



**HAL**  
open science

# Caractérisation d'un nouveau mécanisme permettant la régulation des sites de contact membranaires

Arthur Martinet

► **To cite this version:**

Arthur Martinet. Caractérisation d'un nouveau mécanisme permettant la régulation des sites de contact membranaires. Sciences pharmaceutiques. 2020. hal-03298171

**HAL Id: hal-03298171**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03298171>**

Submitted on 6 Jan 2023

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE



FACULTÉ  
DE PHARMACIE

UNIVERSITE DE LORRAINE  
2020

---

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 29 septembre 2020, sur un sujet dédié à :

CARACTERISATION D'UN NOUVEAU MECANISME  
PERMETTANT LA REGULATION  
DES SITES DE CONTACT MEMBRANAIRE

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par Arthur MARTINET

né(e) le 27 mars 1992

**Membres du Jury**

Président : M. Bertrand RIHN, Professeur des universités, Médecin

Juges : M. Fabien ALPY, Chargé de Recherche INSERM  
M. Jean-Louis MERLIN, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Pharmacien  
M. Alexandre HARLE, Maître de conférences des Universités-Praticien Hospitalier,  
Pharmacien  
M<sup>me</sup> Valérie LAHET, Praticienne hospitalière, Pharmacienne

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2019-2020**

**DOYEN**

Raphaël DUVAL

**Vice-Doyen**

Julien PERRIN

**Directrice des études**

Marie SOCHA

**Conseil de la Pédagogie**

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

**Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier**

Présidente, Béatrice DEMORE

**Commission Prospective Facultaire**

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

**Commission de la Recherche**

Présidente, Caroline GAUCHER

**Chargés de Mission**

**Communication**

**Innovation pédagogique**

**Référente ADE**

**Référente dotation sur projet (DSP)**

**Référent vie associative**

Aline BONTEMPS

Alexandrine LAMBERT

Virginie PICHON

Marie-Paule SAUDER

Arnaud PALLOTTA

**Responsabilités**

**Filière Officine**

Caroline PERRIN-SARRADO

**Filière Industrie**

Julien GRAVOULET

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Filière Hôpital**

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

**Pharma Plus ENSIC**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Pharma Plus ENSAIA**

Xavier BELLANGER

**Pharma Plus ENSGSI**

Igor CLAROT

**Cellule de Formation Continue et Individuelle**

Luc FERRARI

**Commission d'agrément des maîtres de stage**

François DUPUIS

**ERASMUS**

Mihayl VARBANOV

**DOYENS HONORAIRES**

**PROFESSEURS EMERITES**

Chantal FINANCE

Jeffrey ATKINSON

Francine PAULUS

Max HENRY

Claude VIGNERON

Pierre LEROY

Philippe MAINCENT

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Jean-Claude BLOCK

Monique ALBERT

Pierre DIXNEUF

Mariette BEAUD

Chantal FINANCE

François BONNEAUX

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérald CATAU

Thérèse GIRARD

Jean-Claude CHEVIN

Pierre LABRUDE

Jocelyne COLLOMB

Vincent LOPPINET

Bernard DANGIEN

Alain NICOLAS

Marie-Claude FUZELLIER

Janine SCHWARTZBROD

Françoise HINZELIN

Louis SCHWARTZBROD

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Francine PAULUS

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE

Gabriel TROCKLE

Annie PAVIS

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Colette ZINUTTI

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie, Biologie cellulaire
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

**MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Loïc REPPEL	82	Biothérapie
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Xavier BELLANGER <sup>H</sup>	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT <sup>H</sup>	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND <sup>H</sup>	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN <sup>H</sup>	86	Chimie thérapeutique
Cédric BOURA <sup>H</sup>	86	Physiologie
Sandrine CAPIZZI	87	Parasitologie
Antoine CAROF	85	Informatique
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Natacha DREUMONT <sup>H</sup>	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAÏ <sup>H</sup>	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS <sup>H</sup>	86	Pharmacologie
Reine EL OMAR	86	Physiologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER <sup>H</sup>	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD <sup>H</sup>	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT <sup>H</sup>	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire

Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN <sup>H</sup>	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER <sup>H</sup>	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Arnaud PALLOTTA	85	Bioanalyse du médicament
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL <sup>H</sup>	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET <sup>H</sup>	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT <sup>H</sup>	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU <sup>H</sup>	87	Biochimie et Biologie moléculaire

**PROFESSEUR ASSOCIE**

Julien GRAVOULET	86	Pharmacie clinique
------------------	----	--------------------

**PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

<sup>H</sup> Maître de conférences titulaire HDR

\* Disciplines du Conseil National des Universités :

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DE GALIEN

**En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :**

**D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité**

**En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession**

**De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens**

**De coopérer avec les autres professionnels de santé**

**Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.**

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS  
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS  
DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME  
PROPRES A LEUR AUTEUR ».



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Bertrand Rihn, président du jury et co-directeur et les membres de mon jury Monsieur Jean-Louis Merlin, Monsieur Alexandre Harle et Madame Valérie Lahet d'avoir accepté de juger ma thèse d'exercice de pharmacie. Merci pour le temps que vous avez consacré à lire ce manuscrit.

Je remercie également mon directeur de thèse, Fabien Alpy qui m'encadre depuis 4 ans déjà. Je te remercie d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions, d'avoir toujours été présent à chaque fois que j'en avais besoin et de ton aide précieuse. Ta patience, ta pédagogie et ta bonne humeur m'ont permis d'évoluer dans un cadre exceptionnel et formateur. Je te remercie sincèrement pour tout.

Je remercie le Docteur Catherine Tomasetto de m'avoir accueilli dans son laboratoire depuis mon stage de 5<sup>ème</sup> année de pharmacie. Merci pour tous vos conseils et pour votre pédagogie tout au long de mon master et de ma thèse de science. Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'équipe TOMASETTO : Corinne, Nassim, Thiên-Nga, Thomas, Laetitia, Amélie, Massimo et Mehdi qui font de ce labo un lieu de convivialité et de bonne humeur. Vous aurez le droit à un petit texte personnel chacun pour ma thèse de Science, il va falloir être patient d'ici-là. C'est un réel plaisir de faire ma thèse avec vous et j'ai vraiment de la chance de vous avoir comme collègues.

Je remercie mes amis de Pharma, Juliette, Lorène, Marc, Maxime et Jérémy. On a passé tellement de bons moments ensemble pendant nos études. Grâce à vous, j'ai appris beaucoup de la vie étudiante et je garde de merveilleux souvenirs de toutes nos soirées. Je remercie également Arthur et Christopher, cela fait tellement longtemps que l'on se connaît. On a bien changé mais notre amitié reste toujours intacte.

À ma famille, qui m'a soutenu et permis de décompresser lors de vacances ou week-end. A ma marraine, Marie-Christine, qui m'a décidé à poursuivre mes études de Pharmacie dans la recherche et qui m'a permis de m'installer sereinement à Strasbourg. À mes parents, Corinne et Noël, vous m'avez toujours encouragé et soutenu et j'ai toujours pu compter sur vous. A mes frères, Victor et Nicolas, ne changez rien vous êtes géniaux. Merci pour tout.

Et enfin à ma partenaire, Charlotte, tu m'as toujours épaulé pendant ces années. Tu as été là pour me motiver, m'encourager et me soutenir. Je ne sais pas comment j'aurais fait sans toi à mes côtés. Merci à toi.

## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	
<b>Abréviations et acronymes</b> .....	<b>4</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>5</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>A. La cellule eucaryote</b> .....	<b>6</b>
1. Le réticulum endoplasmique .....	6
1. L'appareil de golgi.....	6
2. Les endosomes et lysosomes.....	6
3. La mitochondrie .....	7
<b>B. Les sites de contact membranaire</b> .....	<b>7</b>
1. Comment se forment les SCM ? .....	8
2. La fonction des sites de contact .....	8
3. Le réticulum endoplasmique : L'organite majoritairement impliqué dans la formation de SCM ....	14
4. Les protéines à motifs FFAT .....	16
<b>C. Les SCM associés à des pathologies cancéreuses</b> .....	<b>19</b>
1. Le Cancer du sein .....	19
2. Le lien avec les SCM impliquant la protéine STARD3.....	20
3. Le Cancer et Nir2 .....	21
4. Le Cancer et CERT .....	22
5. Le Cancer et la protéine à activité phosphatase PTP1B.....	22
<b>D. Dynamique des SCM</b> .....	<b>23</b>
<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>25</b>
<b>E. Construction des plasmides d'expression protéique</b> .....	<b>25</b>
1. Obtention des ADN .....	25
2. Purification des fragments de PCR.....	25
3. Insertion des fragments dans le vecteur pQCXIP.....	25
4. Transformation bactérienne.....	26

5. Minipréparation.....	26
6. Midipréparation.....	27
<b>F. Culture cellulaire.....</b>	<b>27</b>
1. Transfection.....	27
2. Établissement de lignées cellulaires stables de surexpression par infection rétrovirale.....	28
<b>G. Extraction et quantification de protéines.....</b>	<b>28</b>
<b>H. Purification de la protéine GST-STARD3.....</b>	<b>28</b>
1. Préparation de la résine et des échantillons.....	29
2. Précipitation puis élution.....	29
<b>I. Analyse de l'expression des protéines par Western Blot.....</b>	<b>29</b>
1. Électrophorèse en condition dénaturante.....	29
2. Transfert des protéines.....	30
3. Blocage des sites aspécifiques et immunoréaction.....	30
4. Révélation du WB.....	31
<b>J. Production et purification de protéine recombinante.....</b>	<b>31</b>
1. Production.....	31
2. Purification.....	31
3. Analyse de l'expression des protéines recombinantes.....	32
<b>K. Co-précipitation peptidique.....</b>	<b>32</b>
1. Co-précipitation avec un extrait protéique.....	32
1. Co-précipitation avec des protéines recombinantes.....	33
<b>L. Immunofluorescence.....</b>	<b>33</b>
1. Préparation des lamelles.....	33
2. Fixation, perméabilisation des cellules et blocage des sites aspécifiques.....	33
3. Immunoréaction.....	34
4. Montage, conservation et imagerie.....	34
<b>Résultats.....</b>	<b>35</b>
<b>A. La phosphorylation permet de réguler les SCM entre le réticulum endoplasmique et les endosomes.....</b>	<b>36</b>
1. La protéine STARD3 est phosphorylée <i>in vivo</i> .....	36
2. STARD3 interagit avec VAPs et MOSPD2 seulement lorsqu'elle est phosphorylée.....	37

3. STARD3 phosphorylée est recrutée au niveau des sites de contact membranaire ER-endosomes .40

**B. La phosphorylation permet de réguler les SCM entre le réticulum endoplasmique et les autres organites ..... 42**

1. Identification de nouvelles protéines possédant un Phospho-FFAT par une analyse *in silico*.....43

2. MIGA2, PTPIP51, FIP200, Kv2.1 et Kv2 .2 interagissent seulement lorsqu'ils sont phosphorylés ....46

***Conclusion et Discussion* ..... 48**

***Bibliographie* ..... 54**

## Abréviations et acronymes

A :	Alanine	kDa :	Kilodalton
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique	Kv :	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily B
APS :	Ammonium Persulfate	LB :	Lysogeny Broth
ATCC :	American Type Culture Collection	LTD :	Lipid transfer domain
BCA :	Acide bicinchoninique	LTP :	Lipid transfer protein
BET :	Bromure d'éthidium	MENTAL :	MLN64 amino-terminal
BSA :	Bovine Serum Albumin	MIGA2 :	Mitoguardin2
CCD :	<i>Charge Coupled Device</i>	MOSPD2 :	Motile sperm domain containing protein 2
CERT :	Ceramide Transfert Protein	MSP :	Major Sperm Protein
CRAL :	Cellular retinaldehyde-binding protein	Nir :	Phosphatidylinositol transfer protein
D :	Acide aspartique	ORP :	Oxysterol-binding protein
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	P :	Proline
dNTP :	Désoxyribonucléotides	PAGE :	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
DTT :	Dithiothreitol	PBS :	Phosphate Buffered Saline
E :	Acide glutamique	PCR :	Polymerase Chain Reaction
ECL :	Enhanced ChemiLuminescence	PFA :	Paraformaldéhyde
EDTA :	Ethylène Diamine Tétracétique	pH :	Potentiel Hydrogène
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor	PH :	Pleckstrin Homology
EP :	Endosome précoce	PM :	Membrane Plasmique
E-Syt :	Extended synaptotagmin	PTP1B :	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1
ET :	Endosome tardif	PTPIP51 :	Microtubule Dynamics Protein 3
F :	Phénylalanine	RE :	Réticulum endoplasmique
FFAT :	Two phenylalanines in an Acidic Tract	S :	Serine
FIP200 :	RB1-inducible coiled-coil protein 1	SCM :	Site de contact membranaire
GFP :	Green Fluorescent Protein	SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
GST :	Glutathion S transferase	STARD :	Star related lipid transfer domain containing protein
HeLa :	Henrietta Lacks	T :	Threonine
HER2 :	Human Epidermal growth factor Receptor 2	TEMED :	Tétraméthyléthylènediamine
IGBMC :	Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire	TRIO :	Triple functional domain protein
IPTG :	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside	UV :	Ultra Violet
		V :	Volt
		VAP :	Vesicle-Associated Membrane Protein associated protein
		Y :	Tyrosine

## Avant-propos

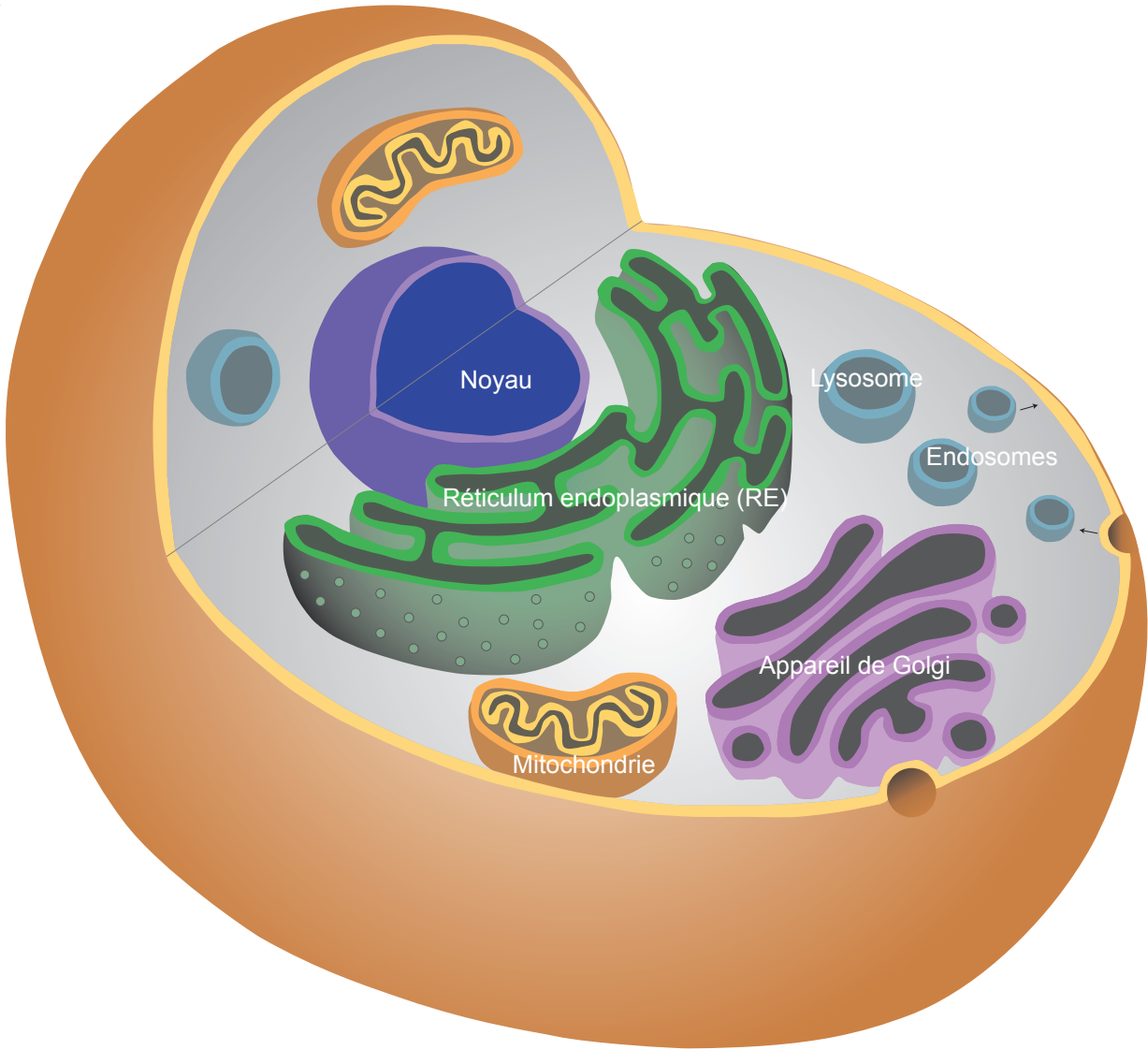
Durant mon doctorat, j'ai étudié un mécanisme biologique récemment découvert, les sites de contact membranaire (SCM) entre deux organites de la cellule. Les contacts entre organites ont été initialement observés par microscopie électronique dans les années 50 (Bernhard and Rouiller, 1956) puis caractérisés quelques années plus tard dans les années 90-2000 (Levine, 2004; Vance, 1990). Les SCM sont formés par des interactions protéines-protéines et/ou protéines-lipides et permettent d'échanger des molécules entre les organites. Depuis la découverte de ce phénomène dans les années 2000, de nombreuses équipes recherchent les protéines et lipides qui forment les SCM et les fonctions associées aux contacts (Csordás et al., 2018; Di Mattia et al., 2020; Peretti et al., 2020; Scorrano et al., 2019; Stefan, 2020; Venditti et al., 2020; Wu et al., 2018). Si les transports de molécules entre organites sont dérégulés, des pathologies telles que le cancer pourraient être favorisées. Pour essayer de comprendre la fonction cellulaire des contacts et leurs rôles dans les pathologies, j'ai étudié les mécanismes de formation des sites de contact membranaire (SCM) et en particulier des complexes protéiques impliqués dans ce processus.

Dans un premier temps, le manuscrit de thèse commence par une brève description de la cellule eucaryote et des organites majeurs étudiés. Ensuite, sont définis les sites de contact membranaire, leur formation et leurs fonctions au sein de la cellule.

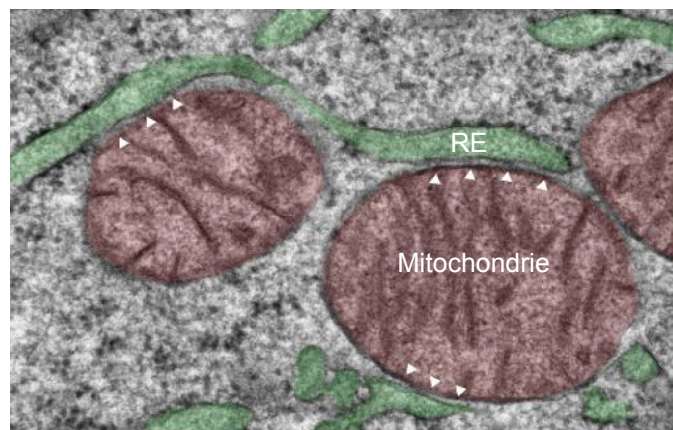
Dans un second temps, les protéines étudiées durant la thèse sont décrites. En effet, j'ai principalement étudié trois protéines du réticulum endoplasmique (VAP-A, VAP-B et MOSPD2) et leurs partenaires. Ces trois protéines possèdent un domaine similaire qui interagit avec un motif protéique présent dans de nombreuses protéines dont certaines sont associées à des pathologies. Dans cette thèse, j'ai principalement orienté mes recherches sur l'interaction des protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2 avec la protéine STARD3. La protéine STARD3, surexprimée dans les cancers du sein HER2+, est un transporteur de cholestérol entre organites qui favorisent la croissance cellulaire (Alpy and Tomasetto, 2014; Tomasetto et al., 1995; Wilhelm et al., 2017).

Mon projet de thèse était d'identifier le mécanisme qui régule l'interaction entre les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2 et la protéine STARD3. Pour cela, des expériences d'interactions *in vitro* et *in cellulo* ainsi que des expériences de localisation intracellulaire de ces protéines ont été effectuées. Dans une deuxième partie des résultats, des analyses *in silico* et *in cellulo* ont été effectuées afin de rechercher si d'autres protéines comme STARD3 possèdent ce même mécanisme de régulation.

A



B



**Figure 11 : la cellule eucaryote**

A : Représentation schématique d'une cellule eucaryote avec ses organites. Le noyau au centre de la cellule est en violet, Le réticulum endoplasmique en vert, l'appareil de Golgi en rose, la mitochondrie en jaune orange et les endosomes et lysosomes en bleu clair. Jusqu'au année 50 les organites de la cellule étaient considérés comme des unités indépendantes avec une fonction associée à chaque organite.

B : Images de microscopie électronique montrant des sites de contact membranaire entre le réticulum endoplasmique en vert et la mitochondrie en brun. Dans les années 2000, il a été montré que les organites de la cellule sont reliés entre eux par des sites de contact membranaire qui sont des voies de transport de molécules.

# Introduction

## A. La cellule eucaryote

Les êtres vivants sont constitués de petites unités biologiques appelées cellules. Les cellules possèdent une membrane à double feuillet lipidique appelée membrane plasmique qui les isole les unes des autres et de l'environnement extracellulaire (Harayama and Riezman, 2018). Dans cette thèse, je me suis intéressé aux cellules eucaryotes. Elles sont composées d'un noyau contenant les informations génétiques de la cellule et d'un cytoplasme qui est une solution aqueuse séparant le noyau de la membrane plasmique (Lodish, 2016). Au sein du cytoplasme, les cellules sont partitionnées en organites qui permettent une division du travail cellulaire. Les organites sont des structures cellulaires interdépendantes délimitées par une membrane qui constitue une barrière à la diffusion de molécules solubles (van Meer et al., 2008) (Fig I1A). Chaque organite possède des fonctions bien définies afin d'assurer la survie, la croissance, la division et la mort de la cellule.

### 1. Le réticulum endoplasmique

Le RE est composé de deux parties morphologiquement distinctes en microscopie électronique. En effet, la présence ou non de ribosome à sa surface permet de distinguer le réticulum rugueux du réticulum lisse. Le réticulum rugueux possédant des ribosomes à sa surface permet la biosynthèse des protéines sécrétées et des protéines membranaires alors que le réticulum lisse est impliqué dans la synthèse des lipides et le stockage du calcium (Schwarz and Blower, 2016). Certaines protéines et lipides nouvellement synthétisés vont être maturés dans d'autres organites tels que l'appareil de Golgi ou la mitochondrie (Holthuis and Menon, 2014).

### 1. L'appareil de golgi

L'appareil de Golgi est un organite intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Il est impliqué dans la maturation des protéines, des lipides, leur tri et leur transport en fonction de leur devenir (Farhan and Rabouille, 2011). Les protéines et lipides sont maturés par les enzymes golgiennes, ensuite les protéines sont transmises soit à la membrane plasmique pour être sécrétées, soit vers la voie endosomale.

### 2. Les endosomes et lysosomes

Les endosomes permettent le transport de macromolécules extracellulaires internalisées par la voie d'endocytose. Il existe plusieurs types d'endosomes: les endosomes



précoces, les endosomes tardifs et les endosomes de recyclage (Huotari and Helenius, 2011). Les endosomes font le tri des macromolécules pour soit les renvoyer à la membrane plasmique (par exemple certains récepteurs membranaires) via les endosomes de recyclage, soit vers le RE et l'appareil de golgi via les endosomes précoces et tardifs ou soit vers les lysosomes via les endosomes tardifs afin de dégrader les molécules. Les endosomes tardifs fusionnent avec les lysosomes et forment des endolysosomes. Cette fusion permet de digérer les molécules internalisées puisque les lysosomes sont des organites composés de protéases, nucléases et lipases qui dégradent ces molécules (Saftig and Klumperman, 2009).

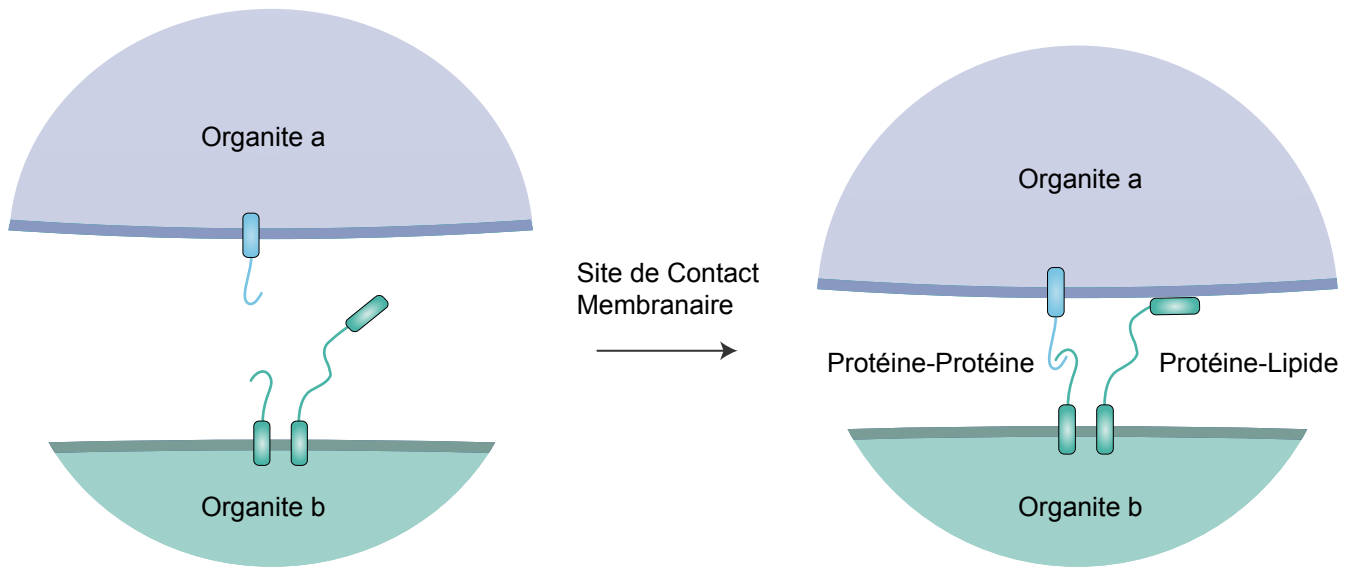
### 3. La mitochondrie

La mitochondrie est l'organite de la production d'énergie de la cellule. En effet, elle produit de l'ATP (Adénosine TriPhosphate) essentiel au métabolisme cellulaire via la phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire qui implique le cycle de Krebs et la  $\beta$ -oxydation (Vartak et al., 2013). De plus, la mitochondrie est composée de deux membranes, une membrane externe et une membrane interne. La membrane interne délimite la matrice mitochondriale qui est composée de protéines, de ribosomes, d'ARN et d'ADN mitochondrial. Elle est aussi concernée dans la maturation lipidique en transformant les phosphatidylsérines biosynthétisées dans le RE en phosphatidyléthanolamine (Holthuis and Menon, 2014). La mitochondrie est un organite essentiel à la cellule qui est impliqué dans l'apoptose, le cycle cellulaire et les voies de signalisation (Pfanner et al., 2019).

Pendant de longues années, les organites ont été décrits comme des structures individuelles et fonctionnant séparément. En effet, les techniques de microscopie et de biologie cellulaire ne permettaient pas de visualiser le rapprochement entre les organites. Ce fut, dans les années 50, grâce au développement de la microscopie électronique, que la description des morphologies morphologique est bien le terme ou morphologie ? des contacts a pu être réalisée ; à partir des années 1990, la fonction des contacts entre organites a commencé à être caractérisée.

### B. Les sites de contact membranaire

Les sites de contact membranaire (SCM) entre organites ont été visualisés pour la première fois en 1956 par des études de microscopie électronique (Bernhard and Rouiller, 1956). A cette époque, la compréhension des implications fonctionnelles et physiologiques de



Adapted from Prinz et al, 2020

**Figure 12 : Mécanisme moléculaire de formation d'un site de contact membranaire**

Les organites de la cellule sont entourés d'une membrane composée de lipides et de protéines. Les protéines en surface peuvent interagir soit avec des protéines présentes en surface d'autres organites ou directement avec les lipides qui composent la membrane des autres organites afin de rapprocher les membranes et former un SCM.

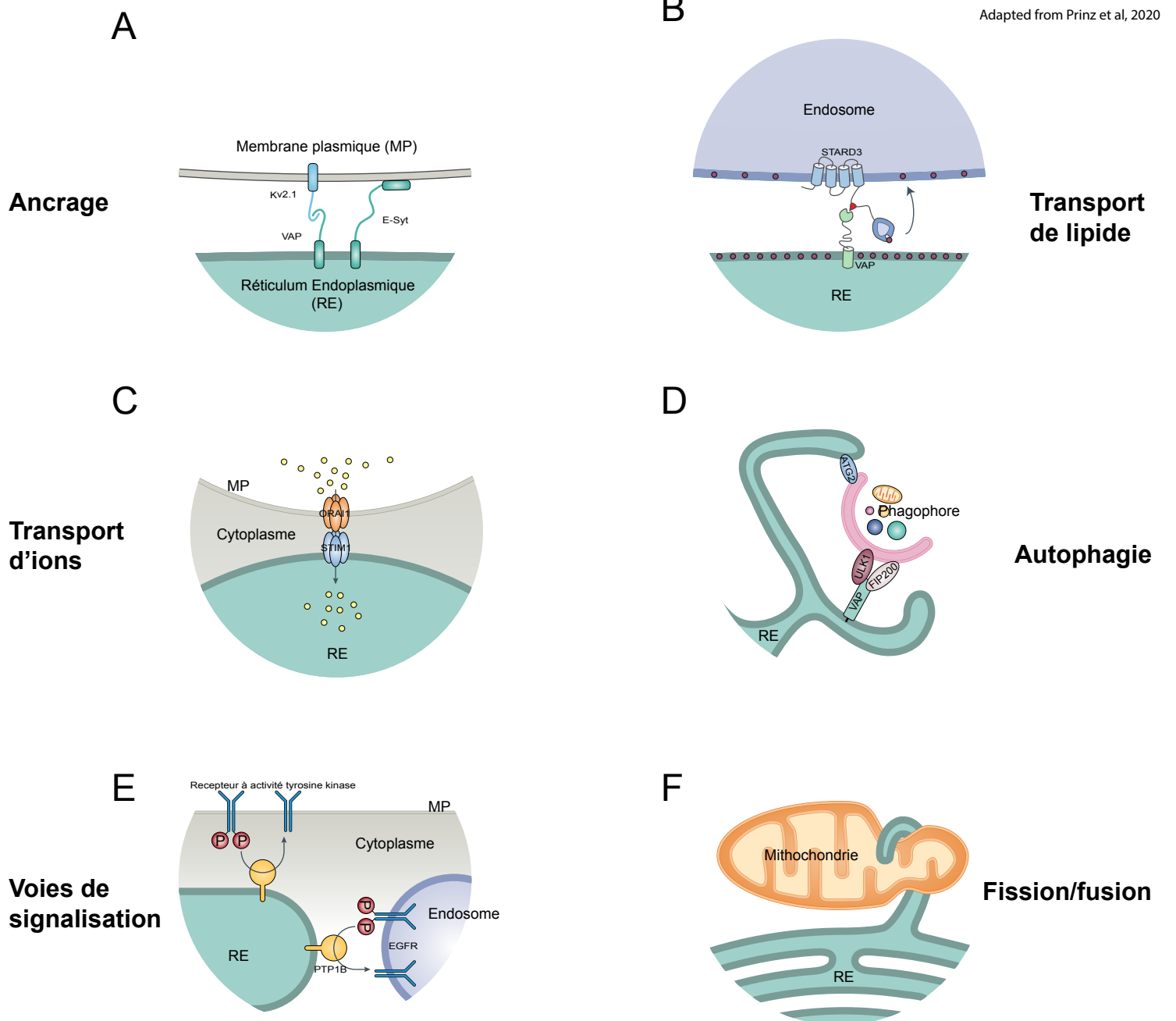
ce résultat n'était pas complète. En effet, L'équipe de Bernhard et Rouiller avait émis plusieurs hypothèses sur l'implication physiologique de ces contacts ; cependant, la possibilité de contacts fortuits entre les membranes de deux organites résultant de l'encombrement spatial du cytoplasme, ne pouvait pas être exclue. Ce fut 40 ans plus tard que les mécanismes de formation et la fonction des SCM ont commencé à être décrits (Levine, 2004; Vance, 1990). En effet, il a été défini que ces structures sont caractérisées par le rapprochement à une distance inférieure à 30 nm des membranes de deux organites (Levine and Loewen, 2006). Par exemple, la figure I1B montre que la membrane de la mitochondrie est en contact direct avec la membrane du réticulum endoplasmique et forme des sites de contact membranaire. Plusieurs analyses ont évalué que 5 à 10% de la surface mitochondriale est en contact avec le RE. (Alpy et al., 2013; Di Mattia et al., 2018; Naon et al., 2016; Stoica et al., 2014). L'étude de la structure et des fonctions des SCM fait naître de nouvelles perspectives dans la compréhension de la biologie cellulaire.

### 1. Comment se forment les SCM ?

D'un point de vue moléculaire, la formation des SCM est médiée par des interactions protéine-protéine et/ou protéine-lipide (Phillips and Voeltz, 2016; Raiborg et al., 2015)(Fig. I2). A la surface des membranes de chaque organite, des protéines d'ancrage permettent la formation de SCM. Ces protéines sont de deux types, soit elles interagissent avec une protéine ancrée à la surface d'un autre organite, soit elles interagissent avec les lipides membranaires d'un autre organite. Ces interactions protéine-protéine et/ou protéine-lipide permettent le rapprochement des membranes et la formation de sites de contact membranaire (Levine, 2004). Au sein de ces contacts, les protéines peuvent réaliser plusieurs fonctions (Prinz et al., 2020).

### 2. La fonction des sites de contact

L'identification des fonctions associées aux SCM est liée aux complexes protéiques qui forment ce contact. En effet, les protéines formant les contacts entre organites possèdent des domaines structuraux fonctionnels autres que ceux spécifiques à la formation de SCM. C'est pour cela que l'identification et la caractérisation de nouveaux complexes protéiques est un enjeu majeur depuis une vingtaine d'années. Les protéines d'ancrage et leurs partenaires sont impliqués dans plusieurs fonctions essentielles à la cellule en permettant le transport de



**Figure 13 : les fonctions des sites de contact membranaire**

A : Les protéines qui forment les SCM peuvent créer plusieurs contacts sur les mêmes organites de la cellule. Par exemple, les protéines Kv2.1 peuvent créer des contacts entre le RE et la membrane plasmique mais la protéine E-Syt peut également former des contacts RE-MP en interagissant avec les lipides présents sur la membrane plasmique. Tous ces contacts protéine-protéine et/ou protéine-lipide stabilisent le rapprochement des membranes.

B : Certaines de ces protéines transportent des lipides d'un organite à un autre. Par exemple la protéine STARD3 peut interagir avec la protéine VAP et former un SCM RE-endosome. Au niveau de ce contact la protéine capte et transporte des molécules de cholestérol du RE vers les endosomes.

C : Les protéines peuvent aussi transporter des ions. Par exemple les protéines ORAI1 et STIM1 forment des SCM RE-MP et via un canal calcique transportent les ions calcium à travers la membrane plasmique et le cytoplasme au RE.

D : La cellule dégrade les molécules indésirables en fabriquant des autophagosomes. Les protéines VAPs, FIP200 et ULK1 forment un complexe protéique permettant de stabiliser la fabrication du phagophore au niveau du RE et la création d'autophagosomes.

E : Certaines voies de signalisation font intervenir des phosphorylations en cascade et certaines protéines appelées phosphatase enlèvent le phosphate des molécules phosphorylées. Cependant, la phosphatase PTP1B est active et déphosphoryle la protéine EGFR au niveau de sites de contact entre le RE et les endosomes. Les SCM peuvent ainsi agir et réguler des voies de signalisation.

F : Les SCM sont aussi présents au cours de la fission et de la fusion mitochondriale et endosomale. En effet, il a été identifié que le réticulum endoplasmique entoure la partie de la mitochondrie qui va se diviser et le contact entre la mitochondrie et le RE induit la fission.

matériel et d'information entre les organites de la cellule afin qu'ils puissent accomplir leurs tâches (Prinz et al., 2020). Les SCM ont 6 fonctions essentielles : ancrage, transport de lipides, transport d'ions, autophagie, voies de signalisation et fusion d'organites (Fig. I3). Nous allons voir plus en détail ces différentes fonctions avec des exemples de complexes protéiques associés à ces fonctions.

#### *a) Ancrage*

L'une des fonctions principales des protéines présentes au niveau des SCM est de former et maintenir le contact entre deux membranes. Pour chaque SCM, plusieurs protéines d'ancrage agissent simultanément pour maintenir le contact et favoriser les échanges entre ces deux organites (Eisenberg-Bord et al., 2016). Par exemple, les protéines du réticulum endoplasmique VAP (Vesicle-Associated Membrane Protein associated proteins) interagissent avec les protéines de la membrane plasmique Kv2.1 (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily B Member 1) pour former des contacts RE-PM (Fig. I3A)(Johnson et al., 2018). Les protéines du RE E-Syt1-3 (Extended synaptotagmin-1 à 3) peuvent elles aussi former des contacts ER-PM en interagissant directement avec les lipides de la membrane plasmique (Fig.I3A)(Giordano et al., 2013). Ces différents complexes protéiques stabilisent le contact via différents mécanismes d'interaction (protéine-protéine et ou protéine-lipide) et ces complexes sont plus ou moins importants dans la stabilité et la formation de SCM. En effet, l'équipe De Matteis qui étudie les SCM entre le RE et l'appareil de Golgi a montré que certaines protéines sont plus importantes que d'autres dans leurs rôles d'ancrage et de stabilisation des contacts. En effet, Les protéines ORP9 (oxysterol-binding protein-related protein 9), ORP10 (oxysterol-binding protein-related protein 10), ORP11 (oxysterol-binding protein-related protein 11) et OSBP (oxysterol-binding protein 1) sont impliquées dans la formation de SCM entre le RE et l'appareil de Golgi. Cependant l'inhibition de l'expression de la protéine ORP10 réduit considérablement les SCM entre le RE et l'appareil de Golgi alors que l'abolition de l'expression des protéines ORP9, ORP11 ou OSBP ne modifie que très peu le nombre de contacts RE-Golgi (Venditti et al., 2019). Ceci montre que plusieurs complexes protéiques travaillent ensemble afin de former et maintenir des contacts entre organites.

#### *b) Transport de lipide*

Les lipides sont des molécules amphiphiles ayant de multiples fonctions : ils composent les membranes cellulaires, constituent une réserve d'énergie qui est stockée ou utilisée en fonction des besoins de la cellule, et sont aussi des hormones : par exemple : les stéroïdes

(œstrogènes, androgènes etc...) sont des messagers qui activent certains récepteurs nucléaires (Di Paolo and De Camilli, 2006; Fahy et al., 2011; van Meer et al., 2008; Thiam et al., 2013). Les lipides se déplacent difficilement dans les milieux hydrophiles à cause de leur partie hydrophobe mais leur transport est essentiel pour la biosynthèse par exemple. Ainsi, les phosphatidylsérines sont bio-synthétisées dans le RE puis métabolisées en phosphatidyléthanolamines dans la mitochondrie puis remodifiées en phosphatidylcholines dans le RE (Jain and Holthuis, 2017). Les lipides sont principalement transportés au sein d'une cellule d'un compartiment cellulaire à un autre par transport vésiculaire ou non vésiculaire (Hanada et al., 2003; Maxfield and Wüstner, 2002). Le transport vésiculaire correspond à la formation de vésicule d'un compartiment donneur. Ensuite, la vésicule est transportée jusqu'au compartiment accepteur ou elle fusionne avec la membrane de celui-ci (Bonifacino, 2014). C'est un moyen pour la cellule de transporter des lipides et des protéines membranaires entre deux compartiments. Cependant, certains organites comme le peroxysome et la mitochondrie n'utilisent pas le système de transport vésiculaire. En effet, la cellule possède une autre voie de transport de lipides via un transport non-vésiculaire.

Le transport non vésiculaire emploie des protéines afin de transporter les lipides entre deux compartiments (Kumagai et al., 2005; Wilhelm et al., 2017). Ces protéines sont appelées protéines de transfert lipidiques (LTP : lipid transfer protein). Elles possèdent un domaine de transfert de lipides (LTD : lipid transfer domain) qui capte une ou des molécules de lipides via une poche hydrophobe et le/les transporte/nt vers une membrane réceptrice (Chiapparino et al., 2016; Holthuis and Levine, 2005). De plus, de nombreuses LTP possèdent des régions protéiques permettant de former des SCM (Balla et al., 2019). Le rapprochement des membranes entraîne une réduction de l'espace hydrophile inter-membranaire, ce qui augmente l'efficacité de transport de lipides des LTP (Mesmin et al., 2013). Chaque LTP a des spécificités de lipide et de SCM ce qui permet un transport rapide et spécifique entre deux organites. Les LTPs sont présents entre le RE et l'appareil de Golgi (Kawano et al., 2006), entre le RE et la membrane plasmique (Kim et al., 2015), entre le RE et la mitochondrie (Galmes et al., 2016) ou encore entre le RE et les endosomes (Alpy et al., 2013). Par exemple, la figure I3B montre un contact entre le RE et les endosomes. La protéine de transfert de cholestérol STARD3 (StAR related lipid transfer Domain containing protein 3) est ancrée à la membrane des endosomes. Cette LTP interagit avec la protéine du RE appelée VAP. Cette interaction va rapprocher les membranes des deux organites et permettre à la protéine STARD3 de transporter du cholestérol du réticulum aux endosomes grâce à son domaine de transfert de lipide (Wilhelm et al., 2017). La protéine CERT (Ceramide Transfert Protein = STARD11) quant à elle forme des SCM entre le RE et l'appareil de golgi (Kawano et al., 2006). Au niveau de ce contact, la protéine transporte des céramides, synthétisés dans le RE, vers

l'appareil de golgi (Kumagai and Hanada, 2019). Ce transport est important dans la fabrication de glycosphingolipides ou de sphingomyélines puisque ces lipides sont générés à partir de céramide et que la réaction a lieu dans l'appareil de Golgi (Holthuis and Menon, 2014).

### *c) Transport d'ions*

Les ions régulent l'activité des cellules en activant la sécrétion d'hormones, les messages nerveux et la contraction musculaire entre autres (Islam, 2020; Wulff et al., 2009). Ils permettent aussi le contrôle de la tonicité des membranes en régulant les concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane. Les ions sont essentiels à la cellule, ce sont des messagers primaires avec une action directe sur les canaux ioniques et des messagers secondaires sur les voies de signalisation. Au niveau des SCM, deux types de canaux ioniques ont été décrits jusqu'à présent : les canaux calciques et les canaux potassiques (Burgoyne et al., 2015; Johnson et al., 2018).

Les échanges de calcium font intervenir des SCM entre le RE et la membrane plasmique (Wu et al., 2006) et entre le RE avec la mitochondrie (Csordás et al., 2018). La mitochondrie et le RE sont des lieux de stockage du calcium intra-cellulaire. Par exemple pour les SCM entre le RE et la membrane plasmique, lorsque la concentration en calcium dans le lumen du RE diminue, la protéine STIM1 (Stromal interaction molecule 1) ancrée à la membrane du réticulum forme des oligomères puis s'accumule au niveau de SCM entre le RE et la membrane plasmique en interagissant avec la protéine ORAI1 (Calcium release-activated calcium channel protein 1) présente à la membrane plasmique (Fig. I3C). Les canaux calciques ORAI1 s'activent et ainsi permettent de transporter le calcium extracellulaire vers le cytoplasme. L'activation de la protéine ORAI1 active ensuite la protéine du RE SERCA (Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase) qui transporte le calcium du cytoplasme à l'intérieur du RE afin de rétablir le stock de calcium (Petersen et al., 2017; Wu et al., 2006). Pour la mitochondrie, la protéine PTPIP51 (RMD3 Microtubule Dynamics Protein 3) est ancrée au niveau de la membrane mitochondriale via un domaine transmembranaire dans sa partie N-terminale. Cette protéine interagit avec les protéines du RE VAPs et MOSPD2 ce qui entraîne la formation des contacts entre la mitochondrie et le RE. Ce SCM est impliqué dans l'homéostasie calcique et l'activité synaptique. (De Vos et al., 2012; Gomez-Suaga et al., 2017; Gómez-Suaga et al., 2019; Stoica et al., 2014).

Pour les ions potassiques, les protéines Kv2.1 et Kv2.2 sont des protéines principalement exprimées dans les cellules neuronales. Ces protéines sont ancrées dans la membrane plasmique et peuvent interagir avec les protéines du RE VAP ce qui forme un

contact RE-PM (Johnson et al., 2018; Kirmiz et al., 2018). Les protéines Kv2 sont des canaux potassiques qui permettent un transport du potassium entre le réticulum endoplasmique et le milieu extra cellulaire afin de réguler l'homéostasie du potassium et l'excitabilité neuronale (Fletcher et al., 2017; Johnson et al., 2018, 2019; Lim et al., 2000; Misonou et al., 2005).

#### *d) Autophagie*

L'autophagie est un système qui permet à la cellule de recycler et de dégrader des molécules via les lysosomes (Yim and Mizushima, 2020). Il existe 3 voies d'autophagies : l'autophagie médiée par des chaperonnes, la microautophagie, et la macroautophagie (Mizushima et al., 2008). L'autophagie médiée par des chaperonnes permet d'éliminer ou de recycler des protéines cytoplasmiques, la microautophagie les molécules environnantes des lysosomes et la macroautophagie des molécules et/ou organites cytoplasmiques. Dans notre cas nous nous intéresserons à la macroautophagie. Lors du processus de macroautophagie, la cellule forme des organites entourés de membranes appelés autophagosomes. Les autophagosomes contiennent les éléments indésirables ou à recycler tels que les protéines et les organites non fonctionnels de la cellule (Feng et al., 2014). L'organite se forme grâce à une membrane qui emprisonne les éléments du cytoplasme à digérer. A cette étape, il est appelé phagophore. Lorsque la membrane entoure entièrement l'organite, il est appelé autophagosome. Ensuite, l'autophagosome fusionne avec les lysosomes qui sont les organites de la dégradation pour former un autolysosome et ainsi permettre la dégradation de son contenu. La formation des autophagosomes se passe au niveau de SCM entre le RE et le phagophore et implique plusieurs protéines (Fig. I3D). La protéine du RE VAP interagit avec les protéines ULK1 (Serine/threonine-protein kinase ULK1) et FIP200 (RB1-inducible coiled-coil protein 1) et forme un complexe protéique impliqué dans la biogenèse de l'autophagosome (Hara et al., 2008; Turco et al., 2019; Zhao et al., 2018). De plus, la protéine ATG2 (Autophagy-related protein 2) est aussi une protéine impliquée dans la formation des autophagosomes en transférant des phospholipides entre les compartiments (Osawa et al., 2019). Un autre SCM entre le RE et la PM est aussi impliqué dans la macroautophagie (Nascimbeni et al., 2017) : les protéines E-syt ancrées au RE interagissent avec les lipides de la PM et forment des SCM ER-PM (Giordano et al., 2013). La surexpression des protéines E-Syt2 et E-syt3 induit la formation de SCM ER-PM et la formation d'autophagosomes alors que leur inhibition réduit la biogenèse des autophagosomes (Nascimbeni et al., 2017). Ces complexes protéiques permettent la fabrication de l'autophagosome en favorisant les contacts avec le RE et en permettant des échanges de lipides pour générer la membrane des autophagosomes.



#### *e) Voies de signalisation*

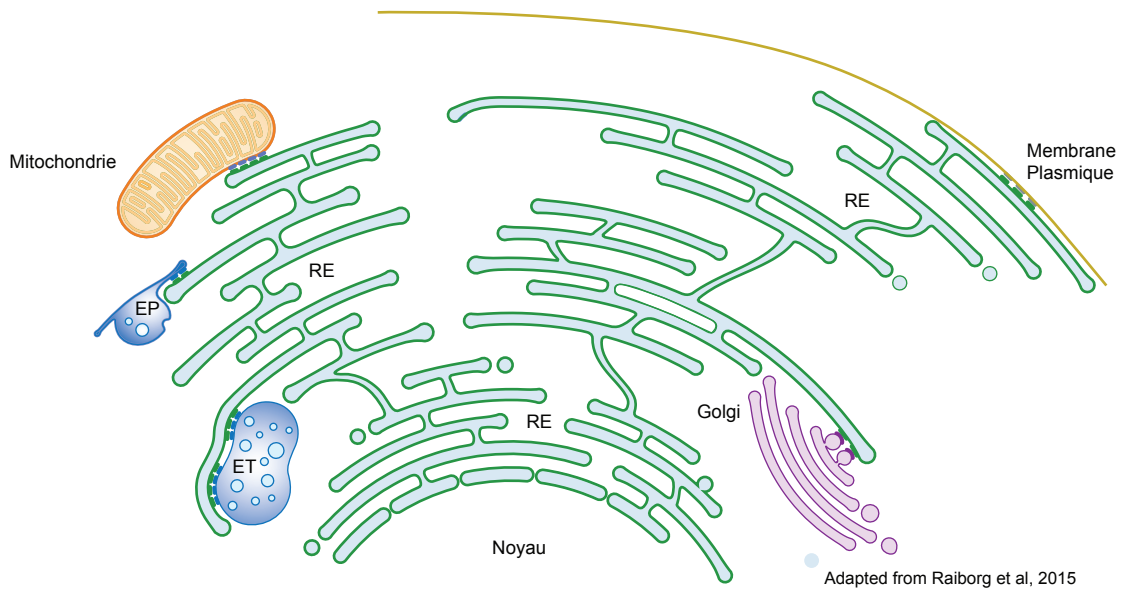
Les cellules sont composées à leur surface de récepteurs membranaires qui lorsqu'ils sont stimulés par leur ligand activent une cascade de signalisation. Les voies de signalisation assurent une réponse coordonnée de la cellule à un stimulus. Les voies de signalisation contrôlent de nombreuses fonctions cellulaires essentielles telles que la croissance, la division ou la mort régulée. Beaucoup de thérapies utilisent les maillons de la voie de signalisation afin d'inhiber ou d'activer la cascade de signalisation que la maladie a dérégulé.

Les sites de contact membranaire jouent un rôle clé dans les voies de signalisation en rapprochant des protéines présentes sur des organites différents. Par exemple, la protéine PTP1B (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1) est une phosphatase présente au niveau du RE qui peut induire la déphosphorylation des protéines membranaires à activité tyrosine kinase telles que le récepteur à l'insuline ou le récepteur à l'EGF (Epidermal growth factor receptor) (Fig. I3E)(Bandyopadhyay et al., 1997; Eden et al., 2010). Au cours de son inactivation, le récepteur de l'EGF (EGFR) est endocyté et est soit recyclé à la membrane plasmique, soit dégradé. Présent au niveau des endosomes, le récepteur à l'EGF interagit avec la protéine du réticulum endoplasmique PTP1B. Durant ce contact entre le réticulum et les endosomes, la protéine PTP1B a la capacité d'induire une déphosphorylation de récepteur à l'EGF. Le récepteur déphosphorylé est internalisé à l'intérieur de l'endosome pour ensuite être dégradé par la voie endo-lysosomale. La formation de contacts entre le réticulum endoplasmique et les endosomes permet ainsi de contrôler la quantité de récepteurs à l'EGF en empêchant son recyclage à la membrane plasmique. (Eden et al., 2010).

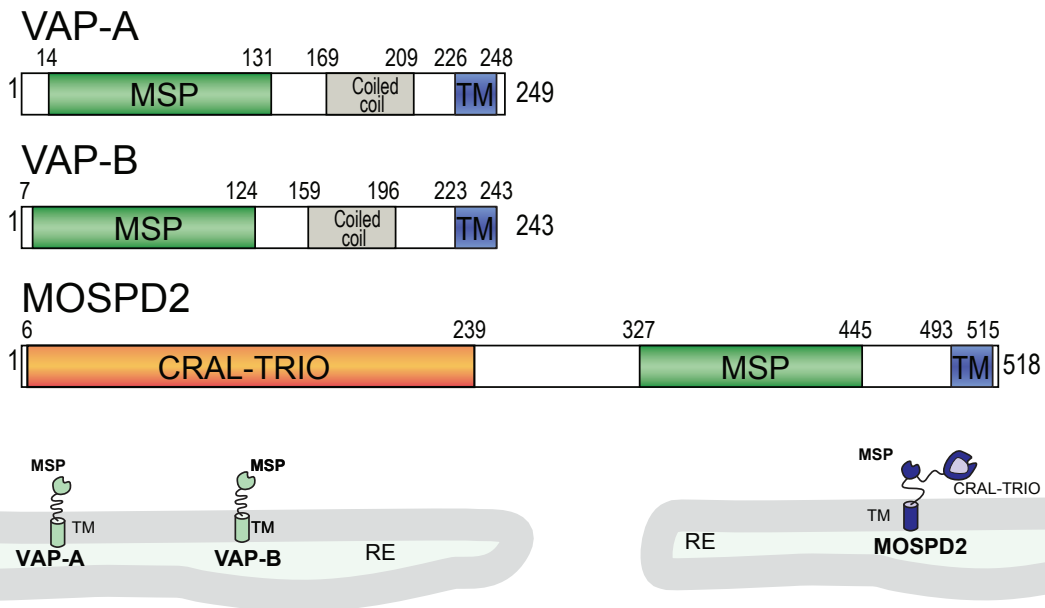
#### *f) Fission et fusion*

Les mitochondries et les endosomes sont des organites dynamiques qui se déplacent, se divisent et fusionnent en continu dans la cellule. Si nous prenons comme exemple la mitochondrie, c'est un organite de la cellule impliqué dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire, l'homéostasie calcique, la sénescence et l'apoptose. Tous ces phénomènes sont régulés par des protéines essentielles telles que la protéine DRP1 (Dynamin-1-like protein) et les protéines Mitofusin permettant respectivement la fission et la fusion mitochondriale (Smirnova et al., 2001). L'expression de ces protéines modifie les événements de fission et fusion mitochondriale ce qui régule la morphologie des mitochondries (Liesa et al., 2009). En effet, si la fission est plus importante, les mitochondries sont sous forme de structures punctiformes. La fission mitochondriale est contrôlée par la protéine DRP1 qui a la capacité de s'oligomériser autour des mitochondries afin de provoquer une constriction de la

A



B



Adapted from Di Mattia et al, 2018

**Figure I4 : Le réticulum endoplasmique forme des contacts avec tous les organites de la cellule**

A : Le réticulum endoplasmique en vert peut grâce à sa morphologie former des SCM avec les endosomes en bleu, la mitochondrie en orange, l'appareil de golgi en rose et la membrane plasmique en jaune.

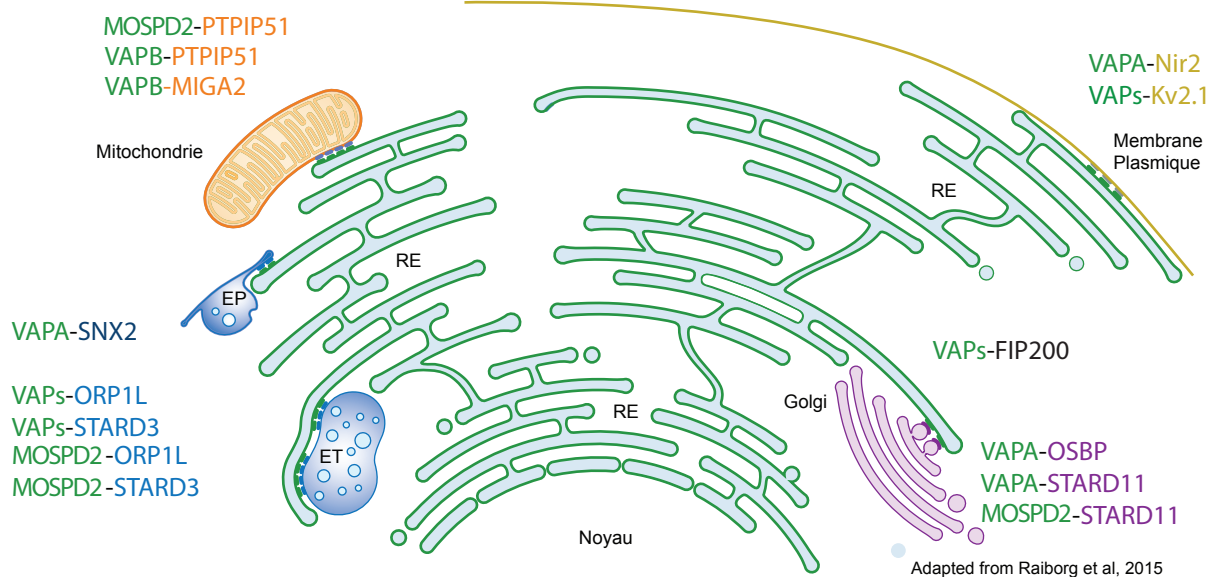
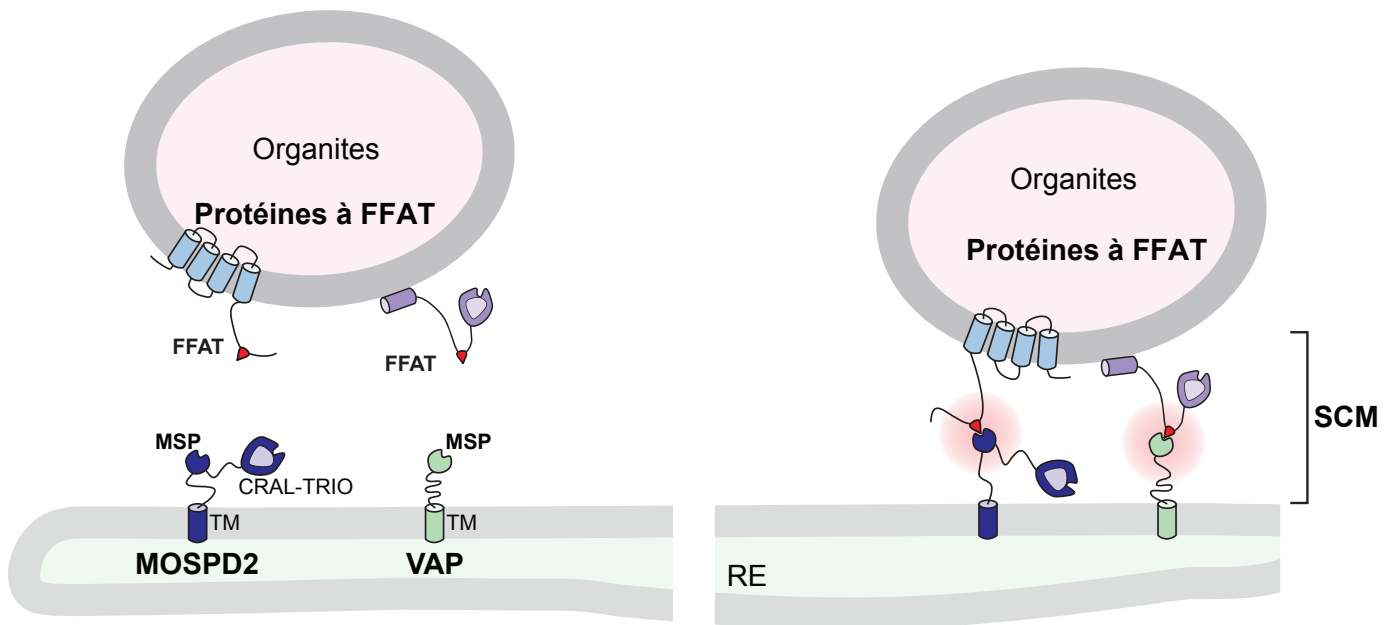
B : Les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2 qui sont ancrées dans la membrane du RE grâce à leurs domaines trans-membranaires (TM) possèdent un domaine MSP cytoplasmique qui interagit avec les protéines présentes sur les membranes des autres organites afin de permettre la formation de SCM. La protéine MOSPD2 dispose en plus, d'un domaine CRAL-TRIO qui pourrait interagir avec des molécules hydrophobes.

mitochondrie et d'entraîner la fission (Losón et al., 2013). Une fission trop importante de la mitochondrie entraîne l'apoptose de la cellule (Liesa et al., 2009). Si la fusion est prédominante alors les mitochondries sont sous forme d'un réseau de filaments. La fusion mitochondriale est contrôlée par les protéines Mitofusin qui ont la capacité de rapprocher et fusionner les membranes externes mitochondriales (de Brito and Scorrano, 2008; Filadi et al., 2018). Une fusion trop importante peut entraîner la senescence de la cellule (Liesa et al., 2009). De récentes études ont montré que les mécanismes de fission et fusion que ce soit de la mitochondrie ou des endosomes se créent principalement au niveau de sites de contact membranaire faisant intervenir le RE (Fig. I3F) (Abrisch et al., 2020; Friedman et al., 2011; Rowland et al., 2014). De plus, l'équipe du docteur Kornmann, s'est intéressée à la fission mitochondriale et a émis l'hypothèse que la fission ne serait pas régulée que par une réponse biochimique mais aussi par des stimuli mécaniques qui induiraient le recrutement des protéines de fission (Helle et al., 2017). Le RE entourant la mitochondrie pourrait être un des stimuli induisant le recrutement des protéines DRP1 et entraînant la fission mitochondriale. Les complexes protéiques formant les SCM impliqués dans la fusion et fission ne sont pas encore tous connus (Abrisch et al., 2020). C'est pourquoi il est primordial de connaître les protéines impliquées dans ces phénomènes ainsi que les protéines permettant la formation de contact avec le réticulum endoplasmique et ces organites.

Le réticulum endoplasmique a la capacité de former des SCM avec tous les organites de la cellule et possède des SCM impliqués pour chacune de ces fonctions décrites. C'est pourquoi, nous allons nous intéresser au SCM impliquant le réticulum endoplasmique.

### 3. Le réticulum endoplasmique : L'organite majoritairement impliqué dans la formation de SCM

L'organite le plus fréquemment impliqué dans la formation de SCM est le RE. En effet, cet organite couvre l'intégralité du cytoplasme du fait de sa morphologie ramifiée (Weiss, 1953) ce qui lui permet de créer des contacts avec tous les organites de la cellule comme les mitochondries, les endosomes, les peroxysomes, l'appareil de Golgi et la membrane plasmique (Fig. I4A) (Raiborg et al., 2015). Le RE est impliqué dans la biogenèse des lipides, le stockage du calcium, les voies de signalisation et la fusion/ fission mitochondriale ou endosomale. Toutes ces fonctions sont essentielles à la cellule et font intervenir des protéines ancrées à sa membrane qui forment des SCM. Trois protéines sont majoritairement impliquées : Les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2.



Adapted from Raiborg et al, 2015

FFAT consensus sequence:                    1 2 3 4 5 6 7  
 E F F D A X E

FFAT sequence:    Nir2 :                    E F F D A H E  
                          OSBP :                    E F F D A P E  
                          STARD11 :                    E F F D A V E  
                          ORP1L :                    E F Y D A L S  
                          PTPIP51 :                    V Y F T A S S  
                          MIGA2 :                    S F F S A T E  
                          FIP200 :                    D F M S A V N  
                          Kv2.1 :                    S F I S C A T  
                          STARD3 :                    Q F Y S P P E

Chang et al, 2013  
 Mesmin et al, 2005  
 Hanada et al, 2005  
 Rocha et al, 2009  
 De Vos et al, 2012  
 Freyre et al, 2019  
 Yan G.Zhao et al, 2018  
 Kirmiz M et al, 2018  
 Alpy et al, 2013

**Figure I5 : Les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2 sont impliquées dans la formation de site de contact membranaire**

Les protéines VAPs et MOSPD2 sont ancrées à la membrane du RE et leur domaine MSP cytoplasmique interagit avec les motifs FFAT des protéines. Ces protéines à motif FFAT peuvent être ancrées où interagir avec la membrane d'autres organites. L'interaction entre les protéines à motif FFAT et les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2 permet le rapprochement des membranes et la formation de SCM avec le RE et tous les autres organites de la cellule. Ces trois protéines sont capables de bâtir des contacts membranaires en interagissant avec leurs partenaires protéiques, entre le RE et la mitochondrie (PTPIP51, MIGA2), la membrane plasmique (Nir2, Kv2.1), l'appareil de Golgi (OSBP, STARD11) et les endosomes (STARD3, ORP1L). Malgré la grande variabilité de leurs séquences les motifs FFAT interagissent avec les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2.

### a) Les protéines VAP et MOSPD2

Au niveau du RE, trois protéines assurent la formation de nombreux SCM : ce sont les protéines VAP pour *Vesicle-Associated Membrane Protein associated proteins* et MOSPD2 pour *Motile sperm domain containing protein 2* (Fig. I4B). Chez l'Homme il existe deux protéines VAP appelées VAP-A et VAP-B (Fig. I4B). Ces deux protéines sont exprimées de manière ubiquitaire dans toutes les cellules du corps humain. De plus, elles possèdent une très grande homologie de séquence avec 63% de séquence identique et 82% de similarité. La similarité de séquence représente les acides aminés possédant des propriétés physico-chimiques très proches comme par exemple les mêmes charges positives ou négatives, la présence d'un cycle aromatique ou de chaîne hydrophobe. Cette grande similarité se retrouve aussi dans leur structure car les protéines VAP-A et VAP-B possèdent toutes les deux 3 domaines : 1- un domaine MSP (*Major Sperm Protein*) faisant face au cytoplasme à l'extrémité amino-terminale 2- un domaine coiled-coil impliqué dans la dimérisation de la protéine. 3- un domaine transmembranaire situé à l'extrémité carboxy-terminale qui permet d'ancrer les protéines au niveau du RE. La protéine MOSPD2 quant à elle possède trois domaines dont deux communs aux protéines VAPs : 1- un domaine LTD appelé CRAL-TRIO (*cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) and triple functional domain protein (TRIO)*) sûrement impliqué dans l'interaction avec des molécules lipidiques 2- un domaine MSP 3- un domaine transmembranaire qui ancre la protéine au RE.

Le domaine MSP de VAP-A, VAP-B et MOSPD2 leur permet d'interagir avec de petits motifs peptidiques constitués de deux phénylalanines dans un environnement acide appelé motif FFAT (*Two phenylalanines in an Acidic Tract*) (Kaiser et al., 2005; Loewen et al., 2003; Mikitova and Levine, 2012). Ces motifs sont présents dans de très nombreuses protéines. Les protéines VAPs et MOSPD2 sont localisées à la surface du RE. Grâce à leur domaine MSP, elles sont capables d'interagir avec des protéines à motif FFAT localisées sur d'autres organites, et ainsi permettre le rapprochement de membranes et la formation de SCM ER-organite. (Raiborg et al., 2015) (Fig. I5).

La protéine MOSPD2 possède une fonction similaire aux protéines VAP mais la particularité de la protéine MOSPD2 comparée aux protéines VAPs est son domaine CRAL-TRIO qui lui permettrait de lier des lipides. Cette différence entre les protéines impliquerait probablement que la protéine MOSPD2 possède une fonction différente des protéines VAPs. Les analyses protéomiques haut débit actuelles, réalisées par plusieurs équipes, estiment que les protéines VAPs et MOSPD2 possèdent environ 500 partenaires (Hein et al., 2015; Huttlin

et al., 2015, 2017). Parmi tous ces partenaires, plus d'une centaine possèderaient un motif FFAT (Murphy and Levine, 2016).

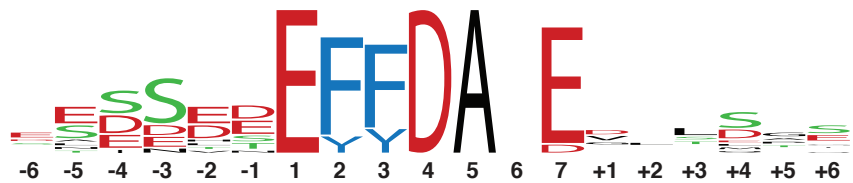
#### 4. Les protéines à motifs FFAT

##### a) Définition du motif

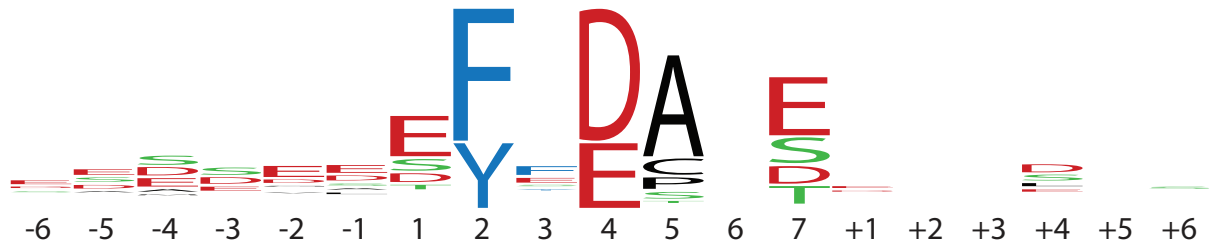
Le motif FFAT est une courte séquence de 7 acides aminés définie par sa fonction de pouvoir interagir avec le domaine MSP des protéines VAP et MOSDP2 (Di Mattia et al., 2018; Kaiser et al., 2005; Loewen et al., 2003; Mikitova and Levine, 2012). Cette séquence a été découverte par l'équipe du Docteur Levine. Il a identifié en 2003 que dans la levure la protéine Osh1 (Oxysterol-binding protein homolog 1), un homologue de la protéine OSBP chez l'Homme, possédait un motif qui permettait à la protéine d'interagir avec le RE (Loewen et al., 2003). En observant un alignement de séquences de Osh1 et OSBP, ce motif préalablement identifié de 39 acides aminés fut réduit à seulement 7 résidus qui étaient conservés entre la levure et l'Homme. Dans ce même article, 17 protéines eucaryotes ont été identifiées comme possédant ce motif de 6 acides aminés identiques et un résidu plus variable. Le motif FFAT fut alors défini par cette séquence consensus  $E^1F^2F^3D^4A^5X^6E^7$  et par sa fonction de pouvoir interagir avec le domaine MSP des protéines VAP et MOSDP2 (Kaiser et al., 2005; Loewen et al., 2003; Mikitova and Levine, 2012; Slee and Levine, 2019). Ce motif est constitué de deux résidus aromatiques (F = phénylalanine) en 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> position et entouré d'acides aminés acides en 1<sup>ère</sup>, 4<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> position (E = acide glutamique, D = acide aspartique), c'est pourquoi il a été appelé Two phenylalanines in an Acidic Tract. La position 5 du motif est une alanine (A) et la position 6 n'a pas de spécificité (X). Cette courte séquence permet à de nombreuses protéines d'interagir avec les protéines du réticulum endoplasmique VAPs et MOSPD2 (fig. 15). Cette interaction peut induire le rapprochement des membranes entre le RE et un autre organe et ainsi former un SCM et les fonctions qui leurs sont associées. Cependant, de nombreuses protéines ont été identifiées comme possédant un motif FFAT différent du consensus mais toujours capables d'interagir avec les protéines VAP. Cette différence peut être légère comme la protéine VPS13A (Vacuolar protein sorting-associated protein 13A) ou ORP1 (Oxysterol-binding protein-related protein 1) qui possèdent respectivement un motif FFAT  $E^1F^2Y^3D^4A^5L^6S^7$  et  $E^1F^2F^3D^4A^5P^6C^7$  (Loewen et al., 2003; Yeshaw et al., 2019). Pour VPS13A, la 3<sup>ème</sup> position du motif est occupée par une tyrosine et le résidu en position 7 est une sérine. Ceci ne modifie que très peu la structure et les charges en comparaison au motif FFAT consensus. D'autres motifs FFAT fonctionnels sont tellement différents du consensus qu'ils sont souvent nommés FFAT-like motif. Par exemple, les protéines KCNB1 et STARD3

A

		1	2	3	4	5	6	7
FFAT consensus sequence:		E	F	F	D	A	X	E
FFAT sequence:	Nir1 :	V	E	S	S	D	D	E
	Nir2 :	E	N	S	S	E	E	E
	Nir3 :	D	E	S	S	D	D	E
	OSBP1 :	D	E	D	D	E	N	E
	STARD11 :	S	L	I	N	E	E	E
	OSBL3 :	I	T	D	S	L	S	E
	OSBL6 :	M	S	E	S	V	S	E
	OSBL7 :	L	A	D	S	H	T	E
	OSBL9 :	Y	S	S	S	E	D	E
	OSBP2 :	E	E	D	E	D	T	E
	S22AF :	E	S	E	E	E	E	E
	WDR44 :	S	E	S	D	T	E	E
	VPS13C :	E	S	E	S	D	D	E



C



### Figure I6 : Le motif FFAT conventionnel

A : Les 8 séquences des protéines possédant un motif FFAT consensus strict. Ces protéines possèdent toutes : deux phénylalanines en position 2 et 3 du motif et deux acides glutamiques chargés négativement en position 1 et 7 et un acide aspartique en position 4.

Les 5 séquences des protéines possédant un motif FFAT consensus étendu. Ces protéines possèdent toutes : deux résidus aromatiques en position 2 et 3 et trois acides aminés chargés négativement en position 1, 4 et 7 du motif FFAT. L'alignement des séquences sous forme d'un weblogo montre que le résidu en 6ème position n'est pas spécifique et que l'environnement du motif FFAT est globalement chargé négativement.

C : Alignement des séquences des protéines possédant un motif FFAT conventionnel connu pour interagir avec les protéines VAPs. Les acides aminés en positions 1 et 7 sont principalement des résidus acides ou phosphorylables. La position 3 du motif est plus variable que le motif consensus avec une préférence pour une phénylalanine. La région en amont est plus conservée que la région en aval. De plus, elle possède plus de résidus avec des charges négatives. Les acides aminés aromatiques, acides et phosphorylables sont en bleu, rouge et vert respectivement. L'absence d'acide aminé indique qu'il n'y a pas de résidu spécificité à cette position.



possèdent des motifs  $S^1F^2I^3S^4C^5A^6T^7$  et  $Q^1F^2Y^3S^4P^5P^6E^7$  qui dans un cas ne possède qu'un résidu aromatique au lieu de deux au niveau des positions 2 et 3, dans l'autre cas le motif ne possède pas d'acide aminé chargé en position 1. Ces grandes différences nous questionnent sur la véritable composition du motif. L'environnement acide a-t-il un emplacement défini ou une charge globale est-elle suffisante ? Quelles sont les résidus réellement indispensables au fonctionnement de ce motif ? Pourquoi ce motif possède une aussi grande variabilité de séquence ?

La structure du domaine MSP de la protéines VAP-A en interaction avec le motif FFAT de ORP1L, un des premiers motif FFAT découvert, a été résolue par cristallographie (Kaiser et al., 2005). L'étude structurale a permis d'identifier que la phénylalanine (acide aminé aromatique) en 2<sup>ème</sup> position s'insère dans une poche hydrophobe du domaine MSP. De plus, l'acide aspartique en 4<sup>ème</sup> position du motif chargé négativement interagit avec la surface positive présente sur le domaine MSP constitué de lysine (K) (Furuita et al., 2010). Enfin, la surface globale du domaine MSP est globalement chargée positivement. Furuita et collaborateurs ont mesuré l'affinité entre le domaine MSP de VAP-A et le motif FFAT de OSBP. Lorsque des mutations de la protéine OSBP sont effectuées au niveau des acides aminés en amont du motif FFAT par des résidus non chargés ou chargés positivement, l'affinité entre OSBP et VAP-A est moins efficace. Une des hypothèses est que le domaine MSP et le motif FFAT formeraient un complexe intermédiaire via des interactions électrostatiques puis lorsque le motif et le domaine sont assez proches, la phénylalanine interagit avec la poche hydrophobe ce qui stabilise l'interaction.

Le nombre de protéines possédant un motif FFAT et leurs fonctions sont en constante évolution depuis une vingtaine d'années. Aux vues des connaissances actuelles, ce qui caractérisait le motif FFAT via la séquence consensus  $E^1F^2F^3D^4A^5X^6E^7$  découverte en 2003 n'était qu'une partie de la complexité fonctionnelle du motif FFAT.

#### *b) Les protéines à motif FFAT conventionnel*

Les protéines à motif FFAT consensus sont les premières protéines à avoir été découvertes comme partenaires des protéines VAP. Ces protéines ont permis de caractériser et définir le motif FFAT consensus  $E^1F^2F^3D^4A^5X^6E^7$  (Loewen et al., 2003). Dans le protéome humain, il existe 8 protéines possédant un motif FFAT consensus strict (Nir-1, Nir-2, Nir-3, OSBL3, OSBL6, OSBL7, OSBP1, STARD11) (Fig. I6A). Toutes ces protéines sont des



partenaires des protéines VAP impliquées dans la formation de SCM entre le RE et la membrane plasmique, l'appareil de Golgi ou les endosomes (Amarilio et al., 2005; Hanada et al., 2003; Kentala et al., 2015). Ce qu'il y a de plus remarquable, c'est que ces 8 protéines possédant un motif FFAT consensus strict possèdent toutes un domaine LTD (lipid transfer domain) permettant le transport de lipides. Ceci montre que certaines protéines transportant des lipides entre organites ont un avantage sélectif à posséder un motif FFAT. Si l'on regarde les protéines ayant des motifs FFAT aux propriétés physico-chimiques similaires, c'est-à-dire un autre résidu aromatique que la phénylalanine en position 2 et 3 du motif comme les tyrosines (Y), ou des résidus acides en position 1 et 7 comme les acides glutamiques (D) et en position 4 des acides aspartiques. Ces modifications n'affectent ni la charge globale du motif, ni les résidus aromatiques essentiels pour l'interaction et donnent ce motif  $E/D^1F/Y^2F/Y^3D/E^4A^5X^6E/D^7$ . Chez l'Homme, 13 protéines possèdent ce motif élargi et ces 13 protéines sont toutes connues pour interagir avec les protéines VAPs (Fig. I6A). D'autres protéines ont des séquences plus éloignées du consensus : par exemple, les protéines ACBD5 ( $V^1Y^2C^3D^4S^5M^6E^7$ ) ou VPS13A ( $E^1F^2F^3D^4A^5P^6C^7$ ) ne possèdent pas de charge en position 1 ou 7. La protéine FAF1 ( $D^1F^2E^3D^4A^5T^6E^7$ ) quant à elle ne possède pas de deuxième résidu aromatique en position 3. De plus, Le résidu en position 5 n'est pas toujours une alanine comme dans la protéine RAB3-GAP ( $E^1F^2F^3E^4C^5L^6S^7$ ) et pourtant toutes ces protéines sont toujours capables d'interagir avec le domaine MSP des protéines VAP (Fig. I6B) (Hantan et al.; Hua et al., 2017; Yeshaw et al., 2019).

Les bases de données d'interaction estiment que les protéines VAPs auraient environ 500 partenaires (Hein et al., 2015; Huttlin et al., 2015, 2017). Le nombre exact de protéines possédant un motif FFAT fonctionnel n'est pas encore identifié et ce nombre augmente d'année en année. En effet, des analyses protéomiques de recherche de partenaires des protéines VAPs et MOSPD2 et des études *in silico* afin d'identifier les motifs FFAT dans le protéome humain ont été réalisées (Huttlin et al., 2017; Murphy and Levine, 2016; Slee and Levine, 2019). Pour valider que le motif FFAT est à l'origine de l'interaction, le motif FFAT est muté soit au niveau du résidu aromatique en 2<sup>ème</sup> position du motif, soit au niveau du résidu acide en 4<sup>ème</sup> position, et l'effet de la mutation sur l'interaction est testé. Ces deux types de mutations abolissent l'interaction avec les VAPs et MOSPD2 (Kaiser et al., 2005; Levine, 2004; Mikitova and Levine, 2012). De plus, l'affinité entre le domaine MSP et les motifs FFAT est plutôt faible et l'interaction est labile. Ce qu'il y a de plus surprenant, c'est que sur ces 500 partenaires, environ 400 protéines ne possèdent pas de motif FFAT identifié. Une des hypothèses serait que ces protéines se lieraient à une autre région de la protéine. Une autre hypothèse serait que l'interaction retrouvée par ces méthodes serait due à une interaction indirecte dans un complexe protéique. C'est pourquoi, il est primordial d'effectuer d'autres

analyses afin d'identifier spécifiquement les protéines pouvant interagir avec les protéines VAPs et MOSDP2.

Un grand nombre de protéines possédant un motif FFAT a été découvert et ces protéines forment des contacts avec tous les organites de la cellule. Toutes ces protéines à motif FFAT possèdent des fonctions de transport d'ions, de lipides ou de régulation de l'autophagie (Murphy and Levine, 2016; Prinz et al., 2020). Les composés lipidiques et ioniques étant indispensables au bon fonctionnement cellulaire, une mauvaise régulation de ces molécules peut entraîner de graves conséquences pour les cellules et l'organisme.

## C. Les SCM associés à des pathologies cancéreuses

### 1. Le Cancer du sein

Le laboratoire où j'effectue ma thèse travaille sur la thématique du cancer du sein depuis de nombreuses années. Aujourd'hui, le laboratoire travaille plus spécifiquement sur la compréhension moléculaire et cellulaire de la maladie en se focalisant sur le rôle du microenvironnement tumoral et des protéases de la matrice extracellulaire, et sur les mécanismes moléculaires mettant en jeu des gènes altérés dans les cellules épithéliales cancéreuses.

#### *a) Définition du cancer du sein*

Le cancer du sein est une maladie caractérisée par la formation d'une tumeur maligne dans la glande mammaire. Dans la plupart des cas, ces tumeurs sont des carcinomes, ce qui signifie qu'ils ont une origine épithéliale. D'après l'institut national du cancer, on dénombre chaque année 58 000 nouveaux cas de cancer du sein en France et une femme sur huit développe cette pathologie au cours de sa vie, principalement après 50 ans (INCa, 2016). Le cancer du sein est la première cause de mortalité par cancer chez la femme (Ferlay et al., 2019). La plupart des cancers du sein sont sporadiques ; seuls 5 à 10% sont liés à des facteurs génétiques (Shannon and Chittenden, 2012). En France, l'incidence du cancer du sein a doublé de 1980 à 2005 et commence seulement à se stabiliser. La mortalité est restée pratiquement constante en France depuis les années 80 et représente environ 12 000 décès par an (Gautier Defossez et al., 2019). Ce chiffre reste relativement stable avec une tendance à diminuer grâce à d'énormes progrès, tant au niveau du dépistage que de la prise en charge médicale de la maladie ; plus de 3 cancers du sein sur 4 guérissent.

#### *b) Caractérisation moléculaire des cancers du sein*

Le cancer du sein est une maladie hétérogène, notamment d'un point de vue histologique et génétique. La caractérisation moléculaire des cancers du sein a permis de définir 3 types principaux de cancers du sein (Goldhirsch et al., 2011; Perou et al., 2000) : les cancers exprimant les récepteurs aux estrogènes (ER : estrogen receptor) et /ou à la progestérone (PR : progesterone receptor); les cancers surexprimant HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), un membre de la famille du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), et enfin les cancers dits « Triple négatifs » qui n'expriment ni les récepteurs hormonaux ER/PR, ni l'oncoprotéine HER2. La caractérisation moléculaire des cancers du sein permet une meilleure prise en charge de la pathologie. En effet, après diagnostic, les cancers du sein sont traités par chirurgie, associée ou non à une chimiothérapie +/- radiothérapie (INCa, 2016). Lorsque le cancer est invasif, c'est-à-dire que les cellules cancéreuses ont franchi la lame basale et envahissent le tissu environnant, voire se développent à distance au sein de métastases, la pathologie peut être traitée par chimiothérapie et/ou thérapie ciblée. Pour les tumeurs exprimant les récepteurs ER/PR et celles exprimant HER2, il existe des thérapies ciblées, qui sont des traitements respectivement à base d'anti-estrogènes (ex : le Tamoxifène) et d'anticorps ciblant le récepteur HER2 (ex : le Trastuzumab) ou d'inhibiteur du récepteur HER2 (ex : Lapatinib) (Abdulkareem and Zurmi, 2012; Lavaud and Andre, 2014; Segovia-Mendoza et al.). Cependant, de nombreuses tumeurs échappent aux traitements : il est donc important d'effectuer des recherches sur la tumeur pour identifier de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans le cancer et de nouveaux marqueurs moléculaires qui vont pouvoir nous éclairer sur le fonctionnement et l'agressivité d'un cancer donné pour mettre en place le plus tôt possible la meilleure thérapie.

## 2. Le lien avec les SCM impliquant la protéine STARD3

L'objectif de l'équipe est d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans la progression des cancers du sein et de déterminer leurs fonctions. La protéine appelée STARD3, est une protéine qui a été identifiée du fait de sa surexpression dans les cancers du sein HER2+, soit environ 15% des cancers du sein (Moog-Lutz et al., 1997; Tomasetto et al., 1995). La surexpression de la protéine STARD3 dans les cellules cancéreuses du sein est corrélée avec une augmentation du risque de récurrence de cancer et une diminution de la survie (Vinatzer et al., 2005). De façon intéressante, cette protéine est indispensable à la croissance des cellules HER2+ : en effet, la diminution de l'expression de la protéine STARD3 dans des lignées de cancers du sein HER2+ réduit la croissance cellulaire (Alpy and Tomasetto, 2014; Kao and Pollack, 2006).

Afin de comprendre la fonction de STARD3 dans les cancers du sein, le rôle moléculaire et cellulaire de cette protéine a été analysé. La protéine STARD3 est ancrée aux endosomes tardifs via son domaine MENTAL (MLN64 amino-terminal). De plus, elle possède un FFAT qui interagit avec les protéines VAPs et MOSPD2 afin de permettre la formation de SCM entre le RE et les endosomes (Alpy et al., 2013; Di Mattia et al., 2018). Au niveau de ce contact, le domaine START de la protéine STARD3 transporte le cholestérol du RE aux endosomes (Fig. I3B) (Wilhelm et al., 2017). Ce transport de cholestérol se fait au dépend de la membrane plasmique. En effet, une surexpression de la protéine STARD3 entraîne une redistribution du cholestérol intracellulaire avec une accumulation au niveau des endosomes et une diminution à la membrane plasmique (Wilhelm et al., 2017).

Une des hypothèses est que la déplétion de cholestérol à la membrane plasmique liée à l'activité de la protéine STARD3 modifie la composition lipidique de la membrane. Dans ce cas, les récepteurs HER2 à la membrane plasmique pourraient être plus facilement activés ce qui entrainerait une cascade de signalisations qui profiterait à la cellule cancéreuse en augmentant sa capacité de migration, d'invasion et de prolifération.

### 3. Le Cancer et Nir2

La protéine STARD3 n'est pas la seule protéine à former des SCM et à être dérégulée dans les cancers. En effet, la protéine Nir2 (PITPnm1 = Phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 1) permet la formation de sites de contact membranaire entre la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique (Amarilio et al., 2005; Loewen et al., 2003). Lors de ce contact, Nir2 transporte des lipides entre ces deux organites. En effet, la protéine Nir2 a la capacité de transporter des phosphatidylinositols du RE à la PM et des acides phosphatidiques de la PM au RE (Kim et al., 2015). Son rôle de transporteur de lipides est impliqué dans l'invasion et la progression tumorale. En effet, l'équipe du docteur Lev a montré que l'inhibition de la protéine Nir2 diminue la capacité invasive des cellules cancéreuses mammaires et leur capacité à former des métastases dans les poumons. De plus, la surexpression de la protéine Nir2 augmente l'invasion et la formation de métastases en activant la voie PI3K/AKT et la voie de signalisation ERK. Ces voies lorsqu'elles sont activées entraînent une augmentation de la croissance, survie et migration cellulaire ainsi que la formation de métastase. Chez l'Homme, une forte expression de la protéine Nir2 est corrélée avec un grade tumoral important et un mauvais pronostic de survie (Keinan et al., 2014). Pour le moment, le lien direct entre l'activation de ces voies de signalisation et le transport de lipides n'est pas encore connu mais comme pour la protéine STARD3, une des hypothèses seraient

que la modification de la composition lipidique de la membrane plasmique aiderait à l'activation des voies de signalisation.

#### 4. Le Cancer et CERT

La protéine CERT, (Ceramide Transfert Protein = STARD11) de la même famille que la protéine STARD3, forme des SCM entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Hanada et al., 2003; Kawano et al., 2006). De plus, cette protéine transporte des céramides entre ces compartiments afin de convertir les céramides en sphingomyélines au niveau de l'appareil de Golgi (Kumagai and Hanada, 2019). L'absence ou la surexpression de la protéine CERT modifie l'intégrité et la fluidité des membranes en modifiant la composition de céramides et de sphingomyélines. Cette modification a pour conséquence d'influencer la prolifération et la migration cellulaire. La protéine CERT peut soit promouvoir ou inhiber la progression tumorale en fonction du type de cancer. En effet, lorsque la protéine CERT est inhibée, la progression tumorale est augmentée dans les cellules du cancer du sein triple négatifs mais réduite dans les cellules cancéreuses du cancer du sein HER2+ (Heering et al., 2012; Lee et al., 2012). L'inhibition de la protéine CERT dans les cancers du sein HER2+ permet une meilleure réponse aux traitements cytotoxiques (Paclitaxel, Doxorubicine et la Cisplatine) en augmentant l'autophagie (Lee et al., 2012). Par contre l'inhibition de la protéine CERT dans les cancers du sein triple négatifs, augmente l'activité du récepteur EGF et la voie AKT ce qui provoque une augmentation de prolifération cellulaire (Heering et al., 2012). Les effets contradictoires entre les différents types moléculaires de cancers montrent que l'identification moléculaire des cancers est indispensable à la prise en charge des patients.

Ces trois protéines, STARD3, Nir2 et CERT révèlent que le transport de lipides au niveau de SCM joue un rôle essentiel dans la composition lipidique des membranes ce qui modifie l'activité des voies de signalisation impliquées dans les pathologies cancéreuses.

#### 5. Le Cancer et la protéine à activité phosphatase PTP1B

la protéine PTP1B, comme vu précédemment dans les fonctions associées au SCM, est une protéine présente dans le réticulum endoplasmique qui peut déphosphoryler les protéines membranaires à activité tyrosine kinase tels que le récepteur à l'EGF au niveau de contacts ER-endosomes (Fig. I3E)(Bandyopadhyay et al., 1997; Eden et al., 2010). Dans ce contact entre le RE et les endosomes, la protéine PTP1B induit une déphosphorylation du récepteur à l'EGF pour qu'ensuite il soit dégradé. Le récepteur à l'EGF est un facteur de croissance impliqué dans plusieurs cancers en accélérant la division cellulaire lorsque celui-ci

est surexprimé. La formation de contacts entre le RE et les endosomes permet ainsi de contrôler la quantité de récepteurs à l'EGF en empêchant son recyclage à la membrane plasmique (Eden et al., 2010). Plusieurs études ont été réalisées sur le lien entre la protéine PTP1B et les cancers mais les résultats sont contradictoires. Selon les études épidémiologiques, dans certains cas l'expression de la protéine est corrélée avec le stade tumoral et la présence ou non de métastase et dans d'autres études rien n'est corrélé (Julien et al., 2007a; Liao et al., 2017; Soysal et al., 2013; Xu et al., 2019; Yu et al., 2019). Dans les études réalisées avec des cellules de cancer du sein exprimant les récepteurs aux estrogènes (MCF-7), l'inhibition de la protéine PTP1B réduit considérablement la prolifération et la migration des cellules cancéreuses (Liao et al., 2017). De plus, des études sur la souris ont montré que les souris n'exprimant pas la protéine PTP1B avaient moins de tumeurs mammaires et moins de métastases pulmonaires (Julien et al., 2007b). Ces résultats sont contradictoires avec les hypothèses de l'équipe d'Eden mais la protéine PTP1B est une protéine qui induit la déphosphorylation d'un grand nombre de protéines comme le récepteur à l'insuline (Stuible and Tremblay, 2010). Cette grande diversité de partenaires peut expliquer les effets contradictoires observés entre les différentes études. En effet, la surexpression ou l'inhibition de la molécule PTP1B va déphosphoryler ou non tous ces partenaires spécifiques. Lorsque plusieurs molécules sont modifiées par le même mécanisme, une protéine déphosphorylée pourra être bénéfique tandis qu'une autre sera en même temps délétère. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour comprendre le lien entre la formation de SCM médiée par PTP1B et la pathologie cancéreuse.

Toutes ces protéines forment des SCM entre organites et sont impliquées dans une pathologie cancéreuse. Dans tous les cas cités ci-dessus, le rôle de la protéine au niveau de leurs SCM respectifs serait relié aux effets pathologiques. La possibilité de bloquer ou d'activer la formation de contacts via des traitements ciblés serait un moyen de lutter efficacement et spécifiquement contre les pathologies cancéreuses. Pour avoir une chance un jour de trouver ces nouveaux traitements, il faut commencer par comprendre la dynamique sous-jacente qui permet la formation de SCM.

#### D. Dynamique des SCM

Nous avons vu précédemment que les SCM étaient formés grâce à des interactions protéine-protéine et/ou protéine-lipide. De plus, les protéines qui forment les contacts membranaires sont capables de transférer des molécules entre ces organites. Ces fonctions

de transport sont essentielles à la cellule et un dérèglement de l'expression ou de la fonction de ces protéines peut induire des pathologies.

Une grande question qui n'est pas encore résolue à ce jour est de savoir comment sont régulés les SCM. En effet, il a été montré par imagerie sur cellules vivantes que les SCM étaient dynamiques (Friedman et al., 2011; Valm et al., 2017). Ils se font et se défont au cours du temps mais les mécanismes de régulation en jeu ne sont pas encore bien définis dans la plupart des cas.

Une partie des mécanismes qui régulent la formation de contact a été identifiée pour les protéines OSBP (*Oxysterol-binding protein*) et CERT. La protéine OSBP possède un domaine LBD (*Lipid Binding Domain*), un motif FFAT conventionnel qui lie la protéine au réticulum endoplasmique via l'interaction avec les protéines VAPs et un domaine PH (*Pleckstrin Homology*) qui se lie directement aux lipides de la membrane de l'appareil de Golgi (Lehto and Olkkonen, 2003). La présence de ligand du domaine LBD permet de réguler l'activité du domaine PH ce qui entraîne son interaction avec les membranes et la formation de SCM (Kentala et al., 2015). Au contraire lorsque l'on prive la cellule de son ligand la protéine ne se lie plus à l'appareil de Golgi. La présence ou non du ligand est un élément essentiel à la formation du SCM ER-Golgi impliquant la protéine OSBP.

La protéine CERT (Ceramide Transfert Protein = STARD11) possède elle aussi un motif FFAT conventionnel, un domaine START et un domaine PH. Cette protéine forme des SCM entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et l'activité du domaine PH est quant à lui régulé par une région riche en sérine adjacente qui lorsqu'elle est phosphorylée va bloquer le domaine PH en contact avec le domaine START et ainsi empêcher son interaction avec la membrane de l'appareil de Golgi. Lorsque cette région est déphosphorylée, le domaine PH est libre d'interagir avec la membrane de l'appareil de Golgi et de former des sites de contact.

Dans le cas de l'interaction STARD3-VAPs, la protéine STARD3 est ancrée via son domaine MENTAL à la membrane des endosomes tardifs et la protéine VAP au réticulum endoplasmique. Ceci laisse à penser qu'une autre voie de régulation de la formation des SCM existe pour ce complexe protéique. Aussi, nous avons cherché par quel mécanisme le complexe STARD3-VAP est régulé afin de mieux comprendre son rôle dans le cancer du sein HER2+ et par la suite de pouvoir inhiber spécifiquement ce SCM. L'objectif de cette thèse est d'apporter des éléments de réponse sur la manière dont sont régulés les SCM.

## Matériels et méthodes

### E. Construction des plasmides d'expression protéique

#### 1. Obtention des ADN

Les vecteurs d'expressions GFP-VAP-A, GFP-VAP-B, GFP-MOSPD2, Flag-STARD3, Flag-STARD3 FA/YA, GST-STARD3 et les plasmides d'expressions des protéines recombinantes VAP-A, VAP-A KD/MD, VAP-B et MOSPD2 étaient déjà disponibles au laboratoire (Alpy and Tomasetto, 2005; Alpy et al., 2013; Di Mattia et al., 2018). Les vecteurs d'expressions des protéines STARD3 S209A, STARD3 S209D, STARD3 S209D/P210A ont été clonés dans le vecteur pQCXIP. Les ADN ont été obtenus par amplification par une série de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir de matrices plasmidiques existantes au laboratoire. Les amorces oligonucléotidiques suivantes ont été utilisées pour chaque constructions : STARD3 S209A : 5'-GACAG TTCTA TGCAC CCCCA GAATC CTTTG C-3' and 5'-GATTC TGGGG GTGCA TAGAA CTGTC CCTCG G-3'; STARD3 S209D: 5'-GACAG TTCTA TGATC CCCCA GAATC CTTTG C-3' and 5'-GATTC TGGGG GATCA TAGAA CTGTC CCTCG G-3'; STARD3 S209D/P210A: 5'-TTCTA TGATG CCCCA GAATC CTTTG CAGGG TCTGA CAAT-3' and 5'-TTCTG GGGCA TCATA GAACT GTCCC TCGGA CAGAG CACC-3'. Les PCR ont été effectuées dans un mélange réactionnel de tampon HF (Thermo Scientific) (4 mM Tris HCl, 0,02 mM EDTA, 0,2 mM DTT, 20 mM KCl, 40 µg/mL BSA et 50% glycérol pH 7,4), de dNTP 0,2 mM, de chaque amorce à 0,5 mM, d'une unité de polymérase Phusion et 10 ng de matrice. La réaction a eu lieu dans un thermocycleur.

#### 2. Purification des fragments de PCR

Afin d'éliminer les amorces libres présentes dans la réaction de PCR et d'inactiver la polymérase, le milieu contenant les fragments d'ADN d'intérêt a été purifié par chromatographie échangeuse d'anions (selon le protocole du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel). L'ADN a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 1% coloré au BET (Bromure d'éthidium). Les fragments d'ADN ont été visualisés sous lampe UV (Ultra-violet).

#### 3. Insertion des fragments dans le vecteur pQCXIP

Le vecteur pQCXIP (10µg) a été digéré par deux enzymes de restrictions NotI (20 unités) et BamHI (20 unités) dans un tampon Cutsmart 1X (New England Biolabs) pendant 2



heures à 37°C. Le vecteur et l'insert ont ensuite été purifiés (Kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel). Pour l'insertion des fragments dans le plasmide de clonage, un ratio de 1/1 molaire de fragment d'ADN et du vecteur pQCXIP digéré à 100 ng sont incubés 15 minutes à 37°C dans du tampon Slice (50 mM tris HCl pH 7.5 ; 10 mM MgCl<sub>2</sub> ; 1 mM ATP ; 1 mM DTT) avec 1 µl d'extrait Slice issu d'*E. coli* JM109 dans un volume final de 10 µL (Okegawa and Motohashi, 2015).

#### 4. Transformation bactérienne

Cent µL de bactéries SURE compétentes ont été mélangés aux plasmides en présence d'une solution KCM 1X (100 mM KCl, 30 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MgCl<sub>2</sub>). Les bactéries compétentes ont été obtenues via le protocole KCM competent cells (Laboratory of Gene Therapy Research). Le mélange a été placé 20 minutes sur glace puis 10 minutes à température ambiante. Après ajout de 1 mL de lysogeny broth (LB), la solution a été incubée 30-50 minutes à 37°C. Les bactéries ont été ensuite sélectionnées sur des boîtes de pétri LB agar contenant 100 µg/mL d'ampicilline pendant 16 heures à 37°C.

#### 5. Minipréparation

Afin de valider le clonage, des colonies bactériennes ont été prélevées du milieu solide et mises en culture dans 3 mL de LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline pendant 16 h à 37°C sous agitation. 1,5 mL de ces cultures a été centrifugé pendant 1 min à 11 600 g, puis le culot cellulaire a été suspendu dans 100 µL de surnageant résiduel. Les bactéries ont été ensuite soumises à une lyse alcaline par ajout de 300 µL de tampon TENS (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaOH 0,1 M, SDS 0,5 %). L'ADN génomique et les protéines bactériennes ont été précipités par l'ajout de 150 µL d'acétate de sodium (3M pH 5,2), suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 11 600 g. 400 µL de surnageant ont été prélevés et l'ADN contenu a été précipité par l'ajout de 1 mL d'éthanol 100%. Après centrifugation 10 minutes à 11 600 g, le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé par 1 mL d'éthanol à 70%. L'éthanol a été éliminé et le culot d'ADN a été séché et repris dans 50 µL de tampon RB (Tris HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, gélatine 0,01%, RNase A 40 µg/mL) à 70°C durant 10 minutes. 5 µL d'ADN plasmidique purifié ont été ensuite digérés par des enzymes de restriction dans du tampon Cutsmart 1X (New England BioLabs). Le profil de restriction a été analysé par migration de la digestion sur un gel d'agarose 1% contenant 2 µL de BET pour 100 mL. Un clone ayant un insert de taille attendu a été vérifié par séquençage de l'ADN par la Méthode Sanger (GATC Biotech).

## 6. Midipréparation

Pour obtenir une grande quantité d'ADN plasmidique, une midipréparation a été réalisée. L'ADN plasmidique a été extrait de 200 mL de culture bactérienne suivant le protocole du kit Nucleobond (chromatographie échangeuse d'anions, Macherey-Nagel). La concentration ainsi que la pureté de la préparation d'ADN a été estimée par mesure de l'absorbance de 260 nm à 280 nm (NanoDrop 2000, ThermoFisher).

## F. Culture cellulaire

Les cellules HeLa obtenues à l'ATCC (American Type Culture Collection, CCL-2) sont issues d'une patiente atteinte d'un carcinome du col utérin et constituent la première lignée cellulaire immortelle d'origine humaine. Elles ont été cultivées dans un milieu comprenant du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) avec 1g/L de glucose, 5% de sérum de veau foetal et 40 µg/mL de gentamycine.

Les cellules 293T sont issues de cellules rénales embryonnaires humaines et ont été cultivées dans du milieu DMEM avec 1g/L de glucose, 10% de sérum de veau foetal, 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine.

Pour les entretenir, lorsque la confluence des cellules dépasse 90%, elles ont été diluées et repiquées. Pour cela, le milieu a été éliminé par aspiration, les cellules ont ensuite été rincées avec de la trypsine diluée puis 2 mL de trypsine diluée ont été ajoutés pour décoller les cellules. Pour un entretien de routine les cellules ont été réensemencées au  $1/10^{\text{ème}}$ . Les cellules ont été incubées en condition d'humidité saturante, à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

### 1. Transfection

La transfection consiste à introduire un fragment d'ADN dans une cellule. Pour cela, les cellules ont été cultivées jusqu'à atteindre une confluence proche de 60%. Ensuite, pour une plaque 24 puits, 0,6 µL d'agent de transfection d'X-tremeGENE 9 (Sigma) et 0,4 µg d'ADN plasmidique ont été dilués dans 9 µL d'OptiMEM. Le mélange a été homogénéisé puis incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Enfin, la préparation a été ajoutée dans un puits d'une plaque 24 puits où se trouvaient les cellules. Pour les boîtes P100, 15 µL d'X-tremeGENE 9 ont été dilués dans 227 µL d'optiMEM, puis 5 µg d'ADN plasmidique ont été ajoutés. Les cellules ont ensuite été incubées avec le mélange pendant 24 h.

## 2. Établissement de lignées cellulaires stables de surexpression par infection rétrovirale

Des lignées de cellules stables ont été produites afin d'obtenir des cellules HeLa surexprimant GFP-VAP-A, GFP-VAP-A KD/MD, GFP-VAP-B et GFP-MOSPD2.

Les cellules 293T ont été utilisées pour produire des particules virales. Une transfection des plasmides exprimant la protéine d'intérêt a été effectuée en ajoutant 1,7 µg de vecteur pAmpho permettant l'empaquetage des particules virales. Après 48 heures d'incubation à 37°C, le surnageant contenant les particules virales a été purifié à travers un filtre ayant des pores de 0,45 µm de diamètre, puis placé en contact sur des cellules HeLa. Après 48 heures, les cellules HeLa ont été sélectionnées puis maintenues en culture en présence de 0,5 µg/mL de puromycine.

### G. Extraction et quantification de protéines

Afin de préparer les extraits protéiques cellulaires, le milieu de culture a tout d'abord été aspiré, puis les cellules ont été lavées avec du PBS 1X (phosphate buffered saline ; NaCl 137 mM ; KCl - 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM). Le PBS a été aspiré et le tampon de lyse protéique (TLP) (50 mM Tris HCl pH 7,5 à 25°C, 75 mM NaCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, TritonX-100 1%) a été ajouté. Les cellules ont été re-suspendues dans ce tampon, transférées dans un tube de 1,5 mL, puis incubées dans la glace pendant 15 min. Le lysat a été centrifugé à 11 600 g pendant 10 minutes à 4°C pour culoter les débris cellulaires, et le surnageant a été récupéré.

Les protéines ont été quantifiées par une méthode colorimétrique appelée test BCA (BiCinchoninic Acid, Thermo Scientific). Pour cela, une gamme d'étalonnage d'albumine de 0,1 mg/mL à 2 mg/mL dans un volume de 10 µL a été préparée pour générer une courbe d'étalonnage. Dix µL de chaque extrait protéique ont été mélangés à 100 µL de solution Pierce® BCA (BiCinchoninic acid Assay) (mélange de 50 fois plus de réactif A que de réactif B). Après avoir incubé les échantillons à 37°C pendant 10 min, l'absorbance a été mesurée à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Grâce à la courbe d'étalonnage, la concentration en protéines de chaque échantillon a été calculée.

### H. Purification de la protéine GST-STAR3

La protéine STARD3 a été purifiée par une chromatographie d'affinité appelée GST (Glutathione S-transferase) Pull Down. Cette technique permet d'isoler et de concentrer une protéine au sein d'un milieu complexe en utilisant une résine Glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) qui a une très forte affinité pour la GST. Ainsi, les protéines taguées GST vont pouvoir être précipitées et purifiées par cette méthode.

### 1. Préparation de la résine et des échantillons

La résine Glutathione sepharose 4B est constituée de billes d'agarose (phase solide). La résine a été lavée 3 fois dans du tampon T<sub>50</sub>Na<sub>150</sub>E<sub>1</sub> (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1mM). Des extraits protéiques de cellules HeLa contrôles et transfectées ont été préparés dans un volume total de 500 µL de tampon T-GST (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, TritonX-100 1% et inhibiteur de protéase et phosphatase (Complete, ROCHE)) à partir de trois flasques P100 confluentes.

### 2. Précipitation puis élution

La précipitation a été effectuée en mélangeant 80 µl de résine, préalablement lavée, à l'extrait protéique de cellule HeLa préalablement préparé puis laissé sous agitation pendant 2 h à 4°C. Les fractions non fixées à la résine ont été récupérées puis 5 lavages ont été réalisés, 2 avec du tampon T-GST2 (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, EDTA 1mM, TritonX-100 1% et inhibiteur de protéase et phosphatase), 2 autres avec du tampon T-GST3 (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 1 M, EDTA 1mM, TritonX-100 1% et inhibiteur de protéase et phosphatase) puis un dernier avec du tampon T-GST. Pour l'élution, les billes ont été reprises dans 80 µL de tampon de dépôt (300 mM Tris-HCl pH 6,8, 60% glycérol, Bleu de Bromophénol, 12% SDS, 8,4 M β-mercaptoéthanol). Le mélange a été laissé pendant 10 min à température ambiante.

## I. Analyse de l'expression des protéines par Western Blot

### 1. Électrophorèse en condition dénaturante

Les protéines ont été séparées selon leur masse sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE. Le gel de polyacrylamide était composé d'un gel de séparation (7,5-12,5% d'acrylamide/bis-acrylamide (40/1), 0,375 M Tris HCl pH 8,8 à 25°C, 0,1 % SDS, 0,05% d'ammonium persulfate (APS) et 0,1% de tétraméthyléthylènediamine (TEMED)) et d'un gel de concentration (4,5% d'acrylamide/bis-acrylamide (40/1), 0,375 M Tris HCl pH 8,8 à 25°C,

0,1% SDS, 0,05% d'APS et 0,1% de TEMED). Le gel de concentration avait pour but de concentrer les protéines à l'entrée du gel de séparation. Le gel a été placé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon de migration (0,02 M Tris base, 0,2 M Glycine, 0,1% SDS). Les extraits protéiques ont été mélangés avec 1/6<sup>ème</sup> du volume en tampon de dépôt (300 mM Tris-HCl pH 6,8, 60% glycérol, Bleu de Bromophénol, 12% SDS, 8,4 M  $\beta$ -mercaptoéthanol) puis déposés sur le gel. Les protéines ont migré pendant environ 1h30 sous une tension de 100 V.

## 2. Transfert des protéines

Après migration, les protéines du gel ont été électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose selon la méthode du sandwich. Pour cela, 6 feuilles de papier Whatman et 1 membrane de nitrocellulose sont préalablement imbibées de tampon de transfert (0,02 M Tris base, 0,1M Glycine, 20% Éthanol), et le montage suivant a été effectué : 3 feuilles de papier Whatman, 1 membrane de nitrocellulose, le gel et 3 feuilles de papier Whatman. Les protéines ont été électro-transférées par transfert semi-sec (Trans-Blot SD, BIO-RAD) pendant 30 min à 1h à 240 mA.

## 3. Blocage des sites aspécifiques et immunoréaction

Pour vérifier l'efficacité du transfert, les protéines sur la membrane ont été colorées avec du rouge Ponceau (0,1% de Ponceau S (Sigma), acide acétique 5%). Ensuite la membrane a été lavée avec du PBS 1X, Tween 0,1% et les sites aspécifiques ont été bloqués avec une solution saturante en protéines de lait (Régilait écrémé 3%) sous agitation pendant 30 min. Une immunoréaction a été effectuée avec des anticorps, anti-actine (2D7-IGBMC), anti-VAP-A (4C12, Santa Cruz Biotechnology), anti-VAP-B (don du Dr. L. Dupuis(Kabashi et al., 2013)) ou anti-MOSPD2 (4E10, IGBMC). Les anticorps primaires anti-VAP-A et anti-VAP-B dilués au 1 000<sup>ème</sup> dans du PBS 1X, Tween 0,1% ont été ajoutés. L'anticorps primaire anti-MOSPD2 a été quant à lui dilué au 15<sup>ème</sup>. Ensuite, les membranes avec les anticorps ont été mises sous agitation toute la nuit à 4°C pour former les complexes antigène-anticorps. Le lendemain, 2 lavages ont été effectués avec du PBS 1X, Tween 0,1% pendant 10 min sous agitation pour éliminer l'excès d'anticorps primaires. Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch), spécifiques de l'espèce animale de l'anticorps primaire, ont été dilués au 10 000<sup>ème</sup> dans du PBS 1X Tween 0,1% puis incubés avec la membrane pendant 30 min. Enfin, 2 lavages ont été effectués avec du PBS 1X, Tween 0,1% pendant 10 min pour éliminer l'excès d'anticorps secondaires.

#### 4. Révélation du WB

Pour la révélation, un mélange volume/volume des solutions A et B du kit ECL (enhanced chemiluminescence, GE Healthcare) a été déposé sur la membrane. Ce mélange a libéré des photons en réaction à l'oxydation du luminol par la peroxydase. La lumière émise par chimioluminescence a ainsi été captée par une caméra CCD (*charge coupled device*) d'un appareil Imager600 (GE Healthcare).

### J. Production et purification de protéine recombinante

#### 1. Production

Des vecteurs d'expression bactérienne codant les domaines MSP des protéines VAP-A, VAP-A KD/MD, VAP-B et MOSPD2 couplés avec un tag 6-Histidine ont été transformés dans des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) (Di Mattia et al., 2018; Mesmin et al., 2013; Wilhelm et al., 2017). Une induction de l'expression des protéines recombinantes a été réalisée par l'ajout d'1mM d'IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) pendant une nuit à 20°C.

#### 2. Purification

Les bactéries ont été lysées sous haute pression (Cell Disruptor TS SERIES, Constant Systems Ltd) dans un tampon de lyse (50 mM phosphate de sodium à pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole et inhibiteur de protéase (cOMplete, Roche)). Les débris bactériens ont été éliminés par plusieurs centrifugations allant de 3 500 g à 50 000 g et une filtration de l'extrait sur une membrane de 0,22  $\mu$ m. Une purification d'affinité a été réalisée en utilisant le système de chromatographie AKTA Start (GE Healthcare Life Science) et une colonne HisTrap HP de 1 ml (GE Healthcare). Les protéines recombinantes possédant un tag 6-Histidine ont été retenues par la colonne d'affinité. Après lavage, les protéines ont été éluées par ajout d'une solution d'éluion (20 mM phosphate de sodium, 250 mM imidazole, pH 7,4). Pour les éliminer les protéines contaminantes restantes, une purification supplémentaire sur une colonne de gel filtration (HiLoad 16/60 Superdex 200 ; GE) dans un tampon de 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl a été effectuée. Et pour finir, les protéines ont été concentrées par centrifugation dans des Amicon Ultra-15 10 kDa (Merck) selon les recommandations du fabricant.

### 3. Analyse de l'expression des protéines recombinantes

La migration des protéines est effectuée par une électrophorèse condition dénaturante. Le gel après migration a été lavé avec de l'eau ultra pure 2 fois pendant 10 min. Ensuite, une solution de bleu de Coomassie (PageBlue Protein Staining Solution ; Thermo Fisher Scientific) a été ajoutée pour colorer les protéines présentes. Après une nuit, le gel a été lavé à l'eau ultra pure puis fixé dans une solution 30% éthanol 5% glycérol.

#### K. Co-précipitation peptidique

La co-précipitation peptidique est une technique permettant d'étudier l'interaction d'un peptide avec une protéine. Ainsi des protéines données peuvent être isolées et concentrées à partir d'un milieu complexe en utilisant des peptides fixés à une résine. Les peptides synthétiques utilisés possèdent une biotine au niveau de leur extrémité N-terminale. Cette biotine permet de fixer les peptides sur une résine de bille magnétique Streptavidin (PureProteome Streptavidin Magnetics beads, EMD Millipore Corp.). En effet, la biotine possède une forte affinité pour le Streptavidin. Ensuite, la résine couplée aux peptides a été ajoutée à un extrait protéique ou à des protéines recombinantes afin d'identifier les interactions peptides-protéines.

##### 1. Co-précipitation avec un extrait protéique

###### *a) Préparation de la résine*

La résine d'affinité a été préparée en incubant 60 nmol de peptide biotinylé avec 15 µl résine Streptavidin, sous agitation pendant 1 h à 4°C, dans un volume total de 1 ml de tampon Précipitation Peptide (T-PP1) [Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 75 mM, EDTA 1mM TritonX-100 1% et inhibiteur de protéase (cOmplete, Roche)]. Ensuite, la résine a été lavée une fois avec du T-PP2 [Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, EDTA 1mM TritonX-100 1% et inhibiteur de protéase] puis deux fois avec du T-PP1.

###### *b) Co-précipitation puis élution*

La co-précipitation a été effectuée en ajoutant, à la résine préalablement préparée, 1 mg d'extrait protéique de cellule HeLa dans un volume total de 1 ml de T-PP3 [Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 75 mM, EDTA 1mM TritonX-100 1%, inhibiteur de protéase et du PhosSTOP

(Roche)] sous agitation pendant 2 h à 4°C. Trois lavages ont ensuite été réalisés avec du T-PP3, puis la résine a été éluée dans 80 µL de tampon de dépôt.

#### 1. Co-précipitation avec des protéines recombinantes

##### *c) Préparation de la résine*

La résine d'affinité a été préparée en incubant 20 nmol de peptide biotinylé avec 15 µl de résine Streptavidin, sous agitation pendant 1 h à 4°C, dans un volume total de 1 ml de T-PP4 [Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 75 mM, EDTA 1mM TritonX-100 1%, inhibiteur de protéase et 1mM DTT]. Ensuite, la résine a été lavée trois fois avec du T-PP4. Un blocage des sites aspécifiques a été effectué en ajoutant 20 µg de BSA sous agitation pendant 1 h à 4°C, puis la résine a été lavée trois fois avec du T-PP4.

##### *d) Co-précipitation puis élution*

La co-précipitation a été effectuée en ajoutant 30 µg de protéines recombinantes et 20 µg de BSA sous agitation pendant 2 h à 4°C, dans un volume de 1 ml de T-PP5 [Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 75 mM, EDTA 1mM TritonX-100 1%, inhibiteur de protéase et 0,25 mM DTT]. Cinq lavages ont été réalisés avec du T-PP5, puis la résine a été éluée dans 40 µL de tampon de dépôt.

## L. Immunofluorescence

#### 1. Préparation des lamelles

Cinquante mille cellules ont été ajoutées sur une lamelle en verre de 12 mm (Marienfeld, No. 1.5H) déposée dans un puits d'une plaque 24 puits contenant 1 mL de milieu de culture frais. Le lendemain, les cellules ont été transfectées si nécessaire.

#### 2. Fixation, perméabilisation des cellules et blocage des sites aspécifiques

Un jour après la transfection, les cellules ont été fixées. Pour cela, le milieu a été remplacé par un mélange PBS 1X, paraformaldéhyde (PFA) 4% (Electron Microscopy Sciences) pendant 10 à 15 min. Puis plusieurs rinçages ont été effectués avec du PBS 1X pour éliminer les traces de PFA. Ensuite, les cellules ont été perméabilisées avec du Triton 0,1%, PBS 1X pendant 10 min avant de rincer avec du PBS 1X. Après, les sites aspécifiques ont été bloqués avec 300 µl d'albumine sérique bovine (BSA) 1% PBS 1X pendant 30 minutes.



### 3. Immunoréaction

Les anticorps primaires anti-Flag (F7425, Sigma) dilués au 1 000<sup>ème</sup> dans une solution BSA1%, PBS 1X, ont été ajoutés sur la lamelle, puis le mélange a été incubé sous agitation douce à 4°C toute la nuit. Le lendemain, 2 lavages de 5 min ont été effectués avec du PBS 1X. Par la suite, les anticorps secondaires couplés avec un fluorochrome ont été dilués au 1 000<sup>ème</sup> dans du PBS 1X puis ajoutés sur la lamelle. Les fluorochromes suivants ont été utilisés : AlexaFluor 488 et AlexaFluor 555. Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst 33258.

### 4. Montage, conservation et imagerie

Pour finir, après les 2 lavages de 10 min avec du PBS 1X, un montage entre lame et lamelle a été réalisé avec du prolong gold (Invitrogen). Ces lames ont été conservées à 4°C à l'abri de la lumière. Après 24H à 4°C les lamelles ont été observées par microscopie confocale. Des images ont été prises au microscope à fluorescence confocal SP5 UV (Leica) avec un objectif à immersion à l'huile 63X (1,40-0,60 HCX PL APO Oil). Les images ont été analysées avec le logiciel ImageJ.

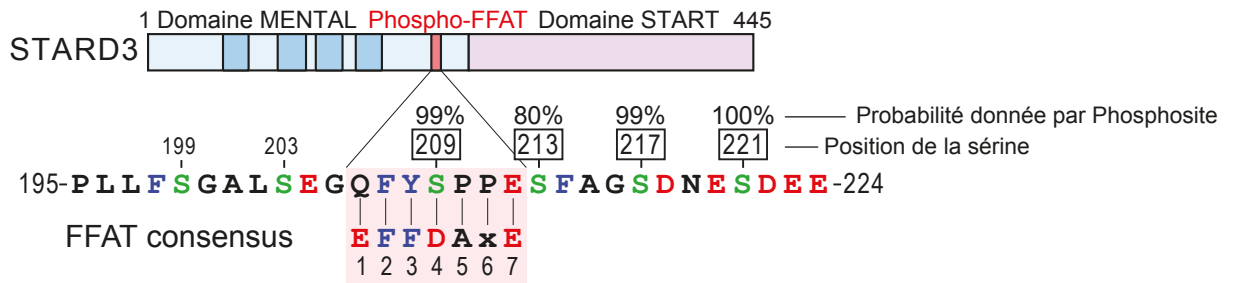
## Résultats

L'objectif de ce projet est d'identifier de nouveaux mécanismes permettant la régulation des sites de contact membranaire. Au cours de ces dernières années, de nombreux complexes protéiques formant des SCM ont été identifiés. Ces protéines sont largement impliquées dans les fonctions essentielles de la cellule telles que le transport de lipides, d'ions et la régulation des voies de signalisation (Prinz et al., 2020; Wu et al., 2018). De plus, ces protéines sont associées dans plusieurs maladies telles que le cancer. La compréhension de la fonction des protéines formant des SCM et les mécanismes associés est un réel enjeu pour mieux appréhender le fonctionnement cellulaire et ses perturbations dans les pathologies, et éventuellement identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Certaines protéines ont un rôle prépondérant dans la formation de SCMs. Ainsi, les protéines du réticulum endoplasmique VAP-A, VAP-B et MOSPD2 sont des acteurs majeurs de la formation de contacts entre le RE et les autres organites cellulaires. Le domaine MSP de ces protéines leur permet d'interagir avec de nombreuses autres protéines portant une courte séquence d'acides aminés appelée motif FFAT (Loewen et al., 2003). Ce motif possède une séquence consensus  $E^1F^2F^3D^4A^5x^6E^7$  composée de deux résidus aromatiques en position 2 et 3 et d'un environnement acide. La position 4 du motif est quant à elle classiquement occupée par un acide aspartique (D) ou un acide glutamique (E). La mutation de ces résidus en 2<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> position du motif en un acide aminé non aromatique pour la position 2 ou non acide pour la position 4 empêche l'interaction avec le domaine MSP (Loewen et al., 2003). De façon intéressante, nous avons identifié que certaines de ces protéines possèdent au sein du motif FFAT un acide aminé en 4<sup>ème</sup> position pouvant être phosphorylé (serine ou thréonine). Ces protéines possédant un résidu phosphorylable en position 4 sont capables d'interagir avec les protéines VAPs (Alpy et al., 2013; Dong et al., 2016; Freyre et al., 2019; Johnson et al., 2018). De plus, la phosphorylation d'une sérine ou de la thréonine entraîne d'un point de vue électrostatique une charge globalement équivalente aux acide aspartique et acide glutamique. Nous avons donc émis l'hypothèse que la phosphorylation des motifs FFAT possédant une sérine ou une thréonine en position 4 pourrait moduler l'interaction de ces protéines avec les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2. Nous nous sommes donc demandé si la phosphorylation en position 4 pouvait réguler la formation de sites de contact membranaire.

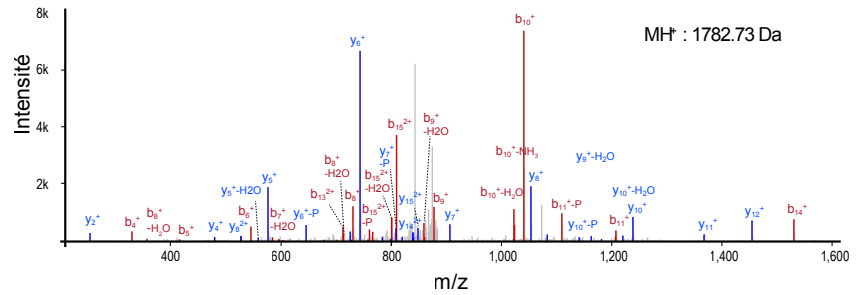
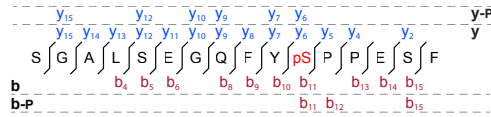
Pour tester cette hypothèse de travail, nous avons choisi d'étudier dans un premier temps une seule protéine pour ensuite pouvoir généraliser ce nouveau mécanisme de régulation de contact aux autres protéines connues. Le choix s'est porté sur la protéine

**A**

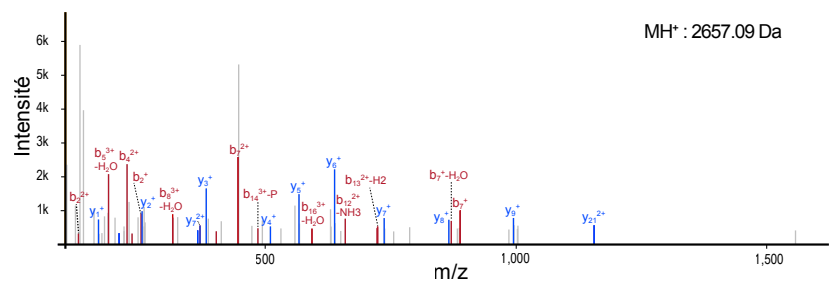
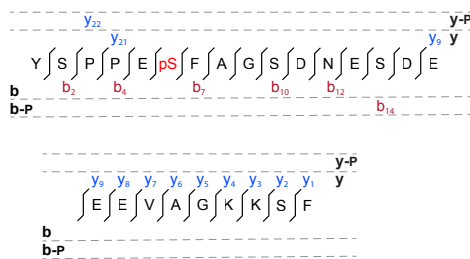


**B**

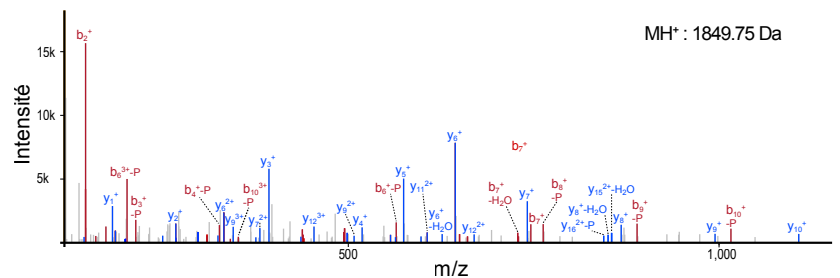
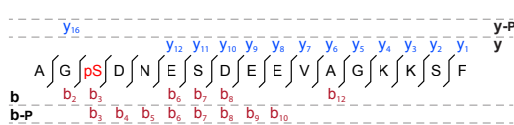
Identification de la phosphorylation S<sub>209</sub>



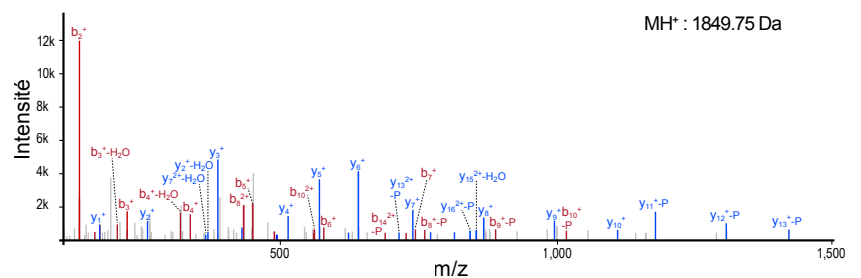
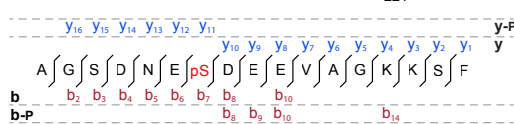
Identification de la phosphorylation S<sub>213</sub>



Identification de la phosphorylation S<sub>217</sub>



Identification de la phosphorylation S<sub>221</sub>



**Figure R1 : La protéine STARD3 possède un motif FFAT phosphorylé in vivo**

A : représentation schématique de la protéine STARD3. Le domaine MENTAL, le motif Phospho-FFAT et le domaine START sont représentés en bleu, rouge et rose, respectivement. En dessous, la séquence du motif FFAT est alignée avec le motif FFAT consensus. Sur cette séquence, les résidus aromatiques sont en bleu, les résidus acides en rouge et les résidus phosphorylables en vert. Les sérines ainsi que la probabilité que celles-ci soient phosphorylées sont indiquées au-dessus de cette séquence.

B : Les peptides identifiés par spectrométrie de masse sont représentés ainsi que les spectres qui leur sont associés. Sur chaque peptide et spectre, les ions « y » retrouvés sont en bleu et les ions « b » sont en rouge. Le poids moléculaire de chaque peptide est indiqué par MH<sup>+</sup>.

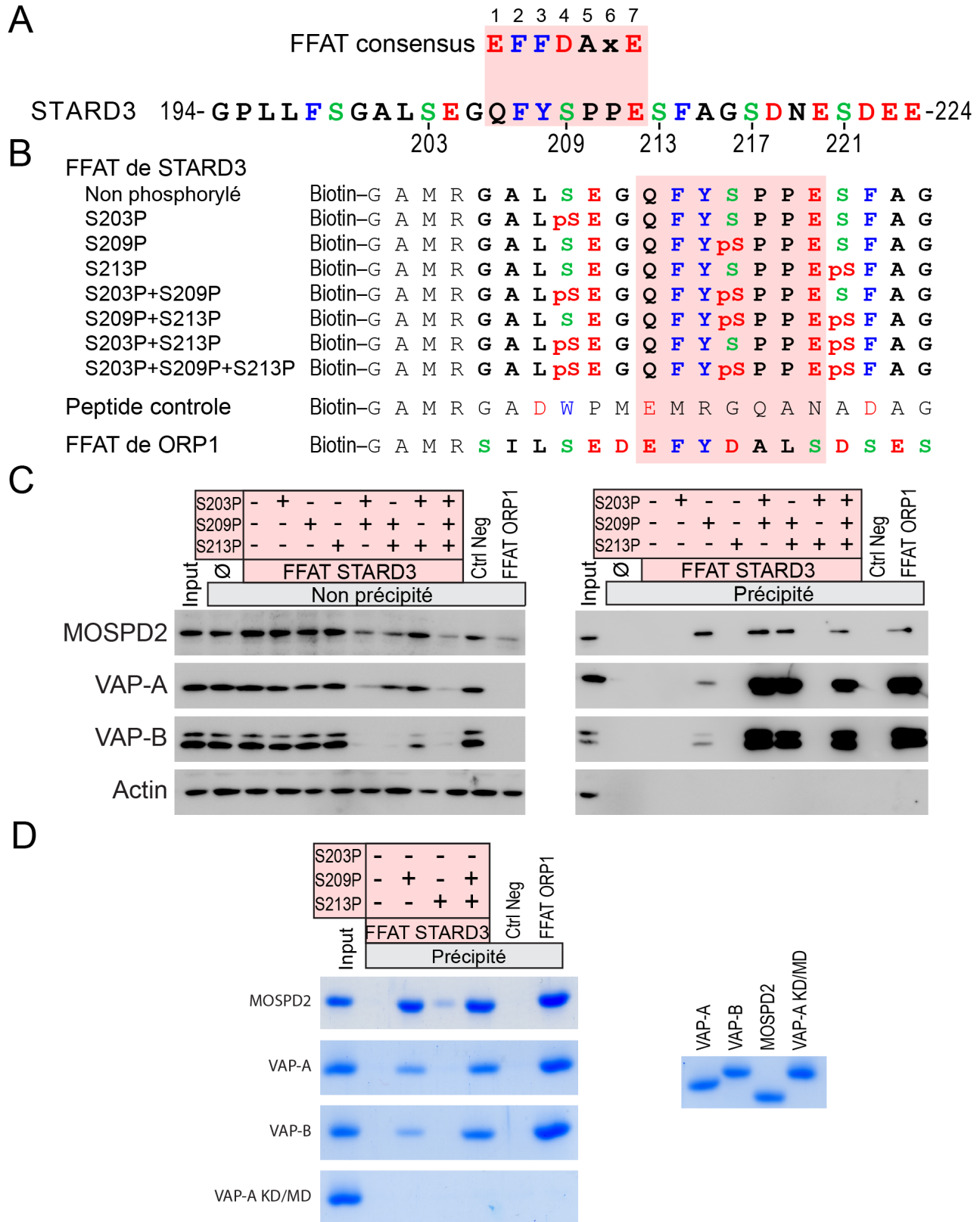
STARD3 qui possède un motif FFAT-like avec une sérine en 4<sup>ème</sup> position (Q<sup>1</sup>F<sup>2</sup>Y<sup>3</sup>S<sup>4</sup>P<sup>5</sup>P<sup>6</sup>E<sup>7</sup>). Ce motif FFAT-like interagit avec VAP et MOSPD2 ce qui entraîne la formation de SCM entre le réticulum endoplasmique et les endosomes tardifs (Alpy et al., 2013). Ces contacts permettent le transport de cholestérol du RE aux endosomes tardifs (Wilhelm et al., 2017). C'est pourquoi nous avons étudié les effets de la phosphorylation de la sérine en position 4 sur la formation de SCM entre les endosomes tardifs et le RE.

## A. La phosphorylation permet de réguler les SCM entre le réticulum endoplasmique et les endosomes

### 1. La protéine STARD3 est phosphorylée *in vivo*

Pour commencer, nous nous sommes demandé si les sérines du motif FFAT de STARD3 étaient phosphorylées *in vivo*. En effet, la protéine STARD3 possède 6 sérines autour du motif FFAT : deux sérines avant le motif FFAT en position 199 et 203, une sérine au centre du motif en position 209 et trois sérines après le motif FFAT en position 213, 217 et 221. Pour répondre à cette question, la protéine STARD3 a été isolée et analysée par spectrométrie de masse pour identifier les sites de phosphorylation. Pour cela, la protéine STARD3 en fusion avec un tag GST (glutathione S-transferase) a été surexprimée dans des cellules HeLa. Ensuite, la protéine a été précipitée afin de l'isoler de l'extrait protéique en utilisant une résine glutathion sepharose 4B qui possède une grande affinité pour la GST. Et pour finir, avec l'aide de la plateforme de protéomique de l'IGBMC, une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier les résidus phosphorylés de la protéine STARD3.

La complexité de cette expérience est due à la présence de plusieurs sites potentiellement phosphorylés au niveau de la séquence FFAT de STARD3 (fig. R1A). La recherche de phosphorylation par spectrométrie de masse n'a pas la capacité d'analyser plus de 2 phosphorylations sur un même peptide. Nous avons préalablement digéré la protéine STARD3 avec de la trypsine et/ou chymotrypsine afin de cliver la protéine en plusieurs peptides. Ensuite, l'échantillon a été soumis à une chromatographie liquide puis une analyse par spectrométrie de masse en tandem (Ultimate nano-LC et LTQ Orbitrap, Thermo Fisher). Nous avons pu identifier que les sérines S209, S213, S217 et S221 possèdent une probabilité de phosphorylation de 99%, 80%, 99% et 100% respectivement (fig. R1)(Taus et al., 2011). Ce taux de probabilité de phosphorylation est calculé via le logiciel phosphoRS qui associe un score entre les masses obtenues et les masse calculées pour une ou deux phosphorylations



**Figure R2 : La phosphorylation du motif FFAT de STARD3 est indispensable à son interaction avec les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2**

A : Séquence protéique du motif FFAT de STARD3. Les résidus aromatiques sont en bleu, les résidus acides en rouge et les résidus phosphorylables en vert.

B : Séquence des peptides biotinylés utilisés pour les expériences d'interaction avec les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2. Ces peptides sont constitués de la séquence du motif FFAT de la protéine STARD3 du résidu 200 au résidu 216. Les sérines 203, 209 et 213 étaient soit phosphorylées ou non phosphorylées. Le peptide contrôle négatif et contrôle positif sont composés respectivement d'une séquence de 16 acides aminés ne possédant pas de motif FFAT et de la séquence du motif FFAT de la protéine ORP1 du résidu 469 au résidu 485.

C : Western Blot de l'expérience de peptide pull down utilisant les peptides en R2B. L'input est un extrait de cellule HeLa WT. Des anticorps anti-VAP-A, anti-VAP-B, anti-MOSPD2 et anti-Actine permettent d'identifier quel peptide précipite ou non chacune de ces protéines. L'actine est utilisée comme contrôle de charge. Seuls les peptides possédant une phosphorylation au niveau de la sérine 209 précipitent les trois protéines.

D : Bleu de Coomassie de l'expérience de peptide pull down utilisant les peptides en R2B. L'input sont des protéines recombinantes des domaines MSP des protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2. La protéine VAP-A KD/MD a été mutée afin d'empêcher le domaine de se lier au motif FFAT. Les protéines recombinantes seules ont été migrés sur un gel à droite de la figure. Les peptides étant phosphorylés au niveau de la sérine 209 du motif FFAT de STARD3 sont capable de précipiter les domaines MSP des protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2.

au sein d'un même peptide (Taus et al., 2011). Ces pourcentages de probabilité étant très élevés, nous pouvons conclure que ces 4 sérines existent sous la forme phosphorylée *in vivo*. De plus, les autres peptides analysés montrent que la protéine STARD3 est à la fois dans un état phosphorylé et non phosphorylé *in vivo*. Les sérines S199 et S203, possédant une probabilité de phosphorylation nulle via le logiciel PhosphoRS, sont quant à elles non phosphorylées (fig. R1A). Les fragments analysés ainsi que les spectres obtenus pour chacune des sérines S209, S213, S217 et S221 sont représentés figure R1B. L'identification d'un peptide analysé par spectrométrie de masse est donnée par plusieurs ions. Le peptide est décomposé en plusieurs fragments qui sont ionisés. Les ions représentés sur la figure R1B, sont les ions retrouvés lors de l'analyse. Les ions b, en rouge, sont les ions issus des séquences allant de l'extrémité amino-terminale à l'extrémité carboxy-terminale alors que les ions y, en bleu, sont les ions allant de l'extrémité carboxy-terminale à l'extrémité amino-terminale. De plus, les ions ayant perdu leur phosphate lors de l'analyse sont annotés y-P ou b-P. Lors de la recherche d'une phosphorylation, il est important de retrouver les ions bordant le site de phosphorylation. Pour la phosphorylation de la sérine 209, tous les ions proches de la phosphorylation sont présents. Les ions b10 et y6, représentant les fragments SGALSEGQFY et pSPPEsf respectivement, possèdent une grande intensité de signal ce qui démontre que le fragment avant la sérine 209 n'est pas phosphorylé et qu'à partir de la sérine 209 le fragment est phosphorylé.

Ce premier résultat, nous indique que la protéine STARD3 possède plusieurs états de phosphorylation et que la sérine S209 en 4<sup>ème</sup> position du motif FFAT est phosphorylée ainsi que les sérines suivantes : S213, S217 et S221. Après avoir confirmé que la protéine STARD3 est phosphorylée *in vivo*, nous avons recherché si la phosphorylation du motif FFAT de STARD3 modifie l'interaction avec ses partenaires protéiques VAPs et MOSPD2.

## 2. STARD3 interagit avec VAPs et MOSPD2 seulement lorsqu'elle est phosphorylée

Il a été identifié que la protéine STARD3 interagit via son FFAT avec les protéines VAPs et MOSPD2 (Alpy et al., 2013; Di Mattia et al., 2018). Les motifs FFAT sont constitués d'une région acide chargée négativement. La séquence du FFAT de STARD3 quant à elle possède peu d'acide aspartique ou d'acide glutamique mais plusieurs sérines (Fig. R2A). Nous avons voulu observer l'effet de la phosphorylation des sérines sur l'interaction avec ces partenaires VAPs et MOSPD2 dans différentes situations : avant le FFAT : S203 même si

celle-ci ne semble pas phosphorylée *in vivo*, au centre du FFAT : S209 et après le FFAT : S213.

Pour cela, des peptides synthétiques ont été fabriqués (Fig. R2B). Ces peptides sont constitués d'une biotine en partie N-terminale, puis des séquences de STARD3 non phosphorylées, mono-phosphorylées, bi-phosphorylées et tri-phosphorylées aux sérines 203, 209 et 213. Deux autres peptides ont été synthétisés, un contrôle négatif comprenant une séquence aléatoire de même taille et un contrôle positif constitué de la séquence de la protéine ORP1. La protéine ORP1 est une protéine qui possède un motif FFAT (E<sup>1</sup>F<sup>2</sup>Y<sup>3</sup>D<sup>4</sup>A<sup>5</sup>L<sup>6</sup>S<sup>7</sup>) conventionnel connu pour interagir avec les protéines VAPs et MOSPD2 (Di Mattia et al., 2018; Loewen et al., 2003). Ces peptides, grâce à la biotine, ont été fixés sur une résine Streptavidine. Avec ce système, les interactants de chacun de ces peptides ont été précipités et identifiés par Western Blot ou SDS-Page suivi d'une coloration au Bleu de Coomassie.

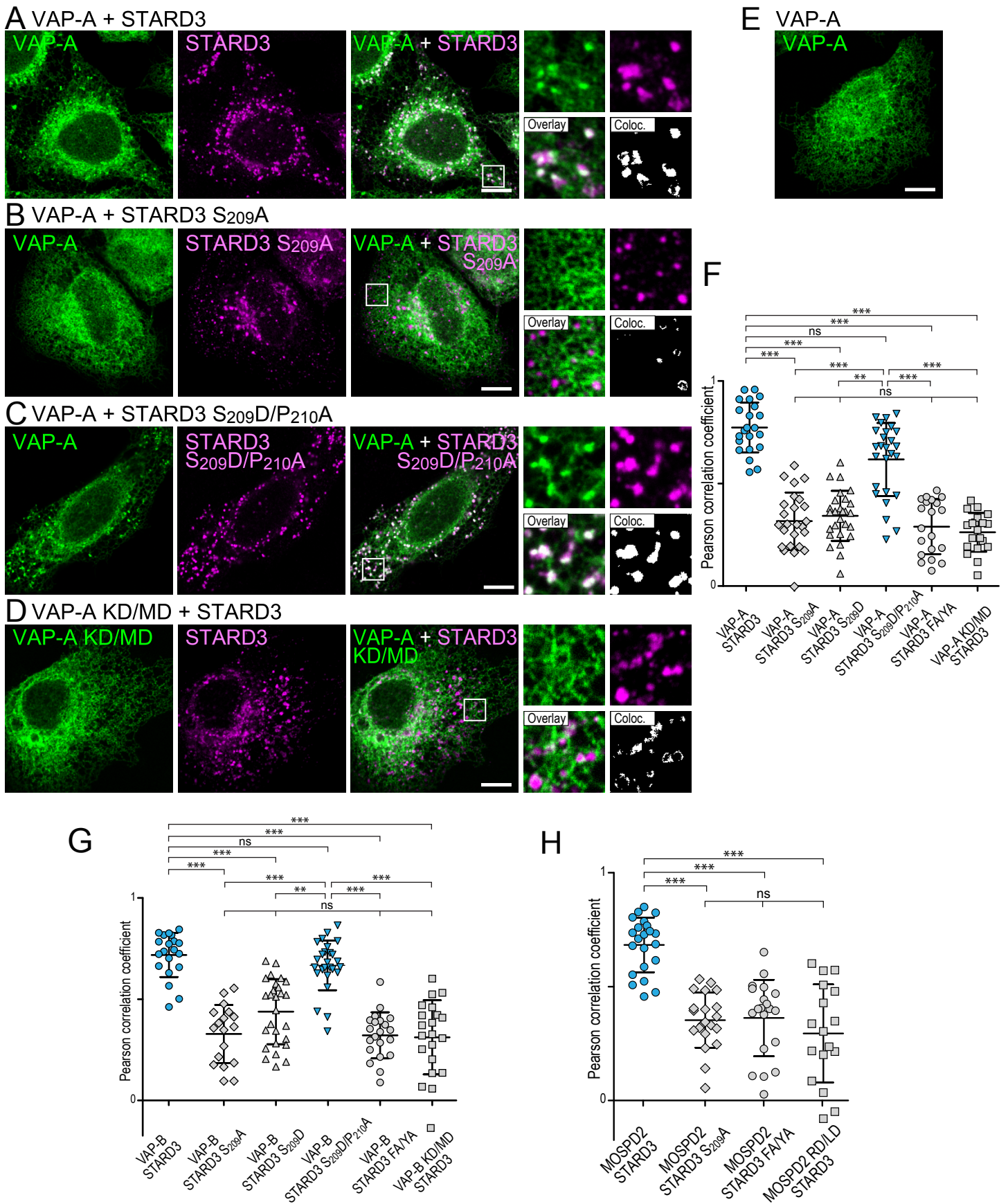
Dans un premier temps, un extrait protéique de cellules HeLa a été utilisé pour identifier la capacité des peptides à précipiter les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2 au sein d'un milieu complexe. Les peptides fixés sur une résine Streptavidine sont mélangés à un extrait protéique total de cellules HeLa. Les fractions non précipitées et précipitées ont été récupérées puis analysées par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2 (Fig. R2C). L'extrait protéique utilisé, identifié sur la figure par input, possède les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2. De plus, l'utilisation d'une condition sans peptide et une condition peptide contrôle négatif montre que les protéines VAPs et MOSPD2 sont présentes seulement dans la fraction non précipitée. Le peptide contrôle positif constitué du FFAT de ORP1 précipite VAP-A, VAP-B et MOSPD2. Ceci valide l'efficacité de ce système, le motif FFAT de ORP1 peut interagir avec les protéines VAPs et MOSPD2 alors que l'absence de peptide ou une séquence aléatoire ne le peut pas. Ensuite, le peptide non phosphorylé de STARD3 ne précipite aucune de ces trois protéines. Lorsque le peptide est entièrement phosphorylé, les protéines sont précipitées. L'interaction entre la protéine STARD3 et les protéines VAPs et MOSPD2 est donc dépendante de la phosphorylation du motif FFAT de STARD3. Ensuite, nous avons voulu savoir si certains sites de phosphorylation sont plus importants dans ces interactions protéiques. Lorsque le motif FFAT n'est phosphorylé qu'une seule fois, les protéines VAPs et MOSPD2 sont précipitées seulement dans le cas où la phosphorylation se situe au centre du FFAT, sur la sérine 209. Si deux phosphorylations sur le motif sont présentes, les protéines sont précipitées seulement si la sérine 209 est phosphorylée. La phosphorylation de la sérine S209 est donc indispensable à l'interaction. De plus, l'intensité des bandes précipitées est plus importante lorsque plusieurs

sérines sont phosphorylées. L'interaction entre le motif FFAT de la protéine STARD3 et les protéines VAPs et MOSPD2 est dépendante de la phosphorylation de la sérine 209 et l'affinité entre le peptide et les protéines VAPs et MOSPD2 augmente si les sérines à proximité du motif sont phosphorylées.

Après avoir montré l'importance de la phosphorylation du motif FFAT de STARD3 dans un milieu complexe, nous avons vérifié ce résultat *in vitro* en utilisant des protéines recombinantes de VAPs et MOSPD2. Cette expérience permet de mettre en évidence une interaction directe dans un milieu contrôlé. Pour cela, des protéines recombinantes des domaines MSP de VAP-A, VAP-B, MOSPD2 et VAP-A KD/MD, mutation du domaine MSP qui empêche l'interaction avec les motifs FFAT en modifiant la poche hydrophobe qui permet de lier l'acide aminé aromatique en position 2 du motif, ont été produites (Fig. R2D)(Kaiser et al., 2005). Pour cette expérience, nous avons choisi d'utiliser les peptides possédant des phosphorylations existantes dans la protéine STARD3 *in vivo*, c'est-à-dire les sérines 209 et 213. Ces peptides ont été fixés sur une résine Streptavidine puis la protéine recombinante a été ajoutée au milieu. Ensuite, la résine ayant précipité ou non les protéines recombinantes a été lavée puis éluée. Le peptide contrôle négatif n'a pas retenu les protéines VAPs et MOSPD2 alors que le motif FFAT de ORP1 a précipité les trois protéines recombinantes VAP-A, VAP-B et MOSPD2 et n'a pas précipité la protéine VAP-A KD/MD. Comme attendu, le motif FFAT d'ORP1 interagit de manière directe avec les domaines MSP des protéines VAPs et MOSPD2. Le motif FFAT non phosphorylé de STARD3 comme le contrôle négatif ne précipite pas les protéines recombinantes. Le peptide entièrement phosphorylé, bi-phosphorylé en S209 et S213 de STARD3, quant à lui précipite ces protéines. La phosphorylation est donc primordiale à l'interaction directe entre le motif FFAT de STARD3 et les domaines MSP des protéines VAPs et MOSPD2. De plus, la phosphorylation en position 209 est indispensable à l'interaction car seul le peptide mono-phosphorylé en cette position peut interagir avec ces protéines. La mutation de la protéine VAP-A KD/MD au niveau du domaine MSP bloque l'interaction avec les peptides d'ORP1 et STARD3 phosphorylé, ce qui nous indique que les motifs FFAT phosphorylés interagissent avec la poche hydrophobe du domaine MSP des protéines VAPs et MOSPD2. Ces données montrent que l'interaction entre la protéine STARD3 et les protéines VAPs et MOSPD2 est directe et que celle-ci est dépendante de la phosphorylation de la sérine 209.

Les premiers résultats d'interaction montrent des différences d'affinités en fonction de la présence d'une ou de plusieurs phosphorylations sur le motif FFAT de STARD3. Pour évaluer cette différence, nous avons mesuré la constante d'affinité entre le motif FFAT de





**Figure R3 : La protéine STARD3 permet le recrutement du réticulum endoplasmique au niveau des endosomes lorsque celle-ci est phosphorylée.**

A-D : Images de cellules HeLa co-exprimant la protéine GFP-VAP-A ou GFP-VAP KD/MD (D) avec la protéine Flag-STARD3 (A), Flag-STARD3 S209A (B), Flag-STARD3 S209A/P210A (C). La protéine GFP-VAP-A et Flag-STARD3 sont représentées en vert et en magenta, respectivement. Une superposition des deux canaux ainsi qu'un grossissement de l'image (3,5X) sont indiqués à droite. La barre d'échelle est de 10  $\mu$ m.

E : Image de cellule HeLa exprimant seulement la protéine GFP-VAP-A.

F-H : Coefficient de corrélation de Pearson entre Flag-STARD3 et ses mutants avec GFP-VAP-A (F), GFP-VAP-B (G), GFP-MOSPD2 (H). Chaque point est la représentation d'une cellule issue d'au moins trois expériences indépendantes. Les comparaisons de chaque conditions sont statistiquement différentes \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

STARD3 et les domaines MSP des protéines VAPs et MOSPD2 par résonance des plasmons de surface, en collaboration avec le Docteur Nominé (Fig. 2E). Pour ce faire, les peptides de STARD3 ont été fixés sur une surface (CM5 sensor surface, GE Healthcare). L'ajout d'une phase mobile constituée de plusieurs concentrations de protéines recombinantes VAP-A, VAP-B ou MOSPD2 va faire onduler les charges à la surface de la membrane en fonction de l'affinité de ces protéines avec le peptide. Cette oscillation des charges va être mesurée pour identifier les constantes de dissociation de chacun des partenaires. Les motifs FFAT de STARD3 non phosphorylés ou ayant une phosphorylation en S213 n'interagissaient pas avec les protéines VAPs et MOSPD2, ce qui est cohérent avec les résultats préalablement obtenus. Le peptide phosphorylé en S209 a une affinité, de l'ordre de 6  $\mu$ M et 1  $\mu$ M respectivement, pour les protéines VAPs et MOSPD2. La double phosphorylation S209 et S213 diminue ces constantes de dissociation à environ 4  $\mu$ M et 0,35  $\mu$ M. L'ajout d'une phosphorylation permet d'augmenter l'affinité du motif avec les domaines MSP des protéines VAPs et MOSPD2. De plus, l'affinité du peptide pour la protéine MOSPD2 est supérieure à celle des protéines VAPs. Cette information sous-entend que les protéines à motif FFAT auraient des partenaires protéiques de prédilection. Cette expérience montre que la phosphorylation de la serine en position 4 du motif FFAT est indispensable et que l'affinité est de l'ordre du micromolaire.

Pour conclure, le motif FFAT de la protéine STARD3 interagit avec les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2 de façon directe et de l'ordre du micromolaire. La phosphorylation de la sérine 209 est obligatoire pour permettre l'interaction et, plus l'environnement du motif est phosphorylé plus celui-ci gagne en affinité.

### 3. STARD3 phosphorylée est recrutée au niveau des sites de contact membranaire ER-endosomes

Les études réalisées jusqu'à maintenant se concentraient sur le motif FFAT de STARD3 dans un milieu contrôlé sans prendre en compte la protéine entière dans son environnement. C'est pour cela que nous avons voulu vérifier si la phosphorylation de la protéine STARD3 pouvait réguler la formation de SCM. Nous nous sommes donc intéressés à la formation de SCM entre la protéine endosomale STARD3 et les protéines du réticulum VAP-A, VAP-B et MOSPD2 *in cellulo*. Dans un premier temps, une co-expression des protéines GFP-VAP-A et FLAG-STARD3 dans des cellules HeLa a été effectuée pour visualiser la localisation de ces protéines. La surexpression seule de la protéine VAP-A fusionnée à une GFP montre un marquage réticulaire présent dans l'ensemble du cytoplasme de la cellule, cette localisation dans la cellule correspond au RE (Fig. R3E). Lorsque l'on co-

exprime la protéine STARD3 et la protéine VAP-A, la localisation de la protéine GFP-VAP-A change (Fig. R3A) : alors qu'elle est présente de manière uniforme dans le RE lorsqu'elle est exprimée seule, VAP-A s'accumule dans des sous-domaines du RE en contact avec les endosomes positifs pour STARD3 lorsque VAP-A et STARD3 sont co-exprimées. (Alpy et al., 2013). Si l'on surexprime la protéine STARD3 et la protéine VAP-A KD/MD, le mutant incapable d'interagir avec les motifs FFAT, la protéine VAP-A reste localisée uniformément dans le réticulum endoplasmique (Fig. R3D). En regardant la localisation de la protéine VAP-A et en quantifiant la co-localisation des protéines VAP-A et STARD3, nous pouvons observer indirectement l'interaction entre ces deux protéines ainsi que la formation de SCM.

La protéine STARD3 étant *in vivo* dans plusieurs états de phosphorylation, des mutations phospho-mimétiques ont été utilisées. Une mutation phospho-mimétique consiste en un remplacement du résidu phosphorylé, sérine ou thréonine chargée négativement par la phosphorylation, par un résidu acide, acide aspartique ou acide glutamique. Un contrôle négatif de l'expérience a été réalisé en utilisant le mutant FA/YA qui est connu dans la littérature pour inhiber l'interaction entre un motif FFAT et le domaine MSP (Kaiser et al., 2005; Loewen et al., 2003; Mesmin et al., 2013; Wilhelm et al., 2017). En effet, les deux résidus aromatiques, phénylalanine 207 et la tyrosine 208, ont été changés en alanine pour empêcher l'interaction du motif FFAT de STARD3 avec la protéine VAP-A. Ce mutant ne recrute pas la protéine GFP-VAPA (Fig. R3F). Puis, deux mutants phospho-mimétiques et une mutation de la protéine dans un état non-phosphorylable ont été réalisés. Le premier, STARD3 S209A, est un mutant non-phosphorylable du motif FFAT : la sérine 209 a été remplacée par une alanine non chargée et non-phosphorylable. La protéine STARD3 S209A possède la même localisation que la protéine STARD3 (Fig. R3B). Par contre, la protéine GFP-VAP-A n'est pas recrutée au niveau de STARD3 S209A. Cette mutation empêche l'interaction entre les deux protéines. Le second mutant, STARD3 S209D, est un mutant phosphomimétique du motif : l'acide aminé 209 a été remplacé par un acide aspartique chargé négativement. La localisation de la protéine VAP-A reste inchangée et l'étude de la co-localisation ne montre pas de corrélation (Fig. R3F). La mutation S209D dans STARD3 n'a pas permis de restaurer l'interaction. Ce résultat très surprenant, nous a poussé à regarder plus en détail la structure cristallographique de l'interaction entre le domaine MSP de VAP-A et un peptide constitué de la séquence du motif FFAT de la protéine STARD3 phosphorylée afin de trouver une mutation qui permettrait d'obtenir un phospho-mimétique convenable (données non publiées au laboratoire). Nous avons constaté que l'acide aspartique n'avait pas exactement la même taille et la même conformation qu'une sérine phosphorylée. En effet, la sérine phosphorylée possède une charge négative plus éloignée que l'acide aspartique. De plus, La présence de

deux prolines successives après la sérine induit une rigidité conformationnelle du motif FFAT de STARD3. Ces différences permettent à la sérine d'interagir plus facilement qu'un acide aspartique avec les résidus chargés positivement du domaine MSP de VAP-A. Nous avons alors fait un troisième mutant, S209D/P210A, dans lequel, en plus de la mutation S209D, nous avons remplacé la proline 210 par une alanine pour diminuer la rigidité conformationnelle du motif FFAT de STARD3. Nous avons à nouveau co-transfecté les mutants de la protéine STARD3 avec la protéine GFP-VAPA et observé leurs localisations intra-cellulaires. La localisation de la protéine GFP-VAP-A présente des enrichissements ponctiformes au niveau de la protéine STARD3 S209D/P210A (Fig. R3C), ce qui montre que cette mutation restaure l'interaction entre les deux protéines. La co-localisation entre tous ces mutants et la protéine VAP-A a été mesurée par un test de corrélation entre les signaux acquis dans le vert pour GFP-VAPA et dans le rouge pour STARD3 (Fig. R3F). Ces résultats montrent que la protéine VAP-A est recrutée au niveau de la protéine STARD3 que lorsque celle-ci est sous une forme qui mime l'état phosphorylé de la protéine.

Les mêmes expériences ont été effectuées avec la protéine VAP-B (Fig. R3G). La protéine STARD3 entraîne un recrutement de la protéine VAP-B. Le mutant S209D/P210A conserve cette capacité alors que les protéines STARD3 S209A, S209D et FA/YA ne sont plus capables d'induire une relocalisation de la protéine VAP-B. Ce résultat est similaire à la protéine VAP-A. Pour finir, nous avons testé le mutant S209A, mimant STARD3 non-phosphorylée, avec la protéine MOSPD2. Comme avec les protéines VAP-A et VAP-B, la mutation de la sérine en alanine de la protéine MOSPD2 empêche l'interaction avec STARD3.

Ces expériences utilisant des mutants non-phosphorylables ou mimant un état phosphorylé de la protéine STARD3 suggèrent que la protéine STARD3 non phosphorylée est dans l'incapacité d'interagir avec les protéines du RE et n'induit plus la formation de SCM entre le RE et les endosomes alors que la protéine STARD3 phosphorylée peut interagir et former des contacts.

## B. La phosphorylation permet de réguler les SCM entre le réticulum endoplasmique et les autres organites

La découverte des motifs FFAT est récente (Kaiser et al., 2005; Levine, 2004; Loewen et al., 2003). La définition et les algorithmes pour les identifier sont issus de la connaissance des partenaires protéiques des protéines VAP-A et VAP-B. Dans la majorité des cas de ces

**A**

Idéal	Phospho-FFAT						
	DE ST	FY	FY	ST	A C	X	DE ST
Positions	1	2	3	4	5	6	7
D E	0	4	1	4	4	0	0
S T	0	4	1	0	1	0	0
F Y	1	0	0	4	2	0	1
W	1	2	1	4	2	0	1
H K R	1,5	4	1	4	2,5	0	1,5
A C	1	4	1	4	0	0	1
G P	1	4	1	4	1	0	1
I L M N Q V X	1	4	1	4	2	0	1

SCORE1 du Phospho-FFAT	
score	1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6 + 7

**B**

Environnement acide (N-terminal et C-terminal)													
Positions	-6	-5	-4	-3	-2	-1	FFAT	8	9	10	11	12	13
D/E	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1
S/T	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1
K/R	-1	-1	-1	-1	-1	-1		-1	-1	-1	-1	-1	-1
autres	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0

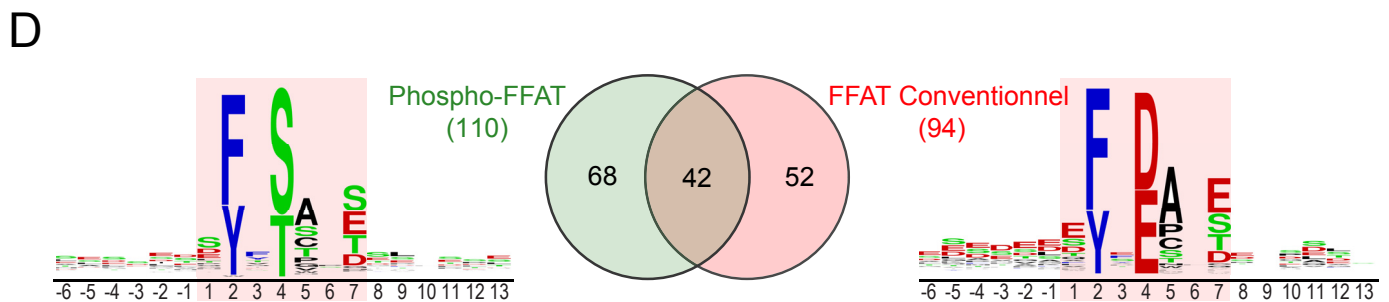
SCORE2 positions de -6 à -1					SCORE4 positions de -6 à 9					SCORE3 positions de 8 à 9				
	≥4	3	2	1,5		≥6	5	4-3	≤2		≥4	3	2	1,5
score	0	0,5	1	1,5	score	0	0,5	1	1,5	score	0	0,5	1	1,5

**C**

Environnement acide en 7 et 8		
Positions	7	8
D/E	1	1
S/T	1	1
autres	0	0

SCORE5 positions 7 et 8			
	2	1	0
score	0	0,5	4

SCORE final	
SCORE1 + Minimum (SCORE2; SCORE3; SCORE4) + SCORE5	



**E**

NOM	Phospho-FFAT					FFAT Conventiennel				
	SCORE	START	N-ter	CORE	C-ter	SCORE	START	N-ter	CORE	C-ter
MIGA2	0	286	SLTSED	SFFSATE	LFESLQ	4	286	SLTSED	SFFSATE	LFESLQ
Kv2.1	1	584	SMSSID	SFISCAT	DFPEAT	2,5	748	FEAGVH	QYIDADT	DDEGQL
Kv2.2	1	599	STSSID	SFTSCAT	DFTEETE	3	797	SSRERR	SFTEIDT	GDDDEF
PТИP151	1	151	STGSSS	VYFTASS	GATFTD	1	160	TASSGA	TFTDAES	EGGYTT
FIP200	2	725	AESPES	DFMSAVN	EFVIEE	5	687	LEELSP	DSIDAHT	FDFTETI
STAR3	2,5	200	GALSEG	QFYSPPE	SFAGSD	4	260	KFEKNN	EYGDTVY	TIEVPF

**Figure R4 : Identification de nouvelles protéines possédant un motif Phospho-FFAT potentiel**

A-C : algorithme permettant de calculer un score prédictif de motif Phospho-FFAT d'une séquence de 13 acides aminés. Le calcul de ce score prédictif est composé de plusieurs malus : un pour le corps du motif (A), un pour les charges autour du corps du motif (B) et un pour la présence d'une charge en fin du motif FFAT (C). Les résidus aromatiques, acides et phosphorylables sont colorés en bleu, rouge et vert, respectivement.

D : Diagramme de Venn des protéines identifiées possédant un Phospho-FFAT et/ou un FFAT conventionnel parmi la liste de protéines interagissant avec les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2. Les séquences des motif FFAT ont été compilées sous forme d'un web-logo.

E : Liste de protéines connues dans la littérature comme interagissant avec les protéines VAPs et possédant un résidu phosphorylable en 4ème position du motif FFAT. Ces protéines ont toutes été retrouvées dans notre analyse avec un score de prédiction de motif Phospho-FFAT inférieur à 2,5. Le score, la position du motif au sein de la protéine ainsi que la séquence sont indiqués pour le meilleur Phospho-FFAT et FFAT conventionnel identifié par notre analyse.

partenaires, le résidu en 4<sup>ème</sup> position du motif est un acide aspartique, comme illustré dans la séquence du motif consensus du FFAT : E<sup>1</sup>F<sup>2</sup>F<sup>3</sup>D<sup>4</sup>A<sup>5</sup>X<sup>6</sup>E<sup>7</sup> (Loewen et al., 2003). Les analyses *in silico* recherchant de nouveaux motifs FFAT réalisés se sont basées sur ces connaissances et n'ont pas pris au même niveau de considération les acides aminés chargés négativement (acide aspartique et acide glutamique) et les résidus pouvant être phosphorylés tels que la serine ou la thréonine. Étant donné que le motif FFAT de STARD3 Q<sup>1</sup>F<sup>2</sup>Y<sup>3</sup>S<sup>4</sup>P<sup>5</sup>P<sup>6</sup>E<sup>7</sup> n'a pas été identifié par ces analyses, nous avons donc fait une recherche *in silico* afin de déterminer si d'autres protéines comme STARD3 possèdent un motif FFAT avec un résidu phosphorylable en position 4 qui pourraient être régulés par phosphorylation. Si d'autres protéines possèdent ce motif Phospho-FFAT et qu'elles sont régulées comme la protéine STARD3, cela permettra ensuite de généraliser le concept d'une régulation de la formation de SCM par phosphorylation à l'ensemble des protéines possédant un motif phosphorylable.

### 1. Identification de nouvelles protéines possédant un Phospho-FFAT par une analyse *in silico*

Le motif FFAT a été défini par plusieurs critères : le premier est sa capacité à interagir avec les protéines VAPs ; le deuxième est sa séquence cœur de 7 acides aminés, ayant pour consensus E<sup>1</sup>F<sup>2</sup>F<sup>3</sup>D<sup>4</sup>A<sup>5</sup>X<sup>6</sup>E<sup>7</sup> et possédant en amont une séquence riche en acides aminés acide. Afin de trouver de nouvelles protéines à motif FFAT, des algorithmes de recherche de courtes séquences ont été utilisés sur l'ensemble des protéines identifiées chez l'Homme et répertoriées dans la base de donnée SwissProt (Mikitova and Levine, 2012; Murphy and Levine, 2016). Les analyses *in silico* scannent et découpent virtuellement chaque protéine en plusieurs séquences de 13 acides aminés, 7 résidus pour le corps du motif et 6 pour l'environnement acide en amont du corps. Pour ce faire, à chaque résidu du corps du motif est attribué un score compris entre 0 et 4 en fonction de la nature de ce résidu (Fig. R4A). Le but de ce système est d'identifier les protéines humaines qui possèdent un motif FFAT potentiel. En effet, les données de la littérature permettent d'avoir une idée de la composition en acides aminés du motif FFAT (Kaiser et al., 2005; Loewen et al., 2003; Murphy and Levine, 2016). Celui-ci doit contenir obligatoirement un résidu aromatique en position 2 et un résidu chargé négativement en position 4 et un autre en position 7 et/ou 8. Dans la plupart des motifs identifiés, un résidu aromatique est aussi présent en position 3 et des acides aminés chargés négativement sont présents en position 1 et 7. Sachant que parmi les 21 acides aminés qui composent les protéines, 3 possèdent un cycle aromatique (phénylalanine F, tyrosine Y et tryptophane W), 2 possèdent une charge négative (acide aspartique D et acide glutamique E), 3 possèdent une charge positive (arginine R, histidine H, lysine K) et 3 peuvent être



phosphorylés (serine S, thréonine T et tyrosine Y). Nous pouvons ainsi créer des combinaisons de séquences ayant plus ou moins de probabilité de se comporter comme un motif FFAT, c'est-à-dire d'interagir avec VAP et MOSPD2. Pour cela, des malus allant de 0 à 4 sont ajoutés pour chaque acide aminé différent du motif FFAT consensus. Ces malus sont ensuite additionnés pour donner un score au cœur du motif. Un score de 0 représente le meilleur score et nous indique que le motif a de grande chance d'être un véritable motif FFAT. Une addition de malus supérieur ou égal à 4 exclue la possibilité pour le motif d'être un motif FFAT. Par exemple : pour la première position du motif FFAT, nous savons que dans un grand nombre de motifs FFAT fonctionnels le premier acide aminé du motif est chargé négativement puisque le domaine MSP possède en surface des charges positives. Un acide aspartique D ou un acide glutamique E chargé négativement en position 1 n'ajoutera pas de malus alors qu'une histidine H ayant une charge opposée positive ajoute un malus de 1,5. Pour la deuxième position une phénylalanine F ou une tyrosine Y étant indispensable au fonctionnement de ce motif, aucun malus n'est ajouté si ces résidus sont présents à cette position, par contre un autre acide aminé aura un malus de 4, et élimine cette séquence de la liste des FFATs potentiels. Ceci est réalisé sur chacune des positions du corps du motif FFAT allant de 1 à 7 puis tous les malus sont additionnés afin de donner le score du cœur du motif (fig. R4A). Les protéines possédant des FFAT ayant des scores proches de 0 sont les protéines ayant le meilleur potentiel et les motifs supérieurs ou égaux à 4 sont considérés comme ne possédant pas de motif FFAT. En partenariat avec le docteur Timothy Levine et John Slee (University College London, UK), nous avons exécuté une nouvelle recherche en choisissant les malus pour chacune des positions des 7 acides aminés qui composent le motif FFAT.

Cette nouvelle recherche comporte quelques différences comparées aux précédentes expériences déjà réalisées par l'équipe de Timothy Levine. Nous avons fait deux algorithmes, un pour identifier les motif FFAT consensus ( $E^1F^2F^3D^4A^5x^6E^7$ ) possédant un acide aminé acide en position 4 et un pour identifier les Phospho-FFAT ( $E^1F^2F^3S^4A^5x^6E^7$ ) qui possèdent un résidu phosphorylable en position 4 du motif. De plus, nous avons ajouté de nouvelles règles pour le calcul de l'environnement acide du FFAT, car la protéine STARD3 possède plus de charge dans sa partie après le FFAT qu'avant, or les études *in silico* précédentes ne prenaient en compte que la partie en amont du FFAT (Fig. R4B). Pour cela, nous avons fait le calcul de score en scannant et découpant les protéines en séquences de 19 acides aminés successifs, 7 pour le corps du motif, 6 pour la région en amont et 6 pour la région en aval. Le calcul du score final pour une séquence donnée est un résultat de 5 scores différents (Fig.4A-C). Le premier score représente le corps du motif FFAT. C'est une addition des malus pour chacun

des 7 acides aminés en fonction de leur position (Fig. R4A). Pour obtenir deux listes différentes pour les FFAT conventionnels et les Phospho-FFAT, nous avons défini en position 4 du motif soit un score de 0 pour les résidus phosphorylables et 4 pour les acides aminés acides, soit l'inverse. Ceci permet d'avoir une idée de l'importance des Phospho-FFAT dans le protéome comparé aux FFAT conventionnels déjà très étudiés. Les scores 2, 3 et 4 sont des scores donnés à l'environnement du motif. Les alignements de séquence des motifs FFAT connus montrent que les régions bordant le motif FFAT sont chargées négativement. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier les 6 acides aminés en amont et en aval du motif (Fig. R4B). Si les régions possèdent une majorité d'acides aminés chargés négativement alors aucun malus n'est ajouté. Par contre si les régions bordant le motif ne sont pas chargées ou chargées positivement alors un malus sera ajouté. Le score 2 représente la séquence en amont, le score 3 en aval et le score 4 la totalité. Le score qui donnera le moins de malus entre le score 2, 3 et 4 est ajouté au score du cœur du motif. Le dernier, le score 5 est quant à lui au niveau de la position 7 ou 8 du motif, un acide aminé chargé négativement doit être présent (Fig. R4C). C'est pour cela qu'un malus de 4 est ajouté si ce résidu est manquant. Le score final est l'addition du premier score avec le score 5 et le score le plus petit entre les scores 2, 3 et 4. Ces méthodes permettent d'analyser toutes les protéines connues chez l'Homme mais ne permettent pas de valider l'interaction avec les protéines VAPs qui est le critère principal de ce motif. Ceci fait que les protéines possédant une séquence FFAT identifiée *in silico* n'ont pas forcément un motif FFAT fonctionnel. Ce sont des motifs FFAT potentiels. Des expériences *in vitro* ou *in vivo* sont indispensables pour valider le motif FFAT identifié par ces algorithmes.

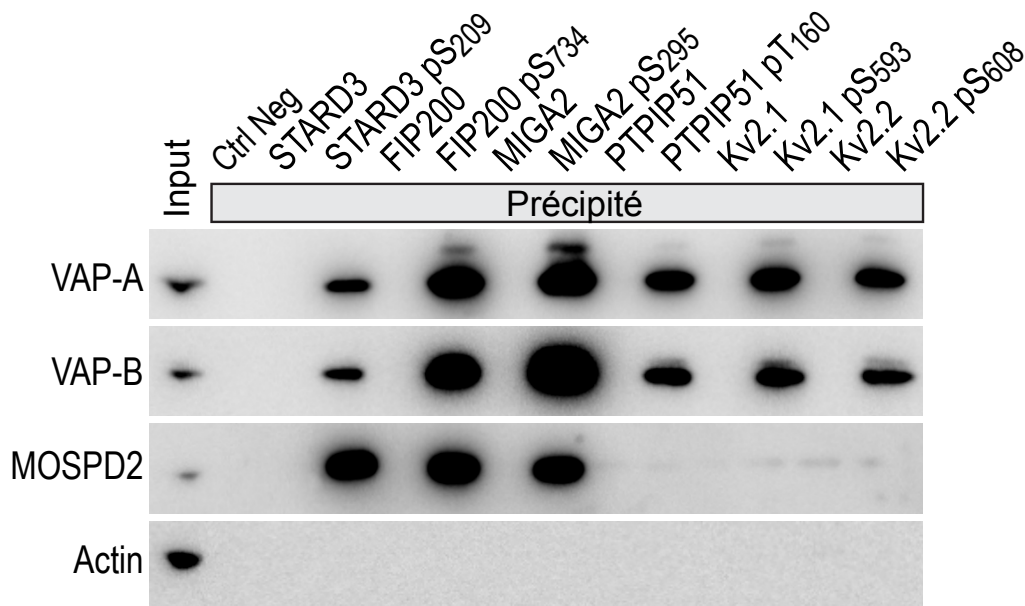
Grace à cette analyse, sur les 20 373 protéines humaines testées, nous avons identifié 3 442 protéines possédant un Phospho-FFAT potentiel ayant un score inférieur ou égal à 3. Nous avons choisi le score de 3 pour être le plus sélectif possible. Sur ces 3 442 protéines, très peu ont été définies dans la littérature comme interagissant avec les protéines VAPs et encore moins le fait que le motif Phospho-FFAT soit à l'origine de cette interaction. Pour réduire cette liste de Phospho-FFAT potentiels, nous avons utilisé les bases de données d'interactions de Biogrid et d'IntAct ainsi que nos propres analyses protéomiques. Sur les 488 protéines connues comme partenaires des VAPs et MOSPD2, 110 possèdent un Phospho-FFAT, 94 possèdent un FFAT-conventionnel et 42 de ces protéines possèdent deux motifs : un potentiel Phospho-FFAT et FFAT-conventionnel. Les séquences des Phospho-FFAT et des FFAT-conventionnels ont été condensées dans un weblogo (Fig R4D). La quantité de Phospho-FFAT identifiée avec cette analyse est similaire aux motifs Conventionnels. La plupart des motifs connus dans la littérature sont des FFAT conventionnels, ce qui laisse à



**A**

								1	2	3	4	5	6	7							
								E	F	F	D	A	x	E							
FFAT de STARD3																					
Non phosphorylé	Biotin-G	A	M	R	G	A	L	S	E	G	Q	F	Y	S	P	P	E	S	F	A	G
S209P	Biotin-G	A	M	R	G	A	L	S	E	G	Q	F	Y	pS	P	P	E	S	F	A	G
FFAT de FIP200																					
Non phosphorylé	Biotin-G	A	M	R	A	E	S	P	E	S	D	F	M	S	A	V	N	E	F	V	I
S734P	Biotin-G	A	M	R	A	E	S	P	E	S	D	F	M	pS	A	V	N	E	F	V	I
FFAT de MIGA2																					
Non phosphorylé	Biotin-G	A	M	R	S	L	T	S	E	D	S	F	F	S	A	T	E	L	F	E	S
S295P	Biotin-G	A	M	R	S	L	T	S	E	D	S	F	F	pS	A	T	E	L	F	E	S
FFAT de PTPIP51																					
Non phosphorylé	Biotin-G	A	M	R	S	T	G	S	S	S	V	Y	F	T	A	S	S	G	A	T	F
T160P	Biotin-G	A	M	R	S	T	G	S	S	S	V	Y	F	pT	A	S	S	G	A	T	F
FFAT de Kv2.1																					
Non phosphorylé	Biotin-G	A	M	R	S	M	S	S	I	D	S	F	I	S	C	A	T	D	F	P	E
S593P	Biotin-G	A	M	R	S	M	S	S	I	D	S	F	I	pS	C	A	T	D	F	P	E
FFAT de Kv2.2																					
Non phosphorylé	Biotin-G	A	M	R	S	T	S	S	I	D	S	F	T	S	C	A	T	D	F	T	E
S608P	Biotin-G	A	M	R	S	T	S	S	I	D	S	F	T	pS	C	A	T	D	F	T	E
Peptide controle	Biotin-G	A	M	R	G	A	D	W	P	M	E	M	R	G	Q	A	N	A	D	A	G

**B**



**Figure R5 : Les protéines possédant un Phospho-FFAT régulent leurs interactions via la phosphorylation**

A : Séquence des peptides biotinylés des motif Phospho-FFAT des protéines STARD3, FIP200, MIGA2, PTPIP51, KV2.1 et KV2.2 utilisés pour les expériences de peptide pull down. Le résidu en position 4 est sous forme phosphorylée ou non phosphorylée.

B : Western Blot de l'expérience de peptide pull down utilisant les peptides en R5A. L'input est un extrait de cellule HeLa WT. Des anticorps anti-VAP-A, anti-VAP-B, anti-MOSDP2 et anti-Actine permettent d'identifier quel peptide précipite chacune de ces protéines. L'actine est utilisée comme contrôle de charge. Les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2 sont précipitées seulement quand les peptides sont phosphorylés.

penser qu'un grand nombre de nouvelles protéines possédant un Phospho-FFAT reste à découvrir. De plus, ces protéines seraient régulées en fonction de leur état de phosphorylation.

## 2. MIGA2, PTPIP51, FIP200, Kv2.1 et Kv2.2 interagissent seulement lorsqu'ils sont phosphorylés

Afin de valider le fait que d'autres protéines puissent posséder un motif Phospho-FFAT régulé par phosphorylation, nous avons sélectionné des protéines présentes dans la liste obtenue par notre analyse *in silico* (Fig. R4E). Nous les avons choisies selon trois critères : connues dans la littérature comme une protéine interagissant avec VAPs ; que le motif FFAT qui lie cette protéine aux protéines VAPs soit connu et pour finir que ce motif possède un résidu phosphorylable en 4<sup>ème</sup> position. Avec ces critères de sélection, nous avons identifié 5 protéines. La protéine MIGA2 (Mitoguardin2) est une protéine présente à la membrane externe de la mitochondrie qui est impliquée dans la dynamique mitochondriale (Freyre et al., 2019). Les protéines Kv2.1 et Kv2.2 (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily B Member 1 et 2 (KCNB1 et KCNB2) sont des protéines membranaires impliquées dans le transport du potassium au niveau des neurones principalement (Johnson et al., 2018; Kirmiz et al., 2018; Lim et al., 2000). La protéine PTPIP51 (RMD3 Microtubule Dynamics Protein 3) forme des contacts entre la mitochondrie et le RE et est impliquée dans l'homéostasie calcique (De Vos et al., 2012; Stoica et al., 2014). Cette protéine possède deux FFAT un conventionnel et un Phospho-FFAT. La protéine FIP200 (RBCC1 RB1-Inducible Coiled-Coil Protein 1) est une protéine cytoplasmique impliquée dans la formation des autophagosomes (Hara et al., 2008; Zhao et al., 2018). Toutes ces protéines possèdent un motif FFAT avec une sérine ou une thréonine en 4<sup>ème</sup> position de leurs motifs.

Pour vérifier la capacité des motifs FFAT de ces protéines à interagir avec les protéines VAPs et MOSPD2, nous avons généré de nouveaux peptides biotinylés comme pour STARD3. Deux peptides ont été synthétisés pour chacune des protéines, l'un des peptides est phosphorylé au niveau du 4<sup>ème</sup> résidu du Phospho-FFAT potentiel, et l'autre est non phosphorylé (Fig. R5A). Afin de tester la capacité de ces peptides à interagir avec les protéines VAPs et MOSPD2, une expérience de peptide Pull down a été effectuée avec un extrait protéique de cellule HeLa. Les fractions d'éluion ont été analysées par Western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2 (Fig. R5B). Les peptides de STARD3 phosphorylé et non phosphorylé ont été utilisés en tant que contrôle de l'expérience. Comme attendu, le peptide phosphorylé de STARD3 interagit avec les protéines

VAPs et MOSPD2 alors que le peptide non phosphorylé n'en est pas capable. Pour ce qui est des Phospho-FFAT des protéines FIP200, MIGA2, PTPIP51, KV2.1 et KV2.2, ils ont tous précipité les protéines VAP-A et VAP-B lorsque phosphorylés. Les peptides non phosphorylés ne sont pas capables de précipiter les VAPs. La phosphorylation est donc indispensable pour l'interaction entre les Phospho-FFAT et les protéines VAP-A et VAP-B. En ce qui concerne MOSPD2, seulement FIP200 et MIGA2 précipitent la protéine MOSPD2 lorsque les peptides sont phosphorylés. Le domaine MSP de MOSPD2 ne possède que 30 % d'identité de séquence avec les protéines VAP-A et VAP-B. Cette différence pourrait influencer l'affinité du domaine MSP pour un motif FFAT spécifique. C'est sûrement pour cela que sur un extrait protéique complexe les peptides phosphorylés de PTPIP51, KV2.1 et KV2.2 n'ont pas précipité la protéine MOSPD2. Cette expérience montre que les protéines possédant un Phospho-FFAT peuvent réguler l'interaction qui existe avec les protéines VAPs et MOSPD2 en jouant sur la phosphorylation du motif. De plus, ces protéines étant pour la plupart ancrées au niveau d'organelle spécifique, mitochondrie, membrane plasmique et endosomes, l'interaction de ces protéines avec les protéines du réticulum endoplasmique VAP-A, VAP-B et MOSPD2 peut potentiellement former des SCM entre ces organites. Ces SCM peuvent se former et se défaire en fonction de la phosphorylation du motif.

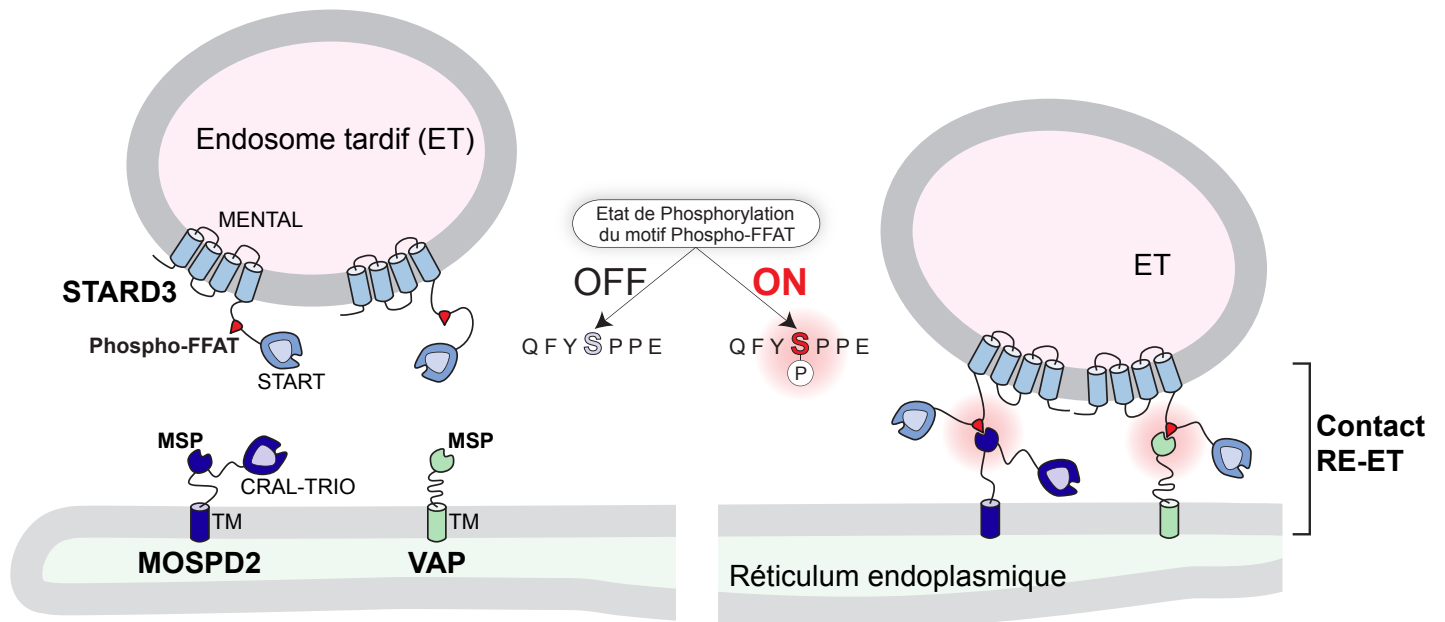
## Conclusion et Discussion

L'objectif de cette thèse était d'identifier un mécanisme de régulation de la formation de sites de contact membranaire impliquant la protéine STARD3 et les protéines VAP-A, VAP-B et MOSDP2 puis d'en étendre le concept à d'autres contacts. L'idée était que le motif Phospho-FFAT (Q<sup>1</sup>F<sup>2</sup>Y<sup>3</sup>S<sup>4</sup>P<sup>5</sup>P<sup>6</sup>E<sup>7</sup>) de la protéine STARD3 qui interagit avec ces trois protéines possède un résidu phosphorylable (sérine S) en 4<sup>ème</sup> position du motif, ce qui diffère des FFAT conventionnels qui possèdent un acide aminé acide (acide aspartique E ou acide glutamique D) à cette position. Les résidus phosphorylables possèdent deux états soit non phosphorylé avec une charge globalement neutre ou soit phosphorylé ce qui amène des charges négatives à ce résidu. L'hypothèse était que la phosphorylation de l'acide aminé en 4<sup>ème</sup> position du motif Phospho-FFAT peut réguler l'interaction du motif avec les protéines VAP-A, VAP-B et MOSDP2 et ainsi contrôler la formation de SCM.

Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord déterminé si le motif Phospho-FFAT de la protéine STARD3 était phosphorylé *in vivo*. Après avoir analysé la phosphorylation de la protéine par spectrométrie de masse, nous pouvons affirmer que la protéine est phosphorylée dans son motif Phospho-FFAT ainsi que les trois résidus phosphorylables après le motif.

Ensuite, nous nous demandions si la phosphorylation de la protéine STARD3 peut influencer l'interaction de celle-ci avec les protéines VAP-A, VAP-B et MOSDP2. En utilisant des peptides composés de la séquence du motif Phospho-FFAT de la protéine STARD3 sous sa forme non phosphorylée ou phosphorylée aux différents sites de phosphorylation possibles, nous avons identifié que l'interaction entre la protéine STARD3 et les protéines VAP-A, VAP-B et MOSDP2 était dépendante de la phosphorylation de la sérine en 4<sup>ème</sup> position du motif Phospho-FFAT de STARD3. En effet, lorsque la sérine est phosphorylée les peptides co-précipitent les trois protéines alors que lorsque la sérine est sous sa forme non phosphorylée l'interaction ne se produit pas. De plus, l'affinité de l'interaction est plus importante lorsque les sérines environnantes du motif sont phosphorylées que ce soit en amont ou en aval du motif. Ces expériences confirment que l'interaction qui existe entre le motif Phospho-FFAT et le domaine MSP est contrôlée par des interactions électrostatiques globales faisant intervenir les charges négatives qui composent la séquence. De plus, la phosphorylation au niveau du 4<sup>ème</sup> acide aminé du motif est obligatoire afin de permettre l'interaction protéique.

Pour finir, avec la caractérisation de notre modèle utilisant la protéine STARD3, nous avons voulu savoir si la phosphorylation de la protéine pouvait réguler la formation de SCM ER-endosomes. Pour cela, j'ai généré des protéines mimant un état non phosphorylé et un



**Figure C1 : Les sites de contact impliquant un Phospho-FFAT sont régulés par phosphorylation**

Représentation schématique de notre modèle de régulation de SCM par phosphorylation. La protéine STARD3 et les protéines VAPs et MOSPD2 sont ancrées à la membrane des endosomes tardifs et à la membrane du réticulum endoplasmique, respectivement. L'interaction entre ces protéines, via le motif Phospho-FFAT de la protéine STARD3 et le domaine MSP des protéines MOSPD2 et VAPs, permet le rapprochement des membranes et la formation de SCM entre ces deux organites. Le motif Phospho-FFAT de la protéine STARD3 possède deux états : non phosphorylé ou phosphorylé au niveau de la serine au centre du motif. Si le motif n'est pas phosphorylé alors l'interaction entre les protéines STARD3 et VAPs ou MOSPD2 est impossible. Par contre lorsque le motif est phosphorylé alors l'interaction entre les protéines STARD3 et VAPs ou MOSPD2 se réalise ce qui forme un contact entre le réticulum endoplasmique et les endosomes tardifs.

état phosphorylé de la protéine, puis nous avons surexprimé les protéines deux à deux afin de regarder par immunofluorescence le recrutement des protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2 induit par la protéine STARD3. Les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2 ne sont pas recrutées au niveau de la protéine STARD3 lorsque celle-ci est sous sa forme non phosphorylée alors que sous la forme qui mime la phosphorylation les protéines VAP-A et VAP-B co-localisent avec la protéine STARD3. Ceci nous indique que la phosphorylation de la protéine STARD3 est un moyen de contrôler la formation de SCM et par la même occasion d'inhiber la fonction de la protéine au niveau de ces contacts. En effet, des expériences fonctionnelles de la protéine STARD3 ont été effectuées et seule la protéine phosphorylée continue de transporter du cholestérol entre le RE et les endosomes (données non montrées).

Grâce à toutes ces expériences, un modèle de fonctionnement de la régulation de SCM impliquant la protéine STARD3 est proposé (Fig C1). La protéine STARD3, ancrée aux endosomes via son domaine MENTAL, est présente sous deux formes au sein de la cellule, une non-phosphorylée et une phosphorylée. Cette protéine peut transporter du cholestérol au sein de SCM entre le RE et les endosomes (Alpy et al., 2013; Di Mattia et al., 2018; Wilhelm et al., 2017). Dans certaines conditions physiologiques, la cellule accumule du cholestérol dans les endosomes via une ou des kinases qui phosphorylent la protéine STARD3. La protéine ainsi phosphorylée peut interagir avec les protéines du réticulum endoplasmique VAPs et MOSPD2. L'interaction entre ces protéines induit un rapprochement des membranes et la formation d'un SCM ER-endosomes. La protéine STARD3 au niveau de ces contacts transporte alors du cholestérol du RE aux endosomes. Dans une autre condition physiologique, des phosphatases pourraient être activées afin de déphosphoryler la protéine STARD3 et ainsi empêcher la formation de SCM et le transport de cholestérol.

Nous savons que la protéine STARD3 est une protéine surexprimée dans les cancers du sein HER2+ et que l'inhibition de la protéine diminue grandement la prolifération cellulaire (Alpy and Tomasetto, 2014; Kao and Pollack, 2006; Tomasetto et al., 1995). De plus, la surexpression de la protéine entraîne une accumulation de cholestérol au niveau des endosomes et une diminution au niveau de la membrane plasmique (Wilhelm et al., 2017). Cette modification de composition lipidique serait possiblement une des causes de la prolifération cellulaire des cancers du sein HER2+. En identifiant les kinases et phosphatases responsables de la phosphorylation et déphosphorylation du motif Phospho-FFAT de la protéine STARD3 nous pourrions inhiber la formation de SCM ER-endosome dans ces cellules cancéreuses et potentiellement réduire les échanges de lipide ainsi que la croissance cellulaire liée à l'activité de la protéine. Pour le moment les kinases et phosphatases agissant sur la protéine STARD3 n'ont pas encore été identifiées mais les kinases spécifiques de la protéine

STARD3 seraient de très bons candidats à étudier comme potentiel traitement additionnel aux inhibiteurs du récepteur HER2 pour les patientes atteintes de cancer du sein HER2+. En effet, des inhibiteurs de kinases empêcheraient la phosphorylation de la protéine STARD3 ce qui bloquerait l'activité de la protéine en empêchant la formation de SCM entre le RE et les endosomes ce qui équivaldrait à inhiber la protéine STARD3 et entrainerait probablement une diminution de la croissance cellulaire. Pour tester cette hypothèse, il faudrait identifier les kinases et phosphatases responsables de la phosphorylation et déphosphorylation du motif Phospho-FFAT de la protéine STARD3. Après les avoir identifiées, des tests sur lignées cancéreuses HER2+ seraient à réaliser. Pour commencer on pourrait surexprimer et inhiber les kinases afin de phosphoryler ou d'empêcher la phosphorylation de la protéine STARD3 et montrer son impact sur la croissance, migration et invasion cellulaire. Dans un deuxième temps, une recherche d'un inhibiteur de la kinase pouvant spécifiquement bloquer l'activité de la phosphorylation de la protéine STARD3 serait à entreprendre puis ensuite de tester son action *in vitro* et *in vivo*.

La protéine STARD3 n'étant pas la seule à posséder un motif Phospho-FFAT, d'autres SCM peuvent potentiellement être régulés par ce même système. En effet, nous avons montré que 6 protéines interagissent avec les protéines VAPs via un motif Phospho-FFAT. D'après les études d'interaction effectuées avec les protéines VAPs et les analyses *in silico* de l'équipe du Docteur Levine, sur les 500 partenaires des protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2, au moins une centaine de protéines devraient interagir avec les protéines VAPs via un motif FFAT (Alli-Balogun and Levine, 2019; Mikitova and Levine, 2012; Murphy and Levine, 2016; Slee and Levine, 2019). Ces 20 dernières années, une trentaine de protéines possédant un motif FFAT conventionnel a été découverte. De plus, lors des analyses *in silico* précédentes, les motifs Phospho-FFAT n'ont pas tous été identifiés du fait de la présence d'une serine ou thréonine en position 4. Au vue des connaissances des protéines à motif Phospho-FFAT qui interagissent avec les protéines VAPs et MOSPD2, nous avons voulu identifier de nouvelles protéines possédant un motif Phospho-FFAT via une nouvelle analyse *in silico*.

Pour cela, un nouvel algorithme a été créé afin d'identifier de façon différentiel les motifs FFAT conventionnels et les Phospho-FFAT du protéome humain. En effet, deux analyses ont été faites sur les 20 373 protéines humaines identifiées dans la base de données SwissProt avec pour seule différence un acide aminé acide ou phosphorylable en 4<sup>ème</sup> position du motif. Nous avons identifié 3 442 protéines possédant un Phospho-FFAT potentiel et 2927 protéines possédant un FFAT conventionnel potentiel. Pour réduire ce nombre, nous avons choisi de nous intéresser aux 488 protéines identifiées, via les bases de donnée Biogrid, IntAct et analyse protéomique, comme partenaire des protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2 (Di

Mattia et al., 2018; Huttlin et al., 2015, 2017). Sur ces protéines, 110 possèdent un Phospho-FFAT, 94 possèdent un FFAT-conventionnel et 42 de ces protéines possèdent les deux motifs. Sur les 110 protéines identifiées avec un Phospho-FFAT, nous avons retrouvé les 6 protéines déjà connues pour posséder un motif Phospho-FFAT fonctionnel ce qui valide notre analyse. Cette nouvelle analyse montre que dans le protéome humain et parmi les partenaires identifiés de VAPs et MOSPD2, la proportion de motif Phospho-FFAT et FFAT conventionnel serait similaire. Pour confirmer ce résultat, il faudrait identifier avec certitude que les motifs sont bien à l'origine de l'interaction. Ce résultat est assez surprenant car, durant ces 20 dernières années, 3 fois plus de protéines possédant un motif FFAT conventionnel que de protéines possédant un motif Phospho-FFAT ont été identifiées alors que l'analyse montre que la quantité de Phospho-FFAT serait similaire au motif FFAT conventionnel. Cela laisse à penser que de nombreuses protéines possédant un motif Phospho-FFAT n'ont pas encore été étudiées ainsi que les SCM qui y sont liés et leurs fonctions au niveau de ces sites. De manière intéressante, l'étude *in silico* révèle aussi que 42 protéines possèdent deux motifs potentiels, un Phospho-FFAT et un FFAT conventionnel. Si les deux FFAT peuvent réellement interagir avec les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2, on pourrait supposer que le FFAT conventionnel étant toujours actif formerait le contact et le Phospho-FFAT supplémentaire pourrait permettre une régulation plus fine en augmentant l'interaction avec les protéines VAPs et MOSPD2 afin de renforcer l'interaction en fonction des conditions physiologiques.

Afin d'étendre le modèle d'étude réalisé sur la protéine STARD3, nous avons choisi de confirmer le résultat sur 5 autres protéines possédant un Phospho-FFAT fonctionnel. De plus, ces protéines sont présentes à la surface de plusieurs organites de la membrane plasmique (Kv2.1, Kv2.2), de la mitochondrie (MIGA2, PTPIP51), de l'autophagosome (FIP200)(De Vos et al., 2012; Freyre et al., 2019; Johnson et al., 2018; Kirmiz et al., 2018; Zhao et al., 2018). Toutes ces protéines forment des SCM avec le RE et ces différents SCM sont impliqués dans le transport d'ions, de lipides et dans l'autophagie. Une des questions est de savoir si ces protéines possèdent le même mécanisme de régulation que la protéine STARD3. Est-ce que la phosphorylation du 4<sup>ème</sup> résidu de leur motif Phospho-FFAT permet de réguler l'interaction avec les protéines VAPs et MOSPD2 et ainsi de contrôler la formation de SCM et les fonctions associées aux protéines ?

Pour cela comme avec la protéine STARD3, nous avons étudié la capacité des motifs MIGA2, PTPIP51, FIP200, Kv2.1 et Kv2.2 à interagir avec les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2. Des peptides comprenant les différents motifs Phospho-FFAT phosphorylé ou non au niveau du 4<sup>ème</sup> acide aminé des protéines MIGA2, PTPIP51, FIP200, Kv2.1 et Kv2.2 ont été générés. Nous avons identifié que seuls les peptides phosphorylés pouvaient interagir



avec les protéines VAP-A et VAP-B et que les peptides non phosphorylés n'interagissaient pas avec les protéines VAP-A, VAP-B et MOSPD2. De façon surprenante, La protéine MOSPD2 ne se comporte pas exactement de la même manière que les protéines VAPs. Même phosphorylés, les peptides des protéines PTPIP51, Kv2.1 et Kv2.2 n'interagissent pas avec MOSPD2. Les domaines MSP des protéines VAP-A et VAP-B possèdent une similarité de séquence d'environ 90% alors qu'avec MOSPD2 cette similarité est d'environ 50%. De plus, cette expérience a été réalisée au sein d'un milieu complexe en utilisant des extraits protéiques de cellules HeLa comprenant de nombreuses protéines dans des proportions très variables. Nous pouvons supposer que ces différences entre les domaines MSP et la compétition qui existe au sein de l'extrait protéique sont à l'origine des affinités différentes du domaine MSP des protéines VAPs et du domaine MSP de la protéine MOSPD2. Les protéines VAPs et la protéine MOSPD2 formeraient des SCM différents avec des partenaires privilégiés au sein de la cellule. Les trois protéines qui n'ont pas été co-précipitées sont impliquées dans des transports d'ions. La protéine MOSPD2 possédant un domaine CRAL-TRIO pouvant surement interagir avec des lipides aurait peut-être moins d'affinité pour ces protéines et plus d'affinité pour des protéines à motif FFAT impliquées dans le transport de lipides comme la protéine STARD3. Grace aux expériences avec ces différents peptides, nous pouvons affirmer que les motifs Phospho-FFAT des protéines STARD3, MIGA2, PTPIP51, FIP200, Kv2.1 et Kv2.2 interagissant avec VAPs et MOSPD2 peuvent être régulés par la phosphorylation du 4<sup>ème</sup> acide aminé.

Cette nouvelle découverte questionne sur l'utilité physiologique d'un système de régulation de la formation des SCM par la phosphorylation. En effet, nous savons que les SCM sont dynamiques (Valm et al., 2017). Sur les 6 protéines possédant un motif Phospho-FFAT, 5 d'entre elles sont des protéines ancrées dans la membrane d'un organite via un domaine transmembranaire. Les protéines du RE VAP-A, VAP-B et MOSPD2 sont elles aussi fixées dans une membrane, celle du RE. L'interaction entre deux protéines membranaires bloquerait le SCM et empêcherait une dynamique de contact. Nous pouvons supposer que le seul moyen de réguler ces interactions et la formation de SCM était le site de liaison entre le domaine MSP et le motif FFAT et plus spécifiquement la phosphorylation du motif Phospho-FFAT. De plus, la possibilité que la protéine possède d'autres interactants et d'autres fonctions lorsqu'elle n'est pas sous la forme de SCM avec le RE est envisageable. En effet, la protéine MIGA2 possède un domaine de liaison aux gouttelettes lipidiques présentes dans la cellule qui lui permet de former des contacts entre la mitochondrie et les gouttelettes lipidiques en absence de RE (Freyre et al., 2019). Ainsi la phosphorylation permettrait de réguler la balance entre ces 2 contacts : si le motif Phospho-FFAT est phosphorylé, il y a formation de contact avec le RE et si le motif n'est pas phosphorylé, il y a formation de SCM avec les gouttelettes lipidiques.

Cette thèse a permis d'identifier un nouveau mode de régulation des SCM. En effet, les protéines qui possèdent un motif Phospho-FFAT et qui forment des SCM peuvent être régulées par la phosphorylation du 4<sup>ème</sup> résidu de leur motif. La phosphorylation permet l'interaction avec les protéines du réticulum endoplasmique VAP-A, VAP-B et MOSPD2 ce qui va rapprocher les membranes des organites et créer un SCM. Au sein de ces contacts membranaires, les protéines qui les composent vont pouvoir transporter des molécules entre les organites. De nombreuses protéines possédant un motif Phospho-FFAT restent à être découvertes et étudiées et la surexpression ou l'inhibition de ces protéines de transport pourraient être liées à des pathologies. Grâce à ce travail, nous comprenons mieux comment certains SCM sont régulés et les possibilités d'action pour les contrôler. Le contrôle de certains SCM ouvre de nombreuses possibilités de recherche sur de potentiels nouveaux traitements ciblés qui induiraient ou inhiberaient des sites de contact membranaire pour favoriser la prise en charge de patients.

## Bibliographie

1. Abdulkareem, I., and Zurmi, I. (2012). Review of hormonal treatment of breast cancer. *Niger J Clin Pract* 15, 9.
2. 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. *Journal of Cell Biology* 219, e201911122.
3. Alli-Balogun, G.O., and Levine, T.P. (2019). Regulation of targeting determinants in interorganelle communication. *Current Opinion in Cell Biology* 57, 106–114.
4. Alpy, F., and Tomasetto, C. (2005). Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *Journal of Cell Science* 118, 2791–2801.
5. Alpy, F., and Tomasetto, C.L. (2014). STARD3: A Lipid Transfer Protein in Breast Cancer and Cholesterol Trafficking. In *Cholesterol Transporters of the START Domain Protein Family in Health and Disease*, (Springer, New York, NY), pp. 119–138.
6. Alpy, F., Rousseau, A., Schwab, Y., Legueux, F., Stoll, I., Wendling, C., Spiegelhalter, C., Kessler, P., Mathelin, C., Rio, M.-C., et al. (2013). STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *Journal of Cell Science* 126, 5500–5512.
7. Amarilio, R., Ramachandran, S., Sabanay, H., and Lev, S. (2005). Differential Regulation of Endoplasmic Reticulum Structure through VAP-Nir Protein Interaction. *J. Biol. Chem.* 280, 5934–5944.
8. Balla, T., Kim, Y.J., Alvarez-Prats, A., and Pemberton, J. (2019). Lipid Dynamics at Contact Sites Between the Endoplasmic Reticulum and Other Organelles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 35, 85–109.
9. Bandyopadhyay, D., Kusari, A., Kenner, K.A., Liu, F., Chernoff, J., Gustafson, T.A., and Kusari, J. (1997). Protein-Tyrosine Phosphatase 1B Complexes with the Insulin Receptor *in Vivo* and Is Tyrosine-phosphorylated in the Presence of Insulin. *J. Biol. Chem.* 272, 1639–1645.
10. Bernhard, W., and Rouiller, C. (1956). Close topographical relationship between mitochondria and ergastoplasm of liver cells in a definite phase of cellular activity. *The Journal of Cell Biology* 2, 73–78.
11. Bonifacino, J.S. (2014). Vesicular transport earns a Nobel. *Trends in Cell Biology* 24, 3–5.
12. de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605–610.
13. Burgoyne, T., Patel, S., and Eden, E.R. (2015). Calcium signaling at ER membrane contact sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853, 2012–2017.
14. Chiapparino, A., Maeda, K., Turei, D., Saez-Rodriguez, J., and Gavin, A.-C. (2016). The orchestra of lipid-transfer proteins at the crossroads between metabolism and signaling. *Progress in Lipid Research* 61, 30–39.
15. Csordás, G., Weaver, D., and Hajnóczky, G. (2018). Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. *Trends in Cell Biology* 28, 523–540.
16. 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. *Human Molecular Genetics* 21,

1299–1311.

17. 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 Reports* e45453.
18. Di Mattia, T., Tomasetto, C., and Alpy, F. (2020). Faraway, so close! Functions of Endoplasmic reticulum–Endosome contacts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1865, 158490.
19. Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651–657.
20. 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.
21. Eden, E.R., White, I.J., Tsapara, A., and Futter, C.E. (2010). Membrane contacts between endosomes and ER provide sites for PTP1B–epidermal growth factor receptor interaction. *Nature Cell Biology* 12, 267–273.
22. Eisenberg-Bord, M., Shai, N., Schuldiner, M., and Bohnert, M. (2016). A Tether Is a Tether: Tethering at Membrane Contact Sites. *Developmental Cell* 39, 395–409.
23. Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., and Subramaniam, S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811, 637–647.
24. Farhan, H., and Rabouille, C. (2011). Signalling to and from the secretory pathway. *Journal of Cell Science* 124, 669–669.
25. Feng, Y., He, D., Yao, Z., and Klionsky, D.J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 24, 24–41.
26. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., and Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 144, 1941–1953.
27. Filadi, R., Pendin, D., and Pizzo, P. (2018). Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death Dis* 9, 330.
28. Fletcher, E.V., Simon, C.M., Pagiazitis, J.G., Chalif, J.I., Vukojicic, A., Drobac, E., Wang, X., and Mentis, G.Z. (2017). Reduced sensory synaptic excitation impairs motor neuron function via Kv2.1 in spinal muscular atrophy. *Nat Neurosci* 20, 905–916.
29. 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. *Molecular Cell* 76, 811–825.e14.
30. Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science* 334, 358–362.
31. 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.
32. 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.
33. Gautier Defosse, Sandra Le Guyader-Peyrou Zoé Uhry, Pascale Grosclaude, Marc Colonna, Emmanuelle Dantony Patricia Delafosse, Florence Molinié Anne-Sophie

- Woronoff Anne-Marie Bouvier Nadine Bossard, Laurent Remontet, and Alain Monnereau (2019). Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 – Tumeurs solides. Juin 2019 *1*, 372.
34. Giordano, F., Saheki, Y., Idevall-Hagren, O., Colombo, S.F., Pirruccello, M., Milosevic, I., Gracheva, E.O., Bagriantsev, S.N., Borgese, N., and De Camilli, P. (2013). PI(4,5)P<sub>2</sub>-Dependent and Ca<sup>2+</sup>-Regulated ER-PM Interactions Mediated by the Extended Synaptotagmins. *Cell* *153*, 1494–1509.
  35. Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thurlimann, B., Senn, H.-J., and Panel members (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology* *22*, 1736–1747.
  36. Gomez-Suaga, P., Paillusson, S., Stoica, R., Noble, W., Hanger, D.P., and Miller, C.C.J. (2017). The ER-Mitochondria Tethering Complex VAPB-PTPIP51 Regulates Autophagy. *Current Biology* *27*, 371–385.
  37. Gómez-Suaga, P., Pérez-Nievas, B.G., Glennon, E.B., Lau, D.H.W., Paillusson, S., Mórotz, G.M., Cali, T., Pizzo, P., Noble, W., and Miller, C.C.J. (2019). The VAPB-PTPIP51 endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins are present in neuronal synapses and regulate synaptic activity. *Acta Neuropathol Commun* *7*, 35.
  38. 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.
  39. Hantan, D., Yamamoto, Y., and Sakisaka, T. VAP-B Binds to Rab3GAP1 at the ER: Its Implication in Nuclear Envelope Formation through the ER-Golgi Intermediate Compartment. *BINDING PROTEIN* *9*.
  40. Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J.-L., and Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* *181*, 497–510.
  41. Harayama, T., and Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* *19*, 281–296.
  42. Heering, J., Weis, N., Holeiter, M., Neugart, F., Staebler, A., Fehm, T.N., Bischoff, A., Schiller, J., Duss, S., Schmid, S., et al. (2012). Loss of the Ceramide Transfer Protein Augments EGF Receptor Signaling in Breast Cancer. *Cancer Research* *72*, 2855–2866.
  43. 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.
  44. Helle, S.C.J., Feng, Q., Aebersold, M.J., Hirt, L., Grüter, R.R., Vahid, A., Sirianni, A., Mostowy, S., Snedeker, J.G., Šarić, A., et al. (2017). Mechanical force induces mitochondrial fission. *ELife* *6*, e30292.
  45. Holthuis, J.C.M., and Levine, T.P. (2005). Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 209–220.
  46. Holthuis, J.C.M., and Menon, A.K. (2014). Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* *510*, 48–57.
  47. 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. *Journal of Cell Biology* *216*, 367–377.

48. Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J* 30, 3481–3500.
49. 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.
50. 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.
51. INCa (2016). Les traitements des cancers du sein Volume 3, ollection Guides patients Cancer info, INCa.
52. Islam, Md.S. (2020). Calcium Signaling: From Basic to Bedside. In Calcium Signaling, Md.S. Islam, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–6.
53. Jain, A., and Holthuis, J.C.M. (2017). Membrane contact sites, ancient and central hubs of cellular lipid logistics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864, 1450–1458.
54. 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 USA* 115, E7331–E7340.
55. 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.
56. Julien, S.G., Dubé, N., Read, M., Penney, J., Paquet, M., Han, Y., Kennedy, B.P., Muller, W.J., and Tremblay, M.L. (2007a). Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat Genet* 39, 338–346.
57. Julien, S.G., Dubé, N., Read, M., Penney, J., Paquet, M., Han, Y., Kennedy, B.P., Muller, W.J., and Tremblay, M.L. (2007b). Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat Genet* 39, 338–346.
58. Kabashi, E., El Oussini, H., Bercier, V., Gros-Louis, F., Valdmanis, 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. *Human Molecular Genetics* 22, 2350–2360.
59. 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.
60. Kao, J., and Pollack, J.R. (2006). RNA interference-based functional dissection of the 17q12 amplicon in breast cancer reveals contribution of coamplified genes. *Genes, Chromosomes and Cancer* 45, 761–769.
61. Kawano, M., Kumagai, K., Nishijima, M., and Hanada, K. (2006). Efficient Trafficking of Ceramide from the Endoplasmic Reticulum to the Golgi Apparatus Requires a VAMP-associated Protein-interacting FFAT Motif of CERT. *Journal of Biological Chemistry* 281, 30279–30288.
62. Keinan, O., Kedan, A., Gavert, N., Selitrennik, M., Kim, S., Karn, T., Becker, S., and Lev, S. (2014). The lipid-transfer protein Nir2 enhances epithelial-mesenchymal transition and facilitates breast cancer metastasis. *Journal of Cell Science* 127, 4740–4749.
63. Kentala, H., Pfisterer, S.G., Olkkonen, V.M., and Weber-Boyvat, M. (2015). Sterol liganding of OSBP-related proteins (ORPs) regulates the subcellular distribution of

- ORP–VAPA complexes and their impacts on organelle structure. *Steroids* 99, 248–258.
64. Kim, Y.J., Guzman-Hernandez, M.-L., Wisniewski, E., and Balla, T. (2015). Phosphatidylinositol-Phosphatidic Acid Exchange by Nir2 at ER-PM Contact Sites Maintains Phosphoinositide Signaling Competence. *Developmental Cell* 33, 549–561.
  65. 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.
  66. 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* 593, 2366–2377.
  67. 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.
  68. Lavaud, P., and Andre, F. (2014). Strategies to overcome trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancers: focus on new data from clinical trials. *BMC Med* 12, 132.
  69. Lee, A.J.X., Roylance, R., Sander, J., Gorman, P., Endesfelder, D., Kschischo, M., Jones, N.P., East, P., Nicke, B., Spassieva, S., et al. (2012). CERT depletion predicts chemotherapy benefit and mediates cytotoxic and polyploid-specific cancer cell death through autophagy induction. *J. Pathol.* 226, 482–494.
  70. Lehto, M., and Olkkonen, V.M. (2003). The OSBP-related proteins: a novel protein family involved in vesicle transport, cellular lipid metabolism, and cell signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1631, 1–11.
  71. Levine, T. (2004). Short-range intracellular trafficking of small molecules across endoplasmic reticulum junctions. *Trends in Cell Biology* 14, 483–490.
  72. Levine, T., and Loewen, C. (2006). Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 371–378.
  73. Liao, S., Li, J., Yu, L., and Sun, S. (2017). Protein tyrosine phosphatase 1B expression contributes to the development of breast cancer. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 18, 334–342.
  74. Liesa, M., Palacín, M., and Zorzano, A. (2009). Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease. *Physiological Reviews* 89, 799–845.
  75. Lim, S.T., Antonucci, D.E., Scannevin, R.H., and Trimmer, J.S. (2000). A Novel Targeting Signal for Proximal Clustering of the Kv2.1 K<sup>+</sup> Channel in Hippocampal Neurons. *Neuron* 25, 385–397.
  76. Lodish, U. Harvey. (2016). *Molecular Cell Biology*. (W.H. Freeman).
  77. 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.
  78. Losón, O.C., Song, Z., Chen, H., and Chan, D.C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *MBoC* 24, 659–667.
  79. Maxfield, F.R., and Wüstner, D. (2002). Intracellular cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* 110, 891–898.
  80. van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112–124.
  81. 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.
82. 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, 30455–30469.
  83. Misonou, H., Mohapatra, D.P., and Trimmer, J.S. (2005). Kv2.1: A Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel Critical to Dynamic Control of Neuronal Excitability. *NeuroToxicology* 26, 743–752.
  84. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069–1075.
  85. Moog-Lutz, C., Tomasetto, C., Régnier, C.H., Wendling, C., Lutz, Y., Muller, D., Chenard, M.-P., Basset, P., and Rio, M.-C. (1997). MLN64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) and is over-expressed in human breast carcinomas. *Int. J. Cancer* 71, 183–191.
  86. Murphy, S.E., and Levine, T.P. (2016). VAP, a Versatile Access Point for the Endoplasmic Reticulum: Review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861, 952–961.
  87. Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., Varanita, T., Grespi, F., Lakshminarayanan, S., Serafini, A., Semenzato, M., Herkenne, S., Hernández-Alvarez, M.I., et al. (2016). Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum–mitochondria tether. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, 11249–11254.
  88. Nascimbeni, A.C., Giordano, F., Dupont, N., Grasso, D., Vaccaro, M.I., Codogno, P., and Morel, E. (2017). ER–plasma membrane contact sites contribute to autophagosome biogenesis by regulation of local PI3P synthesis. *EMBO J* 36, 2018–2033.
  89. Okegawa, Y., and Motohashi, K. (2015). Evaluation of seamless ligation cloning extract preparation methods from an Escherichia coli laboratory strain. *Analytical Biochemistry* 486, 51–53.
  90. 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.
  91. 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, 371.
  92. Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., Rijn, M. van de, Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747.
  93. Petersen, O.H., Courjaret, R., and Machaca, K. (2017). Ca<sup>2+</sup> tunnelling through the ER lumen as a mechanism for delivering Ca<sup>2+</sup> entering via store-operated Ca<sup>2+</sup> channels to specific target sites: Ca<sup>2+</sup> tunnelling. *J Physiol* 595, 2999–3014.
  94. Pfanner, N., Warscheid, B., and Wiedemann, N. (2019). Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 267–284.
  95. 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.
  96. Prinz, W.A., Toulmay, A., and Balla, T. (2020). The functional universe of membrane contact sites. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 7–24.
  97. Raiborg, C., Wenzel, E.M., and Stenmark, H. (2015). ER-endosome contact sites: molecular compositions and functions. *The EMBO Journal* 34, 1848–1858.
  98. Rowland, A.A., Chitwood, P.J., Phillips, M.J., and Voeltz, G.K. (2014). ER contact sites define the position and timing of endosome fission. *Cell* 159, 1027–1041.



99. Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 623–635.
100. Schwarz, D.S., and Blower, M.D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 79–94.
101. 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*, 1287.
102. Segovia-Mendoza, M., González-González, M.E., Barrera, D., and Díaz, L. Efficacy and mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, lapatinib and neratinib in the treatment of HER2-positive breast cancer: preclinical and clinical evidence. *31*.
103. Shannon, K.M., and Chittenden, A. (2012). Genetic Testing by Cancer Site: Breast. *The Cancer Journal* *18*.
104. Slee, J.A., and Levine, T.P. (2019). Systematic Prediction of FFAT Motifs Across Eukaryote Proteomes Identifies Nucleolar and Eisosome Proteins With the Predicted Capacity to Form Bridges to the Endoplasmic Reticulum. *Contact* *2*, 251525641988313.
105. Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.-L., and van der Blik, A.M. (2001). Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *MBoC* *12*, 2245–2256.
106. Soysal, S., Obermann, E.C., Gao, F., Oertli, D., Gillanders, W.E., Viehl, C.T., and Muenst, S. (2013). PTP1B expression is an independent positive prognostic factor in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* *137*, 637–644.
107. Stefan, C.J. (2020). Endoplasmic reticulum–plasma membrane contacts: Principals of phosphoinositide and calcium signaling. *Current Opinion in Cell Biology* *63*, 125–134.
108. 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*, 3996.
109. Stuible, M., and Tremblay, M.L. (2010). In control at the ER: PTP1B and the down-regulation of RTKs by dephosphorylation and endocytosis. *Trends in Cell Biology* *20*, 672–679.
110. Taus, T., Köcher, T., Pichler, P., Paschke, C., Schmidt, A., Henrich, C., and Mechtler, K. (2011). Universal and Confident Phosphorylation Site Localization Using phosphoRS. *J. Proteome Res.* *10*, 5354–5362.
111. Thiam, A.R., Farese Jr, R.V., and Walther, T.C. (2013). The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* *14*, 775–786.
112. Tomasetto, C., Régnier, C., Moog-Lutz, C., Mattei, M.G., Chenard, M.P., Lidereau, R., Basset, P., and Rio, M.C. (1995). Identification of Four Novel Human Genes Amplified and Overexpressed in Breast Carcinoma and Localized to the q11-q21.3 Region of Chromosome 17. *Genomics* *28*, 367–376.
113. Turco, E., Witt, M., Abert, C., Bock-Bierbaum, T., Su, M.-Y., Trapannone, R., Sztacho, M., Danieli, A., Shi, X., Zaffagnini, G., et al. (2019). FIP200 Claw Domain Binding to p62 Promotes Autophagosome Formation at Ubiquitin Condensates. *Molecular Cell* *74*, 330-346.e11.
114. 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.
115. Vance, J.E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 265, 7248–7256.
  116. Vartak, R., Porras, C.A.-M., and Bai, Y. (2013). Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein Cell* 4, 582–590.
  117. 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. *Journal of Cell Biology* 218, 1055–1065.
  118. Venditti, R., Masone, M.C., and De Matteis, M.A. (2020). ER-Golgi membrane contact sites. *Biochemical Society Transactions* 48, 187–197.
  119. Vinatzer, U., Dampier, B., Streubel, B., Pacher, M., Seewald, M., Stratowa, C., Kaserer, K., and Schreiber, M. (2005). Expression of HER2 and the Coamplified Genes GRB7 and MLN64 in Human Breast Cancer: Quantitative Real-time Reverse Transcription-PCR as a Diagnostic Alternative to Immunohistochemistry and Fluorescence In situ Hybridization. *Clinical Cancer Research* 11, 8348–8357.
  120. Weiss, J.M. (1953). The ergastoplasm: its fine structure and relation to protein synthesis as studied with the electron microscope in the pancreas of the Swiss albino mouse. *Journal of Experimental Medicine* 98, 607–618.
  121. Wilhelm, L.P., Wendling, C., Védie, B., Kobayashi, T., Chenard, M., Tomasetto, C., Drin, G., and Alpy, F. (2017). STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *The EMBO Journal* 36, 1412–1433.
  122. Wu, H., Carvalho, P., and Voeltz, G.K. (2018). Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *Science* 361, eaan5835.
  123. Wu, M.M., Buchanan, J., Luik, R.M., and Lewis, R.S. (2006). Ca<sup>2+</sup> store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *The Journal of Cell Biology* 174, 803–813.
  124. Wulff, H., Castle, N.A., and Pardo, L.A. (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 8, 982–1001.
  125. Xu, Q., Wu, N., Li, X., Guo, C., Li, C., Jiang, B., Wang, H., and Shi, D. (2019). Inhibition of PTP1B blocks pancreatic cancer progression by targeting the PKM2/AMPK/mTOC1 pathway. *Cell Death Dis* 10, 874.
  126. Yeshaw, W.M., van der Zwaag, M., Pinto, F., Lahaye, L.L., Faber, A.I., Gómez-Sánchez, R., Dolga, A.M., Poland, C., Monaco, A.P., van IJzendoorn, S.C., et al. (2019). Human VPS13A is associated with multiple organelles and influences mitochondrial morphology and lipid droplet motility. *ELife* 8, e43561.
  127. Yim, W.W.-Y., and Mizushima, N. (2020). Lysosome biology in autophagy. *Cell Discov* 6, 6.
  128. Yu, M., Liu, Z., Liu, Y., Zhou, X., Sun, F., Liu, Y., Li, L., Hua, S., Zhao, Y., Gao, H., et al. (2019). PTP 1B markedly promotes breast cancer progression and is regulated by miR-193a-3p. *FEBS J* 286, 1136–1153.
  129. Zhao, Y.G., Liu, N., Miao, G., Chen, Y., Zhao, H., and Zhang, H. (2018). The ER Contact Proteins VAPA/B Interact with Multiple Autophagy Proteins to Modulate Autophagosome Biogenesis. *Current Biology* 28, 1234-1245.e4.

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 29/09/2020

<p><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par : Arthur MARTINET</p> <p><u>Sujet</u> : Caractérisation d'un nouveau mécanisme permettant la régulation des sites de contact membranaire</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : M. Bertrand RIHN, PR Directeur : M. Fabien ALPY, CR INSERM Co-directeur : M. Bertrand RIHN, PR Juges : M. Jean-Louis MERLIN, PR-PH M. Alexandre HARLE, MCU-PH Mme Valérie LAHET, PH</p>	<p>Vu, à Nancy, le 31/09/2020</p> <p>Le Président du Jury                      Directeur de Thèse Co-directeur de Thèse</p> <p>M. Bertrand RIHN                      M. Fabien ALPY</p> <p> <b>Professeur B. RIHN</b> Université de Lorraine</p> <p></p>
<p>Vu et approuvé, Nancy, le 31.08.2020</p> <p>Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p> <b>Pr. Raphaël DUVAL</b></p>	<p>Vu, Nancy, le 19.09.2020</p> <p>Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p> <b>Pierre MUTZENHARDT</b></p> <p>N° d'enregistrement : 11369 C</p>

N° d'identification :

**TITRE**

**CARACTERISATION D'UN NOUVEAU MECANISME PERMETTANT LA REGULATION DES SITES DE CONTACT MEMBRANAIRE**

Thèse soutenue le 29 septembre 2020

Par Arthur MARTINET

**RESUME :**

Les cellules eucaryotes sont compartimentées en organites qui permettent une division du travail. Les organites ne sont pas des unités indépendantes : ils requièrent des échanges pour remplir leur fonction. De récentes observations de biologie cellulaire ont révélé que les organites sont en contact physique les uns avec les autres au sein de structures nommées sites de contact membranaire, où les membranes d'organites se rapprochent étroitement. Les sites de contact membranaires, qui sont des structures dynamiques s'assemblant et se défaisant au cours du temps, permettent des échanges de molécules et d'informations entre les compartiments cellulaires. D'un point de vue moléculaire, les sites de contact sont formés par des complexes protéiques, dont beaucoup ont été identifiés récemment. Parmi ces nouvelles protéines, plusieurs sont impliquées dans des pathologies néoplasiques. À ce jour, les mécanismes permettant la dynamique des contacts restent très peu connus. Le projet est de comprendre comment sont régulées les interactions protéiques formant les contacts entre organites. En étudiant un complexe protéique, fabriqué par les protéines STARD3 et VAP, nous avons montré que la phosphorylation permet de réguler la formation des contacts entre l'endosome et le réticulum endoplasmique, et leur fonction de transfert de stérols. Cette étude révèle que la phosphorylation agit comme un interrupteur général pour les contacts inter-organites.

**MOTS CLES :**

Biologie cellulaire, organites, protéines, sites de contact membranaire, cancer

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Fabien ALPY	Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire INSERM U1258/CNRS UMR7104/Université de Strasbourg 1 rue Laurent Fries, 67400 Illkirch, FRANCE	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <input type="checkbox"/>

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales  
3 – Médicament  
⑤ - Biologie

2 – Hygiène/Environnement  
4 – Alimentation – Nutrition  
6 – Pratique professionnelle