35 Oil objective (Olympus). CTL was imaged using Semrock BrightLine filters (320/40 nm band-pass filter, 347 nm dichroic beam splitter, and 390/40 nm band-pass filter).

### Widefield time-lapse imaging

Cells were seeded in  $\mu$ -slides 35mm dishes (Ibidi) and placed in an appropriate initial volume of growth medium so that homogenous mixing of SWG (50 nM) (freshly diluted before use) was achieved upon subsequent additions during the time course measurements. Widefield time-lapse microscopy was performed using an Olympus IX83 inverted microscope equipped with a Z-drift compensator, a scanning stage SCAN IM (Marzhauser), and an iXon3 camera (Andor). Cells plated were mounted in a stage chamber set at 37°C (Okolab). TagBFP, EGFP, and mCherry were observed using Chroma fluorescence filter sets (ref. 49000, 39002, 39010). Multidimensional acquisition and analysis were performed with MetaMorph software (Molecular Devices).

### PEG fusion assay

50,000 cells expressing mitochondrially targeted CFP were cultured overnight on  $\mu$ -slides 35mm (Ibidi) dishes with 50,000 cells expressing mitochondrially targeted mCherry. The next morning, cells were fused for 60s in 1 mL of 50% PEG 1500 (Roche). Cells were washed 4 times and incubated for 16 h in growth medium containing 20  $\mu$ g/mL cycloheximide before fixation. Mitochondria fusion was analyzed by confocal microscopy and quantified using Pearson's correlation coefficient measurement.

### Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) assay

For FRAP assay, cells were maintained at 37°C in growth medium. FRAP were carried out using a Nikon Eclipse Ti inverted microscope equipped with an UltraVIEW VoX spinning disc imaging system (PerkinElmer) driven by Velocity software. Images were acquired using a 100 $\times$  oil-immersion objective (Nikon CFI Plan Apochromat 100 $\times$ /1.4). Photobleaching was performed on circular areas of  $\sim$ 4  $\mu$ m<sup>2</sup> within cell perinuclear regions. Fluorescence in these areas was then recorded every 0.5 s and normalized to the initial intensity.

### Stimulated emission depletion microscopy (STED)

Cells were transfected with pSNAP-tag or pHTN HaloTag<sup>®</sup> plasmids using the Amaxa nucleofactor device (Lonza), and plated on glass coverslips. Cells were labelled 24 h after transfection with 3  $\mu$ M SNAP-Cell TMR STAR (New England BioLabs) or 0.2  $\mu$ M Janelia Fluor 646 HaloTag<sup>®</sup>-Ligand (Promega) in growth medium for 30 min at 37°C. Cells were then washed twice to remove excess dye and further incubated for 30 min at 37°C in growth medium. Finally, cells were washed in PBS, fixed with PFA 4%/glutaraldehyde 0.1%, washed again in PBS and quickly in water before mounting in Abberior Mount Solid Antifade (Abberior GmbH). STED images were acquired using a Leica SP8 STED 3X (Leica Microsystems, Nanterre) equipped with a pulsed white light laser as an excitation

source and the 775 nm pulsed laser as depletion light source. All images were acquired through a 100x/1.4 Oil objective using the LAS X software (Leica Microsystems). The TMR Star was imaged with a 561 nm excitation wavelength and the *Janelia Fluor 646* was imaged with a 633 nm excitation wavelength. STED images have a 15 nm pixel size. All images were deconvolved with Huygens Core version 21.04/Huygens Remote Manager version 3.7 (Scientific Volume Imaging), using the CMLE algorithm.

### Transmission electron microscopy (TEM)

For TEM, cells were fixed with 1.6% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, rinsed in 0.1 M cacodylate buffer, and postfixed for 1 h in 1% osmium tetroxide and 1% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer to enhance membrane staining. The cells were then rinsed in distilled water, dehydrated in alcohols and lastly embedded in epoxy resin. Contrasted ultrathin sections (70 nm) were analyzed under a JEOL 1400 transmission electron microscope mounted with a Morada Olympus CCD camera.

### Mass spectrometry

A modified Bligh and Dyer was used for lipid extraction.  $10^6$  cells were collected and pelleted in an Eppendorf tube and resuspended in 200  $\mu$ L of pre-cooled water, 500  $\mu$ L of methanol and 250  $\mu$ L of chloroform. The mixture was vortexed for 10 min before a new addition of 250  $\mu$ L of water and 250  $\mu$ L of chloroform. The mixture was vortexed again for 10 min and finally centrifuged (3000 rpm, 15 min at 4°C). Then, 400  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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, ThermoFisher). Lipid extracts were separated on an Accucore C18 (150 $\times$ 2.1, 2.5  $\mu$ m) column (ThermoFisher) operated at 400  $\mu$ L/min flow rate. The injection volume was 3  $\mu$ L. Eluent solutions were ACN/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) containing 10 mM ammonium formate and 0.1% formic acid (solvent A) and IPA/ACN/H<sub>2</sub>O (88:10:2 v/v) containing 2 mM ammonium formate and 0.02% formic acid (solvent B). The step gradient of elution was in %B: 0 min, 35%; 0–4 min, 35 to 60%; 4–8 min, 60 to 70%; 8–16 min, 70 to 85%; 16–25 min, 85 to 97%; 25–25.1 min 97 to 100% B, 25.1–31 min 100% B and finally the column was reconditioned at 35% B for 4 min. The UPLC system was coupled with a Q-exactive Mass Spectrometer (ThermoFisher); equipped with a heated electrospray ionization (HESI) probe. This spectrometer was controlled by Xcalibur software (version 4.1.31.9.) and operated in electrospray positive mode.

For CL analyzes lipid extracts were separated on a Cortex C8 (150 $\times$ 2.1, 2.7  $\mu$ m) column (Waters) operated at 400  $\mu$ L/min flow rate (column temperature 45°C). The injection volume was 3  $\mu$ L of diluted lipid extract. Eluent solutions were ACN/H<sub>2</sub>O (6:4 v/v) containing 10 mM ammonium formate and 0.1% formic acid (solvent A) and IPA/ACN/H<sub>2</sub>O (88:10:2 v/v) containing 2 mM ammonium formate and 0.02 % formic acid (solvent B). The used step gradient of elution was: 0–5 min 60% B, 5–12.5 min 60 to 74% B, 12.5–13 min 70 to 99% B, 13–17 min 99% B, 17–17.5 min 99 to 60% B and finally the column was reconditioned at 60% B for 2.5 min. In this case the Mass Spectrometer was operated in electrospray negative mode.

Data were acquired with dd-MS2 mode. MS spectra were acquired at a resolution of 70,000 (200 m/z) in a mass range of 250–1200 m/z or 1000–1600 m/z for CL analyzes with an AGC target value of 1e6 and a maximum injection time of 250 ms. 15 most intense precursor ions were selected and isolated with a window of 1 or 1.5 m/z and fragmented by HCD (Higher energy C-Trap Dissociation) with normalized collision energy (NCE) of 25 and 30 eV or 20, 30 and 40 eV for CL analyses. MS/MS spectra were acquired in the ion trap with an AGC target 1e5 value, the resolution was set at 35 000 at 200 m/z combined with an injection time of 80 ms.

Data were reprocessed using Lipid Search 4.2.21 (ThermoFisher). The product search mode was used and the identification was based on the accurate mass of precursor ions and MS2 spectral pattern. The parameters for the ion identification and alignment were set up as follow: ion precursor tolerance 5 ppm; ion product tolerance 5 ppm; ion searched [H+], [NH4+] and [Na+] or [H-] for CL analyzes; alignment retention time tolerance 0.4 min; ID quality filters A, B and C.

### MD simulations of dimer models

The dimer models of VAP-A WT and sL1/2 were built with AlfaFold2 tool.<sup>70</sup> The VAP-A transmembrane helix was removed. MD simulations were performed with GROMACS 2021.3 (<https://www.gromacs.org/>) with the CHARMM36 force field. The dimer was centered in the cubic box, at a minimum distance of 2 nm from box edges. Solvent molecules were added in the coordinate file. The TIP3P water model configuration was used. Na and Cl ions were added to neutralize the simulation box, at a minimum concentration of 120 mM. The total number of atoms (protein + solvent + counterions) was 462,599 for the VAP-A WT dimer model and 258,855 for sL1/2 dimer model.

Energy minimization was performed using the steepest descent minimization algorithm for the subsequent 50,000 steps. A step size of 0.01 nm was used during energy minimization. A cutoff distance of 1 nm was used for generating the neighbor list and this list was updated at every step. Long-range electrostatic interactions were calculated using the particle mesh Ewald summation methods. Periodic boundary conditions were used. A short 100 ps NVT equilibration was performed. During equilibration, the protein molecule was restrained. All bonds were constrained by the LINear Constraints Solver (LINCS) constraint algorithm. A short 100 ps NPT equilibration was performed similar to the NVT equilibration. During the production run, the V-rescale thermostat and Parrinello–Rahman barostat stabilized the temperature at 300 K and pressure at 1 bar, respectively. The simulations were performed for 1  $\mu$ s for each system and coordinates were saved every 100 ps. The MD analyzes of the Root Mean Square Fluctuation (RMSF) were performed using GROMACS utilities. Trajectories have been centered and fitted on the coiled-coiled domain of VAP-A. Movies and images have been generated with VMD and PyMOL 2.0 software, respectively.

## QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

In cryo-EM images, the lipid bilayer of the vesicles or of the ribbons is identifiable and serves as landmarks for distance measurements. The lengths of the extramembraneous domains of VAP-A<sup>FL</sup>-WT and sL1/2 are reported from the electron densities extending at the largest distances from the membrane. Measurements were made every 20 nm along the membranes of vesicles or ribbons.

For EGFP-VAP-A enrichment at the TGN area, a TGN mask was applied on the GFP channel and a ratio between the average fluorescence in this area and the average fluorescence in the rest of the cell (i.e., cell minus TGN area) is determined. For TGN/cytosol ratios of OSBP, P4M, CTL and CERT, two regions of interest (ROIs) of the same area were drawn in the TGN and in the cytosol. The average fluorescence was determined for each ROI and the ratio was then calculated. In all superplots illustrating image quantification, each point represents one cell analyzed, and each experiment was performed 3 times independently. Statistical analyzes were done in Prism \* p < 0.1, \*\*p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001. The scale bars in widefield, confocal and STED images are 10 μm, and 2 μm in zoomed images. The images were shared, treated and edited using OMERO.web, OMERO.iviewer, OMERO.figure from an OMERO image database from the Université Côte d'Azur and EMBRC-France OMERO Database.

Colocalization quantifications were done using Coloc 2 Pearson test on Fiji software (ImageJ, NIH). Kymographs were generated using the Metamorph software (Molecular Devices) from a rectangle drawn on the image stack and projected across time of the complete time series. Scan line quantifications were generated using Fiji software. For mCherry-D4H quantification at the PM a mask of WGA was applied on the D4H channel, normalized by the total intensity in the field and by the control condition; one point represents one field analyzed; experiments were repeated 3 times independently with 8 fields analyzed per experiment.

To quantify mitochondria morphology, maximum intensity projection images from confocal z-series were processed automatically through a custom pipeline in CellProfiler (Broad Institute). Images were first background corrected and a gaussian filter was applied using the *CorrectIllumination* module. Mitochondria were then accentuated and binarized using the *EnhanceOrSuppressFeatures* and *Threshold* modules. Thereafter, images were cleaned using the *Morph* module, and mitochondria (objects) were identified using the *IdentifyPrimaryObject* module. Finally, the *MeasureObjectSizeShape* module enabled measuring objects shape, notably according to the form factor  $[(4 \times \pi \times \text{Area}) / \text{Perimeter}^2]$ . Values were then ranked in a histogram where the number of mitochondria for each form factor value was normalized to the total mitochondria count. Data was further normalized to the mean maximum count of the WT condition. For TEM images quantification, mitochondria width was measured in Fiji (Image J, NIH) by drawing straight lines. One point represents one mitochondrion analyzed.

**Developmental Cell, Volume 58**

**Supplemental information**

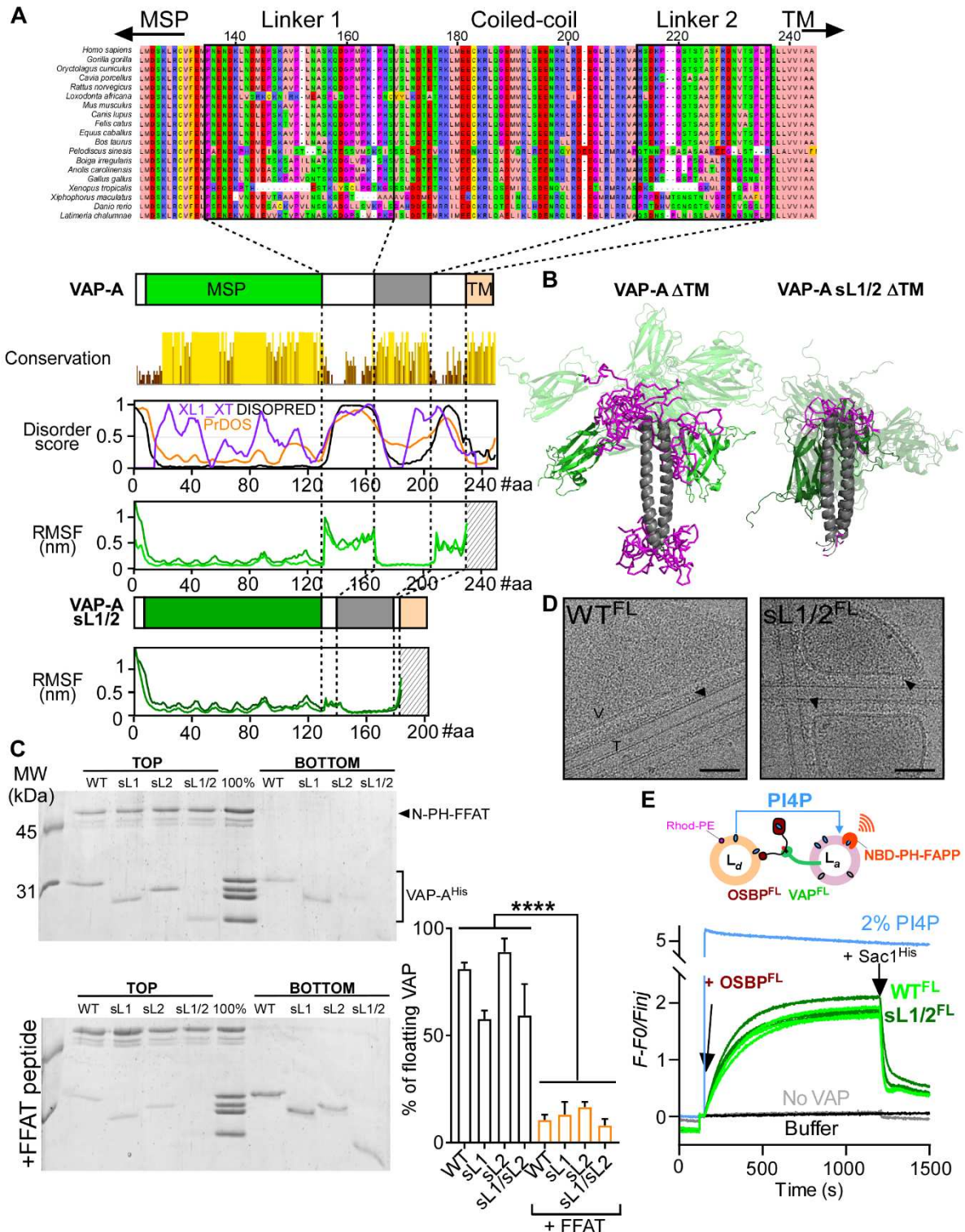
**VAP-A intrinsically disordered regions enable  
versatile tethering at membrane contact sites**

**Mélody Subra, Manuela Dezi, Joëlle Bigay, Sandra Lacas-Gervais, Aurélie Di Cicco, Ana Rita Dias Araújo, Sophie Abélanet, Lucile Fleuriot, Delphine Debayle, Romain Gautier, Amanda Patel, Fanny Roussi, Bruno Antony, Daniel Lévy, and Bruno Mesmin**



**Mélody Subra et al., VAP-A intrinsically disordered regions enable versatile tethering at membrane contact sites**

**SUPPLEMENTAL INFORMATION**



**Figure S1. Intrinsically disordered regions in VAP-A. Related to figure 1.**

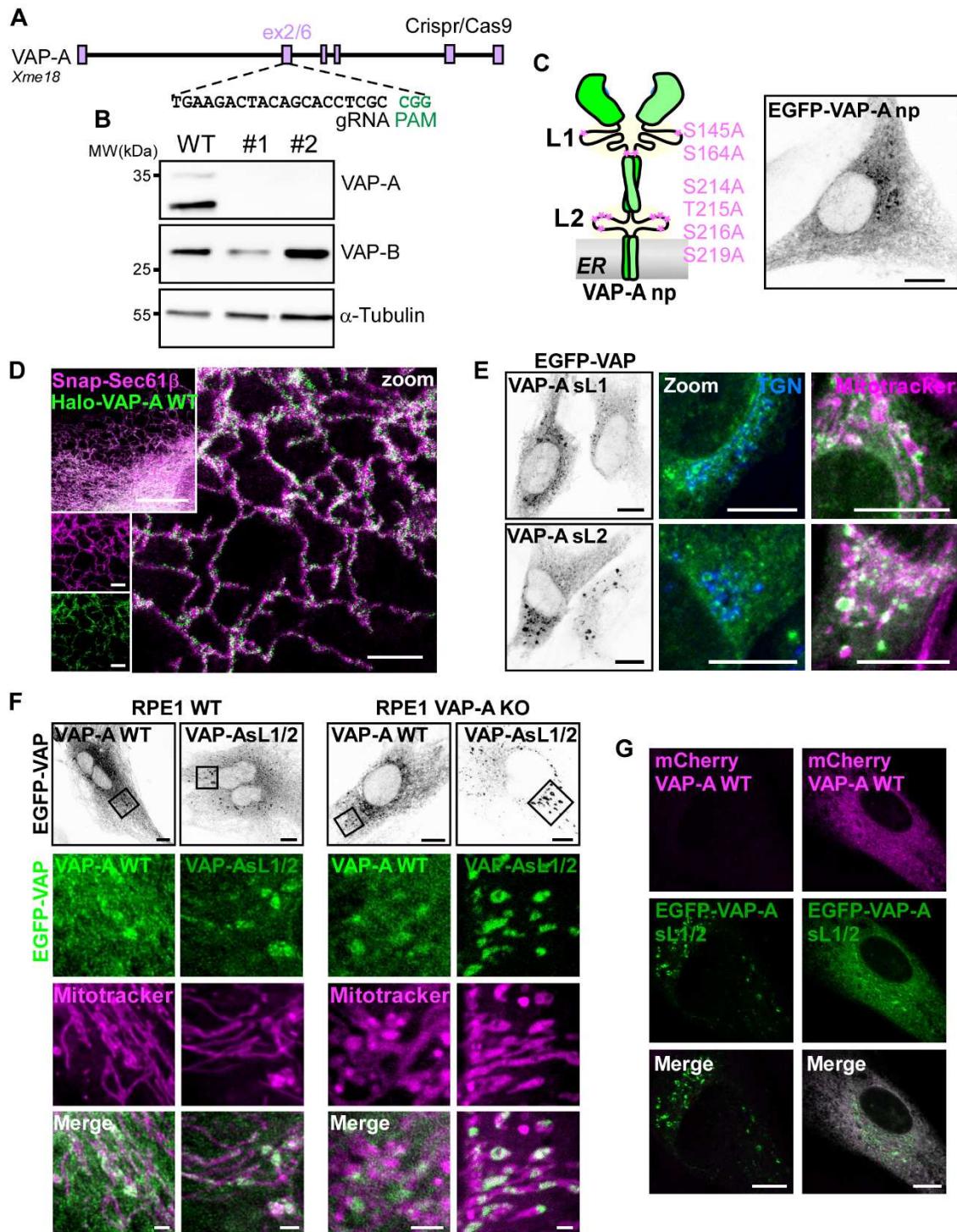
(A) Clustal-O alignment of VAP-A sequences from vertebrates. The conservation score (yellow scale) is proportional to the bars' height. Intrinsic disorder prediction from different algorithms (XL1\_XT, DISOPRED and PrDOS) suggests that linkers 1 and 2 are unstructured. The RMSF is calculated from molecular dynamics simulations with VAP-A  $\Delta$ TM. The two lines represent RMSF of each monomer of the dimeric protein. Linker regions show greater fluctuation sizes. By contrast, VAP-A short linkers (sL1/2) show fluctuations indistinguishable from the rest of the structure, as expected.

(B) Snapshots from molecular dynamics simulations of VAP-A WT or sL1/2 ( $\Delta$ TM), built with the AlphaFold2 tool [S1], showing that the movements of the MSP are more restricted with the mutant construct.

(C) Flotation assay. N-PH-FFAT bound to PI(4)P liposomes was incubated with VAP-A<sup>His</sup> WT or sL mutant constructs. The suspension was adjusted to 30% w/v sucrose and overlaid with two cushions of decreasing sucrose density. After ultracentrifugation, the top and bottom fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE and Sypro-orange staining. Proteins bound to liposomes were retrieved on the top fraction. Bottom; a peptide encompassing the FFAT motif of OSBP was added as a competitor. Right; quantification of the fraction of VAP-A<sup>His</sup> bound to N-PH-FFAT. Data are mean of 3 independent experiments  $\pm$  SEM.

(D) Representative cryo-EM images of *in vitro* reconstituted MCS between proteoliposomes containing VAP-A WT or sL1/2 (LPR 70 mol/mol) and N-PH-FFAT bound to galactosylcerebroside nanotubes doped with PI(4)P. Protein densities at MCS are indicated by arrowheads. V: vesicle; T: tube. Bar: 50 nm.

(E) Real-time measurement of OSBP-mediated PI(4)P transfer *in vitro*. As described previously [S2], the specific PI(4)P probe NBD-labelled PH-FAPP1 (250 nM) was mixed with donor liposomes ( $L_d$ ; 250  $\mu$ M lipids containing 4 mol% PI(4)P and 2 mol% Rhod-PE) and acceptor liposomes ( $L_a$ ; 250  $\mu$ M lipids containing 2 mol% DGS-NTA(Ni) and 150 nM VAP-A reconstituted at LPR 1300 mol/mol). At  $t=150$ s, OSBP (100 nM) was added to the mix. Thereafter, Sac1<sup>His</sup> (100 nM) was added at  $t=1200$ s in order to hydrolyze PI(4)P transferred to  $L_a$ . The blue curve represents the signal for full equilibration of PI(4)P between  $L_d$  and  $L_a$ .



**Figure S2. CRISPR/Cas9-mediated KO and subcellular localization of VAP-A mutants. Related to figure 2.**

(A and B) CRISPR/Cas9 generation of RPE-1 VAP-A KO cells, targeting strategy and Western blot analyses.

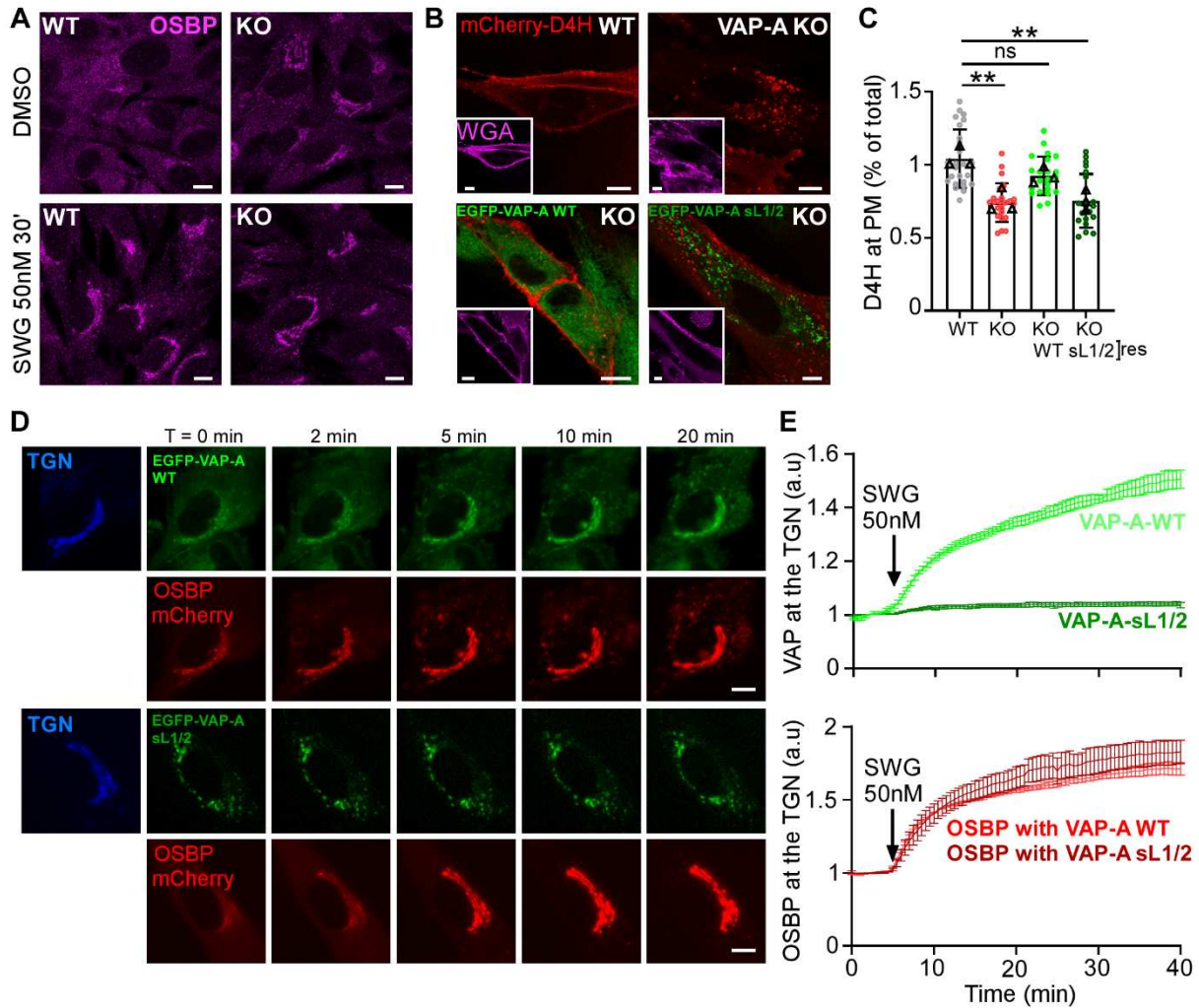
(C) Representative image of RPE-1 VAP-A KO cell expressing EGFP-VAP-A np, in which all phosphorylatable residues present in the linkers were replaced by alanines.

(D) STED image showing colocalization between Halo-VAP-A WT and the ER labelled by Snap-Sec61 $\beta$ .

(E) Confocal images showing partial redistribution of EGFP-VAP-A sL1 or sL2 to ER-Mito MCS in RPE1 cells KO for endogenous VAP-A.

(F) Comparison of EGFP-VAP-A WT or sL1/2 expressed in WT RPE-1 or in VAP-A KO RPE-1. The relocation of VAP-A sL1/2 to mitochondria is attenuated in RPE1 containing endogenous VAP-A WT.

(G) The co-expression of mCherry-VAP-A WT with EGFP-VAP-A sL1/2 in VAP-A KO RPE1 cells redistributes EGFP-VAP-A sL1/2 away from ER-Mito MCS. Data from (F) and (G) suggest that the mutant is able to form heterodimer with WT forms.

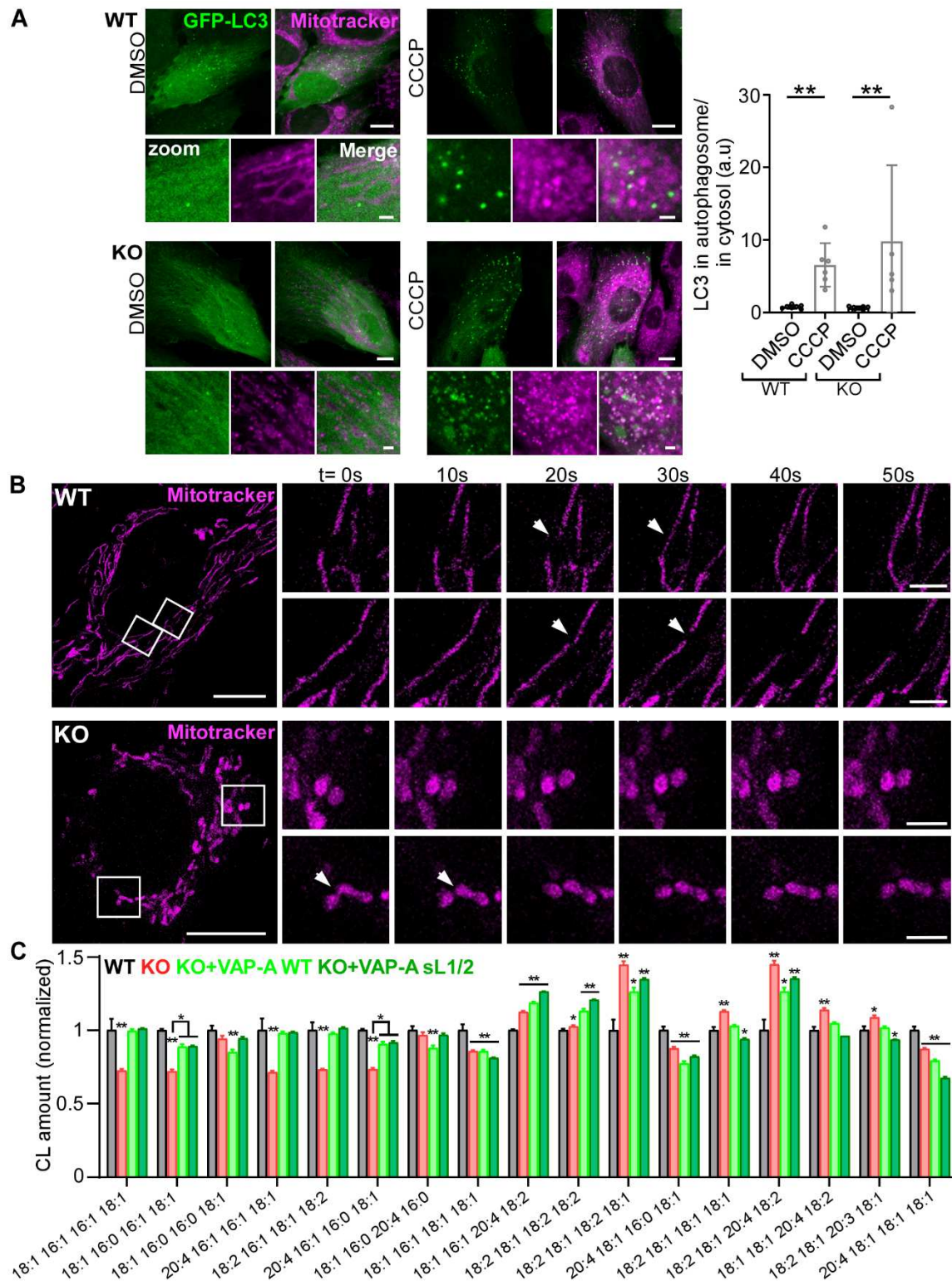


**Figure S3. Effects of OSBP inhibitor SWG treatment and cholesterol probe distribution. Related to figure 3.**

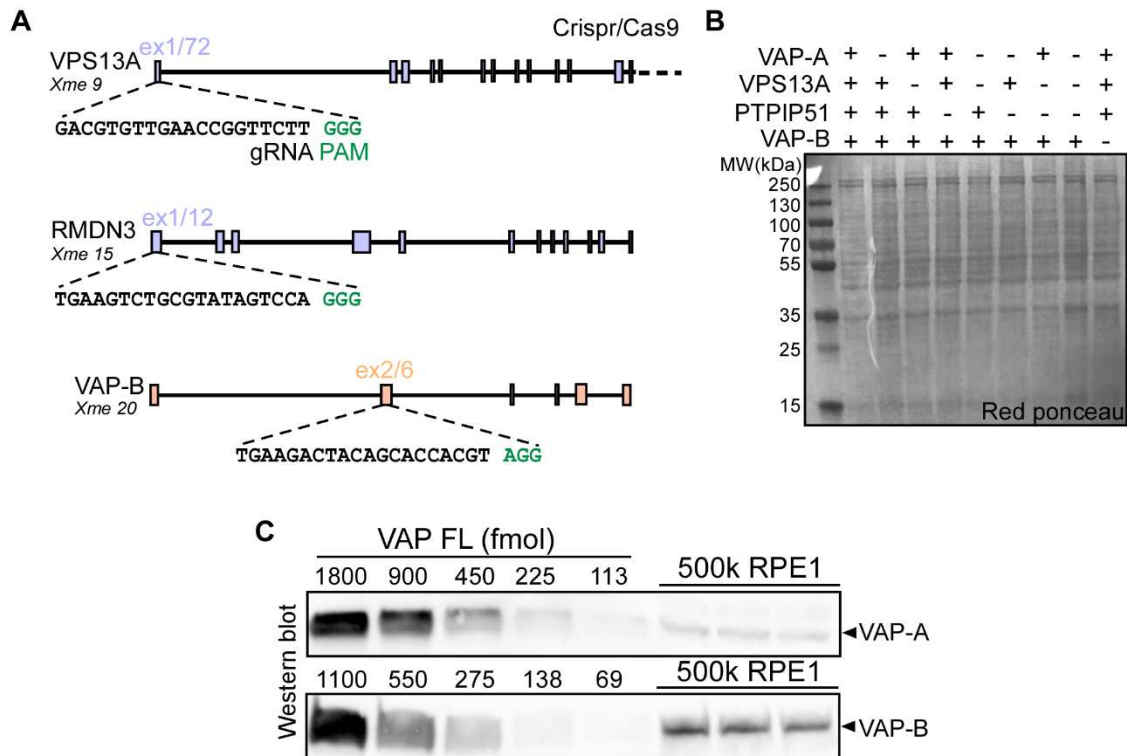
(A) Confocal images showing endogenous OSBP distribution in WT or VAP-A KO RPE-1 cells upon SWG (50 nM) treatment during 30 min.

(B and C) Cells were transfected with the cholesterol probe mCherry-D4H and labeled with the plasma membrane marker WGA-Alexa Fluor 647. The plot shows the amount of mCherry-D4H at the plasma membrane. Mean of 3 independent experiments  $\pm$  SEM (24 fields were analyzed).

(D and E) Time-lapse imaging of VAP-A KO cells co-expressing EGFP-VAP-A WT or sL1/2, OSBP-mCherry, and the TGN marker TagBFP- $\beta$ GalT1. OSBP and VAP-A WT, but not VAP-A sL1/2, are rapidly recruited to ER-Golgi MCS upon SWG (50 nM) addition. Graphs show the normalized mean fluorescence intensity of OSBP-mCherry or EGFP-VAP-A from TGN regions over the time course. Data are mean of 3 independent experiments  $\pm$  SEM (n= 45 cells analyzed).



**Figure S4. VAP-A KO impairs mitochondrial fusion and CL metabolisms. Related to figure 4.** (A) Confocal images of RPE1 cells WT or KO for VAP-A expressing the autophagy marker GFP-LC3 in DMSO (control) or CCCP (mitophagy inducer) treatment conditions. The graph on the right is the quantification of the LC3 intensity at autophagosomes. (B) Time-lapse confocal imaging of Mitotracker featuring mitochondrial fusion and fission events (arrowheads). Fission, but no fusion, was observed in VAP-A KO cells. (C) Quantification of CL species amount by LC-MS/MS. The relative areas are normalized to the control condition. Data are mean of 4 independent experiments  $\pm$  SEM.



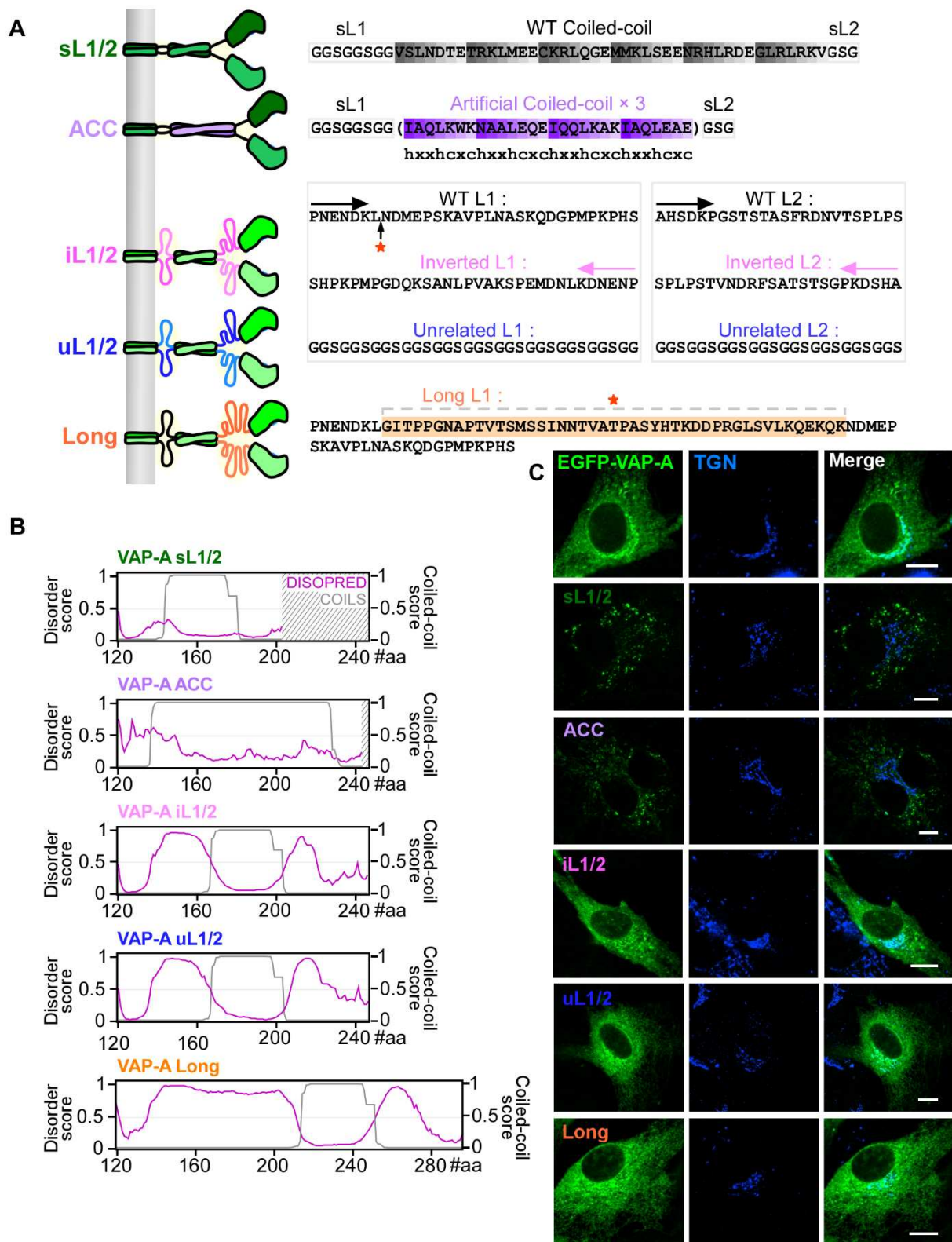
**Figure S5. Crispr/Cas9 KO strategy and endogenous VAP quantification in RPE1 cells. Related to figure 5.**

(A) Generation of RPE1 cell lines KO for VAP-A/B, PTPIP51 and/or VPS13A by CRISPR/Cas9.

(B) Red ponceau staining corresponding to the Western blot showed in fig. 5a.

(C) Quantification of endogenous VAP-A and VAP-B in RPE1 cells by Western blot. Standards are from known amounts of purified full-length VAP-A or VAP-B. Total lysate from 500,000 cells was loaded in each of the three last lanes. Proteins were then immunoblotted with anti-VAP-A (top) or anti-VAP-B (bottom). We measured that one RPE1 cell contains 122 fmol (~147,000 molecules) of VAP-A and 254 fmol (~306,000 molecules) of VAP-B.





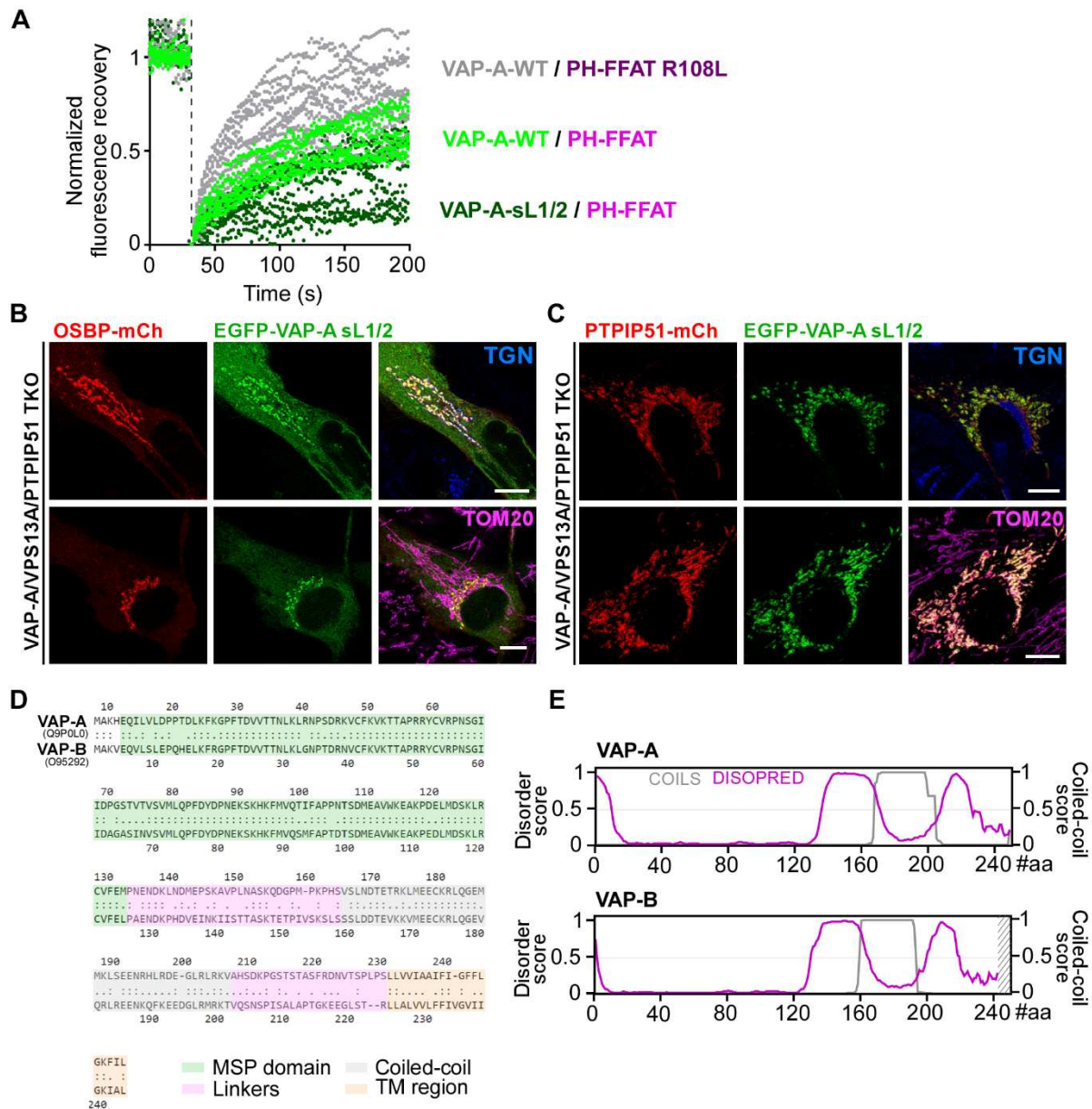
**Figure S6. VAP-A constructs and their subcellular localization. Related to figure 6.**

(A) Domain organization of the different VAP-A rigid and flexible constructs (left), and the corresponding sequences of their coiled-coil and/or linker regions (right). The original coiled-coil in VAP-A sL1/2 (gray), comprising 6 heptads, was replaced by an artificial coiled-coil (ACC) in VAP-A ACC (purple). The ACC is formed by three repeats of 4 heptads, as designed previously [S3]. Among the flexible VAP-A mutant constructs, VAP-A iL1/2 has its linkers inverted with respect to

the WT linkers. In this case, neither the length nor the composition in amino acids is changed, but only their sequences differ. In VAP-A uL1/2, the original linkers are replaced by Gly/Ser-rich sequences of the same length. Regarding VAP-A Long, it is a natural isoform of VAP-A (UniProt ID: Q9POL0-2), containing an insertion of 45 amino acids within the linker 1 (orange). The position of the insertion in the linker 1 is indicated by a red star.

(B) Disorder prediction (from DISOPRED, magenta curves) and coiled-coil probability score (from COILS, grey curves) for regions downstream the MSP domain, for each VAP-A construct described in (A). Note that the linker 1 in VAP-A Long is predicted to be intrinsically disordered.

(C) Confocal images of RPE1 VAP-A KO cells transfected with EGFP-VAP-A WT or the mutants described in (A), fixed, permeabilized and stained with anti-TGN46 followed by Alexa Fluor-conjugated secondary antibody to mark the TGN (blue). In contrast to the rigid constructs, all flexible constructs (WT, iL1/2, uL1/2 and VAP-A Long) are distributed throughout the ER and are slightly concentrated in the vicinity of the TGN, which is consistent with their engagement at ER-Golgi MCS.



**Figure S7. FRAP experiment and subcellular distribution of EGFP-VAP-A sL1/2. Comparison between VAP-A and VAP-B. Related to figure 7.**

(A) FRAP analysis performed on EGFP VAP-A WT or sL1/2 on RPE1 cells coexpressing PH-FFAT-mCherry WT or R108L, as indicated. Data are from 2 independent experiments ( $n \approx 10$  cells analyzed).

(B and C) Transient expression of EGFP-VAP-A-sL1/2 with OSBP-mCherry or PTPIP51-mCherry in RPE-1 KO for VAP-A, VPS13A and PTPIP51.

(D) Sequence alignment of Human VAP-A [8-249] and VAP-B [1-243] (by using LALIGN), showing 62.9% of identity and 85.3% of similarity. The main differences between the two sequences are concern linkers and coiled-coil regions.

(E) Disorder prediction (from DISOPRED, pink) and Coiled-coil prediction (from COILS, grey) for Human VAP-A and VAP-B.

## Supplemental references

S1. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. [10.1038/s41586-021-03819-2](https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2).

S2. Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J., Lacas-Gervais, S., Drin, G., and Antonny, B. (2013). A Four-Step Cycle Driven by PI(4)P Hydrolysis Directs Sterol/PI(4)P Exchange by the ER-Golgi Tether OSBP. *Cell* 155, 830–843. [10.1016/j.cell.2013.09.056](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.056).

S3. Horchani, H., Saint-Jean, M. de, Barelli, H., and Antonny, B. (2014). Interaction of the Spo20 Membrane-Sensor Motif with Phosphatidic Acid and Other Anionic Lipids, and Influence of the Membrane Environment. *Plos One* 9, e113484. [10.1371/journal.pone.0113484](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113484).



# New insights into the OSBP–VAP cycle

Mélody Subra, Bruno Antony and Bruno Mesmin

## Abstract

VAP-A is a major endoplasmic reticulum (ER) receptor that allows this organelle to engage numerous membrane contact sites with other organelles. One highly studied example is the formation of contact sites through VAP-A interaction with Oxysterol-binding protein (OSBP). This lipid transfer protein transports cholesterol from the ER to the trans-Golgi network owing to the counter-exchange of the phosphoinositide PI(4)P. In this review, we highlight recent studies that advance our understanding of the OSBP cycle and extend the model of lipid exchange to other cellular contexts and other physiological and pathological conditions.

## Addresses

Université Côte d'Azur, Inserm, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 660 Route des Lucioles, 06560, Valbonne, France

Corresponding authors: Mesmin, Bruno ([mesmin@ipmc.cnrs.fr](mailto:mesmin@ipmc.cnrs.fr)); Antony, Bruno ([antony@ipmc.cnrs.fr](mailto:antony@ipmc.cnrs.fr))

Current Opinion in Cell Biology 2023, 82:102172

This review comes from a themed issue on **Membrane Trafficking (2023)**

Edited by Karin Reinisch and Aurélien Roux

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online xxx

<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102172>

0955-0674/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

In eukaryotic cells, the membranes of each organelle have a unique lipid composition, which is adapted to their functions [1]. This lipid heterogeneity between compartments is maintained by elaborated lipid trafficking mechanisms, notably involving a large group of proteins called lipid transfer proteins (LTPs). One of the best-studied family of LTPs comprises Oxysterol-binding protein (OSBP), OSBP-related proteins (ORPs) and the yeast OSBP homology proteins (Osh proteins). There are 12 ORPs including OSBP in humans, and 7 Osh proteins in *Saccharomyces cerevisiae* [2,3], all containing a conserved OSBP-related domain (ORD), which encompasses a hydrophobic pocket responsible for lipid solubilization in the cytosol and transfer between membranes. OSBP, the founder member of this family, is ubiquitously expressed and essential for life. It was

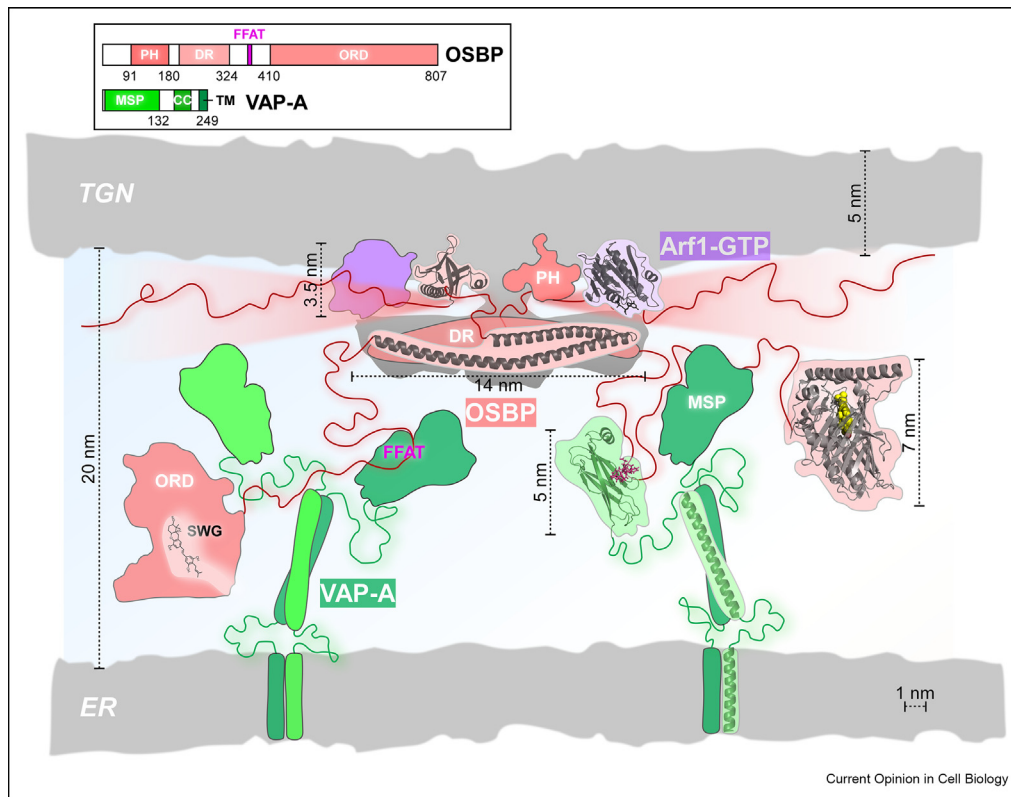
initially characterized in the early 1990s as an intracellular receptor for oxysterols [4], hence its name; yet, subsequent studies showed that OSBP is not involved in oxysterol signaling and instead pointed out that it efficiently transports cholesterol between organelles [5].

The molecular mechanisms driving OSBP-mediated lipid transport and the resulting cellular implications have been extensively studied over the past decade. It was shown that OSBP binds to phosphatidylinositol 4-phosphate [PI(4)P] and Arf1 at the surface of the trans-Golgi network (TGN) via its N-terminal Pleckstrin homology (PH) domain [6,7], and to the general receptor VAP-A at the endoplasmic reticulum (ER) via a central “two phenylalanines in an acidic tract” (FFAT) motif (Figure 1) [8,9]. We proposed about 10 years ago a model in which membrane tethering mediated by the PH-FFAT moiety of OSBP directs lipid transfer by the C-terminal ORD domain [10]. Cholesterol transported by OSBP from the ER to the TGN is counter-exchanged for PI(4)P, which is synthesized by kinases at the TGN and, upon transfer to the ER, hydrolyzed by the phosphatase Sac1. This mechanism lies in the ability of the ORD domain to accommodate two chemically very different lipids, cholesterol or PI(4)P, alternatively. In this regard, other ORP/Osh proteins also act as lipid exchangers and use the PI(4)P gradient for unidirectional phosphatidylserine (PS) transfer between organelles [11]. Whether other lipids are also transported in a vectorial manner using PI(4)P counter exchange by other ORPs is not known. In the case of OSBP, we further proposed that this mechanism creates a negative feedback loop: OSBP detaches from PI(4)P-depleted membrane regions resulting from OSBP lipid exchange activity, thereby explaining the partial cytosolic distribution of OSBP and its oscillatory binding behavior to the TGN surface [10,12]. Thus, OSBP couples cholesterol transport to PI(4)P turnover in a spatiotemporal manner, and dynamically modulates membrane tethering.

## New structural features of the OSBP-VAP complex

Key structural elements of OSBP were defined recently. First, the crystal structure of the ORD domain of OSBP (residues 406–807) was solved in complex with cholesterol (Figure 1) [13]. This structure is very similar to that of ORD domains of other ORPs/Osh proteins. The structure is organized around a central 12-strand beta

Figure 1



**Model of the structural organization of the OSBP/VAP-A complex at ER-TGN MCS.** OSBP is represented in red, VAP-A in green and Arf1 in purple. This model and the structures presented are intended to be to scale. The PH domain of OSBP binds to the TGN surface by interacting with PI(4)P and Arf1-GTP, and its FFAT motif is recognized by the MSP domain of the ER-receptor VAP-A. The dimerization region of OSBP (DR) may form a helix bundle of two hairpins according to the cryo-EM envelope (dark gray) and structure predictions. The X-ray structure of the ORD of OSBP bound to a cholesterol molecule (in yellow) is presented on the right, whereas a SWG molecule inserted into the hydrophobic pocket is depicted on the left. Note that the OSBP/VAP-A stoichiometry is poorly defined, therefore this model showing one OSBP dimer interacting with two VAP-A dimers remains hypothetical. In addition, the many IDRs of both OSBP and VAP-A (represented by strings) can make the distance between membranes variable. (For interpretation of the reference to color in the figure legend, the reader is referred to the web version for this article)

barrel fold that defines the lipid binding pocket as well as N-terminal and C-terminal regions, which surround the beta barrel. A network of hydrophobic residues oriented into the interior of the barrel form the cholesterol-binding site whereas an N-terminal lid covers the entrance to the hydrophobic tunnel. The cholesterol hydroxyl group is maintained at the bottom of the cavity by three polar residues (D453, S483, K577) forming hydrogen bonds. Nevertheless, the study suggests that hydrophobic interactions between the tetracyclic ring of cholesterol and non-polar residues contribute the most to ligand binding. Other structural features of the ORD, such as a long C-terminal helix, are highly conserved among ORPs/Osh proteins as well. Further structural work will be needed to dissect how the interaction of VAP with the FFAT motif of OSBP, which is upstream of the ORD, facilitates lipid exchange.

Cryo-electron tomography and sub-tomogram averaging have recently provided unexpected information on the

dimerization region of OSBP, which extends between its PH domain and FFAT motif [14]. Analyses of reconstituted membrane contact site (MCS) samples formed by VAP-A/N-PH-FFAT *in vitro* showed that OSBP dimerizes via a rigid structure oriented parallel to the membrane (Figure 1). Further biochemical and modeling data suggested that the dimerization region comprises a bundle of two  $\alpha$ -helical hairpins, where the two N-termini of the dimer are at the center of the bundle while the C-termini are at its ends [14]. This organization suggests that the two FFAT motifs of the OSBP dimer are far apart, which could facilitate independent movement of the ORD domains between membranes.

Many proteins that are enriched in MCS contain intrinsically disordered regions (IDRs), including OSBP, which has a N-terminal IDR of 91 residues (N-ter). Unlike other domains of OSBP, the function of this IDR was overlooked until recently. IDRs are associated with

different protein functions, such as molecular interaction (e.g., through peptide motif recognition; FFAT motifs are typically found in IDRs), condensate formation, cell signaling, and disease [15]. It is also well established that random flexible movements of IDRs create a large exclusion volume, also called entropic barrier; accordingly, the surface density of an OSBP construct lacking the N-ter was much higher at MCS than that of full-length OSBP. Moreover, the mobility of OSBP constructs bearing the N-ter was almost one order of magnitude faster than that of constructs lacking the N-ter [16]. Thus, the long IDR of OSBP might prevent protein overcrowding at MCS, thereby facilitating protein lateral movements. Interestingly, most of the ORPs have predicted IDRs at their N-termini suggesting a general mechanism for rapid turnover of proteins at MCS [16]. However, these regions show striking differences in length and amino-acid composition suggesting additional roles beyond the entropic barrier model.

Although the structural basis of the interaction between VAP-A Major Sperm Protein (MSP) domain and the FFAT motif is well characterized, there is no model for how VAP interacts with hundreds of targets in MCSs that are so different in geometry and lifetime. Recent cryo-EM structural analysis shows that VAP can tune its length to form MCSs of adjustable thickness (10–30 nm), *in vitro* [14]. We further reported that VAP-A contain two stretchable IDRs that make VAP-A highly flexible (Figure 1). Importantly, these IDRs ensure VAP-A engagement and function at different MCSs: replacing endogenous VAP-A with a rigid construct massively redistributes the protein to stable ER-mitochondria MCS at the expense of short-lived ER-TGN MCS, thereby affecting lipid fluxes between these organelles [17]. Thus, the conformational flexibility mediated by VAP-A IDRs ensures membrane tethering plasticity and efficiency.

### Pharmacological targeting of OSBP and ORPs

Pharmacological inhibition of OSBP/ORPs became possible when Burgett and colleagues identified ORPphilins as naturally occurring molecules targeting specifically OSBP and ORP4L. ORPphilins, which include OSW-1, cephalostatin, stelletin, and schweinfurthin subfamilies, have various structures and display cytotoxic and antiproliferative properties, [18]. They provide pharmacological tools to address basic principles regarding the cellular functions of the OSBP-VAP complex at MCSs. For example, schweinfurthin G (SWG) was recently shown to directly bind to the lipid-binding cavity of OSBP with nanomolar affinity and inhibit its lipid exchange activity; as a consequence, post-Golgi trafficking, membrane cholesterol levels, and PI(4)P turnover were strongly affected [19]. Interestingly, transient treatment with OSW-1, but not with other

OSBP inhibitors, was shown to induce long-term reduction of cellular OSBP levels by ~90% in different cell lines [20]. How OSW-1 represses OSBP expression has not been defined yet, but this led to the finding that OSBP is a long-lived protein, not rapidly turned over in cells. Pharmacological effects of OSBP/ORP inhibition were also assessed on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), notably on their lipidome and transcriptome. SWG treatment decreased PS and its rate of synthesis, whereas it increased cholesteryl esters, triacylglycerols and lipid droplet number [21]. Moreover, a number of ER stress related pathways were turned on in SWG-treated HUVECs, which could be a consequence of lipid transport and metabolism dysfunction.

Beyond ORPphilins, other OSBP-targeting compounds have been reported, including TTP-8307 [22], enviroxime-like molecules [23], and triazoles such as itraconazole (ITZ) and posaconazole (POS) [24,25]. Although they all exhibit potent inhibitory effects on OSBP, their differential affinity for OSBP and interactions with the cellular environment and/or with other targets (for example ITZ and POS also target NPC1 and block the Hedgehog pathway), can result in divergent physiological consequences. Nevertheless, evidence suggests that the development of OSBP inhibitors such as ORPphilin derivatives may be helpful for human pathophysiology. First, although the direct role of OSBP in cancer is debated, the involvement of ORP4L in cell proliferation and tumor transformation has been demonstrated. A recent study showed that in T-cell leukemia cells, ORP4L dimerizes with OSBP to control the shuttling of OSBP between Golgi and PM. This change in OSBP distribution leads to PI(4)P transport to the PM, thereby promoting PI(4,5)P<sub>2</sub> and PI(3,4,5)P<sub>3</sub> synthesis. The resulting increase in PI(3,4,5)P<sub>3</sub> level contributes to PI3K/Akt hyperactivation and leukemogenesis [26]. Second, many single-stranded RNA-positive viruses infecting humans, such as rhinovirus, hepatitis C virus, poliovirus, dengue and Zika virus, hijack the OSBP machinery to their benefit [27,28]. These viruses create intracellular replication organelles (ROs) highly enriched in PI(4)P that enable viral replication and protect genomic RNA from innate immune response factors. In this context, the PI-transfer protein Nir2, PI4-kinases as well as OSBP are diverted to provide cholesterol to RO membranes [29]. Importantly, targeting OSBP with inhibitory compounds (or siRNA) inhibits replication of several viruses [30,31]. Beyond viral infection, it has recently been shown that OSBP and other ORPs are also hijacked during infections by intracellular bacteria, including *Salmonella typhimurium* and *Legionella pneumophila*, which cause a range of human diseases [32,33]. Better understanding of how OSBP/ORPs control normal physiology and how they are involved in disease and infections when subverted by intracellular pathogens is important, as these proteins may constitute an emerging class of drug targets.

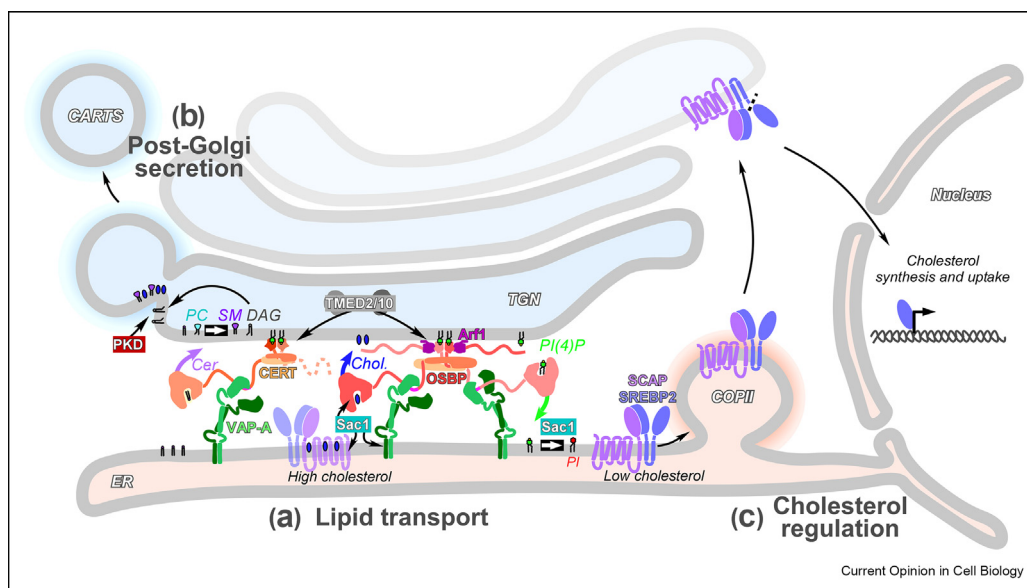
### OSBP site of actions – ER-TGN contact sites and other locations

At ER-TGN MCS, OSBP enables membrane remodeling, which contributes to the biogenesis of vesicle CARRIERS of the TGN to the cell Surface (CARTS) and cholesterol buildup in late secretory compartments, including the plasma membrane (PM). Along with OSBP, other LTPs at ER-TGN MCS, such as ceramide-transfer protein (CERT), which determines the formation of sphingomyelin (SM) in TGN membranes, establish a lipid order gradient across the secretory pathway, and mediate cross-regulation of LTPs and lipid transfer at ER-TGN MCS [34]. Recent studies identified further regulatory elements that reinforce the targeting of these LTPs at ER-TGN MCS (Figure 2). First, the p24 protein family members TMED2 and TMED10 were shown to act as essential organizers of a supercomplex containing OSBP, VAP-A, Sac1 and CERT, thereby coordinating both cholesterol and ceramide exchange at ER-TGN MCS [35]. Interestingly, TMED2/10 were discovered through a RNAi screen to identify cellular mediators of anthrax intoxication, which involves association with cholesterol-rich nanodomains at the cell surface. Mechanistically, TMED2/10 cytosolic tails might guide the local recruitment Arf1 to the TGN membrane, which subsequently determines OSBP and CERT site of action. In a second study, Tagaya and colleagues, who previously reported an interaction between Sac1 and OSBP, identified the cholesterol

sensor Scap as a new component of ER-TGN MCS [36,37]. It is well known that cellular cholesterol levels are fine-tuned by the sterol regulatory element-binding protein (SREBP-2) transcription factor. When cholesterol levels in the ER are low, SREBP-2 is escorted by Scap from the ER to the Golgi [38]. There, SREBP-2 is cleaved by proteases, enabling its transcriptionally active domain to enter the nucleus and promote expression of genes involved in cholesterol synthesis and uptake. Using immunoprecipitation of FLAG-tagged Sac1 and mass spectrometry analysis, the authors revealed that Scap interacts with the OSBP-VAP complex via Sac1, thereby facilitating OSBP activity and thus CARTS biogenesis [37]. Cholesterol-sensing-defective Scap mutants could not mediate this effect, suggesting that Scap conformation in cholesterol-fed cells primes the Sac1-OSBP-VAP-A complex for cholesterol transport to the TGN.

Because PI(4)P is not restricted to the TGN [39], OSBP can visit other organelles, such as endosomes and lysosomes. For example, when engaged along with VAP at ER-Lysosome MCSs, OSBP enables cholesterol transport to this compartment (Figure 3). Two recent studies described a new role for PI(4)P, OSBP and several ORPs in lysosomal membrane repair [40,41]. Lysosome permeabilization, which occurs in many age-related pathologies, causes Ca<sup>2+</sup> release in the cytosol. This leads to the recruitment of the kinase PI4KII $\alpha$  to

Figure 2



**OSBP at the crossroad between the cholesterol-sensing machinery and post-Golgi secretion at ER-TGN MCS.** Through their lipid exchange activity (a) OSBP and CERT, stabilized by TMED2/10, contribute to TGN membrane remodeling and enable CARTS biogenesis (b). Diacylglycerol (DAG), which is produced by the SM-synthase along with SM, recruits PKD which initiates membrane budding. In parallel, the Scap/SREBP2 cholesterol sensor machinery also contributes to CARTS biogenesis (c): when cholesterol levels are high, Scap interacts with the OSBP/VAP complex via Sac1, thereby facilitating OSBP activity.



the lysosome surface, which synthesizes PI(4)P and subsequently recruits OSBP, ORP9, ORP10 and ORP11. Thereafter, ER/Lysosome MCSs mediated by OSBP/ORPs and VAP-A lead to cholesterol and PS exchange against PI(4)P that help membrane repair. Of note, PS transport to lysosomes activates ATG2, a tunnel-like LTP, which also participates in the rapid repair of the lysosome, thus amplifying this process.

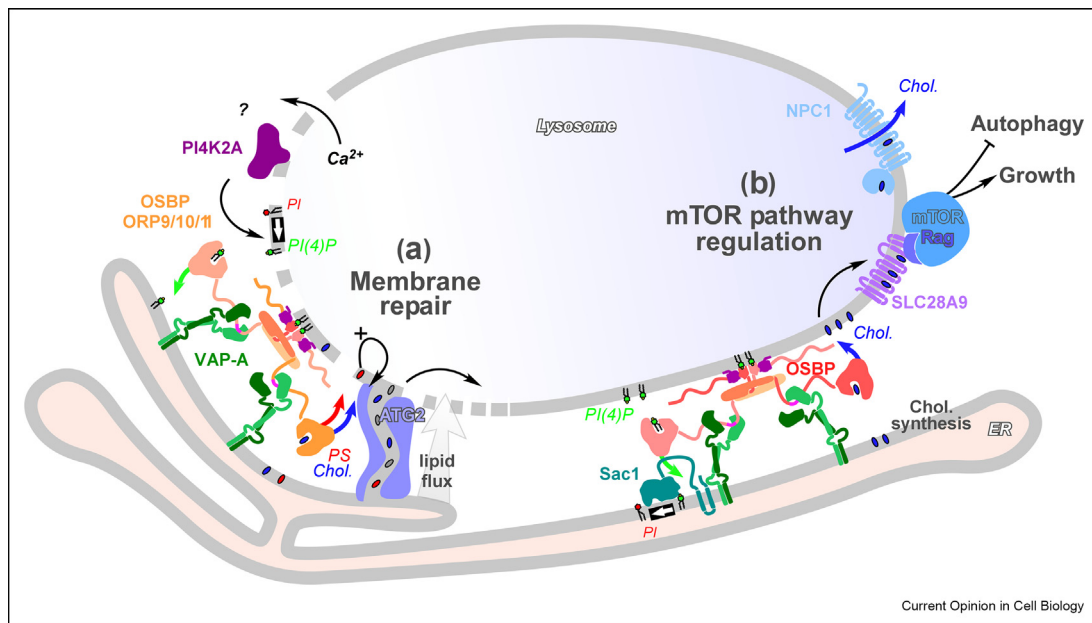
Lysosomal cholesterol levels are also regulated by Niemann-Pick type-C disease protein 1 (NPC1), which enables LDL-derived cholesterol to reach the lysosome limiting membrane. High cholesterol levels in this membrane activates the guanine nucleotide exchange factor of Rag GTPases, which trigger the recruitment mTORC to the lysosome surface that turns on important metabolic pathways, including ribosome biogenesis, SREBP activation, and autophagy inhibition. Counter-intuitively, loss of NPC1 results in mTORC1 hyperactivation and lysosomal and mitochondrial dysfunction. Zoncu and colleagues showed that in NPC1-deficient cells, cholesterol accumulates both inside lysosomes and on their limiting membranes. This latter accumulation is due to OSBP activity [42]. Furthermore, inhibition of OSBP by shRNA or by OSW-1 corrects aberrant mTORC1 signaling in NPC1-deficient cells, and restores autophagy.

Other findings suggest that MCSs between recycling endosomes (RE) and TGN also involve OSBP and are important for intracellular cholesterol distribution. In these MCS that do not contain VAP, OSBP interacts with the protein RELCH, a newly identified Rab11 effector, *via* its HEAT repeat motifs [43]. Reconstitution experiments showed that the Rab11/RELCH/OSBP complex bridges membranes mimicking TGN and RE, and allows OSBP to transfer cholesterol toward TGN-like membranes. Finally, a study focusing on spermatogenesis in nematodes showed that the polarized distribution of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pump, which occurs during sperm activation and is crucial for *Caenorhabditis elegans* sperm motility, depends on cholesterol/PI(4)P exchange at MCSs between plasma membrane and specific membranous organelles [44]. Lipid remodeling at these MCSs is mediated by OSBP, VAP, and Sac1 orthologs, as well as the protein CIL-1, an ortholog of the human inositol 5-phosphatase K (INPP5K), which preferentially converts PI(4,5)P<sub>2</sub> to PI(4)P.

### PI(4)P-driven transport mechanisms and their regulation

New studies have shown that the OSBP/VAP/Sac1 machinery can be regulated upon activation of important cell signaling pathways. First, Haucke and colleagues

Figure 3



**Role of OSBP and ORPs at ER-lysosome MCS.** (a) OSBP brings cholesterol to lysosome from the ER and thus enables mTORC1 pathway activation. This pathway is controlled by NPC1, which mediates lysosomal cholesterol egress, thereby repressing cholesterol neosynthesis. Conversely, the mTORC1 pathway is stimulated in NPC1-deficient cells. (b) Permeabilization of lysosome releases Ca<sup>2+</sup>, which recruits PI4K1 $\alpha$ . This kinase synthesizes PI(4)P and recruits OSBP, ORP9, ORP10 and ORP11. Subsequently, OSBP/ORP- and VAP-A-mediated ER/Lysosome MCS enable cholesterol and PS transport, hence facilitating membrane repair. PS activates ATG2, which also participates in rapid lysosome repair.

reported that calcium efflux from ER stores induced by inositol triphosphate (IP3) accumulation (e.g., following deregulation of inositol 5-phosphatase INPP5A) leads to cholesterol depletion as well as to reduced levels of the glycosphingolipid Gb3 at the cell surface [45]. They demonstrated that these effects result from the dissociation of OSBP from ER-Golgi MCS following IP3-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. OSBP dissociation can be recapitulated in vitro, since micromolar calcium concentrations interfere with the binding of the PH domain of OSBP to PI(4)P-containing liposomes. Thus, this study links calcium signaling to OSBP-directed cholesterol/PI(4)P exchange. Another study showed that NLRP3-dependent inflammasome activating factors, such as nigericin, lead to accumulation of PI(4)P in endosome membranes, which promotes NLRP3 recruitment to their surface and thus triggers a cell death mechanism called pyroptosis [46]. Increased PI(4)P level in endosomes results from the disruption of ER-endosomes MCS and causes endosomes-to-TGN trafficking defect. It appears that the OSBP-dependent machinery, which operates at ER-endosomes MCS, maintains PI(4)P levels low enough to prevent NLRP3 recruitment and activation. This model is supported by the finding that NLRP3 is constitutively localized in PI(4)P-enriched endosomes in VAP- or OSBP-deficient cells, conditions that potentiate NLRP3 inflammasome activation leading to pyroptotic cell death. How MCS are disrupted upon inflammasome activation remains to be discovered.

As mentioned before, PI(4)P-driven lipid-transport mechanisms are used by many ORPs and Osh proteins in addition to OSBP. For example, ORP5 and 8 and their analogs Osh6 and 7 transport PS between the ER and PM by PI(4)P counter exchange and hydrolysis by Sac1 [47–50]. How these mechanisms are further regulated is the subject of many studies. For example, Balla and colleagues showed that ER-anchored ORP8 attaches to the PM and performs PS/PI(4)P exchange only when PI(4,5)P<sub>2</sub> levels are increased at PM. This mechanism enables adjusting PI(4)P availability to restrict the activity of PIP 5-kinase and ensures that PI(4,5)P<sub>2</sub> levels are maintained within a narrow range [51]. The degree of saturation of the lipid species transported may also modulate transfer rates. It was recently shown that PS transport by Osh6 and ORP8 is generally accelerated by PI(4)P counter-exchange; however, PS transport without counter-exchange is possible provided that PS species are fully saturated [52]. Of note, Osh6/7 localizes to the ER/PM MCS through interaction with the tether protein Ist2, which contains a conserved binding motif in its cytosolic tail. Remarkably, mutations in this motif phenocopies the deletion of Osh6/7 by blocking PS transport to the PM [53]. Last, two studies reported that in response to physiological cues, such as starvation or heat stress conditions, PI(4)P-driven lipid transfer by Osh proteins is highly affected. First, it was shown that Osh1 recruitment to the TGN by PI(4)P is dependent on intracellular pH,

which depends on glucose supply [54]. The pH, through PI(4)P protonation, thus regulates sterol/PI(4)P exchange at ER-TGN MCS, and cargo sorting at the TGN. The second study reported that under heat stress condition, Osh3, but not other Osh proteins, undergoes aggregation. As a result, its localization at ER-PM MCS is impaired, which reduces PI(4)P turnover at the PM of mother cell, thereby leading to non-polarized secretion at the expense of polarized growth [55].

## Conclusion

Following the discovery that OSBP transports cholesterol against PI(4)P, evidence has accumulated that this mode of exchange is neither restricted to OSBP nor to contact sites between ER and TGN. OSBP participates in other MCSs, and other ORPs use PI(4)P as metabolic energy for lipid transfer reactions. Thus, one of the main challenges for the future is to decipher how the OSBP cycle and related mechanisms are controlled during physiological and pathological conditions. These include cell differentiation and cell infection by pathogens. In addition, the OSBP cycle remains very challenging to study at the molecular scale both in terms of protein and lipid dynamics. Thus, our understanding of the VAP-OSBP organization, including the positioning and dynamics of the ORD domain during lipid exchange, remains fragmental. Similarly, imaging lipid distribution at a scale of a MCS, that is in the 10–100 nm range, is difficult although this information is critical to understand how organelle acquire lipids and distribute them temporally and spatially for their functions.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Data availability

No data was used for the research described in the article.

## Acknowledgements

The authors thank Daniel Lévy (Institut Curie, Paris) for discussions. This work is supported by the CNRS, the Inserm, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE13-0021-01), the “Investments for the Future” program LABEX SIGNALIFE (ANR-11-LABX-0028-01), the IDEX UCAJedi program (ANR-15-IDEX-01), the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT202204015217), and the ERC (Synergy #856404).

## References

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- \* of special interest
- \*\* of outstanding interest

1. Vance JE: **Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells.** *Traffic* 2015, **16**:1–18.

2. Olkkonen VM, Levine TP: **Oxysterol binding proteins: in more than one place at one time?** *Biochem Cell Biol* 2004, **82**:87–98.
3. Tong J, Manik MK, Yang H, Im YJ: **Structural insights into nonvesicular lipid transport by the oxysterol binding protein homologue family.** *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Mol Cell Biology Lipids* 2016, **1861**:928–939.
4. Ridgway ND, Dawson PA, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL: **Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding.** *J Cell Biol* 1992, **116**:307–319.
5. Antony B, Bigay J, Mesmin B: **The oxysterol-binding protein cycle: burning off PI(4)P to transport cholesterol.** *Annu Rev Biochem* 2016, **87**:1–29.
6. Levine TP, Munro S: **The pleckstrin homology domain of oxysterol-binding protein recognises a determinant specific to Golgi membranes.** *Curr Biol* 1998, **8**:729–739.
7. Balla A, Tuymetova G, Tsiomenko A, Várnai P, Balla T: **A plasma membrane pool of phosphatidylinositol 4-phosphate is generated by phosphatidylinositol 4-kinase type-III alpha: studies with the PH domains of the oxysterol binding protein and FAPP1.** *Mol Biol Cell* 2005, **16**:1282–1295.
8. Kaiser SE, Brickner JH, Reilein AR, Fenn TD, Walter P, Brunger AT: **Structural basis of FFAT motif-mediated ER targeting.** *Structure* 2005, **13**:1035–1045.
9. Loewen CJR, Roy A, Levine TP: **A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP.** *EMBO J* 2003, **22**:2025–2035.
10. Mesmin B, Bigay J, Moser von Filseck J, Lacas-Gervais S, Drin G, Antony B: **A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-golgi tether OSBP.** *Cell* 2013, **155**:830–843.
11. Delfosse V, Bourguet W, Drin G: **Structural and functional specialization of OSBP-related proteins.** *Contact* 2020, **3**, 251525642094662.
12. Mesmin B, Bigay J, Polidori J, Jamecna D, Lacas-Gervais S, Antony B: **Sterol transfer, PI4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP.** *EMBO J* 2017, **36**:3156–3174.
13. Kobayashi J, Arita M, Sakai S, Kojima H, Senda M, Senda T, \* *et al.*: **Ligand recognition by the lipid transfer domain of human OSBP is important for enterovirus replication.** *ACS Infect Dis* 2022, <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00108>.  
This paper presents the crystal structure of the ORD domain of human OSBP in complex with cholesterol. The authors also identified inhibitor-resistant OSBP variants by systematic mutagenesis of the ligand-binding region.
14. Mora E de la, Dezi M, Cicco AD, Bigay J, Gautier R, Manzi J, \*\* *et al.*: **Nanoscale architecture of a VAP-A-OSBP tethering complex at membrane contact sites.** *Nat Commun* 2021, **12**:3459.  
This paper establishes the first three-dimensional model of proteins engaged in MCS at the nanoscale. The authors performed structural analysis of the OSBP–VAP-A complex in reconstituted MCS in vitro by cryo-tomography and subtomogram averaging. They show that the OSBP dimerization region forms a helix bundle parallel to the membranes and that VAP-A is highly flexible.
15. Wright PE, Dyson HJ: **Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015, **16**:18–29.
16. Jamecna D, Polidori J, Mesmin B, Dezi M, Levy D, Bigay J, *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* 2019, **49**:220–234.e8.
17. Subra M, Dezi M, Bigay J, Lacas-Gervais S, Cicco AD, Araújo ARD, *et al.*: **VAP-A intrinsically disordered regions enable versatile tethering at membrane contact sites.** *Dev Cell* 2023, **58**:121–138.e9.  
This paper reports that VAP-A has two IDRs that ensure its flexibility. IDRs are required for VAP-A-mediated tethering at short-lived ER-Golgi MCS, which are highly dependent on PI(4)P turnover. In contrast, rigid VAP-A constructs lacking IDR are able to functionally interact with FFAT-containing lipid transfer proteins, such as PTPIP51 and VPS13A, at the more stable ER-mitochondria MCS.
18. Burgett AWG, Poulsen TB, Wangkanont K, Anderson DR, Kikuchi C, Shimada K, *et al.*: **Natural products reveal cancer cell dependence on oxysterol-binding proteins.** *Nat Chem Biol* 2011, **7**:639–647.
19. Péresse T, Kovacs D, Subra M, Bigay J, Tsai M-C, Polidori J, *et al.*: **Molecular and cellular dissection of the oxysterol-binding protein cycle through a fluorescent inhibitor.** *J Biol Chem* 2020, **295**:4277–4288.
20. Roberts BL, Severance ZC, Bensen RC, Le AT, Kothapalli NR, Nuñez JI, *et al.*: **Transient compound treatment induces a multigenerational reduction of oxysterol-binding protein (OSBP) levels and prophylactic antiviral activity.** *ACS Chem Biol* 2018, **14**:276–287.
21. Taskinen JH, Ruhanen H, Matsysik S, Käkälä R, Olkkonen VM: **Global effects of pharmacologic inhibition of OSBP in human umbilical vein endothelial cells.** *Steroids* 2022, **185**, 109053.
22. Albuлесcu L, Bigay J, Biswas B, Weber-Boyvat M, Dorobantu CM, Delang L, *et al.*: **Uncovering oxysterol-binding protein (OSBP) as a target of the anti-enteroviral compound TTP-8307.** *Antivir Res* 2017, **140**:37–44.
23. Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H: **Oxysterol-binding protein family I is the target of minor enviroxime-like compounds.** *J Virol* 2013, **87**:4252–4260.
24. Strating JRPM, van der Linden L, Albuлесcu L, Bigay J, Arita M, Delang L, *et al.*: **Itraconazole inhibits enterovirus replication by targeting the oxysterol-binding protein.** *Cell Rep* 2015, **10**:600–615.
25. Meutiawati F, Bezemer B, Strating JRPM, Overheul GJ, Zusinaite E, Kuppeveld FJM van, *et al.*: **Posaconazole inhibits dengue virus replication by targeting oxysterol-binding protein.** *Antivir Res* 2018, **157**:68–79.
26. Zhong W, Lin W, Yang Y, Chen D, Cao X, Xu M, *et al.*: **An acquired phosphatidylinositol 4-phosphate transport initiates T-cell deterioration and leukemogenesis.** *Nat Commun* 2022, **13**:4390.  
This paper reports that phosphoinositide-driven oncogenic signaling that contributes to T-cell leukemogenesis is unexpectedly initiated by PI(4)P transport by OSBP, which is diverted by ORP4L via heterodimerization to act from Golgi to the PM. OSBP/ORP4L-mediated transfer of PI(4)P to the PM ultimately leads to PI(3,4,5)P3 biosynthesis and PI3K/AKT hyperactivation.
27. Roulin PS, Lötzerich M, Torta F, Tanner LB, van Kuppeveld FJM, Wenk MR, *et al.*: **Rhinovirus uses a phosphatidylinositol 4-phosphate/cholesterol counter-current for the formation of replication compartments at the ER-golgi interface.** *Cell Host Microbe* 2014, **16**:677–690.
28. Wang H, Perry JW, Lauring AS, Neddermann P, Francesco RD, Tai AW: **Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking.** *Gastroenterology* 2014, **146**:1373–1385.e11.
29. Wang H, Tai AW: **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* 2019, **93**.
30. Roberts BL, Severance ZC, Bensen RC, Le AT, Malinky CA, Mettenbrink EM, *et al.*: **Differing activities of oxysterol-binding protein (OSBP) targeting anti-viral compounds.** *Antivir Res* 2019, **170**, 104548.
31. Strating JR, Kuppeveld FJ van: **Viral rewiring of cellular lipid metabolism to create membranous replication compartments.** *Curr Opin Cell Biol* 2017, **47**:24–33.
32. Kolodziejek AM, Altura MA, Fan J, Petersen EM, Cook M, Brzovic PS, *et al.*: **Salmonella translocated effectors recruit OSBP1 to the phagosome to promote vacuolar membrane integrity.** *Cell Rep* 2019, **27**:2147–2156.e5.
33. Vormittag S, Hüslер D, Haneburger I, Kroniger T, Anand A, \* Prantl M, *et al.*: **Legionella- and host-driven lipid flux at LCV-**

**ER membrane contact sites promotes vacuole remodeling.**  
*EMBO Rep* 2023, <https://doi.org/10.15252/embr.202256007>.

The authors describe that *L. pneumophila* hijacks MCS components, including VAP, Sac1 and OSBP11, which facilitate PI(4)P/sterol exchange and thus promote the expansion of PI(4)P-positive *Legionella*-containing vacuole, which is required for pathogen replication.

34. Mesmin B, Kovacs D, D'Angelo G: **Lipid exchange and signaling at ER–Golgi contact sites.** *Curr Opin Cell Biol* 2019, **57**:8–15.
35. Anwar MU, Sergeeva OA, Abrami L, Mesquita FS, Lukonin I, Amen T, *et al.*: **ER-Golgi-localized proteins TMED2 and TMED10 control the formation of plasma membrane lipid nanodomains.** *Dev Cell* 2022, **57**:2334–2346.e8.
- This paper reports that two transmembrane proteins TMED2 and TMED10 help organizing a lipid-transfer protein supercomplex at ER-Golgi MCS, comprising Arf1, OSBP, CERT and VAP-A, which controls the formation of cell-surface lipid nanodomains and Anthrax intoxication.
36. Wakana Y, Kotake R, Oyama N, Murate M, Kobayashi T, Arasaki K, *et al.*: **CARTS biogenesis requires VAP–lipid transfer protein complexes functioning at the endoplasmic reticulum–Golgi interface.** *Mol Biol Cell* 2015, **26**:4686–4699.
37. Wakana Y, Hayashi K, Nemoto T, Watanabe C, Taoka M, Angulo-Capel J, *et al.*: **The ER cholesterol sensor SCAP promotes CARTS biogenesis at ER–Golgi membrane contact sites.** *J Cell Biol* 2020, **220**, e202002150.
38. Brown MS, Radhakrishnan A, Goldstein JL: **Retrospective on cholesterol homeostasis: the central role of Scap.** *Annu Rev Biochem* 2017, **87**:1–25.
39. Hammond GRV, Machner MP, Balla T: **A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi/Localization of PtdIns4P in living cells.** *J Cell Biol* 2014, **205**:113–126.
40. Tan JX, Finkel T: **A phosphoinositide signalling pathway mediates rapid lysosomal repair.** *Nature* 2022, <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05164-4>.
- This paper reports that lysosomal membrane permeabilization is rapidly resolved by a phosphoinositide-initiated membrane tethering and lipid transport pathway, involving PI4K2A, ORP9, ORP10, ORP11, OSBP and finally ATG2, which by transferring PS and cholesterol to lysosome, supports lysosomal membrane repair and integrity.
41. Radulovic M, Wenzel EM, Gilani S, Holland LK, Lystad AH, Phuyal S, *et al.*: **Cholesterol transfer via endoplasmic reticulum contacts mediates lysosome damage repair.** *EMBO J* 2022, **41**, e112677.
- Using lipidomic analyses, the authors show that PS and cholesterol levels increase upon lysosomal membrane damage. This increase correlates with the rapid formation of ER-lysosome MCS, where PI4K2A, VAPA/B and ORPs function to promote cholesterol/PI(4)P exchange, which contributes to lysosome repair.
42. Lim C-Y, Davis OB, Shin HR, Zhang J, Berdan CA, Jiang X, Counihan JL, *et al.*: **ER–lysosome contacts enable cholesterol sensing by mTORC1 and drive aberrant growth signalling in Niemann–Pick type C.** *Nat Cell Biol* 2019, **21**:1206–1218.
43. Sobajima T, Yoshimura S, Maeda T, Miyata H, Miyoshi E, Harada A: **The Rab11-binding protein RELCH/KIAA1468 controls intracellular cholesterol distribution RELCH/KIAA1468 regulates cholesterol transport.** *J Cell Biol* 2018, **217**:1777–1796.
44. Wang Q, Cao Z, Du B, Zhang Q, Chen L, Wang X, *et al.*: **Membrane contact site-dependent cholesterol transport regulates Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase polarization and spermiogenesis in *Caenorhabditis elegans*.** *Dev Cell* 2021, **56**:1631–1645.e7.
45. Malek M, Wawrzyniak AM, Koch P, Luchtenborg C, Hessenberger M, Sachsenheimer T, *et al.*: **Inositol triphosphate-triggered calcium release blocks lipid exchange at endoplasmic reticulum-Golgi contact sites.** *Nat Commun* 2021, **12**:2673.
- This paper reports that IP3 accumulation, which induces calcium release from ER stores, triggers dissociation of OSBP from the Golgi, thereby depleting cholesterol and Gb3 from the PM. Conversely, INPP5A-mediated IP3 hydrolysis promotes OSBP-mediated lipid exchange.
46. Zhang Z, Venditti R, Ran L, Liu Z, Vivot K, Schürmann A, *et al.*: **Distinct changes in endosomal composition promote NLRP3 inflammasome activation.** *Nat Immunol* 2022, <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01355-3>.
- Recruitment of NLRP3 to PI(4)P-containing membranes is a key step for inflammasome activation. In this paper, the authors show that activators of NLRP3 inflammasome disrupt ER-endosome MCS, thereby preventing OSBP activity. This leads to endosomal accumulation of PI(4)P and impairment of endosome-to-TGN trafficking. As a result, NLRP3 is recruited and activated at endosome surface.
47. Filseck JM von, Čopić A, Delfosse V, Vanni S, Jackson CL, Bourguet W, *et al.*: **Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate.** *Science* 2015, **349**:432–436.
48. Chung J, Torta F, Masai K, Lucast L, Czaplá H, Tanner LB, *et al.*: **PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER–plasma membrane contacts.** *Science* 2015, **349**:428–432.
49. Eisenreichova A, Rózycki B, Boura E, Humpolickova J: **Osh6 revisited: control of PS transport by the concerted actions of PI4P and Sac1 phosphatase.** *Front Mol Biosci* 2021, **8**, 747601.
50. Lipp N-F, Gautier R, Magdeleine M, Renard M, Albanèse V, Copić A, *et al.*: **An electrostatic switching mechanism to control the lipid transfer activity of Osh6p.** *Nat Commun* 2019, **10**:3926.
51. Sohn M, Korzeniowski M, Zewe JP, Wills RC, Hammond GRV, Humpolickova J, *et al.*: **PI(4,5)P2 controls plasma membrane PI4P and PS levels via ORP5/8 recruitment to ER–PM contact sites Regulation of PM PI(4,5)P2 levels via ORP5/8.** *J Cell Biol* 2018, **217**:1797–1813.
52. Ikhlef S, Lipp N-F, Delfosse V, Fuggetta N, Bourguet W, Magdeleine M, *et al.*: **Functional analyses of phosphatidylserine/PI(4)P exchangers with diverse lipid species and membrane contexts reveal unanticipated rules on lipid transfer.** *BMC Biol* 2021, **19**:248.
53. D'Ambrosio JM, Albanèse V, Lipp N-F, Fleuriet L, Debayle D, Drin G, *et al.*: **Osh6 requires Ist2 for localization to ER–PM contacts and efficient phosphatidylserine transport in budding yeast.** *J Cell Sci* 2020, **133**:jcs243733.
54. Shin JJH, Liu P, Chan LJ, Ullah A, Pan J, Borchers CH, *et al.*: **pH biosensing by PI4P regulates cargo sorting at the TGN.** *Dev Cell* 2020, **52**:461–476.e4.
55. Omrus DJ, Cadou A, Thomas FB, Bader JM, Soh N, Chung GHC, *et al.*: **A heat-sensitive Osh protein controls PI4P polarity.** *BMC Biol* 2020, **18**:28.

# Contact

## ***Stranger Twins: A tale of resemblance and contrast between VAP proteins***

Journal:	<i>Contact</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Opinion
Keywords:	endoplasmic reticulum (ER), VAMP-associated protein (VAP), membrane contact sites, tether, structural biology
Abstract:	When considering the vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) family, major receptors at the surface of the endoplasmic reticulum (ER), it appears that VAP-A and VAP-B paralogs largely overlap in structure and function, and that specific features to distinguish these two proteins hardly exist or are poorly documented. Here, we question the degree of redundancy between VAP-A and VAP-B: is one simply a backup plan, in case of loss of function of one of the two genes, or are there molecular and functional divergences that would explain their maintenance during evolution?

SCHOLARONE™  
Manuscripts

**Title**

*Stranger Twins: A tale of resemblance and contrast between VAP proteins*

**Abstract**

When considering the vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) family, major receptors at the surface of the endoplasmic reticulum (ER), it appears that VAP-A and VAP-B paralogs largely overlap in structure and function, and that specific features to distinguish these two proteins hardly exist or are poorly documented. Here, we question the degree of redundancy between VAP-A and VAP-B: is one simply a backup plan, in case of loss of function of one of the two genes, or are there molecular and functional divergences that would explain their maintenance during evolution?

**Main text**

VAP-A and VAP-B are ubiquitously expressed type-II ER transmembrane proteins, with homologs widely distributed from yeast to human, involved in several functions at membrane contact sites (MCS), and implicated in genetic and infectious diseases (Kors et al., 2022; Murphy and Levine, 2016; Neefjes and Cabukusta, 2021). They encompass a N-terminal Major Sperm Protein (MSP) domain, a central coiled-coil region for dimerization and a C-terminal transmembrane domain (TMD) (**figure 1**). Two intrinsically disordered regions (linker 1 and 2) connect these different domains together and ensure VAP flexibility (Subra et al., 2023). VAP-A and VAP-B act as receptors for ~100 proteins containing a short recognition motif called “two phenylalanines in an acidic tract” (FFAT), which consists of the consensus sequence EFFDAxE flanked by acidic residues (Loewen et al., 2003). VAP-A and VAP-B share 63% sequence identity and 83% similarity. Their MSP domain, responsible for FFAT binding, are nearly identical (82% sequence identity) and highly conserved. The FFAT motif binding site within the MSP is positively

1  
2  
3 charged and includes two residues (K94 and M96 in VAP-A and K87 and M89 in VAP-B) that are  
4 key for VAP-FFAT interaction (Kaiser et al., 2005). VAP proteins tolerate many variations in the  
5 FFAT sequence, and also bind phospho-FFAT (pFFAT) motifs, which must be phosphorylated to  
6 interact with the MSP (Mattia et al., 2020). For example, STARD3, MIGA2, PTPIP51, and the  
7 voltage-gated membrane potassium channels Kv2.1 and Kv2.2 encompass a pFFAT (Alpy et al.,  
8 2013; Sun and Camilli, 2018; Xu et al., 2020; Yeo et al., 2021). Amino acid variations within FFAT  
9 motifs may influence affinities between VAP-A or VAP-B and their partners, and thus modulate  
10 their respective subcellular localization.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

20  
21 Despite their high sequence similarity, a few genetic mutations are known to affect VAP-B  
22 but not VAP-A, including the prevalent VAP-B P56S mutation in its MSP domain, which is linked  
23 to a rare dominantly inherited form of amyotrophic lateral sclerosis (ALS-8) (Teuling et al., 2007).  
24 The P56S mutation leads to MSP misfolding, resulting in the formation of aggregates, which are  
25 ubiquitinated and eliminated (Borgese et al., 2021). Curiously, proline 56 is conserved in VAP-A,  
26 but incorporating the same mutation in VAP-A causes minor effects. It appears that VAP-A is  
27 resistant to aggregation because of the presence of other prolines in its MSP, unlike VAP-B, which  
28 has only one. Mutation of a second proline in VAP-A MSP leads to massive aggregation resembling  
29 the VAP-B P56S phenotype (Nakamichi et al., 2011). Of note, MSP domains are also found in ER-  
30 resident Mobile Sperm Domain-containing proteins (MOSPD1, 2 and 3), although MOSPD1 and  
31 MOSPD3 recognize motifs called “two phenylalanines in a neutral tract” (FFNT)(Cabukusta et al.,  
32 2020). MOSPD2 binds to FFAT motifs, but evidence suggests that it has distinct functions, notably  
33 via its CRAL-TRIO domain, and a lower abundance compared to VAP-A and VAP-B (Mattia et al.,  
34 2018; Zouiouich et al., 2022).  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

50  
51 The interactomes of VAP-A and VAP-B (also called “VAPome”) have been revealed using  
52 affinity chromatography coupled to mass spectrometry (Huttlin et al., 2015), and proximity  
53 labeling approaches, either through BioID, which is based on proximity-dependent biotinylation  
54 of proteins by a biotin ligase fused to VAP (Cabukusta et al., 2020), or a modified ascorbate  
55 peroxidase 2 (APEX2) screen (James et al., 2019). These studies revealed new hits or confirmed  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 known VAP-A and VAP-B interactors, such as OSBP and OSBP-related proteins, PTPIP51, CERT,  
4 VPS13A, MIGA2, PITPs and ACBD5, which are involved in lipid exchange at MCS, Rtn4, involved in  
5 membrane shaping, and sorting nexins (SNX), involved in membrane remodeling and transport  
6 (James and Kehlenbach, 2021). Of note, FFAT-containing proteins represent only ~50% of the  
7 identified putative VAP partners (Murphy and Levine, 2016), suggesting that VAP-mediated  
8 interactions are not limited to MSP-FFAT binding. Importantly, the VAP-A and VAP-B  
9 interactomes do not fully overlap, as a significant number of hits are listed as exclusive partners  
10 of VAP-A or exclusive partners of VAP-B. It is unclear, however, what predicts specificity for one  
11 or the other protein. Since the MSP domains of VAP-A and VAP-B are very similar, their “stem”  
12 regions (comprising linkers, coiled-coil, and TMD), which show sequence divergence, may  
13 promote the formation of specific protein complexes. Such interactions that are independent of  
14 the MSP have been reported with different partners (Amini-Bavil-Olyaei et al., 2013; Forrest et  
15 al., 2013; Hamamoto et al., 2005; Saito et al., 2008). This is the case for the phosphatase Sac1,  
16 which exhibits a better affinity for VAP-A than VAP-B (Wakana et al., 2015). Another example is  
17 Protrudin, an ER-resident and FFAT-containing protein that regulates neurite formation and  
18 axonal regeneration (Petrova et al., 2020; Saita et al., 2009). Interestingly, Protrudin preferentially  
19 associates with VAP-A rather than VAP-B, recognizing not only its MSP domain but also its TMD  
20 (Saita et al., 2009).

21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43 The stem region might also confer specific properties to VAP-A that differ from VAP-B,  
44 such as oligomerization, flexibility, membrane diffusion, and subcellular localization, which in  
45 turn would support association with some partners over others. VAP-A and VAP-B are considered  
46 dimeric proteins, mainly due to their coiled-coil region, which consists of 6 putative heptads that  
47 would form a rigid rod of 5.9 nm. The TMDs of VAP-A and VAP-B also contain a conserved  
48 dimerization GxxxG motif. However, there are conflicting data on the ability of TMD alone to form  
49 dimers (Cabukusta et al., 2020; Kim et al., 2010). Some studies also report that VAP-A and VAP-B  
50 are capable of forming heterodimers, but it remains unclear to what extent this occurs (Cabukusta  
51 et al., 2020; Kim et al., 2010; Nishimura et al., 1999). What about the role of MSP in dimerization?  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 In the crystal structure, the MSP domain of VAP-A forms a 2:2 complex with FFAT, where MSP  
4 domains resemble a flytrap sandwiching two FFAT (Kaiser et al., 2005). By contrast, in NMR  
5 studies, VAP-A MSP makes a 1:1 complex with the FFAT motif (Furuita et al., 2010), and no  
6 contribution of the MSP to the dimerization of VAP-B was reported (Kim et al., 2010).  
7  
8 Nevertheless, future studies will be needed to define the stoichiometry between VAP-A or VAP-B  
9 and their partners, as many of them are also organized as dimers, and may occupy the same  
10 contact sites. It is also worth noting that chemical crosslinking analyses suggested the existence  
11 of other oligomeric forms for VAP-B (monomer, tetramer) (Kim et al., 2010), but their functional  
12 impact at the molecular and cellular level remains obscure. This is potentially important when  
13 considering the lateral diffusion of VAP along the ER membrane. It is known that the subcellular  
14 localization of VAP-A or VAP-B can be modulated upon overexpression of one of its partners. For  
15 example, overexpression of OSBP brings VAP-A to ER/Golgi MCS (Mesmin et al., 2013). Recent  
16 single particle tracking (sptPALM) analyzes revealed that the trajectory of VAP-B shows  
17 localization hubs that correspond to ER/mitochondria MCS (Obara et al., 2022). Indeed, the  
18 diffusion of VAP-B along the ER decreases from  $\sim 1.8 \mu\text{m}^2/\text{s}$  to  $\sim 0.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$  when engaged in a  
19 contact site. As expected, overexpression of its partner PTPIP51 concentrates VAP-B at MCS; but  
20 without its MSP, VAP-B randomly explores the entire surface of the ER. Interestingly, AlphaFold  
21 predicts slightly different transmembrane  $\alpha$ -helix lengths for VAP-A and VAP-B (Jumper et al.,  
22 2021; Varadi et al., 2021)(**figure 1**). If these differences exist, they could potentially influence  
23 VAP-A and VAP-B lateral diffusion and/or adapt them to specific membrane contexts.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

47 Another structural feature worth mentioning is VAP linker regions, which show the most  
48 significant sequence variation between VAP-A and VAP-B. In a recent study, we demonstrated that  
49 these linkers are responsible for VAP-A flexibility, and are necessary for its engagement in the  
50 highly dynamic ER/Golgi MCSs (Mora et al., 2021; Subra et al., 2023). By contrast, mutants of VAP-  
51 A designed to be more rigid only adapt to ER/Mitochondria MCS's, which are more stable over  
52 time. Intrinsic disorder prediction suggests that VAP-B linkers are unstructured, similarly to those  
53 of VAP-A. In **figure 1**, we show original molecular dynamics (MD) simulation data of full-length  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 VAP-A versus VAP-B inserted into membranes. The RMSF values clearly indicate a higher mobility  
4 of the amino acids present in the linkers, suggesting that like VAP-A, VAP-B has two very flexible  
5 regions flanking its coiled-coil domain. It should be noted that there is a less abundant, natural  
6 isoform of VAP-A produced by alternative splicing that differs from canonical VAP-A by the  
7 insertion of 45 residues in its first linker. Disorder prediction indicates that the inserted sequence  
8 is unstructured, thus forming an extra-long flexible linker 1. We have shown that expressing this  
9 isoform rescued a range of defects associated with ER/Golgi and ER/mitochondria MCS in VAP-A  
10 KO cells (Subra et al., 2023), but the functional implication of this splice variant remains to be  
11 determined. As a side note, there is also a splice variant of VAP-B, called VAP-C, whose sequence  
12 stops in the middle of the MSP, but its function remains largely unexplored.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

25 Few studies demonstrated clear functional differences between VAP-A and VAP-B. For  
26 example, it has been shown that VAP-A, but not VAP-B, plays a key role with ORP3 and Rab7 in  
27 promoting the entry of late endosomes in deep nuclear envelope invaginations that penetrate  
28 into the nucleoplasm, possibly by facilitating MCS formation between these compartments  
29 (Santos et al., 2018). By contrast, a specific function for VAP-B was shown in differentiated motor  
30 neurons: in these cells, VAP-B depletion alters phosphoinositide balance and significantly delays  
31 neurite extension (Genevini et al., 2019). In rescue experiments, neurogenesis levels recovered to  
32 control cells with VAP-B expression, but less so when using the corresponding VAP-A construct.  
33 In a recent study, we showed divergent implications of VAP-A and VAP-B on mitochondrial  
34 morphology and cardiolipin (CL) levels in hTERT-immortalized retinal pigment epithelial (RPE-  
35 1) cells. Our data indicated that knocking out VAP-A, but not VAP-B, results in decreased CL levels  
36 associated with defective mitochondrial fusion (Subra et al., 2023). Of note, RPE-1 cells have  
37 comparable levels of VAP-A and VAP-B, suggesting that functional differences exist between these  
38 proteins. In these cited studies, however, the underlying molecular basis for why one VAP is  
39 involved in a given function and not the other remains elusive. Nevertheless, unlike VAP-B, VAP-  
40 A KO is lethal at the embryonic stage in mice (Kabashi et al., 2013; McCune et al., 2017), implying  
41 that VAP-B is less important and/or less abundant than VAP-A, and further suggesting that VAP-  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 A can replace VAP-B in its functions, but not vice versa. There is indeed a striking difference in the  
4 transcript levels of VAP-A and VAP-B genes between tissues and, as a general rule, VAP-B  
5 transcript levels are reduced compared to VAP-A (**figure 1**) (Consortium et al., 2015). Of note,  
6 they are more balanced in the nervous system. Future studies will be necessary to define the  
7 molecular basis explaining the preferences of each of the VAPs for different partners, and thus the  
8 set of functions that are not shared between VAP-A and VAP-B, as their respective roles may  
9 diverge to varying degrees depending on the cell type or tissue considered.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

## 21 **Methods**

22  
23  
24 **MD simulations of VAP-A and VAP-B dimer models.** MD simulations were performed  
25 essentially as described previously (Subra et al., 2023), except that full-length membranous VAP-A  
26 and VAP-B proteins were simulated. Simulations of modified VAP-A and VAP-B structures from  
27 AlphaFold in a membrane were prepared using 560 POPC, 560 DOPC and 56 cholesterol (5%  
28 cholesterol), a water thickness of 30 Å at a temperature of 303K and neutralized with 120 mM  
29 NaCl. The TMDs were inserted into the membrane using the PPM 2.0 tool. Energy minimization  
30 and simulations were performed as described previously except that two NVT and four NPT  
31 equilibrations were performed using the Berendsen thermostat and barostat. Simulations (1 μs)  
32 were done in triplicate, using Gromacs 2021.3 (<https://www.gromacs.org/>) with the CHARMM36  
33 force-field, and the TIP3P water model. MD analyzes of the Root Mean Square Fluctuation (RMSF)  
34 were performed as described previously (Subra et al., 2023).  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

## 51 **Acknowledgments**

52 We thank Amanda Patel (IPMC, Valbonne) for critical reading of the manuscript.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59

## 60 **Declaration of Conflicting Interests**

1  
2  
3 The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship,  
4 and/or publication of this article.  
5  
6  
7  
8  
9

## 10 **Funding**

11  
12 This work was supported by the CNRS, the Inserm, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-  
13 21-CE13-0021-01, ANR-15-IDEX-01), the Fondation pour la Recherche Médicale  
14 (FDT202204015217), and by the Polytech Nice Sophia (Université Côte d'Azur) PhD fellowship  
15 program.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

## 26 **References**

- 27  
28 Alpy F, Rousseau A, Schwab Y, et al. (2013) STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular  
29 tether between late endosomes and the ER. *Journal of Cell Science* 126(23): 5500–5512. DOI:  
30 10.1242/jcs.139295.  
31  
32  
33 Amini-Bavil-Olyae S, Choi YJ, Lee JH, et al. (2013) The Antiviral Effector IFITM3 Disrupts  
34 Intracellular Cholesterol Homeostasis to Block Viral Entry. *Cell Host & Microbe* 13(4): 452–464.  
35 DOI: 10.1016/j.chom.2013.03.006.  
36  
37 Borgese N, Navone F, Nukina N, et al. (2021) Mutant VAPB: Culprit or Innocent Bystander of  
38 Amyotrophic Lateral Sclerosis? *Contact* 4: 25152564211022516. DOI:  
39 10.1177/25152564211022515.  
40  
41 Cabukusta B, Berlin I, Elsland DM van, et al. (2020) Human VAPome Analysis Reveals MOSPD1  
42 and MOSPD3 as Membrane Contact Site Proteins Interacting with FFAT-Related FFNT Motifs.  
43 *Cell Reports* 33(10): 108475. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108475.  
44  
45 Consortium TGte, Ardlie KG, Deluca DS, et al. (2015) The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot  
46 analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science* 348(6235): 648–660. DOI:  
47 10.1126/science.1262110.  
48  
49 Forrest S, Chai A, Sanhueza M, et al. (2013) Increased levels of phosphoinositides cause  
50 neurodegeneration in a Drosophila model of amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular*  
51 *Genetics* 22(13): 2689–2704. DOI: 10.1093/hmg/ddt118.  
52  
53 Furuita K, Jee J, Fukada H, et al. (2010) Electrostatic Interaction between Oxysterol-binding  
54 Protein and VAMP-associated Protein A Revealed by NMR and Mutagenesis Studies. *Journal of*  
55 *Biological Chemistry* 285(17): 12961–12970. DOI: 10.1074/jbc.m109.082602.  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 Genevini P, Colombo MN, Venditti R, et al. (2019) VAPB depletion alters neuritogenesis and  
4 phosphoinositide balance in motoneuron-like cells: relevance to VAPB-linked amyotrophic  
5 lateral sclerosis. *Journal of Cell Science* 132(7): jcs220061. DOI: 10.1242/jcs.220061.  
6  
7 Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, et al. (2005) Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus  
8 Replication through Interaction with NS5A and NS5B. *Journal of Virology* 79(21): 13473–  
9 13482. DOI: 10.1128/jvi.79.21.13473-13482.2005.  
10  
11 Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, et al. (2015) The BioPlex Network: A Systematic Exploration of  
12 the Human Interactome. *Cell* 162(2): 425–440. DOI: 10.1016/j.cell.2015.06.043.  
13  
14 James C and Kehlenbach RH (2021) The Interactome of the VAP Family of Proteins: An Overview.  
15 *Cells* 10(7): 1780. DOI: 10.3390/cells10071780.  
16  
17 James C, Müller M, Goldberg MW, et al. (2019) Proteomic mapping by rapamycin-dependent  
18 targeting of APEX2 identifies binding partners of VAPB at the inner nuclear membrane. *Journal*  
19 *of Biological Chemistry* 294(44): 16241–16254. DOI: 10.1074/jbc.ra118.007283.  
20  
21 Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with  
22 AlphaFold. *Nature* 596(7873): 583–589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.  
23  
24 Kabashi E, Oussini HE, Bercier V, et al. (2013) Investigating the contribution of VAPB/ALS8 loss of  
25 function in amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics* 22(12): 2350–2360. DOI:  
26 10.1093/hmg/ddt080.  
27  
28 Kaiser SE, Brickner JH, Reilein AR, et al. (2005) Structural Basis of FFAT Motif-Mediated ER  
29 Targeting. *Structure* 13(7): 1035–1045. DOI: 10.1016/j.str.2005.04.010.  
30  
31 Kim S, Leal SS, Halevy DB, et al. (2010) Structural Requirements for VAP-B Oligomerization and  
32 Their Implication in Amyotrophic Lateral Sclerosis-associated VAP-B(P56S) Neurotoxicity.  
33 *Journal of Biological Chemistry* 285(18): 13839–13849. DOI: 10.1074/jbc.m109.097345.  
34  
35 Kors S, Costello JL and Schrader M (2022) VAP Proteins – From Organelle Tethers to Pathogenic  
36 Host Interactors and Their Role in Neuronal Disease. *Frontiers in Cell and Developmental*  
37 *Biology* 10: 895856. DOI: 10.3389/fcell.2022.895856.  
38  
39 Loewen CJR, Roy A and Levine TP (2003) A conserved ER targeting motif in three families of lipid  
40 binding proteins and in Opi1p binds VAP. *The EMBO Journal* 22(9): 2025–2035. DOI:  
41 10.1093/emboj/cdg201.  
42  
43 Mattia TD, Wilhelm LP, Ikhlef S, et al. (2018) Identification of MOSPD2, a novel scaffold for  
44 endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO reports* 19(7). DOI:  
45 10.15252/embr.201745453.  
46  
47 Mattia TD, Martinet A, Ikhlef S, et al. (2020) FFAT motif phosphorylation controls formation and  
48 lipid transfer function of inter-organelle contacts. *The EMBO Journal*: e104369. DOI:  
49 10.15252/embj.2019104369.  
50  
51 McCune BT, Tang W, Lu J, et al. (2017) Noroviruses Co-opt the Function of Host Proteins VAPA  
52 and VAPB for Replication via a Phenylalanine–Phenylalanine–Acidic–Tract–Motif Mimic in  
53 Nonstructural Viral Protein NS1/2. *mBio* 8(4): e00668-17. DOI: 10.1128/mbio.00668-17.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 Mesmin B, Bigay J, Moser von Filseck J, et al. (2013) A Four-Step Cycle Driven by PI(4)P Hydrolysis  
4 Directs Sterol/PI(4)P Exchange by the ER-Golgi Tether OSBP. *Cell* 155(4): 830–843. DOI:  
5 10.1016/j.cell.2013.09.056.  
6  
7 Mora E de la, Dezi M, Cicco AD, et al. (2021) Nanoscale architecture of a VAP-A-OSBP tethering  
8 complex at membrane contact sites. *Nature Communications* 12(1): 3459. DOI:  
9 10.1038/s41467-021-23799-1.  
10  
11 Murphy SE and Levine TP (2016) VAP, a Versatile Access Point for the Endoplasmic Reticulum:  
12 Review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -*  
13 *Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861(8): 952–961. DOI: 10.1016/j.bbalip.2016.02.009.  
14  
15 Nakamichi S, Yamanaka K, Suzuki M, et al. (2011) Human VAPA and the yeast VAP Scs2p with an  
16 altered proline distribution can phenocopy amyotrophic lateral sclerosis-associated  
17 VAPB(P56S). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404(2): 605–609. DOI:  
18 10.1016/j.bbrc.2010.12.011.  
19  
20 Neefjes J and Cabukusta B (2021) What the VAP: The Expanded VAP Family of Proteins Interacting  
21 With FFAT and FFAT-Related Motifs for Interorganellar Contact. *Contact* 4:  
22 251525642110122. DOI: 10.1177/25152564211012246.  
23  
24 Nishimura Y, Hayashi M, Inada H, et al. (1999) Molecular Cloning and Characterization of  
25 Mammalian Homologues of Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated (VAMP-  
26 Associated) Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254(1): 21–26.  
27 DOI: 10.1006/bbrc.1998.9876.  
28  
29 Obara CJ, Nixon-Abell J, Moore AS, et al. (2022) Motion of single molecular tethers reveals dynamic  
30 subdomains at ER-mitochondria contact sites. *bioRxiv*: 2022.09.03.505525. DOI:  
31 10.1101/2022.09.03.505525.  
32  
33 Petrova V, Pearson CS, Ching J, et al. (2020) Protrudin functions from the endoplasmic reticulum  
34 to support axon regeneration in the adult CNS. *Nature Communications* 11(1): 5614. DOI:  
35 10.1038/s41467-020-19436-y.  
36  
37 Saita S, Shirane M, Natume T, et al. (2009) Promotion of Neurite Extension by Protrudin Requires  
38 Its Interaction with Vesicle-associated Membrane Protein-associated Protein. *Journal of*  
39 *Biological Chemistry* 284(20): 13766–13777. DOI: 10.1074/jbc.m807938200.  
40  
41 Saito S, Matsui H, Kawano M, et al. (2008) Protein Phosphatase 2Cε Is an Endoplasmic Reticulum  
42 Integral Membrane Protein That Dephosphorylates the Ceramide Transport Protein CERT to  
43 Enhance Its Association with Organelle Membranes. *Journal of Biological Chemistry* 283(10):  
44 6584–6593. DOI: 10.1074/jbc.m707691200.  
45  
46 Santos MF, Rappa G, Karbanová J, et al. (2018) VAMP-associated protein-A and oxysterol-binding  
47 protein-related protein 3 promote the entry of late endosomes into the nucleoplasmic  
48 reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 293(36): 13834–13848. DOI:  
49 10.1074/jbc.ra118.003725.  
50  
51 Subra M, Dezi M, Bigay J, et al. (2023) VAP-A intrinsically disordered regions enable versatile  
52 tethering at membrane contact sites. *Developmental Cell* 58(2): 121-138.e9. DOI:  
53 10.1016/j.devcel.2022.12.010.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 Sun EW and Camilli PD (2018) Kv2 potassium channels meet VAP. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(31): 7849–7851. DOI: 10.1073/pnas.1810059115.  
4  
5  
6 Teuling E, Ahmed S, Haasdijk E, et al. (2007) Motor Neuron Disease-Associated Mutant Vesicle-  
7 Associated Membrane Protein-Associated Protein (VAP) B Recruits Wild-Type VAPs into  
8 Endoplasmic Reticulum-Derived Tubular Aggregates. *The Journal of Neuroscience* 27(36):  
9 9801–9815. DOI: 10.1523/jneurosci.2661-07.2007.  
10  
11  
12 Varadi M, Anyango S, Deshpande M, et al. (2021) AlphaFold Protein Structure Database: massively  
13 expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models.  
14 *Nucleic Acids Research* 50(D1): D439–D444. DOI: 10.1093/nar/gkab1061.  
15  
16 Wakana Y, Kotake R, Oyama N, et al. (2015) CARTS biogenesis requires VAP–lipid transfer protein  
17 complexes functioning at the endoplasmic reticulum–Golgi interface. *Molecular Biology of the*  
18 *Cell* 26(25): 4686–4699. DOI: 10.1091/mbc.e15-08-0599.  
19  
20  
21 Xu L, Wang X, Zhou J, et al. (2020) Miga-mediated endoplasmic reticulum–mitochondria contact  
22 sites regulate neuronal homeostasis. *eLife* 9: e56584. DOI: 10.7554/elife.56584.  
23  
24 Yeo HK, Park TH, Kim HY, et al. (2021) Phospholipid transfer function of PTPIP51 at  
25 mitochondria-associated ER membranes. *EMBO reports* 22(6): e51323. DOI:  
26 10.15252/embr.202051323.  
27  
28 Zouiouich M, Mattia TD, Martinet A, et al. (2022) MOSPD2 is an endoplasmic reticulum–lipid  
29 droplet tether functioning in LD homeostasis. *Journal of Cell Biology* 221(6): e202110044. DOI:  
30 10.1083/jcb.202110044.  
31  
32  
33  
34  
35

## 36 Figure Legend

37  
38 **Figure 1. Similarities and differences between VAP-A and VAP-B.** *Left panel*, VAP-A and VAP-B  
39 have similar subcellular distribution and structural organization. *Right panel*, the graphs show  
40 disorder prediction (DISOPRED3; <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred>), coiled-coil probability  
41 score (COILS; [https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa\\_lupas.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_lupas.html)), and RMSF values calculated  
42 from MD simulations with full-length VAP-A or VAP-B having their TMD inserted into a lipid  
43 bilayer. The two lines represent the RMSF of each monomer of a dimeric protein. Linker regions  
44 show larger fluctuation sizes. The conservation score (yellow scale) indicates that sequence  
45 divergence between VAP-A and VAP-B occurs primarily in the stem region. The helical structures  
46 of the VAP-A and VAP-B stem regions, as predicted by AlphaFold, are shown below. The color code  
47 shows the degree of confidence (high, dark blue; medium, light blue; low, yellow; very low,  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 orange). *Bottom*, quantitative genetic expression of VAP-A and VAP-B among tissues, as  
4  
5 determined by RNA sequencing, from the GTEx database.  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review



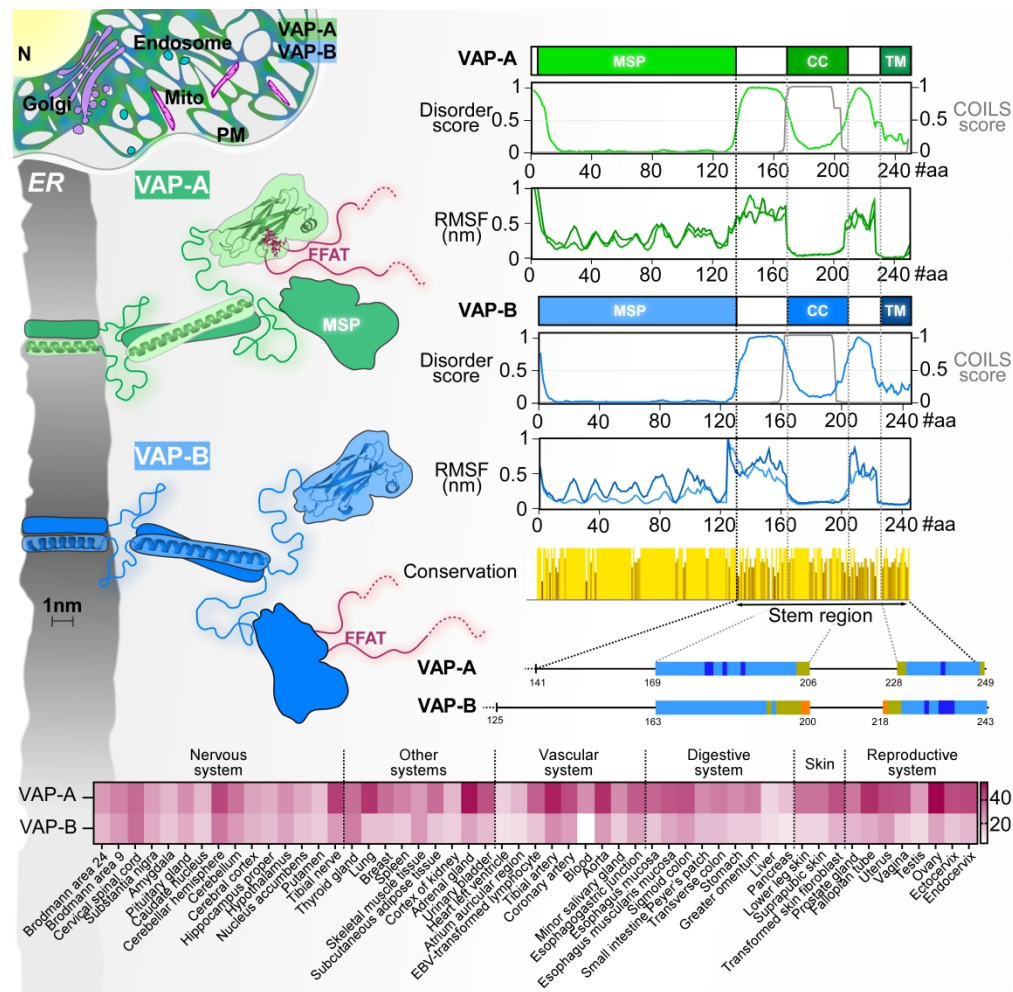


Figure 1. Similarities and differences between VAP-A and VAP-B. Left panel, VAP-A and VAP-B have similar subcellular distribution and structural organization. Right panel, the graphs show disorder prediction (DISOPRED3; <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred>), coiled-coil probability score (COILS; [https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa\\_lupas.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_lupas.html)), and RMSF values calculated from MD simulations with full-length VAP-A or VAP-B having their TMD inserted into a lipid bilayer. The two lines represent the RMSF of each monomer of a dimeric protein. Linker regions show larger fluctuation sizes. The conservation score (yellow scale) indicates that sequence divergence between VAP-A and VAP-B occurs primarily in the stem region. The helical structures of the VAP-A and VAP-B stem regions, as predicted by AlphaFold, are shown below. The color code shows the degree of confidence (high, dark blue; medium, light blue; low, yellow; very low, orange). Bottom, quantitative genetic expression of VAP-A and VAP-B among tissues, as determined by RNA sequencing, from the GTEx database.

422x417mm (300 x 300 DPI)

## NOUVELLE

### La protéine VAP-A fil conducteur de la communication entre organelles

Mélody Subra, Bruno Mesmin

Université Côte d'Azur, Inserm, CNRS,  
Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire,  
Valbonne, France.  
[mesmin@ipmc.cnrs.fr](mailto:mesmin@ipmc.cnrs.fr)

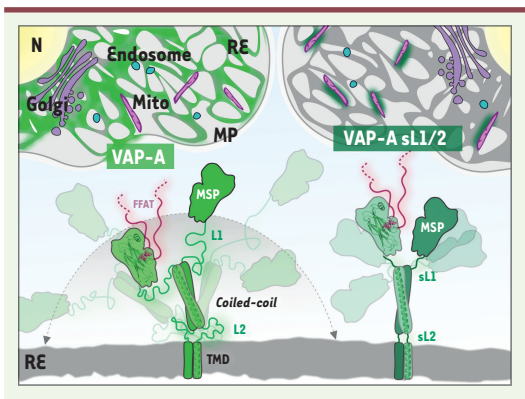
► La communication, qui permet aux individus d'une espèce de recevoir ou de transmettre des informations, opère aussi à l'échelle subcellulaire. En effet, la cellule eucaryote est compartimentée en différentes organelles dotées de fonctions spécifiques, mais qui doivent constamment échanger des signaux et des métabolites. Certains mécanismes de « dialogue » entre organelles sont connus, comme le transport passif ou actif à travers le cytosol, ainsi que le trafic vésiculaire. Mais il existe aussi un système de communication directe impliquant des sites de contact membranaire, des régions spécialisées où

la distance intermembranaire est de 15 à 45 nm, permettant à deux organelles de former des contacts physiques sans pour autant fusionner [1]. De très nombreuses protéines contribuent alors au pontage entre les membranes de ces organelles, au transfert de petites molécules (lipides, ions calcium, etc) de l'une à l'autre, et au contrôle de ces opérations de transfert. Les sites de contact membranaire entre organelles sont ubiquitaires et sont impliqués dans diverses activités cellulaires : transport et métabolisme lipidique, signalisation calcique, dynamique des organelles, etc. Toutefois, ces sites sont hétéro-

gènes en termes de taille, de composition et de dynamique : ils ont notamment une durée de vie variable selon l'organelle engagée, allant de plusieurs dizaines de secondes à plusieurs heures, ce qui représente un véritable défi physique pour leurs effecteurs.

#### Adaptabilité et flexibilité pour faciliter la communication

Si la flexibilité d'un individu facilite ses liens sociaux, qu'en est-il pour les protéines à l'échelle cellulaire ? La protéine VAP-A (*VAMP-associated protein A*) est une protéine intégrale de la membrane du réticulum endoplasmique impliquée



**Figure 1. Modèle moléculaire de la protéine VAP-A endogène et d'une protéine VAP-A rigidifiée par mutation de ses deux domaines linker (VAP-A sL1/2).** Les *linkers* flexibles L1 et L2 de la protéine VAP-A endogène lui permettent d'explorer un espace conformationnel plus large pour capturer des partenaires de liaison et adapter ainsi sa fonction à divers sites de contact membranaire entre organelles, y compris les sites de contact membranaire entre réticulum endoplasmique et réseau trans-golgien, qui sont éphémères, alors que le mutant rigidifié de la protéine, VAP-A sL1/2, a une distribution limitée aux sites de contact membranaire entre réticulum endoplasmique et mitochondrie, qui sont plus stables. N : Noyau ; Mito : mitochondrie ; RE : réticulum endoplasmique ; MP : membrane plasmique ; TMD : domaine trans-membranaire ; MSP : domaine *major sperm protein* ; FFAT : motif de séquence protéique contenant deux résidus phénylalanine (FF) entourés de résidus acides, aspartate (D) ou glutamate (E).

dans les divers sites de contact membranaire avec d'autres organelles. VAP-A possède trois domaines structurés : un domaine *major sperm protein* (MSP) N-terminal, un domaine *coiled-coil* central de dimérisation, et un domaine transmembranaire C-terminal. Par son domaine MSP, VAP-A interagit avec des centaines de protéines dont la séquence d'acides aminés contient un motif FFAT, constitué de deux résidus phénylalanine (FF) dans un segment riche en résidus acides [2] (Figure 1). Par exemple, VAP-A interagit avec la protéine de liaison à l'oxystérol (OSBP) aux sites de contact membranaire entre le réticulum endoplasmique et le réseau trans-golgien : le complexe moléculaire OSBP-VAP-A assure le pontage membranaire et l'échange cholestérol/phosphatidyl-

inositol-4-phosphate (PI4P) entre ces organelles [3]. Aux sites de contact membranaire entre réticulum endoplasmique et mitochondrie, VAP-A interagit avec VPS13A (*vacuolar protein sorting-associated protein 13A*) et PTPIP51 (*protein tyrosine phosphatase-interacting protein 51*), deux protéines qui contribuent au transfert d'acide phosphatidique du réticulum endoplasmique vers les mitochondries [4, 5] : l'acide phosphatidique est un précurseur de la cardiolipine, un lipide crucial pour la dynamique mitochondriale. VAP-A joue donc le rôle d'un « opérateur central » répondant aux demandes de multiples interlocuteurs.

Bien que l'interaction entre les domaines MSP et FFAT ait été caractérisée, il n'existait pas encore de modèle pour rendre compte, aux divers sites de contact membranaire, de l'interaction de VAP-A avec des partenaires de liaison aussi hétérogènes. Toutefois, on savait que VAP-A est capable de s'orienter et de s'allonger sur des distances variables depuis la membrane [6]. Par ailleurs, des programmes de prédiction de structure secondaire indiquaient que cette protéine possède deux régions non structurées (*linkers* L1 et L2) flanquant son domaine *coiled-coil*. Aussi avons nous fait l'hypothèse que VAP-A, grâce à la flexibilité de ses *linkers*, peut recruter différents partenaires de liaison dans différents contextes de sites de contact membranaire, ce dont une molécule rigide serait incapable. Ces caractéristiques moléculaires pourraient également avoir une incidence sur la dynamique et la fonction de VAP-A aux sites de contact membranaire.

Quand nous utilisons le téléphone pour joindre un ami, VAP-A, quant à elle, utilise ses *linkers* pour entrer en contact avec ses partenaires de liaison. Grâce à des analyses biochimiques et des simulations de dynamique moléculaire, nous avons découvert que les deux *linkers* de VAP-A sont des régions intrinsèquement désordonnées [7]. Ces régions, sans structure tridimensionnelle définie, contiennent un grand nombre d'acides aminés polaires et chargés (notamment, Glu, Lys, Gln, et Ser) ainsi que les acides aminés Pro et Gly, qui tolèrent le contact avec le solvant aqueux, et peu de résidus hydrophobes (tels que Ile, Phe, Trp et Tyr). Les régions intrinsèquement désordonnées, qui se comportent comme des fils flexibles nageant dans le cytosol, augmentent la liberté conformationnelle des protéines, ce qui favorise les mouvements interdomaines, ou l'interaction avec des partenaires de liaison éloignés ou mobiles. En remplaçant par mutagenèse les *linkers* L1 et L2 de VAP-A (constitués respectivement de 32 et de 24 résidus) par des *linkers* synthétiques plus courts (sL1 et sL2, de séquences GGSGGSGG et GSG), nous avons observé, par cryomicroscopie électronique, que cette forme mutée de la protéine, VAP-A sL1/2, purifiée et reconstituée dans des protéoliposomes, est beaucoup moins flexible que la protéine non mutée, bien qu'elle conserve sa capacité d'interagir avec des protéines contenant un motif FFAT [7].

Pour étudier l'impact des régions intrinsèquement désordonnées de VAP-A dans un contexte cellulaire, nous avons utilisé une lignée de cellules épithéliales pigmentaires de la rétine humaine (cellules RPE1) immortalisée par expression de la protéine hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*). Cette lignée cellulaire, dont le caryotype est stable, est couramment utilisée pour étudier le trafic membranaire. Nous avons établi des lignées hTERT-RPE1 génétiquement dépourvues de VAP-A par la technique CRISPR/Cas9, afin de réaliser des expériences



de réexpression de VAP-A ou de VAP-A sL1/2 par transfection en évitant toute dimérisation avec la protéine VAP-A endogène. Nous avons constaté que la présence de la mutation sL1/2 dans la protéine VAP-A réexprimée entraîne son déplacement complet vers les sites de contact membranaire entre réticulum endoplasmique et mitochondrie, au détriment de ceux entre réticulum endoplasmique et réseau trans-golgien, ce qui perturbe l'activité de transfert de lipides de ses différents partenaires de liaison (tels que la protéine OSBP) à ces sites de contact. Étonnamment, nous montrons qu'aux sites de contact membranaire entre réticulum endoplasmique et mitochondrie, la réexpression de VAP-A sL1/2 mime les fonctions de la protéine endogène (non mutée) : elle restaure le métabolisme de la cardiolipine et la capacité de fusion mitochondriale (fonctions perdues en l'absence de VAP-A) grâce aux interactions de VAP-A sL1/2 avec PTPIP51 et VPS13A. Notons aussi qu'une autre construction rigide, obtenue en allongeant artificiellement le domaine *coiled-coil* de VAP-A, se comporte comme le mutant VAP-A sL1/2. En revanche, d'autres constructions flexibles dans lesquelles les *linkers* de VAP-A ont été remplacés par des peptides de même longueur, mais dont la séquence d'acides aminés est différente (séquence inversée, ou riche en résidus Gly et Ser), ont une localisation et une fonction similaires à celles de la protéine VAP-A endogène [7]. Cela montre que ce n'est pas la séquence d'acides aminés précise, mais bien la nature non structurée et flexible des régions intrinsèquement

désordonnées de la protéine VAP-A qui lui permet de s'engager fonctionnellement dans les divers sites de contact membranaire.

### Maintenir le contact en toutes circonstances

Malgré la dynamique de leur réseaux respectifs, le réticulum endoplasmique et les mitochondries établissent entre eux des sites de contact membranaire particulièrement stables dans le temps [9]. Au contraire, les sites de contact entre réticulum endoplasmique et réseau trans-golgien sont éphémères : ces deux organelles s'associent et se dissocient rapidement au gré du *turnover* de PI4P [10]. Grâce à ses *linkers* flexibles, la protéine VAP-A endogène peut donc opérer dans des sites de contact membranaire très dynamiques, comme ceux entre le réticulum endoplasmique et le réseau trans-golgien, alors qu'une protéine VAP-A dont les domaines *linkers* ont été artificiellement modifiés pour la rendre plus rigide se concentre préférentiellement dans les sites de contact membranaire plus stables, comme ceux entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Il a d'ailleurs été possible de relocaliser cette protéine mutée aux sites de contact entre réticulum endoplasmique et réseau trans-golgien en stabilisant artificiellement ces derniers par surexpression d'une protéine de pontage membranaire [7].

Nous suggérons que les régions intrinsèquement désordonnées de VAP-A se comportent comme des ressorts moléculaires qui assurent sa flexibilité et lui permettent ainsi de s'adapter aux contraintes spécifiques des différents

sites de contact membranaire, afin de faciliter le contact avec ses partenaires de liaison [7]. De nombreuses autres protéines abondantes aux sites de contact membranaire ont également des régions prédites comme intrinsèquement désordonnées : il se pourrait que cette flexibilité conformationnelle soit une caractéristique générale des protéines impliquées dans l'organisation et la dynamique de ces sites. ♦

### VAP-A: a thread to weave communication between organelles.

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Prinz WA, Toulmay A, Balla T. The functional universe of membrane contact sites. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020 ; 21 : 7-24.
2. Murphy SE, Levine TP. 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* 2016 ; 1861 : 952-61.
3. Mesmin B, Bigay J, Moser von Filseck J, et al. A four-step cycle driven by PI4P hydrolysis directs sterol/PI4P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell* 2013 ; 155 : 830-43.
4. Yeo HK, Park TH, Kim HY, et al. Phospholipid transfer function of PTPIP51 at mitochondria-associated ER membranes. *EMBO Rep* 2021 ; 22 : e51323.
5. Kumar N, Leonzino M, Hancock-Cerutti W, et al. VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites. *J Cell Biol* 2018 ; 217 : 3625-39.
6. de la Mora E, Dezi M, Cicco AD, et al. Nanoscale architecture of a VAP-A-OSBP tethering complex at membrane contact sites. *Nat Commun* 2021 ; 12 : 3459.
7. Subra M, Dezi M, Bigay J, et al. VAP-A intrinsically disordered regions enable versatile tethering at membrane contact sites. *Dev Cell* 2023 ; 58 : 121-138.e9.
8. Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015 ; 16 : 18-29.
9. Friedman JR, Webster BM, Mastroratte DN, et al. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J Cell Biol* 2010 ; 190 : 363-75.
10. Mesmin B, Bigay J, Polidori J, et al. Sterol transfer, PI4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP. *EMBO J* 2017 ; 36 : 3156-74.