



HAL
open science

Mécanisme moléculaire de l'addiction des cancers HER2 positifs pour le transporteur de cholestérol STARD3

Laëtitia Voilquin

► **To cite this version:**

Laëtitia Voilquin. Mécanisme moléculaire de l'addiction des cancers HER2 positifs pour le transporteur de cholestérol STARD3. Cancer. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ021 . tel-04213542

HAL Id: tel-04213542

<https://theses.hal.science/tel-04213542>

Submitted on 21 Sep 2023

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

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



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Ecole Doctorale Des Sciences de la Vie et de la Santé (ED414)

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

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

THÈSE

Présentée par **Laëtitia Voilquin**

Soutenue le 3 juillet 2020

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

Discipline : **Sciences de la Vie et de la Santé**
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Mécanisme moléculaire de l'addiction des cancers HER2 positifs pour le transporteur de cholestérol STARD3

Thèse dirigée par : Docteur Catherine TOMASETTO et Docteur Fabien ALPY (IGBMC, Illkirch)

Rapporteurs externes : Docteur Christophe Lamaze (Institut Curie, Paris)
Docteur David Masson (Inserm UMR 1231, Dijon)

Examinatrice interne : Docteur Gertraud Orend (Inserm U1109, Strasbourg)

Examineurs externes : Docteur Fabienne Guillaumond (CRCM, Marseille)
Docteur Nicolas Etique (Université de Reims, Reims)

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	i
LISTE DES ABREVIATIONS.....	iii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	vi
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS.....	viii
AVANT-PROPOS.....	iv

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1 : LE CANCER DU SEIN

I. Epidémiologie des cancers du sein.....	1
A. Incidence et mortalité.....	1
B. Etiologie.....	1
1. Les facteurs génétiques.....	2
2. Les facteurs hormonaux.....	4
3. Les facteurs environnementaux et le mode de vie.....	4
II. Anatomico-physio-pathologie du sein.....	6
A. Anatomie du sein normal.....	6
1. Anatomie de la glande mammaire.....	6
2. Organisation cellulaire de la glande mammaire.....	7
B. Les cancers du sein.....	8
1. Les carcinomes <i>in situ</i>	8
2. Les carcinomes infiltrants ou invasifs.....	9
3. Les formes rares de carcinomes.....	9
III. Classification des cancers du sein.....	10
A. Classification clinique.....	10
B. Classification histologique.....	10
C. Classification moléculaire.....	11
IV. Diagnostic du cancer du sein.....	12
A. Le dépistage organisé du cancer du sein.....	12
B. Les examens du bilan initial.....	12
C. Les examens du bilan d'extension.....	13

V.	Les marqueurs biologiques du cancer du sein	13
A.	Les marqueurs « non-circulants ».....	13
1.	Les récepteurs hormonaux.....	13
2.	Le statut HER2 (Human Epidermal growth factor receptor 2).....	15
3.	uPA et PAI-1	16
4.	Ki67.....	16
B.	Les marqueurs « circulants »	17
1.	Le domaine extracellulaire de HER2 (ECD).....	18
2.	L'antigène CA15.3	18
C.	Les signatures moléculaires du cancer du sein	19
1.	Signatures moléculaires de première génération : Oncotype DX® et Mammaprint®	19
2.	Signatures moléculaires de nouvelle génération : Prosigna® et EndoPredict®	20
VI.	Traitements du cancer du sein.....	21
A.	La chirurgie	21
B.	La radiothérapie.....	22
C.	La chimiothérapie.....	23
D.	L'hormonothérapie	24
E.	Les thérapies ciblées (Tableau 7).....	25
1.	Thérapies ciblant le récepteur HER2 (cf chapitre 2 sur le cancer HER2 positif)	25
2.	Thérapies ciblant le récepteur au VEGF	25
3.	Thérapies ciblant mTOR	26
4.	Thérapie ciblant les CDK.....	26
5.	Thérapies ciblant les protéines PARP	27
F.	L'immunothérapie	27
1.	PD-1/PD-L1	27
2.	CTLA-4.....	28
3.	La vaccination thérapeutique.....	29
4.	Les cellules CAR-T.....	29
5.	Les TILs comme marqueur pronostique et prédictif de réponse thérapeutique.....	30
G.	L'apport du séquençage sur cellule unique dans le traitement du cancer du sein.....	31
	CHAPITRE 2 : LE CANCER DU SEIN HER2 POSITIF	
I.	Le récepteur transmembranaire HER2	33

A.	Les récepteurs tyrosine kinase	33
B.	Découverte d'HER2	33
C.	Rôle physiologique de HER2	34
D.	Structure du récepteur HER2	35
E.	Mécanisme d'action d'HER2	36
F.	Voies de signalisation issues de HER2	37
1.	La voie PI3K/Akt/mTOR	37
2.	La voie Ras/Raf/MAPK	38
3.	La voie JAK/STAT	39
G.	Endocytose et dégradation de HER2	39
II.	HER2 et cancer	41
A.	Surexpression de HER2	41
B.	Mutations de HER2	42
C.	Rôle de HER2 dans la progression métastatique	43
III.	Thérapies ciblées anti-HER2	44
A.	Les anticorps monoclonaux	44
1.	Le trastuzumab	44
2.	Le pertuzumab	46
B.	Les inhibiteurs de tyrosine kinase	46
1.	Le lapatinib	46
2.	Le nératinib	47
IV.	Résistances aux thérapies ciblées anti-HER2	47
A.	Mécanismes de résistance au trastuzumab	48
B.	Mécanismes de résistance au lapatinib	49
V.	L'amplicon HER2	50
A.	Description de l'amplicon HER2	50
1.	Définition, localisation et taille de l'amplicon	50
2.	La plus petite région commune d'amplification	51
3.	Corrélation entre le nombre de copies des gènes et l'expression	52
B.	Implications biologique et clinique de gènes co-amplifiés avec HER2	53
CHAPITRE 3 : LA PROTEINE STARD3		
I.	Description de STARD3	54

A.	Découverte de STARD3	54
B.	Les souris knock-out pour le gène STARD3	54
C.	Structure, localisation et fonctions de la protéine STARD3	54
II.	STARD3 et cancer HER2+.....	58
A.	STARD3 appartient à l'amplicon HER2	58
B.	Implications biologiques de STARD3 dans le cancer HER2+	58
C.	STARD3 est un marqueur de mauvais pronostic.....	59
D.	STARD3 est une cible potentielle pour lutter contre la résistance aux thérapies	60
E.	STARD3 est un marqueur prédictif de la réponse aux thérapies	60
CHAPITRE 4 : LE CHOLESTEROL		
I.	Découverte, structure et fonctions du cholestérol.....	64
II.	Origines du cholestérol.....	65
A.	La biosynthèse du cholestérol.....	65
B.	Le cholestérol exogène	66
III.	Export du cholestérol de la cellule	68
IV.	Régulation de l'homéostasie du cholestérol.....	69
A.	Les facteurs de transcription SREBPs	70
B.	Les facteurs de transcription LXRs	71
C.	L'enzyme HMG-CoA réductase.....	72
D.	Les micro-ARNs.....	73
V.	Le transport du cholestérol dans la cellule.....	73
A.	Transport vésiculaire du cholestérol.....	74
B.	Transport non vésiculaire du cholestérol	75
1.	Les protéines à domaine START	75
2.	Les protéines appartenant à la famille des ORPs	77
3.	Les protéines NPC1 et NPC2	77
4.	Les protéines Aster ou Gramd.....	78
VI.	Cholestérol et cancer.....	79
A.	Etudes épidémiologiques	79
B.	Reprogrammation du métabolisme du cholestérol dans le cancer	80
C.	Cibler le cholestérol pour traiter le cancer.....	81

RESULTATS

I.	Marquage et quantification du cholestérol intracellulaire et membranaire.....	84
II.	Étude du rôle de STARD3 dans la croissance des cellules cancéreuses HER2+	86
III.	Processus cellulaires régulés par STARD3	89
IV.	La phosphorylation de STARD3 régule la formation des MCS et le transfert de cholestérol	90

DISCUSSION

I.	STARD3, une cible thérapeutique pour le traitement des cancers HER2+	91
II.	STARD3, un marqueur diagnostique des cancers HER2+ et prédictif de la réponse aux thérapies ciblées anti-HER2.....	93
III.	Les statines pour traiter le cancer HER2+ ?	95
IV.	Le cholestérol de la membrane plasmique influence l'activation des RTK	96
V.	STARD3 et endocytose du récepteur HER2.....	98
VI.	MCS et transport du cholestérol médié par STARD3 dans les cancers HER2+	99

BIBLIOGRAPHIE.....	102
---------------------------	------------

ANNEXES

Matériels et méthodes complémentaires	130
---	-----

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury, mesdames Gertraud Orend et Fabienne Guillaumond ainsi que messieurs Christophe Lamaze, David Masson et Nicolas Etique d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse présentés dans ce manuscrit.

Mes trois premières années de thèse ont été financées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et ma quatrième année a bénéficié du soutien de l'IGBMC et de l'Institut National du Cancer (INCa). Merci à Catherine d'avoir trouvé les financements pour ma 4^{ème} année (finalement j'en ai faite une).

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés dans le laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Cancers du Sein à l'IGBMC, dirigé par le Docteur Catherine-Laure Tomasetto.

Je remercie chaleureusement Catherine et Fabien, mes deux directeurs de thèse, pour leur soutien tout au long de ces quatre années. Je n'oublie pas que c'est en grande partie grâce à vous deux que j'ai obtenu la bourse ministérielle et que j'en suis là aujourd'hui. Vous avez été pour moi d'excellents directeurs de thèse grâce à vos qualités humaines et scientifiques. Merci de m'avoir fait confiance sur ce projet, j'ai adoré travailler sur STARD3 et HER2 ! Catherine, merci de m'avoir accueillie dans l'équipe pendant plus de cinq ans. Un grand merci pour tous vos conseils et votre disponibilité tout au long de ma thèse. Votre supervision rend le travail de doctorant dans le laboratoire très enrichissant et formateur. Fabien, merci pour ta gentillesse et pour tout ce que tu m'as appris depuis mon arrivée dans le laboratoire. Toujours souriant, disponible et pédagogique, tu m'as énormément apporté. Catherine, Fabien, j'ai beaucoup appris grâce à vous deux durant ces quatre années de thèse, j'ai grandi et je me sens maintenant capable d'entamer une nouvelle aventure qu'est le postdoc.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'équipe « Tomasetto » qui rendent le travail au laboratoire plus qu'agréable. Corinne alias Coco, merci pour tous tes conseils techniques au cours de ma thèse et surtout merci pour ton écoute. Merci à mes collègues du RU pour ces délicieux repas partagés. Petite Amélie alias Améloche ou l'estomac sur pattes, merci pour le petit grain de folie que tu apportes au labo et pour tous ces bons moments partagés. Thomas alias Di MattiT, un grand merci pour ton aide depuis mon arrivée dans l'équipe. Tu m'as beaucoup fait rire pendant ces quatre années, surtout sur les pistes de

danse ! A mes deux confrères pharmaciens, Arthur et Mehdi, merci pour votre bonne humeur. Mehdi, je te confie notre box. Amélie, Arthur et Mehdi, bon courage pour la fin de votre thèse, tenez-moi au courant quand vous la soutiendrez. Amélie S., j'espère que tu pourras faire ta thèse au sein de cette super équipe. Je remercie également Mélanie, ma voisine de box, pour toutes les discussions et les fous rires que nous avons pu avoir. Enfin, je vous souhaite à toutes et tous le meilleur pour la suite !

Je remercie également Léa, Thiên-Nga et Massimo, des anciens étudiants du laboratoire. Léa, j'ai commencé ma thèse à tes côtés, merci pour ton aide pour la MRT et pour tout ce que tu m'as appris sur le marquage du cholestérol. Thiên-Nga merci pour ta gentillesse, c'est toujours un plaisir de se retrouver autour d'un bon repas toutes les trois avec Amélie. Massimo, un grand merci pour tout le travail que tu as fait sur STARD3.

Je remercie nos collaborateurs, Toshi et Nario plus particulièrement, ainsi que les personnes des services communs de l'IGBMC, qui ont contribué à l'avancement de ce travail.

Merci également à mes ami(e)s, qui ont partagé mon quotidien pendant toutes ces années. Je vous remercie pour tous ces bons moments qui m'ont permis d'échapper au stress de la thèse.

Un immense merci à ma famille ! A mes parents, 1000 mercis. Vous m'avez toujours soutenue et encouragée tout au long de mes études. J'ai énormément de chance de vous avoir et je ne vous remercierai jamais assez. Mon frère, je suis très fier de l'homme que tu es devenu. Je te souhaite plein de bonheur avec ma bella sista adorée ! Vous allez tous terriblement me manquer quand je serai aux states.

A la plus belle rencontre de ma thèse, Seb, mon partenaire dans la vie, merci pour ton amour et ton soutien infailible. Notre vie à deux ne fait que commencer, plein de belles choses nous attendent. Notre prochaine étape, les Etats-Unis. J'ai hâte de partager cette aventure américaine avec toi !

ABBREVIATIONS

5-FU : 5-Fluoro-Uracile	EMT : Epithelial to Mesenchymal Transition
ABC : ATP Binding Cassette	ER ou RE : Estrogen Receptor / Récepteurs aux oestrogènes
ACAT : Acyl-CoA Cholestérol Acyl Transférase	ERC : Endocytic Recycling Compartment
Acetyl-CoA : Acétyl-Coenzyme A	ERE : Estrogen Response Elements
aCGH : hybridation génomique comparative sur puce	ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
ADAM10 : A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	FAK : Focal Adhesion Kinase
ADC : Antibody Drug Conjugate	FFAT : Two Phenylalanines in an Acidic Tract
ADCC : antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	FDA : Food and Drug Administration
ADN : Acide DesoxyriboNucléique	FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptors
AKT : Protein kinase B	FISH : Fluorescence In situ Hybridization
AMM : Autorisation de mise sur le marché	FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching
AMP : Assistance Médicale à la Procréation	FSH : Follicle Stimulating Hormone
AMPK : AMP-activated protein kinase	GAP : GTPase Activating Protein
ARNm : Acide RiboNucléique messenger	GDP : Guanosine Di-Phosphate
ATP : Adénosine TriPhosphate	GEF : Guanosine Exchange Factor
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2	GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
BRCA1 : Breast Cancer 1	GRB2 : Growth factor Receptor Bound Protein 2
BRCA2 : Breast Cancer 2	GRB7 : Growth factor Receptor Bound Protein 7
CA15.3 : Cancer Antigen 15.3	GTP : Guanosine Tri-Phosphate
CAR : Chimeric Antigen Receptor	HBOC : Hereditary Breast and Ovarian Cancer
Cav-1 : cavéoline-1	HB-EGF : Heparin-binding EGF-like growth factor
CCIS : Cancer Canalaire In Situ	HDL : High Density Lipoprotein
CDK : Cyclin-Dependent Kinase	HER : Human Epidermal Growth Factor Receptor
CEA : CarcinoEmbryonic Antigen	HER2 : Epidermal growth Factor Receptor 2 (aussi appelé ErbB2 ou EGFR2)
CETP : Cholesteryl Ester Transfer Protein	HIF1 : Hypoxia Inducible Factor 1
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer	HMG-CoA : Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme A
CLIS : Cancer Lobulaire In Situ	HMGCR : HMG-CoA réductase
c-Met/HGFR: tyrosine-protein kinase Met ou hepatocyte growth factor receptor	HSP : Heat Shock Protein
COP I/II : Coat protein complex I/II	IDL : Intermediates Density Lipoprotein
CSMa : Cellule Souche Mammaire	IGF1R : Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4	IHC : Immunohistochimie
DBD : DNA Binding Domain	ILV : Intraluminal Vesicle
ECD : Extracellular Domain of HER2	INCa : Institut National du Cancer
EGF : Epidermal Growth Factor	Insig-1 : Insulin-induced gene 1 protein
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor	IPP : Pyrophosphate d'IsoPentényle
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
EMA : European Medicines Agency	JAK : Janus Kinase

Kb : kilobase
 KO : knock outSR
 LBD : Ligand Binding Domain
 LCAT : Lécithine-Cholestérol AcylTransférase
 LDL : Low Density Lipoprotein
 LDLR : Récepteur aux LDL
 LFS : Li-Fraumeni Syndrome
 LHRH : Luteinizing Hormone Releasing Hormone
 LH : Luteinizing Hormone
 LTP : Lipid Transfer Protein
 LXR : Liver X Receptor
 MAPK ou MEK : Mitogen-Activated Protein Kinase
 MCS : Membrane Contact Site
 MENTAL : MLN64-Nterminal domain
 miARN : Micro-ARN
 MLN : Metastatic Lymph Node
 MMP11 : Matrix Metalloproteinase-11
 MOSPD2 : Motile Sperm Domain Containing 2
 MSP : Major Sperm Protein
 mTOR : Mammalian target of Rapamycin
 mTORC1 : mTOR Complex 1
 mTORC2 : mTOR Complex 2
 NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
 NMD : Nonsense mediated mRNA Decay
 NPC : Niemann-Pick disease type C
 NPC1/2 : NPC Intracellular Cholesterol Transporter 1/2
 ORD : Oxysterol-Related Domain
 ORP : Oxysterol-binding protein (OSBP)-Related Proteins
 OPR1L : OSBP-related protein 1L
 OSBP : OxySterol-Binding Protein
 PAI1/2 : Plasminogen Activator Inhibitor 1/2
 PAM50 : Prediction Analysis of Microarray 50
 PARP : Poly (ADP-Ribose) Polymérase
 pb : paire de bases
 pCR : Pathological Complete Response
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 PD-1 : Programmed Death 1
 PD-L1 : Programmed Death Ligand 1
 PDK1 : Phosphatidylinositol 3-Dependent Kinase 1
 PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptors
 PFS : Progression Free Survival
 PH : Plexstrin Homology
 PI3K : Phosphoinositide 3 kinase
 PI3KCA : Mutant constitutivement actif de PI3K
 PI4P : Phosphatidylinositol-4-phosphate
 PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
 PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
 PLA : Proximity Ligation Assay
 PMCA2 : Plasma Membrane Calcium ATPase 2
 PR ou RP : Progesterone Receptor / Récepteur à la progestérone
 PRE : Progesterone Response Element
 PTC : Premature Stop Codon
 PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
 PTP1B : Protein-Tyrosine Phosphatase 1B
 RAPTOR : Regulatory-associated protein of mTOR
 RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
 RE : Réticulum Endoplasmique
 RICTOR : Rapamycin-insensitive companion of mTOR
 RTK : Récepteur tyrosine kinase
 RTqPCR : Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction
 RS : Score de rechute
 RXR : Retinoid X Receptor
 SCAP : SREBP Cleavage-Activating Protein
 SERD : Selective Estrogen Receptor Down Regulator
 SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator
 SH2 / SH3 : Src Homology 2 ou 3
 siRNA : Small Interfering RNA
 Sp1 : Specificity protein 1
 SRA : Smallest Region of Amplification
 SR-BI : Scavenger receptor class B member 1
 SRE : Sterol Regulatory Element
 SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
 SSD : Sterol Sensing Domain
 START : Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer
 STARD : START domain containing protein
 STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
 T-DM1 : trastuzumab emtansine
 TGF : Transforming Growth Factor
 TILs : Tumor Infiltrating Lymphocytes
 TNBC : Triple Negative Breast Cancer
 TNM : Tumor Node Metastasis

TP53 : Tumor Protein 53

tPA : tissue Plasminogen Activator

uPA : urokinase Plasminogen Activator

uPAR : uPA receptor

UTR : Untranslated Transcribed Region

VAP : Vesicle-Associated Membrane Protein (VAMP)-
Associated Protein

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Récepteur au facteur de croissance de
l'endothélium vasculaire

v-erbB : virus de l'érythroblastose aviaire

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Rappels bibliographiques :

TABLEAUX

Tableau 1 : Recommandations de prévention ou dépistage des personnes porteuses d'une mutation d'un des gènes du panel GGC

Tableau 2 : Classification TNM

Tableau 3 : Grade histologique

Tableau 4 : Classification moléculaire des cancers du sein et traitements associés

Tableau 5 : Score HER2 et indication aux thérapies ciblées anti-HER2

Tableau 6 : Liste des protocoles de chimiothérapie utilisés en France pour le traitement du cancer du sein

Tableau 7 : Liste des thérapies ciblées disposant d'une AMM en France pour le traitement du cancer du sein

FIGURES

Figure I1 : Classement des tumeurs solides par incidence et par mortalité en France métropolitaine en 2018 chez la femme

Figure I2 : Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer du sein chez la femme entre 1990 et 2015

Figure I3 : Structure du sein adulte normal

Figure I4 : Hiérarchie cellulaire de la glande mammaire

Figure I5 : Diagnostic des cancers du sein HER2+ par immunohistochimie

Figure I6 : Diagnostic des cancers du sein HER2+ par FISH

Figure I7 : Structure des récepteurs de la famille de l'EGFR

Figure I8 : Récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (EGFR/HER2) et voies de signalisation sous-jacentes favorisant la croissance tumorale

Figure I9 : Principales thérapies ciblées anti-HER2

Figure I10 : Description de l'amplicon HER2

Figure I11 : HER2, STARD3 et GRB7 sont au cœur de l'amplicon

Figure I12 : HER2 et STARD3 sont co-amplifiés et co-surexprimés

Figure I13 : STARD3 est essentielle à la croissance des cellules HER2+

Figure I14 : STARD3 est une protéine endosomale à domaine START qui forme des sites de contact membranaire et transporte du cholestérol

Figure I15 : Composition lipidique des différentes membranes cellulaires

Figure I16 : Représentation schématique de la membrane plasmique

Figure I17 : La biosynthèse du cholestérol dans le réticulum endoplasmique

Figure I18 : Les lipoprotéines plasmatiques

Figure I19 : Le transport réverse du cholestérol

Figure I20 : Régulation de l'homéostasie du cholestérol

Figure I21 : Transport cellulaire des lipides

Résultats :

Marquage et quantification du cholestérol (Publication « Intracellular and plasma membrane cholesterol labeling and quantification using filipin and GFP-D4 »)

Figure 1 : Plasma membrane and intracellular cholesterol staining with the GFP-D4 probe

Figure 2 : Whole-cell and intracellular cholesterol staining with filipin

Figure 3 : Filipin staining quantification by image analysis.

Étude du rôle de STARD3 dans la croissance des cellules HER2+ (Manuscript « Intracellular cholesterol traffic represents a new dependence for HER2-amplified cancers »)

Figure 1 : STARD3 and HER2 expression are correlated in breast cancers

Figure 2 : STARD3 is required specifically for HER2+ cell growth and not for HER2- cells

Figure 3 : STARD3 modulates cholesterol distribution in HCC1954 cancer cells

Figure 4 : STARD3 and VAP-A are in close proximity in HER2+ cells

Figure 5 : STARD3-mediated cholesterol transport is required for HER2+ cell growth

Figure 6 : STARD3 favors HER2 signaling

Figure 7 : HER2, EGFR and HER3 are sensitive to the PM cholesterol for their activation

Figure 8 : STARD3 favors HER2 homodimers and heterodimers

Figure 9. Schematic representation of the molecular mechanism of STARD3 addiction in HER2 tumors

Processus cellulaires régulés par STARD3

Figure R1 : STARD3 agit sur la survie et la migration des cellules HER2+

Discussion :

Figure D1 : Mécanisme moléculaire de l'addiction des tumeurs HER2+ pour STARD3

Figure D2 : Régulation de l'interaction STARD3-VAPs/MOSPD2 par phosphorylation du motif FFAT

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Publications :

- Voilquin L, Lodi M, Tomishige N, Chenard MP, Mathelin C, Kobayashi T, Frisch B, Alpy F, Tomasetto C. Intracellular cholesterol traffic represents a new dependence for HER2-amplified cancers. (En préparation)
- Lodi M, Voilquin L, Alpy F, Mathelin C, Chenard MP, Tomasetto C. STARD3: a predictive biomarker of neoadjuvant systemic treatment response in HER2-positive breast cancer. (En préparation)
- Di Mattia T, Martinet A, Ikhlef S, McEwen A, Nominé Y, Wendling C, Voilquin L, Eberling P, Ruffenach F, Poussin-Courmontagne P, Cavarelli J, Slee J, Levine T, Drin G, Tomasetto C, Alpy F. Phosphorylation regulates inter-organelle contact formation. (En révision dans EMBO Journal)
- Voilquin L, Di Mattia T, and Alpy F. Another hijack! Some enteroviruses co-opt the c10orf76/PI4KB complex for their own good. EMBO Reports, p. e49876, Jan. 2020.
- Voilquin L, Lodi M, Di Mattia T, Chenard M.-P, Mathelin C, Alpy F and Tomasetto C. STARD3: A Swiss army knife for intracellular cholesterol transport. 2019, Contact.
- Wilhelm L.P, Voilquin L, Kobayashi T, Tomasetto C and Alpy F. Intracellular and plasma membrane cholesterol labeling and quantification using filipin and GFP-D4. 2019, Methods in Molecular Biology. 1949, 137–152. (Co-premier auteur)

Communications orales :

- 2019 : The cholesterol transfer protein STARD3 function in HER2+ cancers, Voilquin L, Alpy F and Tomasetto C, 1st Japan-Europe Workshop on Glycosphingolipids and Membrane Homeostasis, Strasbourg, France.
- 2019 : The cholesterol transfer protein STARD3 function in HER2+ cancers, IGBMC, retraite du département, Functional Genomics and Cancer Department, La Petite Pierre, France.
- 2018 : Molecular mechanisms of STARD3 addiction in HER2 tumors, Voilquin L, Alpy F and Tomasetto C, 20th world congress of Senologic International Society on Breast Healthcare. Workshop on fundamental research in breast cancer, Strasbourg, France.

Communications par poster :

- 2019 : Molecular mechanisms of STARD3 addiction in HER2 tumors, Voilquin L, Alpy F and Tomasetto C, Annual meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB), Orlando, USA.
- 2018 : STARD3 modulates intracellular cholesterol distribution and promotes the growth of HER2+ breast cancer cells, Voilquin L, Wendling C, Alpy F, Tomasetto C, 19ème journée de la ligue contre le cancer, Illkirch, France.
- 2018 : STARD3 modulates intracellular cholesterol distribution and promotes the growth of HER2+ breast cancer cells, Voilquin L, Wendling C, Alpy F, Tomasetto C, IGBMC, retraite du département, Functional Genomics and Cancer Department Munster, France.

AVANT-PROPOS

Mon travail de doctorat concerne l'étude moléculaire de cancers ayant une altération commune, l'amplification du gène *HER2*. Cette altération a été identifiée il y a plus de trente ans dans les cancers du sein et depuis les connaissances sur le récepteur HER2 n'ont cessé de croître. Ces cancers, caractérisés par l'amplification du gène *HER2*, représentent un sous-type moléculaire des cancers du sein et sont appelés cancers HER2 positifs. Les grandes lignes des connaissances actuelles sur le cancer du sein et sur le récepteur HER2 font donc l'objet des premiers chapitres de l'introduction.

Le profilage génétique des tumeurs HER2+ a démontré que ces tumeurs présentent des altérations supplémentaires. En effet, plusieurs gènes localisés au niveau du locus 17q12 sont co-amplifiés et co-surexprimés avec HER2 dans ces tumeurs. Parmi ces gènes, le laboratoire a identifié *STARD3* et a proposé que les gènes co-amplifiés et co-exprimés avec HER2 puissent contribuer à la biologie des cancers HER2+. En effet, des études sur des modèles cellulaires de cancer du sein HER2+ ont montré que *STARD3* est essentielle à la croissance des cellules HER2+ (Kao and Pollack, 2006; Sahlberg et al., 2013; Alpy et Tomasetto, 2014b). C'est pourquoi le 3^{ème} chapitre de l'introduction concerne la protéine *STARD3* et son implication dans le cancer HER2+. J'ai ajouté à ce chapitre une revue parue dans le journal *Contact* que j'ai co-écrite et qui résume les fonctions connues de cette protéine (Voilquin et al., 2019).

Enfin, les rappels bibliographiques se terminent sur un chapitre concernant le cholestérol. En effet, *STARD3* est un transporteur spécifique du cholestérol au sein de la cellule. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle *STARD3* agit sur la croissance des cellules cancéreuses HER2+ de manière indirecte en altérant la distribution normale du cholestérol et en modifiant la composition lipidique des membranes cellulaires. Cette hypothèse a servi de point de départ aux recherches effectuées au cours de ma thèse. Ce dernier chapitre décrit les fonctions cellulaires du cholestérol, les mécanismes de transport et d'homéostasie du cholestérol ainsi que son implication dans le cancer.

Mon projet de thèse était dans un premier temps de montrer que *STARD3* est essentielle à la croissance des cellules cancéreuses HER2+ du sein et d'autres organes, et dans un deuxième temps d'établir les mécanismes moléculaires à l'origine de la dépendance des tumeurs HER2+ pour *STARD3*. La partie « Résultats » comprend l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse concernant le rôle de *STARD3* dans la croissance des cellules cancéreuses HER2 positives. Ces résultats sont décrits dans un manuscrit que nous prévoyons de soumettre prochainement. Enfin, mon manuscrit se termine par une partie discussion et perspectives.

**RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES**

CHAPITRE 1 : LE CANCER DU SEIN

I. Epidémiologie des cancers du sein

A. Incidence et mortalité

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et la première cause de décès par cancer chez la femme (**Figure 11**) (Bray et al., 2018; Fahad Ullah, 2019). Avec 28 % de l'ensemble des cancers incidents chez la femme et 15 % des décès féminins par cancer, le cancer du sein représente un problème de santé publique majeur (Bray et al., 2018). Après avoir doublé entre 1980 et 2005, le taux d'incidence du cancer du sein est stable depuis 2005 (**Figure 12**) (Ghoncheh et al., 2016). Les taux d'incidence les plus élevés sont observés dans les pays les plus développés. Dans le monde, 2,1 millions de nouveaux cas et 627000 décès sont estimés en 2018 selon le Global Cancer Observatory (Ferlay et al., 2019).

Selon l'Institut National du Cancer (INCa), 58 459 nouveaux cas de cancers du sein ont été diagnostiqués chez les femmes en France en 2018, et 12 146 décès enregistrés. L'âge moyen au diagnostic est de 61 ans et l'âge moyen au décès est de 73 ans. Le taux standardisé de mortalité par cancer du sein a diminué de 5% en 10 ans (**Figure 12**). Ce succès provient des récents progrès thérapeutiques mais également du dépistage organisé depuis 2004 qui favorise les diagnostics précoces et permet de traiter la maladie avec une meilleure efficacité. Ainsi, on observe une amélioration de la survie à 5 ans du cancer du sein qui est passée de 80 % pour les femmes diagnostiquées entre 1989 et 1993 à 87 % pour celles diagnostiquées entre 2005 et 2010 (INCa). S'il est dépisté à un stade précoce, la survie à 5 ans est de 98 %. Cependant, la médiane de survie des stades métastatiques de cancer du sein est seulement de 20 à 38 mois, ce qui prouve la gravité de cette maladie (Caswell-Jin et al., 2018).

B. Etiologie

Les étiologies du cancer du sein sont nombreuses et complexes. En effet, différents facteurs peuvent être liés au risque d'apparition du cancer du sein. Le sexe et l'âge représentent les principaux facteurs de risque. Plus de 99% des cancers du sein touchent la femme et près de 80% se développent après 50 ans. D'autres facteurs comme les antécédents familiaux de

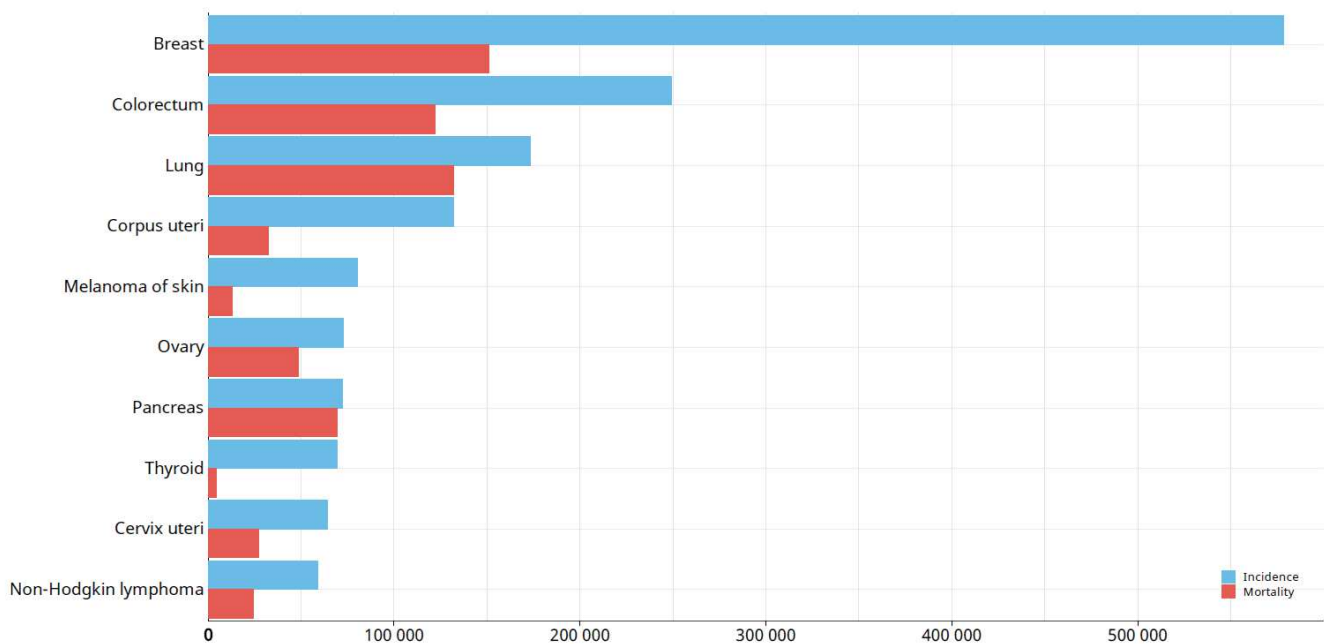


Figure I1 : Classement des tumeurs solides par incidence et par mortalité en France métropolitaine en 2018 chez la femme

Le cancer du sein est la première cause de cancer et de décès par cancer chez la femme. (Sources Global Cancer Observatory). L'incidence et la mortalité des différents cancers sont en bleu et rouge respectivement.

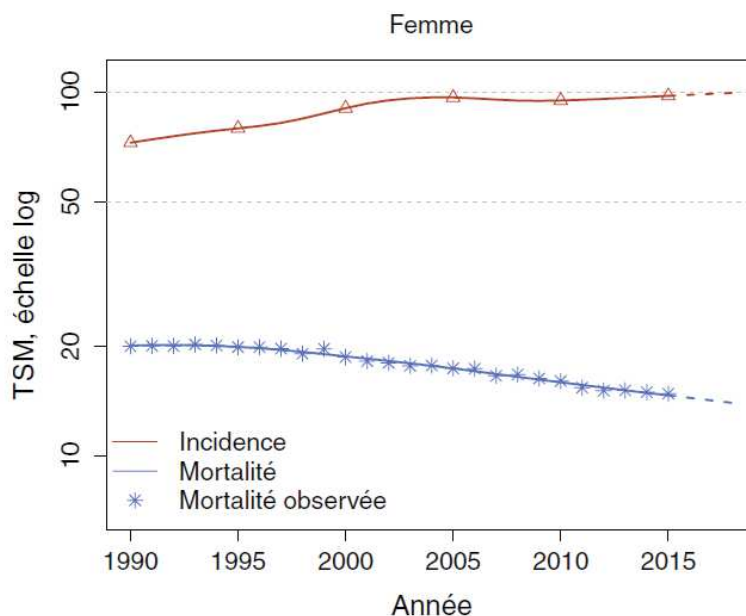


Figure I2 : Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer du sein chez la femme entre 1990 et 2015

Les taux d'incidence et de mortalité sont standardisés selon la population mondiale (TSM Taux standardisés Monde) et sont exprimés pour 100 000 personnes-années. Le taux d'incidence standardisé a fortement augmenté entre 1990 et 2005. Le taux de mortalité est en diminution depuis 1990 (Sources INCa).

cancers, les prédispositions génétiques au cancer, les traitements hormonaux et le mode de vie sont également impliqués dans le risque de développer un cancer du sein.

1. Les facteurs génétiques

5 à 10 % des cancers du sein sont héréditaires (Shannon and Chittenden, 2012a). Environ 30 gènes sont connus pour être impliqués dans le risque de cancer du sein. Parmi ces gènes, on trouve les gènes *BRCA1* et *BRCA2* et des gènes impliqués dans des syndromes rares de cancer (Apostolou and Fostira, 2013; Collins and Politopoulos, 2011). Les principaux gènes impliqués dans la transmission héréditaire du cancer du sein sont détaillés ci-dessous.

Les mutations des gènes *BRCA1* (Breast cancer 1) et *BRCA2* (Breast cancer 2) représentent les causes génétiques les plus fréquentes du cancer du sein héréditaire. En effet, elles sont retrouvées dans 80% des cancers du sein héréditaires. *BRCA1* (localisé sur le chromosome 17) et *BRCA2* (localisé sur le chromosome 13) sont tous les deux des gènes suppresseurs de tumeurs. Ces gènes de prédisposition sont transmis selon un mode autosomique dominant avec une pénétrance élevée. Les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* conduisent au syndrome HBOC (Hereditary Breast and Ovarian Cancer syndrome) (Roy et al., 2011). *BRCA1* et *BRCA2* sont impliqués dans la recombinaison homologue, un processus essentiel des mécanismes de réparation de l'ADN (Roy et al., 2011; Zhang and Powell, 2005). Il existe un grand nombre de mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2*. Dans plus de 90% des cas, les mutations de *BRCA1* entraînent l'introduction d'un codon stop prématuré (PTC ou Premature Stop Codon). Le mécanisme de dégradation des ARNm porteurs d'un PTC, le NMD (Nonsense mediated mRNA Decay), reconnaît ensuite ces ARNm et les dégrade (Perrin-Vidoz et al., 2002). La mutation de ces gènes entraîne des erreurs dans le processus de réparation de l'ADN, des instabilités chromosomiques et des cancers dus à l'incapacité de réguler la mort cellulaire et à la croissance cellulaire incontrôlée. Dans la plupart des cas, les mutations du gène *BRCA1* sont associées à des tumeurs de type triple négatif (RE-, RP-, HER2-) qui sont des tumeurs de haut grade et de mauvais pronostic. A l'inverse, les patientes porteuses de mutations *BRCA2* possèdent des tumeurs plus souvent RE (Récepteur aux oestrogènes) et RP (Récepteur à la progestérone) positives (phénotype luminal) (Gage et al., 2012).

D'autres gènes sont également impliqués dans des formes de cancer du sein héréditaires (Apostolou and Fostira, 2013; de Jong et al., 2002). C'est le cas des gènes *TP53* et *PTEN* (Collins and Politopoulos, 2011). En effet, il existe différents syndromes associés à un haut

-Introduction-

risque de développer un cancer du sein. Des mutations du gène *TP53* sont responsables du syndrome de Li-Fraumeni (LFS) (Guha and Malkin, 2017). *TP53* est localisé sur le chromosome 17 et code pour la protéine p53. p53, également appelé « DNA damage sensor », a pour rôle d'assurer la stabilité du génome en protégeant des dommages à l'ADN (Levine et al., 1991). p53 est également impliqué dans l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire et l'activation des protéines de réparation de l'ADN (Meek, 2015). Le syndrome de Li-Fraumeni est un trouble héréditaire complexe de prédisposition au cancer. Il se manifeste par l'apparition précoce de cancers dans différents tissus (sarcomes osseux, cancer du sein, tumeurs cérébrales, leucémies, cancers de la peau, du colon ou du pancréas). Ce syndrome est responsable d'1% des cancers du sein (Shannon and Chittenden, 2012b). Les mutations germinales du gène *TP53* sont identifiées chez 75% des patients présentant une LFS. La probabilité pour un porteur de mutation *TP53* de développer un cancer est de 75% chez les hommes et près de 100% chez les femmes (Guha and Malkin, 2017). De plus, des mutations du gène *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog) causent le syndrome de Cowden, un second syndrome de prédisposition héréditaire aux cancers (Shannon and Chittenden, 2012b). Le gène *PTEN* est localisé sur le chromosome 10. C'est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire et de la croissance cellulaire. La phosphatase PTEN module des voies de signalisation en déphosphorylant le phosphatidylinositol triphosphate (Maehama and Dixon, 1999). Le syndrome de Cowden est caractérisé par des hamartomes (malformations tissulaires) multiples et disséminés et par un risque élevé de développer des tumeurs. C'est un syndrome de cancer héréditaire autosomique dominant qui augmente le risque de cancers du sein, de la thyroïde, du rein, de l'utérus, ainsi que des problèmes neurologiques et développementaux (Mester and Eng, 2015).

Récemment, le Groupe Génétique et Cancer (GGC) - Unicancer a recommandé l'analyse de 13 gènes face à un risque héréditaire de cancer du sein et de l'ovaire (Moretta et al., 2018). Ces gènes sont BRCA1, BRCA2, PALB2, TP53, CDH1, PTEN, RAD51C, RAD51D, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 et EPCAM. Ces différents gènes sont principalement impliqués dans la réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire ainsi que les processus d'adhésion cellulaire. La découverte de ces gènes montre que le cancer du sein est une maladie très hétérogène causée par la modification génétique des cellules épithéliales mammaires. L'analyse de ces gènes a montré une utilité clinique et il existe des recommandations de prévention ou dépistage des personnes porteuses d'une mutation d'un de ces gènes (**Tableau 1**).

Gène	Nom de la protéine	Fonction	Surveillance mammaire	Chirurgie mammaire de réduction des risques
BRCA1	Breast Cancer 1	Réparation de l'ADN	De 30 à 65 ans : IRM + Mammographie 1 fois par an	Mastectomie prophylactique recevable
BRCA2	Breast Cancer 2			
PLAB2	Partner And Localizer of BRCA2			
CDH1	Cadherin 1	Adhérence intercellulaire	Après 65 ans : mammographie +/- échographie 1 fois par an	
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog	Régulation du cycle cellulaire	A partir de 20 ans : IRM + échographie tous les ans	
TP53	Tumor antigen p53			
RAD51C	Rad protein 51C	Réparation de l'ADN	Pas de surveillance mammaire spécifique	Non indiquée
RAD51D	Rad protein 51D			
MLH1	MutL Homolog 1	Réparation de l'ADN (Mismatch repair protein)		
MSH2	MutS Homolog 2			
MSH6	MutS Homolog 6			
PMS2	PMS1 homolog 2			

Tableau 1 : Recommandations de prévention ou dépistage des personnes porteuses d'une mutation d'un des gènes du panel GGC (D'après GGC – Unicancer 2017).

2. Les facteurs hormonaux

Le second facteur de risque de développement d'un cancer du sein concerne les hormones stéroïdes sexuelles. Les facteurs hormonaux jouent un rôle majeur dans le développement physiopathologique de la glande mammaire puisque celle-ci est soumise au contrôle des hormones ovariennes jusqu'à la ménopause. Le développement du cancer du sein est donc influencé par les fluctuations des taux d'œstrogènes et de progestérone auxquelles la femme est exposée au cours de sa vie (Yaghjyan and Colditz, 2011). C'est ce qu'on appelle l'imprégnation hormonale.

L'exposition prolongée à des œstrogènes endogènes (estradiol et progestérone) liée à une puberté précoce, une ménopause tardive ou une première grossesse tardive (après 35 ans) augmente le risque de développer un cancer du sein (MacMahon, 2006). En effet, le risque est légèrement augmenté chez les femmes ayant été réglées avant l'âge de 12 ans ou chez celles dont la ménopause est survenue après 55 ans. Cependant, les grossesses et l'allaitement semblent avoir un effet protecteur contre le cancer du sein (MacMahon, 2006). Les femmes n'ayant pas eu d'enfant ou celles n'ayant pas allaité ont un risque de cancer du sein légèrement supérieur aux autres femmes. De plus, l'ovariectomie réduit le risque de cancer du sein. Dans une étude ancienne, il a été montré que la ménopause chirurgicalement induite réduit de moitié le risque de cancer du sein par rapport à des femmes dont la ménopause est survenue naturellement (Trichopoulos et al., 1972).

D'autre part, les hormones exogènes entraînent également un risque plus élevé de cancer du sein. Les femmes utilisant des contraceptifs oraux ou un traitement hormonal substitutif de la ménopause courent ainsi un risque plus élevé par rapport aux femmes qui ne les utilisent pas (Iatrakis et al., 2011; Rozenberg et al., 2013). Aussi, les stimulations hormonales lors d'AMP (Assistance Médicale à la Procréation) pourraient également augmenter le risque de cancer du sein (Lo Russo et al., 2013). Cependant, les résultats sont contradictoires puisqu'une étude a montré qu'il n'y a pas de corrélation significative entre l'exposition aux traitements de fertilité et le risque de cancer du sein (Gabriele et al., 2017).

3. Les facteurs environnementaux et le mode de vie

D'autres facteurs sont également associés à une augmentation du risque de cancer du sein. En effet, la consommation excessive d'alcool, la consommation de tabac, la sédentarité et

-Introduction-

l'obésité augmentent les risques de cancer du sein (Howell et al., 2014). Selon le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), la consommation d'alcool, l'obésité et le manque d'activité physique seraient responsables respectivement de 15 %, 8 % et 3 % des cas de cancer du sein en France. Une revue suggère également que la moitié des cas de cancer du sein pourraient être évités en modifiant le mode de vie, par le maintien d'un poids santé, l'activité physique régulière et la consommation minimale d'alcool (Colditz and Bohlke, 2014). On parle alors de chimioprévention. Cependant, l'impact de l'obésité sur le risque de cancer du sein diffère selon le statut ménopausique et les sous-types moléculaires de la maladie. Les données actuelles suggèrent qu'un indice de masse corporel élevé est associé à un risque réduit de cancer du sein avant la ménopause, alors qu'il est fortement corrélé à un risque accru après la ménopause (Garcia-Estevez and Moreno-Bueno, 2019). L'obésité post-ménopausique semble être un facteur de risque pour l'apparition du cancer du sein hormonodépendant (Munsell et al., 2014).

Des études ont également montré qu'une alimentation riche en graisse ainsi qu'une hypercholestérolémie favorisaient la survenue de cancer du sein (Kuzu et al., 2016; Tartter et al., 1981). Cependant, les données épidémiologiques restent contradictoires. Certaines études ont montré que l'usage de statines sur une période supérieure à 10 ans doublait le risque de cancer du sein (Jacobs et al., 2011) alors que d'autres études suggèrent qu'il n'y a pas de corrélation entre l'utilisation de statines et le risque de cancer du sein (Islam et al., 2017). Les statines sont des médicaments qui bloquent la synthèse de cholestérol en inhibant la HMG-CoA réductase. Aussi, certains dérivés du cholestérol possèdent des effets pro ou anti-cancéreux. Par exemple, le 25-hydroxycholesterol a un effet antiprolifératif dans divers cancers alors que le 27-hydroxycholesterol agit comme un agoniste des récepteurs des œstrogènes dans le cancer du sein, induisant une croissance tumorale et des métastases (Kuzu et al., 2016).

Le travail de nuit et le manque de sommeil prédisposent également au cancer du sein (Leonardi et al., 2012; Menegaux et al., 2013). Le travail de nuit a été classé cancérigène probable (groupe 2A) par le CIRC : il entraîne des perturbations hormonales qui pourraient favoriser l'apparition de cancers. De plus, l'incidence du cancer du sein est significativement augmentée chez les hôtesses de l'air (Buja et al., 2006; Gassmann et al., 2015). Le travail de nuit et le décalage horaire entraînant une perturbation du rythme circadien ainsi que l'exposition aux radiations cosmiques expliqueraient cette augmentation de risque.

Les perturbateurs endocriniens comme le dichlorodiphényldichloroéthane, les polychlorobiphényles ou les dioxines sont suspectés d'avoir un rôle dans les cancers du sein

-Introduction-

hormono-dépendants. Les liens entre l'exposition à ces substances et le risque de cancer du sein restent cependant à établir. Aussi, l'exposition aux radiations ionisantes représente également un facteur de risque du cancer du sein (Carmichael et al., 2003).

Enfin, même si la plupart des études ne sont pas concluantes, un risque accru de cancer du sein chez les agricultrices exposées aux pesticides a été rapporté dans une étude américaine (Duell et al., 2000). Une seconde étude plus récente a également associé l'exposition aux pesticides et le risque accru de plusieurs cancers, notamment une augmentation des cancers du sein triples négatifs (Louis et al., 2017).

II. Anatomo-physio-pathologie du sein

A. Anatomie du sein normal

Le sein est constitué d'une glande mammaire exocrine dont la fonction biologique est de produire le lait. Le lait maternel contient l'ensemble des nutriments nécessaires au développement du nourrisson ainsi que les anticorps maternels (Immunoglobulines de type IgA principalement) (Ballabio et al., 2007). La glande mammaire est entourée de tissu de soutien composé de vaisseaux, de fibres et de graisse.

1. Anatomie de la glande mammaire

La glande mammaire est un organe spécifique des mammifères, constituée de lobules et de canaux galactophoriques (Arrata, 1975; Hassiotou and Geddes, 2013) (**Figure I3**). La glande mammaire adulte comporte une vingtaine de lobes mammaires chacun drainé par un canal galactophore. Les canaux galactophoriques, reliés au mamelon et ramifiés, se terminent sur les lobules. Chaque lobule est formé par un groupe de 10 à 100 acini mammaires ou alvéoles. Ces alvéoles constituent la partie sécrétrice de la glande. Plusieurs lobules (20 à 40) forment le lobe mammaire (**Figure I3B**) (Hassiotou and Geddes, 2013). Les lobules produisent le lait en période d'allaitement et les canaux transportent le lait vers le mamelon. Ces éléments sont entourés par du tissu conjonctif et du tissu adipeux. Des ligaments de soutien assurent l'attachement du sein au muscle pectoral.

Des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques parcourent le sein afin d'assurer sa nutrition et son drainage (Estourgie et al., 2004). Les ganglions et les vaisseaux lymphatiques

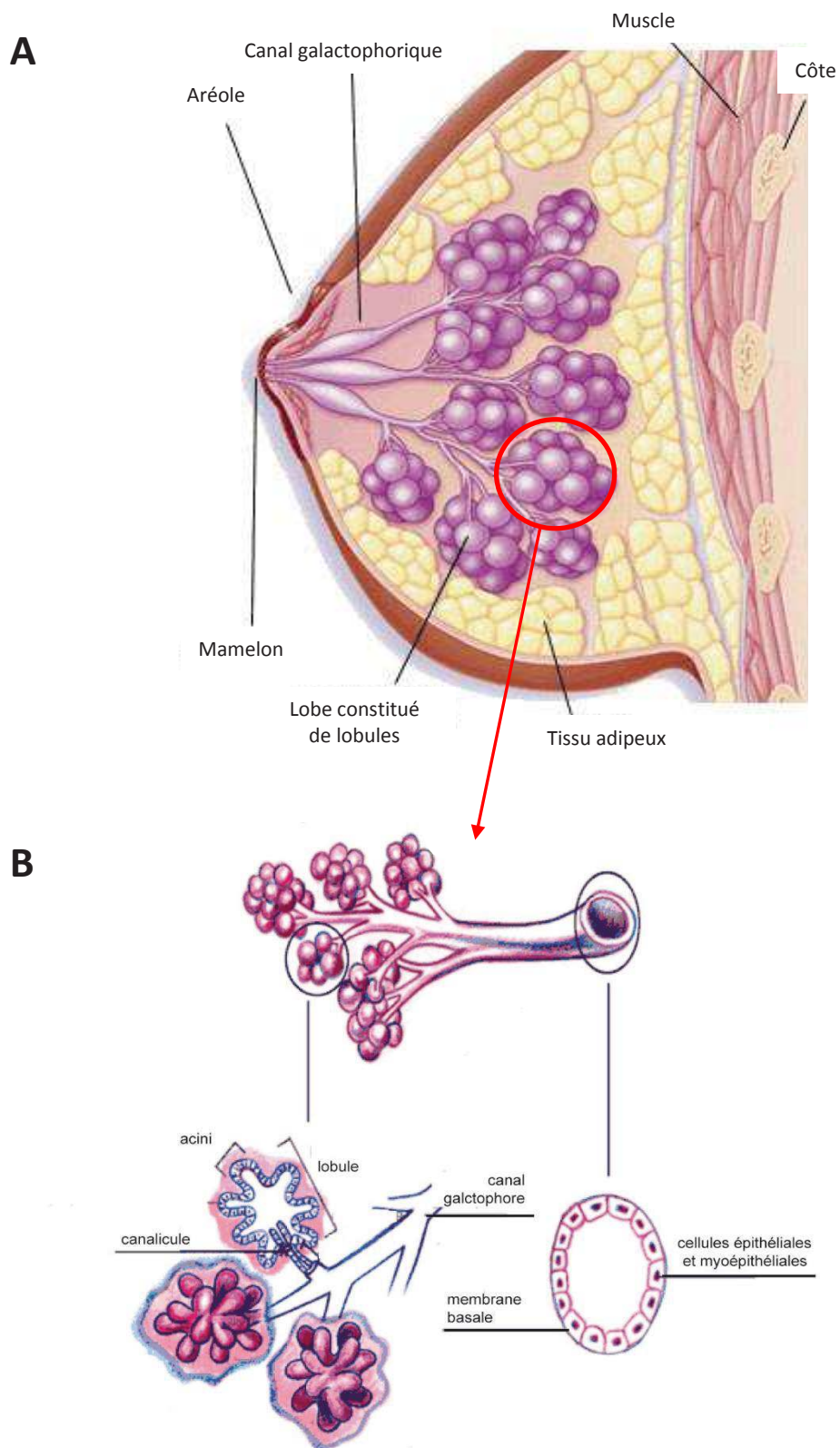


Figure I3 : Structure du sein adulte normal

- A. Anatomie du sein. La glande mammaire est constituée d'un système de canaux galactophoriques entourés par du tissu conjonctif puis par du tissu adipeux. Les canaux émanent des lobules et sont reliés au mamelon.
- B. Structure des lobules. Les lobules sont formés d'acini qui sont la partie sécrétrice de la glande mammaire. Les canaux et lobules sont constitués d'une couche de cellules épithéliales entourée de cellules myoépithéliales en contact avec la membrane basale (D'après le site du Centre de sénologie des Côteaux et d'après l'Institut National du Cancer).

-Introduction-

forment le système lymphatique qui permet de lutter contre les infections. Les ganglions lymphatiques du sein sont situés au niveau de l'aisselle (ganglions axillaires), au-dessus de la clavicule (ganglions sus-claviculaires), sous la clavicule (ganglions sous-claviculaires) et à l'intérieur du thorax (ganglions mammaires internes).

2. Organisation cellulaire de la glande mammaire

La glande mammaire est composée de deux compartiments cellulaires (épithélial et mésenchymateux) qui contiennent chacun différents types cellulaires (Pillay and Davis, 2018).

a) Le compartiment épithélial

Le compartiment épithélial est en contact avec la membrane basale. Deux types de cellules épithéliales sont retrouvés dans la glande mammaire :

- les cellules épithéliales luminales qui bordent la lumière des acini et des canaux permettant de produire le lait en période de lactation
- les cellules myoépithéliales qui entourent les cellules luminales qui possèdent une fonction contractile permettant d'acheminer le lait vers le mamelon

L'épithélium mammaire présente un fort potentiel régénératoire et la capacité de subir de nombreux cycles de croissance suggérant l'existence de cellules souches épithéliales mammaires. La capacité de régénération de l'épithélium mammaire a été démontrée pour la première fois au début des années 1960 (Faulkin and Deome, 1960). Ensuite, il a été montré qu'une glande mammaire fonctionnelle entière peut être dérivée d'une seule cellule soutenant le fait que l'épithélium mammaire possède une population de cellules souches (Shackleton et al., 2006). En effet, les cellules souches mammaires (CSMa) sont à l'origine des cellules épithéliales luminales et myoépithéliales. Les CSMa sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent donner naissance à plusieurs types cellulaires, elles sont présentes en faible quantité et possèdent une capacité d'auto-renouvellement. Une hiérarchie cellulaire de la glande mammaire a donc été établie (Fu et al., 2014). La cellule souche mammaire peut se diviser de manière symétrique ou asymétrique (Smith, 2005). Au cours de la division symétrique, la cellule souche donne deux cellules filles identiques gardant les propriétés de cellule souche mère. Au cours de la division asymétrique, la cellule souche donne naissance à une cellule identique et à une cellule appelée progéniteur : progéniteur luminal commun ou progéniteur

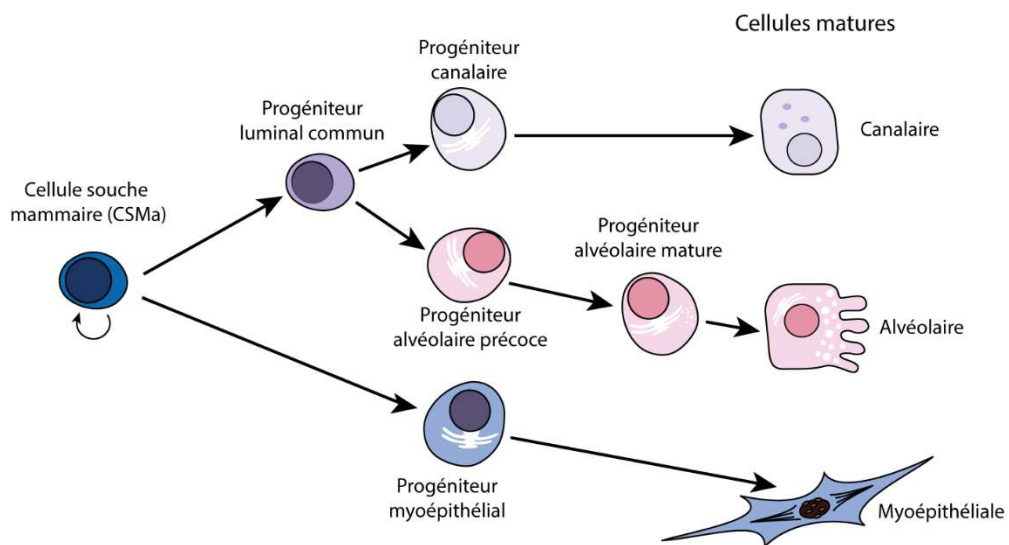


Figure I4 : Hiérarchie cellulaire de la glande mammaire

La cellule souche mammaire est à l'origine des différentes lignées cellulaires de la glande mammaire. Elle est capable de se diviser en progéniteur luminal commun ou progéniteur myoépithélial. Le progéniteur luminal commun peut se diviser en deux progéniteurs donnant naissance aux cellules différenciées composant les compartiments épithéliaux canalaire ou alvéolaire. Le progéniteur myoépithélial donne naissance aux cellules du myoépithélium (D'après Visvader et al., 2014).

-Introduction-

myoépithélial. Le progéniteur luminal se divise ensuite en progéniteur canalaire ou alvéolaire. Après différenciation et divisions, les progéniteurs donnent naissance aux cellules différenciées composant la glande mammaire (**Figure I4**) (Visvader and Stingl, 2014).

b) Le compartiment mésenchymateux

La membrane basale sépare le compartiment mésenchymateux du compartiment épithélial. Le compartiment mésenchymateux est également appelé stroma mammaire et est composé de cellules immunitaires, d'adipocytes, de fibroblastes, de vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des constituants de la matrice extracellulaire comme des protéines et des facteurs de croissance (Schedin and Hovey, 2010). Le compartiment mésenchymateux fait partie du microenvironnement de la glande mammaire dont le rôle principal est de participer à son développement.

B. Les cancers du sein

Concernant le cancer du sein, il existe des tumeurs bénignes et des tumeurs malignes. Les tumeurs bénignes du sein sont le plus souvent des fibroadénomes. Elles sont caractérisées par des contours bien délimités et sont incapables de métastaser. Ces petites tumeurs sont souvent laissées en place ou alors elles peuvent être enlevées par chirurgie lorsqu'elles sont gênantes pour la patiente. Les tumeurs malignes du sein sont des adénocarcinomes dans 95% des cas, c'est-à-dire des cancers qui se développent à partir des cellules épithéliales (=carcinome) de la glande (=adeno) mammaire. On distingue les cancers *in situ* et les cancers invasifs ou infiltrants. Le reste des cancers du sein comprend les lymphomes mammaires et les sarcomes, c'est-à-dire des cancers qui se développent à partir des cellules conjonctives.

1. Les carcinomes *in situ*

Le carcinome *in situ* est défini comme une prolifération de cellules cancéreuses confinées à l'intérieur des canaux ou des lobules. Il est caractérisé par une tumeur bien délimitée et par une absence de rupture de la membrane basale. C'est pourquoi il est également appelé carcinome « non-invasif ». On peut distinguer les carcinomes canaux *in situ* (CCIS) qui se développent à partir des cellules épithéliales des canaux excréteurs de la glande mammaire des

carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS) qui se développent à partir des cellules épithéliales des lobules mammaires. Le cancer canalaire *in situ* est le plus fréquent. En effet, huit à neuf cancers *in situ* sur dix sont des cancers canaux (Source INCa).

2. Les carcinomes infiltrants ou invasifs

Les carcinomes invasifs sont caractérisés par une rupture de la membrane basale. Les cellules tumorales acquièrent de nouvelles propriétés biologiques leur permettant d'envahir le tissu conjonctif. La tumeur n'est plus délimitée par une membrane basale intacte et peut ainsi métastaser (Hanahan and Weinberg, 2000; Pickup et al., 2014). En effet, des cellules cancéreuses peuvent s'échapper de la tumeur primaire et aller coloniser une autre région du corps grâce à la circulation lymphatique et sanguine, pour y former une nouvelle tumeur qu'on appelle tumeur secondaire ou métastase. Les carcinomes canaux infiltrants représentent 75% des cancers du sein invasifs.

3. Les formes rares de carcinomes

Les formes rares de carcinomes sont de meilleur pronostic que les carcinomes canaux infiltrants. Ils représentent chacun 1 à 2% des cancers du sein infiltrants et touchent généralement les femmes âgées.

Le carcinome médullaire est caractérisé par une bordure souvent ronde et bien définie qui peut ressembler à un fibroadénome à la mammographie (Park et al., 2013).

Le carcinome mucineux, également appelé carcinome colloïde, doit son nom au fait qu'il est formé de cellules cancéreuses sécrétant du mucus (Harrison and Dillon, 2018).

Le carcinome tubuleux doit son nom à l'aspect tubuleux des cellules au microscope. Il est généralement de petite taille et se propage rarement aux ganglions lymphatiques axillaires (Min et al., 2013).

Le carcinome papillaire peut être infiltrant ou non. Il est fait de structures papillaires (Rakha et al., 2016).

III. Classification des cancers du sein

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène. La classification des tumeurs a pour but d'évaluer la gravité de la maladie et d'orienter les médecins dans le choix de la stratégie thérapeutique. Pour le cancer du sein, il existe trois classifications différentes couramment utilisées : la classification clinique, histologique et moléculaire (Penault-Llorca, 2014a). Grâce à ces classifications, le médecin est capable d'évaluer les critères diagnostiques mais aussi pronostiques, conduisant à des traitements personnalisés.

A. Classification clinique

La classification clinique consiste à déterminer l'étendue de la maladie au moment du diagnostic. C'est ce qu'on appelle le stade du cancer. Pour évaluer l'étendue d'un cancer du sein, trois critères sont pris en compte : la taille de la tumeur, l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques et la présence ou non de métastases. Ces critères permettent d'obtenir la classification clinique TNM (**Tableau 2**) (Bertero et al., 2018). TNM vient de l'anglais « Tumor, Nodes, Metastasis » ce qui signifie « tumeur, ganglions, métastases ». La classification cTNM (c pour clinique) est obtenue avant tout traitement, c'est le stade pré-thérapeutique. Après la chirurgie, la classification pTNM (p pour post-chirurgical) est définie sur l'examen anatomopathologique de la tumeur et l'analyse des ganglions prélevés. En fonction des observations faites lors de cet examen, l'anatomopathologiste ajoute un chiffre aux lettres T, N et M :

- T1 à T4 pour la taille de la tumeur
- N0 à N3 pour le degré d'envahissement des ganglions
- M0 ou M1 pour la présence ou non de métastases

La lettre « x » est portée pour T, N ou M dans les cas où le critère n'a pas pu être évalué ou si les informations sont insuffisantes pour conclure.

B. Classification histologique

L'examen anatomopathologique réalisé sur un échantillon de la tumeur permet de définir le grade histo-pronostic d'Elston-Ellis (Stein, 2007). Cette classification reflète l'agressivité de la tumeur. Trois paramètres morphologiques sont analysés : l'architecture des

Taille de la tumeur primaire		
<i>T_x</i>	la tumeur primaire ne peut pas être évaluée	
<i>T₀</i>	la tumeur primaire n'est pas palpable	
<i>T_{is}</i>	tumeur in situ	
<i>T₁</i>	tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension	
	T1 mic	≤ 1 mm dans sa plus grande dimension
	T1a	0,1 mm < tumeur ≤ 5 mm dans sa plus grande dimension
	T1b	0,5 cm < tumeur ≤ 1 cm dans sa plus grande dimension
	T1c	1 cm < tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension
<i>T₂</i>	2 cm < tumeur ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension	
<i>T₃</i>	> 5 cm dans sa plus grande dimension	
<i>T₄</i>	tumeur avec extension à la paroi thoracique ou à la peau, ou tumeur inflammatoire	
	T4a	extension à la paroi thoracique
	T4b	œdème (y compris peau d'orange), ulcération de la peau ou nodules de perméation situés sur la peau même du sein
	T4c	T4a + T4ab
	T4d	cancer inflammatoire
Ganglions lymphatiques régionaux		
<i>N_x</i>	l'envahissement des ganglions régionaux ne peut être évalué	
<i>N₀</i>	pas d'adénopathie axillaire	
<i>N₁</i>	N1a	envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires
	N1b	envahissement des ganglions de la chaîne mammaire interne (CMI) détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
	N1c	N1a + N1b
<i>N₂</i>	N2a	envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires avec au moins un amas cellulaire > 2 mm
	N2b	envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire
<i>N₃</i>	N3a	envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires
	N3b	envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaire et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
	N3c	envahissement des ganglions sus-claviculaire homolatéraux
Métastases		
<i>M_x</i>	renseignements insuffisants	
<i>M₀</i>	absences de métastases à distance	
<i>M₁</i>	présence de métastases à distance	

Tableau 2 : Classification TNM

La classification TNM permet d'obtenir le stade de la maladie. Elle repose sur l'analyse de trois critères : la taille de la tumeur, l'envahissement des ganglions lymphatiques et la présence ou non de métastases.

cellules tumorales, la forme et la taille du noyau cellulaire et le nombre de cellules qui se divisent (ou activité mitotique) reflétant la vitesse à laquelle les cellules cancéreuses se multiplient. Une note allant de 1 à 3 est attribuée à chaque critère. La somme des notes obtenues pour chacun des trois critères permet d'obtenir le grade du cancer (**Tableau 3**). Les scores 3,4 et 5 correspondent aux tumeurs les moins agressives de grade I ; 6 et 7 au grade intermédiaire II et les scores 8 et 9 correspondent aux tumeurs les plus agressives de grade III.

C. Classification moléculaire

La conférence de Saint Gallen a permis de classer les cancers du sein selon cinq sous-types moléculaires principaux (**Tableau 4**) (Dai et al., 2015; Goldhirsch et al., 2011a; Vasconcelos et al., 2016):

- Les cancers du sein « luminaux » : luminal A ou luminal B, caractérisés par la surexpression du récepteur aux œstrogènes (RE) et/ou du récepteur à la progestérone (RP) représentent 65% des cancers du sein. Ces tumeurs sont appelées « luminal » car elles ont le même profil d'expression que les cellules épithéliales de la lumière des canaux et lobules de la glande mammaire. Les tumeurs « luminal » A ont un statut prolifératif faible (Ki67 faible) par rapport aux « luminal » B de statut prolifératif fort (Ki67 élevé) (Inic et al., 2014). Les tumeurs « luminal A » représentent à peu près 50% des cancers du sein et sont souvent de bas grade histologique avec un bon pronostic. Les tumeurs « luminal B » ne représentent que 10 à 20% des cancers du sein et sont habituellement de haut grade histologique et de moins bon pronostic. De plus, les « luminal » B peuvent être divisées en « luminal » B surexprimant ou non le récepteur HER2.
- Les cancers du sein HER2-positifs (HER2+), caractérisés par l'amplification et la surexpression du gène HER2 sur le chromosome 17q12 représentent 15% des cancers du sein. Ces tumeurs sont de mauvais pronostic dû au potentiel métastatique élevé.
- Les cancers du sein de phénotype basal qui n'expriment ni les récepteurs hormonaux, ni l'oncoprotéine HER2 et qui sont souvent désignés par le terme « triple négatif » représentent 20% des cancers du sein. Ce type de cancer du sein touche généralement les femmes jeunes. Il est associé à des tumeurs agressives présentant un haut risque de récurrence à 5 ans et une mauvaise survie globale par rapport aux autres types de cancer

DIFFERENCIATION TUMORALE proportion de tubes ou glandes dans la tumeur (en % de surface tumorale)	Score
> 75 % : Tumeur bien différenciée	1
10-75 % : Tumeur moyennement différenciée	2
< 10 % : Tumeur peu différenciée	3
NOYAUX CELLULAIRES	
Noyaux petits, réguliers, uniformes	1
Pléomorphisme modéré	2
Variations marquées de taille, de forme, avec nucléoles proéminents	3
NOMBRE DE MITOSES (à compter sur 10 champs au grossissement x 400)	
0 à 6 mitoses	1
7 à 12 mitoses	2
> 12 mitoses	3
SOMME	
Grade I	3, 4, 5
Grade II	6, 7
Grade III	8, 9

Tableau 3 : Grade histologique

Le grade histologique reflète l'agressivité de la tumeur. Elle repose sur l'analyse au microscope de trois caractéristiques : la différenciation des cellules tumorales, la structure des noyaux et l'activité mitotique. Un score de 1 à 3 est attribué à chaque critère. La somme des scores permet d'obtenir le grade histologique.

Sous-types	Caractéristiques moléculaires		Traitements médicamenteux
Luminal A	RE+ et/ou RP+/HER2- Ki67 bas		Hormonothérapie exclusive sauf si facteur de risques
Luminal B	HER2 négatif	RE+ et/ou RP+ / HER2- Ki67 fort	Hormonothérapie +/- Chimiothérapie
	HER2 positif	RE+ et/ou RP+ / HER2+Ki67 indifférent	Chimiothérapie Trastuzumab Hormonothérapie
HER2+ non luminal	RE-/RP-/HER2+		Chimiothérapie Trastuzumab
Triple négatif	RE-/RP-/HER2-		Chimiothérapie

Tableau 4 : Classification moléculaire des cancers du sein et traitements associés

Le cancer du sein peut être classé en cinq sous-types moléculaires différents : luminal A et B qui surexpriment les récepteurs hormonaux, HER2+ luminal ou non et les triples négatifs.

du sein (Foulkes et al., 2010). Les tumeurs présentant des mutations génétiques du gène *BRCA1* sont fortement associées à ce type de cancer du sein.

IV. Diagnostic du cancer du sein

Toute manifestation anormale au niveau du sein doit alerter les femmes et les conduire à consulter un médecin. Ces symptômes sont principalement une boule dans le sein, des ganglions durs au niveau de l'aisselle, une modification de la peau du sein, une modification du mamelon (écoulement, suintement) ou un changement de la taille ou de la forme du sein (rougeur, œdème, chaleur importante). Lorsqu'une personne présente ces symptômes ou qu'une anomalie est décelée lors d'un examen de dépistage, des examens doivent être réalisés afin d'établir un diagnostic.

A. Le dépistage organisé du cancer du sein

Le dépistage organisé du cancer du sein existe en France depuis 2004 et cible les femmes âgées de 50 à 74 ans. Elles sont invitées tous les deux ans à réaliser une mammographie et un examen clinique des seins auprès d'un radiologue agréé (Rouëssé et al., 2014). Cet examen est pris en charge à 100 % par l'assurance maladie. La mammographie est systématiquement lue par deux radiologues. La double lecture a pour but d'augmenter la fiabilité du dépistage. En cas d'absence de cancer détecté lors de la première lecture, une seconde lecture est réalisée. Lorsqu'une anomalie est décelée, le radiologue pratique de suite un bilan diagnostique afin de raccourcir le délai de prise en charge de la patiente. Malheureusement, en 2017, seulement 49.9 % (50.7 % en 2016) des femmes âgées de 50 à 74 ans ont participé à ce dépistage (Source INCa). Bien que la participation n'atteigne pas les 100 %, le dépistage organisé favorise un diagnostic précoce et est en partie responsable de la baisse de la mortalité du cancer du sein depuis 2005.

B. Les examens du bilan initial

Le bilan initial comprend un examen clinique des seins chez un médecin spécialisé et une mammographie des deux seins, pouvant être associée à une échographie des seins et des ganglions. Parfois une IRM mammaire peut également être réalisée. Cependant, c'est l'examen

anatomopathologique de prélèvement au niveau de l'anomalie (biopsie) qui établit le diagnostic. Le prélèvement est réalisé par micro ou macrobiopsie à travers la peau.

C. Les examens du bilan d'extension

Ces examens ne sont pas systématiques pour toutes les patientes. A l'issue du bilan initial, si les résultats laissent penser que les cellules cancéreuses ont pu former des métastases, des examens supplémentaires sont réalisés. Le cancer du sein peut métastaser dans le foie, les poumons, le cerveau et les os principalement. Les examens le plus souvent réalisés sont donc une radiographie du thorax, une scintigraphie osseuse, un scanner, une échographie abdominale, ou une IRM. Un bilan sanguin complet est également réalisé afin d'évaluer l'état général de la patiente.

V. Les marqueurs biologiques du cancer du sein

Plusieurs marqueurs biologiques sont disponibles afin de caractériser les cancers du sein (Nicolini et al., 2018). Un marqueur est une caractéristique biologique mesurée de façon précise et reproductible, utilisé comme indicateur d'un état pathologique. Les marqueurs sont utilisés en routine dans le cancer du sein à des fins diagnostique, pronostique, prédictive d'une réponse thérapeutique, ou dans le cadre d'un suivi. De plus, les marqueurs permettent aux médecins d'identifier le sous-type moléculaire du cancer du sein et ainsi décider d'un traitement adapté. Aujourd'hui, il existe un réel besoin d'identifier de nouveaux marqueurs dans les cancers du sein afin d'améliorer la prise en charge actuelle en développant de nouvelles thérapies ciblées. On distingue les marqueurs « non circulants » qui sont réalisés sur les biopsies tumorales des marqueurs circulants dans le sang.

A. Les marqueurs « non-circulants »

1. Les récepteurs hormonaux

Le récepteur aux œstrogènes (RE) et le récepteur à la progestérone (RP) sont les deux récepteurs hormonaux principalement impliqués dans les cancers du sein. Leur surexpression caractérise un sous-groupe moléculaire des cancers du sein appelés cancers luminaux

-Introduction-

(Goldhirsch et al., 2011a). Les récepteurs hormonaux sont de bons marqueurs pronostic et prédictif de réponse thérapeutique des patientes traitées par hormonothérapie (Viale et al., 2007). Ce sont des récepteurs nucléaires, des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de nombreux gènes cibles. Les récepteurs hormonaux possèdent trois domaines fonctionnels : le domaine NTD (NH₂-terminal Domain), le domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA-Binding Domain) et le domaine de liaison au ligand (LBD, Ligand-Binding Domain) (Jia et al., 2015). Ces deux récepteurs possèdent le même mécanisme d'action. En absence de ligand, le récepteur est lié à des protéines HSP (Heat Shock Protein) dans le cytoplasme de la cellule. En présence de ligand (œstrogènes ou progestérone), le récepteur subit des modifications conformationnelles le dissociant des protéines HSP et permettant au récepteur d'être transloqué dans le noyau. Dans le noyau, le récepteur se dimérise et se fixe sur les séquences régulatrices des gènes cibles. Cette interaction entre le récepteur et les gènes cibles se fait par liaison directe du domaine DBD du récepteur à l'ADN via un élément de réponse appelé ERE (Estrogen Response Elements) ou PRE (Progesterone Response Elements) (Bertherat, 2004). Cela entraîne ensuite la transcription des gènes cibles.

Le RE possède deux isoformes : RE α et RE β , codés par deux gènes distincts localisés sur deux chromosomes distincts (6q25.1 pour RE α et 14q23.2 pour RE β). Le rôle du RE β dans le cancer du sein est encore mal connu. En revanche, RE α joue un rôle majeur dans la croissance des cellules cancéreuses mammaires (Jia et al., 2015).

Le RP possède également deux isoformes qui sont codés par le même gène en 11q22 mais transcrits par deux promoteurs différents et qui sont généralement co-exprimés (Kastner et al., 1990). Dans le cancer du sein, les cellules surexprimant le récepteur à la progestérone libèrent des facteurs prolifératifs qui induisent une signalisation paracrine et ont des effets significatifs sur le maintien des cellules souches tumorales et la croissance tumorale (Hagan and Lange, 2014).

L'expression de RE et de RP dans la tumeur est évaluée par immunohistochimie (IHC) sur pièce opératoire ou biopsie (Nofech-Mozes et al., 2012). Un score est obtenu grâce à l'analyse de deux critères : le pourcentage de cellules positives et l'intensité du marquage. RE et RP sont tous les deux des marqueurs nucléaires avec des propriétés d'expression similaires donc la procédure de « scoring » pour les deux marqueurs est identique. Deux scores peuvent être obtenus : le score H ou le score Allred. Le score H ou histo-score est calculé en multipliant le pourcentage de cellules marquées par l'intensité de la coloration. Un score H supérieur à 10 signifie que le cancer est RE⁺ ou RP⁺ nécessitant un traitement par hormonothérapie. Le score

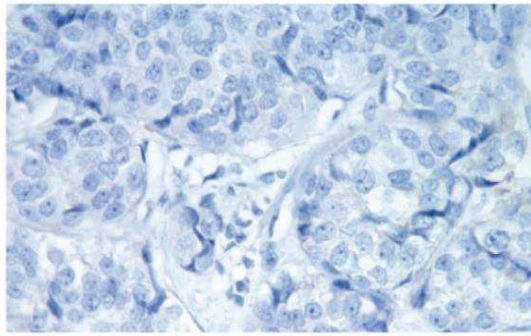
-Introduction-

Allred est un score allant de 0 à 8 qui additionne le pourcentage de cellules marquées (aucune cellule marquée = 0, < 1% de cellules = 1, de 1 à 10% de cellules = 2, de 10 à 33% de cellules = 3, de 33 à 67% de cellules = 4 et de 67% à 100% de cellules = 5) et l'intensité du signal (de 0 à 3) (Qureshi and Pervez, 2010). Un score ≤ 2 est considéré comme négatif. Le score Allred évalue les cancers susceptibles de répondre à un traitement hormonal. En règle générale, les cancers du sein ne répondent pas au tamoxifène avec un score Allred < 6.

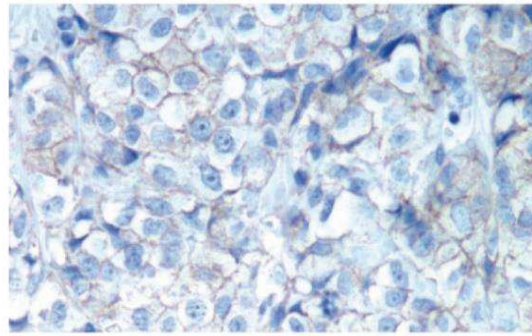
2. Le statut HER2 (Human Epidermal growth factor receptor 2)

Le proto-oncogène HER2 /ErbB2 est surexprimé et amplifié dans 15 à 20% des cancers du sein (Goldhirsch et al., 2011a; Slamon and Clark, 1988). HER2 appartient à la famille des récepteurs au facteur de croissance EGFR/HER composée de quatre membres notés HER1, HER2, HER3 et HER4. HER2 est un récepteur à activité tyrosine kinase qui active différentes voies de signalisation dans la cellule comme la voie des MAPK ou la voie PI3K/Akt/mTOR. Ces voies de signalisation favorisent la transcription de gènes cibles permettant la survie cellulaire, la prolifération cellulaire, l'invasion et l'angiogenèse (Hynes and MacDonald, 2009; Yarden and Sliwkowski, 2001). La structure et le mécanisme d'action de HER2 seront détaillés plus précisément dans le chapitre 2.

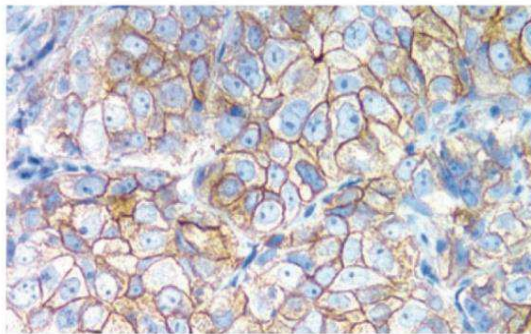
Il a été montré que l'amplification de HER2 est un marqueur de mauvais pronostic et un marqueur prédictif de réponse aux thérapies ciblées anti-HER2 (Sjögren et al., 1998). La surexpression de HER2 est détectée par immunohistochimie (IHC) (Figure 15) grâce à un anticorps spécifique anti-HER2 et l'amplification de HER2 est détectée par fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Figure 16) sur des fragments tumoraux. Le score obtenu par IHC repose sur l'analyse de deux critères : l'intensité du signal membranaire et le pourcentage de cellules positives. Le score est noté de 0 à ++++. Lorsque le score d'IHC est 0 ou +, le taux d'HER2 est normal, la tumeur est HER2 négative, et la patiente ne sera pas éligible à un traitement par trastuzumab. Lorsque le score d'IHC est ++++, la tumeur est HER2 positive et le traitement par trastuzumab est indiqué (Figure 15). Un score d'IHC intermédiaire (++) nécessite dans un deuxième temps une FISH afin d'étudier l'amplification du gène (Tableau 5) (Penault-Llorca et al., 2014). Le principe de la FISH est d'hybrider l'ADN du patient avec deux sondes d'ADN fluorescentes : une sonde complémentaire du gène HER2 et une deuxième sonde reconnaissant le centromère du chromosome 17 (le gène HER2 est situé sur le chromosome 17q21). L'analyse des cellules tumorales au microscope permet d'obtenir un ratio du nombre de copies du gène



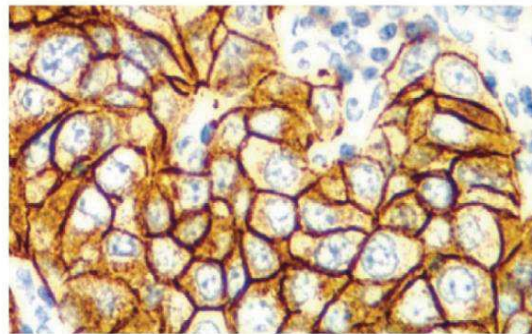
Score: 0 (40x)



Score: 1+ (40x)



Score: 2+ (40x)



Score: 3+ (40x)

Figure I5 : Diagnostic des cancers du sein HER2+ par immunohistochimie

Les noyaux des cellules sont marqués en bleu par l'hématoxyline. La protéine HER2, localisée au niveau de la membrane plasmique est marquée en brun grâce à un anticorps spécifique de la protéine. Les images A, B, C et D montrent les différentes intensités de marquage que l'on peut obtenir par IHC. (<http://latestbreastcancer.blogspot.com/2011/05/her2-part-4-how-doctors-determine-if.html>)

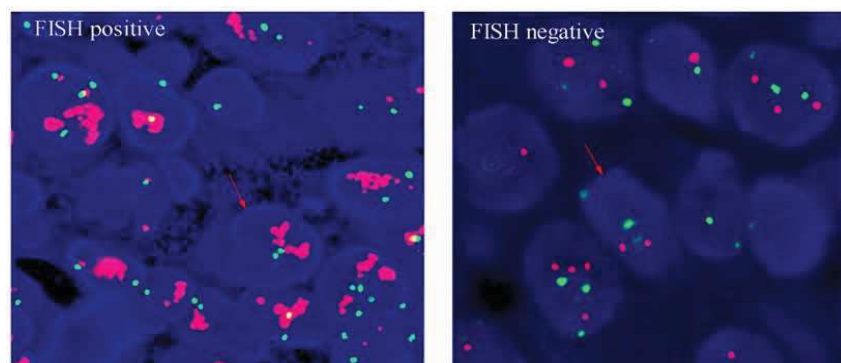


Figure I6 : Diagnostic des cancers du sein HER2+ par FISH

Dans les cas où le score HER2 par IHC est intermédiaire (2+), une FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) est réalisée. Les noyaux des cellules apparaissent en bleu. Le centromère du chromosome 17 est marqué avec une sonde verte, le gène HER2 est marqué avec une sonde rouge. A gauche, une FISH positive montre plus de 10 copies du gène HER2 par noyau avec présence de clusters par rapport à une FISH négative à droite. (D'après Qiu et al., 2017)

	Marquage en IHC	Indication thérapeutique anti-HER2
0	Absence de marquage ou marquage membranaire < 10 % de cellules invasives	Non
+	Marquage membranaire faible et incomplet > 10 % des cellules invasives	Non
++	Marquage membranaire faible à modéré et complet \geq 10 % de cellules invasives	Oui, seulement si amplification prouvée par FISH
+++	Marquage membranaire fort et complet > 30 % des cellules invasives	Oui

Tableau 5 : Score HER2 et indication aux thérapies ciblées anti-HER2

Le marquage HER2 est déterminé par IHC. Un score de 0 à 3+ est obtenu en fonction de l'intensité du signal et du pourcentage de cellules positives. 0 et 1+ signifient qu'HER2 n'est pas surexprimé et ne nécessite pas de thérapie anti-HER2. Un score de 3+ justifie un traitement par trastuzumab. Pour un score intermédiaire de 2+, une FISH est nécessaire.

-Introduction-

HER2 par rapport à celui du chromosome 17 (**Figure I6**). Il y a amplification du gène HER2 si le rapport HER2/chr 17 est supérieur ou égal à 2 ou si le nombre moyen de copies du gène HER2 par cellule est ≥ 6 (Zare et al., 2018). L'amplification est négative si le rapport HER2/chr 17 est inférieur à 2 et que le nombre moyen de copies du gène HER2 par cellule est inférieur à 4. Si le ratio est entre 1.8 et 1.99 ou si le rapport HER2/chr 17 est inférieur à 2 avec un nombre de copies entre 4 et 6, il faut recompter sur un plus grand nombre de cellules.

3. uPA et PAI-1

Les cellules cancéreuses doivent être capables de franchir la membrane basale et dégrader la matrice extracellulaire afin de disséminer dans la circulation sanguine et former des métastases. Les protéases sont des enzymes protéolytiques qui dégradent la matrice extracellulaire. La plasmine est responsable de l'activation des proenzymes en protéases actives. Le plasminogène est la forme inactive de la plasmine. uPA et PAI-1 sont des protéines impliquées dans l'hémostase, elles appartiennent au système fibrinolytique activateur du plasminogène. Ce système comprend cinq molécules majeures : uPA (urokinase Plasminogen Activator) une protéase qui active le plasminogène en plasmine et son récepteur (uPAR) ; deux inhibiteurs spécifiques d'uPA nommés PAI-1 et PAI-2 et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA tissue Plasminogen Activator) (Lamy et al., 2010).

Différentes études ont montré que des taux élevés d'uPA et de PAI-1 étaient associés à un pronostic défavorable. En effet, des taux élevés d'uPA dans la tumeur sont associés à une diminution de la survie sans récurrence (Duffy et al., 1988; Gouri et al., 2016; Völker et al., 2018).

Le dosage d'uPA et PAI-1 est réalisé par un immunodosage ELISA sur pièce opératoire. Il est recommandé dans les cas de tumeurs HER2-, RE/RP+ sans atteinte ganglionnaire. Les patientes ayant un faible taux d'uPA (< 3 ng/mg de protéines) et de PAI-1 (< 14 ng/mg de protéines) sont considérées à faible risque de rechute et ne nécessitent pas de chimiothérapie adjuvante (Jänicke et al., 2001). A l'inverse, une chimiothérapie sera discutée en réunion de concertation pluridisciplinaire pour les patientes avec un taux élevé d'uPA et/ou de PAI-1.

4. Ki67

L'antigène Ki67 est un marqueur de prolifération (Luporsi et al., 2012). Cette protéine, codée par le gène MKI67, est impliquée dans le maintien de l'intégrité des chromosomes

mitotiques (Cuylen et al., 2016). Il est exprimé tout au long du cycle cellulaire et est absent des cellules quiescentes (Lopez et al., 1991). Sa détection est réalisée par immunohistochimie sur des coupes de tumeurs à l'aide d'un anticorps spécifique anti-Ki67. L'index Ki-67 représente le pourcentage de noyaux colorés par l'anticorps. S'il est élevé, cela signifie que les cellules cancéreuses se divisent rapidement. Dans ce cas, la chimiothérapie adjuvante est indiquée. Le Ki-67 est un test utile afin de prévoir la sensibilité d'une tumeur aux agents cytotoxiques. Les recommandations sont les suivantes (Egelé et al., 2015). Une tumeur présentant un index Ki-67 > 30% est considérée comme une tumeur à fort taux prolifératif et doit recevoir une chimiothérapie. A l'inverse, une tumeur présentant un index Ki-67 < 10% ne nécessite pas de chimiothérapie. Si la tumeur présente un index Ki-67 intermédiaire entre 11 et 30%, d'autres critères discutés en réunion de concertation pluridisciplinaire permettront de prendre la décision.

B. Les marqueurs « circulants »

Les marqueurs biologiques circulants font partie d'une classe émergente de marqueurs non-invasifs. Ils sont bien tolérés par la patiente par rapport aux biopsies tissulaires et ils fournissent des informations lorsque la biopsie n'est pas réalisable. Les prélèvements répétés sont possibles, ce qui permet de suivre la réponse au traitement, de contrôler son efficacité et l'apparition d'éventuelles résistances.

Plus récemment, des méthodes visant à analyser l'ADN tumoral circulant ont émergé. En effet, les cellules tumorales libèrent du matériel génétique dans la circulation sanguine. Une étude pionnière a montré l'intérêt du séquençage de l'ADN tumoral circulant pour la surveillance des cancers du sein métastasés (Dawson et al., 2013). Notamment, il est possible de focaliser les analyses sur l'identification de mutations ponctuelles des gènes majeurs comme *TP53*. Cette méthode de biopsie liquide représente une alternative non invasive pour le suivi des patientes. L'accès à l'ADN tumoral circulant ouvre de nombreuses perspectives. En effet, cela permettra de personnaliser le suivi des patientes en fonction du sous-type moléculaire de la maladie et de cibler des mutations associées à la résistance aux traitements. La méthode de biopsie liquide est en cours d'évaluation en France par des essais cliniques prospectifs comme l'étude multicentrique ALIENOR.

1. Le domaine extracellulaire de HER2 (ECD)

Le domaine extracellulaire (ECD Extracellular Domain) de HER2 est libéré dans le sang par un mécanisme protéolytique appelé « ECD shedding ». Ce mécanisme est augmenté au cours de la formation de métastases. C'est pourquoi le taux d'ECD dans le sérum a été proposé comme un biomarqueur prometteur pour la récurrence du cancer du sein et pour le suivi des patientes surexprimant HER2 (Perrier et al., 2018; Reix et al., 2016). Ce dosage est réalisé en routine à l'hôpital dans le suivi des patientes afin d'identifier d'éventuelles rechutes. Cependant, son utilité reste encore fortement contredite puisqu'il ne semble pas être corrélé à une amélioration du taux de survie des patientes (Leyland-Jones and Smith, 2011).

2. L'antigène CA15.3

L'antigène CA15.3 (Cancer Antigen 15.3) est une glycoprotéine qui appartient à la famille des mucines. Le CA15.3 est un des épitopes d'une protéine codée par le gène MUC1. Les produits du gène MUC-1 sont impliqués dans la cancérogenèse. C'est le marqueur tumoral le plus couramment utilisé. Le taux de cet antigène dans le sang augmente dans les cas de cancers du sein métastatiques (Bensouda et al., 2009). Son dosage est utilisé comme marqueur de récurrence. Le CA15.3 permet de diagnostiquer près de 75 % des métastases en anticipant leur détection par rapport aux méthodes conventionnelles d'imagerie médicale (Chourin et al., 2008). Cependant, aucun bénéfice d'un traitement précoce de ces métastases n'a été prouvé, ni sur l'espérance de vie des patientes, ni sur leur qualité de vie en phase métastatique. Ce marqueur n'est donc utilisé que pour le suivi et l'évaluation de la réponse thérapeutique en phase métastatique (Konan et al., 2015). L'augmentation des taux sanguins de l'antigène CA15.3 est généralement couplée à l'augmentation de l'antigène CEA (Carcinoembryonic Antigen). Le CEA est une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire et détectée au cours du développement fœtal. Chez l'adulte, la protéine est présente en très faible quantité mais il peut y avoir une hausse du taux sanguin du CEA en présence de certains cancers. Pour certains, la combinaison CA15.3 + CEA présente un intérêt limité. Pour d'autres, l'association CA15.3 + CEA permet d'améliorer la détection des récurrences (Maccio et al., 2017; Riedinger et al., 2016).

C. Les signatures moléculaires du cancer du sein

Ces dernières années, les progrès de la biologie moléculaire ont permis des innovations dans le domaine du diagnostic et de la prise en charge du cancer du sein. En effet, les techniques de PCR et de microarray ont permis le développement de signatures moléculaires disponibles dans le commerce (Kittaneh et al., 2013). Une signature moléculaire est un test biologique réalisé sur la tumeur. Ces signatures représentent une nouvelle approche pour prédire le pronostic et le risque de récurrence d'une patiente en interprétant le profil d'expression d'un panel de gènes liés à la progression tumorale. La transcription de ces gènes est utilisée comme marqueur du potentiel métastatique. Plusieurs signatures moléculaires sont actuellement commercialisées (Penault-Llorca, 2014b). Les plus connues sont Oncotype DX, MammaPrint, Prosigna et EndoPredict. Ces tests génétiques s'adressent aux femmes ayant un cancer du sein hormono-dépendant et dont les ganglions de l'aisselle ne sont pas touchés.

Cependant, ces signatures moléculaires ne se substituent pas au diagnostic classique par immunohistochimie réalisé par les anatomopathologistes. En France, l'utilisation des signatures moléculaires n'est pas recommandée car elles n'apportent pas d'informations utiles pour les tumeurs de haut grade comme les tumeurs triples négatives ou les tumeurs HER2+ considérées comme des cancers de mauvais pronostic. De plus, ces tests coûtent cher et ne sont pas pris en charge par la sécurité sociale.

1. Signatures moléculaires de première génération : Oncotype DX® et MammaPrint®

Oncotype DX® et MammaPrint® sont les premières signatures moléculaires commercialisées. Ces tests reposent sur la technique des puces à ADN. Ce sont des tests centralisés, c'est-à-dire qu'ils sont uniquement réalisés aux Etats-Unis pour Oncotype DX® et aux Pays-Bas pour MammaPrint®.

Oncotype DX® est un test diagnostique basé sur le niveau d'expression de 21 gènes (récepteurs hormonaux, récepteur HER2, gènes du stroma mammaire comme la MMP11, gènes impliqués dans la prolifération cellulaire comme le Ki67 et gènes impliqués dans l'invasion) par RTqPCR (Kittaneh et al., 2013; Penault-Llorca, 2014b). Il aide à la décision thérapeutique chez les femmes atteintes de cancer du sein hormono-dépendant (Siow et al., 2018). Il permet d'estimer le bénéfice de la chimiothérapie et le risque de récurrence à 10 ans. Un score de rechute (RS) entre 0 et 100 est obtenu : un RS <18 est défini comme étant à faible risque, tandis qu'un

-Introduction-

score ≥ 31 est défini comme étant à haut risque de récurrence, 18 à 30 étant un risque intermédiaire (Paik et al., 2004). Des études ont montré que la chimiothérapie n'apportait pas de bénéfice clinique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein surexprimant le récepteur aux œstrogènes avec un RS bas alors que des patientes avec RS élevé bénéficiaient de l'ajout de la chimiothérapie à l'hormonothérapie (Weigelt et al., 2008). Comme tout biomarqueur, Oncotype DX® a ses limites. Il n'a été validé que dans le cancer du sein à récepteurs hormonaux positifs. Il n'y a pas de données sur l'utilité d'Oncotype DX® pour d'autres sous-types de cancer du sein. De plus, il existe un taux de faux négatifs relativement élevé pour HER2, ce qui pourrait conduire à une sous-estimation du risque (Dabbs et al., 2011). Des données suggèrent également qu'Oncotype DX® ne fournit pas d'informations pronostiques indépendantes de celles fournies par l'IHC pour le Ki-67, le RE, le RP et HER2 (Cuzick et al., 2011).

MammaPrint® permet d'étudier par puce à ADN le profil d'expression de 70 gènes associés aux étapes essentielles de progression tumorale et métastatique (régulation du cycle cellulaire, prolifération cellulaire, invasion, angiogenèse) (Tian et al., 2010). Ce test permet de classer les patientes en deux catégories : bon ou mauvais pronostic c'est-à-dire à faible ou fort risque de développer des métastases (Cardoso et al., 2016). Il a été démontré que MammaPrint® est un marqueur pronostique indépendant des facteurs cliniques et pathologiques classiques tels que la taille de la tumeur, le statut des récepteurs hormonaux et le statut HER2. Ce test génomique est approuvé par la FDA depuis 2008 chez des patientes âgées de moins de 61 ans atteintes d'un cancer du sein hormono-dépendant ou non, de moins de 5 cm, sans atteinte ganglionnaire, et de stade I/II.

2. Signatures moléculaires de nouvelle génération : Prosigna® et EndoPredict®

Prosigna® (PAM50) et EndoPredict® sont les signatures moléculaires les plus récentes. Le test Prosigna® est appelé PAM50 pour Prediction Analysis of Microarrays. Il mesure l'expression de 50 gènes par RTqPCR permettant d'identifier les sous-types moléculaires du cancer du sein appelés luminal A, luminal B, HER2+ et de type basal (Parker et al., 2009). C'est une signature de survie sans métastase à 10 ans qui a été approuvée par la FDA en 2013. Différentes analyses ont montré que ce test est prédictif de la survie dans le cancer du sein indépendamment des variables clinico-pathologiques telles que l'état ganglionnaire, le RE et le grade tumoral (Chia et al., 2012; Nielsen et al., 2010).

-Introduction-

Le test EndoPredict® analyse l'expression de 12 gènes associés aux œstrogènes et à la prolifération cellulaire. Le score obtenu permet de prédire le risque de rechute à court et à long terme (Fitzal et al., 2015). Il est utile pour déterminer la pertinence d'une chimiothérapie chez les patientes atteintes d'un cancer du sein RE+.

Pour conclure, les tests génétiques prédisent le risque de récurrence dans les 10 ans à venir et ont prouvé leur efficacité. Cependant, les médecins français restent réticents à leur utilisation. Dans 20 à 30 % des cas, ils n'identifient pas les mêmes femmes à haut et bas risque que les examens clinico-pathologiques classiques. C'est pourquoi l'INCa préfère ne pas les recommander avant la publication de nouvelles études. Cependant, dans tous les pays où les tests génomiques sont réalisés, on assiste à une modification du plan thérapeutique initialement prévu dans 30 à 35 % des cas, le plus souvent vers la désescalade, avec une abstention de chimiothérapie. On pourrait donc estimer que chaque année, en France, des milliers de femmes pourraient éviter une chimiothérapie peut-être inutile. Le défi futur consiste donc à combiner ces tests génomiques aux examens classiques réalisés par l'anatomopathologiste.

VI. Traitements du cancer du sein

Suite au diagnostic et à la classification du cancer du sein, un traitement est décidé en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). Les différents types de traitement du cancer du sein sont la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et les thérapies ciblées.

A. La chirurgie

Le traitement par chirurgie est le plus souvent réalisé en premier. Il peut être suivi d'une chimiothérapie et/ou d'une radiothérapie. Dans certains cas, afin de réduire la taille de la tumeur et faciliter l'intervention chirurgicale, une chimiothérapie néoadjuvante précède la chirurgie. La chirurgie mammaire peut être conservatrice ou non. Dans le cas d'une chirurgie mammaire conservatrice on parle de tumorectomie. Les chirurgies mammaires non conservatrices sont appelées mastectomies.

La chirurgie conservatrice consiste à retirer la tumeur avec une marge saine afin de s'assurer d'avoir enlevé la totalité des cellules cancéreuses. Elle est toujours complétée d'une

radiothérapie. Elle est possible lorsque la tumeur est localisée à un seul endroit dans le sein et lorsqu'elle est suffisamment petite par rapport à la taille du sein. Le but est d'enlever toute la tumeur avec une marge saine suffisante pour éviter une récurrence et avec un résultat esthétique satisfaisant pour la patiente.

La chirurgie non conservatrice consiste à retirer la totalité du sein. Dans ce cas, une reconstruction mammaire et un soutien psychologique sont proposés à la patiente. La mastectomie est envisagée lorsque la tumeur est trop volumineuse, si la localisation ou la forme de la tumeur rend impossible la chirurgie conservatrice ou s'il y a plusieurs tumeurs dans le même sein.

En cas de tumeur infiltrante, la chirurgie s'accompagne d'une exérèse du ganglion sentinelle. Cette technique consiste à enlever le ou les premiers ganglions lymphatiques de l'aisselle pour vérifier, par analyse anatomopathologique, s'ils contiennent ou non des cellules tumorales. L'analyse est réalisée extemporanément pendant que la patiente reste sous anesthésie. L'objectif est de savoir si la tumeur s'étend au-delà du sein.

Si un envahissement ganglionnaire est observé au cours de l'analyse du ganglion sentinelle, le chirurgien réalise un curage axillaire ou curage ganglionnaire. Cette technique consiste à retirer une dizaine de ganglions lymphatiques de l'aisselle. Le but est d'enlever toutes les cellules cancéreuses qui auraient pu se propager jusqu'aux ganglions lymphatiques et ainsi diminuer le risque de formation de métastases. Le principal effet secondaire d'un curage axillaire est le gonflement du bras appelé lymphœdème ou « gros bras ».

B. La radiothérapie

La radiothérapie est utilisée en complément de la chirurgie pour le traitement des cancers du sein *in situ* et infiltrants. Le but est de détruire les cellules cancéreuses encore présentes malgré la chirurgie et ainsi diminuer le risque de récurrence. La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants à haute énergie émis en faisceaux. Ces rayons sont dirigés sur la zone à traiter, tout en préservant le plus possible les tissus sains et les organes voisins. Les rayons traversent la peau pour atteindre les tissus tumoraux et détruire les cellules cancéreuses. La radiothérapie de la glande mammaire est quasiment toujours réalisée après une chirurgie conservatrice. Après une chirurgie non conservatrice, une radiothérapie au niveau de la paroi thoracique est uniquement indiquée pour les cancers du sein infiltrants associés à des facteurs de risque de récurrence. Une étude en 2014 a montré que la radiothérapie après mastectomie

réduisait le risque de récurrence à 10 ans et la mortalité par cancer du sein à 20 ans (EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) et al., 2014). Une radiothérapie peut également être réalisée au niveau des ganglions lymphatiques après une chirurgie conservatrice ou non.

C. La chimiothérapie

Les médicaments de chimiothérapie sont cytotoxiques. Ils touchent les cellules cancéreuses à fort pouvoir prolifératif mais également les cellules saines d'où de nombreux effets indésirables. La chimiothérapie peut être néoadjuvante, c'est-à-dire qu'elle est administrée avant la chirurgie pour diminuer la taille de la tumeur, ou adjuvante une fois que la tumeur a été enlevée par chirurgie. Une association de plusieurs médicaments appelée poly-chimiothérapie est généralement utilisée afin d'augmenter l'efficacité du traitement. Différents protocoles de chimiothérapie sont utilisés pour le traitement du cancer du sein (**Tableau 6**). Le plus souvent, ils sont administrés en 4 à 6 séances tous les 21 jours. Les protocoles de chimiothérapie les plus courants sont les suivants :

- 4 à 6 cycles de FEC toutes les trois semaines
- 4 à 6 cycles de FEC suivis de 3 à 4 cycles de docetaxel toutes les trois semaines ou 9 à 12 cycles de paclitaxel toutes les semaines

FEC est l'acronyme pour trois médicaments : le 5FU ou 5-fluoro-uracile, le cyclophosphamide et l'épirubicine. Le 5FU est un antimétabolite analogue des pyrimidines. Il se comporte comme un faux substrat, il entre dans le circuit métabolique classique et entraîne une inhibition de la synthèse des nucléotides. Le cyclophosphamide est un agent alkylant de l'ADN. L'épirubicine est une anthracycline qui inhibe la topoisomérase II. Le docetaxel et paclitaxel sont des taxanes issus de l'If du Pacifique. Ils inhibent la dépolymérisation et stimule la polymérisation des microtubules ce qui entraîne la mort des cellules au cours de la mitose. Les taxanes sont également appelés poisons du fuseau.

Les principaux effets secondaires des chimiothérapies sont hématologiques avec une neutropénie (augmentant le risque d'infections), une anémie (fatigue) et une thrombopénie (augmentant le risque hémorragique) mais également gastriques avec des nausées et des vomissements, une perte des cheveux ou des troubles cardiaques.

SITUATION	POLY-CHIMIOOTHERAPIE	MEDICAMENTS	MECANISME D'ACTION
Cancer du sein HER2 négatif	FEC	5-FU	Antimétabolite analogue des pyrimidines
		Epirubicine	Anthracycline inhibiteur de topoisomérase
		Cyclophosphamide	Agent alkylant de l'ADN
	CMF	Cyclophosphamide	Agent alkylant de l'ADN
		Méthotrexate	Antimétabolite analogue de l'acide folique
		5-FU	Antimétabolite analogue des pyrimidines
	FAC	5-FU	Antimétabolite analogue des pyrimidines
		Doxorubicine (Adriblastine®)	Anthracycline inhibiteur de topoisomérase
		Cyclophosphamide	Agent alkylant de l'ADN
	TC	Docetaxel (Taxotère®)	Poison du fuseau
Cyclophosphamide		Agent alkylant de l'ADN	
Cancer du sein HER2 positif	FEC + trastuzumab	5-FU	Antimétabolite analogue des pyrimidines
		Epirubicine	Anthracycline inhibiteur de topoisomérase
		Cyclophosphamide	Agent alkylant de l'ADN
	AC + paclitaxel + trastuzumab	Trastuzumab	Anticorps anti-HER2
		Doxorubicine (Adriblastine®)	Anthracycline inhibiteur de topoisomérase
		Cyclophosphamide	Agent alkylant de l'ADN
		Paclitaxel	Poison du fuseau
	TCH	Trastuzumab	Anticorps anti-HER2
		Docetaxel (Taxotère®)	Poison du fuseau
		Cyclophosphamide	Agent alkylant de l'ADN
Trastuzumab (Herceptin®)		Anticorps anti-HER2	

Tableau 6 : Liste des protocoles de chimiothérapie utilisés en France pour le traitement du cancer du sein

D. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est indiquée dans les cas des cancers du sein de type luminal surexprimant les récepteurs aux œstrogènes et/ou à la progestérone. Ces cancers sont dits hormono-sensibles ou hormono-dépendants. En effet, plus l'expression des récepteurs est élevée, plus la tumeur répondra aux traitements d'hormonothérapie. L'hormonothérapie a pour but d'empêcher l'action stimulante des hormones ovariennes sur les cellules cancéreuses.

L'hormonothérapie est généralement commencée à la suite de la chimiothérapie. Il existe quatre catégories de médicaments utilisés dans l'hormonothérapie contre le cancer du sein : les anti-œstrogènes, les anti-aromatase, les analogues de la LH-RH et les progestatifs (Abdulkareem and Zurmi, 2012; Korkut et al., 1991; Tremont et al., 2017). Les traitements d'hormonothérapie sont généralement des traitements de longue durée (de 5 à 10 ans) nécessitant une bonne observance des patientes.

Les anti-œstrogènes sont des médicaments qui entrent en compétition avec les œstrogènes. Ils empêchent les œstrogènes de se fixer à leurs récepteurs en se fixant à leur place. Cela entraîne un blocage de l'activation du récepteur et des voies de signalisation en aval. Ils sont utilisés chez la femme ménopausée ou non. On distingue deux types d'anti-œstrogènes : les SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) comme le tamoxifène et les SERD (Selective Estrogen Receptor Down regulator) comme le fulvestrant. Le tamoxifène possède une AMM en France pour le traitement des cancers du sein RE+ depuis 1996 et le fulvestrant depuis 2004.

Les anti-aromatase sont des médicaments qui entrent en compétition et inhibent l'aromatase. L'aromatase est une enzyme responsable de la synthèse des œstrogènes chez la femme ménopausée. Les anti-aromatase sont donc indiqués dans le traitement du cancer du sein hormono-dépendant chez la femme ménopausée depuis 1996. Les médicaments utilisés en France sont l'anastrozole, le létrozole et l'exémestane.

Les agonistes de la LH-RH inhibent la production d'œstrogènes par les ovaires chez la femme non ménopausée en bloquant la sécrétion de LH et FSH. La LH-RH (ou GnRH) est une hormone produite par l'hypothalamus. Elle stimule l'hypophyse qui en réponse sécrète la LH et la FSH. Ces hormones vont stimuler les ovaires qui vont alors sécréter des œstrogènes et de la progestérone. Un agoniste est une substance qui peut prendre la place d'une autre substance et jouer son rôle du fait de sa ressemblance avec celle-ci. Les analogues de la LH-RH induisent une hyperstimulation de l'hypophyse qui finit par ne plus répondre et qui arrête de stimuler les

ovaires. Cela revient à induire une ménopause avec les symptômes qui lui sont associés (bouffées de chaleur, sudation excessive, diminution de la densité osseuse...). Les médicaments utilisés sont la goséréline et leuproréline.

A fortes doses, les progestatifs permettent d'inhiber l'axe hypothalamo-hypophysaire entraînant une inhibition de sécrétion d'œstrogènes, de cortisol et d'androgènes. Les médicaments utilisés sont l'acétate de médroxy-progestérone et l'acétate de mégestrol.

E. Les thérapies ciblées (Tableau 7)

La thérapie ciblée consiste en l'utilisation d'un médicament qui cible spécifiquement une protéine ou un mécanisme impliqué dans le développement de la tumeur. Le but est de s'attaquer aux cellules cancéreuses en touchant le moins possible les cellules normales. Différents types de thérapie ciblée sont utilisés dans le traitement du cancer du sein : les thérapies anti-HER2, anti-VEGF, anti-mTOR, anti-CDK et anti-PARP (The Lancet, 2017).

1. Thérapies ciblant le récepteur HER2 (cf chapitre 2 sur le cancer HER2 positif)
2. Thérapies ciblant le récepteur au VEGF

Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est un facteur de croissance impliqué dans l'angiogenèse. L'angiogenèse est définie comme le développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. L'angiogenèse est un processus vital qui se produit pendant le développement normal, la croissance et la cicatrisation. Cependant, ce processus est dérégulé dans le cancer, grâce à la capacité de la tumeur à sécréter des signaux qui stimulent l'angiogenèse. Le sang apporté par ces nouveaux vaisseaux permet à la tumeur de grandir et aux cellules de la tumeur primaire d'envahir localement les tissus voisins et former des métastases (Nagy et al., 2008). Le VEGF se lie à son récepteur transmembranaire VEGFR localisé à la membrane des cellules endothéliales. VEGFR est un récepteur à activité tyrosine kinase. La liaison du ligand à son récepteur induit la dimérisation du récepteur, sa phosphorylation et l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire impliquées dans l'angiogenèse (Cébe-Suarez et al., 2006; McMahon, 2000; Shibuya, 2011).

Le Bevacizumab (Avastin®) est le seul médicament anti-angiogénique utilisé dans le traitement du cancer du sein. C'est un anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF. Il inhibe la

Molécule	Nom commercial	Cible	Indications thérapeutiques
Trastuzumab	Herceptin	HER2	HER2+ métastatique en monothérapie ou en association avec paclitaxel/docetaxel/inhibiteur aromatase
			HER2+ précoce en monothérapie ou en association avec paclitaxel/docetaxel
Trastuzumab emtansine	Kadcyla		HER2+ métastatique ou localement avancé en monothérapie
Petuzumab	Perjeta		HER2+ métastatique ou localement avancé en association avec trastuzumab et chimiothérapie (Docétaxel)
Lapatinib	Tyverb		HER2+ métastatique ou localement avancé en association avec capécitabine
Bevacizumab	Avastin	VEGF	Métastatique en association à la chimiothérapie
Everolimus	Afinitor	mTOR	Hormono-dépendant avancé en association avec exemestane
Palbociclib	Ibrance	CDK4/6	Hormono-dépendant métastatique ou localement avancé en association avec fulvestrant ou inhibiteur d'aromatase
Olaparib	Lynparza	PARP	Triple négatif métastatique avec mutations BRCA en monothérapie
Talazoparib	Talzenna		

Tableau 7 : Liste des thérapies ciblées disposant d'une AMM en France pour le traitement du cancer du sein

liaison du VEGF à son récepteur entraînant une inhibition des voies de signalisation et de l'angiogenèse. Le bevacizumab fait régresser les vaisseaux tumoraux et inhibe la formation de nouveaux vaisseaux, stoppant ainsi la croissance de la tumeur qui n'est plus approvisionnée en nutriments et en oxygène (Ellis, 2006). Le bevacizumab possède une AMM en France pour le traitement des cancers du sein métastatiques depuis 2004. Il est utilisé en association avec le paclitaxel ou la capécitabine. Il est recommandé de poursuivre le traitement jusqu'à progression de la maladie. Malheureusement, il a été montré que ce traitement permet d'améliorer la survie sans progression (PFS) mais pas la survie globale (Miles et al., 2010; Sini et al., 2016).

3. Thérapies ciblant mTOR

mTOR (mammalian Target of Rapamycin) est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. Une fois activée par Akt, cette protéine forme des complexes (mTORC1 et mTORC2) permettant la régulation de gènes cibles. mTOR est impliqué dans de nombreux processus cellulaires : régulation de la synthèse protéique, régulation du cycle cellulaire, de l'angiogenèse, de l'apoptose et contrôle du métabolisme cellulaire de base (Chantal Dreyer et al., 2009). Les inhibiteurs de mTOR sont des dérivés de la rapamycine. Depuis 2012, l'évérolimus (Affinitor®) est indiqué dans le traitement des cancers du sein avancés, positifs pour les récepteurs hormonaux, en association avec l'exémestane chez la femme ménopausée après un échec de traitement par l'exémestane seul. L'évérolimus est un analogue de la rapamycine (Houghton, 2010). Le traitement doit être poursuivi aussi longtemps qu'un bénéfice clinique est observé ou jusqu'à la survenue d'une toxicité inacceptable.

4. Thérapie ciblant les CDK

Les CDK (Cyclin-Dependent Kinase) sont une classe de protéines kinases jouant un rôle dans la régulation du cycle cellulaire. En 2016, le palbociclib (Ibrance®), un inhibiteur des CDK4/6, a obtenu une AMM européenne pour le traitement des cancers du sein de type « luminal A » localement avancés ou métastatiques en association avec le fulvestrant ou un inhibiteur de l'aromatase. Selon les résultats de l'étude PALOMA-2, l'ajout du palbociclib améliore la survie sans progression de la maladie mais n'a pas d'effet sur la survie globale. De plus, une forte toxicité hématologique est fréquemment observée (Rugo et al., 2018).

5. Thérapies ciblant les protéines PARP

Les inhibiteurs de PARP sont des thérapies ciblées qui inhibent les protéines poly (ADP-ribose) polymérasas (PARP), qui sont impliquées dans la réparation de l'ADN simple brin (D'Andrea, 2018). Deux médicaments ont récemment obtenu une AMM en 2019 : l'olaparib (Lynparza®) et le talazoparib (Talzenna®). Ils sont indiqués dans le traitement des cancers du sein triples négatifs avancés ou métastatiques présentant une mutation des gènes BRCA (Geenen et al., 2018; Robson et al., 2017). Ils sont utilisés en seconde ligne après un traitement par anthracycline ou taxane. L'inhibition des PARP provoque des cassures doubles brins de l'ADN et l'apoptose des cellules tumorales avec mutation des gènes BRCA qui sont déficientes dans le processus de recombinaison homologue. Pour le moment, il n'existe pas de données concernant l'efficacité ou la sécurité de ces médicaments chez les patientes atteintes d'un cancer du sein.

F. L'immunothérapie

Depuis quelques années, le développement de l'immunothérapie est en plein essor. L'objectif général de l'immunothérapie est de favoriser l'activation du système immunitaire contre les cellules tumorales et induire leur destruction. Des succès d'immunothérapie anticancéreuse ont été observés dans de nombreux cancers comme le mélanome, le cancer du poumon ou les lymphomes. Cependant, l'efficacité de l'immunothérapie dans le traitement des cancers du sein n'a pas encore été prouvée. Bien que le nombre d'essais cliniques testant l'immunothérapie dans le cancer du sein soit en augmentation, aucune immunothérapie expérimentale n'a été approuvée à ce jour comme cela a été le cas pour d'autres types de cancers (Vonderheide et al., 2017).

1. PD-1/PD-L1

Une limite majeure de l'immunothérapie anticancéreuse est le fait que les cellules tumorales sont peu antigéniques, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas ou peu reconnues comme étrangères par le système immunitaire. Une des stratégies actuelles consiste donc à cibler les récepteurs des cellules immunitaires impliqués dans la tolérance comme par exemple PD1/PD-L1 (Programmed Death-1/Programmed Death Ligand-1) (Emens, 2018). PD-1 est un récepteur

-Introduction-

exprimé à la surface des lymphocytes T. PD-L1 est le ligand de PD-1 exprimé à la surface des cellules cancéreuses. L'interaction entre PD-1 et son ligand représente un des mécanismes d'échappement à la surveillance antitumorale. Aujourd'hui, trois anticorps inhibant cette interaction sont en cours d'étude clinique : le pembrolizumab (anti-PD-1), l'avelumab (anti-PD-L1), et l'atezolizumab (anti-PD-L1) (Emens, 2018). Cependant, l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales dans le cancer du sein est faible et variable. Pour les tumeurs triples négatives ou surexprimant le récepteur aux œstrogènes, seules 20 % des patientes présentent plus de 1 % de cellules tumorales exprimant PD-L1 (Cimino-Mathews et al., 2016; Rugo et al., 2016). Ces résultats montrent à nouveau à quel point les cancers du sein sont très hétérogènes. Bien que les cellules cancéreuses de carcinomes canaux *in situ* présentent des niveaux très faibles de PD-L1, il a été montré que 81 % des lésions contiennent des lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs Tumor Infiltrating Lymphocytes) qui expriment PD-L1 (Thompson et al., 2016). Les lymphocytes infiltrant la tumeur avec des niveaux élevés d'expression de PD-L1 n'ont été observés que dans les cancers canaux *in situ* triples négatifs. Ce résultat suggère un intérêt potentiel de ces anticorps dans le traitement des cancers du sein de type basal like et suggère également l'intérêt des TILs comme marqueur prédictif de réponse à cette immunothérapie (Mittendorf et al., 2014). Malheureusement, différentes études ont montré que les anticorps anti-PD-1 et anti-PD-L1 présentent des taux de réponse faibles (de 12 à 20 %) chez des patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif (Emens et al., 2016; Nanda et al., 2016). Aujourd'hui, des essais cliniques sont toujours en cours afin d'étudier l'efficacité de ce type d'immunothérapie contre le cancer du sein en combinaison avec d'autres traitements (Ayoub et al., 2019).

2. CTLA-4

Deux anticorps monoclonaux humanisés anti-CTLA-4 sont étudiés en clinique pour le traitement du cancer du sein : le tremelimumab (Vonderheide et al., 2010) et l'ipilimumab (McArthur et al., 2016). CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) est un récepteur protéique qui fonctionne comme un point de contrôle des réponses immunitaires. CTLA-4 est surexprimé après l'activation des cellules T, liant CD80/CD86 pour transmettre un signal inhibiteur aux cellules T (Pardoll, 2012). CTLA-4 représente donc une cible thérapeutique importante dans le traitement du cancer. Cependant, il a été montré que le blocage de CTLA-4 par le tremelimumab chez des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique

ER+ présente une activité clinique limitée (Vonderheide et al., 2010). De nombreux essais cliniques étudiant le rôle des anticorps anti-CTLA-4 dans les cancers du sein sont en cours ainsi que l'étude de combinaisons d'anticorps anti-PD-1 et anti-CTLA-4 (Ayoub et al., 2019).

3. La vaccination thérapeutique

Le meilleur moyen d'induire une réponse immunitaire est naturellement le vaccin. Le but de la vaccination thérapeutique est de provoquer une réaction du système immunitaire spécifiquement contre les cellules cancéreuses en induisant la production d'anticorps. Un défi pour les vaccins antitumoraux est que les antigènes tumoraux sont également des auto-protéines normales non mutées qui ne sont pas reconnues par le système immunitaire, ce qui rend difficile de concevoir des peptides tumoraux qui provoqueraient une forte réponse immunitaire. Récemment, un laboratoire a montré que l'introduction d'une modification post-traductionnelle, la conversion d'un résidu d'acide aspartique en un résidu iso-aspartique supprime cette auto-tolérance. Ils ont généré des peptides homologues à EGFR, HER2 et HER3 possédant cette modification. Ils ont montré que l'injection de ces peptides chez la souris induisait une réponse immunitaire par production d'anticorps anti-EGFR et entraînait une inhibition de la croissance des cellules exprimant HER2 (Doyle et al., 2018). Cette stratégie présente donc un avenir prometteur dans le traitement des cancers du sein HER2+. Tout comme les autres traitements d'immunothérapie, de nombreux essais cliniques sur des immunothérapies vaccinales à base de peptides sont en cours pour le traitement du cancer du sein (Ayoub et al., 2019).

4. Les cellules CAR-T

Les cellules CAR-T (ou CAR-T cells) signifient cellules T à récepteur antigénique chimérique (Chimeric Antigen Receptor). Les cellules CAR-T constituent une nouvelle forme d'immunothérapie en plein développement. Les propres lymphocytes T d'un patient sont modifiés génétiquement afin que ceux-ci puissent reconnaître et détruire les cellules cancéreuses. En effet, une protéine chimérique spécifique est exprimée par modification génétique à la surface des lymphocytes T, leur permettant alors de reconnaître les cellules cancéreuses (Lim and June, 2017). Une fois modifiés, les lymphocytes T sont réinjectés au patient. Dans le cas des cancers hématologiques, des résultats cliniques impressionnants ont été obtenus avec la thérapie cellulaire CAR-T. Deux CAR-T cells disposent d'une AMM en France

pour le traitement des lymphomes : Yescarta® et Kymriah® (Fala, 2018; Zheng et al., 2018). Cependant, concernant le cancer du sein, les cellules CAR-T sont encore aux premiers stades de développement ou ont échoué. Par exemple, l'utilisation de cellules CAR-T spécifiques de HER2 a montré des régressions de la maladie chez quelques patientes atteintes de cancers HER2+ avancés mais des effets secondaires mortels comme une détresse respiratoire et un relargage de cytokines ont été observés (Disis et al., 2014; Morgan et al., 2010).

5. Les TILs comme marqueur pronostique et prédictif de réponse thérapeutique

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène qui nécessite des marqueurs prédictifs de réponse thérapeutique. Les lymphocytes infiltrant la tumeur forment un sous-groupe de leucocytes qui jouent un rôle central dans le microenvironnement tumoral par le biais des facteurs qu'ils sécrètent, entraînant ainsi des activités pro- ou anti-tumorales. Parmi les TILs, on retrouve par exemple les macrophages associés aux tumeurs, les cellules T helper, les cellules T cytotoxiques, les cellules T régulatrices, les cellules B ou encore les cellules dendritiques (Salgado et al., 2015a). Dans le cancer du sein, une infiltration étendue de la tumeur par les cellules T cytotoxiques CD8+ a été fortement associée à la survie des patientes et à la réponse thérapeutique (Mahmoud et al., 2011; Seo et al., 2013). Les TILs sont plus nombreux dans le cancer du sein triple négatif (TNBC) que dans les autres sous-types moléculaires de la maladie. En effet, il a été montré que l'infiltration de lymphocytes dans la tumeur est un marqueur indépendant de la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif (Liu et al., 2012; Savas et al., 2016). Dans le cancer du sein HER2+, les TILs permettent également de prédire la survie globale des patientes. De plus, l'étendue des TILs permet de prédire une meilleure réponse à certaines thérapies, notamment la chimiothérapie dans le cas du cancer du sein TNBC et le trastuzumab dans le cas du cancer du sein HER2+ (Stanton and Disis, 2016). Ces marqueurs prédictifs s'appliquent donc à la fois à la chimiothérapie à base d'anthracyclines et à la thérapie ciblée à base de trastuzumab. La valeur prédictive des TILs dans les cancers du sein surexprimant le récepteur aux œstrogènes n'est pas encore claire. Le marquage hématoxyline/éosine et l'immunohistochimie ont été les principaux outils de caractérisation des TILs dans le cancer du sein (Salgado et al., 2015b). Ainsi, le degré d'infiltration en TILs pourrait devenir non seulement un marqueur pronostique majeur, mais également un marqueur prédictif de réponse au traitement, particulièrement dans les cancers du sein triple-négatifs et HER2+ (Lacroix-Triki and Penault-Llorca).

En conclusion, le développement de l'immunothérapie dans le traitement des cancers du sein représente un enjeu majeur. De nombreux essais cliniques sont en cours afin d'étudier l'efficacité de traitements alliant immunothérapie, chimiothérapie et thérapie ciblée.

G. L'apport du séquençage sur cellule unique dans le traitement du cancer du sein

L'essor des technologies de séquençage sur cellule unique (single-cell sequencing) revêt un grand intérêt en cancérologie, en particulier dans le domaine du cancer du sein. Cette technologie est définie comme un processus qui vise à séquencer une seule cellule à la fois permettant ainsi d'étudier l'hétérogénéité cellulaire et d'obtenir une cartographie moléculaire des tumeurs (Tang et al., 2019). Bien que les classifications moléculaires des cancers du sein aient apporté un meilleur rationnel pour le choix des traitements, la maladie est très hétérogène. L'hétérogénéité des cellules tumorales peut être masquée par les méthodes traditionnelles de séquençage qui ne peuvent détecter que des populations de cellules. C'est pourquoi de nombreux programmes de recherche étudient l'hétérogénéité au sein des tumeurs par des méthodes de single-cell sequencing (Lawson et al., 2018). Ces méthodes permettent d'étudier l'évolution des génomes au sein des tumeurs et au cours de la progression de la maladie en étudiant les cellules tumorales circulantes. Par exemple, il est possible de savoir si des sous-populations invasives émergent directement de sous-populations *in situ* dans les cancers du sein de stade précoce, ou s'il s'agit de sous-populations de cellules évoluant indépendamment (Casasent et al., 2018; Navin et al., 2011; Wang et al., 2014). De plus, les technologies de séquençage sur cellule unique permettent également d'explorer le micro-environnement tumoral du cancer du sein afin notamment d'identifier des différences dans l'expression génique des cellules immunitaires infiltrant la tumeur (Azizi et al., 2018; Chung et al., 2017).

Enfin, les techniques de séquençage sur cellule unique ont également été utilisées afin d'étudier la chimiorésistance chez des patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif (Kim et al., 2018). Dans cette étude, les auteurs ont révélé par séquençage sur cellule unique que les aberrations génomiques résistantes sont préexistantes au traitement et sont sélectionnées de manière adaptative au cours du traitement. La chimiothérapie induit une reprogrammation transcriptionnelle des signatures résistantes préexistantes (Brady et al., 2017; Kim et al., 2018).

Ainsi, l'analyse du génome d'une seule cellule pourrait avoir une utilité clinique dans le traitement du cancer du sein. En effet, cette technique de séquençage permet de mieux

-Introduction-

caractériser les cancers du sein qui sont très hétérogènes, de suivre la progression de la maladie et d'adapter de manière plus spécifique les traitements en fonction de l'évolution de la maladie.

En conclusion, le cancer du sein dispose d'un large panel de médicaments qui permet aujourd'hui une médecine personnalisée. La médecine personnalisée est définie comme l'administration du médicament le plus adapté au patient, au meilleur moment et à la posologie la plus efficace si possible sans effets indésirables. Ainsi, le développement de nouvelles thérapies ciblées, de l'immunothérapie et de nouveaux tests prédictifs de réponse thérapeutique afin d'éviter des traitements inadaptés représente les défis actuels des traitements du cancer du sein.

CHAPITRE 2 : LE CANCER DU SEIN HER2 POSITIF

Les cancers du sein HER2+, caractérisés par une amplification et une surexpression du proto-oncogène HER2, représentent 15 à 20% des cancers du sein et forment l'un des principaux sous-types moléculaires de la maladie (Perou et al., 2000). Dans ce second chapitre, le récepteur et l'amplicon HER2 et son implication dans le cancer seront décrits ainsi que les thérapies ciblées anti-HER2 et les mécanismes de résistance à ces traitements.

I. Le récepteur transmembranaire HER2

A. Les récepteurs tyrosine kinase

La transduction du signal est un mécanisme qui permet à une cellule de réguler des cascades de signalisation et des processus cellulaires internes suite à la fixation extracellulaire d'un messager sur un récepteur membranaire spécifique. Parmi ces récepteurs, on trouve par exemple les récepteurs couplés à une protéine G, les récepteurs sérine/thréonine kinase et les récepteurs tyrosine kinase (RTK). Les RTKs ont été découverts il y a 38 ans par Hunter et Sefton (Hunter and Sefton, 1980). Environ 20% du génome humain code pour des protéines impliquées dans la transduction du signal. Ces protéines sont des kinases et des phosphatases qui permettent une régulation de la phosphorylation dans les cascades de signalisation intracellulaire. Il existe de nombreuses familles de récepteurs tyrosine kinase comme les récepteurs de la famille de l'EGFR, les récepteurs à l'insuline, les récepteurs au VEGF, les récepteurs PDGFR ou encore le récepteur au facteur de croissance des hépatocytes c-Met. Dans ce chapitre, nous nous consacrerons au récepteur HER2 qui appartient à la famille des récepteurs de l'EGFR.

B. Découverte d'HER2

Neu est le gène homologue de *HER2* chez le rongeur. Ils possèdent 88% d'homologie de séquence. *HER2* et *neu* ont été identifiés et nommés indépendamment au début des années 1980 à partir de modèles de rongeurs et de modèles humains. *Neu* a initialement été décrit comme un oncogène transformant découvert dans un modèle de tumeur cérébrale induite par un cancérogène chez le rat (Shih et al., 1981). Ce gène *Neu* s'est révélé être homologue à

l'oncogène viral *v-erbB* (virus de l'érythroblastose aviaire) et au gène codant pour le récepteur au facteur de croissance épidermique (*EGFR*) (Schechter et al., 1985). De plus, dans des études parallèles, un gène proche d'*EGFR* a été retrouvé amplifié dans des cancers du sein humains (King et al., 1985). Du fait de son homologie avec le gène *EGFR* aussi appelé *HER1*, ce gène a été nommé *HER2*. En 1987, Dennis Slamon a démontré que l'amplification du gène *HER2* dans les cancers du sein représente un facteur de mauvais pronostic (Slamon et al., 1987). En effet, l'amplification de *HER2* est associée à une évolution défavorable de la maladie due à une augmentation des capacités de prolifération et de croissance des cellules tumorales (Moasser, 2007). Quelques années plus tard, la caractérisation du génome a permis de compléter la description des récepteurs de la famille de l'EGFR. Cette famille est composée de quatre membres notés HER1 (ou EGFR), HER2 (erbB2/neu), HER3 (erbB3) et HER4 (erbB4) (Moasser, 2007).

C. Rôle physiologique de HER2

HER2 est une protéine ubiquitaire exprimée dans l'ensemble des tissus humains. HER2 est retrouvée en plus grande quantité dans la peau, le poumon, les tissus musculaires, le tractus gastro-intestinal, les seins, l'utérus et le placenta (Press et al., 1990). HER2 possède une fonction physiologique dans l'organogenèse. Il est principalement impliqué dans le développement du cœur (Negro et al., 2004). Il semble que la protéine HER2 joue un rôle protecteur pour le cœur lorsqu'il est soumis à différents stress comme lors d'hypertension artérielle. En effet, l'activation des récepteurs HER2 favorise l'hypertrophie et la prolifération des cellules musculaires cardiaques (cardiomyocytes) adultes et embryonnaires (Gordon et al., 2009). HER2 réduit également l'apoptose des cardiomyocytes et participe à leurs mécanismes de réparation. C'est pourquoi les souris invalidées pour HER2 meurent avant le 11^{ème} jour de développement embryonnaire des suites d'une malformation cardiaque (Lee et al., 1995). HER2 est également impliquée dans le développement normal de la glande mammaire. Il a été montré que des souris transgéniques exprimant un dominant négatif de HER2 présentent un retard dans le développement mammaire et la lactation (Jackson-Fisher et al., 2004).

D. Structure du récepteur HER2

HER2 est codé par le gène *HER2/neu* situé sur le chromosome 17q12. La protéine HER2 est une glycoprotéine membranaire constituée de 1255 acides aminés et pesant 185 kDa. HER2 est présent à la surface des cellules sous forme monomérique. Les récepteurs de la famille de l'EGFR possèdent une structure commune (Moasser, 2007). La structure des domaines principaux de ces récepteurs a été obtenue par cristallographie (Aertgeerts et al., 2011; Bocharov et al., 2008; Cho et al., 2003; Garrett et al., 2003). Les récepteurs tyrosine kinase comme HER2 sont des protéines de type I, c'est-à-dire que la partie N-terminale de la protéine est située dans le milieu extracellulaire et la partie C-terminale dans le cytoplasme de la cellule. Ils possèdent trois domaines fonctionnels : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase (Figure I7).

- Le domaine extracellulaire est un domaine de liaison au ligand composé de quatre sous-domaines. Il est constitué de deux régions se liant au ligand et de deux régions riches en cystéines impliquées dans la dimérisation du récepteur. Il existe dans une conformation fermée inactive ou ouverte active en fonction de la liaison du ligand. Contrairement aux autres membres de la famille HER, HER2 ne possède pas de ligand connu (Burgess et al., 2003). Le domaine extracellulaire de HER2 reste en conformation ouverte similaire à celle du récepteur EGFR activé après fixation de son ligand. Cette conformation ouverte permet d'exposer la boucle de dimérisation de HER2 à la surface des cellules. HER2 existe donc dans une conformation favorable à la dimérisation, c'est pourquoi ce récepteur est un partenaire privilégié de dimérisation.
- Le segment transmembranaire est une simple hélice constituée d'une courte séquence d'acides aminés hydrophobes (environ 23 résidus) permettant aux récepteurs de s'ancrer dans la membrane plasmique des cellules. Le domaine transmembranaire joue également un rôle dans la dimérisation en stabilisant le dimère formé.
- Le domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase est impliqué dans la transduction du signal. Le domaine intracellulaire est composé d'un domaine juxta-membranaire, d'un domaine catalytique tyrosine kinase et d'une région carboxy-terminale. Le domaine kinase est constitué de deux lobes, l'un du côté N-terminal qui comprend des feuillets β et une hélice α et l'autre du côté C-terminal qui comprend principalement des hélices α . Entre ces deux lobes se trouve un sillon où se fixe l'ATP. L'ATP apporte le groupement phosphate qui sera ajouté sur les fonctions alcool des tyrosines.

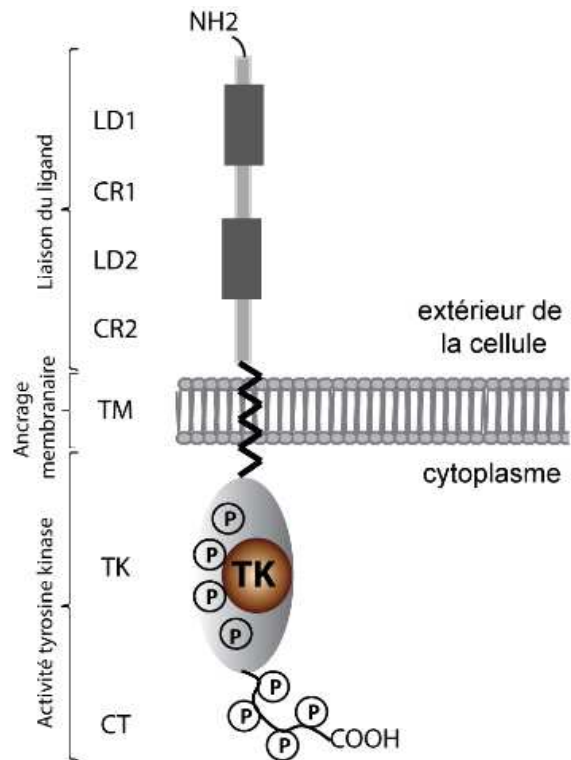


Figure I7 : Structure des récepteurs de la famille de l'EGFR

Les récepteurs de la famille de l'EGFR sont des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase. Ils possèdent deux régions se liant au ligand (LD1 et LD2), deux régions riches en cystéines (CR1 et CR2), un domaine transmembranaire (TM), un domaine à activité tyrosine kinase (TK) et une queue carboxy-terminale. (D'après Moasser, 2007)

E. Mécanisme d'action d'HER2

HER2 est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase qui active des voies de signalisation intracellulaire en réponse à des signaux extracellulaires. Il joue un rôle central dans l'initiation, l'invasion et la progression métastatique de nombreux cancers dont les cancers du sein, du poumon et de l'estomac (Hynes and MacDonald, 2009). En absence de ligand, les récepteurs existent sous forme monomérique. La liaison du ligand sur le domaine extracellulaire du récepteur de la famille de l'EGFR induit un changement de conformation de ce domaine entraînant l'activation du récepteur et sa dimérisation (Lemmon, 2009). Cependant, pour HER2, aucun ligand n'a été identifié à ce jour. Dans les cancers, c'est la surexpression d'HER2 qui entraîne sa dimérisation et stimule l'activité tyrosine kinase intrinsèque du récepteur. Le bras de dimérisation du récepteur HER2 est donc constitutivement actif et exposé à ses partenaires de dimérisation. HER2 forme préférentiellement des hétérodimères avec les récepteurs EGFR et HER3. La signalisation est induite par la liaison des ligands à ces deux partenaires. Les principaux ligands de l'EGFR sont le facteur de croissance épidermique EGF, le facteur de croissance transformant- α ou TGF- α , le facteur de croissance de type EGF fixant l'héparine ou HB-EGF, l'amphiréguline et l'épiréguline (Singh et al., 2016). Quant à HER3, il possède comme ligand principal l'héréguline ou neuréguline (Kawakami and Yonesaka, 2016). La dimérisation des récepteurs entraîne l'activation du site catalytique kinase qui déclenche la phosphorylation des résidus tyrosine au sein du domaine cytoplasmique (Maruyama, 2014). C'est une transphosphorylation, chaque récepteur pourra phosphoryler son partenaire de dimérisation. La proximité engendrée par la dimérisation des récepteurs suffit à déclencher la phosphorylation des tyrosines et ne nécessite aucun changement conformationnel. Les résidus de tyrosine phosphorylés permettent ensuite le recrutement de molécules de signalisation intracellulaire entraînant l'activation de différentes voies de signalisation (**Figure I8**) (Broutin and Ducruix, 2000). En effet, la phosphorylation des résidus tyrosines du domaine kinase génère des sites de fixation pour les protéines de signalisation pouvant reconnaître des séquences contenant des phosphotyrosines. Une cascade de signalisation est ensuite activée dans le cytoplasme des cellules. La transduction du signal se poursuit ensuite dans le noyau, où la transcription de gènes cibles est régulée. Ainsi, la surexpression de HER2 dans les cancers dérégule les voies de signalisation et favorise les processus de cancérisation.

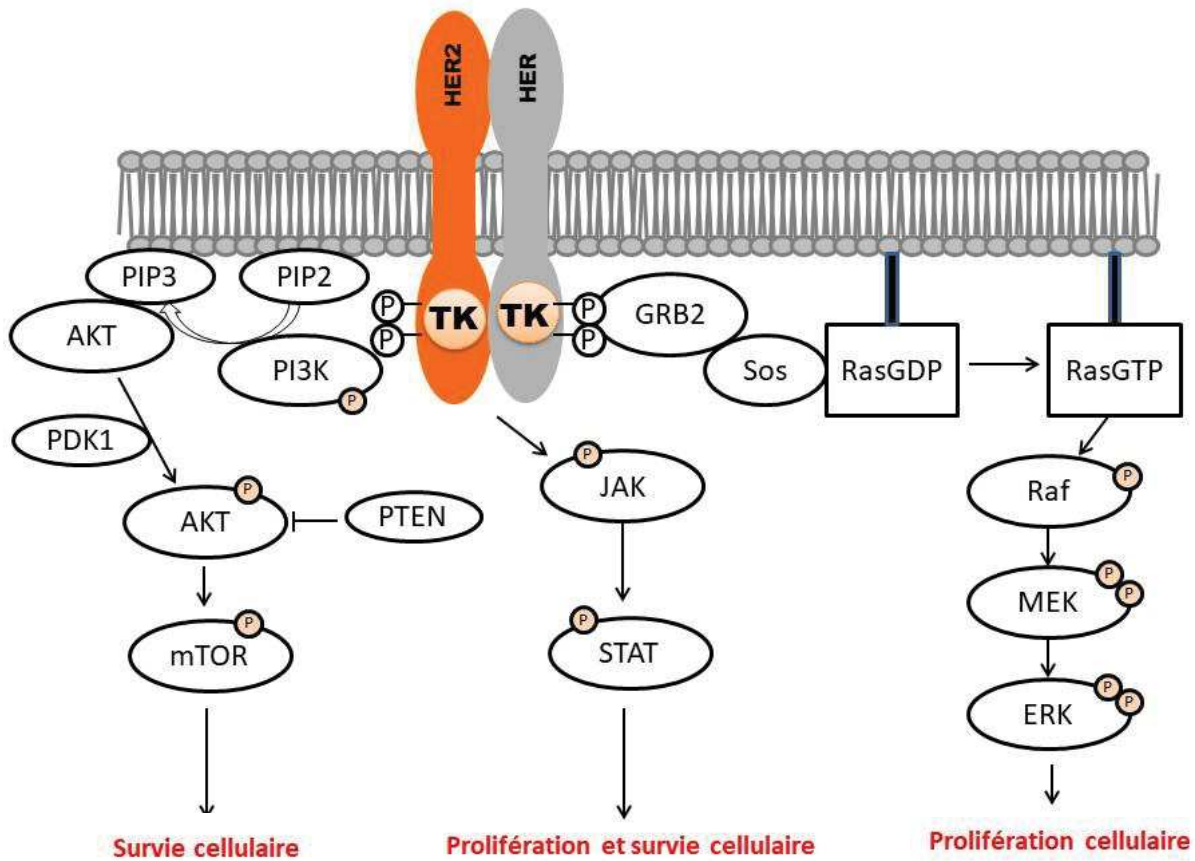


Figure I8 : Récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (EGFR/HER2) et voies de signalisation sous-jacentes favorisant la croissance tumorale

L'activation des récepteurs de la famille de l'EGFR entraîne l'activation de la voie JAK/STAT et de la voie PI3K/AKT/mTOR. Ras, une GTPase monomérique active lorsqu'elle est liée au GTP, est également activée. Le récepteur membranaire interagit avec Sos par l'intermédiaire de GRB2. Sos permet l'échange de GDP en GTP. L'activation de Ras va activer la voie Ras/Raf/MAPK. Ces voies de signalisation vont favoriser la transcription de gènes cibles favorisant la survie cellulaire, la prolifération cellulaire, l'invasion et l'angiogenèse.

F. Voies de signalisation issues de HER2

La dimérisation et la phosphorylation du récepteur HER2 entraînent l'activation de voies de signalisation intracellulaire responsables de différents effets biologiques. HER2 permet d'activer plusieurs voies de signalisation : la voie Ras/Raf/MAPK, la voie PI3K/Akt/mTOR et la voie JAK/STAT. Ces voies de signalisation vont favoriser la transcription de gènes cibles impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération cellulaire, l'invasion et l'angiogenèse (**Figure I8**) (Hynes and MacDonald, 2009; Olayioye et al., 2000; Yarden and Sliwkowski, 2001).

1. La voie PI3K/Akt/mTOR

La voie PI3K/Akt/mTOR est une voie de signalisation intracellulaire jouant un rôle clé dans la régulation de l'apoptose, de la croissance cellulaire, du cycle cellulaire et de l'angiogenèse. Elle est également appelée « voie de survie cellulaire » et est fréquemment dérégulée dans les cancers (Chantal Dreyer et al., 2009). Cette voie comprend différentes protéines qui sont des gènes suppresseurs de tumeurs ou des proto-oncogènes.

La partie intracellulaire de HER2 sert d'amarrage à la sous-unité régulatrice p85 de PI3K (phosphoinositide 3 kinase). PI3K est une kinase constituée de deux protéines : une sous-unité régulatrice p85 et une sous-unité catalytique p110. PI3K est directement phosphorylée par HER2. Une fois activée, PI3K transforme le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃) au niveau de la membrane plasmique. Le gène suppresseur de tumeur PTEN a pour rôle de déphosphoryler le PIP₃ en PIP₂. Le PIP₃ permet ensuite le recrutement de la sérine/thréonine kinase Akt (protéine kinase B) au niveau de la membrane plasmique où elle est phosphorylée par PDK1 (phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1). Akt phosphorylée va ensuite phosphoryler à son tour mTOR (**Figure I8**) (Ersahin et al., 2015). La protéine mTOR est une enzyme à activité sérine/thréonine kinase de 289 kDa. Pour être active, mTOR forme des complexes multiprotéiques : mTORC1 dans lequel il est associé à RAPTOR ou mTORC2 dans lequel il est associé à RICTOR. mTOR est impliquée dans la régulation de la synthèse protéique, la régulation du cycle cellulaire, dans l'apoptose et dans le contrôle du cytosquelette (Laplante and Sabatini, 2009). Par exemple, mTOR régule la traduction de la cycline D1 impliquée dans la progression du cycle cellulaire ou encore HIF1 (Hypoxia inducible factor) impliqué dans l'angiogenèse. La localisation et la fonction du

complexe mTORC1 a mis en lumière le rôle fondamental du lysosome. Cet organite est maintenant considéré comme un senseur et un régulateur essentiel du métabolisme cellulaire (Settembre et al., 2013).

2. La voie Ras/Raf/MAPK

La voie Ras/Raf/MAPK joue un rôle clé dans la régulation de la prolifération, de la différenciation, de la migration cellulaire et de l'angiogenèse (Li et al., 2016; Lièvre and Laurent-Puig, 2010; McCubrey et al., 2007). Elle est principalement appelée « la voie de la prolifération cellulaire » et est souvent dérégulée dans les cancers. Elle est en général activée par le biais d'un récepteur membranaire de la famille de l'EGFR. Une cascade de phosphorylation est ensuite activée.

Les protéines Ras sont des GTPases qui jouent un rôle important dans la transmission de signaux cellulaires (Grunicke and Maly, 1993). Ces protéines sont ancrées au niveau de la face interne de la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Elles oscillent entre un état actif lié au GTP (Guanosine Tri-Phosphate) permettant d'activer différentes molécules intracellulaires et un état inactif lié au GDP (Guanosine Di-Phosphate). Le remplacement du GDP en GTP est réalisé par des protéines GEF (Guanine Exchange Factor) et l'hydrolyse du GTP en GDP par les protéines GAP (GTPase-Activating Proteins) (Bos et al., 2007). Les protéines Ras sont activées par la protéine Sos qui fait partie des protéines GEF (Margolis and Skolnik, 1994). Sos interagit avec le récepteur tyrosine kinase grâce à la protéine GRB2. En effet, la protéine GRB2, une protéine adaptatrice des récepteurs HER2, interagit avec la forme phosphorylée de HER2 par son domaine SH2 et avec la protéine Sos par son domaine SH3. Sos transforme ensuite Ras GDP en Ras GTP (**Figure I8**). Puis, les protéines Ras activent et phosphorylent les protéines de la famille Raf qui sont des sérine-thréonine kinases (ARAF, BRAF, CRAF) (Jelinek et al., 1996; Wan et al., 2004). Raf est ensuite responsable de l'activation par phosphorylation de la MAPK ou MEK. A son tour, MEK active par double phosphorylation ERK, ce qui entraîne sa translocation dans le noyau et l'activation de gènes codant pour des facteurs de transcription (Shaul and Seger, 2007).

3. La voie JAK/STAT

La voie JAK/STAT est principalement impliquée dans la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et la réponse immunitaire (Amoyel et al., 2014; Blouin et al., 2016; Jang and Baik, 2013; Rawlings et al., 2004). La famille des protéines JAK (Janus Kinase) comporte quatre membres notés JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 qui sont des tyrosine kinases. Les protéines STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) sont à la fois des transmetteurs du signal et des activateurs de la transcription. On en dénombre 7 chez les mammifères, de STAT1 à STAT7. Elles sont présentes sous forme de monomères inactifs dans le cytoplasme.

La dimérisation du récepteur HER2 et sa phosphorylation permettent l'association et le recrutement des protéines JAK et STAT au niveau du récepteur. Une fois activée par HER2, JAK phosphoryle les protéines STAT sur des résidus tyrosine (**Figure I8**) (Bromberg, 2001; Garcia and Jove, 1998). Cette phosphorylation permet la dimérisation (homo- ou hétérodimérisation) des STAT et leur migration dans le noyau où elles se fixent aux séquences promotrices de gènes cibles jouant ainsi le rôle de protéines activatrices de la transcription (Bromberg and Darnell, 2000). Cette double capacité des protéines STAT à répondre à un signal extracellulaire et à favoriser la transcription est à l'origine de leur nom.

G. Endocytose et dégradation de HER2

L'endocytose et le transport intracellulaire des récepteurs est un processus essentiel pour la régulation de la signalisation (Gonnord et al., 2012). Mais à nouveau, HER2 ne se comporte pas comme les autres récepteurs tyrosine kinase. Contrairement aux autres membres de la famille des récepteurs de l'EGFR, HER2 serait résistant à l'internalisation et à la dégradation (Bertelsen and Stang, 2014). La conclusion selon laquelle HER2 résiste à l'endocytose repose en partie sur sa distribution, sans localisation détectable dans les endosomes, même après incubation avec un inhibiteur du recyclage (Longva et al., 2005). HER2 reste donc à la surface de la cellule pour assurer la transduction du signal sur de longues périodes après son activation. Les mécanismes qui expliquent la rétention de HER2 à la surface cellulaire ne sont pas complètement compris à ce jour. HER2 n'ayant pas de ligand connu, son internalisation est difficile à étudier. L'interaction entre HER2 et HSP90 semble être le principal mécanisme rendant HER2 résistant à l'internalisation. En effet, les inhibiteurs d'HSP90 entraînent

-Introduction-

l'internalisation et la dégradation du récepteur HER2 (Pedersen et al., 2008; Tikhomirov and Carpenter, 2000). Il est possible que l'interaction entre HER2 avec HSP90 retienne physiquement le récepteur au niveau de la membrane plasmique. Aussi, HSP90 peut garder HER2 dans une conformation dans laquelle les signaux pour l'internalisation ne sont pas reconnus. De plus, des études ont montré que HER2 doit interagir avec la protéine chaperonne HSP90 et la pompe à calcium PMCA2 (Plasma Membrane Calcium ATPase2) dans des domaines spécifiques de la membrane plasmique formant des protrusions afin de rester à la surface cellulaire (Hommelgaard et al., 2004; Jeong et al., 2016, 2017). En effet, la signalisation issue de HER2 elle-même est importante pour la formation et le maintien de ces protrusions, au moins en partie, en maintenant l'expression de PMCA2 et en prévenant une augmentation des concentrations de calcium intracellulaire (Jeong et al., 2016). L'inhibition pharmacologique de la signalisation HER2 entraîne la déplétion des protrusions membranaires et la perturbation des interactions entre HER2 et HSP90. Ceci est associé à l'ubiquitination de HER2, à son internalisation avec EGFR ou HER3 et à sa dégradation dans la voie endo-lysosomale (Jeong et al., 2017). Ces résultats suggèrent donc un modèle par lequel un certain seuil de signalisation HER2 est requis pour la formation et le maintien de complexes protéiques qui renforcent et prolongent la signalisation HER2/EGFR ou HER2/HER3 en inhibant l'ubiquitination et l'internalisation de HER2. Aussi, l'expression de HER2 est associée à une diminution générale de l'endocytose médiée par la clathrine (Cortese et al., 2013; Haslekås et al., 2005). Cela indique que la surexpression d'HER2 elle-même est responsable de son faible taux d'internalisation.

Cependant, certaines études ont montré que la localisation de HER2 au niveau de la membrane plasmique est un processus dynamique gouverné par des mécanismes d'endocytose et de recyclage (Austin et al., 2004). En 2000, Harari et Yarden montraient que les dimères EGFR-HER2 et HER2-HER3 étaient endocytés grâce aux puits recouverts de clathrine induisant le recyclage ou la dégradation des récepteurs (Harari and Yarden, 2000). De plus, il a également été montré que HER2 est localisé au niveau de domaines de la membrane plasmique riches en cavéoles (Nagy et al., 2002). Les cavéoles sont des sous-domaines des radeaux lipidiques qui sont dérégulés dans les cancers et enrichis en cholestérol et sphingolipides (Parton et al., 2020). Il a été montré récemment que la déplétion de Cav-1, une des principales protéines composant les cavéoles, augmente la demi-vie et la disponibilité de HER2 au niveau de la membrane plasmique (Pereira et al., 2018). Ce résultat suggère que HER2 serait endocyté par un mécanisme dépendant des cavéoles.

-Introduction-

Le trafic intracellulaire d'HER2 reste un sujet controversé avec deux modèles principaux qui s'affrontent et expliquent chacun à leur manière la présence prédominante du récepteur à la membrane plasmique. Dans un premier modèle, HER2 est rapidement recyclé après son endocytose alors que dans un second modèle, les dimères contenant HER2 sont retenus à la surface de la cellule et résistent à l'endocytose.

II. HER2 et cancer

HER2 est un proto-oncogène, c'est-à-dire un régulateur positif de la prolifération cellulaire qui est présent normalement dans le génome mais qui suite à une altération, devient un oncogène. Un oncogène est un gène dont l'expression permet la survenue de cancers. Un proto-oncogène peut être activé en oncogène par différents processus génétiques :

- Une mutation
- Une augmentation de la quantité de protéine due à une dérégulation transcriptionnelle, une duplication/amplification du gène ou une augmentation de la stabilité de l'ARNm
- Une translocation chromosomale

Dans le cas d'HER2, le proto-oncogène est principalement transformé en oncogène par amplification et surexpression.

A. Surexpression de HER2

La surexpression d'un gène est définie comme l'augmentation de la quantité d'ARNm transcrite alors que l'amplification est l'augmentation du nombre de copies d'ADN du gène. Pour HER2, la surexpression peut provenir soit d'une amplification du nombre de copies du gène soit d'une dérégulation transcriptionnelle.

HER2 est amplifié et surexprimé dans 15 à 20 % des cancers du sein représentant un sous-type moléculaire de la maladie (cancer du sein HER2+). Il y a une corrélation entre le nombre de copies du gène HER2 et sa surexpression (Venter et al., 1987). Les cancers du sein peuvent avoir jusqu'à 25 à 50 copies du gène HER2 et jusqu'à 40 à 100 fois plus de protéine HER2 exprimée, entraînant jusqu'à 2 millions de récepteurs exprimés à la surface des cellules tumorales (Kallioniemi et al., 1992; Venter et al., 1987). Les mécanismes d'amplification de HER2 ne sont pas clairs mais seraient liés à des défauts de réplication de l'ADN (Matsui et al., 2013). HER2 n'est pas uniquement amplifié et surexprimé dans le cancer du sein, il l'est

-Introduction-

également dans d'autres types de cancers : cancer du poumon, de l'estomac, de l'œsophage, des ovaires, de l'endomètre et de la prostate (Martin et al., 2014).

La surexpression de HER2 dans des cellules épithéliales mammaires induit une augmentation de la prolifération cellulaire, des effets anti-apoptotiques et favorise la croissance des cellules dans des modèles 3D (Moasser, 2007). De plus, l'utilisation de souris transgéniques exprimant HER2 activé dans le tissu mammaire entraîne la formation d'adénocarcinomes et le développement de métastases attestant le pouvoir transformant de l'oncogène HER2 (Fantozzi and Christofori, 2006).

La surexpression de HER2 est détectée par immunohistochimie sur des coupes de tumeur à l'aide d'un anticorps spécifique de la protéine. En fonction de l'intensité du marquage membranaire de HER2, l'anatomopathologiste donne un score de 0 à +++ . Un score de 0 ou + signifie que HER2 n'est pas surexprimée. Un score de +++ signifie que la patiente présente une surexpression de HER2 et vraisemblablement une amplification et qu'elle est éligible à un traitement par thérapie ciblée. En cas de score intermédiaire ++, il y aura indication de traitement ciblé si le gène est amplifié (cf chapitre I partie VA2).

La conséquence de la surexpression de HER2 est une augmentation de l'activité du récepteur et des voies de signalisation intracellulaire. En effet, la surexpression de HER2 induit une densité élevée de récepteurs à la surface cellulaire entraînant une augmentation de sa dimérisation (Chung et al., 2016). La surexpression de HER2 va donc favoriser la prolifération et la survie cellulaire, l'invasion et l'angiogenèse. De plus, la surexpression de HER2 est un marqueur de mauvais pronostic dû au potentiel métastatique élevé et un marqueur prédictif de réponse thérapeutique au trastuzumab (Scaltriti et al., 2015; Slamon et al., 1987). L'amplification de HER2 estimée soit indirectement par IHC ou directement par FISH est obligatoire pour la prescription des thérapies ciblées anti-HER2.

B. Mutations de HER2

Des mutations somatiques du gène HER2 ont également été détectées dans différents types de cancers chez l'Homme. Les données précliniques suggèrent que ces mutations activatrices d'HER2 conduisent au maintien du phénotype cancéreux de manière similaire à l'amplification du gène HER2 (Bose et al., 2013). De plus, les mutations du gène HER2 peuvent également conférer une sensibilité aux thérapies ciblées anti-HER2. La majorité des cancers présentant une mutation d'HER2 ne sont pas associés à une amplification simultanée du gène

et représentent donc un sous-groupe de cancers dépendant d'HER2 qui ne sont pas identifiés par les techniques classiques d'immunohistochimie et de FISH (Connell and Doherty, 2017). Ces mutations apparaissent dans environ 3% des cancers du sein (<http://cbioportal.org>).

Les mutations sont trouvées sur tous les exons du gène HER2. Les mutations du gène HER2 affectent le domaine extracellulaire, le domaine transmembranaire ou le domaine tyrosine kinase de la protéine HER2 et sont capables d'activer les voies de signalisation issues de HER2 (Wang et al., 2017).

Ces mutations peuvent être des mutations ponctuelles par substitution de nucléotide ou des délétions. Par exemple, la mutation I665V (remplacement d'un acide aminé isoleucine par une valine en position 665) dans le domaine transmembranaire de HER2 confère un potentiel accru de dimérisation et de signalisation.

C. Rôle de HER2 dans la progression métastatique

Les localisations métastatiques préférentielles du cancer du sein sont les os, les poumons, le cerveau et le foie. La surexpression de HER2 est associée à un potentiel métastatique élevé en favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et la perte de polarité et d'adhésion cellulaire (Slamon and Clark, 1988). La surexpression de HER2 augmente les capacités des cellules cancéreuses mammaires à métastaser dans le cerveau (Tonyali et al., 2016). Les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+ ont environ deux fois plus de risque de développer des tumeurs cérébrales secondaires. L'incidence de métastases cérébrales est estimée à 33 % dans les formes HER2 positives avec une médiane de survie de 18 mois (Lin et al., 2009; Sperduto et al., 2013).

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) induite par HER2 est médiée par le TGF β (Transforming Growth Factor β) (Gupta and Srivastava, 2014). L'EMT est un processus qui permet à des cellules épithéliales d'acquies des propriétés morphologiques et fonctionnelles de cellules mésenchymateuses (Kalluri and Weinberg, 2009). L'EMT est impliquée dans le processus de progression tumorale. La surexpression de HER2 conduit à la production de TGF β et à l'activation de la signalisation TGF β /SMAD impliquée dans l'angiogenèse et le déclenchement de l'EMT. L'activation de SNAIL, SLUG et ZEB-1, les répresseurs transcriptionnels de l'E-cadhérine et l'augmentation des caractéristiques mésenchymateuses ont été observés dans des cellules surexprimant HER2 (Gupta and Srivastava, 2014).

-Introduction-

En conclusion, la surexpression d'HER2 favorisant l'EMT représente un marqueur de mauvais pronostic associé à une diminution de la survie des patientes.

Il a également été montré que la surexpression de HER2 entraîne la rupture de l'intégrité épithéliale en provoquant une déformation morphologique de la membrane cellulaire (Chung et al., 2016). Cela représente un mécanisme supplémentaire dans l'acquisition du phénotype invasif.

III. Thérapies ciblées anti-HER2

En plus de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie, les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+ sont traitées par des thérapies ciblées anti-HER2. Ces médicaments ciblent spécifiquement le récepteur HER2. Le but est de s'attaquer aux cellules cancéreuses en épargnant au maximum les cellules saines. La thérapie ciblée présente donc moins d'effets secondaires que la chimiothérapie.

De plus, le concept de dépendance à un oncogène, basé sur le fait que certains cancers dépendent d'un gène pour la maintenance du phénotype malin, a justifié le développement des thérapies ciblées (Weinstein, 2002). En clinique, l'efficacité de l'anticorps trastuzumab ciblant HER2 chez des patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+ illustre ce concept d'addiction à un oncogène en montrant que certaines tumeurs mammaires ont besoin de la protéine HER2 pour leur phénotype malin.

Les patientes atteintes de cancer du sein HER2+ sont traitées par deux types de thérapie ciblée : les anticorps monoclonaux comme le trastuzumab ou le pertuzumab et les inhibiteurs de tyrosine kinase comme le lapatinib ou le nératinib (Figure 19).

A. Les anticorps monoclonaux

1. Le trastuzumab

Le trastuzumab (Herceptin®) représente le traitement standard des cancers du sein HER2+. C'est un anticorps monoclonal humanisé spécifique des récepteurs HER2 qui cible le domaine extracellulaire de la protéine (Figure 19) ce qui a pour conséquence d'inhiber l'activation des voies de signalisation en aval du récepteur. Le trastuzumab se lie au domaine juxtamembranaire IV de HER2 (Lavaud and Andre, 2014). L'activité antitumorale du

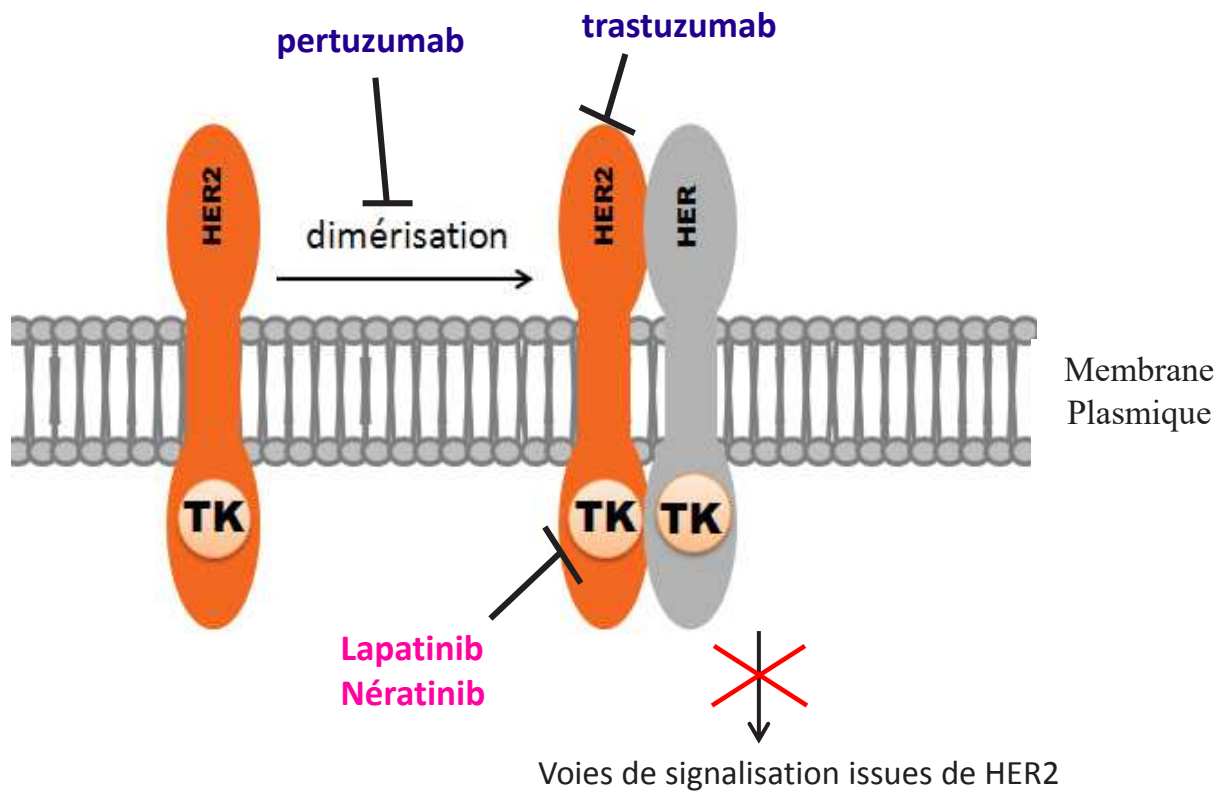


Figure I9 : Principales thérapies ciblées anti-HER2

Les thérapies ciblées anti-HER2 peuvent être divisées en deux groupes : les anticorps monoclonaux comme le trastuzumab ou le pertuzumab et les inhibiteurs de tyrosine kinase comme le lapatinib et le nératinib. Le pertuzumab bloque la dimérisation du récepteur, le trastuzumab cible le domaine extracellulaire de HER2 et le lapatinib/nératinib inhibe l'activité tyrosine kinase de HER2. Ces traitements permettent d'inhiber la phosphorylation du récepteur et ainsi bloquer les voies de signalisation sous-jacentes.

-Introduction-

trastuzumab serait liée d'une part à cette régulation négative des voies de signalisation intracellulaire, en particulier via PI3K et MAPK, mais aussi à l'activation d'une réponse immunitaire via la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC) (Petricevic et al., 2013). L'ADCC est un mécanisme de défense par lequel une cellule immunitaire lyse une cellule cible (ici cellule cancéreuse) en reconnaissant des anticorps spécifiques (ici trastuzumab) à la surface de cette cellule. De plus, la liaison du trastuzumab à HER2 empêche le clivage protéolytique de son domaine extracellulaire, qui est un mécanisme induisant l'activation constitutive de HER2 (Higgins and Baselga, 2011).

Le trastuzumab possède une AMM en France depuis l'année 2000. Il est indiqué dans le traitement des cancers du sein présentant une surexpression de HER2 et dans les cancers du sein HER2+ métastatiques. La survie moyenne en situation métastatique est passée de 22 à 31 mois grâce au trastuzumab. Dans les situations métastatiques, le traitement est poursuivi jusqu'à la progression éventuelle de la maladie.

De nombreux essais cliniques ont montré que le trastuzumab améliore la survie globale des patientes. L'étude HERA (HERceptin Adjuvant) a évalué l'intérêt d'un traitement par trastuzumab et a montré qu'il diminuait le risque relatif de décès de 34 % chez des patientes atteintes d'un cancer HER2+. La survie à 10 ans passe de 63% à 69% pour le groupe traité par trastuzumab pendant 1 an par rapport au groupe placebo (Cameron et al., 2017). Dans le domaine du traitement du cancer du sein, le trastuzumab représente le progrès thérapeutique le plus important depuis la découverte du tamoxifène.

Les effets secondaires du trastuzumab sont principalement cardiaques dû au rôle de HER2 dans la signalisation anti-apoptotique des cardiomyocytes (Riccio et al., 2016). De ce fait, les patientes traitées par trastuzumab sont régulièrement suivies par un cardiologue.

Un autre médicament, le trastuzumab emtansine (T-DM1), a été développé dans le but d'augmenter l'efficacité de la thérapie ciblée en couplant le trastuzumab à un agent cytotoxique (Puglisi et al., 2016). Ce composé est un anticorps monoclonal conjugué (ADC, Antibody Drug Conjugate), qui associe le trastuzumab permettant le ciblage des cellules cancéreuses HER2+ à un inhibiteur de la polymérisation des microtubules, l'emtansine (Barok et al., 2014). L'effet cytotoxique du T-DM1 varie en fonction de la concentration intracellulaire d'emtansine accumulée dans les cellules cancéreuses, des niveaux intracellulaires élevés entraînant une apoptose rapide.

De plus, des médicaments biosimilaires du trastuzumab sont en développement. Un médicament biosimilaire est un médicament de même composition qualitative et quantitative

en substance active et de même forme pharmaceutique que le médicament biologique de référence. Cependant, il n'est pas considéré comme une spécialité générique en raison de différences liées à la matière première ou aux procédés de fabrication (article L.5121-1, 15 du code de santé publique). Le médicament biosimilaire et le médicament de référence présentent une efficacité et des effets secondaires équivalents mais les biosimilaires ont l'avantage de coûter moins cher. L'Agence Européenne du Médicament (EMA) a rendu en 2018 un avis favorable à trois médicaments biosimilaires de l'Herceptin® : l'Ontruzant®, l'Herzuma® et le Kanjinti®. Il s'agit des premiers biosimilaires de l'Herceptin® homologués en Europe (Jeong et al., 2019; Lamb, 2018).

2. Le pertuzumab

D'autres anticorps monoclonaux ciblant HER2 ont été développés, comme le pertuzumab (Perjeta®). Le pertuzumab est un anticorps monoclonal humanisé qui inhibe la dimérisation de la protéine HER2 avec EGFR et HER3 (Figure I9) en se fixant au domaine d'hétérodimérisation II de la protéine (Lavaud and Andre, 2014). Le pertuzumab a obtenu l'AMM en France en 2013. Il est indiqué dans les cancers du sein HER2+ métastatiques en association avec le trastuzumab et le docétaxel (Fleeman et al., 2015). Une étude a montré que le taux de réponse pathologique complète (pCR rate) passe de 29% chez des patientes traitées par trastuzumab et docetaxel à 45% chez des patientes traitées par trastuzumab, docetaxel et pertuzumab (Gianni et al., 2012).

B. Les inhibiteurs de tyrosine kinase

1. Le lapatinib

Le lapatinib (Tyverb®) est une petite molécule qui inhibe l'activité tyrosine kinase des récepteurs EGFR et HER2 (Figure I9) aboutissant au blocage des voies de signalisation sous-jacentes par la diminution de phosphorylation des protéines cibles (Raf, ERK, Akt). Le lapatinib inhibe l'activité tyrosine kinase des récepteurs en agissant comme un compétiteur de l'ATP (Segovia-Mendoza et al., 2015). Il inhibe donc le domaine catalytique intracellulaire de HER2 contrairement au trastuzumab qui inhibe le domaine extracellulaire. La liaison du lapatinib au site de liaison de l'ATP est réversible. Le lapatinib permettrait également d'augmenter la

-Introduction-

cytotoxicité dépendante de l'anticorps du trastuzumab grâce à une accumulation de HER2 à la surface des cellules (Lavaud and Andre, 2014).

Le lapatinib est indiqué en association à la capécitabine dans le traitement du cancer du sein avancé ou métastatique, avec surexpression des récepteurs HER2 (IHC 3+ ou FISH amplifié), chez des patientes réfractaires ayant reçu un traitement par trastuzumab et pour lesquelles la poursuite ou la reprise du trastuzumab ne sont pas indiquées. Il a l'AMM en France depuis 2008 et est administré par voie orale. Différentes études ont montré un avantage de l'association lapatinib-capécitabine par rapport à la capécitabine seule, en termes de temps sans progression de la maladie (Cameron et al., 2008, 2010; Geyer et al., 2006).

2. Le nératinib

Le nératinib est un inhibiteur irréversible de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de la famille de l'EGFR (**Figure I9**). Il entre également en compétition avec l'ATP. En se liant au domaine tyrosine kinase des récepteurs, il bloque la liaison d'ATP et donc la phosphorylation des récepteurs (Feldinger and Kong, 2015).

Le neratinib a obtenu en juillet 2018 l'autorisation de commercialisation dans l'Union Européenne par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) sous le nom de Nerlynx® dans le traitement du cancer du sein HER2+. Un article en 2017 a rapporté les résultats d'un essai clinique sur le nératinib. Chez des patientes atteintes de cancer du sein HER2+ ayant été traitées par chimiothérapie plus trastuzumab, l'ajout d'un traitement par neratinib a diminué le nombre de rechutes (Martin et al., 2017).

IV. Résistances aux thérapies ciblées anti-HER2

Bien que les thérapies ciblées anti-HER2 aient montré des bénéfices cliniques significatifs, les résistances aux traitements sont fréquentes et constituent un réel problème (Pohlmann et al., 2009). Plus de la moitié des patientes HER2+ ont des tumeurs qui deviennent résistantes aux traitements ou présentent une absence de réponse thérapeutique (Garrett and Arteaga, 2011). Pour le trastuzumab en néoadjuvant, seulement 45% des patientes présentent une réponse complète, 40% une réponse partielle et 15% ne répondent pas du tout au traitement (Gianni et al., 2010). Aussi, dans le cas de tumeurs métastatiques, des résistances au trastuzumab ont été observées dès la première année de traitement (Romond et al., 2005). La

découverte de nouvelles thérapies ou l'amélioration de la thérapie ciblée anti-HER2 apparaît donc nécessaire pour traiter le cancer du sein HER2+ et empêcher le développement de résistances. L'hétérogénéité et l'instabilité génomique des cancers, menant à des mutations et à l'activation d'autres voies de signalisation, sont vraisemblablement responsables de cette résistance thérapeutique. Les mécanismes moléculaires expliquant ces résistances sont décrits ci-dessous.

A. Mécanismes de résistance au trastuzumab

Une grande proportion de patientes atteintes de tumeurs HER2+ ne répondent pas au trastuzumab ou développent une tolérance acquise à l'anticorps, suggérant des mécanismes de résistance *de novo* et acquis. Dans la plupart des cas, l'amplification du gène *HER2* et la surexpression de la protéine sont maintenues dans les tumeurs HER2+ résistantes au trastuzumab (Ritter et al., 2007). Cela implique que les cellules tumorales résistantes continuent de dépendre de l'oncogène HER2. Les mécanismes de résistance au trastuzumab sont multiples (Garrett and Arteaga, 2011; Pohlmann et al., 2009).

Premièrement, la résistance au trastuzumab peut être le résultat d'une signalisation aberrante des voies en aval de HER2 comme la voie PI3K/Akt. Les principales mutations rencontrées sont une mutation gain de fonction du gène *PI3KCA* codant pour la sous-unité catalytique de PI3K (Bachman et al., 2004), des mutation d'AKT ou la perte de PTEN, le régulateur négatif de PI3K (Du et al., 2015; Nagata et al., 2004). Ces mutations entraînent une activation de la signalisation PI3K/Akt indépendamment de HER2.

La signalisation par l'intermédiaire d'un autre récepteur constitue un second mécanisme de résistance au trastuzumab. Par exemple, un autre récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, l'IGF-1R, interagit avec HER2 dans des lignées cellulaires résistantes au trastuzumab, induisant sa phosphorylation. Dans ces modèles, le traitement par des drogues anti-IGF-1R restaure la sensibilité des cellules au trastuzumab (Nahta et al., 2005). De plus, les homodimères EGFR et les hétérodimères EGFR/HER3 pourraient potentiellement contourner le blocage de HER2 par le trastuzumab. Les niveaux d'expression et de phosphorylation de EGFR et HER3 sont augmentés après exposition des cellules au trastuzumab sur une longue période (Narayan et al., 2009). Fréquemment co-exprimé avec HER2, le récepteur c-Met contribue également à la résistance au trastuzumab par une activation soutenue de Akt. Les cellules cancéreuses du sein HER2+ répondent au trastuzumab en augmentant l'expression du

récepteur c-Met et l'activation de c-Met protège les cellules contre le trastuzumab (Shattuck et al., 2008).

Enfin, l'altération de l'accès au récepteur HER2 représente un troisième mécanisme de résistance au trastuzumab. En effet, le clivage du domaine extracellulaire de HER2 par l'enzyme ADAM10 entraîne la formation d'un récepteur tronqué noté p95HER2 et constitutivement actif (Molina et al., 2002). Ce récepteur tronqué ne présente plus l'épitope reconnu par le trastuzumab mais possède toujours son activité catalytique intracellulaire.

B. Mécanismes de résistance au lapatinib

Dans le cas de la résistance au lapatinib, différents mécanismes moléculaires ont été décrits (D'Amato et al., 2015; Garrett and Arteaga, 2011). Comme pour le trastuzumab, les mutations activatrices de PIK3CA, la perte du gène PTEN et l'implication d'autres voies de signalisation activant PI3K-AKT permettent aux cellules cancéreuses d'échapper au lapatinib (Eichhorn et al., 2008).

D'autres kinases intracellulaires comme la protéine Src sont également impliquées dans les résistances au lapatinib. Src est une protéine tyrosine kinase impliquée dans de nombreuses voies de signalisation. Elle interagit avec les RTKs EGFR, HER2, MET, PDGFR, IGFR et FGFR au niveau de la membrane plasmique (Roskoski, 2015), participant ainsi à la régulation de la prolifération cellulaire, à la survie, à l'adhésion, à l'invasion et à la migration cellulaire (Elsberger, 2014). Src est surexprimée dans les cellules résistantes au lapatinib (Rexer et al., 2011) induisant une activation de la voie PI3K/Akt malgré l'inhibition continue de HER2 induite par le lapatinib. Les inhibiteurs de Src bloquent l'activation de PI3K dans les cellules résistantes et rétablissent la sensibilité au lapatinib dans les xénogreffes résistantes.

L'activation d'autres récepteurs tyrosine kinase comme EGFR ou HER3 qui transactivent HER2 et amplifient la transduction du signal en aval, contournant ainsi l'effet inhibiteur du lapatinib représente également un mécanisme de résistance au lapatinib. En effet, l'inhibition de HER2 par le lapatinib est suivie d'une régulation positive de HER3 et de phospho-HER3 (Garrett et al., 2011). Une combinaison de thérapie ciblée anti-HER2, anti-HER3 et anti-PI3K devrait probablement être utilisée chez ces patientes.

Un mécanisme de résistance commun aux inhibiteurs de tyrosine kinase est la mutation du domaine kinase intracellulaire du récepteur. Des mutations dans le domaine kinase de HER2 ont été identifiées dans environ 2 à 5% de divers cancers humains (Cohen et al., 2005; Stephens

-Introduction-

et al., 2004). Une équipe a identifié 17 substitutions d'acides aminés différentes dans le site catalytique de HER2 associées à la résistance au lapatinib (Trowe et al., 2008). Ces mutations empêchent donc la fixation du lapatinib au domaine kinase du récepteur.

Enfin, l'implication de la signalisation du récepteur aux œstrogènes est aussi responsable de la résistance au lapatinib. On parle de « crosstalk » entre HER2 et le récepteur aux œstrogènes. La résistance au lapatinib s'accompagne d'une surexpression du récepteur aux œstrogènes et de la protéine anti-apoptotique bcl-2, favorisant la survie des cellules résistantes (Giuliano et al., 2015). Il a été montré que l'association de lapatinib et d'inhibiteurs du récepteur aux œstrogènes supprime le développement de résistance acquise au lapatinib.

Pour conclure, les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées anti-HER2 sont multiples et fréquents. Au cours de ces résistances, les cancers du sein HER2+ restent dépendants d'HER2, et le trastuzumab et le lapatinib en monothérapie ne suffisent pas à inhiber complètement le réseau de signalisation HER2. Il apparaît donc nécessaire d'identifier de nouvelles cibles dans les cancers du sein HER2+ afin de compléter l'arsenal thérapeutique contre ce cancer de mauvais pronostic.

V. L'amplicon HER2

Les cancers du sein HER2+ sont caractérisés par une amplification de la région q12-q21 du chromosome 17, entraînant la surexpression de HER2. Depuis l'identification de l'amplification de *HER2* dans les cancers du sein, plusieurs gènes ont été retrouvés co-amplifiés avec *HER2* au niveau du locus 17q12 (Bièche et al., 1996; Kauraniemi et al., 2001; Tomasetto et al., 1995). Les gènes co-amplifiés avec *HER2* ont été identifiés par différentes techniques de biologie moléculaire comme l'hybridation soustractive, l'hybridation génomique comparative sur puce (aCGH), le southern blot et la fluorescence *in situ* hybridization (FISH). L'ensemble de ces gènes forme ce qu'on appelle aujourd'hui l'amplicon HER2.

A. Description de l'amplicon HER2

1. Définition, localisation et taille de l'amplicon

-Introduction-

Un amplicon est un fragment d'ADN génomique amplifié, donc présent en nombre de copies anormalement élevé. L'amplicon HER2 implique la région chromosomique 17q12-q21. Cette dénomination provient de la caractérisation des chromosomes au cours du caryotypage. En effet, lorsqu'un caryotype est réalisé, les chromosomes en mitose sont colorés au giemsa permettant l'apparition de bandes sombres et claires alternées. La topographie des bandes est caractéristique d'un chromosome et permet de l'identifier. Le nombre 17 signifie que l'amplicon est localisé sur le chromosome 17. L'abréviation « q » représente le bras long du chromosome. « 12-21 » signifie que l'amplicon s'étale de la bande 2 de la première région chromosomique jusqu'à la bande 1 de la deuxième région (**Figure I10A**).

L'amplicon HER2 n'est pas uniquement retrouvé dans les cancers du sein HER2 positifs. D'autres types de cancers présentent une amplification au niveau 17q12. C'est le cas des cancers HER2+ de l'estomac, du poumon, des ovaires et de la prostate (Martin et al., 2014).

Les limites de l'amplicon sont définies comme allant du premier gène amplifié du côté centromérique jusqu'au dernier gène amplifié du côté télomérique autour du gène *HER2*, sur le bras long du chromosome 17. *PLXDC1*, *FBXL20*, *PPARBP*, *CRK7* et *STARD3* ont été identifiés comme des frontières centromériques fréquentes et *ZNZNIA3*, *PSMD3*, *THRA*, *WIRE*, *CDC6* et *RARA* comme frontières télomériques fréquentes (**Figure I10B**) (Sircoulomb et al., 2010). Globalement, *CRK7* et *ZNZNIA3* représentent les limites les plus courantes de l'amplicon HER2.

L'amplicon HER2 présente de nombreuses hétérogénéités inter-individuelles. Tout d'abord, la taille de l'amplicon et donc le nombre de gènes amplifiés peut varier d'une patiente à l'autre. La taille moyenne de l'amplicon observée dans les tumeurs est de 1,74 Mbp. La taille de l'amplicon peut varier de 0.28 Mbp à 13.6 Mbp (Sahlberg et al., 2013b). La nature des gènes amplifiés n'est pas la même d'une tumeur à l'autre. C'est pourquoi, une région minimale d'amplification a été identifiée. Elle correspond aux gènes qui sont systématiquement co-amplifiés avec HER2. Aussi, le nombre de copies pour chaque gène est également très variable d'une tumeur à l'autre.

2. La plus petite région commune d'amplification

L'amplicon HER2 est très hétérogène. Cependant, plusieurs études ont montré que la plus petite région amplifiée et commune à l'ensemble des cancers HER2+ mesure 280 kb et contient une dizaine de gènes dont les gènes *STARD3*, *GRB7* et *HER2* (**Figure I11**) (Alpy and

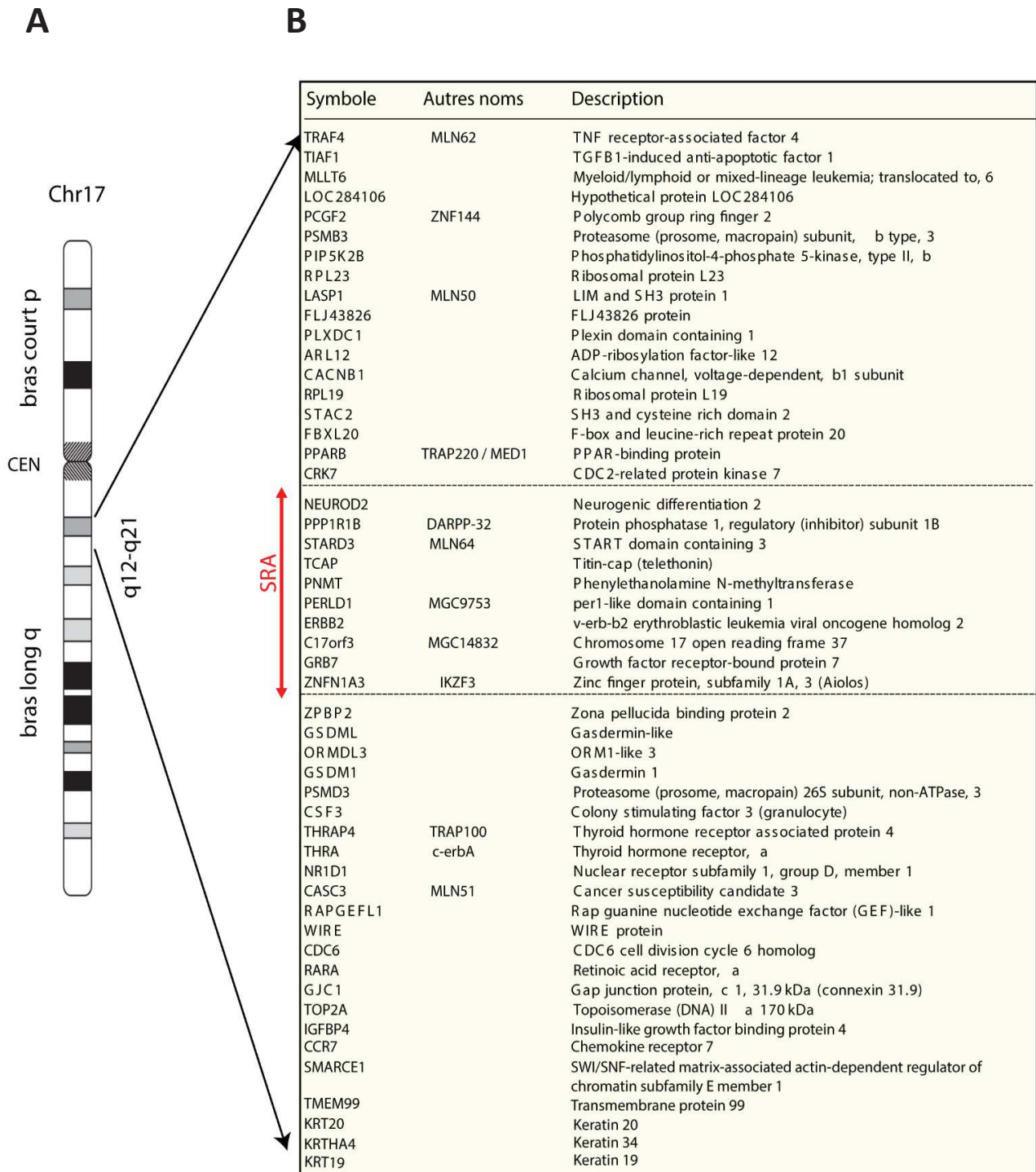


Figure I10 : Description de l'amplicon HER2

- A. Structure du chromosome 17 et localisation de l'amplicon HER2. Le bras court du chromosome est noté p et le bras long noté q. Les deux bras du chromosome sont séparés par le centromère (CEN). L'amplicon HER2 est situé sur le locus q12-q21.
- B. Liste des gènes de l'amplicon HER2. La plus petite région commune d'amplification (SRA) comprend les gènes *NEUROD2*, *PPP1R1B*, *STARD3*, *TCAP*, *PNMT*, *PERLD1*, *HER2*, *C17orf3*, *GRB7* et *ZNFN1A3*. (D'après Kauraniemi et al., 2001)

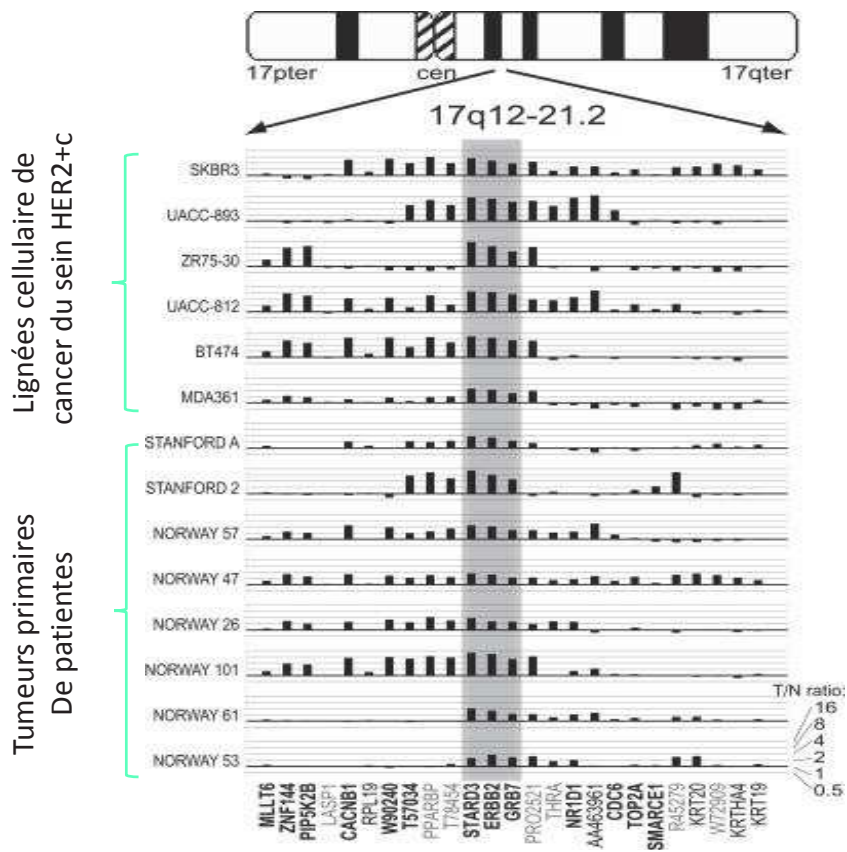


Figure I11 : HER2, STARD3 et GRB7 sont au cœur de l'amplicon

L'amplification de nombreux gènes sur le locus 17q12-q21 a été mesurée par hybridation génomique comparative sur puce à partir de lignées cellulaires de cancers du sein HER2+ et de tumeurs primaires de patientes. La zone grisée montre que les gènes *HER2*, *STARD3* et *GRB7* appartiennent à la plus petite région commune d'amplification au niveau 17q12-q21. (D'après Kao et Pollack, 2006)

-Introduction-

Tomasetto, 2014b; Bertucci et al., 2004; Kauraniemi et al., 2003; Lamy et al., 2011; Orsetti et al., 2004). En effet, une corrélation statistique entre le niveau d'amplification d'*HER2* et le niveau d'amplification de *GRB7* ou *STARD3* a été établie (Lamy et al., 2011). On dit que ces gènes sont au cœur de l'amplicon HER2 au niveau 17q12. Dans la littérature, cette région est appelée SRA pour « Smallest Region of Amplification ». Sur le locus 17q12, *HER2* est localisé entre *GRB7* et *STARD3*. *GRB7* est situé à 47 kb de *HER2* et *STARD3* à 40 kb. *GRB7* appartient à une famille de protéines adaptatrices de la signalisation par les récepteurs tyrosine kinase (Han et al., 2001). Lors de l'activation de *HER2*, *GRB7* interagit directement avec *HER2* au sein d'un complexe contenant l'adaptateur *Shc* et ce complexe mène à l'activation de *Ras* (Pradip et al., 2013). *STARD3* appartient à la famille des protéines à domaine START qui sont des protéines d'échange de lipides (LTP Lipid Transfert Proteins) (Alpy et al., 2009). La protéine *STARD3* sera décrite plus en détail dans le chapitre suivant. *GRB7* et *STARD3* sont donc co-amplifiés et co-surexprimés avec *HER2* dans les cancers du sein *HER2+* (Moog-Lutz et al., 1997; Stein et al., 1994). Les autres gènes identifiés comme appartenant à la région SRA sont : *NEUROD2*, *TCAP*, *PNMT*, *PPP1R1B*, *C17orf37*, *PERLD1* et *ZNFNIA3* (Figure I10B). Dans la plupart des tumeurs, la taille de l'amplicon dépasse cette région minimale.

3. Corrélation entre le nombre de copies des gènes et l'expression

Pour *HER2*, il y a une corrélation entre l'amplification du gène et la surexpression. En analysant l'expression des gènes par RTqPCR ou northern blot, il a été montré que ce n'est pas le cas pour l'ensemble des gènes de l'amplicon (Alpy et al., 2003). Par exemple, au niveau de la plus petite région commune d'amplification, certains gènes sont co-surexprimés avec *HER2* et d'autres ne le sont pas (Figure I12). En effet, les gènes *HER2*, *GRB7*, *PNMT* et *STARD3* présentent une corrélation significative entre le niveau d'amplification et le niveau d'expression. A l'inverse, l'analyse par RTqPCR d'échantillons tumoraux a montré que les niveaux d'expression de *TCAP* (telethonin), *DARPP32* (*PPP1R1B*) et de *NEUROD2* sont très faibles ou absents (Alpy et al., 2003; Kauraniemi et al., 2003). Cela montre que la co-amplification d'un groupe de gènes n'est pas suffisante pour conduire à leur co-surexpression et indique qu'en plus de leur localisation chromosomique commune, les gènes co-amplifiés et co-surexprimés peuvent partager des mécanismes transcriptionnels (Alpy et al., 2003).

De plus, *HER2* est le gène de l'amplicon présentant le nombre de copies le plus élevé. Il a été montré que la fréquence d'amplification d'un gène diminue avec sa distance par rapport

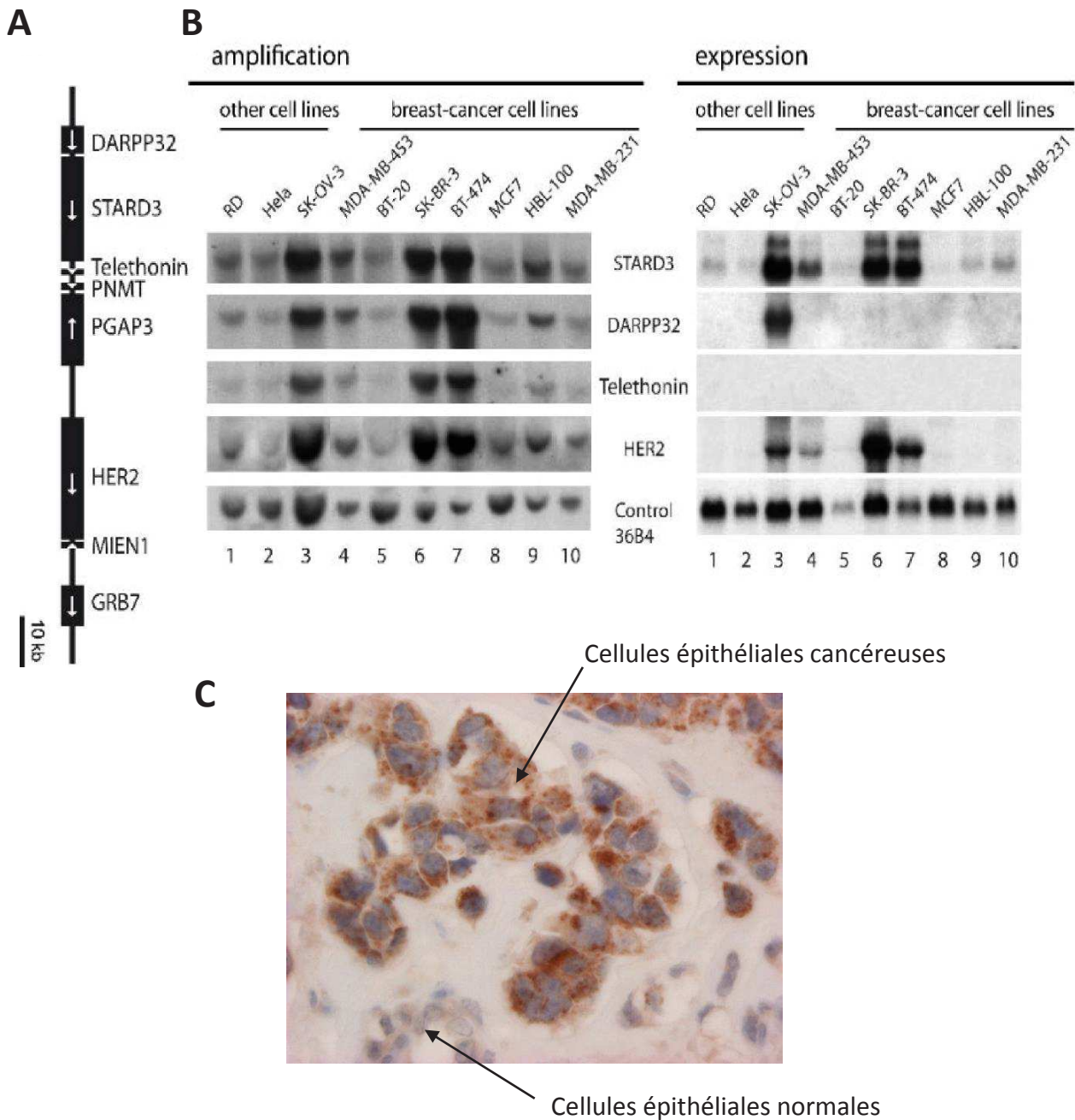


Figure I12 : HER2 et STARD3 sont co-amplifiés et co-surexprimés

A. Représentation schématique d'une partie des gènes de l'amplicon HER2.

B. L'amplification et l'expression de différents gènes de l'amplicon ont été mesurées respectivement par southern blot et northern blot dans des lignées cellulaires. Dans les cellules de cancer du sein HER2+ (SK-BR3 et BT474) et de cancer de l'ovaire HER2+ (SK-OV-3), HER2 est co-amplifié avec STARD3, DARPP32 et la téléthonine. Cependant, parmi ces gènes seul STARD3 est systématiquement co-surexprimé avec HER2. (D'après Alpy et Tomasetto, 2014)

C. Immunohistochimie sur une coupe de tumeur HER2+ avec un anticorps spécifique anti-STARD3. STARD3, en brun, est surexprimé par les cellules cancéreuses et non par les cellules normales. (D'après Alpy et al., 2003; Alpy et al., 2009)

à *HER2* (Lamy et al., 2011). Ces résultats suggèrent que l'instabilité au sein du chromosome 17 est provoquée par l'amplification de *HER2*. En effet, les tumeurs HER2-positives présentent des niveaux plus élevés d'instabilité génomique globale que les tumeurs HER2-négatives, ce qui conforte l'idée que l'amplification de *HER2* est impliquée de manière fonctionnelle dans l'instabilité chromosomique au niveau du bras long du chromosome 17 (Ellsworth et al., 2008).

B. Implications biologique et clinique de gènes co-amplifiés avec HER2

Le profilage génétique des tumeurs HER2 positives a démontré que ces tumeurs ont des altérations supplémentaires. En effet, plusieurs gènes localisés à proximité de *HER2*, en 17q12, sont co-amplifiés et co-surexprimés avec HER2 dans ces tumeurs. Le laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire des cancers du sein à Illkirch a fait une des premières observations de ce type et a proposé que ces gènes co-amplifiés puissent contribuer à la biologie des cancers HER2+. En jouant un rôle important dans la progression tumorale, ces gènes pourraient représenter des dépendances génétiques dans les cancers HER2+ et donc des cibles thérapeutiques potentielles. Par exemple, il a été montré que GRB7 a une influence directe sur l'agressivité des cellules de cancer du sein. En utilisant une stratégie de perte de fonction de GRB7, plusieurs études ont montré que GRB7 participe à la croissance et à la migration des cellules de cancer du sein HER2+ (Kao and Pollack, 2006b; Lim et al., 2014; Pradip et al., 2013). Aussi, il a été montré que la perte de fonction de GRB7, PSMD3 et PERLD1 en combinaison avec HER2 conduit à une diminution additive de la prolifération cellulaire par rapport à la perte d'expression de HER2 seule ou par rapport au traitement par trastuzumab seul (Sahlberg et al., 2013b). En conclusion, certains gènes co-amplifiés et co-surexprimés avec HER2 constituent de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement des cancers HER2+. Parmi ces gènes, le laboratoire s'est concentré sur STARD3. En effet, des études sur des modèles cellulaires de cancers du sein HER2+ ont montré que STARD3 est essentielle pour la croissance des cellules HER2+ (Alpy and Tomasetto, 2014a; Kao and Pollack, 2006b; Sahlberg et al., 2013b). De manière intéressante, le laboratoire a montré que l'effet de STARD3 sur la croissance cellulaire est limité aux cellules HER2 positives. En effet, dans des cellules ne présentant pas d'amplification en 17q12-q21, l'inhibition d'expression de STARD3 n'affecte pas leur croissance (**Figure I13**). Ces résultats ont donc conduit à mon projet de thèse portant sur l'étude du mécanisme moléculaire d'addiction des cellules cancéreuses HER2+ pour STARD3.

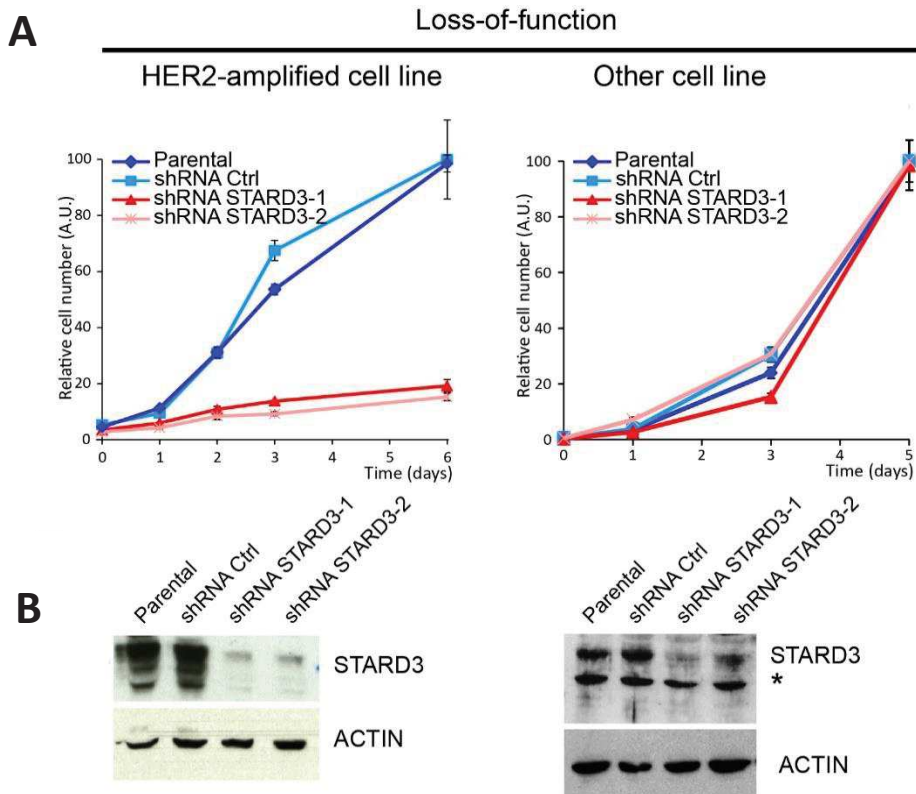


Figure I13 : STARD3 est essentielle à la croissance des cellules HER2+

- A. Courbes de croissance des cellules SKBR3 (gauche) et HeLa (droite) après perte de fonction de STARD3. Une stratégie de perte de fonction de STARD3 par des petits ARN interférents a été utilisée. Les courbes montrent que les cellules HER2+ n'exprimant plus STARD3 (courbes rouges) poussent très lentement par rapport aux cellules contrôles (courbes bleues). Cet effet est restreint aux cellules HER2+ puisque la perte de fonction de STARD3 dans les cellules HeLa n'a pas d'effet sur la croissance. (D'après Alpy et al., 2014)
- B. Immunoblot confirmant la diminution d'expression de STARD3 après transfection avec les ARN interférents.

CHAPITRE 3 : LA PROTÉINE STARD3

I. Description de STARD3

A. Découverte de STARD3

Dans les années 1990s, afin d'identifier des gènes dont l'expression était corrélée à la progression tumorale, le laboratoire a réalisé un criblage différentiel sur des biopsies chirurgicales de ganglions lymphatiques axillaires métastasés. Grâce à cette technique, le laboratoire a isolé 10 gènes surexprimés dans les métastases ganglionnaires par rapport au fibroadénome, une tumeur bénigne du sein (Tomasetto et al., 1995). Chacun d'eux a été nommé MLN (Metastatic Lymph Node) suivi du numéro de clone. Parmi ces gènes, le gène *MLN64* a été identifié. Ce n'est que plus tard que *MLN64* deviendra *STARD3* du fait de son homologie de séquence avec la protéine STARD1/StAR (Moog-Lutz et al., 1997).

B. Les souris knock-out pour le gène STARD3

Au laboratoire, il a été généré des souris Knock-out (KO) pour le gène STARD3 par recombinaison homologue. Le phénotype de ces souris a ensuite été étudié à l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch). Les souris KO pour STARD3 (*STARD3*^{-/-}) sont viables et fertiles. Ces souris sont de plus grande taille et en surpoids. Elles présentent également des anomalies métaboliques caractérisées par une augmentation des taux de glucose, de triglycérides et de cholestérol dans le sang. Ces observations suggèrent donc que STARD3 a un impact sur le métabolisme général.

C. Structure, localisation et fonctions de la protéine STARD3

La protéine STARD3 (START domain containing protein 3) possède 445 acides aminés pour un poids moléculaire de 50 kDa. STARD3 est une protéine conservée au cours de l'évolution. Elle est présente dans l'ensemble du règne animal ainsi que dans les organismes unicellulaires étroitement liés aux animaux. STARD3 est une protéine ubiquitaire exprimée dans la plupart des tissus à un niveau faible. Des études de localisation subcellulaire de

-Introduction-

STARD3 par immunofluorescence ont montré que cette protéine est localisée au niveau des endosomes tardifs (Alpy et al., 2001).

STARD3 appartient à la famille des protéines à domaine START (Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer) qui sont des protéines d'échange de lipides (LTP, Lipid Transfer Proteins). Ces protéines sont importantes dans le transport intracellulaire des lipides. Elles agissent en parallèle au transport assuré par le système vésiculaire. La famille START est composée de quinze protéines chez les mammifères (STARD1 à STARD15) (Alpy et al., 2009). Le domaine START est un module d'environ 210 acides aminés présent à l'extrémité carboxy-terminale des protéines de la famille (Figure I14). C'est un domaine qui permet l'échange de lipides entre les membranes. En effet, le domaine START est constitué d'une poche amphiphile où se fixe le ligand hydrophobe qui se trouve ainsi isolé du milieu aqueux. STARD3 est impliquée dans le transport spécifique du cholestérol (Alpy and Tomasetto, 2014b; Alpy et al., 2009).

En plus de son domaine START, STARD3 possède un domaine additionnel appelé le domaine MENTAL (Figure I14). Ce domaine régule l'adressage de la protéine aux endosomes et permet à STARD3 de s'ancrer dans la membrane des endosomes tardifs (Alpy et al., 2001). Le domaine MENTAL permet la formation de microdomaines enrichis en cholestérol à la surface des endosomes se traduisant par une altération morphologique du compartiment endo-lysosomal (Alpy et al., 2005).

De plus, il a été montré par le laboratoire que STARD3, ancrée dans la membrane des endosomes tardifs, interagit grâce à son motif FFAT-like (two phenylalanines in an acidic tract) avec les protéines VAPs (VAP-A et VAP-B) ou avec la protéine MOSPD2 du réticulum endoplasmique pour former un site de contact membranaire (MCS, Membrane Contact Site) entre ces deux organites (Figure I14) (Alpy et al., 2013; Mattia et al., 2018). Les sites de contact membranaire sont des régions cellulaires spécifiques caractérisées par un rapprochement entre deux organites distincts (< 30nm), qui permettent l'échange de métabolites et d'informations (Helle et al., 2013). Les MCS permettent de réduire la distance entre les organites et donc faciliter le transport de certains composés comme les lipides (Prinz, 2014).

Récemment, le laboratoire a montré que la formation de sites de contact membranaire engendrée par l'interaction entre STARD3 et VAPs permet au domaine START de STARD3 de transporter le cholestérol du réticulum endoplasmique vers les endosomes tardifs aux dépens de la membrane plasmique (Figure I14) (Wilhelm et al., 2017). Ainsi, les cellules

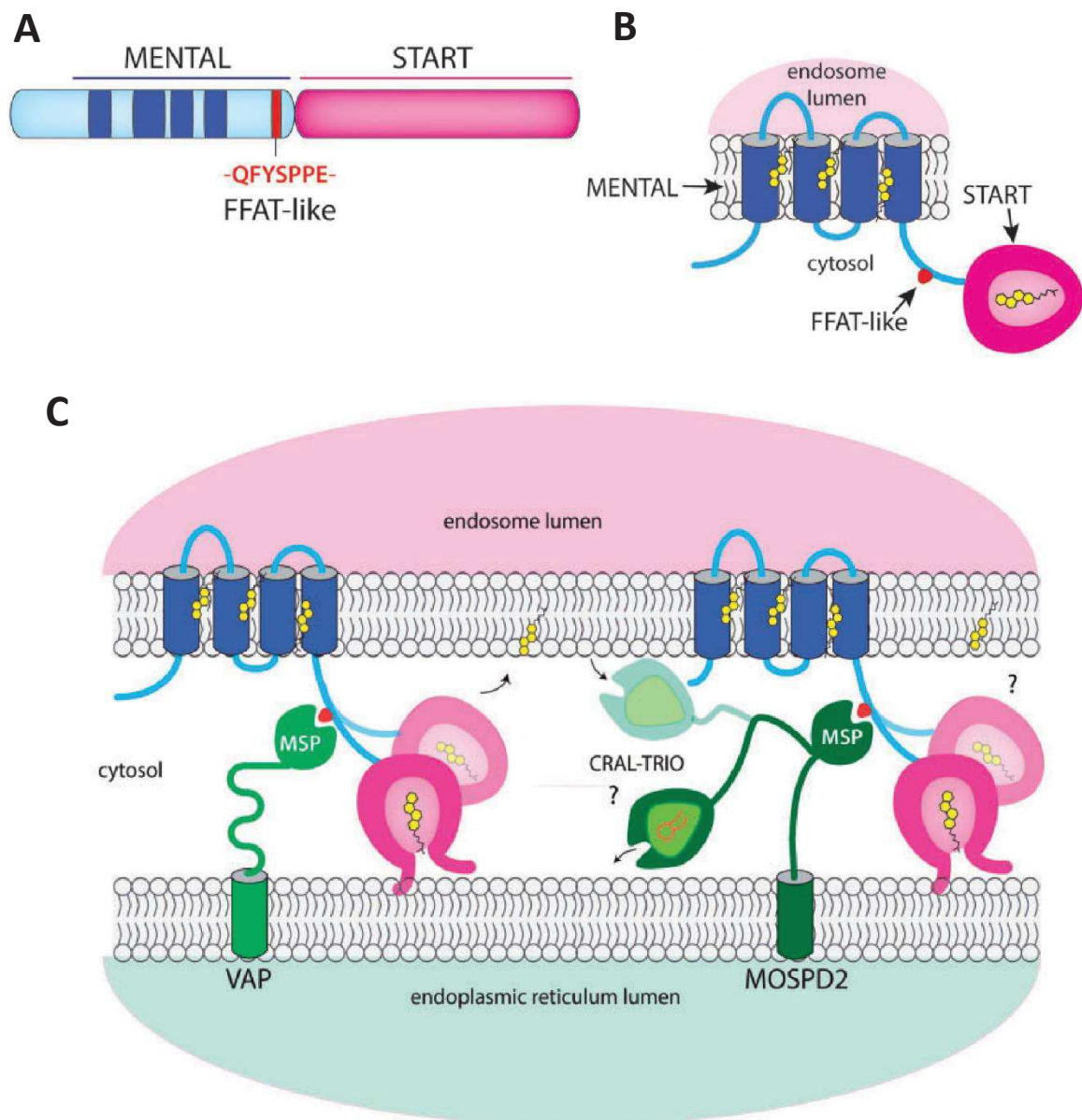


Figure I14 : STARD3 est une protéine endosomale à domaine START qui forme des sites de contact membranaire et transporte du cholestérol

A-B. Représentation schématique de STARD3. La protéine STARD3 possède un domaine START qui permet l'échange de cholestérol et un domaine MENTAL qui ancre la protéine dans la membrane des endosomes tardifs (ET) grâce à quatre hélices transmembranaires (bleu foncé). STARD3 possède également un motif FFAT (two phenylalanines in an acidic tract) sur son domaine MENTAL (rouge).


C. La protéine STARD3 interagit avec le domaine MSP des protéines VAP et MOSPD2 via son motif FFAT (triangle rouge) formant ainsi un site de contact membranaire entre les endosomes tardifs et le réticulum endoplasmique. L'interaction STARD3-VAP permet le transport de cholestérol du RE vers les endosomes. (D'après Voilquin et al., 2019)




-Introduction-

surexprimant STARD3 présentent une accumulation de cholestérol dans les endosomes associée à une diminution de cholestérol au niveau de la membrane plasmique.

STARD3 est donc une protéine positionnée à l'interface entre deux organites impliqués dans le métabolisme du cholestérol. La fonction de STARD3 dans le transport intracellulaire du cholestérol ainsi que l'impact de l'interaction STARD3/VAPs-MOSPD2 sur l'architecture et la dynamique des endosomes ont été décrits plus précisément dans une revue que j'ai co-écrite et qui a été publiée en 2019 dans le journal *Contact* (Voilquin et al., 2019). Dans la littérature, STARD3 a également été impliquée dans la synthèse d'hormones thyroïdiennes, le transport de caroténoïdes et la réplication virale. Ces autres fonctions de STARD3 sont également discutées dans cette revue, présentée ci-après.

STARD3: A Swiss Army Knife for Intracellular Cholesterol Transport

Contact
Volume 2: 1–15
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/2515256419856730
journals.sagepub.com/home/ctc


Laetitia Voilquin^{1,2,3,4}, Massimo Lodi^{1,2,3,4} ,
Thomas Di Mattia^{1,2,3,4}, Marie-Pierre Chenard^{1,2,3,4,5},
Carole Mathelin^{1,2,3,4,6}, Fabien Alpy^{1,2,3,4}  and
Catherine Tomasetto^{1,2,3,4} 

Abstract

Intracellular cholesterol transport is a complex process involving specific carrier proteins. Cholesterol-binding proteins, such as the lipid transfer protein steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain-3 (STARD3), are implicated in cholesterol movements between organelles. Indeed, STARD3 modulates intracellular cholesterol allocation by reducing it from the plasma membrane and favoring its passage from the endoplasmic reticulum (ER) to endosomes, where the protein is localized. STARD3 interacts with ER-anchored partners, notably vesicle-associated membrane protein-associated proteins (VAP-A and VAP-B) and motile sperm domain-containing 2 (MOSPD2), to create ER–endosome membrane contacts. Mechanistic studies showed that at ER–endosome contacts, STARD3 and VAP proteins build a molecular machine able to rapidly transfer cholesterol. This review presents the current knowledge on the molecular and cellular function of STARD3 in intracellular cholesterol traffic.

Keywords

cholesterol, lipid transfer protein, contact, endoplasmic reticulum, endosomes, STARD3, MLN64, STARD3NL, MENTHO

Introduction

Steroidogenic acute regulatory (StAR)-related lipid transfer domain-3 (STARD3) was identified using a bedside to bench approach. It was isolated from human breast biopsies in a screen designed to identify new genes implicated in breast cancer. In early publications, STARD3 was named Metastatic Lymph Node clone 64 (MLN64), as it was the 64th hit isolated in the screen (Tomasetto et al., 1995). Its current name STARD3 was given with respect to its homology with the StAR protein, also referred to as STARD1 (Alpy & Tomasetto, 2005; Stocco & Clark, 1996). On the human genome, the STARD3 gene lies next to the oncogene human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) on chromosome 17q11-12 (Tomasetto et al., 1995). Amplification of this chromosomal subregion explains the co-expression between STARD3 and HER2 in breast cancer cells (Alpy et al., 2003; Bièche et al., 1996; Tomasetto et al., 1995). Remarkably, several studies showed that STARD3 contributes to the growth of HER2-positive cancer cells, but given that both proteins

do not directly interact the molecular mechanism remains unclear (Alpy & Tomasetto, 2014b). Over the last years, the basic function of STARD3 has been clarified. Notably, it was showed to be a cholesterol transporter working at contact sites between endosomes and the endoplasmic reticulum (ER) (Alpy et al., 2013;

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Illkirch, France

³Centre National de la Recherche Scientifique, Illkirch, France

⁴Université de Strasbourg, Illkirch, France

⁵Anatomic Pathology Unit, Strasbourg University Hospital (CHRU), Hôpital de Hautepierre, France

⁶Senology Unit, Strasbourg University Hospital (CHRU), Hôpital de Hautepierre, France

Received September 24, 2018. Revised February 19, 2019. Accepted May 21, 2019.

Corresponding Author:

Catherine Tomasetto, Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, 1 rue Laurent Fries, Strasbourg 67404, France.
Email: catherine-laure.tomasetto@igbmc.fr

Wilhelm et al., 2017). In this article, we review the literature on STARD3 structure and function on intracellular sterol transfer.

STARD3 Is a Lipid Transfer Protein From the START Protein Superfamily

STARD3 contains an MLN64 N-terminal (MENTAL) domain, anchoring the protein to the endosome membrane, a central two phenylalanines in an acidic tract-

like motif (FFAT-like) suggesting the binding to resident proteins from the ER, and a C-terminal StAR-related lipid transfer (START) domain able to transfer cholesterol (Figure 1(a)).

The START Lipid Transfer Domain

The presence of the START domain at the C-terminus qualifies STARD3 as a lipid transfer protein (LTP) from the START superfamily (Figure 1; Alpy & Tomasetto, 2014a; Ponting & Aravind, 1999; Soccio & Breslow,

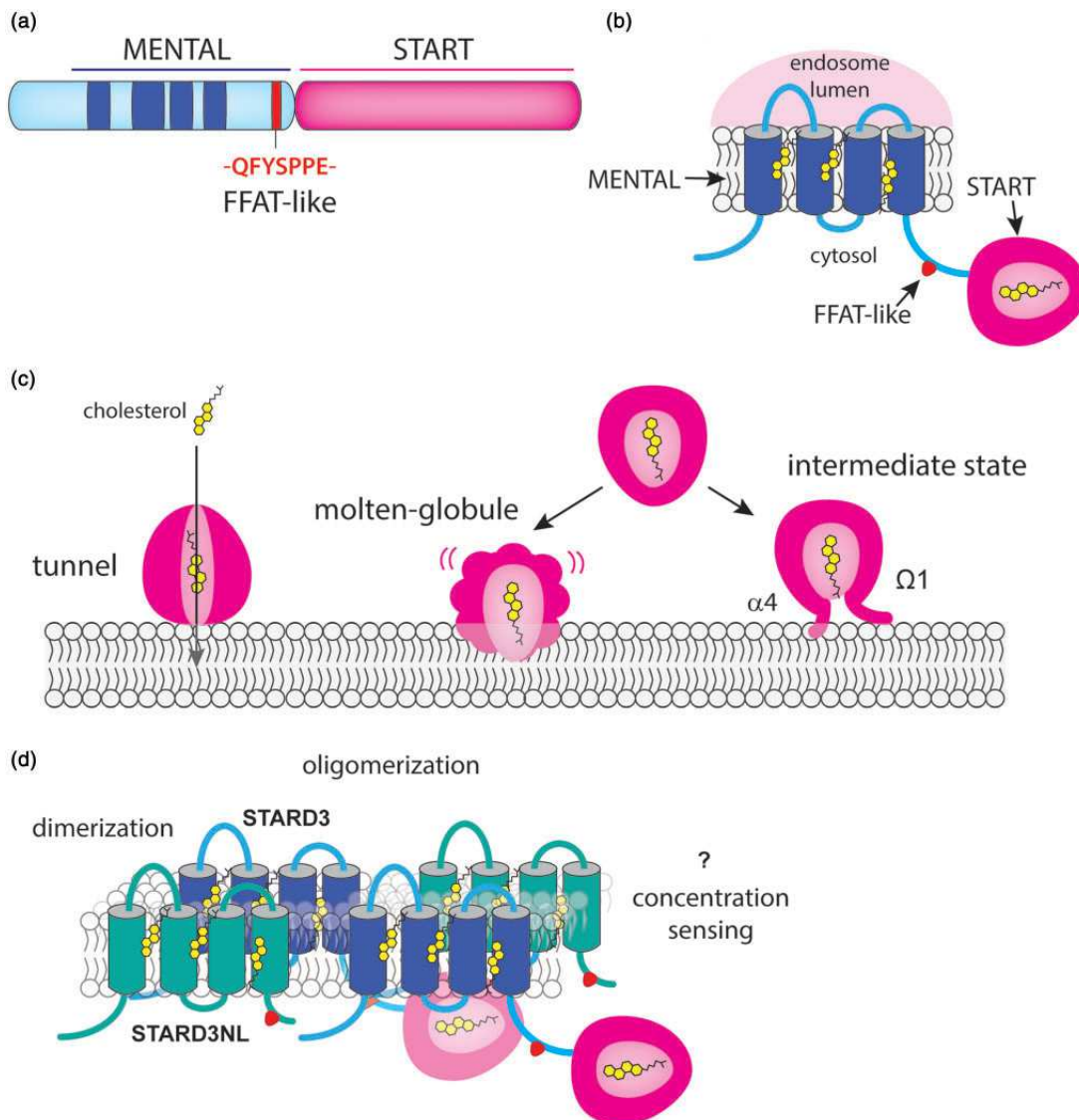


Figure 1. STARD3 protein organization. (a) Schematic representation of STARD3 protein containing a conserved MENTAL domain made of four transmembrane helices (blue), an FFAT-like motif (red), and a START domain (magenta). (b) STARD3 is positioned in endosomes and the START domain is in the cytosol. (c) Models of cholesterol transfer by the START domain. (d) The MENTAL domain mediates the formation of homo- and heterodimers or oligomers with STARD3NL. These interactions may create microdomains enriched in cholesterol at the surface of endosomes. These microdomains may serve to concentrate cholesterol next to the START domain or as sensing domains. MENTAL: MLN64 N-terminal domain; FFAT: two phenylalanines in an acidic tract motif; START: steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain; STARD3: steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain-3; STARD3NL: STARD3 N-terminal like.

2003). The START domain of STARD3 adopts an alpha-helix/beta-strand grip fold structure with an internal cavity matching the size and hydrophobicity of a cholesterol molecule (Figure 2(a); Letourneau,

Lefebvre, Lavigne, & LeHoux, 2015; Tsujishita & Hurley, 2000). The affinity of the START domain for cholesterol is around $1.5 \mu\text{M}$, a low range consistent with a transport activity (Tsujishita & Hurley, 2000).

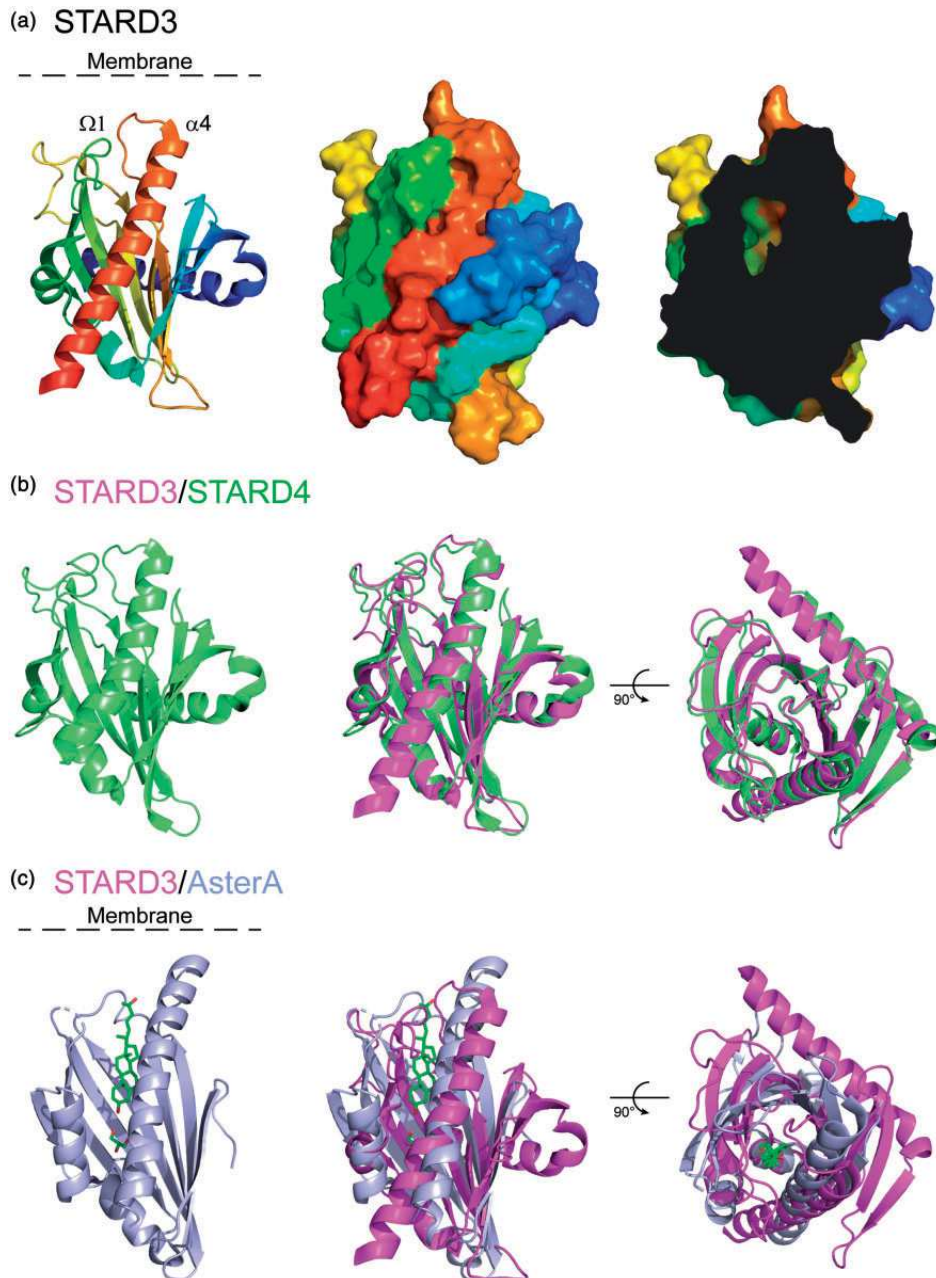


Figure 2. The START domain of STARD3, a cholesterol transfer interface. (a) Three-dimensional (3D) structure of the START domain of STARD3 shown as cartoon (left) or surface (middle) representation. The protein ribbon is rainbow-colored from blue (N-terminus) to red (C-terminus). On the right, a cutaway view of the surface of the domain showing a part of the cholesterol-binding pocket. (b) 3D structure of the START domain of STARD4 alone (green, left) and aligned with STARD3 (magenta, middle). The right-hand panel is rotated 90° about the x -axis. The two structures are highly similar. (c) 3D structure of the START-like domain of Aster-A alone (blue, left) and aligned with STARD3 (magenta, middle). The ligand of Aster-A, 25-hydroxycholesterol, is shown as sticks: green, carbon and red, oxygen. The right-hand panel is rotated 90° about the x -axis. The main difference between the two structures resides in the extended N-terminal α helix present in STARD3 but absent in Aster-A. STARD3: steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain-3.

Surprisingly, the domain structure was similar to that of the birch pollen allergen Bet v1 (Horvath et al., 2016; Tsujishita & Hurley, 2000). Since then, the Bet v1 structure revealed the existence of a large superfamily of structurally related proteins. Eleven Pfam families were determined to be members of the Bet v1-like superfamily also known as the SRPBCC (START/RHO_alpha_C/PITP/Bet_v1/CoxG/CalC) ligand-binding domain superfamily (Iyer, Koonin, & Aravind, 2001; Radauer, Lackner, & Breiteneder, 2008). Among them, two families are distributed in all three superkingdoms: the polyketide cyclase and the activator of heat shock protein 90 (Hsp90) ATPase homologue 1 families. The ring hydroxylases and the CoxG families are only present in bacteria and archaea. Two families are specific to eukaryotes: Phosphatidylinositol transfer protein family is present in most eukaryotes, while the Bet v1 family is only present in plants. Of interest, while START proteins were thought to be absent from yeast, *in silico* analyses, based on both sequence comparison and secondary structure prediction, showed recently that a large family of eukaryotic proteins contains a domain resembling the START domain (Gatta et al., 2015; Khafif, Cottret, Balague, & Raffaele, 2014). This family comprises three human proteins (Aster-A, B, and C; encoded by the GRAMD1A, B, and C genes, respectively) and six proteins from yeast (Lam1p/Ysp1p, Lam2p/Ysp2p, Lam3p/Sip3p, Lam4p, Lam5p, and Lam6p/Lct1; Gatta et al., 2015). Moreover, these novel START-like containing proteins bind and transport sterols (Gatta et al., 2015; Horemcamp, Valverde, Nunnari, & Reinisch, 2018; Murley et al., 2015; Murley et al., 2017; Sandhu et al., 2018). It was tempting to speculate that the structure of the START-like domain first defined by Gatta et al. (2015) shares the Bet v1 fold. This assumption was confirmed recently by the crystal structure of the START-like domains of Lam2, Lam4, and Aster-A, which have a similar overall structure to the one of STARD3 and STARD4 (Horenkamp, 2018; Jentsch et al., 2018; Sandhu et al., 2018; Tong, Manik, & Im, 2018; Figure 2(b)). Interestingly, the isolated sterol-binding domains of Lam2p, Lam4, and Aster-A proteins were co-crystallized with sterols, which was present in the ligand-binding pocket created by the concave beta-sheet, and the long C-terminal helix (Horenkamp et al., 2018; Jentsch et al., 2018; Sandhu et al., 2018; Tong et al., 2018). These data strengthen previous predictions regarding the orientation of the sterol molecule in the START domain, and thus the orientation of the START domain in relation to the membrane for sterol loading and unloading (Figure 2; Murcia, Faraldo-Gomez, Maxfield, & Roux, 2006; Tsujishita & Hurley, 2000). However, we can speculate that the mode or the efficiency of transfer differs between the STARD and the Lam/Aster/Gram proteins.

Indeed, in the Lam/Aster/Gram subfamily, the START-like domain is embedded in the protein and the C-terminal helix is not free while all the STARD proteins have a free C-terminal helix.

Mechanism of Sterol Transport

The molecular mechanism implicated in the entry and exit of cholesterol from the START domain is a matter of debate. Several models were proposed: a tunnel hypothesis, an intermediate state model implicating movements of the C-terminal alpha 4 helix and the omega 1 loop, and the molten globule hypothesis where the structure of the protein unfolds upon interaction with the acidic environment of the membrane (Figure 1; Bose, Whittal, Baldwin, & Miller, 1999; Iaea, Dikiy, Kiburu, Eliezer, & Maxfield, 2015; Lavigne, Najmanivich, & LeHoux, 2010; Murcia et al., 2006) reviewed in (Letourneau et al., 2015). The tunnel hypothesis is based on the presence of two openings in the structure but given their limited diameters, the authors suggested that additional movements in the alpha 4 helix and omega 1 loop would be necessary to allow sterol entry and exit (Tsujishita & Hurley, 2000; Figures 1(c) and 2(a)). The molten globule hypothesis is based on experimental data showing unfolding of STARD1 at acidic pH (Bose et al., 1999). The model is consistent with the delivery of sterol in the membrane, but it is challenged by the fact that under this unfolded form, the START domain cannot hold a sterol molecule (Roostae, Barbar, Lehoux, & Lavigne, 2009). The intermediate state model originates from the local unfolding and movement of the C-terminal alpha 4 helix of STARD1 upon interaction with the membrane (Mathieu, Fleury, Ducharme, Lavigne, & LeHoux, 2002; Roostae, Barbar, Lavigne, & LeHoux, 2009; Roostae, Barbar, Lehoux, & Lavigne, 2008). This model is completed by other studies showing movements of the omega 1 loop upon cholesterol loading (Murcia et al., 2006). The intermediate-state model including notably conformational changes in the omega 1 loop, and the alpha 4 helix interacting with the membrane is today a good model to explain cholesterol binding and delivery by the START domain (Figure 1(c)).

START Domains Are Not Equal in Terms of Transfer

Early *in vivo* and *in vitro* studies using either steroidal assays in transfected cells or synthetic donor and acceptor vesicles showed that—in isolation—the START domain of STARD3 had a sterol transfer capacity similar to that of STARD1 (Bose, Whittal, Huang, Baldwin, & Miller, 2000; Watari et al., 1997). Later, a comparative study on the activity and structure of STARD proteins from the sterol binder subgroup

(STARD2, D3, D4, D5 and D6) was done by the Bose and Miller's groups (Bose et al., 2008). This seminal study using recombinant START domains in isolation for STARD1 and D3 and the whole STARD4, D5 and D6 proteins showed that cholesterol-binding capacity does not predict steroidogenic activity, in other words, the ability for a given START domain to move cholesterol. Bose et al. (2008) showed that although cholesterol binding was quite similar for all the STARD proteins from this subgroup, their capacities to transfer cholesterol were different. In fact STARD1, D6 and D3 were able to rapidly induce pregnenolone production using isolated mitochondria, while STARD4 and D5 had little activity (Bose et al., 2008). This is surprising because the crystal structures of STARD3 and D4 are very similar (Figure 2; Romanowski, Soccio, Breslow, & Burley, 2002). It is also puzzling because STARD4 is an efficient sterol transporter (Mesmin et al., 2011) able to transfer dehydroergosterol (DHE) from donor to acceptor liposome at a rate of seven molecules of DHE per molecule of STARD4 per minute (Iaea et al., 2015). It is difficult to compare transfer activities from different experimental settings, but we showed that under its soluble form (similar to that of STARD4), the START domain of STARD3 had a transfer capacity of 1 DHE molecule per molecule of STARD3 per min (Wilhelm et al., 2017), more modest than STARD4's. These data indicate that lipid transfer activities between synthetic membranes do not always predict biological activities. Of interest, Iaea et al. (2015) showed that the surface charge of donor and acceptor vesicles modulated STARD4 transfer capacity. Horenkamp et al. (2018) made a similar observation for the isolated START-like domain of Lam2p/Ysp2p and Aster-B/GramD1b. It is then very likely that the donor and acceptor membrane identities in terms of lipid and protein compositions regulate sterol transfer by the START domain. START proteins have a conserved fold, but their primary sequences are different, leaving room for selectivity in their binding with other partner membranes or proteins.

STARD3 Is an Endosome-Bound Sterol Transporter

STARD3 distinguishes itself by the presence of a membrane spanning domain composed of four transmembrane helices (Figure 1(a) and (b); Alpy et al., 2001; Moog-Lutz et al., 1997). The membrane spanning region is critical for the addressing and the proper localization of STARD3 in endosomes (Alpy et al., 2001). We named this region MENTAL domain (Alpy et al., 2005; Alpy, Wendling, Rio, & Tomasetto, 2002) because it is also found in a second human protein called STARD3 N-terminal like (STARD3NL), originally called MLN64

N-terminal domain (MENTAL) homologue (MENTHO) (Figure 1(d); Alpy et al., 2002). The MENTAL domain anchors the protein in endosomes leaving the START domain in the cytosol (Figure 1(b); Alpy et al., 2001). Overexpression of STARD3NL, or of a truncated STARD3 protein containing only the MENTAL domain, results in the enlargement of endosomes (Alpy et al., 2005). In addition, this domain allows the homo- and hetero-oligomerization of both proteins and binds cholesterol (Alpy et al., 2005; Figure 1(d)). Of interest, proteome-wide mapping of cholesterol-interacting proteins using the click chemistry methodology confirmed this finding; several cholesterol-bound peptides were identified in the MENTAL domain (STARD3NL, residues 23–37 and 185–196; Hulce, Cognetta, Niphakis, Tully, & Cravatt, 2013). Altogether, thanks to its ability to dimerize and oligomerize (Alpy et al., 2005), we speculate that the MENTAL domain of STARD3 and STARD3NL build quaternary structures or microdomains at the endosome surface possibly acting as sterol reservoir (Figure 1(d)). In support to this, STARD3 immunolabeling in electron microscopy showed that the protein is not evenly localized on the limiting membrane of endosomes, the labeling appearing as patches, which is compatible with the formation of microdomains (Alpy et al., 2001). Another possibility is that the MENTAL domain acts as a sterol sensing domain to regulate the activity of the START domain.

One study argued that STARD3 was present on a subpopulation of late endosomes positive for the cholesterol transporter ATP-binding cassette subfamily A member 3 and negative for the oxysterol-binding protein-related protein 1L (ORP1L) and the Niemann–Pick type C1 (NPC1) proteins (van der Kant, Zondervan, Janssen, & Neefjes, 2013). Experiments were done in a malignant melanoma cell line (MelJuSo) using overexpression of fluorescent protein tagged STARD3 at the C-terminus. This study is not consistent with results obtained in other cells including HeLa cells, where untagged STARD3 was localizing with the late endosomal markers LAMP1, CD63, Rab7, and BMP (Alpy et al., 2001; Wilhelm et al., 2017), therefore overlapping with ORP1L- and NPC1-positive endosomes. This discrepancy may reflect cell specific differences in the endosomal compartment; it is known that melanocytes have a cell-type specific endosomal system to generate melanosomes which are lysosome related organelles (Raposo & Marks, 2007). It may also be caused by the presence of the fluorescent protein at the C-terminus that possibly impairs the function of the START domain. Indeed, the START domain is always present at the C-terminus of all STARD proteins, leaving the alpha 4 helix free to interact with acceptor membranes (Alpy & Tomasetto,

2005; Iaea et al., 2015; Tsujishita & Hurley, 2000; Figure 2).

STARD3 Is Ubiquitously Expressed and Regulated in a Cell-Specific Manner

STARD3 is a conserved protein present in the whole animal kingdom as well as in unicellular organisms closely related to animals (Figure 3). STARD3NL is only present in vertebrates evoking a more recent appearance of this protein (Alpy & Tomasetto, 2014b). STARD3 is expressed in most tissues at low levels.

Sequence analysis of the gene 5' region revealed a high GC-content (or guanine-cytosine content) and the absence of canonical promoter elements such as a TATA box. A short promoter of about 200 base pairs upstream of the transcription start sites was sufficient to drive high expression of a reporter gene in vitro (Alpy et al., 2003). In breast cancer cells, there is a strong correlation between STARD3 gene DNA copy number and transcript levels, arguing that amplification of the gene is the main driver for the overexpression (Alpy et al., 2003; Bièche et al., 1996; Tomasetto et al., 1995). In other cells and tissues, STARD3 is likely regulated in a cell-specific

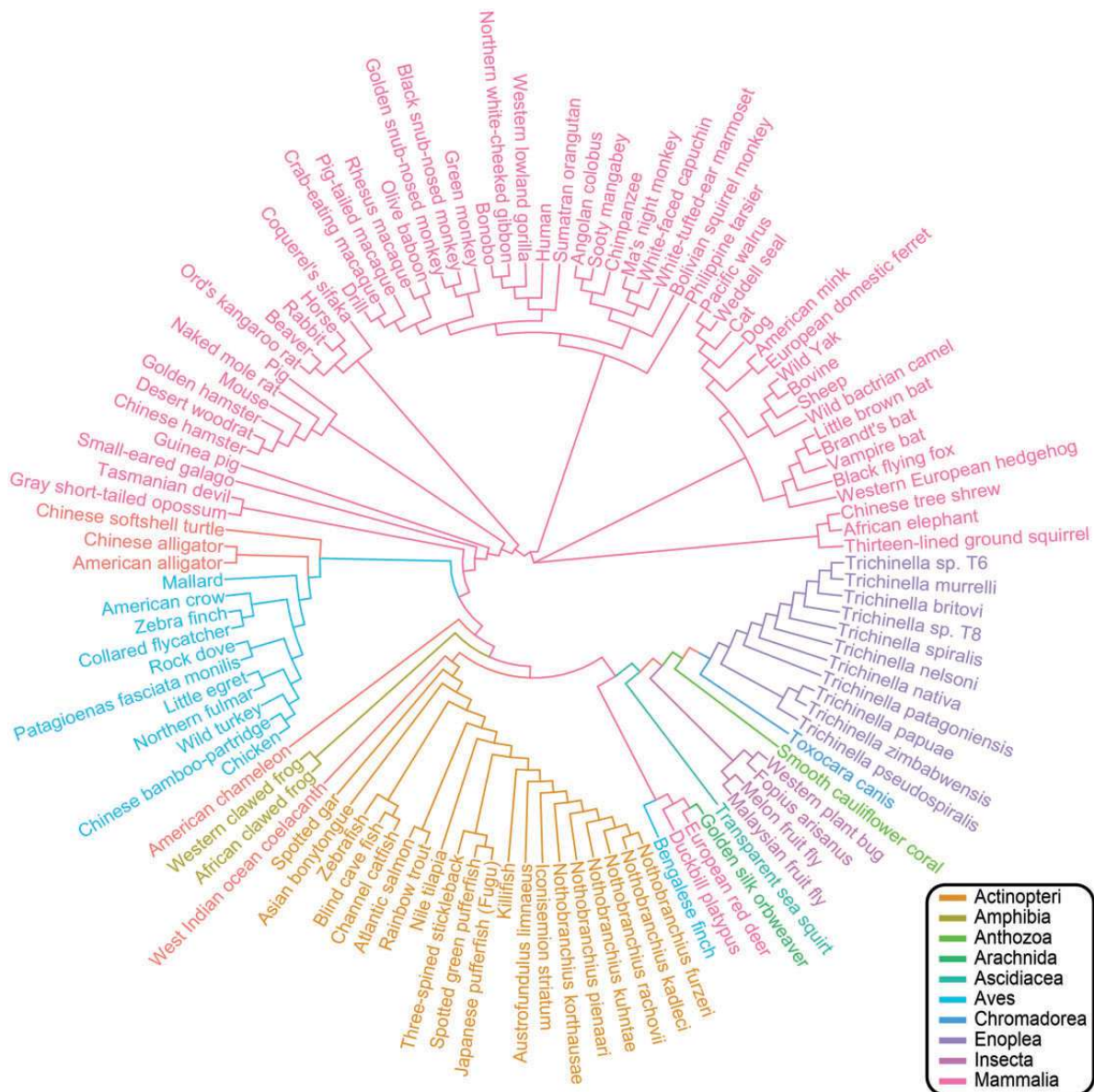


Figure 3. Phylogenetic tree of STARD3 orthologs from 115 species. The whole amino acid sequences were aligned by the Clustal Omega program (McWilliam, Li, Uludag, Squizzato, Park, Buso, Cowley & Lopez, 2013). The phylogenetic tree was drawn with R Studio, R version 3.5.1 (2018-07-02) and the packages *ggtree*, *seqinr*, and *msa*.

manner. A detailed analysis of STARD3 expression in the brain showed a heterogeneous immunostaining of the protein, indicating selective expression in discrete specific cell populations and regions (King et al., 2006). As another example, STARD3 gene expression was shown to be upregulated by 9-cis-retinoic acid in macrophages (Borthwick, Allen, Taylor, & Graham, 2010), and repressed by all-trans-retinoic acid in lymphoma cells (Wang, Cheng, Chuang, Hsu, & Su, 2000). The promoter region of STARD3 gene contains several putative sites for Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) transcription factors binding; in macrophages, STARD3 mRNA decreases during macrophage differentiation and cholesterol loading and increases following acute cholesterol depletion from the plasma membrane (PM) by methyl beta-cyclodextrin and in response to the release of sequestered SREBPs by LY295427 (Borthwick et al., 2010). Of interest, hepatic expression of STARD3 protein was found to be repressed by genetic obesity in both males and females suggesting that STARD3 might facilitate lipid export, rather than its retention in the liver (Soffientini, Caridis, Dolan, & Graham, 2014). One study recently reported a function of STARD3 in osteoporosis (Lei, Xueming, & Ruihang, 2018). Interestingly, it shows that STARD3 promoted osteoclast differentiation possibly by increasing an inflammatory response (Lei et al., 2018).

Intracellular Functions of STARD3

The presence of a START domain in STARD3 is a strong argument for a role of this protein in intracellular sterol transport. By immobilizing the protein on endosomes, the MENTAL domain restricts its sterol transfer activity to the endocytic compartment territory (Figure 1). However, as the endocytic compartment is highly dynamic and connected with many other cellular organelles, STARD3 may act on many cellular organelles.

Does STARD3 Function in the PM?

Several studies reported that STARD3 was addressed to the PM en route to late endosomes (Holttä-Vuori et al., 2005; Liapis, Chen, Davies, Wang, & Ioannou, 2012; van der Kant et al., 2013; Vassilev et al., 2015; Zhang et al., 2002), supporting the idea that STARD3 might transport sterol at the cell surface. In our laboratory, we occasionally observed STARD3 at the PM in cells expressing very high amounts of the protein, but we interpreted this localization as an overexpression artifact; our opinion is that under physiological conditions, STARD3 is mainly in endosomes (Alpy et al., 2001). However, live cells imaging showed that the protein

was in endosomal tubules (our unpublished data; Zhang et al., 2002). It is possible that endosome tubules-containing STARD3 reach the PM bringing STARD3 transiently at PM–endosome contacts. In fact, Vassilev et al. (2015) reported that overexpression of STARD3 tagged with green fluorescent protein (GFP) in a breast cancer cell line, resulted in STARD3 localization in endosomes and for a subset of cells at the PM. The PM staining was attributed to a localization in microdomains in the PM or in vesicles at the proximity of the PM (Vassilev et al., 2015). This observation is consistent with the transient presence of STARD3 in endosomal tubules reaching the PM; whether it is functional is unknown.

Does STARD3 Transport Cholesterol to the Mitochondria?

The literature generally presents STARD3 as an LTP able to make contacts between endosomes and mitochondria, implying a role in transferring cholesterol into the mitochondria (Wong, Gatta, & Levine, 2019). The first study by Watari et al. (1997) showed that STARD3 is able to transfer cholesterol to the mitochondria. There, STARD3 was able to induce the first step of steroidogenesis in Chinese hamster ovary (CHO) cells modified to sustain steroidogenesis. It showed that this activity was low when the full-length protein was expressed. In fact, only a construct corresponding to a free START domain (lacking the MENTAL domain and the FFAT motif) was able to sustain steroidogenesis at levels similar to that of STARD1 (Watari et al., 1997). The interpretation of these data was that the sterol transfer function of STARD3 to the mitochondria was not a physiological process. The hypothesis of a proteolytic cleavage of the protein freeing the START domain was then proposed to support the idea of a role of STARD3 in steroidogenesis (Watari et al., 1997). This notion was not confirmed. Actually, STARD3-deficient mice were not impaired for steroid production (Alpy & Tomasetto, 2014b; Kishida et al., 2004). In addition, STARD3 cannot compensate for the lack of STARD1 in lipoid congenital adrenal hyperplasia, a condition where mutations in the STAR gene (aka STARD1) totally prevent steroidogenesis (Stocco, 2001). Nevertheless, correlation between STARD3 expression and either endosome–mitochondria contacts (Zhang et al., 2002) or with cholesterol entry in the mitochondria (Balboa et al., 2017; Charman, Kennedy, Osborne, & Karten, 2010) was reported. Zhang et al. (2002) used live imaging to show that endosomes marked by STARD3-GFP made contacts with mitochondria. However, in this pioneer study, contacts were not quantified and not compared with cells marked with a different endosome marker. Although the authors interpreted the presence

of contacts between endosomes and mitochondria as the result of STARD3 expression, it was not confirmed by later studies. A study in liver cells showed that STARD3 overexpression results in severe liver damage and apoptosis (Tichauer et al., 2007). By looking at the molecular mechanisms involved, Balboa et al. (2017) concluded that overexpression of STARD3 was associated with increased mitochondrial cholesterol and with mitochondrial morphologic and metabolic alterations in hepatic cells. Unfortunately, they did not document the changes that are expected to be seen upon STARD3 overexpression, notably cholesterol accumulation in endosomes, and therefore it is difficult to know if the mitochondrial phenotype is due to a direct action of STARD3 on mitochondria or is a result of late endosomal cholesterol accumulation that is deleterious to the cell. Charman et al. (2010) showed that silencing STARD3 reduced steroidogenesis (a read-out for cholesterol transport into the mitochondria) in modified CHO cells and decreased mitochondrial cholesterol content but only in CHO cells deficient for the NPC1 protein. In addition, they showed that some of the mitochondrial metabolic alterations seen in NPC1-deficient-CHO cells can be rescued by STARD3 silencing (Balboa et al., 2017; Kennedy et al., 2014). However, the reduction of STARD3 alone in CHO cells had no effect on mitochondrial metabolism (Kennedy et al., 2014). It is possible that endosome–mitochondria contacts created by other mechanisms, such as endosome enlargement and cholesterol accumulation as in NPC1-deficient cells, may bring STARD3 at the periphery of mitochondria where it can transfer cholesterol to mitochondria by the START domain. This transport appears to play a role in CHO-NPC1-deficient cells, but it is unclear that it is relevant in other cells.

STARD3 Makes Specific Contacts With the ER Through VAPs and MOSPD2

A conserved FFAT-like motif marks the end of the MENTAL domain (Figure 1(a) and (b)). This motif is present in an unstructured region between the MENTAL and the START domain. Canonical FFAT motifs were originally described as linear peptide sequences (EFFDAXE) flanked by an acidic region (Loewen, Roy, & Levine, 2003). FFAT motifs are signals for the interaction with proteins containing a major sperm protein (MSP) domain including vesicle-associated membrane protein-associated proteins (VAP-A and VAP-B), (Furuita, Jee, Fukada, Mishima, & Kojima, 2010; Kaiser et al., 2005; Loewen et al., 2003; Mikitova & Levine, 2012) and motile sperm domain containing 2 (MOSPD2), (Di Mattia et al., 2018). MOSPD2 and VAP proteins contain an MSP domain able to recognize

FFAT motifs and to bind to FFAT-containing proteins like STARD3 and STARD3NL (Alpy et al., 2013; Di Mattia et al., 2018). The MSP domain has an immunoglobulin-like fold based on a seven-stranded beta-sandwich (Bullock, Roberts, & Stewart, 1996; Kaiser et al., 2005). Our in vitro analyses revealed that, despite sharing limited sequence homology, the MSP domains of MOSPD2 and VAPs have a conserved fold, the same mode of FFAT motif recognition, and similar affinities (Di Mattia et al., 2018). VAP-A, VAP-B, and MOSPD2 are tail-anchored proteins localized on the ER (Figure 4; Di Mattia et al., 2018; Lev, Ben Halevy, Peretti, & Dahan, 2008). In addition, these MSP domain-containing proteins are able to build ER–endosome contacts with STARD3 (Figure 4). It is unclear whether STARD3 competes with VAPs and MOSPD2 for binding and whether contact sites can contain different tethers. Of note, at the resolution of light microscopy (200–300 nm), we observed both VAPs and MOSPD2 in a given subdomain of the ER engaged in a contact with endosomes (Di Mattia et al., 2018). However, we cannot affirm that the presence of multiple tethers in the same region indicates that all of them are in complex with a partner on the facing membrane as most of these proteins can dimerize. Interestingly, contacts made by VAP and MOSPD2 are likely functionally different (Figure 4). Indeed, MOSPD2 is more than a VAP homolog; it contains an N-terminal cellular retinaldehyde-binding protein and triple functional domain protein (CRAL-TRIO) domain. This lipophilic domain was first identified in the Sec14-protein (Sec14p) of yeast and functions in exchanging phosphatidylinositol and phosphatidylcholine between lipid membrane bilayers (Bankaitis, Aitken, Cleves, & Dowhan, 1990). The function of the CRAL-TRIO domain of MOSPD2 is unknown, but we can speculate that its association with STARD3 might form a molecular machine able to counterexchange sterol with another lipid (Figure 4).

The Interaction Between STARD3, STARDNL, and VAP/MOSPD2 Proteins Has a Strong Impact on the Subcellular Architecture and on Endosome Dynamics

In cells overexpressing either STARD3 or STARD3NL, endosomes are covered by the ER. This ER–endosome tethering results in the formation of extended membrane contact sites where the distance between the ER and endosome membranes is less than 10 nm (Alpy et al., 2013). Of interest, extended ER–endosome contacts mediated by STARD3NL alter the dynamics of the endosomal compartment by preventing vesicle-to-tubule transitions (Alpy et al., 2013). Membrane

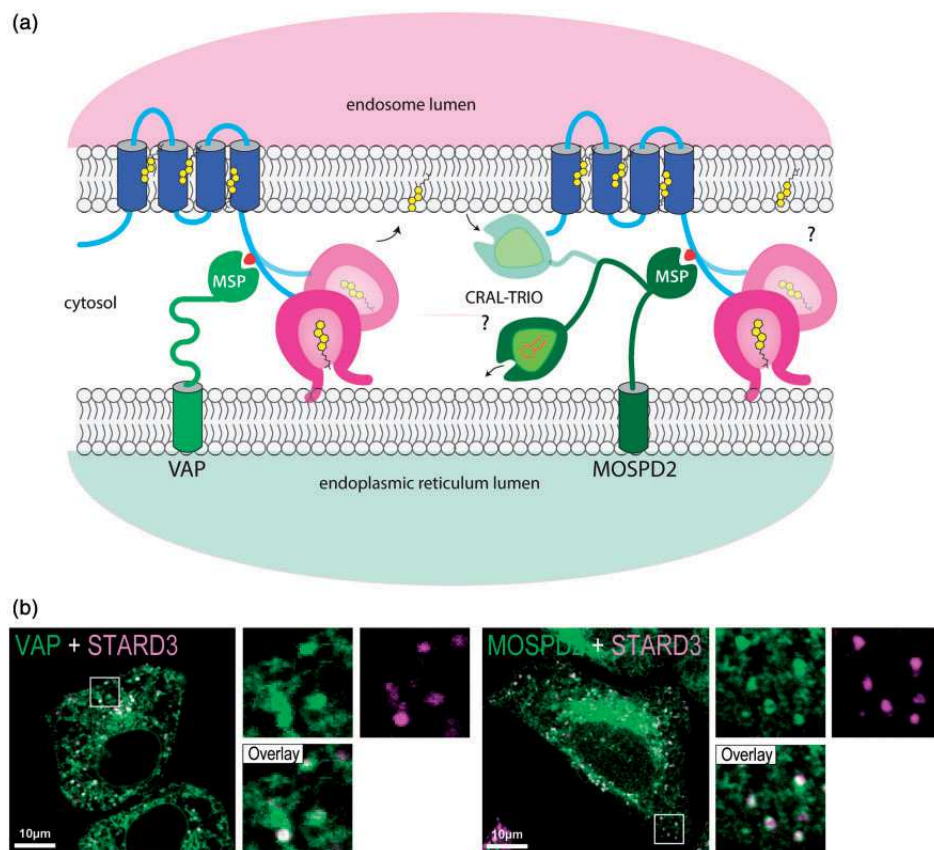


Figure 4. STARD3 creates membrane contacts between endosomes and the ER. (a) Schematic representation of STARD3 positioning in the context of the endocytic compartment and ER-endosome contact via interaction with the ER-proteins VAP and MOSPD2. (b) Localization of STARD3 with VAP and MOSPD2 at ER-endosome contacts. Merge images on the left of STARD3 (magenta) and VAP (green) labeling and on the right of STARD3 (magenta) and MOSPD2 (green) labeling. Insets correspond to a 3.5 \times magnification. Scale bar: 10 μ m. VAP: vesicle-associated membrane protein-associated proteins; MOSPD2: motile sperm domain-containing 2; MSP: major sperm protein domain; CRAL-TRIO: cellular retinaldehyde-binding protein and triple functional domain protein domain; STARD3: steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain-3.

contacts between the ER and endosomes have been previously described in the context of intracellular cholesterol sensing. They involved another sterol transfer protein named ORP1L (Johansson, Lehto, Tanhuanpää, Cover, & Olkkonen, 2005; Rocha et al., 2009). Of note, both STARD3 and ORP1L interact with VAPs and MOSPD2 proteins in the ER (Alpy et al., 2013; Di Mattia et al., 2018). However, at contacts between endosomes and the ER, ORP1L mediates cholesterol transfer from endosomes to the ER (Ridgway & Zhao, 2018; Zhao & Ridgway, 2017), while STARD3 mediates cholesterol transfer from the ER to endosomes (Wilhelm et al., 2017). In addition, in cells grown in the absence of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol condition, VAPs and ORP1L are required for transport of ER-derived cholesterol to a subpopulation of endosomes (Eden et al., 2016). These results support the idea that

ER-endosome contacts are built by distinct protein complexes and lipid transport at these sites might be flexible.

STARD3 and VAP Form an Autonomous Sterol Transfer Machine

STARD3 builds physical contacts between endosomes and the ER. How these contacts function in sterol exchange was recently uncovered using *in vitro* and *in vivo* approaches.

STARD3 Favors Cholesterol Transport in Endosomes and Reduces PM Cholesterol

Cholesterol *in situ* labeling in cells expressing high amount of STARD3 showed that STARD3 modulates the intracellular repartition of cholesterol (Wilhelm

et al., 2017). Consistent with earlier studies, STARD3 expression is associated with increased cholesterol in late endosomes (Alpy et al., 2001). To better understand the mechanism of this accumulation, we used STARD3 mutants impaired in their ability either to transfer cholesterol or to make contact sites. Mutants lacking the START domain or containing a two amino acid substitution in the START domain lipid-binding cavity did not accumulate cholesterol in endosomes. Likewise, mutation in the FFAT motif inactivating binding with VAP prevented cholesterol accumulation in endosome (Wilhelm et al., 2017). As the PM is enriched in cholesterol, we studied its cholesterol content in the context of STARD3 expression. The PM contains different pools of cholesterol (Das, Brown, Anderson, Goldstein, & Radhakrishnan, 2014). Cholesterol-enriched domains are accessible to the domain 4 (D4) of Perfringolysin O (Θ toxin), a cholesterol-binding toxin (Ohno-Iwashita et al., 2004). Using a fluorescent protein tagged GFP-D4 as a biosensor for membrane cholesterol in living cells, we showed that STARD3 expression was associated with a reduction of signal at the PM that we assumed reflects a reduction of PM cholesterol. Of note, Vassilev et al. (2015) reported that STARD3-GFP was implicated in cholesterol delivery in the PM at the expense of the ER in MCF7 cells. As we observed an opposite results in HeLa cells, where STARD3 expression is associated with cholesterol accumulation in endosome and cholesterol reduction at the PM (Wilhelm et al., 2017), we overexpressed an untagged version of STARD3 in MCF7 cells and looked at cholesterol distribution. We could not confirm Vassilev et al. (2015) observations; in MCF7 cells, STARD3 expression results in cholesterol accumulation in late endosomes and a reduction of PM cholesterol (our unpublished data).

Membrane Tethering Boosts Sterol Transport by the START Domain

In vivo studies support the model in which STARD3 and VAP-made late endosome–ER contacts allow cholesterol transport. To have direct evidence of this transport, we reconstituted the tethering complex in vitro using recombinant proteins and synthetic liposomes. As mentioned earlier, compared with STARD4, and indirectly with Lamp proteins (Iaea et al., 2015; Jentsch et al., 2018), the sterol transfer function of the soluble START domain of STARD3 is modest. But in contrast to STARD4, which is free, STARD3 is hooked on endosomes by the MENTAL domain and attached to the ER by a FFAT-MSP interaction (Figure 4). To test sterol transport in this defined context, contact sites were mimicked in vitro, by STARD3-decorated endosome-like liposomes and VAP-decorated ER-like liposomes, and sterol transport was measured in real time using a

fluorescence resonance energy transfer-based assay (Mesmin et al., 2011; Moser von Filseck, Vanni, Mesmin, Antonny, & Drin, 2015). In this in vitro setting, within the first second, endosome–ER contact formation occurred and was associated with a fast sterol transport; the equilibrium in sterol between both populations of liposomes was reached within few minutes. The initial transport rate was about 24 sterol molecules/min transported by one STARD3 molecule, an order of magnitude higher than unattached STARD3 (Wilhelm et al., 2017). This was not observed for START-like proteins; curiously, the sterol transfer capacity of Lam2p/Ysp2p and Aster B/GramD1b is not favored by tethering (Horenkamp et al., 2018). In the case of STARD3, sterol transport assays are consistent with in vivo studies (Wilhelm et al., 2017), showing that the complex formed by STARD3 and VAP in membrane contacts functions as an independent molecular machine transferring sterols in a rapid manner.

STARD3/VAP Contacts Move Cholesterol From the ER to Endosomes

It was first thought that STARD3 could export LDL-derived cholesterol from endosome to the ER where it is esterified. Many lines of evidence are against this idea: the expression of STARD3 in different cell lines including CHO, HeLa, and cells being CV-1 (simian) in Origin (COS) results in cholesterol accumulation in endosomes (Alpy et al., 2001; Holtta-Vuori et al., 2005; Liapis et al., 2012). In addition, STARD3 overexpression did not cause a significant change in cholesterol esterification (Liapis et al., 2012). Finally, STARD3 expression in NPC1- and NPC2-deficient fibroblasts does not alleviate cholesterol accumulation in endosomes, it rather increases sterol load (Alpy et al., 2001, 2002; Holtta-Vuori et al., 2005). To have a better insight on the source of cholesterol mobilized by STARD3/VAP contacts, we labeled cholesterol in situ in cells expressing STARD3, in the absence of LDL cholesterol, and in the absence of de novo synthesized cholesterol. Of interest, while the absence of LDL-derived cholesterol had no significant effect on cholesterol accumulation driven by STARD3, in the absence of de novo synthesis, cholesterol was not accumulated in endosomes. These results support the notion that STARD3/VAP contacts are involved in the delivery of neosynthesized cholesterol in endosomes (Wilhelm et al., 2017). The cellular processes involved in sterol uptake and synthesis are tightly regulated by the transcription factors from the SREBPs family (Horton, Goldstein, & Brown, 2002). Notably, SREBP-2 is a transcriptional regulator of genes participating in the synthesis and uptake of cholesterol. We were surprised to note that the endosomal–cholesterol accumulation and PM depletion driven by STARD3/

VAP contacts were imperceptible to the SREBP2 transcription factor despite the fact that the pathway was still functional (Wilhelm et al., 2017). All these results suggest that different pools of cholesterol coexist in endosomes, notably the LDL-cholesterol en route to the ER, and a pool of newly formed cholesterol moving to endosomes.

STARD3/VAP Contacts Modulate the Inner Membrane Composition of Endosomes

Endosomes are cholesterol rich organelles, and therefore bringing more cholesterol from the ER to endosomes appears counterintuitive. One recent study showed that cholesterol can move from the ER to endosomes. Eden et al. (2016) reported that ER–endosome contacts made by Annexin A1 and S100A11 support cholesterol transport by ORP1L from the ER to endosome in the context of Epidermal Growth Factor signaling. This ER-to-endosome transport made by ORP1L and VAP is involved in the formation of endosome intraluminal vesicles (Eden et al., 2016). Actually, the morphology of endosomes under conditions of VAP/STARD3 contacts is changed. Endosomes with homogenous intraluminal vesicles were rarer in these cells compared with control cells. The endosomes were generally pleomorphic and enriched in internal membranes including multilamellar and multivesicular structures (Wilhelm et al., 2017). Given that the complex formed by STARD3 and VAP fluxes cholesterol toward endosomes, this pool of cholesterol might be preferentially used to make inner membranes in endosomes.

STARD3, More Than a Cholesterol Transporter

A surprising function for STARD3 was discovered in silkworms (*Bombyx mori*). Silkworm larvae build cocoons in silk which naturally displays a yellow color. This color results from the presence of carotenoids in the silk, a chemical which is not synthesized by these animal but taken up from mulberry leaves through the alimentation (Sakudoh et al., 2007; Sakudoh & Tsuchida, 2009). Genetic analyses showed that in silkworms, the STARD3 gene has evolved to produce two different proteins by alternative promoter usage and splicing: A START-only protein named carotenoid-binding protein which is involved in carotenoid transport in the silk glands, and *Bombyx mori* Start1, which has the same structure as STARD3 found in other animals, and is likely involved in cholesterol transport (Sakudoh, Tsuchida, & Kataoka, 2005; Tabunoki et al., 2002). Of note, in humans, two carotenoids, lutein and zeaxanthin, accumulate in the central region of the retina, the macula lutea, that is responsible for central vision. The name

macula lutea originates from the yellow color of this structure, which results from the presence of carotenoids. Interestingly, a carotenoid-binding protein was purified from human retina (Bhosale et al., 2009). This protein binds lutein with a K_d of 0.45 μM . Based on the molecular weight of this protein and its detection by anticarotenoid-binding protein antibodies, STARD3 was proposed to be the carotenoid-binding protein in human eyes (Bhosale et al., 2009). Accordingly, the START domain of STARD3 was shown to bind lutein with a K_d similar to that of cholesterol of 0.45 μM (Li, Vachali, Frederick, & Bernstein, 2011). These data suggest that STARD3 might be responsible for carotenoid accumulation in the human retina, thus implying that STARD3 could bind several ligands, and therefore have a general function in cholesterol transport and a specialized role in the retina.

STARD3 has been recently incriminated in viral infection and replication. Actually, factors implicated in endocytosis and intracellular cholesterol homeostasis are generally needed for viral infection. The NPC1 protein has been shown to be essential for filovirus infection notably Ebola virus infection (Carette et al., 2011; Cote et al., 2011; Herbert et al., 2015). In that case, the protein itself acts as a viral receptor. However, for many other viruses, endosomal cholesterol contributes to their entry and replication: notably Chikungunya, Zika, West Nile, and Dengue viruses (Wichit et al., 2017). Of interest, a recent publication reported that NPC1 and STARD3 were implicated in the entry and replication of Hepatitis C virus, and not of the Dengue virus (Stoeck et al., 2018). While the molecular mechanism implicating STARD3 is not known, it might bring cholesterol to the replication organelle, a structure composed of

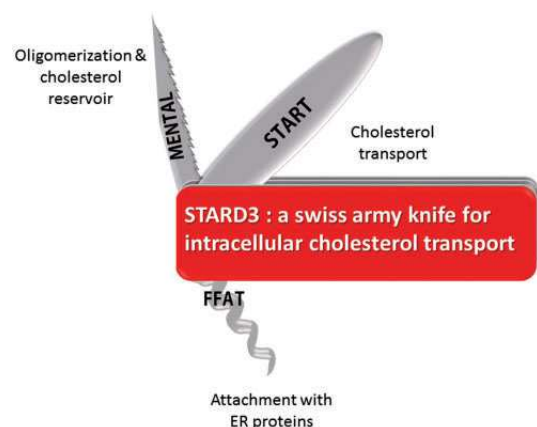


Figure 5. Title visual narrative. MENTAL: MLN64 N-terminal domain; FFAT: two phenylalanines in an acidic tract motif; START: steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain; ER: endoplasmic reticulum; STARD3: steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain-3.

single and double membrane vesicles (Romero-Brey et al., 2012). This study supports the idea that individual LTPs like STARD3 may represent new vulnerabilities for many viruses.

Conclusion

STARD3 is an LTP able to transport cholesterol; the different structural and functional regions present in the protein cooperate to ensure a fast and efficient intracellular transport of cholesterol between endosomes and the ER (Figure 5). The fact that STARD3 can partner with three different ER receptors (VAPs and MOSPD2) suggests that it might be involved in the transport of different pools of cholesterol, coming and leaving endosomes, involving the ER and perhaps other organelles and LTPs. Along this line, the physiological relevance of a complex made of STARD3 and MOSPD2 on intracellular lipid transport needs to be addressed. The isolation, purification, and molecular characterization of the contacts made by STARD3 under different conditions will clarify its role in pathophysiological pathways. In addition, structure function experiments with the complete protein in complex with either VAP or MOSPD2 will help to capture the mechanism of sterol transport. The role of STARDNL, the START domain-less protein, remains enigmatic and should be clarified. We speculate that STARD3NL assists STARD3 by the creation of microdomains at the surface of late endosomes ready to assemble into extended membrane contact sites and to store a pool of cholesterol to be transferred by the START domain. The role of STARD3 in binding and trafficking other ligands has been established in silkworm and in the human retina; more studies are needed to understand the function of this transport. STARD3/VAP and STARD3/MOSPD2 complexes are examples of a growing number of molecular complexes implicated in inter-organelle communication and exchange, and their characterization will provide new insights about intracellular communication and lipid distribution.

Acknowledgments

The authors acknowledge core funds from the Institut National de Santé et de Recherche Médicale (<http://www.inserm.fr/>), the Centre National de la Recherche Scientifique (<http://www.cnrs.fr/>), the Université de Strasbourg (<http://www.unistra.fr/>), and the ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.


Declaration of Conflicting Interests


The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: LV is supported by an allocation from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France; <http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/>). TDM is supported by a Fondation pour la Recherche Médicale fellowship. M. L. is supported by a fellowship from the Faculty of Medicine, University of Strasbourg. This work was supported by grants from the Institut National Du Cancer INCA (INCA_9269; www.e-cancer.fr) and the Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est; <https://www.ligue-cancer.net>).

ORCID iD

Massimo Lodi  <https://orcid.org/0000-0002-7593-6378>

Fabien Alpy  <https://orcid.org/0000-0002-0526-0720>

Catherine Tomasetto  <https://orcid.org/0000-0002-1811-5848>

References

- Alpy, F., Boulay, A., Moog-Lutz, C., Andarawewa, K. L., Degot, S., Stoll, I., ... Tomasetto, C. (2003). Metastatic lymph node 64 (MLN64), a gene overexpressed in breast cancers, is regulated by Sp/KLF transcription factors. *Oncogene*, *22*, 3770–3780.
- Alpy, F., Latchumanan, V. K., Keding, V., Janoshazi, A., Thiele, C., Wendling, C., ... Tomasetto, C. (2005). Functional characterization of the MENTAL domain. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*, 17945–17952.
- Alpy, F., Rousseau, A., Schwab, Y., Legueux, F., Stoll, I., Wendling, C., ... Levine, T. P. (2013). STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *Journal of Cell Science*, *126*, 5500–5512.
- Alpy, F., Stoeckel, M. E., Dierich, A., Escola, J. M., Wendling, C., Chenard, M. P., ... Rio, M. C. (2001). The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*, 4261–4269.
- Alpy, F., & Tomasetto, C. (2005). Give lipids a START: The StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *Journal of Cell Science*, *118*, 2791–2801.
- Alpy, F., & Tomasetto, C. (2014a). START ships lipids across interorganelle space. *Biochimie*, *96*, 85–95.
- Alpy, F., & Tomasetto, C. L. (2014b). STARD3: A lipid transfer protein in breast cancer and cholesterol trafficking. In B. J. Clark, & D. M. Stocco (Eds.), *Cholesterol transporters of the START domain protein family in health and disease* (pp. 119–138). New York, NY: Springer.

- Alpy, F., Wendling, C., Rio, M. -C., & Tomasetto, C. (2002). MENTHO, a MLN64 homologue devoid of the START domain. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*, 50780–50787.
- Balboa, E., Castro, J., Pinochet, M. J., Cancino, G. I., Matias, N., Jose Saez, P., . . . Zanlungo, S. (2017). MLN64 induces mitochondrial dysfunction associated with increased mitochondrial cholesterol content. *Redox Biology*, *12*, 274–284.
- Bankaitis, V. A., Aitken, J. R., Cleves, A. E., & Dowhan, W. (1990). An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature*, *347*, 561–562.
- Bhosale, P., Li, B., Sharifzadeh, M., Gellermann, W., Frederick, J. M., Tsuchida, K., & Bernstein, P. S. (2009). Purification and partial characterization of a lutein-binding protein from human retina. *Biochemistry*, *48*, 4798–4807.
- Bièche, I., Tomasetto, C., Régnier, C. H., Moog-Lutz, C., Rio, M. C., & Lidereau, R. (1996). Two distinct amplified regions at 17q11-q21 involved in human primary breast cancer. *Cancer Research*, *56*, 3886–3890.
- Borthwick, F., Allen, A. -M., Taylor, J. M., & Graham, A. (2010). Overexpression of STARD3 in human monocyte/macrophages induces an anti-atherogenic lipid phenotype. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *119*, 265–272.
- Bose, H. S., Whittal, R. M., Baldwin, M. A., & Miller, W. L. (1999). The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*, 7250–7255.
- Bose, H. S., Whittal, R. M., Huang, M. C., Baldwin, M. A., & Miller, W. L. (2000). N-218 MLN64, a protein with StAR-like steroidogenic activity, is folded and cleaved similarly to StAR. *Biochemistry*, *39*, 11722–11731.
- Bose, H. S., Whittal, R. M., Ran, Y., Bose, M., Baker, B. Y., & Miller, W. L. (2008). StAR-like activity and molten globule behavior of StARD6, a male germ-line protein. *Biochemistry*, *47*, 2277–2288.
- Bullock, T. L., Roberts, T. M., & Stewart, M. (1996). 2.5 Å resolution crystal structure of the motile major sperm protein (MSP) of *Ascaris suum*. *Journal of Molecular Biology*, *263*, 284–296.
- Carette, J. E., Raaben, M., Wong, A. C., Herbert, A. S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., . . . Dal Cin, P. (2011). Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature*, *477*, 340–343.
- Charman, M., Kennedy, B. E., Osborne, N., & Karten, B. (2010). MLN64 mediates egress of cholesterol from endosomes to mitochondria in the absence of functional Niemann-Pick Type C1 protein. *Journal of Lipid Research*, *51*, 1023–1034.
- Cote, M., Misasi, J., Ren, T., Bruchez, A., Lee, K., Filone, C. M., . . . Cunningham, J. (2011). Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature*, *477*, 344–348.
- Das, A., Brown, M. S., Anderson, D. D., Goldstein, J. L., & Radhakrishnan, A. (2014). Three pools of plasma membrane cholesterol and their relation to cholesterol homeostasis. *Elife*, *3*, e02882.
- Di Mattia, T., Wilhelm, L. P., Ikhlef, S., Wendling, C., Spehner, D., Nomine, Y., . . . Alpy, F. (2018). Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO Reports*, *19*, e45453.
- Eden, E. R., Sanchez-Heras, E., Tsapara, A., Sobota, A., Levine, T. P., & Futter, C. E. (2016). Annexin A1 tethers membrane contact sites that mediate ER to endosome cholesterol transport. *Developmental Cell*, *37*, 473–483.
- Furuita, K., Jee, J., Fukada, H., Mishima, M., & Kojima, C. (2010). Electrostatic interaction between oxysterol-binding protein and VAMP-associated protein A revealed by NMR and mutagenesis studies. *Journal of Biological Chemistry*, *285*, 12961–12970.
- Gatta, A. T., Wong, L. H., Sere, Y. Y., Calderón-Noreña, D. M., Cockcroft, S., Menon, A. K., & Levine, T. P. (2015). A new family of StART domain proteins at membrane contact sites has a role in ER-PM sterol transport. *eLife*, *4*, e07253.
- Herbert, A. S., Davidson, C., Kuehne, A. I., Bakken, R., Braigen, S. Z., Gunn, K. E., . . . Walkley, S. U. (2015). Niemann-pick C1 is essential for ebolavirus replication and pathogenesis in vivo. *MBio*, *6*, e00565–e00515.
- Holtta-Vuori, M., Alpy, F., Tanhuanpaa, K., Jokitalo, E., Mutka, A. L., & Ikonen, E. (2005). MLN64 is involved in actin-mediated dynamics of late endocytic organelles. *Molecular Biology of the Cell*, *16*, 3873–3886.
- Horenkamp, F. A., Valverde, D. P., Nunnari, J., & Reinisch, K. M. (2018). Molecular basis for sterol transport by StART-like lipid transfer domains. *The EMBO Journal*, *37*, e98002.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*, *109*, 1125–1131.
- Horvath, M. P., George, E. W., Tran, Q. T., Baumgardner, K., Zharov, G., Lee, S., . . . Bernstein, P. S. (2016). Structure of the lutein-binding domain of human StARD3 at 1.74 Å resolution and model of a complex with lutein. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, *72*, 609–618.
- Hulce, J. J., Cognetta, A. B., Niphakis, M. J., Tully, S. E., & Cravatt, B. F. (2013). Proteome-wide mapping of cholesterol-interacting proteins in mammalian cells. *Nature Methods*, *10*, 259–264.
- Iaea, D. B., Dikiy, I., Kiburu, I., Eliezer, D., & Maxfield, F. R. (2015). STARD4 membrane interactions and sterol binding. *Biochemistry*, *54*, 4623–4636.
- Iyer, L. M., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2001). Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *43*, 134–144.
- Jentsch, J. A., Kiburu, I., Pandey, K., Timme, M., Ramlall, T., Levkau, B., . . . Menon, A. K. (2018). Structural basis of sterol binding and transport by a yeast StArkin domain. *Journal of Biological Chemistry*, *293*, 5522–5531.
- Johansson, M., Lehto, M., Tanhuanpää, K., Cover, T. L., & Olkkonen, V. M. (2005). The oxysterol-binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7 and Alters functional properties of late endocytic compartments. *Molecular Biology of the Cell*, *16*, 5480–5492.

- Kaiser, S. E., Brickner, J. H., Reilein, A. R., Fenn, T. D., Walter, P., & Brunger, A. T. (2005). Structural basis of FFAT motif-mediated ER targeting. *Structure*, *13*, 1035–1045.
- Kennedy, B. E., Madreiter, C. T., Vishnu, N., Malli, R., Graier, W. F., & Karten, B. (2014). Adaptations of energy metabolism associated with increased levels of mitochondrial cholesterol in Niemann-Pick type C1-deficient cells. *Journal of Biological Chemistry*, *289*, 16278–16289.
- Khafif, M., Cottret, L., Balague, C., & Raffaele, S. (2014). Identification and phylogenetic analyses of VASt, an uncharacterized protein domain associated with lipid-binding domains in Eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, *15*, 222.
- King, S. R., Smith, A. G. A., Alpy, F., Tomasetto, C., Ginsberg, S. D., & Lamb, D. J. (2006). Characterization of the putative cholesterol transport protein metastatic lymph node 64 in the brain. *Neuroscience*, *139*, 1031–1038.
- Kishida, T., Kostetskii, I., Zhang, Z., Martinez, F., Liu, P., Walkley, S. U., . . . Strauss, J. F. (2004). Targeted mutation of the MLN64 START domain causes only modest alterations in cellular sterol metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*, 19276–19285.
- Lavigne, P., Najmanivich, R., & LeHoux, J. -G. (2010). Mammalian StAR-related lipid transfer (START) domains with specificity for cholesterol: Structural conservation and mechanism of reversible binding. In J. R. Harris (Ed.), *Cholesterol binding and cholesterol transport proteins* (pp. 425–437). Dordrecht, the Netherlands: Springer.
- Lei, C., Xueming, H., & Ruihang, D. (2018). MLN64 deletion suppresses RANKL-induced osteoclastic differentiation and attenuates diabetic osteoporosis in streptozotocin (STZ)-induced mice. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, *505*, 1228–1235.
- Letourneau, D., Lefebvre, A., Lavigne, P., & LeHoux, J. G. (2015). The binding site specificity of STARD4 subfamily: Breaking the cholesterol paradigm. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *408*, 53–61.
- Lev, S., Ben Halevy, D., Peretti, D., & Dahan, N. (2008). The VAP protein family: From cellular functions to motor neuron disease. *Trends in Cell Biology*, *18*, 282–290.
- Li, B., Vachali, P., Frederick, J. M., & Bernstein, P. S. (2011). Identification of StARD3 as a lutein-binding protein in the macula of the primate retina. *Biochemistry*, *50*, 2541–2549.
- Liapis, A., Chen, F. W., Davies, J. P., Wang, R., & Ioannou, Y. A. (2012). MLN64 transport to the late endosome is regulated by binding to 14-3-3 via a non-canonical binding site. *PLoS One*, *7*, e34424.
- Loewen, C. J. R., Roy, A., & Levine, T. P. (2003). A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *The EMBO Journal*, *22*, 2025–2035.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Mi Park, Y., Buso, N., Cowley, A. P. & Lopez, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* 2013, *41*(W1): W597–W600.
- Mathieu, A. P., Fleury, A., Ducharme, L., Lavigne, P., & LeHoux, J. G. (2002). Insights into steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-dependent cholesterol transfer in mitochondria: Evidence from molecular modeling and structure-based thermodynamics supporting the existence of partially unfolded states of StAR. *Journal of Molecular Endocrinology*, *29*, 327–345.
- Mesmin, B., Pipalia, N. H., Lund, F. W., Ramlall, T. F., Sokolov, A., Eliezer, D., & Maxfield, F. R. (2011). STARD4 abundance regulates sterol transport and sensing. *Molecular Biology of the Cell*, *22*, 4004–4015.
- Mikitova, V., & Levine, T. P. (2012). Analysis of the key elements of FFAT-like motifs identifies new proteins that potentially bind VAP on the ER, including two AKAPs and FAPP2. *PLoS One*, *7*, e30455.
- Moog-Lutz, C., Tomasetto, C., Régnier, C. H., Wendling, C., Lutz, Y., Muller, D., . . . Rio, M. C. (1997). MLN64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) and is over-expressed in human breast carcinomas. *International Journal of Cancer*, *71*, 183–191.
- Moser von Filseck, J., Vanni, S., Mesmin, B., Antonny, B., & Drin, G. (2015). A phosphatidylinositol-4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes. *Nature Communications*, *6*, 6671.
- Murcia, M., Faraldo-Gomez, J. D., Maxfield, F. R., & Roux, B. (2006). Modeling the structure of the StAR domains of MLN64 and StAR proteins in complex with cholesterol. *Journal of Lipid Research*, *47*, 2614–2630.
- Murley, A., Sarsam, R. D., Toulmay, A., Yamada, J., Prinz, W. A., & Nunnari, J. (2015). Ltc1 is an ER-localized sterol transporter and a component of ER–mitochondria and ER–vacuole contacts. *The Journal of Cell Biology*, *209*, 539–548.
- Murley, A., Yamada, J., Niles, B. J., Toulmay, A., Prinz, W. A., Powers, T., & Nunnari, J. (2017). Sterol transporters at membrane contact sites regulate TORC1 and TORC2 signaling. *The Journal of Cell Biology*, *216*, 2679–2689.
- Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Waheed, A. A., Hayashi, M., Inomata, M., Nakamura, M., . . . Iwashita, S. (2004). Perfringolysin O, a cholesterol-binding cytolysin, as a probe for lipid rafts. *Anaerobe*, *10*, 125–134.
- Ponting, C. P., & Aravind, L. (1999). START: A lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends in Biochemical Science*, *24*, 130–132.
- Radauer, C., Lackner, P., & Breiteneder, H. (2008). The Bet v 1 fold: An ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evolutionary Biology*, *8*, 286.
- Raposo, G., & Marks, M. S. (2007). Melanosomes–dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*, 786–797.
- Ridgway, N. D., & Zhao, K. (2018). Cholesterol transfer at endosomal-organelle membrane contact sites. *Current Opinion in Lipidology*, *29*, 212–217.
- Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., . . . Neefjes, J. (2009). Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7–RILP–p150Glued and late endosome positioning. *The Journal of Cell Biology*, *185*, 1209–1225.
- Romanowski, M. J., Soccio, R. E., Breslow, J. L., & Burley, S. K. (2002). Crystal structure of the *Mus musculus* cholesterol-regulated START protein 4 (StarD4) containing a STAR-related lipid transfer domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*, 6949–6954.

- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J. Y., Chlanda, P., Haselman, U., ... Walther, P. (2012). Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathogens*, 8, e1003056.
- Roostae, A., Barbar, E., Lavigne, P., & LeHoux, J. G. (2009). The mechanism of specific binding of free cholesterol by the steroidogenic acute regulatory protein: Evidence for a role of the C-terminal alpha-helix in the gating of the binding site. *Bioscience Reports*, 29, 89–101.
- Roostae, A., Barbar, E., Lehoux, J. G., & Lavigne, P. (2008). Cholesterol binding is a prerequisite for the activity of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *Biochemical Journal*, 412, 553–562.
- Sakudoh, T., Sezutsu, H., Nakashima, T., Kobayashi, I., Fujimoto, H., Uchino, K., ... Kataoka, H. (2007). Carotenoid silk coloration is controlled by a carotenoid-binding protein, a product of the Yellow blood gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 8941–8946.
- Sakudoh, T., & Tsuchida, K. (2009). [How is cocoon colored?]. *Seikagaku*, 81, 27–31.
- Sakudoh, T., Tsuchida, K., & Kataoka, H. (2005). BmStart1, a novel carotenoid-binding protein isoform from *Bombyx mori*, is orthologous to MLN64, a mammalian cholesterol transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336, 1125–1135.
- Sandhu, J., Li, S., Fairall, L., Pfisterer, S. G., Gurnett, J. E., Xiao, X., ... Hartman, C. L. (2018). Aster proteins facilitate nonvesicular plasma membrane to ER cholesterol transport in mammalian cells. *Cell*, 175, 514–529.e520.
- Soccio, R. E., & Breslow, J. L. (2003). StAR-related lipid transfer (START) proteins: Mediators of intracellular lipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 22183–22186.
- Soffientini, U., Caridis, A. -M., Dolan, S., & Graham, A. (2014). Intracellular cholesterol transporters and modulation of hepatic lipid metabolism: Implications for diabetic dyslipidaemia and steatosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841, 1372–1382.
- Stocco, D. M. (2001). Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Molecular Endocrinology (Baltimore, MD)*, 15, 1245–1254.
- Stocco, D. M., & Clark, B. J. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocrine Reviews*, 17, 221–244.
- Stoek, I. K., Lee, J. Y., Tabata, K., Romero-Brey, I., Paul, D., Schult, P., ... Bartenschlager, R. (2018). Hepatitis C virus replication depends on endosomal cholesterol homeostasis. *Journal of Virology*, 92, e01196–e01217.
- Tabunoki, H., Sugiyama, H., Tanaka, Y., Fujii, H., Banno, Y., Jouni, Z. E., ... Tsuchida, K. (2002). Isolation, characterization, and cDNA sequence of a carotenoid binding protein from the silk gland of *Bombyx mori* larvae. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 32133–32140.
- Tichauer, J. E., Morales, M. G., Amigo, L., Galdames, L., Klein, A., Quinones, V., ... Rigotti, A. (2007). Overexpression of the cholesterol-binding protein MLN64 induces liver damage in the mouse. *World Journal of Gastroenterology*, 13, 3071–3079.
- Tomasetto, C., Régnier, C., Moog-Lutz, C., Mattei, M. G., Chenard, M. P., Lidereau, R., ... 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.
- Tong, J., Manik, M. K., & Im, Y. J. (2018). Structural basis of sterol recognition and nonvesicular transport by lipid transfer proteins anchored at membrane contact sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, E856–E865.
- Tsujishita, Y., & Hurley, J. H. (2000). Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nature Structural Biology*, 7, 408–414.
- van der Kant, R., Zondervan, I., Janssen, L., & Neefjes, J. (2013). Cholesterol-binding molecules MLN64 and ORP1L mark distinct late endosomes with transporters ABCA3 and NPC1. *Journal of Lipid Research*, 54, 2153–2165.
- Vassilev, B., Sihto, H., Li, S., Hölttä-Vuori, M., Ilola, J., Lundin, J., ... Ikonen, E. (2015). Elevated levels of StAR-related lipid transfer protein 3 alter cholesterol balance and adhesiveness of breast cancer cells: Potential mechanisms contributing to progression of HER2-positive breast cancers. *The American Journal of Pathology*, 185, 987–1000.
- Wang, K. C., Cheng, A. L., Chuang, S. E., Hsu, H. C., & Su, I. J. (2000). Retinoic acid-induced apoptotic pathway in T-cell lymphoma: Identification of four groups of genes with differential biological functions. *Experimental Hematology*, 28, 1441–1450.
- Watari, H., Arakane, F., Moog-Lutz, C., Kallen, C. B., Tomasetto, C., Gerton, G. L., ... Strauss, J. F. (1997). MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 8462–8467.
- Wichit, S., Hamel, R., Bernard, E., Talignani, L., Diop, F., Ferraris, P., ... Thomas, F. (2017). Imipramine Inhibits Chikungunya Virus Replication in Human Skin Fibroblasts through Interference with Intracellular Cholesterol Trafficking. *Scientific Reports*, 7, 3145.
- Wilhelm, L. P., Wendling, C., Védie, B., Kobayashi, T., Chenard, M. -P., Tomasetto, C., ... Alpy, F. (2017). STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *The EMBO Journal*, 36, 1412–1433.
- Wong, L. H., Gatta, A. T., & Levine, T. P. (2019). Lipid transfer proteins: The lipid commute via shuttles, bridges and tubes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20, 85–101.
- Zhang, M., Liu, P., Dwyer, N. K., Christenson, L. K., Fujimoto, T., Martinez, F., ... Strauss, J. F. (2002). MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 33300–33310.
- Zhao, K., & Ridgway, N. D. (2017). Oxysterol-binding protein-related protein 1L regulates cholesterol egress from the endo-lysosomal system. *Cell Reports*, 19, 1807–1818.

II. STARD3 et cancer HER2+

A. STARD3 appartient à l'amplicon HER2

Le gène *STARD3* est situé à 40 kb du gène *HER2* sur le chromosome 17. *STARD3* appartient à la plus petite région commune d'amplification au niveau 17q12-q21 (**Figure I11**) (Alpy et al., 2003; Bièche et al., 1996; Kauraniemi et al., 2003). Dans les cellules de cancer HER2+, il existe une forte corrélation entre le nombre de copies d'ADN du gène *STARD3* et les niveaux de transcription, suggérant que l'amplification du gène est principalement responsable de sa surexpression. En plus de la proximité génique de *STARD3* et *HER2* participant à leur co-amplification, ces deux gènes partagent des facteurs de transcription communs. Ils ont tous les deux des sites de reconnaissance pour les facteurs de transcription de la famille Sp1 (Specificity protein 1) dans leurs promoteurs proximaux (Alpy et al., 2003). *STARD3* et *HER2* sont donc co-amplifiés et co-surexprimés dans 98 % des cancers HER2+ (**Figure I12**).

B. Implications biologiques de STARD3 dans le cancer HER2+

STARD3 est surexprimée par les cellules épithéliales cancéreuses dans les cancers du sein HER2+ (**Figure I12C**) (Moog-Lutz et al., 1997; Tomasetto et al., 1995). Des études sur des modèles cellulaires de cancers du sein HER2+ ont montré que *STARD3* est essentielle pour la croissance des cellules HER2+ (Alpy and Tomasetto, 2014a; Kao and Pollack, 2006b). De manière intéressante, l'effet de *STARD3* sur la croissance cellulaire est limité aux cellules HER2 positives. En effet, dans des cellules ne présentant pas d'amplification en 17q12-q21, l'inhibition d'expression de *STARD3* n'affecte pas leur croissance (**Figure I13**).

Sahlberg et al. ont également montré que la perte de *STARD3* dans des lignées cellulaires HER2+ provoque une diminution de la croissance cellulaire, une diminution de la prolifération cellulaire, une diminution de la phosphorylation d'Akt et une apoptose accrue (Sahlberg et al., 2013b). L'effet de *STARD3* sur la prolifération cellulaire est encore plus prononcé lorsque *STARD3* et *HER2* sont co-inhibés.

Récemment, une étude a montré que *STARD3* participe à la prolifération et à la migration de cellules de cancers gastriques HER2+ (Kwon et al., 2017). Ils ont montré que la perte d'expression de *STARD3* diminue la croissance des cellules de cancers gastriques HER2+ et induit un blocage des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire.

-Introduction-

De plus, Cai et al. ont montré que STARD3 influence l'adhésion cellulaire (Cai et al., 2010). Dans des cellules de cancer du sein triple négatives ou surexprimant le récepteur aux œstrogènes (non amplifiées pour HER2), la perte d'expression de STARD3 augmente l'adhésion cellulaire et augmente l'expression de la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase). STARD3 pourrait donc contribuer à la progression tumorale des cancers du sein en régulant les capacités d'adhésion des cellules cancéreuses. Cependant, le mécanisme moléculaire n'est pas encore compris et ce résultat nécessite d'être confirmé dans des cellules amplifiées pour HER2.

En conclusion, l'ensemble des études publiées s'accordent et incriminent STARD3 dans la croissance des cellules HER2+. Toutes ces études ne proposent pas de mécanisme moléculaire expliquant cette fonction spécifique de STARD3. L'hypothèse défendue par notre équipe est que les cellules amplifiées pour HER2 sont devenues dépendantes de STARD3 pour leur croissance en parallèle de leur transformation cancéreuse. Les travaux du laboratoire ont montré le rôle de STARD3 dans l'homéostasie intracellulaire du cholestérol (Wilhelm et al., 2017). Ces données mécanistiques ont permis d'établir un rationnel quant au rôle de STARD3 dans la croissance des cellules HER2+. En effet, au début de ma thèse, nous avons émis l'hypothèse que STARD3, en modifiant la composition lipidique de la membrane plasmique, modifierait la signalisation issue de HER2.

C. STARD3 est un marqueur de mauvais pronostic

Une étude clinique a montré qu'un niveau d'expression élevé de STARD3 est corrélé à des stades avancés de la classification TNM, à la propagation de la tumeur et à une diminution de la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein (Cai et al., 2010). De plus, deux autres équipes ont étudié l'amplification du gène STARD3 comme marqueur pronostique dans une cohorte de cancers du sein HER2+. Lamy et al. ont inclus 86 patientes et n'ont trouvé aucune association entre STARD3 et la survie globale et sans rechute (Lamy et al., 2011), tandis que Vinatzer et al. ont établi une cohorte de 136 patientes et ont montré une relation statistiquement significative entre l'expression de STARD3 et la survie globale et sans maladie (Vinatzer et al., 2005). Une autre étude s'est concentrée sur l'expression de la protéine STARD3 dans une cohorte rétrospective de 2200 patientes atteintes d'un cancer du sein, HER2 positifs et négatifs, afin d'évaluer l'impact pronostique de STARD3 (Vassilev et al., 2015). Dans 85.6 % des cas, la surexpression de STARD3 est corrélée à celle de HER2 et à une diminution de la survie globale des patientes. Ainsi, Vinatzer et al et Vassilev et al ont montré que STARD3 est un marqueur

de mauvais pronostic. Cependant, dans les deux cas, il a été montré que STARD3 n'est pas un marqueur pronostic indépendant de HER2. Pour Vinatzer et al, l'intérêt d'utiliser STARD3 comme marqueur pronostic serait d'ordre pratique. En effet, en clinique, lorsque le score de HER2 mesuré par immunohistochimie est intermédiaire, les laboratoires doivent réaliser une FISH afin de diagnostiquer un cancer HER2+ de mauvais pronostic. Ainsi, il serait plus facile en pratique d'étudier la surexpression de STARD3 par immunohistochimie pour les laboratoires non équipés de FISH.

D. STARD3 est une cible potentielle pour lutter contre la résistance aux thérapies

Afin d'étudier le rôle des gènes de l'amplicon dans la résistance aux thérapies ciblées, Sahlberg et al., ont utilisé des lignées cellulaires HER2+ résistantes au trastuzumab (Sahlberg et al., 2013b). Ils ont étudié la viabilité de ces différentes lignées cellulaires après transfection avec des combinaisons d'ARN interférents (siRNA) permettant d'inhiber l'expression des gènes de l'amplicon et après traitement avec le trastuzumab. Ils ont montré que l'inhibition de STARD3 potentialise l'apoptose induite par le trastuzumab dans une lignée cellulaire résistante à la drogue (Sahlberg et al., 2013b).

Aussi, une seconde étude a montré que l'expression de STARD3 est significativement augmentée dans une lignée cellulaire résistante au lapatinib par rapport à la lignée parentale (McDermott et al., 2013).

Ces résultats suggèrent donc que STARD3 participe à la résistance aux thérapies anti-HER2.

E. STARD3 est un marqueur prédictif de la réponse aux thérapies

Une première étude sur une petite cohorte a identifié *STARD3* comme un biomarqueur de réponse à un inhibiteur d'Akt dans un essai clinique de phase Ib (Chien et al., 2016). Au cours de cette étude, 16 patients atteints d'un cancer métastatique HER2 positif (12 cancers du sein, 3 cancers gastriques et 1 cancer de l'œsophage) ont été traités toutes les semaines par l'inhibiteur d'Akt MK-2206 en combinaison avec le paclitaxel et le trastuzumab. L'analyse de l'expression des gènes par séquençage de l'ARN a montré que dans ces tumeurs, *STARD3* représente un important marqueur prédictif de réponse puisque son niveau d'expression était corrélé à la réponse des patients au MK-2206.

-Introduction-

De plus, en 2013, un laboratoire a voulu identifier des signatures moléculaires qui pourraient être utilisées afin d'attribuer un traitement spécifique et individuel à chaque patiente atteinte d'un cancer du sein (Daemen et al., 2013). Ils ont d'abord analysé les signatures omiques (niveau d'expression d'ARNm, expression protéique, nombre de copies des gènes, méthylation du promoteur, mutations génétiques, séquençage de l'ARN) de 70 lignées cellulaires de cancer du sein tous types confondus. Ils ont ensuite traité ces lignées par 90 composés thérapeutiques. Les composés utilisés comprennent des agents cytotoxiques classiques comme les taxanes ou les anthracyclines mais également des thérapies ciblant les récepteurs hormonaux ou les récepteurs tyrosine kinase. Ils ont réalisé des tests d'inhibition de croissance pour chaque composé et chaque lignée afin d'obtenir une concentration de médicament inhibant la croissance de 50% des cellules. Cela a permis de classer les lignées cellulaires en lignées résistantes ou sensibles à chaque composé. L'ensemble des données (caractéristiques moléculaires et réponses thérapeutiques) a été obtenu pour 48 lignées cellulaires. La corrélation entre la réponse thérapeutique à chaque composé et les signatures omiques de chaque lignée a ensuite été analysée par des techniques biostatistiques. Ces signatures permettent de prédire la réponse thérapeutique pour 51 composés testés. Pour 13 de ces 51 composés, la réponse thérapeutique est corrélée au sous-type moléculaire de la lignée cellulaire. Ainsi, l'utilisation du sous-type transcriptionnel seul peut prédire la réponse thérapeutique de certains composés. Par exemple, la sensibilité au lapatinib est spécifique aux patientes HER2+. Cependant, pour 65% des composés testés, un profilage génétique et moléculaire complet des lignées cellulaires permet une prédiction de réponse thérapeutique plus précise. Les gènes identifiés comme prédicteurs de réponse thérapeutique codent pour des protéines intervenant dans différentes voies de signalisation ou processus cellulaires comme la régulation du cycle cellulaire, la régulation de la mort cellulaire, le métabolisme, l'activité des protéines kinase ou encore la polymérisation des microtubules. Parmi les gènes identifiés comme signature de réponse thérapeutique, les auteurs ont montré que *STARD3* est un bon prédicteur de réponse au lapatinib (Daemen et al., 2013). Aujourd'hui, la personnalisation des traitements des cancers du sein est basée sur le statut du récepteur HER2 et du récepteur aux œstrogènes mais les taux de réponse au trastuzumab et au tamoxifène restent faibles (respectivement 15-50 % et 25 %). Ainsi, les marqueurs de réponse basés sur le profilage omique aideraient à choisir des options thérapeutiques plus appropriées pour les patientes triple négatives et permettraient d'identifier des traitements secondaires pour celles qui ne répondent pas aux thérapies anti-HER2 ou à l'hormonothérapie.

-Introduction-

Enfin, une étude rétrospective sur l'intérêt de STARD3 comme marqueur prédictif de la réponse aux thérapies ciblées anti-HER2 a été menée au laboratoire en collaboration avec l'hôpital de Hautepierre (Lodi et al., en préparation). Dans cette étude, une cohorte de 62 patientes diagnostiquées d'un cancer du sein HER2+ entre 2011 et 2017 a été utilisée. Elles présentaient toutes un score HER2 3+ par immunohistochimie et ont été traitées par chimiothérapie néoadjuvante avec trastuzumab puis par chirurgie. Parmi les 62 patientes, 27 ont présenté une réponse complète (43,5%) tandis que 35 ont partiellement ou n'ont pas répondu au traitement (56,4%). Pour chaque patiente, un immunoscore de STARD3 a été évalué par immunohistochimie sur la biopsie initiale faite lors du diagnostic. Toutes les patientes ayant un score négatif de STARD3 ont présenté une réponse partielle ou absente au traitement. Ces résultats suggèrent que la surexpression de STARD3 pourrait être utilisée en clinique comme marqueur prédictif de réponse aux thérapies anti-HER2. En effet, les patientes présentant une surexpression de HER2 due à une dérégulation transcriptionnelle et non à l'amplification du gène ne répondent pas au trastuzumab. La raison n'est pas connue mais peut-être que dans ces tumeurs, *HER2* n'est pas le seul gène « driver » de la maladie. Par conséquent, l'analyse de la surexpression de HER2 conjointement à celle de STARD3 par immunohistochimie pourrait être utilisée en clinique pour diagnostiquer les patientes HER2+ et pour confirmer l'indication d'un traitement par thérapie anti-HER2. En effet, les patientes HER2+ et susceptibles de répondre au trastuzumab présentent une co-amplification de *STARD3* et *HER2* et les techniques de FISH permettant de diagnostiquer des amplifications de gènes ne sont réalisées qu'en cas d'immunoscore HER2 intermédiaire du fait du coût élevé de cette méthode. Tout comme Vinatzer l'avait suggéré, STARD3 n'est pas un marqueur indépendant de HER2 mais pourrait être utilisé comme marqueur prédictif additionnel en cas de doutes de l'amplification de HER2. En pratique, il est plus simple et moins coûteux de réaliser une immunohistochimie supplémentaire plutôt qu'une FISH.

En conclusion, les cancers du sein HER2+ ne dépendent pas uniquement de l'oncogène *HER2* mais également de *STARD3*. *STARD3* n'est pas directement oncogénique, mais il est devenu nécessaire à la progression tumorale. Ceci est conforme au concept d'addiction à des « non oncogènes » dans les cellules cancéreuses. Ainsi, l'étude du mécanisme moléculaire d'addiction des cellules HER2+ pour STARD3 était nécessaire avant d'envisager STARD3 comme une cible thérapeutique pour un traitement combinatoire avec les thérapies anti-HER2 existantes. De plus, les études cliniques concernant le rôle de STARD3 comme marqueur

-Introduction-

pronostic et prédictif de réponse thérapeutique ne sont pas claires. Ainsi, l'étude concernant l'intérêt potentiel de STARD3 comme biomarqueur prédictif de la réponse aux thérapies néoadjuvantes anti-HER2 permettra d'apporter plus d'informations quant à la signification clinique de la surexpression de STARD3 (Lodi et al., en préparation). Ce travail, encore en cours, est réalisé en collaboration avec les cliniciens du CHU de Strasbourg.

CHAPITRE 4 : LE CHOLESTEROL

STARD3 est un transporteur spécifique du cholestérol au sein de la cellule. C'est pourquoi la dernière partie des rappels bibliographiques porte sur le métabolisme du cholestérol et sur son rôle dans les cancers.

I. Découverte, structure et fonctions du cholestérol

Le cholestérol est un lipide appartenant à la famille des stérols. Il est retrouvé uniquement chez les mammifères. Le cholestérol est remplacé par des phytostérols chez les plantes et par l'ergostérol chez la levure. Son nom vient du grec ancien. *Chole* signifie bile et *stereos* signifie solide, du fait qu'il a été identifié pour la première fois comme un composant solide des calculs biliaires. En effet, le cholestérol a été isolé pour la première fois à partir de calculs biliaires en 1768 par François Poulletier de la Salle. Mais ce n'est qu'en 1816 que le chimiste français Michel Eugène Chevreul a identifié et purifié cette substance cristalline à partir de calculs biliaires et l'a nommée cholestérol (Schlienger, 2012).

Le cholestérol contient quatre cycles carbonés formant le noyau stéroïde, un groupement hydroxyle pouvant être estérifié par des acides gras et une chaîne hydrocarbonée. Du fait de sa composition, le cholestérol est hydrophobe. Cependant, la présence du groupe hydroxyle rend cette molécule également partiellement hydrophile, ce qui lui confère une propriété amphiphile, caractéristique des composants lipidiques des membranes cellulaires.

Le cholestérol est un composé important des membranes cellulaires, en particulier de la membrane plasmique où il est retrouvé en plus grande quantité (Hullin-Matsuda et al., 2014; van Meer et al., 2008). En effet, la membrane plasmique, puis l'appareil de Golgi et les endosomes, et enfin le RE et les mitochondries contiennent respectivement de forte, moyenne et faible concentrations de cholestérol (**Figure I15**). Les taux de cholestérol dans les membranes intracellulaires sont constamment ajustés pour correspondre aux fonctions spécifiques de chaque organite. Le cholestérol est maintenu à un niveau élevé dans la membrane plasmique du fait de sa fonction de barrière avec le milieu extérieur, tandis que des niveaux bas sont trouvés dans le réticulum endoplasmique où le cholestérol intervient dans le contrôle de sa propre synthèse. En effet, 60 à 70 % du cholestérol cellulaire est localisé dans la membrane plasmique tandis que le réticulum endoplasmique n'en contient que 5 %. Ce gradient de concentration en

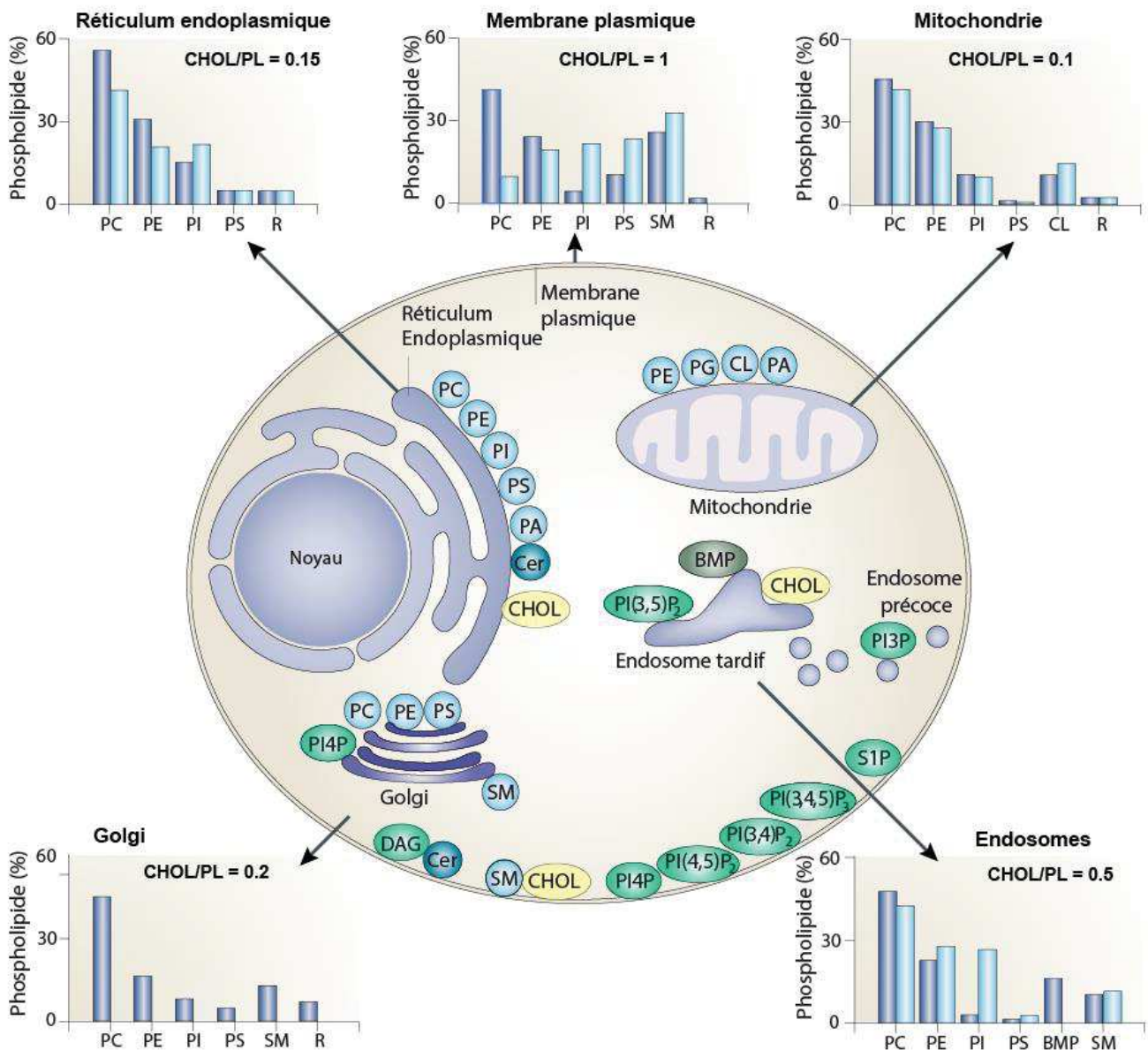


Figure I15 : Composition lipidique des différentes membranes cellulaires

Les données de composition lipidiques sont exprimées en pourcentage total de phospholipides (PL) chez les mammifères (bleu) et la levure (bleu clair). Comme mesure de la teneur en cholestérol, le rapport molaire du cholestérol (CHOL) aux phospholipides est indiqué en gras. (D'après Van Meer et al., 2008)

-Introduction-

cholestérol est donc important pour le transport de lipides entre les différentes membranes cellulaires (Ikonen, 2008; Mesmin and Antony, 2016).

Le cholestérol s'insère entre les phospholipides pour former la bicouche lipidique de la membrane plasmique et seul le groupe hydroxyle fait face à l'environnement extérieur (**Figure I16**) (Marquardt et al., 2016). Son positionnement dans la bicouche lipidique et son interaction avec d'autres lipides ont un rôle important dans la fluidité de la membrane. En effet, le cholestérol a pour rôle de rigidifier les membranes. En interagissant avec la sphingomyéline, il permet la formation de phases liquides ordonnées plus compactes et moins fluides appelées radeaux lipidiques (Silvius, 2003). Ces microdomaines de la membrane plasmique sont des structures dynamiques riches en cholestérol et en sphingomyéline (**Figure I16**) (Pike, 2006). Les radeaux lipidiques servent d'ancrage à des protéines fonctionnelles et sont impliqués dans la transduction du signal intracellulaire (Simons and Toomre, 2000). En effet, les radeaux lipidiques favorisent les interactions protéine-protéine spécifiques ce qui entraîne l'activation de cascades de signalisation. Les radeaux lipidiques peuvent donc être vus comme des plateformes où se concentrent des récepteurs.

Enfin, le cholestérol est également le précurseur de nombreuses molécules comme les hormones stéroïdiennes (cortisone, cortisol, aldostérone), les hormones sexuelles (œstrogène, progestérone et testostérone), la vitamine D (cholécalférol) ou encore les sels biliaires.

II. Origines du cholestérol

Dans la cellule, le cholestérol peut provenir de deux voies différentes : la voie endogène caractérisée par la synthèse *de novo* du cholestérol dans le réticulum endoplasmique et la voie exogène avec les lipoprotéines. Selon le type cellulaire, l'apport de cholestérol par chacune de ces deux voies est très variable (Ishitsuka et al., 2011). En effet, chaque cellule régule étroitement ses niveaux de cholestérol en contrôlant la synthèse, l'estérification et l'absorption exogène du cholestérol.

A. La biosynthèse du cholestérol

La synthèse du cholestérol a lieu dans le réticulum endoplasmique et implique de nombreuses réactions enzymatiques (**Figures I17**) (Cerqueira et al., 2016). La synthèse du cholestérol débute à partir de l'acétyl-CoA, qui est principalement issu d'une réaction

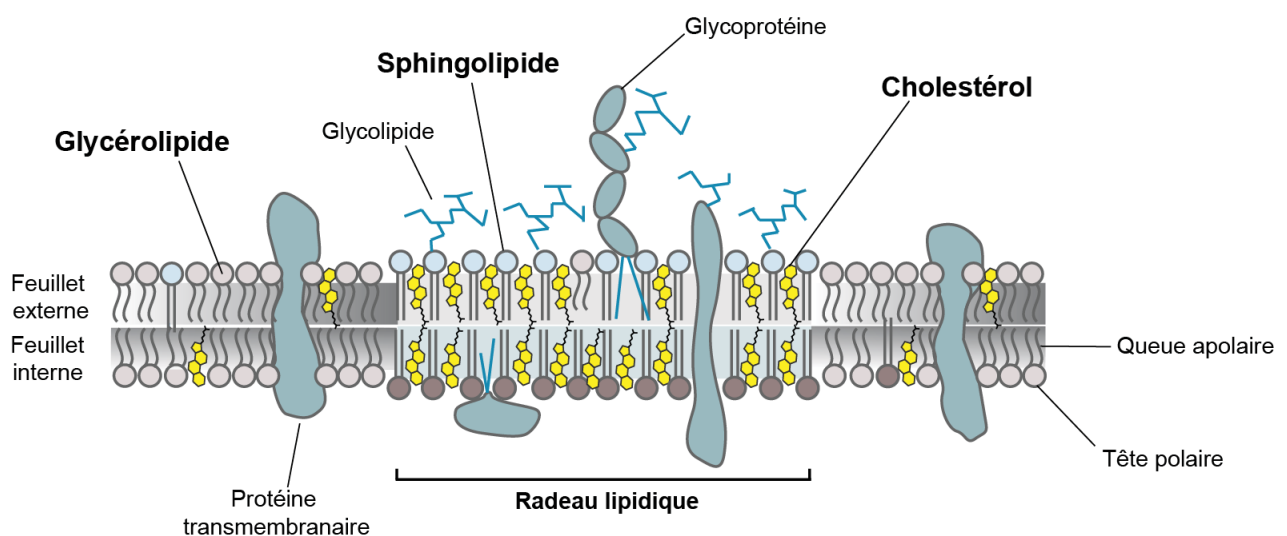


Figure I16 : Représentation schématique de la membrane plasmique

La bicouche lipidique de la membrane plasmique est constituée d'un feuillet interne et d'un feuillet externe. Le cholestérol s'insère entre les glycérolipides et les sphingolipides. Chaque lipide possède une tête polaire orientée vers l'extérieur de la membrane et une queue apolaire orientée vers l'intérieur. Les radeaux lipidiques sont des microdomaines de la membrane enrichis en cholestérol et sphingomyéline qui servent d'ancrage à des protéines fonctionnelles. (D'après Pollard et al., 2008)

d'oxydation dans les mitochondries. Cependant, l'acétyl-CoA peut également être dérivé de l'oxydation cytoplasmique de l'éthanol par l'acétyl-CoA synthétase. L'acétyl-CoA est ensuite converti en 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) par l'enzyme HMG-CoA synthétase. Puis l'HMG-CoA est convertie en mévalonate par l'HMG-CoA réductase (HMGCR) (Figure I17). Cette réaction est l'étape limitante de la synthèse du cholestérol et est réalisée grâce au NADPH, qui est utilisé comme cofacteur pour toutes les réactions de réduction tout au long de la synthèse du cholestérol. Le mévalonate subit ensuite une série de phosphorylations et une décarboxylation pour donner un isoprénoïde, le pyrophosphate d'isopentényle (IPP). Une série de réactions de polymérisation se produit, catalysées par la squalène synthase, conduisant à la production de squalène. La conversion du squalène en lanostérol puis en cholestérol nécessite 19 étapes de réaction supplémentaires comprenant des réactions de cyclisation et d'oxydo-réduction.

B. Le cholestérol exogène

Un mécanisme parallèle à la biosynthèse du cholestérol a été mis en place afin de capturer le cholestérol présent dans le milieu extracellulaire appelé cholestérol exogène. Du fait de son caractère hydrophobe, le cholestérol n'est pas soluble dans le sang et doit être transporté grâce à des particules, les lipoprotéines. La fonction première des lipoprotéines est le transport et l'acheminement des acides gras, du triacylglycérol et du cholestérol vers et depuis les cellules cibles de nombreux organes (Moini, 2019).

Les lipoprotéines sont des particules complexes qui ont un noyau hydrophobe contenant des lipides non polaires, principalement des esters de cholestérol et des triglycérides. Ce noyau hydrophobe est entouré d'une membrane amphiphile composée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (Figure I18A) (Feingold and Grunfeld, 2000). Les lipoprotéines sont divisées en cinq classes selon leur taille, leur composition lipidique et leurs apolipoprotéines (Figure I18B). Les apolipoprotéines jouent un rôle dans la formation et la structure des lipoprotéines, elles servent de ligands pour les récepteurs des lipoprotéines (Feingold and Grunfeld, 2000) et elles dirigent les lipoprotéines vers les sites appropriés du métabolisme (Moini, 2019).

Les lipoprotéines sont classées en fonction de leur densité. On distingue les chylomicrons, les VLDL (Very Low Density Lipoprotein), les IDL (Intermediates Density Lipoprotein), les LDL (Low Density Lipoprotein) et les HDL (High Density Lipoprotein).

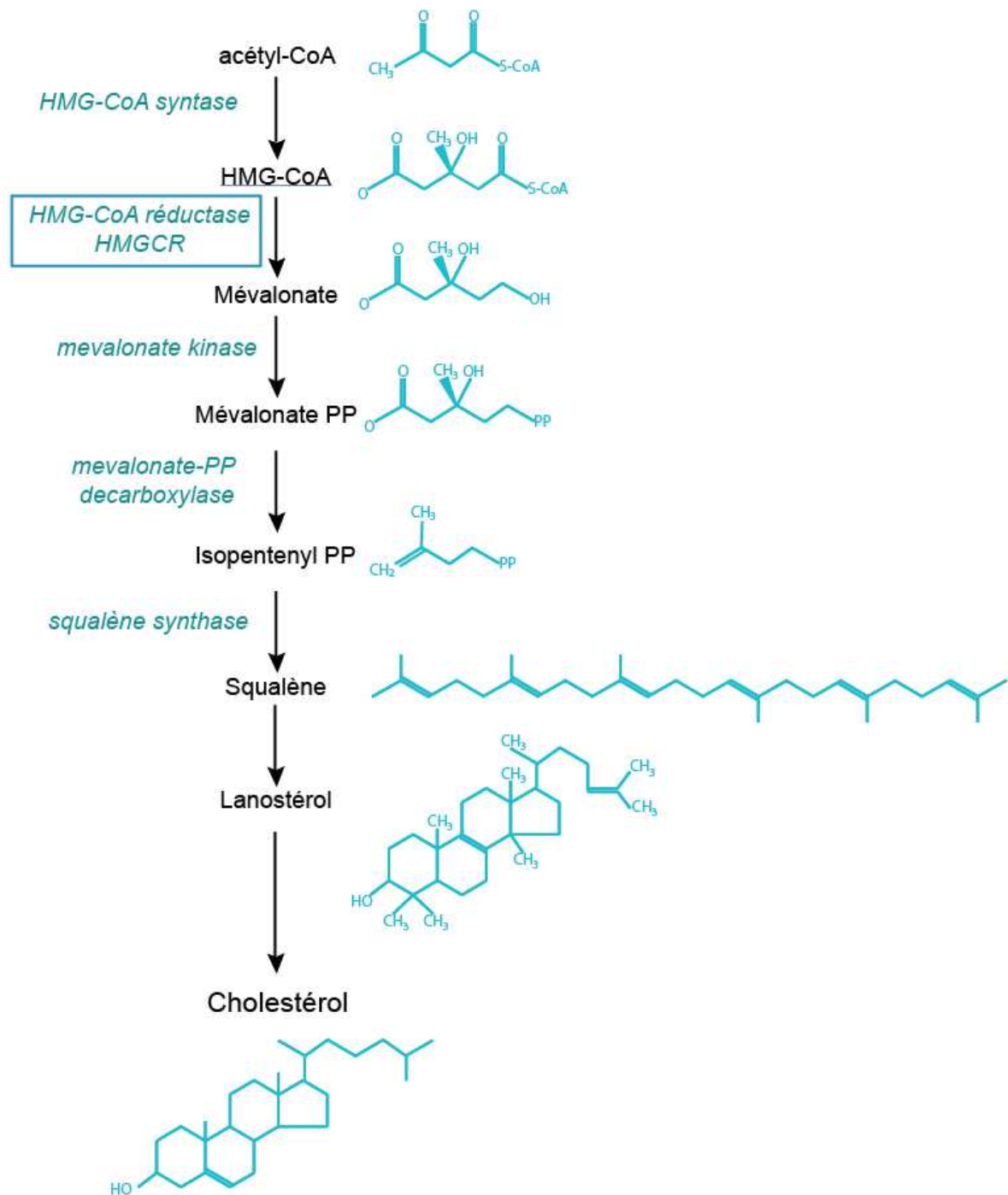


Figure I17 : La biosynthèse du cholestérol dans le réticulum endoplasmique

L'acétyl-CoA est converti en HMG-CoA par l'enzyme HMG-CoA synthétase. L'HMG-CoA est ensuite convertie en mévalonate par l'HMG-CoA réductase (HMGCR). Le mévalonate subit ensuite une série de phosphorylations et une décarboxylation pour donner le pyrophosphate d'isopentényle (IPP). Une série de réactions catalysées notamment par la squalène synthase, conduisent à la production de squalène. Enfin, le squalène est converti en lanostérol puis en cholestérol.

-Introduction-

Comme les lipides ont une densité inférieure à celle de l'eau, la densité des lipoprotéines dépend du rapport entre les lipides et les protéines. Plus le ratio lipides/protéines est faible, plus les lipoprotéines sont denses (**Figure I18B**).

Les chylomicrons sont les plus grandes lipoprotéines. Elles ont le plus grand rapport lipides/protéines (environ 90 % de lipides) et donc la plus faible densité. Les chylomicrons sont produits par les entérocytes et incorporent les lipides absorbés lors de l'alimentation par les cellules de la paroi intestinale (Mansbach and Siddiqi, 2010). La teneur en triglycérides, en esters de cholestérol et en cholestérol libre de ces particules provient donc de la digestion des graisses alimentaires. Les chylomicrons sont ensuite sécrétés dans la circulation lymphatique puis dans la circulation sanguine. Leurs principales destinations sont le muscle cardiaque, le muscle squelettique, le tissu adipeux et le tissu mammaire en lactation.

Les VLDL sont des lipoprotéines synthétisées par le foie et sont riches en triglycérides. Son rôle est également de délivrer des triglycérides, des esters de cholestérol et du cholestérol aux tissus périphériques. L'élimination des triglycérides des VLDL par le muscle et le tissu adipeux entraîne la formation de particules IDL qui sont enrichies en cholestérol.

Les LDL sont dérivées des particules VLDL et IDL et elles sont encore plus enrichies en cholestérol et en esters de cholestérol. Les LDL transportent la majorité du cholestérol qui se trouve dans la circulation sanguine. Il a été montré qu'une abondance de particules LDL est associée à une hypertriglycémie, un faible taux de HDL, à une obésité et au diabète de type 2. La décharge du contenu lipidique des LDL aux cellules nécessite la reconnaissance de l'apoprotéine ApoB par un récepteur situé à la surface des cellules. Lorsque l'apoprotéine est liée au récepteur des LDL (LDLR), le complexe LDLR-LDL est endocyté. La baisse du pH dans les endosomes permet la dissociation du complexe LDLR-LDL. Le récepteur est ensuite recyclé à la membrane plasmique tandis que la particule de LDL est dégradée dans les lysosomes et libère son contenu à l'intérieur de la cellule (Goldstein Joseph L. and Brown Michael S., 2009). La découverte du processus d'absorption cellulaire des particules de LDL par Michael Brown et Joseph Goldstein leur a valu le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1985 (Brown and Goldstein, 1979). De plus, il a été montré que des mutations du gène codant pour le récepteur aux LDL induisent des défauts d'internalisation du complexe LDLR-LDL responsable d'une augmentation du taux de LDL dans le sang et jouant un rôle majeur dans des maladies comme l'hypercholestérolémie familiale (Anderson et al., 1977; Brown and Goldstein, 1979; Davis et al., 1986; Garcia et al., 2001; Tada et al., 2011).

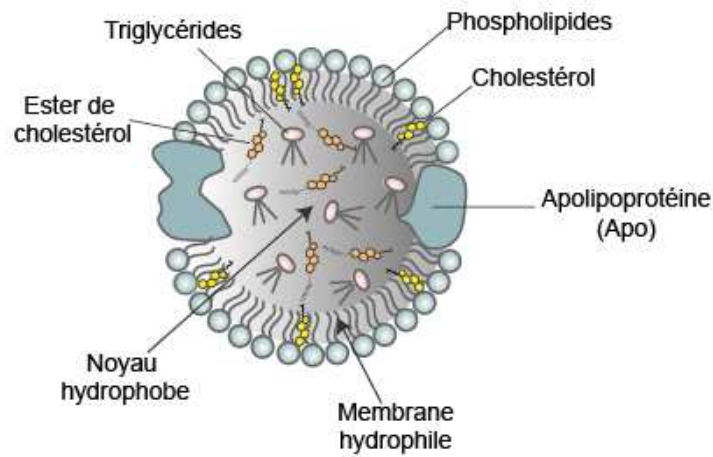
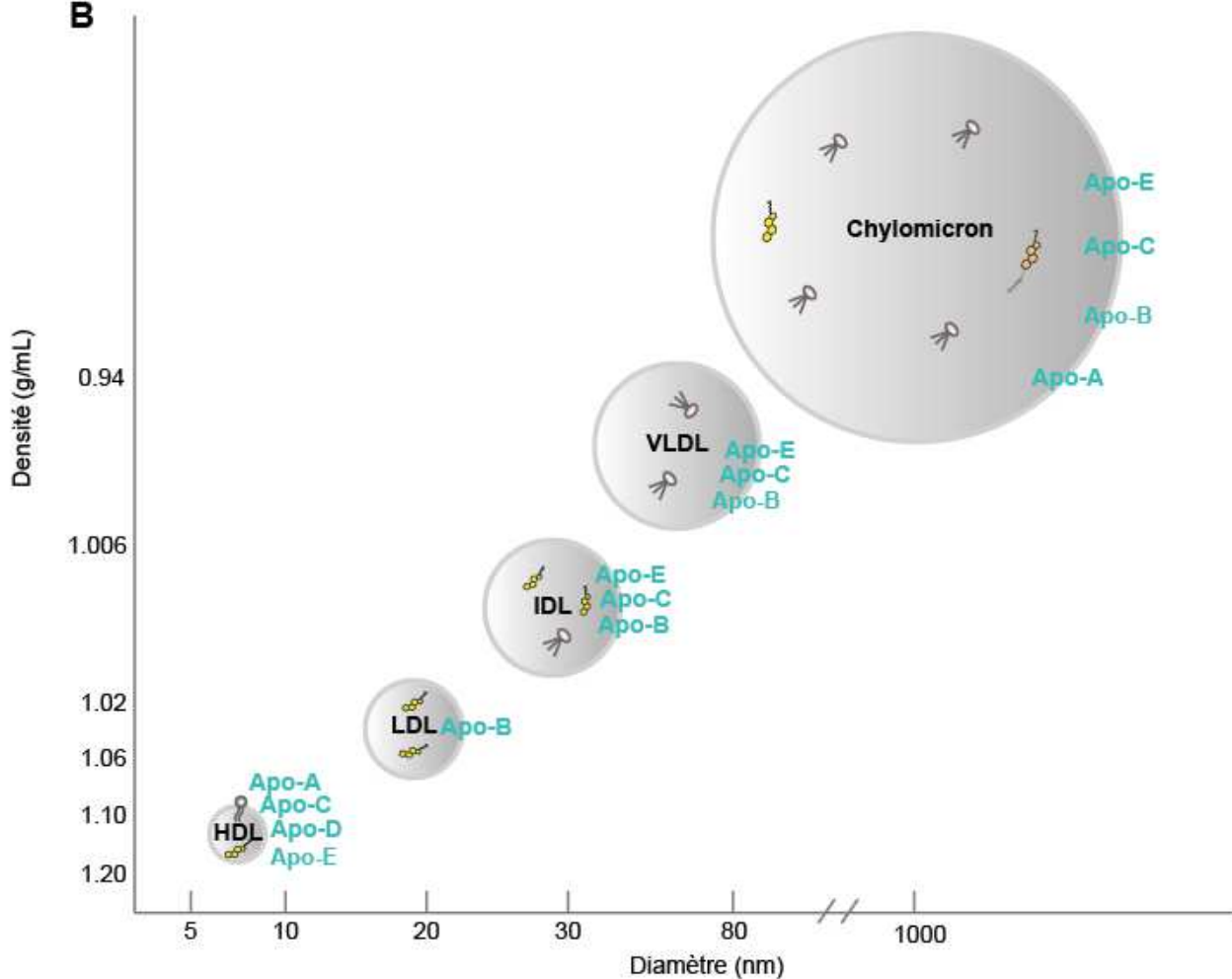
A**B**

Figure I18 : Les lipoprotéines plasmatiques

A. Représentation schématique des lipoprotéines. Les lipoprotéines sont constituées d'un noyau hydrophobe contenant des lipides non polaires (esters de cholestérol et triglycérides) et d'une membrane hydrophile composée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines.

B. Les lipoprotéines sont classées en fonction de leur densité. Elles se différencient les une des autres en fonction de leur composition lipidique et de leurs apolipoprotéines. (D'après Feinglod and Grunfeld, 2015)

-Introduction-

Les HDL quant à eux sont impliqués dans le transport réverse du cholestérol, c'est-à-dire le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Il a été montré que le flux de cholestérol des macrophages vers les HDL joue un rôle majeur dans la protection contre le développement de l'athérosclérose et des maladies cardiaques (Hutchins and Heinecke, 2015).

Ainsi, en fonction de leurs besoins, les cellules sont capables de néosynthétiser du cholestérol au niveau du réticulum endoplasmique mais également de capter le cholestérol exogène en endocytant des lipoprotéines LDL.

III. Export du cholestérol de la cellule

Les cellules périphériques accumulent le cholestérol par l'absorption des lipoprotéines circulantes et la biosynthèse du cholestérol. Les cellules des organes stéroïdogéniques peuvent convertir le cholestérol en hormones stéroïdiennes. Cependant, la plupart des cellules ne sont pas capables de cataboliser le cholestérol. C'est pourquoi un mécanisme de transport réverse du cholestérol a été mis en place. Le transport réverse du cholestérol est défini comme le transport du cholestérol des cellules périphériques au foie par les HDL pour son excrétion dans la bile (**Figure I19**) (Lewis Gary F. and Rader Daniel J., 2005; Rader et al., 2009).

Les HDL sont les principales lipoprotéines impliquées dans ce processus. Tout d'abord, l'intestin et le foie synthétisent la protéine Apo A-1, l'apolipoprotéine majeure des HDL, qui entre dans la circulation sanguine et se dirige vers les tissus périphériques. Puis, le cholestérol est transporté de la membrane plasmique des cellules périphériques à la protéine Apo A-1. L'efflux de cholestérol vers l'Apo A-I nouvellement synthétisée est facilité par les transporteurs de la famille ABC (ATP Binding Cassette). Les transporteurs ABC forment une large famille de protéines transmembranaires dont le rôle est de transporter des stérols à travers la membrane plasmique (Schmitz and Kaminski, 2001). Ils utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour ce transport. Deux principaux transporteurs impliqués dans l'efflux du cholestérol des macrophages vers les lipoprotéines HDL ont été décrits : ABCA1 et ABCG1 (Demina et al., 2016). ABCA1 facilite le transport de cholestérol à la protéine Apo A-1 générant un HDL « naissant » ou pré- β -HDL tandis que ABCG1 transfère le cholestérol aux HDL matures (Gelissen et al., 2006). Le transfert de cholestérol à la protéine Apo A-1 est appelée lipidation de l'apolipoprotéine (Maric et al., 2005). De plus, les particules HDL « naissantes » peuvent également servir de substrats pour l'exportation de cholestérol par ABCG1.

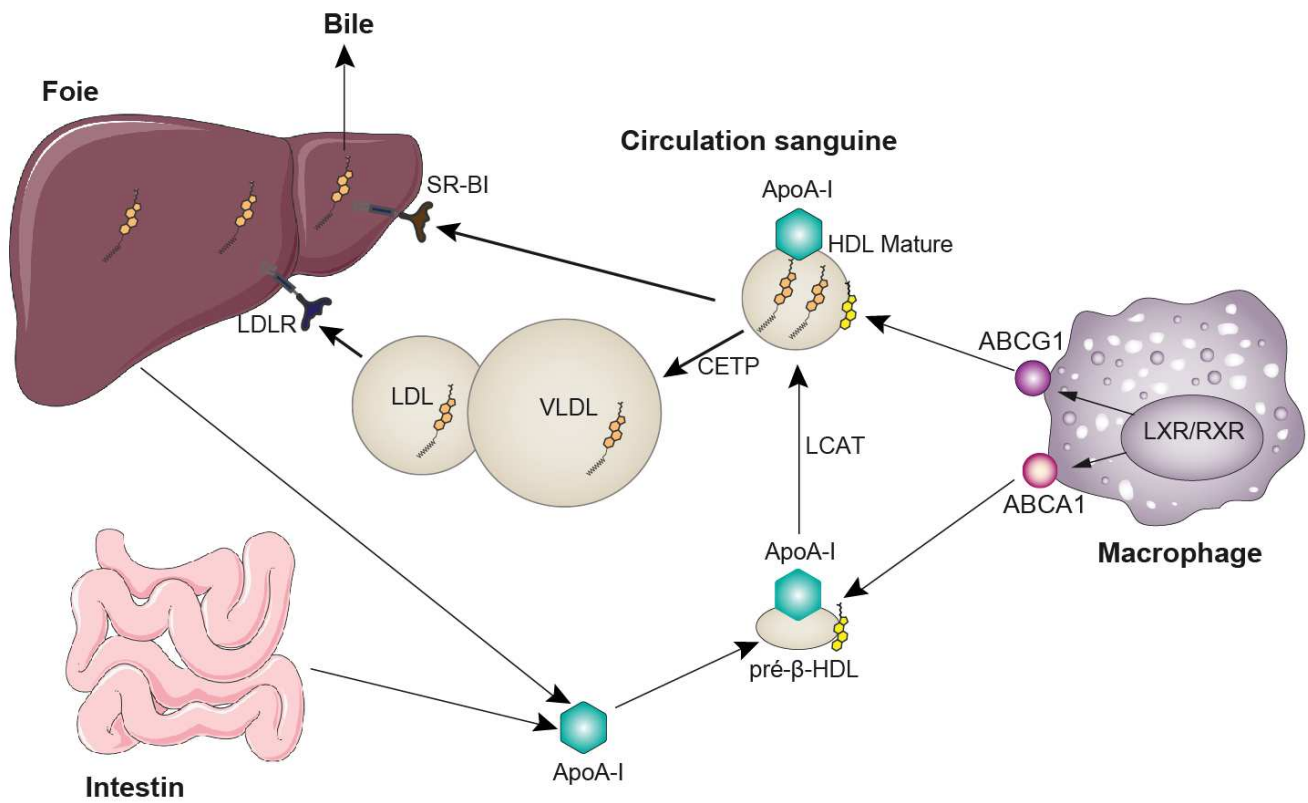


Figure I19 : Le transport réverse du cholestérol

L'intestin et le foie synthétisent la protéine ApoA-1 qui entre dans la circulation sanguine et se dirige vers les tissus périphériques. Les transporteurs ABC (ABCG1 et ABCA1) facilite le transport du cholestérol aux particules HDL. Dans les HDL, l'enzyme LCAT catalyse la réaction d'estérification du cholestérol. Les esters de cholestérol des HDL matures sont absorbés par le foie soit par un transport direct via l'interaction avec le récepteur SR-BI soit par un transport indirect via l'enzyme CETP qui transfère le cholestérol des HDL aux LDL/VLDL. Enfin, les esters de cholestérol sont excrétés dans la bile. (D'après Feinglod and Grunfeld, 2015)

-Introduction-

Le cholestérol qui est transféré des cellules vers les HDL est du cholestérol libre et est localisé à la surface des particules de HDL. Afin de former de grandes particules sphériques de HDL matures avec un noyau d'esters de cholestérol, le cholestérol libre à la surface des particules de HDL doit être estérifié. La LCAT (Lécithine-Cholestérol AcylTransférase), une enzyme associée aux HDL, catalyse le transfert d'un acide gras des phospholipides vers le cholestérol libre, ce qui entraîne la formation d'esters de cholestérol (Manthei et al., 2020). L'ester de cholestérol formé est alors capable de se déplacer de la surface de la particule HDL vers le noyau. L'activité de l'enzyme LCAT est donc nécessaire à la formation de grandes particules de HDL.

Une fois que le cholestérol est transféré des cellules aux particules HDL, il existe deux voies pour que le cholestérol soit absorbé par le foie : un transport direct via l'interaction avec le récepteur SR-BI (Scavenger receptor class B member 1) et un transport indirect via l'enzyme CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) (Marques et al., 2018). En effet, les particules de HDL peuvent directement interagir avec les récepteurs hépatiques SR-BI, ce qui entraîne l'absorption sélective des esters de cholestérol des particules de HDL (Pagler et al., 2006). Ce mécanisme ne nécessite pas d'énergie. De plus, l'enzyme CETP peut également transférer le cholestérol des particules de HDL vers des particules contenant de l'Apo B (VLDL et LDL) en échange de triacylglycérol, induisant l'absorption de ces lipoprotéines par le foie (Inazu, 2010; Moulin, 1995). Les esters de cholestérol absorbés dans le foie sont ensuite excrétés dans la bile.

Ainsi, il existe un mécanisme de transport réverse du cholestérol afin d'induire son catabolisme. Ce processus de transport est réalisé par les lipoprotéines HDL et implique différentes étapes et acteurs comme des transporteurs ABC, des récepteurs « scavenger » et des enzymes.

IV. Régulation de l'homéostasie du cholestérol

L'homéostasie du cholestérol est essentielle au bon fonctionnement des cellules. La perte d'homéostasie du cholestérol est la cause de nombreuses maladies dont les maladies cardiovasculaires, mais aussi d'un nombre croissant d'autres maladies telles que les maladies neurodégénératives et les cancers. Afin d'assurer l'homéostasie du cholestérol, il existe différents mécanismes cellulaires impliquant les facteurs de transcription SREBPs, les facteurs

de transcription LXR α s, l'enzyme HMGCoA réductase ainsi que les micro-ARNs (Goedeke and Fernández-Hernando, 2012; Luo et al., 2020).

A. Les facteurs de transcription SREBPs

La concentration en cholestérol dans les cellules est finement régulée par un système de rétrocontrôle. En effet, le réticulum endoplasmique est principalement responsable de la régulation de la synthèse du cholestérol. Des protéines responsables de la détection des stérols sont capables de fournir un contrôle très précis de la synthèse du cholestérol au niveau de cet organe. Afin de réguler les concentrations de stérols et ajuster leur synthèse et absorption, les cellules utilisent une famille de facteurs de transcription, les protéines SREBPs (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins), (Goldstein et al., 2006).

Les protéines SREBPs sont une famille de facteurs de transcription qui régulent l'homéostasie des lipides en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans la synthèse endogène du cholestérol, des acides gras, du triacylglycérol et des phospholipides. Il existe trois isoformes de SREBP présentant des rôles différents dans la synthèse des lipides : SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2 (Eberlé et al., 2004). Des études *in vivo* utilisant des souris transgéniques et des souris knockout ont montré que SREBP-1c est impliqué dans la synthèse des acides gras et le métabolisme du glucose (en particulier dans la lipogenèse), tandis que SREBP-2 est spécifique à la synthèse du cholestérol (Amemiya-Kudo et al., 2002). L'isoforme SREBP-1a quant à lui semble être impliquée dans les deux voies. Les facteurs de transcription SREBPs sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs liés aux membranes du réticulum endoplasmique.

SREBP-2 est appelé un « senseur » du cholestérol. Son activité est régulée par la teneur en cholestérol cellulaire. A l'état basal, SREBP-2 forme avec la protéine SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein) un complexe retenu dans la membrane du réticulum endoplasmique (Figure I20). En effet, SCAP interagit avec la protéine Insig-1 (Insulin-induced gene 1 protein) afin de maintenir le complexe au niveau du réticulum (Sun et al., 2005). La protéine SCAP agit comme une protéine chaperonne de SREBP-2 et est sensible aux taux de cholestérol grâce à son domaine SSD (Sterol Sensing Domain) (Levine, 2004a; Radhakrishnan et al., 2004). Lorsque le taux de cholestérol cellulaire diminue, la protéine SCAP change de conformation induisant la libération du complexe SREBP-2/SCAP (Brown et al., 2002). SREBP-2 est alors pris en charge par les vésicules de transport COP II afin d'être transporté

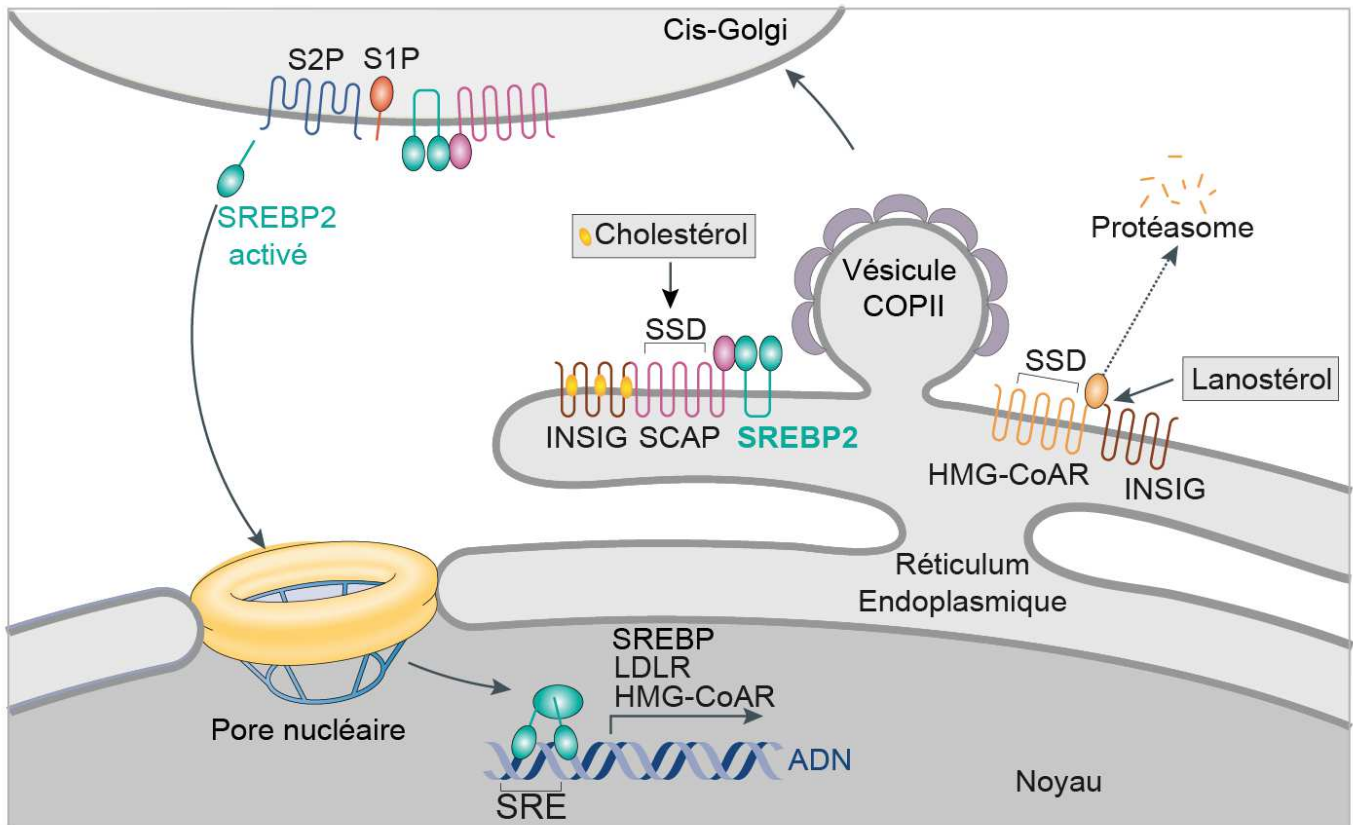


Figure I20 : Régulation de l'homéostasie du cholestérol

SREBP2 forme avec SCAP un complexe retenu dans la membrane du réticulum endoplasmique par la protéine INSIG. Lorsque la concentration en cholestérol diminue, SCAP change de conformation et le complexe SREBP2-SCAP est transporté dans le Golgi par des vésicules COP II. Dans le Golgi, SREBP2 est activé après clivage par les protéases S1P et S2P. SREBP2 actif est transporté dans le noyau où il se fixe sur les séquences SRE afin d'induire la transcription de gènes cibles.

D'autre part, l'accumulation de lanostérol stimule la liaison de l'HMGCR à la protéine INSIG, ce qui induit l'ubiquitination de l'HMGCR et sa dégradation dans le protéasome. (D'après Ikonen, 2008)

vers l'appareil de Golgi où les protéases S1P (site 1 protease) et S2P (site 2 protease) clivent et activent SREBP-2. Une fois activé, SREBP-2 migre dans le noyau et active la transcription de gènes cibles comme l'enzyme HMG-CoA réductase ou le récepteur aux LDL (**Figure I120**) (Hua et al., 1993). En effet, l'ensemble des gènes cibles possèdent une séquence SRE (Sterol Response Element) dans leurs régions promotrices permettant au facteur de transcription SREBP-2 de se fixer et d'induire leur expression. L'activation de SREBP-2 entraîne donc une augmentation de la capture du cholestérol via l'endocytose des particules LDL ainsi qu'une augmentation de la néosynthèse du cholestérol. Enfin, le système ubiquitine-protéasome dégrade SREBP-2 (Hirano et al., 2001).

B. Les facteurs de transcription LXRs

Les récepteurs LXR (Liver X Receptor) sont des récepteurs nucléaires impliqués dans l'homéostasie du cholestérol. Il existe deux isoformes des récepteurs LXR nommés LXR α et LXR β qui sont régulées par la liaison de ligands physiologiques (Ulven et al., 2005). Les ligands naturels des récepteurs LXR sont des dérivés des stérols comme les oxystérols (Yang et al., 2006). Chez l'homme, LXR α et LXR β sont situés respectivement sur le bras court du chromosome 11 et le bras long du chromosome 19. Alors que LXR β est exprimé de manière ubiquitaire, LXR α est principalement exprimé dans le foie, les tissus adipeux et les macrophages jouant donc un rôle important dans le métabolisme des lipides (Annicotte et al., 2004). LXR α (447 acides aminés) et LXR β (460 acides aminés) partagent 77 % d'homologie de séquence (Pannu et al., 2013). Les récepteurs LXR contiennent quatre domaines principaux : un domaine N-terminal d'activation indépendant du ligand, un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine de liaison au ligand (LBD) et un domaine C-terminal d'activation dépendante du ligand qui stimule la transcription de gènes cibles en réponse à la liaison du ligand et est nécessaire pour la liaison des co-activateurs ou co-répresseurs.

Lorsque les niveaux de cholestérol cellulaire sont élevés, les transporteurs ABCA1 et ABCG1 sont surexprimés par le facteur de transcription LXR (Goedeke and Fernández-Hernando, 2012; Tontonoz and Mangelsdorf, 2003). En effet, l'efflux de cholestérol est favorisé par le récepteur LXR en réponse à un excès de cholestérol. Lors de la liaison du ligand, le récepteur LXR s'hétérodimérise avec le récepteur RXR (Retinoïde X receptor) pour réguler positivement l'expression de gènes cibles tels que ABCA1, qui catalyse la première étape du transport réverse du cholestérol par les lipoprotéines HDL.

Des études *in vivo* ont montré que les souris déficientes en récepteurs LXR accumulent des stérols dans leurs tissus et développent rapidement une athérosclérose (Bradley et al., 2007). De plus, les agonistes synthétiques des récepteurs LXR sont capables de stimuler l'expression de ABCA1 et promouvoir le transport réverse du cholestérol. Les agonistes des récepteurs LXR représentent donc des cibles potentielles pour le traitement de maladies cardiovasculaires (Komati et al., 2017; Ma et al., 2017).

C. L'enzyme HMG-CoA réductase

Le métabolisme du cholestérol est également régulé au niveau post-transcriptionnel par divers mécanismes contrôlant l'activité de l'HMGCR. La conversion de l'HMG-CoA en mévalonate par l'HMG-CoA réductase (HMGCR) est l'étape limitante de la biosynthèse du cholestérol et est soumise à une régulation stricte. En plus d'avoir son expression contrôlée par le facteur de transcription SREBP-2, l'activité de l'HMGCR dépend de la présence de son substrat, l'HMG-CoA, au niveau du réticulum endoplasmique. De plus, l'HMGCR possède un domaine senseur du cholestérol appelé domaine SSD (Sterol Sensing Domain) qui lui permet de réguler son activité en fonction de la teneur en cholestérol dans la membrane du réticulum endoplasmique (Burg and Espenshade, 2011).

Le contrôle de la dégradation et phosphorylation de l'HMGCR participe également à l'homéostasie du cholestérol en contrôlant l'activité de l'HMGCR. En effet, il a été montré que le lanostérol stimule la dégradation de l'HMGCR (Chen et al., 2019). Le lanostérol est le premier stérol synthétisé à partir du mévalonate dans la voie des stérols. L'accumulation de lanostérol stimule la liaison de l'HMGCR à la protéine INSIG, ce qui induit l'ubiquitination de l'HMGCR sur deux lysines cytosoliques et sa dégradation ultérieure par le protéasome (Figure I20) (Song et al., 2005). De manière intéressante, il a également été montré que la protéine kinase AMPK est capable de phosphoryler l'HMGCR sur la sérine 871 et inhiber son activité (Hopkins et al., 2003; Sato et al., 1993).

Du fait de son rôle majeur dans l'homéostasie du cholestérol, l'HMGCR est devenue la cible de médicaments, les statines, qui sont utilisées en clinique pour traiter les hypercholestérolémies et diminuer les taux de cholestérol sanguins (Stancu and Sima, 2001).

D. Les micro-ARNs

En plus des mécanismes de régulation classiques, les micro-ARNs (miARNs) régulent également l'expression de gènes cibles dans le métabolisme du cholestérol. Les miARNs sont des petits ARN non codants (~ 22 nucléotides) et simple brin qui régulent l'expression post-transcriptionnelle des gènes. Dans la plupart des cas, les miARNs interagissent avec la région 3' UTR des ARNm cibles portant une séquence homologue et induisent une dégradation des ARNm et une répression de la traduction (O'Brien et al., 2018).

Plusieurs microARN ont été décrits dans la littérature comme régulant le métabolisme des lipides, y compris les miR-122, miR-370, miR-378, miR-143, miR-27, miR-335 et miR-33 (Goedeke and Fernández-Hernando, 2012). Par exemple, miR-33 a été identifié comme un régulateur majeur de l'homéostasie du cholestérol. En cas de carence en cholestérol, miR-33 est co-transcrit avec SREBP-2 et SREBP-1 servant ainsi à augmenter les taux de cholestérol cellulaires en régulant à la baisse l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1 et donc en limitant l'efflux de cholestérol (Gerin et al., 2010; Horie et al., 2010; Najafi-Shoushtari et al., 2010).

Ainsi, les micro-ARNs participent à la régulation de l'homéostasie intracellulaire du cholestérol en intervenant post-transcriptionnellement et représentent donc de bons candidats pour le traitement de maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose (Colpaert and Calore, 2019).

V. Le transport du cholestérol dans la cellule

La distribution correcte du cholestérol entre les membranes cellulaires est essentielle pour de nombreuses fonctions biologiques notamment la transduction du signal ou le trafic membranaire. Chaque organelle possède une composition en cholestérol unique adaptée à ses fonctions. La régulation du transport intracellulaire de cholestérol est donc primordiale. Il existe deux types de transport lipidiques au sein des cellules (Holthuis and Levine, 2005; Maxfield and Wüstner, 2002) : le transport vésiculaire constitué principalement par l'endocytose et l'exocytose et le transport non vésiculaire par l'intermédiaire de protéines spécialisées, les Lipid Transfer Proteins (LTPs), qui agissent au sein de régions de contact étroit entre organites appelés sites de contact membranaire (MCS Membrane Contact Site) (Figure I21A) (Ridgway

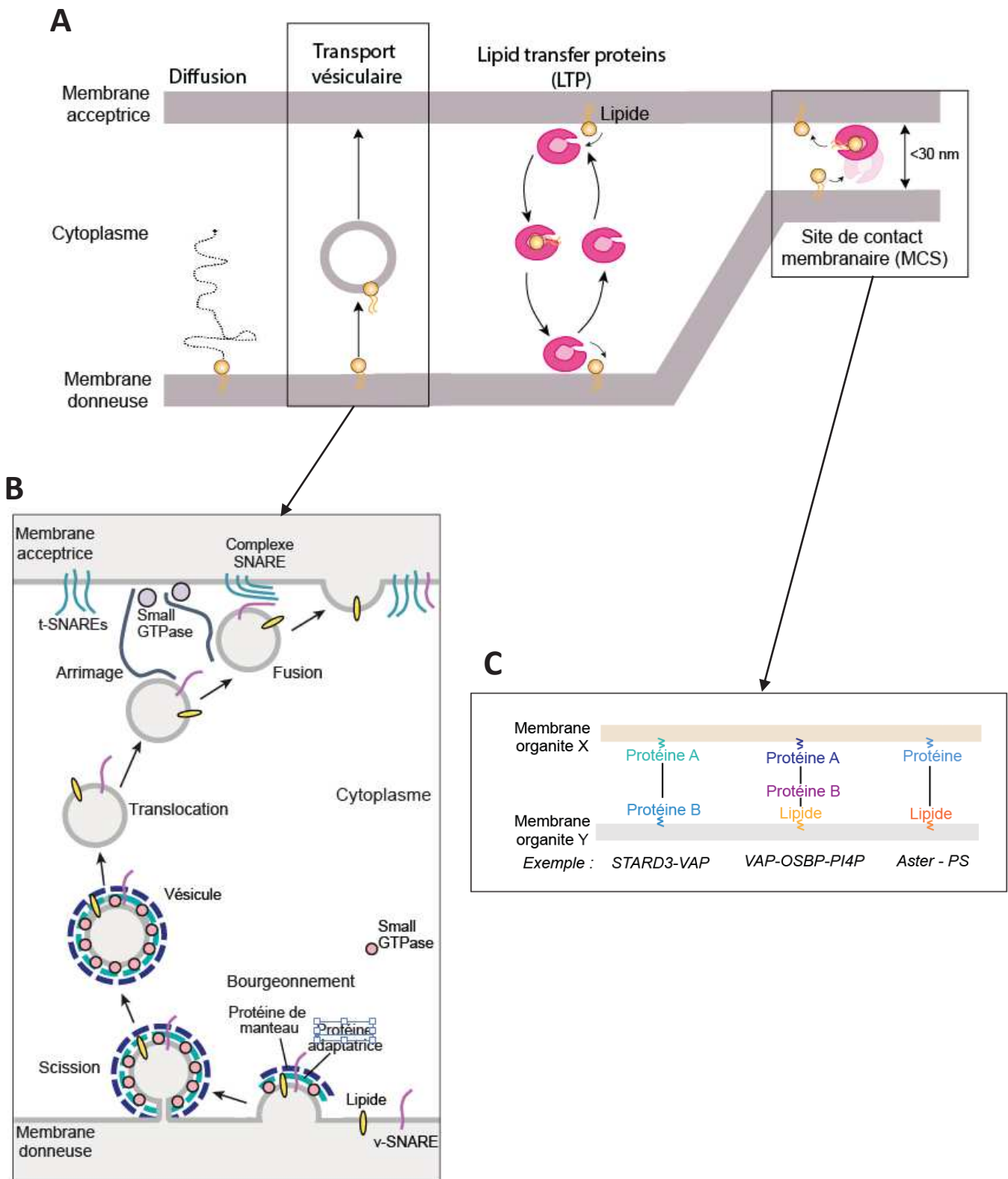


Figure I21 : Transport cellulaire des lipides

A. Il existe différents types de transports lipidiques au sein des cellules : la diffusion (très peu efficace du fait de la nature hydrophobe des lipides), le transport vésiculaire et le transport non vésiculaire par l'intermédiaire des Lipid Transfer Proteins (LTPs) qui agissent au niveau de sites de contact membranaire. (D'après Holthuis and Levine, 2005)

B. Représentation schématique du transport vésiculaire

C. Représentation schématique des différents mécanismes de formation de sites de contact entre organites.

and Zhao, 2018; Wong et al., 2017). Le cholestérol peut être transporté par ces deux voies (vésiculaire ou non) mais la voie non vésiculaire reste majoritaire.

A. Transport vésiculaire du cholestérol

Le transport vésiculaire participe aux voies d'endocytose et de sécrétion et peut être divisé en plusieurs étapes (Figure I21B) :

- La vésicule se forme à partir d'un bourgeon de la membrane donneuse. Au niveau de ce bourgeon se trouve des protéines du manteau (clathrine, protéine COP I/II...) et des protéines adaptatrices.
- La vésicule est libérée dans le cytoplasme par scission et se déplace le long du cytosquelette.
- La vésicule est arrimée au niveau de la membrane acceptrice grâce à des protéines d'arrimage.
- La vésicule fusionne avec la membrane acceptrice en interagissant avec les protéines SNARE et libère son contenu.

Le cholestérol peut être transporté de la membrane d'un organite à un autre dans des vésicules ou des tubules de transport (Maxfield and Wüstner, 2002). Le cholestérol est synthétisé dans le RE et peut ensuite être transporté vers la membrane plasmique par un processus dépendant de l'ATP (Hao et al., 2002). Cependant, la voie vésiculaire ne joue qu'un rôle mineur dans le transfert du cholestérol du site de synthèse, le réticulum endoplasmique, vers la membrane plasmique.

Aussi, il a été proposé que les cavéoles et la cavéoline jouent un rôle important dans le transport intracellulaire du cholestérol. Il semblerait que la cavéoline forme un complexe avec des protéines chaperonnes permettant d'acheminer le cholestérol du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique (Uittenbogaard and Smart, 2000).

Les cellules obtiennent également du cholestérol par endocytose de lipoprotéines LDL qui interagissent avec leur récepteur à la surface des cellules. Une fois livrés aux endosomes tardifs ou lysosomes, les esters de cholestérol des lipoprotéines LDL sont hydrolysés et le cholestérol libre est rapidement recyclé vers la membrane plasmique (Goldstein Joseph L. and Brown Michael S., 2009).

B. Transport non vésiculaire du cholestérol

Le cholestérol est transporté dynamiquement entre les organites cellulaires principalement par des mécanismes non vésiculaires. Le transport non vésiculaire du cholestérol est médié par des protéines appelées LTP (Lipid Transfer Protein). Les LTPs sont divisées en plusieurs sous-familles de protéines selon leur similarité de séquence et de structure (Salminen et al., 2016). Les LTPs sont capables de capter une molécule de lipide dans leur poche hydrophobe et transférer ce lipide entre les membranes cellulaires (**Figure I21A**) (Lev, 2010). De plus, il semble que l'action des LTPs soit facilitée au niveau de sites de contact membranaire (MCS) (Hanada, 2018). Les sites de contact membranaire sont des régions cellulaires spécifiques caractérisées par un rapprochement entre deux organites distincts (< 30nm), qui permettent l'échange de métabolites et d'informations (Helle et al., 2013). Ces contacts sont formés par des interactions protéine-protéine ou protéine-lipide (**Figure I21C**). Les MCS permettent de réduire la distance entre les organites et donc faciliter le transport des lipides (Prinz, 2014). Depuis leur découverte, de nombreuses LTPs impliquées dans le transport du cholestérol ont été identifiées et sont décrites ci-dessous.

1. Les protéines à domaine START

Les protéines à domaine START (Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR)-related lipid transfer) constituent une famille de quinze protéines chez les mammifères (STARD1 à STARD15) qui transportent les lipides au sein de la cellule (Alpy et al., 2009). Le domaine START est un module d'environ 210 acides aminés présent à l'extrémité carboxy-terminale des protéines qui permet l'échange de lipides entre les membranes sans faire appel à des vésicules membranaires (Alpy and Tomasetto, 2005). Le domaine START est constitué d'une poche amphiphile où se fixe le ligand lipidique hydrophobe qui se trouve ainsi isolé du milieu aqueux. Parmi les protéines à domaine START, STARD1, STARD3, STARD4 et STARD6 sont impliquées dans le transport du cholestérol.

STARD1 est une protéine mitochondriale principalement exprimée par les gonades et les glandes surrénales. Cette protéine possède un signal d'adressage à la mitochondrie à son extrémité N-terminale. STARD1 est impliquée dans la stéroïdogénèse. La biosynthèse des hormones stéroïdiennes nécessite le transfert de cholestérol vers la membrane mitochondriale interne, où la stéroïdogénèse commence par la conversion du cholestérol en prégnénolone

-Introduction-

(Miller and Bose, 2011). STARD1 est impliquée dans la stéroïdogénèse en rendant le cholestérol accessible au complexe P450_{scc} (side chain cleaving) ou CYP11A1 (Lin et al., 1995). P450_{scc} est un complexe enzymatique mitochondrial responsable du clivage de la chaîne latérale du cholestérol pour donner la prégnénolone. Chez l'Homme, des mutations inactivatrices de STARD1 sont responsables d'une maladie génétique appelée hyperplasie congénitale des surrénales et caractérisée par une absence de synthèse d'hormones stéroïdiennes (Arboleda and Vilain, 2016).

STARD3 est une protéine endosomale qui transporte le cholestérol du réticulum endoplasmique aux endosomes tardifs au niveau de sites de contact membranaire formés par l'interaction entre STARD3 et les protéines VAPs (Wilhelm et al., 2017) (cf chapitre 3 sur STARD3).

STARD4 est uniquement constituée d'un domaine START et lie spécifiquement le cholestérol. STARD4 est une LTP impliquée dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol. La perte d'expression de STARD4 diminue l'activation de SREBP-2 par le cholestérol, tandis que sa surexpression amplifie la détection des stérols par SCAP/SREBP-2 (Mesmin et al., 2011). De plus, l'expression de STARD4 est contrôlée au niveau transcriptionnel par les stérols. En effet, *STARD4* est régulée par SREBP-2 (Soccio et al., 2005). Aussi, dans un environnement pauvre en cholestérol, il a été constaté qu'une diminution de l'expression de STARD4 entraîne une rétention du cholestérol au niveau de la membrane plasmique, une réduction du cholestérol associé au réticulum endoplasmique et une diminution des esters de cholestérol synthétisés par l'ACAT (Garbarino et al., 2012). En outre, la perte d'expression de STARD4 réduit le transport de cholestérol vers le compartiment de recyclage ERC (endosomal recycling compartment). STARD4 est donc un transporteur cytoplasmique dont le rôle est d'équilibrer le cholestérol entre les différents organites (Iaea et al., 2015).

STARD6 est également constituée uniquement du domaine START. STARD6 présente une activité similaire à celle de STARD1 en ce qui concerne sa liaison au cholestérol et son association avec la membrane externe de la mitochondrie. De manière intéressante, STARD6 est presque exclusivement exprimée par les cellules germinales mâles (Bose et al., 2008; Gomes et al., 2005). De ce fait, elle ne remplace pas l'activité de STARD1 qui, elle, est restreinte aux cellules des gonades et des glandes surrénales. Cela suggère une fonction importante de STARD6 au niveau de la mitochondrie des cellules germinales mâles mais son rôle reste à définir (Calderon-Dominguez et al., 2014).

2. Les protéines appartenant à la famille des ORPs

Parmi les protéines appartenant à la famille des ORPs (Oxysterol-binding protein (OSBP)-Related Proteins), il existe principalement deux protéines impliquées dans le transport du cholestérol : ORP1L (OSBP-related protein 1L) et OSBP (Oxysterol-Binding Protein). Ces protéines possèdent un domaine ORD (Oxysterol-Related Domain) capable de lier le cholestérol.

En plus de son domaine ORD, ORP1L possède une région « ankyrin repeat » et un motif FFAT qui lui permet d'interagir avec les protéines VAPs. Il a été montré que la protéine ORP1L est un transporteur de cholestérol lors du trafic du récepteur membranaire EGFR (Eden et al., 2016). Après liaison du ligand EGF, le récepteur EGFR est activé et endocyté. Il se forme alors des contacts entre le RE et les endosomes. Au niveau de ces contacts, la phosphatase PTP1B localisée sur le RE interagit avec EGFR et le déphosphoryle. Cela entraîne la formation d'ILV (intraluminal vesicles) où est séquestré le récepteur. Aussi, pour former ces vésicules dans la lumière des endosomes, un transport de cholestérol du RE vers les endosomes est nécessaire. Ce transport de cholestérol est médié par le complexe ORP1L-VAP.

La protéine OSBP possède un domaine ORD, un motif FFAT et un domaine PH. Son domaine PH permet à la protéine d'interagir avec le PI4P (phosphatidylinositol-4-phosphate) du Golgi tandis que son motif FFAT lui permet d'interagir avec les protéines VAPs du RE. Ainsi, au niveau de ce contact membranaire entre le RE et le Golgi, OSBP est capable d'échanger une molécule de cholestérol contre une molécule de PI4P. Ainsi, le gradient de PI4P généré permet de créer un gradient de concentration de cholestérol (Antonny et al., 2018; Mesmin et al., 2017).

3. Les protéines NPC1 et NPC2

NPC1 et NPC2 sont deux protéines impliquées dans la sortie du cholestérol des endosomes. NPC1 est une grande protéine transmembranaire localisée au niveau de la membrane limitante des endosomes tardifs/lysosomes. NPC2 est une petite protéine luminale soluble qui transporte le cholestérol des membranes des vésicules intra-lysosomales vers le domaine N-terminal de la protéine NPC1. Des mutations des gènes *NPC1* ou *NPC2* sont responsables d'une maladie neurodégénérative appelée la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC), caractérisée au niveau cellulaire par l'accumulation de cholestérol dans les lysosomes.

-Introduction-

La maladie NPC est causée par des mutations des gènes codant pour les protéines lysosomales NPC1 (95% des cas) ou NPC2 (5% des cas). La mutation de l'un ou de l'autre entraîne le même phénotype suggérant un rôle étroitement lié de ces deux protéines dans le transport du cholestérol. Cependant, le mode de fonctionnement précis de ces protéines dans le transport du cholestérol n'est pas encore clair à ce jour.

Une étude a montré que NPC1 interagit avec la protéine ORP5 résidente du RE et que NPC1 et ORP5 sont toutes deux nécessaires pour la sortie du cholestérol endocyté vers le RE (Du et al., 2011). Récemment, une seconde étude a montré que NPC1 régule la formation de sites de contact membranaire entre les endosomes tardifs/lysosomes et le RE en interagissant avec la protéine de transport des stérols Gramd1b localisée dans le RE. Les protéines Gramd1 sont connues pour transférer les stérols via leur domaine de type START. Ainsi, dans des conditions de cholestérol endocyté élevé, NPC1 interagit avec Gramd1b pour transporter du cholestérol vers le réticulum endoplasmique (Höglinger et al., 2019).

4. Les protéines Aster ou Gramd

Les protéines Aster sont des protéines résidentes du réticulum endoplasmique qui lient le cholestérol et facilitent son retrait de la membrane plasmique des cellules (Sandhu et al., 2018). Il existe trois protéines dans cette famille nommées Aster-A, Aster-B et Aster-C qui sont respectivement codées par les gènes Gramd1a, Gramd1b et Gramd1c. Les protéines Aster contiennent un domaine GRAM du côté N-terminal, qui est structurellement similaire à un domaine PH, un domaine transmembranaire près de l'extrémité C-terminale et un domaine central appelé domaine ASTER qui ressemble structurellement au domaine START. Une étude récente a montré que ces protéines sont ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique par leur domaine transmembranaire et sont recrutées au niveau de la membrane plasmique lorsque le taux de cholestérol dans la membrane plasmique dépasse les niveaux homéostatiques (Sandhu et al., 2018). En effet, les protéines Aster permettent de transporter l'excès de cholestérol de la membrane plasmique vers le réticulum au niveau de sites de contact membranaire RE-PM via leur domaine ASTER (Kutyavin and Chawla, 2018).

Ainsi, il existe de nombreuses LTP transportant le cholestérol au sein de la cellule et certaines semblent agir préférentiellement au niveau de sites de contact membranaire. Ces sites

jouent donc un rôle majeur dans le transport du cholestérol entre les organites ainsi que dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol.

VI. Cholestérol et cancer

Le rôle du cholestérol dans le développement du cancer et la possibilité de cibler le cholestérol des cellules cancéreuses afin de traiter cette maladie est un sujet très controversé (Kuzu et al., 2016). De multiples mécanismes favorisant la perte d'homéostasie du cholestérol et pouvant conduire au développement de cancers ont été identifiés. Cependant, de nombreuses études contradictoires ont été publiées dans la littérature.

A. Etudes épidémiologiques

Certaines études épidémiologiques suggèrent une association positive entre un taux de cholestérol sérique élevé et le risque de développer certains types de cancers. Par exemple, une augmentation de 10 mg/dL de cholestérol dans le sang a été associée à une augmentation de 9 % de la récurrence du cancer de la prostate (Allott et al., 2014). Aussi, une autre étude suggère que l'utilisation de statines est associée à une diminution du risque de mélanome, de lymphome non hodgkinien, de cancer de l'endomètre et de cancer du sein (Jacobs et al., 2011; Murtola et al., 2014). Un autre rapport documente une réduction dose-dépendante de la mortalité par cancer colorectal avec l'utilisation de statines (Cardwell et al., 2014). Enfin, une étude portant sur 295 925 patients atteints de cancer a suggéré un lien entre l'utilisation de statines et une légère réduction de la mortalité pour 13 types de cancer (Nielsen et al., 2012). Bien que ces études épidémiologiques suggèrent un rôle de la cholestérolémie et des statines dans le cancer, elles ont largement été critiquées. En effet, il existe un nombre égal d'études qui ne suggère aucune association entre le cholestérol et le cancer. Dans certaines publications, les statines présentent même des propriétés cancérigènes (Bjerre and LeLorier, 2001; Ravnskov et al., 2015). Par exemple, une étude a montré que l'usage de statines sur une période supérieure à 10 ans double le risque de cancer du sein (Jacobs et al., 2011).

Le rôle du cholestérol alimentaire dans le développement du cancer est également controversé. De nombreuses études ont suggéré une corrélation positive entre les risques de plusieurs cancers et l'absorption de cholestérol alimentaire (Hu et al., 2012). Cependant, les niveaux de cholestérol intracellulaire dans la cellule cancéreuse pourraient être plus importants

que le cholestérol sérique et le cholestérol alimentaire dans le développement du cancer (Swinnen et al., 2006).

En conclusion, les résultats ne sont toujours pas clairs concernant le lien entre le cholestérol total, le taux de HDL ou de LDL dans le sang et le risque de développer un cancer.

B. Reprogrammation du métabolisme du cholestérol dans le cancer

La reprogrammation métabolique est désormais établie comme une caractéristique des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011). Afin d'assurer une prolifération cellulaire incontrôlée, les tumeurs doivent produire efficacement de l'énergie. L'altération des voies associées au métabolisme du cholestérol dans les tumeurs a été fréquemment décrite dans la littérature (Baenke et al., 2013; Beloribi-Djefaflija et al., 2016). Les cellules cancéreuses hautement prolifératives présentent une forte avidité pour le cholestérol (Cruz et al., 2013). En effet, elles augmentent l'absorption de cholestérol exogène ou elles sollicitent leur synthèse endogène (Riscal et al., 2019). De nombreux mécanismes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et pouvant conduire au développement de cancers ont été décrits. Selon le type de cancer, différentes enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol sont surexprimées. Par exemple, les cancers gastriques, les glioblastomes et les cancer du sein surexpriment l'enzyme HMGCR (Yang et al., 2020). De plus, plusieurs signaux oncogéniques, tels que PI3K/AKT/mTOR et TP53 sont impliqués dans la modulation de la synthèse du cholestérol dans les cellules cancéreuses. L'activation constitutive de la signalisation PI3K/AKT favorise les niveaux de cholestérol intracellulaire de manière dépendante de mTORC1 en induisant la synthèse du cholestérol par l'activation de SREBP, en induisant l'importation du cholestérol par les récepteurs LDL et en inhibant l'exportation du cholestérol médié par ABCA1 (Dong et al., 2014; Porstmann et al., 2008). Par exemple, dans le cancer de la prostate, l'augmentation du cholestérol intracellulaire par Akt favorise l'agressivité des cellules cancéreuses et la formation de métastases osseuses (Thysell et al., 2010; Yue et al., 2014). Dans le cancer du sein, il a été montré que la perte de *TP53* augmente l'expression de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol ce qui perturbe l'architecture du tissu mammaire et favorise la prolifération des cellules cancéreuses (Freed-Pastor et al., 2012). De plus, les cellules cancéreuses sont également capables d'augmenter l'import de cholestérol en surexprimant les récepteurs aux LDL. En effet, il a été démontré que le récepteur aux LDL est surexprimé dans les cancers du

sein, les glioblastomes et les adénocarcinomes du pancréas (Gallagher et al., 2017; Guillaumond et al., 2015).

L'excès de lipides, notamment de cholestérol intracellulaire, est stocké dans les gouttelettes lipidiques (Bozza and Viola, 2010). Il a été montré qu'un nombre élevé de gouttelettes lipidiques et une importante teneur en esters de cholestérol stockée dans les cellules tumorales reflètent l'agressivité du cancer (de Gonzalo-Calvo et al., 2015; Yue et al., 2014).

De plus, les radeaux lipidiques qui sont principalement constitués de cholestérol et sphingomyéline sont renforcés dans la membrane de multiples cellules cancéreuses (Mollinedo and Gajate, 2015). De nombreuses protéines de signalisation et des récepteurs transmembranaires sont localisés au niveau de ces radeaux lipidiques et participent à la cancérogénèse.

Enfin, les métabolites du cholestérol sont également associés au développement de divers cancers (McDonnell et al., 2014). Les enzymes de la famille du cytochrome P450 métabolisent le cholestérol en stéroïdes et en oxystérols. L'implication de certains stéroïdes comme les œstrogènes et la progestérone, est bien connue dans le développement du cancer du sein puisque la surexpression de leurs récepteurs caractérise un sous-type moléculaire de la maladie (Goldhirsch et al., 2011b). Les androgènes, d'autres stéroïdes qui dérivent du cholestérol, sont également impliqués dans le développement du cancer de la prostate hormono-dépendant (Dai et al., 2017). Aussi, de nombreux oxystérols comme le 25-hydroxycholestérol ont des effets antiprolifératifs dans divers types de cancer (Kloudova et al., 2017). Cependant, il a été montré que le 27-hydroxycholestérol agit comme un agoniste des récepteurs aux œstrogènes dans le cancer du sein, induisant une croissance tumorale et la formation de métastases (Baek et al., 2017; Wu et al., 2013).

En conclusion, les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme pour proliférer. La dépendance des cellules cancéreuses pour le cholestérol ainsi que ses métabolites pourraient donc être utilisés comme des cibles thérapeutiques potentielles pour traiter les cancers.

C. Cibler le cholestérol pour traiter le cancer

La perte d'homéostasie du cholestérol dans les cellules cancéreuses entraîne une accumulation intracellulaire de cholestérol ce qui permet aux cellules d'échapper aux processus de signalisation apoptotique et de maintenir une prolifération cellulaire continue. Par

-Introduction-

conséquent, la réduction du cholestérol intracellulaire a été envisagée comme une stratégie anticancéreuse potentielle (Chimento et al., 2019; Gu et al., 2019).

Les statines sont une famille de médicaments utilisée pour traiter l'hypercholestérolémie (Stancu and Sima, 2001). Leur mécanisme d'action consiste à inhiber l'HMGCoA-réductase, l'enzyme limitante de la biosynthèse du cholestérol dans le réticulum endoplasmique. Des études ont montré que les statines peuvent avoir un effet antitumoral (Altwaairgi, 2015). En effet, les statines peuvent déclencher une apoptose caspase-dépendante des cellules tumorales (Wong et al., 2002). Ainsi, elles exercent des effets antiprolifératifs, pro-apoptotiques et anti-invasifs dans différentes lignées cellulaires cancéreuses (Clutterbuck et al., 1998; Garwood et al., 2010; Kikuchi et al., 1997). C'est pourquoi les statines sont actuellement en cours d'essais cliniques pour un traitement anticancéreux (Fatehi Hassanabad, 2019). Aussi, certaines études suggèrent que les statines peuvent agir en synergie avec les agents de chimiothérapie. Par exemple, la lovastatine entraîne la mort des cellules tumorales ovariennes par deux mécanismes: premièrement en bloquant l'activité de l'HMGCR et deuxièmement, en sensibilisant les cellules à la doxorubicine (Martirosyan et al., 2010). Toutefois, il est important de noter que les statines présentent plusieurs effets secondaires modérés à graves comme une atteinte musculaire ou hépatique (Stroes et al., 2015). De plus, les statines font preuve d'une efficacité sur certains types de tumeurs mais pas sur tous. Par exemple, il a été montré qu'un traitement à base de faibles doses de statines augmente l'agressivité du cancer de la prostate (Caro-Maldonado et al., 2017). Une étude a également montré qu'un traitement par atorvastatine est capable de moduler des signaux à la fois anti-prolifératifs et pro-prolifératifs dans des cellules mammaires HER2+ (Riganti et al., 2011).

Une stratégie thérapeutique ciblant le récepteur aux LDL peut également être envisagé pour le traitement du cancer. En effet, le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR) est surexprimé dans certains types de cancers. Ainsi, il a été montré que la perte d'expression du LDLR, dans les cellules tumorales du pancréas, réduit nettement l'absorption du cholestérol, diminue la prolifération des cellules tumorales et limite l'activation de la voie de prolifération des MAPK (Guillaumond et al., 2015). De plus, le blocage de l'absorption du cholestérol semble sensibiliser les cellules aux agents de chimiothérapie dans les adénocarcinomes du pancréas.

Aussi, un autre moyen de traiter le cancer est en ciblant les radeaux lipidiques. La méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) est l'un des agents les plus étudiés. La M β CD a montré des effets anticancéreux importants dans un certain nombre de cancers en réduisant efficacement le cholestérol membranaire et en perturbant les radeaux lipidiques (Li et al., 2006; Yamaguchi et

-Introduction-

al., 2015). Dans une étude *in vivo* chez la souris, le traitement par M β CD a montré une réduction d'environ 50 % du volume tumoral (Grosse et al., 1998). Cependant, d'autres études ont montré différents niveaux de cytotoxicité de la M β CD sur divers modèles cellulaires cancéreux ou non (Ulloth et al., 2007).

Enfin, le transport intracellulaire du cholestérol peut également être ciblé afin de traiter le cancer. La leelamine, un produit naturel issu de l'écorce des pins, est un composé lysosomotrope, ce qui conduit à son accumulation dans les organites acides tels que les lysosomes. Il a été montré que l'accumulation de leelamine dans les lysosomes provoque le blocage du transport de cholestérol des lysosomes vers le cytoplasme, rendant ce dernier non disponible pour les activités des cellules cancéreuses (Merarchi et al., 2019). Ainsi, la leelamine cible indirectement des voies de signalisation oncogéniques en induisant un déséquilibre dans l'homéostasie du cholestérol ce qui perturbe le flux autophagique et l'endocytose des récepteurs. Différents mécanismes d'action anticancéreux de la leelamine ont été décrits dans le mélanome, le cancer de la prostate et le cancer du sein (Gowda et al., 2014; Kuzu et al., 2014; Sehrawat et al., 2017; Singh et al., 2018).

En conclusion, le cholestérol des cellules tumorales semble représenter une cible thérapeutique pour le traitement des cancers. Cependant, les thérapies testées actuellement présentent une efficacité très variable en fonction du type de cancer et certaines études sont controversées.

RÉSULTATS

MECANISME MOLECULAIRE DE L'ADDICTION DES CANCERS HER2 POSITIFS POUR LE TRANSPORTEUR DE CHOLESTEROL STARD3

D'après des résultats préliminaires du laboratoire, STARD3 participe spécifiquement à la croissance des cellules cancéreuses HER2+ par un mécanisme inconnu (**Figure I13**). Mon projet de thèse était dans un premier temps de décrire la dépendance des cellules cancéreuses amplifiées pour HER2 au-delà du cancer du sein, et dans un second temps de montrer que l'origine de cette dépendance des tumeurs HER2+ pour STARD3 était liée aux transports intracellulaires de cholestérol médiés par cette protéine. L'hypothèse selon laquelle STARD3 agirait sur la croissance des cellules cancéreuses HER2+ de manière indirecte en altérant la distribution normale du cholestérol et en modifiant la composition lipidique des membranes cellulaires a fondé le deuxième volet de mon travail de thèse.

I. Marquage et quantification du cholestérol intracellulaire et membranaire

Dans le but d'étudier la redistribution du cholestérol médiée par STARD3 au sein des cellules cancéreuses HER2+, j'ai participé à la mise au point d'une technique de marquage et de quantification du cholestérol, en collaboration avec Léa Wilhelm, une ancienne étudiante du laboratoire. Cette technique, basée sur l'utilisation des sondes filipine et GFP-D4, a été publiée en 2019 dans un livre intitulé « Intracellular lipid transport ». La publication se trouve ci-après.



Intracellular and Plasma Membrane Cholesterol Labeling and Quantification Using Filipin and GFP-D4

Léa P. Wilhelm, Laetitia Voilquin, Toshihide Kobayashi, Catherine Tomasetto, and Fabien Alpy

Abstract

Cholesterol, a major component of biological membranes, is rapidly trafficked and unevenly distributed between organelles. Anomalies of intracellular cholesterol distribution are the hallmark of a number of lysosomal lipid storage disorders. A major methodological obstacle for studying cholesterol trafficking is tracing this molecule in situ. The use of fluorescent probes that specifically bind cholesterol allows the visualization and imaging of cellular cholesterol. Here, we describe a series of assays optimized for quantifying free cholesterol in cell populations and at the single cell level, both at the plasma membrane and inside cells. These methods use two fluorescent probes: the D4 fragment of perfringolysin O fused to GFP (GFP-D4) and the polyene macrolide filipin. First, we report a robust method for quantifying plasma membrane cholesterol by flow cytometry using the GFP-D4 probe. Second, to optically distinguish and quantify intracellular cholesterol accumulation, we have adapted the classical filipin cholesterol staining protocol. Indeed, we observed that treatment of living cells with methyl- β -cyclodextrin, a chemical known to extract cholesterol from the plasma membrane, improves the visualization of the intracellular cholesterol pool with filipin. To complement these staining procedures, we developed an image analysis protocol based on image segmentation to quantify, in a robust manner, intracellular cholesterol stained with filipin. Thus, this chapter is a guideline for cellular cholesterol staining and signal quantification.

Key words Cholesterol, Perfringolysin O, Filipin, Plasma membrane, Endosome

1 Introduction

Cholesterol is a key molecule in biology, as a major structural component of cell membranes, and as a precursor of other vital compounds, such as hormones and bile [1, 2]. Interestingly, sterol levels are regulated at the subcellular scale. Indeed high, intermediate, and low levels of sterol are found in the plasma membrane, endosome/Golgi apparatus, and mitochondria/endoplasmic reticulum, respectively [3, 4]. This uneven sterol distribution between

Léa P. Wilhelm and Laetitia Voilquin contributed equally to this work.

organelles results both from vesicular and non-vesicular transport mechanisms [5]. In particular, a class of proteins named Lipid Transfer Proteins (LTPs) plays a crucial role in the latter process. LTPs are cytosolic proteins which have a pocket that accommodates a lipid molecule; LTPs can capture, move, and deliver this lipid molecule within the cell [6–8]. The study of sterol transport inside cells faces a major obstacle, which is the ability to trace this type of molecule in situ. However, the use of natural fluorescent sterols that closely mimic cholesterol, fluorophore-labeled sterols, or fluorescent probes that can trace cholesterol distribution in cells, have advanced the understanding of sterol transport [9]. In this chapter, we describe the use of two fluorescent probes, GFP-D4 and filipin, to label and quantify plasma membrane and intracellular cholesterol levels.

The GFP-D4 probe is a fusion between the fluorescent protein GFP and the D4 fragment of perfringolysin O (referred to as θ toxin), a pore-forming toxin from the bacterium *Clostridium perfringens*. Perfringolysin O is a cholesterol-dependent cytolysin secreted as a water-soluble monomer that recognizes and binds cholesterol-rich membranes where it oligomerizes and creates pores. The D4 fragment of perfringolysin O is able to bind cholesterol-rich membranes (>30 mol% cholesterol) but is devoid of pore-forming activity [10–13]. Interestingly, mutants of GFP-D4, able to bind membranes with less cholesterol, have been generated [14, 15]. In this chapter, we describe the use of recombinant GFP-D4 to stain intracellular cholesterol, and to label plasma membrane cholesterol followed by its quantification by flow cytometry.

Filipin is a polyene macrolide extracted from the bacterium *Streptomyces filipinensis* [9, 16]. Filipin is naturally fluorescent and specifically binds to sterols but not to esterified sterols. Owing to its toxicity, filipin is used on fixed cells. The use of filipin to label and quantify intracellular cholesterol is technically challenging: first, the probe is very sensitive to photobleaching which impedes its use for quantification; and second, it labels total cellular cholesterol, and especially the plasma membrane, making intracellular cholesterol difficult to image. Thus, to bypass these technical limits, we set up a new protocol, also described in this chapter, which allows the imaging and quantification of intracellular cholesterol using filipin [17]. To avoid filipin photobleaching, we used a new generation confocal microscope equipped with a 355 nm UV-laser and ultra-sensitive detectors. In addition, to visualize intracellular cholesterol pools, we treated live cells with methyl- β -cyclodextrin (M β CD), a molecule able to deplete cholesterol from the plasma membrane [18].

2 Materials

2.1 Chemicals and Buffers

1. U18666A [(3 β)-3-[2-(Diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one hydrochloride]: 1 mg/mL in water (stock solution). Store at -20°C .
2. Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) solution: Dissolve 660 mg of M β CD powder in 1 mL of water. Heat at 65°C for 15 min to dissolve, and vortex several times. Store this stock solution (500 mM) at -20°C . Heat at 65°C for 15 min before use.
3. M β CD-cholesterol complex (M β CD/cholesterol molar ratio: 6.5/1) solution: Dissolve 2.65 g of M β CD in 25 mL of buffer (150 mM NaCl, 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 1 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂). Add 0.119 g of cholesterol powder (Sigma), mix, sonicate three times (10 min each) and heat (15 min at 65°C) to solubilize cholesterol. Store this stock solution (80 mM) at -20°C . Heat at 65°C for 15 min before use.
4. Phosphate-buffered saline (PBS) 1 \times : 134 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4.
5. Paraformaldehyde (PFA) stock solution: 16% (w/v) in water (EMS). Store at room temperature (*see Note 1*).
6. PFA solution (4% (w/v) in PBS 1 \times). Mix 10 mL of PFA stock solution (16%) with 4 mL of PBS 10 \times and 26 mL of water. Store at 4°C (*see Note 1*).
7. Filipin solution. To prepare 50 mL of filipin solution (0.1 mg/mL), first dissolve 5 mg of filipin powder in 200 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO). Add this solution dropwise to 50 mL of PBS 1 \times under constant vortexing. Keep filipin protected from light. Aliquot this solution and store at -20°C .
8. 10% (w/v) bovine serum albumin (BSA) solution: Dissolve 1 g of BSA (Fraction V) in 10 mL of PBS 1 \times . Store the stock solution at -20°C .
9. Blocking solution: 1% (w/v) BSA in PBS 1 \times .
10. Cell culture medium with and without serum. Trypsin solution ($\sim 30\ \mu\text{g}/\text{mL}$) and Trypsin-EDTA ($\sim 30\ \mu\text{g}/\text{mL}$, 0.53 mM).

2.2 GFP-D4 Production

1. GFP-D4 expression plasmid (pET28/His6-EGFP-D4; RIKEN BioResource Research Center; RDB13961). This plasmid can be amplified in *E. coli* DH5 α bacteria.
2. *E. coli* BL21 (DE3) competent bacteria.
3. LB broth and LB agar plates containing 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin.
4. IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside): A 1 M stock solution is prepared by dissolving IPTG in water, and stored at -20°C .

5. Conical flasks.
6. Lysis buffer: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8. Add 58.25 mL of Na_2HPO_4 (0.2 M), 4.25 mL of NaH_2PO_4 (0.2 M), 15 mL of NaCl (5 M), and 2.5 mL of imidazole (1 M) to a graduated cylinder. Add water to a volume of 250 mL, mix, and store at 4 °C. Before use, add 1 tablet of EDTA-free complete protease inhibitor cocktail (Roche) in 50 mL of lysis Buffer.
7. His-Select Nickel Affinity Gel (Sigma).
8. Elution buffer: 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 250 mM imidazole, pH 7.4. Add 1.935 mL of Na_2HPO_4 (0.2 M), 0.565 mL of NaH_2PO_4 (0.2 M), and 6.25 mL of imidazole (1 M) to a graduated cylinder. Add water to a volume of 25 mL, mix, and store at 4 °C.
9. Phosphate buffer (PB): 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.4.
10. Ultrafiltration units (Ultra-15 Amicon, MWCO 10 kDa, Millipore).
11. Glycerol (molecular biology grade).
12. Sonicator (Sonics Vibra-Cell 750 W equipped with a 13 mm probe).
13. Chromatography column (Bio-Rad Poly-Prep chromatography column).
14. Peristaltic pump (Gilson).
15. Spectrophotometer (Nanodrop, Thermo Scientific).

2.3 Flow Cytometry and Imaging

1. Round cover glasses (diameter 12 mm, N°. 1.5H).
2. Superfrost microscope slides.
3. 24-well plates.
4. P150 plates.
5. Propidium iodide (PI) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ stock solution, stored at 4 °C) is diluted in PBS to a final concentration of 0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
6. TO-PRO-3 iodide solution: Dilute a 1 mM stock solution in DMSO (ThermoFisher scientific, stored at -20 °C) in PBS to a final concentration of 0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
7. Hoechst-33258 solution: Prepare a stock solution of the dye at 10 mg/mL in water. Dilute the dye in PBS to a final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
8. Anti-CD63 mouse monoclonal antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) H5C6; deposited to the DSHB by August, J.T./Hildreth, J.E.K.). The hybridoma supernatant is diluted 100 times in blocking solution.
9. Mounting medium (ProLong Gold, Invitrogen).

10. Confocal laser scanning microscope (Leica SP8) equipped with a 355 nm optically pumped semiconductor laser (Coherent), super-sensitive detectors (HyD, Leica), and a 63× objective (oil, NA 1.4).
11. Image analysis software: Fiji software (<http://fiji.sc>) or Cell-Profiler (<http://cellprofiler.org/>).
12. Flow cytometer (BD FACS Celesta) or similar.
13. Flowjo software (FlowJo LLC) or similar.

3 Methods

3.1 GFP-D4 Production and Purification

1. Transform competent *E. coli* BL21 (DE3) cells with the pET28/His6-EGFP-D4 vector according to the manufacturer's instructions.
2. Spread bacteria on LB agar plates with kanamycin and incubate overnight at 37 °C.
3. Transfer one colony to 10 mL of LB broth with kanamycin. Incubate for 16 h at 37 °C under agitation.
4. Transfer this pre-culture to a 5 L conical flask containing 1 L of LB broth with kanamycin.
5. Incubate at 37 °C under agitation. Measure the optical density (OD_{600nm}) at a wavelength of 600 nm with a spectrophotometer. When the OD_{600nm} has reached 0.4–0.6, cool down the culture to 18 °C.
6. Add IPTG to a final concentration of 0.4 mM.
7. Incubate under agitation for 16 h at 18 °C.
8. Transfer the culture medium to centrifugation tubes. Pellet the cells by centrifugation at 3500 × *g* for 15 min.
9. Discard the supernatant. Resuspend the cell pellet in 100 mL of lysis buffer.
10. Sonicate the suspension for 10 min (40% amplitude, on/off cycles 10s/20s) on ice under constant stirring.
11. Centrifuge twice at 3500 × *g* for 15 min at 4 °C. Keep the supernatant.
12. Centrifuge twice at 11,000 × *g* for 30 min at 4 °C. Keep the supernatant.
13. Add 1.5 mL of nickel-charged resin into a chromatography column. Connect the column to a peristaltic pump (*see Note 2*).
14. Wash the resin with 16 mL of lysis buffer (flow rate ~1 mL/min).
15. Load the supernatant on the resin (*see Note 3*).

16. Wash the column with 30 mL of lysis buffer.
17. Elute the GFP-D4 probe with 6 mL of elution buffer.
18. The buffer is then exchanged and the probe concentrated with an ultrafiltration unit. First, equilibrate the membrane of a centrifugal filter by adding 5 mL of phosphate buffer. Centrifuge for 10 min at $3500 \times g$. Discard the liquid.
19. Add the GFP-D4 probe to the ultrafiltration unit. Spin at $4500 \times g$ for 30 min in a fixed-angle rotor (*see Note 4*). Discard the flow-through.
20. Add 7 mL of PB buffer and spin at $4500 \times g$ for 30 min (*see Note 4*). Discard the flow-through.
21. Repeat two times the **step 20**.
22. Final spin at $4500 \times g$ and stop when the probe is concentrated in ~ 1 mL. Recover the probe and measure its concentration with a spectrometer (molar extinction coefficient $\epsilon_{280\text{nm}} = 65,320 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; molecular weight: 42.1 kDa).
23. Add 1 mL of glycerol and store the probe at -20°C .

3.2 Plasma Membrane Cholesterol Staining with the GFP-D4 Probe, Followed by Confocal Imaging

1. Day 0: Plate cells on a glass coverslip (*see Notes 5 and 6*).
2. Day 1: Incubate with the GFP-D4 solution (1: 200 in PBS containing 1% BSA) for 30 min at 37°C (*see Notes 7 and 8*).
3. Quickly wash with 1 mL of PBS at room temperature (*see Note 9*).
4. Fix the cells with 0.5 mL of PFA solution for 10 min at room temperature.
5. Wash with 1 mL of PBS for 5 min at room temperature.
6. Stain nuclei with the DNA marker Hoechst-33258 for 5 min.
7. Wash with 1 mL of PBS for 5 min at room temperature.
8. Mount the sample (*see Note 10*).
9. Acquire images with a confocal laser scanning microscope equipped with an Argon Laser (488 nm line for GFP excitation) and a 405 nm diode laser (Hoechst-33258 excitation) (Fig. 1a).

3.3 Plasma Membrane Cholesterol Staining with the GFP-D4 Probe, Followed by Flow Cytometry Analysis

1. Day 0: Plate 600,000 cells in a P150 plate.
2. Day 1: Rinse the cells with PBS. Trypsinize the cells and resuspend them in 5 mL of PBS (*see Notes 6 and 11*).
3. Centrifuge for 5 min at $230 \times g$.
4. Resuspend the cells in 800 μL of PBS. Aliquot in three tubes (250 μL in each tube) to have a technical triplicate.
5. Add 250 μL of GFP-D4 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluted in PBS containing 2% (w/v) BSA in each tube (*see Notes 7 and 12*).

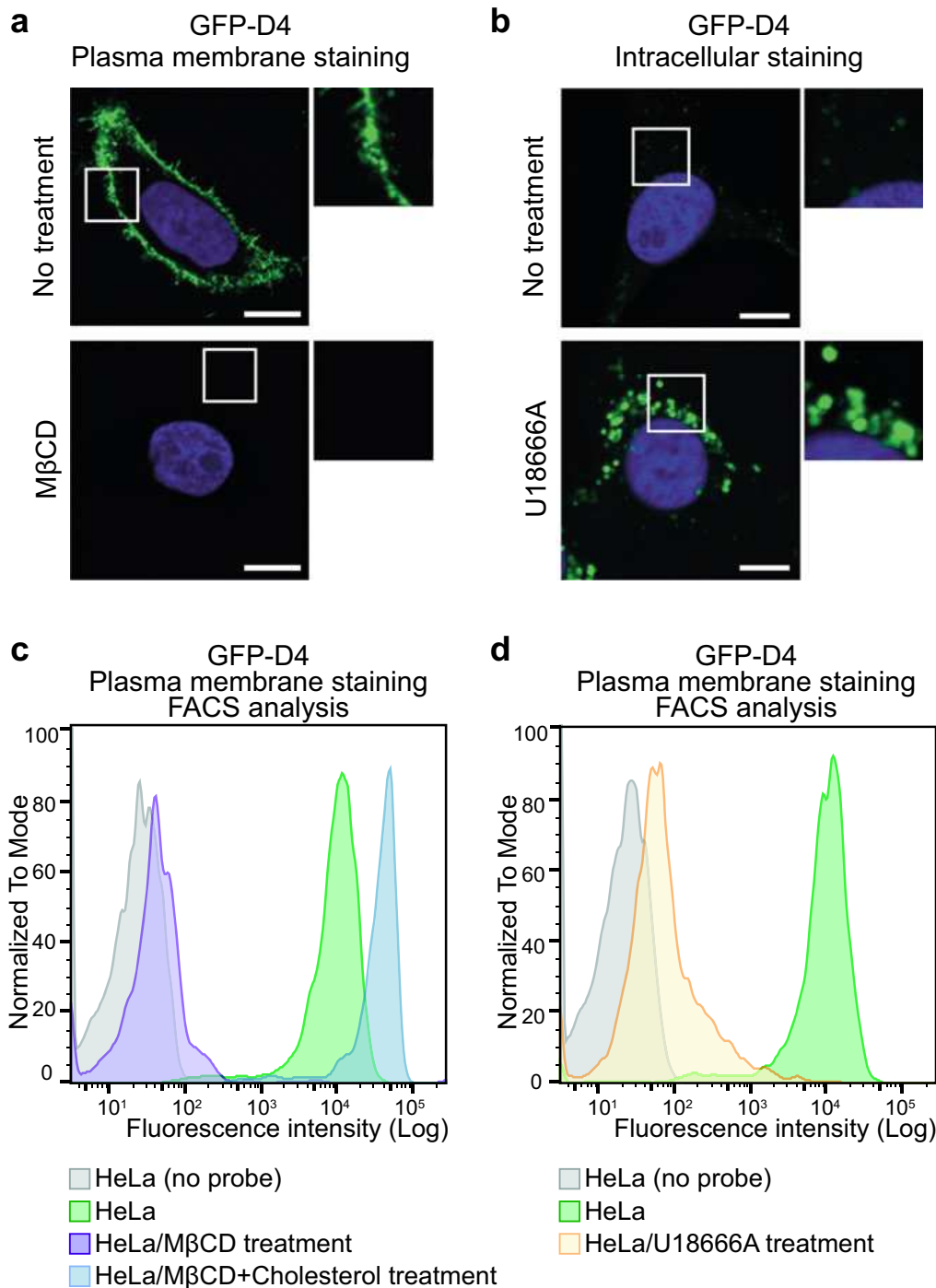


Fig. 1 Plasma membrane and intracellular cholesterol staining with the GFP-D4 probe (**a**) Plasma membrane cholesterol staining of HeLa cells with the GFP-D4 probe. Live cells were left untreated (top image) or treated with M β CD (10 mM in medium without serum for 30 min at 37 °C; bottom image), then stained with the GFP-D4 probe and fixed. The nucleus staining is shown in blue. Scale bar: 10 μ m. (**b**) Intracellular cholesterol staining of HeLa cells with the GFP-D4 probe. Live cells were left untreated (top image) or treated with U18666A (2.5 μ g/mL in normal medium for 16 h at 37 °C; bottom image), fixed, permeabilized, and then stained with the GFP-D4 probe. Nuclei staining is shown in blue. Scale bar: 10 μ m. In panel (**a**) and (**b**), a confocal section image and a higher magnification (2.5 \times) image of the area outlined in white are displayed. (**c**) Flow cytometry analysis of plasma membrane cholesterol staining with the GFP-D4 probe. Live HeLa cells were left untreated (green curve), or were treated with M β CD (10 mM for 30 min at 37 °C; purple curve) or with M β CD complexed to cholesterol (500 μ M for 2 h at 37 °C; blue curve). (**d**) Flow cytometry analysis of live HeLa

6. Incubate for 30 min at 37 °C under gentle agitation.
7. Fix the cells by adding 500 μ L of PFA working solution. Mix gently. Incubate for 10 min at room temperature (*see Note 1*).
8. Pellet the cells by centrifugation for 5 min at $230 \times g$.
9. Resuspend the cells in 1 mL of PBS.
10. Analyze GFP-D4 fluorescence on individual cells by flow cytometry.
11. Single cells are discriminated from doublets using forward scatter height (FSC-H) and forward scatter area (FSC-A) measures. FCS-A and FCS-H are plotted and cells along the diagonal are gated. GFP fluorescence is measured on individual cells using blue laser (488 nm) excitation and a FITC filter (band pass filter 530/30 nm). A minimum of 10,000 events must be counted.
12. Analyze the results with Flowjo software: Viable cells are manually gated using SSC (Side-scattered) and FSC (Forward-scattered) parameters. Data are represented as single-parameter histograms showing GFP fluorescence intensity (x-axis) and the number of events (y-axis). The mean of GFP fluorescence is also measured (Fig. 1c, d).

3.4 Intracellular Cholesterol Labeling with the GFP-D4 Probe

1. Day 0: Plate ~10,000–15,000 cells on a glass coverslip (*see Note 5*).
2. Day 1: Wash with 1 mL of PBS at room temperature for 2 s (*see Note 13*).
3. Fix the cells with 500 μ L of PFA solution at room temperature for 10 min (*see Note 1*).
4. Wash twice with 1 mL of PBS at room temperature (5 min). Keep the cells in PBS.
5. Permeabilize the cells using a liquid nitrogen bath: Take the coverslip out of the 24-well plate, remove the excess of PBS, and put the coverslip in liquid nitrogen. Wait for 5 s. Place the coverslip back into the 24-well plate in PBS.
6. Incubate with 500 μ L of blocking solution at room temperature for 30 min, under gentle agitation.

Fig. 1 (continued) cells which are untreated (green curve), or treated with U18666A (2.5 μ g/mL for 16 h at 37 °C; yellow curve). After the different treatments, the cells were stained with the GFP-D4 probe, fixed, and GFP-D4 staining intensity was analyzed by flow cytometry. These representative histograms display the number of cells analyzed (normalized to mode) as a function of GFP-D4 fluorescence (log intensity). Unstained cells (gray curve) are shown. Note that HeLa cells are strongly labeled with the GFP-D4 probe; M β CD and M β CD/cholesterol treatments prior to labeling strongly decrease and increase GFP-D4 signal intensity, respectively; U18666A treatment decreases GFP-D4 signal intensity. Indeed, U18666A was shown to induce cholesterol accumulation in the endocytic pathway at the expense of the plasma membrane

7. Incubate with the GFP-D4 solution (1:200 in PBS containing 1% BSA) for 1 hour at room temperature (*see* **Notes 7** and **12**).
8. Quickly wash with 1 mL of PBS at room temperature (*see* **Note 9**).
9. Fix the cells with 500 μ L of PFA solution for 10 min at room temperature (*see* **Note 1**).
10. Wash with 1 mL of PBS at room temperature for 5 min (*see* **Note 14**).
11. Stain nuclei with 1 mL of Hoechst-33258 solution.
12. Wash with 1 mL of PBS at room temperature for 5 min.
13. Mount the sample (*see* **Note 10**).
14. Acquire images with a confocal laser scanning microscope equipped with an Argon Laser (488 nm line for GFP excitation) and a 405 nm diode laser (Hoechst-33258 excitation) (Fig. 1b).

3.5 Cholesterol Labeling with Filipin, Followed by Confocal Imaging and Image Analysis

3.5.1 Labeling and Image Acquisition

1. Day 0: Plate ~10,000–15,000 cells on a glass coverslip (*see* **Note 5**).
2. Day 1: Wash twice with 1 mL of PBS at room temperature (2 s each).
3. In order to facilitate intracellular cholesterol visualization, remove plasma membrane cholesterol with M β CD: Dilute the M β CD stock 50 times with preheated culture medium without serum, to obtain a 10 mM M β CD concentration. Add 500 μ L of M β CD solution onto the cells, and incubate at 37 °C for 30 min.
4. Wash twice with 1 mL of PBS at room temperature (2 min each).
5. Fix the cells with 500 μ L of PFA solution at room temperature for 10 min (*see* **Note 1**).
6. Wash with 1 mL of PBS at room temperature (5 min).
7. Incubate with 500 μ L of filipin solution at room temperature for 30 min, under gentle agitation (*see* **Note 7**).
8. Remove the filipin solution and wash the cells with 1 mL of PBS at room temperature for 2 min (*see* **Notes 15** and **16**).
9. Cells are labeled with propidium iodide (PI) (0.35 μ g/mL in PBS) for 5 min, which labels nucleic acids (both DNA and RNA), and thus delineates the cell morphology, an important step for image analysis. Alternatively, cell nuclei are labeled with the DNA marker TO-PRO-3 iodide (0.35 μ g/mL in PBS) for 5 min.
10. Wash twice with 1 mL of PBS at room temperature (2 min each time).

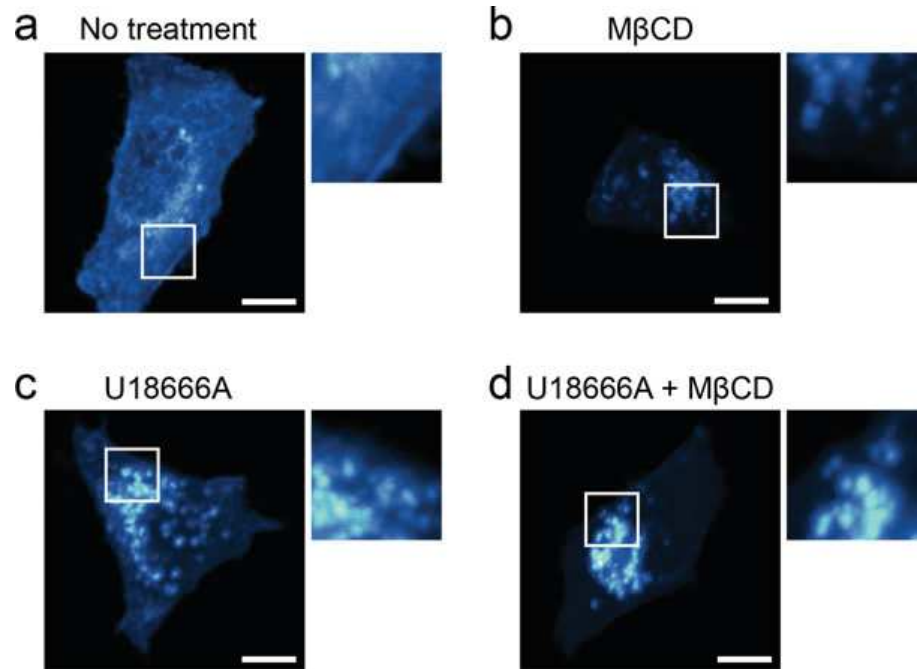


Fig. 2 Whole-cell and intracellular cholesterol staining with filipin. (a) Live HeLa cells were fixed and stained with filipin. (b) Cells were treated with M β CD (10 mM in serum-free medium; 30 min at 37 °C) before fixation and filipin staining. (c) Live HeLa cells were treated with U18666A to induce cholesterol accumulation in endosomes/lysosomes before fixation and filipin staining. (d) Cells were treated with U18666A and then with M β CD, before fixation and filipin staining. Each panel display a confocal section image and a higher magnification (2.5 \times) image of the area outlined in white. Scale bars: 10 μ m. Note that M β CD treatment, by removing cholesterol from the plasma membrane, improves the visualization of intracellular cholesterol pools

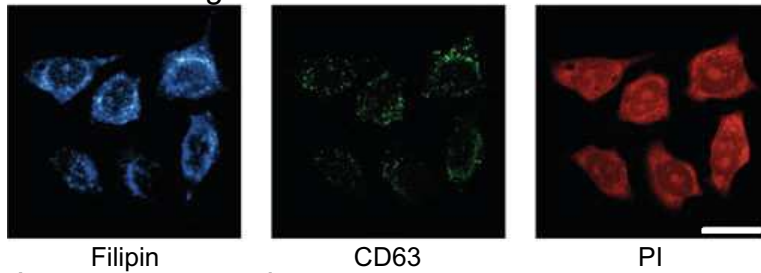
11. Mount the sample (*see* **Note 10**).
12. Acquire images with a confocal laser scanning microscope equipped with a 355 nm optically pumped semiconductor laser to excite filipin. Acquisitions are made using the photon counting mode with a super-sensitive detector to decrease light dosage and thus filipin photobleaching (Fig. 2). Typically, a single optical section comprising multiple randomly chosen cells is acquired (Fig. 3a).

3.5.2 Quantification of Cholesterol in Discrete Subcellular Structures

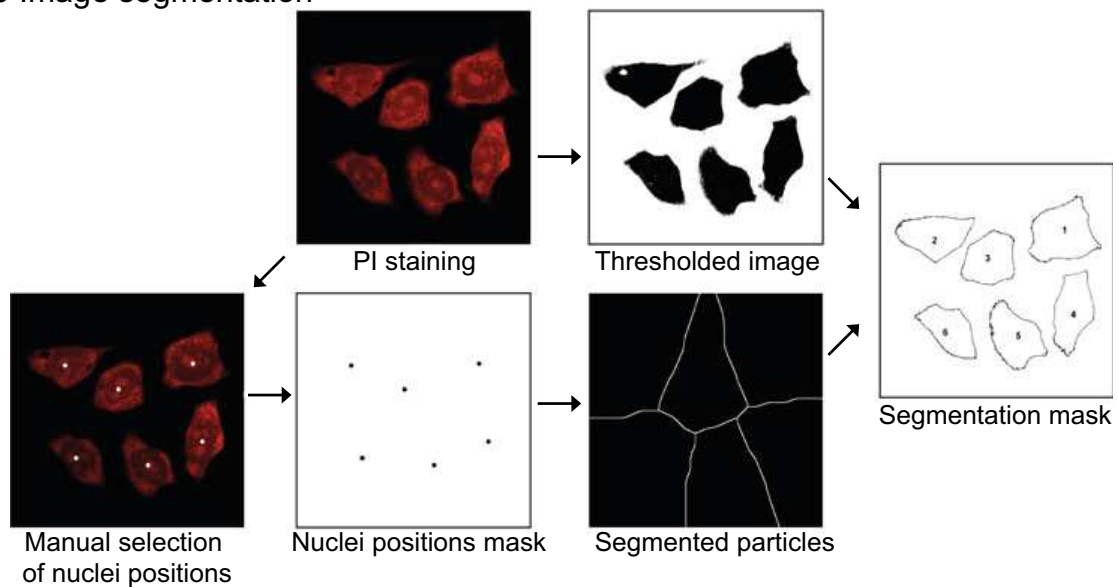
We use the Fiji software or CellProfiler to automate the analysis. The quantification of cholesterol accumulation in discrete subcellular structures is based on signal intensity thresholding

1. Individual cells are segmented on images using the PI staining (Fig. 3b). First an intensity threshold is applied to determine the cell contours. Nuclei positions, manually selected on the PI staining image, are used to divide the image into discrete areas with a watershed algorithm (Find maxima). Then, the

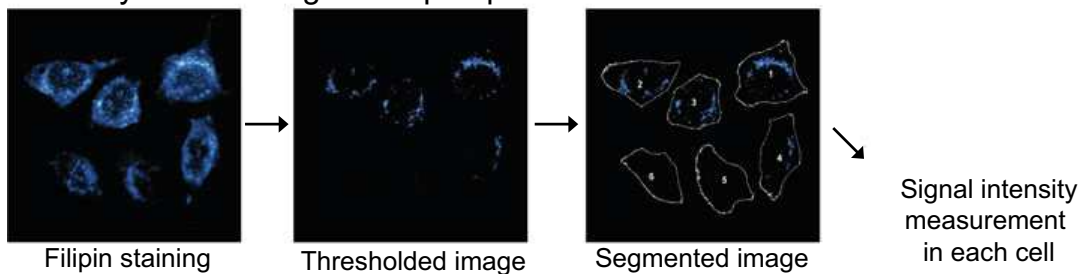
a Confocal images



b Image segmentation



c Intensity thresholding and filipin quantification



d CD63 mask and filipin quantification

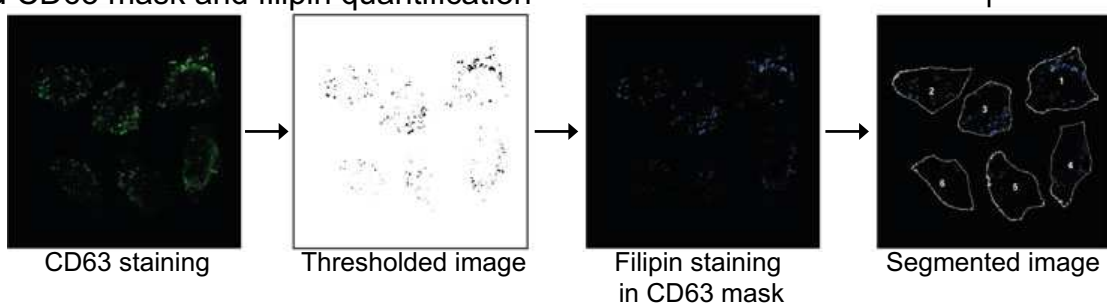


Fig. 3 Filipin staining quantification by image analysis. (a) HeLa cells were stained with filipin (blue), anti-CD63 antibodies (green), and propidium iodide (PI, red). Images were acquired with a confocal microscope and analyzed with Fiji. Scale bar: 30 μm . (b) Image segmentation: First an intensity threshold is applied to determine the cell contours (Thresholded image). Nuclei positions (Nuclei positions mask), manually selected on the PI staining image (Manual selection of nuclei positions), are used to divide the image into discrete areas with a watershed algorithm (Segmented particles). Then, the thresholded and the segmented images are

thresholded and the segmented images are combined to build a segmentation mask showing the contour of individual cells.

2. Apply a threshold value to the filipin image (*see Note 17*).
3. Then, apply the segmentation mask and measure filipin staining intensity in individual cells (Fig. 3c).

3.5.3 Quantification of Cholesterol in a Specific Subcellular Compartment

The second method is based on the use of a mask to restrict the analysis to a specific cellular compartment (Fig. 3d; illustrated with a labeling of late endosomes/lysosomes with anti-CD63 antibodies).

1. Individual cells are segmented as described in **step 1** of Sub-heading 3.5.2.
2. Apply an intensity threshold to the image of the subcellular compartment marker staining.
3. Generate a mask from this threshold.
4. Combine the threshold and the segmentation masks, and measure filipin staining intensity in individual cells.

4 Notes

1. Manipulate PFA under a fume hood. Wear protective gloves, protective clothing, and eye protection.
2. Alternatively, use an automated purification system with a pre-packed immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) column.
3. The green color of GFP facilitates the purification since the protein can easily be followed when bound to the resin and during elution.
4. Adjust the centrifugation time to the volume remaining on the filter which should not be lower than ~1 mL.
5. Under sterile condition, put a glass coverslip in each well of a 24-well plate. Add 500 μ L of preheated medium and the cell suspension (~10,000–15,000 cells). The confluency should be low (around 20–30%) to have isolated cells.

Fig. 3 (continued) combined to generate a mask showing the contour of individual cells (Segmentation mask). **(c)** A threshold is applied on the filipin staining image to decrease the background signal and to focus the analysis on filipin bright spots corresponding to cholesterol accumulations. The segmentation mask is applied on this thresholded image, and filipin signal intensity is measured in each cell. **(d)** A threshold is applied on CD63 staining image to delineate late endosomes and lysosomes positive for this marker. The segmentation mask is applied on this thresholded image, and filipin signal intensity is measured in each cell

6. For cells which have a tendency to form clusters, trypsin EDTA can be used to detach and dissociate cells before the plating.
7. Protect the samples from light during all steps, once filipin or GFP-D4 has been added.
8. Optional: The cells can be pretreated with M β CD to remove cholesterol from the plasma membrane as negative control. Dilute the M β CD stock 50 times with preheated medium without serum, to obtain a 10 mM M β CD solution in culture medium. Wash the cells twice with PBS. Add 0.5 mL of M β CD solution onto the cells, and incubate at 37 °C for 30 min. Remove the M β CD solution and wash the cells once with PBS.
9. This step allows the removal of the excess probe. Remove the probe solution, add 1 mL of PBS at room temperature, and immediately remove it. A longer incubation in PBS would enable the GFP-D4 probe to detach from the membrane before the fixation step.
10. Apply a drop of mounting medium on a glass slide. Take out the cover glass carefully from the well, remove the excess of PBS, and carefully place over the mounting medium with the cells face down. Incubate at least for 2 h at room temperature before use. Slides can be stored at 4 °C protected from light.
11. On Day 1, positive and negative control samples can be obtained by adding or removing cholesterol from the plasma membrane before trypsinization. Plasma membrane cholesterol levels can be reduced by M β CD or U18666A treatment, or increased by M β CD-cholesterol treatment. M β CD treatment: Dilute the M β CD stock 50 times with preheated medium without serum, to obtain a 10 mM M β CD solution in culture medium; wash the cells twice with PBS; add 5 mL of M β CD solution onto the cells and incubate at 37 °C for 30 min. U18666A treatment: Wash the cells twice with PBS; treat the cells with U18666A (2.5 μ g/mL) in normal culture medium for 16 h at 37 °C. M β CD-cholesterol treatment: Dilute the M β CD-cholesterol complex stock 160 times with preheated medium without serum, to obtain a 500 μ M M β CD-cholesterol complex solution in culture medium; wash the cells twice with PBS; add 5 mL of M β CD-cholesterol complex solution onto the cells, and incubate at 37 °C for 2 h.
12. The concentration of GFP-D4 has to be adjusted to the samples analyzed. Increasing the concentration of GFP-D4 will increase the fluorescent signal proportionally.
13. On Day 1, positive control samples can be obtained by treating cells with U18666A to induce cholesterol accumulation in endosomes. Treat the cells with U18666A (2.5 μ g/mL) in

normal culture medium for 16 h at 37 °C, and then wash with PBS.

14. At this step, an immunofluorescence staining can be done to detect the protein of interest in addition to cholesterol.
 - (a) Incubate the cells with 500 μ L of blocking solution at room temperature for 30 min, under gentle agitation.
 - (b) Add appropriate primary antibody diluted in 250 μ L of blocking solution, and incubate for 3 h at room temperature, or overnight at 4 °C, under gentle agitation.
 - (c) Wash 3 times with 1 mL of PBS (5 min each time).
 - (d) Add fluorescently conjugated secondary antibodies (Alexa Fluor 488), and incubate for 1 h at room temperature, under gentle agitation.
 - (e) Wash three times with 1 mL of PBS at room temperature (5 min each time).
15. At this step, an immunofluorescence staining can be done to detect the protein of interest in addition to cholesterol.
 - (a) Incubate the cells with 500 μ L of blocking solution at room temperature for 30 min, under gentle agitation.
 - (b) Add appropriate primary antibody diluted in 250 μ L of blocking solution, and incubate for 3 h at room temperature, or overnight at 4 °C, under gentle agitation.
 - (c) Wash three times with 1 mL of PBS (5 min each time).
 - (d) Add fluorescently conjugated secondary antibodies (Alexa Fluor 488), and incubate for 1 h at room temperature, under gentle agitation.
 - (e) Wash three times with 1 mL of PBS at room temperature (5 min each time).
 - (f) Incubate the cells with 500 μ L of filipin solution at room temperature for 30 min, under gentle agitation.
 - (g) Wash twice with 1 mL of PBS at room temperature (5 min each time).
16. Since filipin permeabilizes membranes, it allows antibody entry inside cells. Note that only some antibodies work in the presence of filipin; this has to be tested for your specific application.
17. The choice of the threshold value is somehow arbitrary. However, in order to allow a comparison between experiments, the threshold can be determined in control cells (no cholesterol accumulation) as the 99th percentile of pixel intensity values. Evaluate this value for all images of control cells and calculate a mean intensity which will be defined as the threshold value.

Acknowledgments

We thank Thomas Di Mattia and Alastair McEwen for their critical reading of the manuscript. We thank the members of the Molecular and Cellular Biology of Breast Cancer team (IGBMC) for helpful advice and discussions, and the IGBMC imaging center. L.V. received an allocation from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France; <http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/>) and L.P.W. a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (<https://www.frm.org/>). This work was supported by grants from the Institut National Du Cancer INCA (INCA_9269; www.e-cancer.fr), the Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est; <https://www.ligue-cancer.net>), The Ara Parseghian Medical Research Fund (<http://parseghianfund.nd.edu/>), Vaincre les maladies lysosomales (<http://www.vml-asso.org/>) and the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02. We also acknowledge funds from the Institut National de Santé et de Recherche Médicale (<http://www.inserm.fr/>), the Centre National de la Recherche Scientifique (<http://www.cnrs.fr/>), and the Université de Strasbourg (<http://www.unistra.fr>).

References

1. Maxfield FR, van Meer G (2010) Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 22:422–429
2. Mesmin B, Antonny B, Drin G (2013) Insights into the mechanisms of sterol transport between organelles. *Cell Mol Life Sci* 70:3405–3421
3. Maxfield FR, Menon AK (2006) Intracellular sterol transport and distribution. *Curr Opin Cell Biol* 18:379–385
4. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112–124
5. Wustner D, Herrmann A, Hao M et al (2002) Rapid nonvesicular transport of sterol between the plasma membrane domains of polarized hepatic cells. *J Biol Chem* 277:30325–30336
6. Chiapparino A, Maeda K, Turei D et al (2016) The orchestra of lipid-transfer proteins at the crossroads between metabolism and signaling. *Prog Lipid Res* 61:30–39
7. Holthuis JC, Levine TP (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:209–220
8. Lev S (2010) Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:739–750
9. Maxfield FR, Wustner D (2012) Analysis of cholesterol trafficking with fluorescent probes. *Methods Cell Biol* 108:367–393
10. Abe M, Makino A, Hullin-Matsuda F et al (2012) A role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to the cleavage furrow during cytokinesis. *Mol Cell Biol* 32:1396–1407
11. Ohno-Iwashita Y, Shimada Y, Waheed AA et al (2004) Perfringolysin O, a cholesterol-binding cytolysin, as a probe for lipid rafts. *Anaerobe* 10:125–134
12. Rossjohn J, Feil SC, McKinstry WJ et al (1997) Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* 89:685–692
13. Shimada Y, Maruya M, Iwashita S et al (2002) The C-terminal domain of perfringolysin O is an essential cholesterol-binding unit targeting to cholesterol-rich microdomains. *Eur J Biochem* 269:6195–6203

14. Johnson BB, Moe PC, Wang D et al (2012) Modifications in perfringolysin O domain 4 alter the cholesterol concentration threshold required for binding. *Biochemistry* 51:3373–3382
15. Liu SL, Sheng R, Jung JH et al (2017) Orthogonal lipid sensors identify transbilayer asymmetry of plasma membrane cholesterol. *Nat Chem Biol* 13:268–274
16. Gimpl G, Gehrig-Burger K (2007) Cholesterol reporter molecules. *Biosci Rep* 27:335–358
17. Wilhelm LP, Wendling C, Védie B et al (2017) STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *EMBO J* 36:1412–1433
18. Zidovetzki R, Levitan I (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* 1768:1311–1324

II. Étude du rôle de STARD3 dans la croissance des cellules cancéreuses HER2+

Résumé des résultats :

Afin d'étudier le rôle de STARD3 dans la croissance des cellules HER2+, une stratégie de perte de fonction grâce à des siRNA a été utilisée. Les résultats obtenus ont confirmé que STARD3 contribue à la croissance des cellules HER2+. La croissance cellulaire a été mesurée par un test de clonogénicité dans plusieurs lignées cellulaires amplifiées pour HER2 provenant de différents organes (sein, poumon, ovaire et estomac). La perte d'expression de STARD3 dans les cellules HER2 négatives n'a montré aucune altération de la croissance cellulaire. Ainsi, nous avons confirmé que STARD3 agit spécifiquement sur la croissance des cellules cancéreuses HER2-positives provenant de différents types de tumeurs. De plus, nous avons montré par un test de soft agar que STARD3 est essentielle à la formation de colonies en absence d'ancrage dans les lignées cellulaires HER2-positives et non dans les cellules non amplifiées.

Afin d'identifier le processus cellulaire régulé par STARD3 dans les cellules HER2+, nous avons étudié la prolifération et l'apoptose dans des conditions de perte de fonction de STARD3. Le taux de prolifération est similaire dans les cellules silencées pour STARD3 et dans les cellules contrôles. Cependant, le taux d'apoptose mesuré par cytométrie en flux est augmenté dans les cellules HER2+ où l'expression de STARD3 est inhibée. Ces résultats indiquent une fonction de STARD3 dans la survie des cellules cancéreuses HER2+. Nous avons également identifié la voie de signalisation régulée par STARD3 par protéine array puis western blot. Nous avons montré que la perte d'expression de STARD3 dans une lignée cellulaire de cancer du sein HER2+ et dans une lignée de cancer de l'estomac HER2+ diminue la phosphorylation de HER2, la phosphorylation de ses deux partenaires de dimérisation EGFR et HER3, et l'activation d'Akt. Cet effet sur la voie PI3K/Akt confirme le rôle de STARD3 dans la survie des cellules HER2+. De plus, nous avons également montré que la perte d'expression de STARD3 diminue le nombre d'homodimères HER2-HER2 et d'hétérodimères HER2-EGFR ou HER2-HER3 dans les cellules de cancer du sein HER2+.

Ensuite, nous avons étudié le rôle des mouvements intracellulaires de cholestérol médiés par STARD3 dans la croissance des cellules HER2+. Nous avons montré que STARD3 module la distribution intracellulaire du cholestérol. En effet, la perte d'expression de STARD3 diminue la quantité de cholestérol dans les endosomes tardifs et augmente le cholestérol au niveau de la

-Résultats-

membrane plasmique dans les cellules HER2+ du sein et de l'estomac. De plus, nous avons confirmé que la croissance des cellules HER2+ dépend des mouvements intracellulaires du cholestérol médiés par STARD3 en faisant une expérience de sauvetage. Nous avons généré des mutants de STARD3 insensibles à la transfection de siRNA, et incapables de transférer du cholestérol ou d'interagir avec les protéines VAPs/MOSPD2. Contrairement à la protéine STARD3 sauvage, ces différents mutants sont incapables de restaurer la croissance des cellules HER2+. Ainsi, la croissance des cellules HER2+ dépend du transport de cholestérol médié par STARD3 et de sa capacité à créer un site de contact membranaire endosomes tardifs-RE.

Pour conclure, ces travaux de thèse montrent que les modifications de la composition lipidique de la membrane plasmique médiées par STARD3 peuvent affecter la dimérisation des récepteurs et les voies de signalisation en aval de HER2 pour favoriser la survie des cellules cancéreuses HER2+.

L'ensemble de ces résultats est décrit dans un article intitulé « Intracellular cholesterol traffic represents a new dependence for HER2-amplified cancers » que nous prévoyons de soumettre prochainement et qui se trouve ci-après.

Intracellular cholesterol traffic represents a new dependence for HER2-amplified cancers

Laetitia Voilquin¹²³⁴, Massimo Lodi¹²³⁴⁷, Nario Tomishige⁴⁵, Marie-Pierre Chenard¹²³⁴⁶, Carole Mathelin¹²³⁴⁷, Toshihide Kobayashi⁴⁵, Benoit Frisch⁸, Fabien Alpy¹²³⁴, and Catherine Tomasetto¹²³⁴

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

2 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U.1258, Illkirch, France.

3 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7104, Illkirch, France.

4 Université de Strasbourg, Illkirch, France

5 Laboratory of Bioimaging and Pathologies, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR7021, Illkirch, France

6 Pathology Unit, Strasbourg University Hospital (CHRU), Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France

7 Institut de cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), 17 avenue Albert Calmette, 67200 Strasbourg Cedex, France

8 CNRS, 3Bio Team, Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR 7199, Illkirch, France.

Corresponding authors:

catherine-laure.tomasetto@igbmc.fr and

fabien.alpy@igbmc.fr.

Abstract

HER2 is a tyrosine kinase receptor from the EGFR family that plays a central role in tumor progression of lung, breast, ovary, and gastric cancers. HER2-positive cancers are characterized by HER2 amplification and overexpression. StAR-related lipid transfer domain-3 (STARD3) is a gene co-amplified and co-expressed with HER2 in cancers. The encoded protein, STARD3, is an endosomal tether involved in the formation of ER-endosomes membrane contacts and intracellular cholesterol trafficking. However, how STARD3 participates in tumorigenesis remains unclear. Here, we showed that loss of STARD3 expression inhibits specifically HER2-positive cancer cell growth and does not affect other cancer cell types. STARD3 acts specifically

on HER2+ cancer cell growth through an indirect mechanism, by altering the normal cholesterol distribution and modifying the lipid composition of the plasma membrane. These changes favor the dimerization and activation of HER2 and the activation of the PI3K/Akt pathway to promote cancer cell survival. This study reveals that HER2-amplified cancer cell growth depends on intracellular cholesterol movements mediated by STARD3 at ER-endosome contacts and reinforce the idea that STARD3 may have a therapeutic potential in HER2-positive cancers.

Introduction

The gene encoding the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), also known as Receptor Tyrosine Kinase ErbB2, is amplified and overexpressed in breast and other cancers (Hynes and MacDonald, 2009). In breast cancers, HER2 amplification defines one of the principal subtype of tumors named HER2-positive breast cancers. The two other main subtypes are luminal cancers expressing the estrogen receptor (ER) and triple-negative cancers lacking both ER and HER2 expression. For patient care, amplification of HER2 in tumor biopsies is the indication for specific anti-HER2 targeted therapies blocking either the receptor itself or its tyrosine kinase activity. These therapies such as trastuzumab, pertuzumab and lapatinib have largely improved the care of HER2-positive cancer, but *de novo* and acquired resistance are common (Gianni et al., 2010; van Ramshorst et al., 2018; Romond et al., 2005), underlying the clinical diversity of these tumors and the need for additional treatment (Garrett and Arteaga, 2011; Pohlmann et al., 2009). Some studies that have profiled the genetic alterations in breast cancers concluded that HER2-amplified breast cancers have a higher level of genomic heterogeneity than non-amplified cancers (Vanden Bempt et al., 2007). This finding suggests that genetic instability might be responsible for the observed clinical diversity. Accordingly, the complexity of gene amplification patterns at the HER2-gene locus has often been reported, underlining the notion that the HER2 amplicon differs in size and in copy number (Jacot et al., 2013; Kauraniemi and Kallioniemi, 2006). Early studies on that matter identified several genes co-amplified and co-expressed with HER2 such as TOPA2 and GRB7 (Järvinen et al., 1999; Stein et al., 1994). Around that

time, our group identified, by differential screening of breast tumors, four novel genes (TRAF4, LASP1, CASC3 and STARD3) co-amplified and co-expressed with HER2 (Bièche et al., 1996; Tomasetto et al., 1995). These genes were thought to represent good candidates as additional drivers for HER2-amplified tumors. STARD3 distinguished itself from the other identified neighboring genes because it is present in the common minimal region of amplification of HER2 cancers (Kauraniemi et al., 2001; Sahlberg et al., 2013), and its silencing reduces the growth of HER2-amplified derived cells (Kao and Pollack, 2006). Although STARD3 is overexpressed in HER2-positive breast cancers, how STARD3 participates in tumorigenesis remains unclear.

STARD3 is a lipid transfer protein (LTP) from the START (StAR-related lipid-transfer) protein family (Alpy and Tomasetto, 2014; Voilquin et al., 2019). It contains a carboxy-terminal START domain able to bind and exchange cholesterol, a FFAT-like motif and an amino-terminal MENTAL domain composed of four transmembrane helices (Voilquin et al., 2019). The MENTAL domain addresses the protein to endosomes, and is able to bind cholesterol and to mediate homotypic and heterotypic interactions with a close homolog called STARD3NL (Alpy et al., 2005). We recently uncovered that STARD3 functions in intracellular cholesterol transport by favoring the flux of endoplasmic reticulum (ER) cholesterol to endosomes (Wilhelm et al., 2017). This transport is associated with a decrease of cholesterol at the plasma membrane. We solved the mechanism of transport by showing that STARD3 forms membrane contacts between the ER and late endosomes by interacting with the ER receptors VAP-A/B and MOSPD2 (Alpy et al., 2013; Mattia et al., 2018). This interaction, based on the recognition of the FFAT-like motif present on STARD3 by the MSP domain of VAP-A/B and MOSPD2, is instrumental for the sterol transport function of the START domain. Indeed, the kinetics of sterol transport was increased by an order of magnitude when STARD3 was present in reconstituted ER-endosome membrane contacts. Thus, *in vitro* and *in vivo* assays showed that the formation of complexes between VAP and STARD3 is necessary to build inter-organelle contacts where a fast transport of cholesterol occurs (Wilhelm et al., 2017).

STARD3 appears as a general modulator of intracellular distribution of cholesterol. In normal tissues, STARD3 is expressed at a basal level and its function is probably balanced by other homeostatic mechanisms regulating cholesterol distribution. In HER2-amplified cancer, STARD3 is overexpressed to

high levels. We speculate that this increased expression is associated with an alteration of the intracellular cholesterol distribution that cannot be compensated. In turn, HER2-amplified cancer cells have adapted to the presence of elevated level of STARD3. In this study using a variety of HER2-amplified cell lines, we show that HER2-amplified tumors have a unique dependency towards STARD3 expression and intracellular cholesterol distribution.

Results

Association between STARD3 and HER2 in breast cancers

Gene amplification is an important mechanism in cancer leading to increased gene expression and gain of function (Vogelstein et al., 2013). In our previous studies, using cell lines and breast tumors, we showed that STARD3 gene amplification and overexpression paralleled that of HER2 (Bièche et al., 1996; Tomasetto et al., 1995). In order to establish with precision the relationship between DNA copy number and RNA expression for STARD3 and other genes from the HER2 amplicon, we took advantage of the CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia) project (Barretina et al., 2012). We extracted DNA copy number and RNA expression data for HER2, GRB7, STARD3 and TOPA2 genes in 51 breast cancer cell lines (Supplementary Table S1). The correlation coefficient between DNA copy number and RNA expression was calculated for the different genes tested. Interestingly, STARD3 expression showed a strong positive correlation with its own DNA copy number (Figure 1A), a feature shared by HER2 and GRB7 (Figure 1B). More important, STARD3 DNA copy number showed a strong positive correlation with HER2 DNA copy number, and both STARD3 DNA copy number and expression (RNA level) are strongly correlated with HER2's (Figure 1). To substantiate this finding, we analyzed STARD3 protein expression on a series of 108 HER2-positive invasive breast cancers by immunohistochemistry (IHC) (Supplementary Table S2). To this aim, we generated a monoclonal antibody with high specificity (Supplementary Figure S1). All these tumors were classified in the HER2-positive subgroup by routine immunohistochemistry performed on initial biopsy. STARD3 expression was scored on initial biopsies according to signal intensity and to the number of positive cancer cells. High STARD3 expression was found in the majority of samples: out of 108 samples, 98 tumors were

positive and 10 were negative (Supplementary Table S2). We also looked at the percentage of cancer cells positive for STARD3 in these samples. In the 98 STARD3-positive tumors, the protein was overexpressed in all cancer cells (Figure 1C). Consistent with the known localization of STARD3 in endosomes, in cancer cells the protein was found in cytoplasmic puncta in all positive cases (Alpy et al., 2001). Thus, in our clinical series, STARD3 is overexpressed at the protein level in 91 % of the HER2-positive tumors scored by routine IHC.

Amplification at the HER2 locus is not specific to invasive ductal carcinoma (IDC). Many studies reported that ductal carcinoma *in situ* (DCIS) have HER2 amplification and overexpression (Latta et al., 2002). In particular, one study in pure DCIS showed co-amplification and overexpression of the 17q12 genes including STARD3 and GRB7 with HER2 (Vincent-Salomon et al., 2008). Because the presence of DCIS lesions is frequent in invasive ductal carcinoma, we observed STARD3 expression in the *in situ* and invasive components of tumors from our series. We found 56 admixed DCIS in the series representing about half of the samples. In all these cases, the level of STARD3 expression was identical in the invasive and *in situ* components of the tumors, and 52 cases were STARD3-positive and 4 were STARD3-negative (Supplementary Table S2).

Consistent with previous reports, we show here that the STARD3 gene is co-amplified with HER2 in the majority of this subtype of breast cancers. This amplification is accompanied by mRNA overexpression and protein overexpression. The strong positive correlation between HER2 and STARD3 supports the notion of a synergistic function of STARD3 with HER2 in these cancers.

STARD3 contributes to HER2-amplified cancer cell growth

To examine the role of STARD3 in HER2-amplified cancer cells, we reduced STARD3 expression by RNA interference (RNAi) using a pool of four small interfering RNAs (siRNAs) in HER2-amplified and non-amplified cell lines. We first examined the kinetics of down-regulation in two representative HER2-amplified cell lines from the breast (HCC1954) and the stomach (NCI-N87). In both cell lines, an efficient down regulation of STARD3 was observed from day 2 to day 6-8 after transfection (Supplementary Figure S2). Of interest, the expression of HER2 was not significantly affected by STARD3 silencing. Second, to analyze the effect of

STARD3 silencing on long term cancer cell growth, we performed clonogenic assays in 6 HER2-amplified cell lines from the breast (HCC1954, SK-BR3, BT474), ovary (SK-OV-3), stomach (NCI-N87) and lung (Calu-3), and in 4 non-amplified cell lines from the breast (MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231) and cervix (HeLa). As shown in figure 2A, reduction of STARD3 expression in representative cell lines from the breast either HER2-amplified (HCC1954) or non-amplified (MDA-MB-231) decreased clonogenicity in HCC1954 cells and had no effect on MDA-MB-231 cells. Quantification of clonogenic assays in all the cell lines mentioned above showed that STARD3 silencing reduced dramatically the ability to form clones in all HER2-amplified cell lines tested but had no effect in the non-amplified cell lines (Figure 2B). We also determined the impact of STARD3 on short term cell growth using the MTT tetrazolium assay. After 4 days of STARD3 down regulation, a reduction of viable cell number was observed in all HER2-amplified cell lines tested (Figure 2C). Conversely, the non-amplified cell lines tested were unaffected. Finally, we also looked at anchorage-independent growth in two representative cells lines, the NCI-N87 (HER2-amplified) and the MDA-MB-231 cells. Remarkably, down regulation of STARD3 reduced the ability of NCI-N87 cells to grow independently of a solid surface (Figure 2E), while it had no effect on HER2-negative MDA-MB-231 cells.

Collectively, these data show that the growth of HER2-amplified cancer cells requires STARD3 expression; in contrast the growth of cancer cells non-amplified for HER2 does not. Thus, these results reveal that HER2-amplified cancer cells are specifically dependent on STARD3 expression.

STARD3 modulates cholesterol distribution in cancer cells

We established previously in HeLa cells that exogenous expression of STARD3 was associated with the increase of cholesterol level in endosomes, and its reduction in the plasma membrane (PM) (Wilhelm et al., 2017). Since STARD3 is endogenously expressed at high levels in HER2-amplified cancer cells, we reasoned that the intracellular distribution of cholesterol in these cancer cells might be under STARD3 control. We first sought to study endosomal cholesterol in the breast-derived HER2-amplified cancer cell line, HCC1954. To do so, we used filipin staining in cells treated with M β CD to specifically remove PM cholesterol. In HCC1954 cells, the cholesterol probe filipin showed the presence of

cholesterol-loaded intracellular vesicles (Figure 3A). Moreover co-staining with STARD3 showed that most filipin-labeled vesicles were STARD3 positive, and both signal were correlated (Figure 3B). To confirm the endosomal identity of STARD3-positive vesicles, cells were also stained with antibodies against early endosome (EEA1) and late endosome/lysosome (Lamp1, CD63 and Rab7) markers (Figure 3). As shown in Figure 3A and B, STARD3 strongly colocalized with all the late endosome/lysosome proteins tested, and not with the early endosome protein EEA1 (Figure 3B). We then studied cholesterol localization in a second HER2-amplified cell line the NCI-N87 cells. Consistently, in these cells STARD3 was present in cholesterol-loaded endosomes (Supplementary Figure S3 A-B). These data indicate that in HER2-amplified cells, STARD3 is predominantly localized in late endosomes that are loaded with cholesterol. Second, to address whether STARD3 was involved in this accumulation of cholesterol in endosomes, we silenced STARD3 and measured total, endosome and PM-cholesterol levels. Total cholesterol levels, measured biochemically, were unchanged by STARD3 silencing (Figure 3G and S3G). To quantify cholesterol in late endosomes, we used an *in situ* cholesterol labelling procedure with filipin and a devised method allowing cholesterol quantification in late endosomes labeled with CD63 (see methods and Supplementary Figure S4) (Wilhelm et al., 2019). Compared with control cells, less filipin-signals in vesicles were observed in cells silenced for STARD3 in both HCC1954 and NCI-N87 cells (Figure 3C-D and Supplementary Figure S3C-D). Next, we measured PM cholesterol in STARD3 down regulated HCC1954 and NCI-N87 cells. We used live cell membrane cholesterol staining with the GFP-D4 probe to image and quantify plasma membrane cholesterol. Quantification was achieved by flow cytometry (Wilhelm et al., 2019). Compared to control or parental cells, STARD3 silencing was associated with increased PM cholesterol labelling by the GFP-D4 probe in both HCC1954 and NCI-N87 cells (Figure 3E-F and Supplementary S3E-F).

To further explore the function of STARD3 on plasma membrane lipids, we quantified sphingomyelin and sphingomyelin/cholesterol complexes in these cells. To measure and quantify sphingomyelin (SM), we used the non-toxic lysenin protein fused with GFP probe (GFP-Lysenin) (Shogomori and Kobayashi, 2008). Similarly, to image and quantify sphingomyelin/cholesterol complexes we employed the GFP-tagged pleurotolysin A2 (PlyA2) probe (Bhat et al., 2013). Quantification was

done by flow cytometry. We controlled the specificity of these probes by treating live cell before staining, with methyl-beta-cyclodextrin (M β CD) and sphingomyelinase (SMase) to remove cell surface cholesterol and SM, respectively. These treatments reduced considerably the PM staining of SM and SM/cholesterol complexes by GFP-lysenin and PlyA2-GFP, respectively (Supplementary Figure S5). These probes were then used to stain HER2-positive cells in which STARD3 expression was down-regulated. In HCC1954 cells, GFP-lysenin binding was only slightly increased in the absence of STARD3 but PlyA2-GFP binding was clearly elevated in cells lacking STARD3 (Figure 3E-F).

Taken together, these data indicate that in HER2-amplified cancer cells, STARD3 modulates the intracellular repartition of cholesterol, by favoring its presence in the endocytic compartment, and reducing its level at the PM. In addition to cholesterol, in the breast cell line HCC1954, STARD3 controls the amount of cell surface cholesterol and SM/cholesterol complexes, which are major components of lipid rafts.

HER2-amplified cells are dependent on cholesterol transport at contact sites

Our results indicate that in HER2-amplified cells, the distribution of intracellular cholesterol is, in part, under STARD3 control. We know that the function of STARD3 on cholesterol distribution requires a two-step molecular mechanism, one is the formation of membrane contacts between the ER and endosomes, the second is the transfer of cholesterol between the two organelles by the START domain (Voilquin et al., 2019; Wilhelm et al., 2017). STARD3 is a modular protein containing a non-conventional FFAT motif able to interact with VAP proteins and make ER-endosome contacts (Alpy et al., 2013; Voilquin et al., 2019). To know if HER2-amplified cells have ER-endosome contacts made by STARD3, we looked at the subcellular localization of the molecular components of these contacts: STARD3 and VAP-A. Immunofluorescence experiments made in HCC1954 cells showed typical endosome and ER signals for STARD3 and VAP-A, respectively (Figure 4A). STARD3 signal was found in close proximity with the dense network of ER labeled by VAP-A. To circumvent the limited resolution of confocal microscopy, we next applied the sensitive technique of *in situ* proximity ligation assay (PLA) to test for the presence of ER-endosome contacts in HCC1954 cells. With this assay, proximity (< 40 nm)

between two proteins is revealed by fluorescent dots (Söderberg et al., 2006). Using antibodies to endogenous STARD3 and VAP-A proteins, we demonstrated proximity between endosomes and the ER. Many PLA-positive fluorescent dots were seen in wild-type HCC1954 cells, indicating the presence of MCSs (Figure 4B-C). In contrast, only a few dots were formed in cells knocked down for either STARD3, VAP-A and for both STARD3 and VAP-A, confirming the specificity of the antibodies used for PLA (Figure 4B-C). Thus, this experiment shows that endogenous STARD3 and VAP-A are in close proximity, most likely in ER-endosome contacts in HCC1954 cells.

The presence of STARD3-VAP-A complexes is consistent with the ability of STARD3 to transport cholesterol at the ER-endosome interface by its START domain. To determine if the ER-to endosome transport of cholesterol contributes to HER2-amplified cell growth, we used functionally impaired STARD3 mutants in rescue experiments. We used a series of mutations which impair the cholesterol transfer function of STARD3 at different steps (Figure 5A) (Wilhelm et al., 2017). The STARD3 FA/YA mutant, which possesses a defective FFAT motif, belongs to the first class of mutants, characterized by their inability to mediate the formation of ER-endosome contacts. Then, the STARD3 MR/ND and the STARD3 ΔSTART belong to the second class of mutants which cannot transfer cholesterol. Next, we used these mutants in rescue experiments (Figure 5). To this aim, a construct insensitive to siRNAs was used to express wild-type and mutant STARD3 in HCC1954 cells (Figure 5B). Transfection with synthetic siRNA resulted in the loss of the endogenous protein while the ectopic expression of the wild-type and mutant proteins was unaffected (Figure 5B). Then, we measured the ability of wild-type and mutant STARD3 expression to restore cell growth defect induced by endogenous STARD3 silencing. Cell growth measurements showed that while the wild-type protein restored cell growth, the two classes of mutants, either unable to make ER-endosome contacts or to transfer cholesterol, did not restore cell growth (Figure 5C).

These results show that the repartition of intracellular cholesterol governed by STARD3 is essential for the growth of HER2-amplified cancer cells.

STARD3 favors HER2 activation

To determine by which molecular mechanisms HER2-amplified cells require STARD3 to

grow, we examined several scenarios. We initially thought that both proteins may directly interact and form a functional complex. The colocalization and interaction results did not support this idea. In all HER2-amplified cancer cells tested, STARD3 and HER2 do not colocalize (Alpy and Tomasetto, 2014) (Supplementary Figure S6A-B) and do not interact (Supplementary Figure S6C). Considering that the function of STARD3 on cholesterol transport was required to support HER2-amplified cancer cell growth, we reasoned that STARD3 might indirectly influence HER2 signaling activity. To identify proteins differentially activated in the presence of STARD3 in HER2+ cells, we used commercial protein arrays. First, we compared the phosphorylation profile of 49 tyrosine kinase receptors (RTK) in HCC1954 control cells and STARD3 knock down cells (Supplementary Figure S7A-B). The main findings of this phospho-RTK array, which were consistent between two independent experiments, were that reduction of STARD3 was associated with a strong decrease of the phosphorylation of HER2, EGFR and cMet (HGFR). A slight decrease of Insulin receptor and IGF-1R phosphorylation was observed. Most of the other receptors present in the array were not detected in both control and silenced cells indicating that the HER2 signaling pathway is predominant in these cells (Supplementary Figure S7A). Second, we decided to focus our analysis on intracellular signaling pathways. We analyzed the phosphorylation status of 26 kinases: mitogen-activated protein kinases (MAPKs), extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinases (JNK1-3), different p38 isoforms and other intracellular proteins such as Akt, GSK-3, p70 S6 kinase, TOR and p53. Again, results consistent between two independent experiments showed that the loss of STARD3 reduced activation of Akt (Supplementary Figure S7C-D). Based on these results, we next tested signaling receptors and molecules individually by immunoblot on control and STARD3 silenced HCC1954 and NCI-N87 cells. We choose these two cell lines because they have a different status regarding the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT/mTOR pathway. The HCC1954 cell line has a frequently observed gain-of-function mutation in the kinase domain of PI3K (H1047R), while the NCI-N87 has a wild-type PI3K (Yarar et al., 2015). We examined the activated status of cMet ; a tyrosine kinase receptor transducing mitogenic and motogenic signals. We confirmed that in HCC1954 and NCI-N87 cells, cMet (HGFR) phosphorylation was strongly decreased by STARD3 silencing (Figure 6). We then focused on the EGFR and HER2 pathways. Down regulation of

STARD3 was associated in a consistent manner with a clear reduction of EGFR, HER2 and HER3 phosphorylation (Figure 6). Next we looked at the activation of kinases downstream of HER2, phosphorylation of ERK and mTOR were not affected by the loss of STARD3, while AKT phosphorylation was clearly reduced (Figure 6).

Having established that STARD3 reduces PM cholesterol and that its reduction is notably associated with a decrease of HER2 phosphorylation, a further step was to see whether reducing PM cholesterol by a pharmacological intervention could mimic STARD3 function and activate HER2 phosphorylation. To address this, wild-type HCC1954 cells were treated with methyl- β -cyclodextrin (M β CD), a chemical known to remove cholesterol from the PM. Alternatively, PM cholesterol was elevated by adding exogenous cholesterol (+chol) (Figure 7A). Of interest, HER2, EGFR and HER3 were activated upon membrane cholesterol depletion, while HER2 downstream targets responded differently (Figure 7B). In fact, ERK phosphorylation was increased while AKT was not activated. When exogenous cholesterol was added to the PM, the activation status of these proteins was similar than in non-treated cells (Figure 7B). These experiments show that the reduction of PM cholesterol by a chemical agent in HCC1954 cells mimics some but not all of the features associated with STARD3 expression.

Collectively, these experiments showed that STARD3 elevated expression in HER2-amplified cancer cells favors the activation of a number of membrane receptors notably HER2 and other RTK including EGFR, HER3 and c-Met.

STARD3 favors HER2 interaction/dimerization with EGFR and HER3

Having observed that ablation of STARD3 decreased HER receptors phosphorylation without altering their global levels (Figure 6), we reasoned that STARD3 may control HER2 activation by increasing its presence and ability to form homo and heterodimers at the PM. It is known that HER2 forms homodimers in the absence of ligand in HER2-overexpressing cells (Yarden and Sliwkowski, 2001). In addition, HER2 associates with other members of the family especially EGFR and HER3 contributing to their dysregulated signaling (Citri and Yarden, 2006; Graus-Porta et al., 1997; Tzahar et al., 1997). To measure the presence of homo HER2-HER2 and hetero HER2-EGFR and HER2-HER3 dimers in STARD3

silenced cells, we used the PLA assay (Figure 8). This method has already been used to quantify the amount of HER2-HER2 and HER2-HER3 dimers in human breast carcinomas (Spears et al., 2012). To validate the specificity of the method, HER2 was also silenced in HCC1954 cells (Figure 8) prior to the PLA assay. Upon HER2 silencing, the protein was undetectable by immunoblot (Figure 8A). Under STARD3 silencing conditions, the total level of HER2 protein remained unchanged (Figure 8A). In the absence of HER2, no to very few PLA signals corresponding to HER2-HER2, HER2-EGFR and HER2-HER3 dimers were detected (Figure 8C). In the absence of STARD3, signals corresponding to HER2-HER2, HER2-EGFR and HER2-HER3 dimers were decreased by half (Figure 8B, 8C and 8D).

Taken together these results show that STARD3 favors HER2 ability to form homo and heterodimers and subsequently its activation.

Discussion

In this study, we showed that HER2 amplified cancer cells have a growth dependency for STARD3, a neighboring gene on chromosome 17q. This dependency is specific to HER2-amplified cancer cells since non-amplified cells are not sensitive to the loss of STARD3 expression. Consistent with the notion that HER2 amplification is a pan-cancer subtype (Chmielecki et al., 2015), we found that STARD3 dependency was not unique to breast cancer cells but was shared with other type of cancers. Thus, the dependency on STARD3 is a general phenomenon of HER2-amplified cells and not a peculiarity of one or two cell lines. We uncovered an indirect mechanism explaining how STARD3 impacts specifically the growth of HER2-amplified cancer cells (Figure 9). In these cells, STARD3 governs the intracellular distribution of cholesterol, by making ER-endosome contacts and favoring cholesterol accumulation in endosomes. In HER2-amplified cells, STARD3 does not change the global level of cellular cholesterol but favors its presence in endosomes at the expense of the PM, possibly by hijacking a route bringing cholesterol from the ER to the PM (Figure 9). Thus STARD3 appears as a regulator of the lipid composition of the PM. Consistent with the primary role of the PM in receptor activation; we showed here that in HER2-amplified cells, STARD3 enhances HER2 homo- and hetero-dimerization with EGFR and HER3 and their subsequent signaling. Interestingly, HER2 activation is associated with the activation of many cellular responses including proliferation,

survival, loss of polarity, and invasion relayed by downstream pathways (Moasser, 2007; Yarden and Sliwkowski, 2001). Here, while loss of STARD3 decreased strongly HER2 phosphorylation, most of the downstream kinases including MAPK were not affected and remained activated. One major exception being AKT whose phosphorylation is dependent on STARD3. The fact that downstream signaling was not affected despite a reduction of HER2 phosphorylation may be explained by our experimental setting. All the experiments were done in serum containing medium and many mitogenic signals likely converge to MAPK independently from HER2 activation. It was surprising to observe a decrease of AKT phosphorylation. Among the two cell lines examined in details in this study, the NCI-N87 cell line is wild-type for PI3K, the kinase upstream from AKT, while the other one, HCC1954, has constitutive activating mutation of the PI3K and loss of phosphatase and tensin homolog (PTEN), the negative regulator of the RTK/PI3K pathway (Jernström et al., 2017; Manning and Cantley, 2007; Yarar et al., 2015). The finding that reduction of STARD3 expression is associated with a decrease of AKT phosphorylation suggests that STARD3 acts on a pathway independent from RTK/PI3K by either activating AKT alternate kinases or inactivating AKT phosphatases. Many alternate AKT kinases have been described (Bozulis et al., 2008; Faes and Dormond, 2015; Ou et al., 2011). Whether STARD3 regulates AKT activity independently from RTK/PI3K should be examined in future studies.

Whether genes co-amplified and co-expressed with a driving oncogene are important for the biology of cancer is a matter of debate. One considers co-amplified genes as passive passenger genes accompanying a driving oncogene, we and others consider that co-amplified and co-expressed genes contribute to the biology of cancer and importantly may represent a vulnerability that can be exploited for therapy. The detailed characterization of the HER2 amplicon provides evidences that co-amplified genes matter (Glynn et al., 2010). In breast cancer, amplification of HER2 marks a specific subtype originally described as aggressive and associated with a poor prognosis (Slamon et al., 1987). A treatment targeting the HER2 protein by the trastuzumab antibody showed prolonged disease-free survival especially in association with chemotherapy (Piccart-Gebhart et al., 2005; Robert et al., 2006; Romond et al., 2005). This targeted therapy had a profound impact on patient care and improved prognosis. Several lines of evidence suggested however that HER2 was not the unique

cancer driver gene. For instance, genetically engineered mice designed to support the idea that HER2 is oncogenic showed that it is more complicated (Ursini-Siegel et al., 2007). Early studies showed that overexpression of an activated mutated form of the murine equivalent of HER2 (Neu-NT) caused the development of multiple invasive carcinomas, while the over expression of a wild-type construct gave focal mammary tumors after a long latency. Given that in human cancers, the wild-type HER2 is amplified and overexpressed, other mouse models were created to better mimic the human disease and understand the different signaling pathways activated by HER2. Among them, a knock-in model where the activated murine receptor is expressed under the control of the endogenous mouse promoter was very interesting since it showed many similarities with the human disease (Andrechek et al., 2000). In this mammary-gland specific knock-in of the activated receptor (NEU-NT), focal tumors developed with a long latency and in most tumors, overexpression was achieved by amplification of the locus. Similarly to the human disease, genes like GRB7 and STARD3 were also amplified and overexpressed in this knock-in model (Schade et al., 2013). This mouse model supports the idea that in mammary gland tumors, co-amplified genes contribute to the biology of HER2-positive cancer cells. Studies performed on GRB7 (Bai and Luoh, 2008; Fiddes et al., 1998; Nadler et al., 2010; Stein et al., 1994) and this work provide additional evidences that HER2-amplified tumors are indeed addicted to HER2 but also to other genes present in the amplicon.

STARD3 is an organelle bound protein. Its attachment to endosomes limits spatially its sterol transfer activity. Its interaction with ER-bound proteins VAP and MOSPD2 results in the formation of inter-organelle contacts where cholesterol is efficiently transferred. Previous studies showed that the sterol transfer activity of the START domain of STARD3 in isolation is weak compared to other related LTP like STARD4 (Iaea et al., 2015; Voilquin et al., 2019). A key finding was that the sterol transfer activity of STARD3 was enhanced by an order of magnitude in assays reconstituting inter-organelle contacts showing that the function of STARD3 relied on contact site formation and sterol transfer (Wilhelm et al., 2017). Consistent with this notion, we show here that these two activities are necessary for the growth of HER2-amplified cells. Although the role of membrane contact sites in cancer has been speculated (Peretti et al., 2019), our study is to our knowledge the first to show that a protein is

implicated in HER2 oncogenesis through the formation of membrane contact sites.

STARD3 is a cholesterol transport protein; the role of cholesterol in cancer has been the scope of many investigations. The levels of intratumoral cholesterol are generally higher in cancer than in normal tissue, but the meaning is unclear, it could reflect altered cancer metabolism (Mollinedo and Gajate, 2020). Epidemiologic studies that have interrogated the association between circulating cholesterol levels and cancer are inconclusive (Nelson et al., 2014). However, a positive association was found between accumulation of intracellular cholesterol and increased cancer risk in pancreatic cancer (Chen et al., 2015). This was supported by experimental studies showing that pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) were dependent for their growth on cholesterol uptake by the low-density lipoprotein receptor (LDLR) pathway (Guillaumond et al., 2015). These studies indicate that pancreatic cancer cells adapt their need for cholesterol by favoring its uptake from lipoproteins and support the idea that targeting LDLR may be a therapeutic strategy. Besides transport and uptake, synthesis, increased storage in lipid droplets and decrease efflux have been described as ways for cancer cells to adapt to their important need for cholesterol (Petan et al., 2018; Tosi and Tugnoli, 2005; Vasseur and Guillaumond, 2015). In this study we add to the list intracellular cholesterol distribution in HER2-amplified cancers.

To conclude, these results revealed the molecular mechanism of STARD3 addiction in HER2 tumors. Indeed, HER2-amplified cancer cell growth depends on intracellular cholesterol movements mediated by STARD3 at ER-endosome contacts. Given this unique dependency, STARD3 is a good target to better treat HER2-amplified cancers in association with anti-HER2 targeted therapies.

Material and methods

RNA and DNA correlations

Data were extracted from the Cancer Cell Line Encyclopedia website, Broad Institute of MIT & Harvard (Barretina et al., 2012). We collected mRNA expression (RNAseq) and DNA copy number for each gene on 51 different breast cancer cell lines (Supplementary table S1). Statistical analyses and graphical plotting were carried out using R version 3.6.1 (2019-07-05) and R packages *Hmisc*, *ggpubr* and *ggplot2*. For correlation, we used Pearson correlation test and regression line was made with a linear model.

STARD3 immunohistochemistry assay on human breast cancer

We conducted a retrospective analysis of STARD3 expression in HER2-positive human breast cancer. For that, we constituted a cohort of patients diagnosed with a HER2-positive primary breast cancer by routine immunohistochemistry (score 3+) treated at the Strasbourg University Hospital between 2011 and 2019. For each patient, we gathered clinical and pathological data. Then, for each patient we unarchived the initial core biopsy of the tumor which was previously fixed in formaldehyde and embedded in a paraffin block. Each block was cut in 4 μm slices using a microtome. The slices were placed on positive-charged glass slides [VWR SuperFrost® Plus] after a bath in 40°C water. Each slide was identified with a bar code and specimen and protocol identification. We then proceeded to automated deparaffinization and staining using BenchMark Ultra IHC slide staining system automat (Ventana, Roche) with UltraView Universal DAB detection kit (Ventana, Roche). The first step was deparaffinization by heating slides to 72°C then washing them four times with EZ Prep™ 1x (950-102, Ventana) solution. Then, a pre-treatment was performed by association of heating to 95°C and Cell Conditioning 1™ solution (CC1, Ventana, Roche) with the 64-minutes standard protocol. At the end of pre-treatment, slides were heated to 36°C until the end of the whole protocol. Slides were washed 3 times with reaction buffer. Endogenous enzyme inhibition was obtained with UltraView Inhibitor™ (Ventana, Roche) applied for 4 minutes. Slides were washed 2 times with reaction buffer. Then, anti-STARD3 3G11 primary antibody (mouse monoclonal antibody, IGBMC) at 1/500 dilution was applied for 32 min at 36°C. Initially, different anti-STARD3 antibodies and different dilutions were tested in order to choose the best experimental situation. Slides were washed 2 times with reaction buffer. Next, secondary anti-mouse antibody coupled with horseradish peroxidase [UltraView HRP Multimer™ (Ventana, Roche)] was applied for 8 minutes at 36°C. Slides were washed 3 times with reaction buffer. At this point, UltraView DAB™ and DAB H2O2™ (Ventana, Roche) were applied on the slides for 8 minutes at 36°C and UltraView Copper™ (Ventana, Roche) was used to improve staining readability. Slides were washed once with reaction buffer. Ultimately, a counterstaining with Hematoxylin II (Ventana, Roche) for 8 minutes was performed. Slides were dehydrated with ethanol and xylene then mounted with the machine Cover Tech Microm CTM6 (Thermo Scientific) using Pertex® rapid drying medium for mounting (Histolab) and 24x50 mm cover slips (Mezel-Glöser). For each patient, we examined STARD3 and HER2 immunohistochemistry assays using brightfield microscopy and those slides were scanned with NanoZoomer-XR (Hamamatsu) using the whole slide imaging system.

Human breast cancer tumors came from the tumor bank "Centre de Ressources Biologiques" of the "Hôpitaux Universitaires de Strasbourg" (number 1970 390 v0). All the samples were collected from patients treated in the Strasbourg University Hospital. All patients gave written informed consent for research use of these tumors. Local Ethics Committee gave his approbation for the study.

Cloning and constructs

STARD3 insensitive mutant (STARD3ins) was synthesized by GenScript. Silencing mutations were made in all the sequences targeted by STARD3 siRNAs to obtain a resistant cDNA with the same coding sequence. From this insensitive mutant, the STARD3 Δ STARTins (Q14849-1, residues 1–235), STARD3 M307R/N311Dins (referred to as MR/NDins mutant), and STARD3 F207A/Y208Ains (referred to as FA/YAins mutant) double mutants were constructed by linked-PCR. The different mutants were then cloned in the lentiviral expression vector pLenti PGK. The expression vectors encoding the GFP-D4, GFP-Lysenin and PlyA2-GFP probes were previously described (Bhat et al., 2013; Ohno-Iwashita et al., 2004; Shogomori and Kobayashi, 2008).

All constructs were verified by DNA sequencing.

Cell culture, transfections and infections

HCC1954 (American Type Culture Collection CRL-2338), NCI-N87 (ATCC CRL-5822) and MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) cells were maintained in RPMI w/o HEPES with 10 % fetal calf serum (FCS) and 40 μ g/ml gentamycin. SK-BR-3 (ATCC HTB-30) cells were maintained in DMEM with 10 % FCS and 40 μ g/ml gentamycin. BT-474 (ATCC HTB-20) cells were maintained in RPMI w/o HEPES with 10 % FCS, 10 μ g/ml insulin and 40 μ g/ml gentamycin. SK-OV-3 (ATCC HTB-77) cells were maintained in Mc Coy's 5a medium with 10 % FCS and 40 μ g/ml gentamycin. Calu-3 (ATCC HTB-55) cells were maintained in MEM with 10 % FCS, AANE, 1 mM sodium pyruvate and 40 μ g/ml gentamycin. HeLa (ATCC CCL-2) cells were maintained in DMEM with 5 % FCS and 40 μ g/ml gentamycin. MCF10A (ATCC CRL-10317) cells were maintained in DMEM/HAM F12 (1:1) with 10 % horse serum, 5 μ g/ml insulin, 40 μ g/ml gentamycin, 2 mM L-Glutamin, 0.5 μ g/ml hydrocortisone, 2 ng/ml human Epidermal Growth Factor (hEGF) and 0.1 μ g/ml cholera toxin. MCF7 (ATCC HTB-22) cells in DMEM with 10 % FCS, 0.6 μ g/ml insulin and 40 μ g/ml gentamycin. 293T (ATCC CRL-3216) cells were maintained in DMEM with 10 % fetal calf serum (FCS), penicillin 100 UI/ml and streptomycin 100 μ g/ml.

Transient siRNA transfections were performed using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, P/N 56532) according to the manufacturer's instructions. STARD3-targeting siRNAs and HER2-targeting siRNAs were SMARTpool ON-TARGETplus obtained from Dharmacon. For controls, siRNAs ON-TARGETplus non-targeting pool from Dharmacon were used. siRNAs were used at 10 nM

final concentration and cells were transfected 24 h - 72 h prior to experiments.

For lentiviral infection, pLenti plasmids expressing the different mutants of STARD3 were co-transfected with three packaging plasmids pLP1, pLP2, and pLP/VSVG (Invitrogen) into 293T cell line for 48 h using X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche). Viral particles supplemented with 10 μ g/ml polybrene were then incubated with HCC1954 cells for 48 h. HCC1954 selection was performed using 0.25 μ g/ml puromycin.

Chemicals treatment

Cells were treated for 2 h at 37°C in medium without serum with 1 mM M β CD (C4555, Sigma) or 500 μ M M β CD/cholesterol (C4951 Sigma) to deplete or load the cells with cholesterol, respectively. To deplete plasma membrane sphingomyelin, cells were treated with 2.5 U of sphingomyelinase from *Staphylococcus aureus* (S8633, Sigma) in medium without serum at 37°C for 2 h.

Immunofluorescence

HCC1954 and NCI-N87 cells were grown to 70 % confluence on glass coverslips. After washing with phosphate-buffered saline (PBS), cells were fixed 10 min at room temperature in 4 % paraformaldehyde in PBS or in a glyoxal solution for Calnexin and VAP-A staining (7.8 % glyoxal (Sigma, 128464), 20 % ethanol, 0.75 % acetic acid, pH 5) and permeabilized for 10 min with 0.1 % Triton X-100 in PBS. After blocking in 1 % bovine serum albumin in PBS, cells were incubated at 4°C overnight with the primary antibodies. Primary antibodies were rabbit anti-STARD3 pABMLN64-Nt-1611 (1:1000), mouse anti-STARD3 3G11 (1:1000), mouse anti-EEA1 (1:1000 ; 610457 BD Biosciences), mouse anti-CD63 H5C6 (1:100 ; DSHB), mouse anti-Lamp1 H4A3 (1:50 ; DSHB), rabbit anti-Rab7L1 (1:1000, Abcam ab199644), goat anti-VAP-A K-15 (1:1000, sc-48698 Santa Cruz biotechnology) and rabbit anti-Calnexin C4731 (1:200, Sigma). Slides were mounted in ProLong Gold (Invitrogen). Observations were made with a confocal microscope (Leica SP8 UV, 63x, NA 1.4).

Colocalization analysis

Colocalization coefficients (Pearson correlation coefficient) were determined using the Coloc2 plugin in Fiji software. The auto-thresholding was performed using the Costes method.

Filipin staining and quantification

Cells were grown on glass coverslips. In order to allow a better visualization of intracellular cholesterol, cells were treated with 10 mM methyl- β -cyclodextrin (M β CD, Sigma) for 30 min at 37°C to remove plasma membrane cholesterol. Cells were then fixed for 10 min at RT with 4 % paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). Cells were incubated with a solution of filipin (0.1 mg/ml,

F-9765 Sigma) for 30 min at RT. After washing and blocking in 1 % bovine serum albumin (BSA) in PBS, cells were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C. After two washes in PBS, cells were incubated for 1 h with Cy3- and Alexa488-conjugated secondary antibodies (Invitrogen Molecular Probes). After two washes in PBS, cells were re-incubated in the filipin solution for 30 min. Finally, after two washes, cells were counterstained with TO-PRO-3 iodide (1 :1000; Invitrogen Molecular Probes) for 5 min. Slides were mounted in Prolong Gold (Invitrogen). Image acquisition was performed with a Leica SP8 UV (63x, NA 1.4) confocal microscope using the photon counting mode; a 355 nm optically pumped semiconductor laser was used to excite filipin. The Fiji software was used to quantify filipin fluorescence intensity. A mask of the CD63 endosomal marker was applied on the filipin staining. Cells were segmented using ROI tool and the filipin staining intensity was measured in each cell.

GFP-D4, GFP-Lysenin and PlyA2-GFP production and staining

Proteins were overexpressed overnight in *E.coli* BL21 (DE3) at 20°C for 16 h upon induction with 0.4 mM (GFP-D4) or 1 mM (PlyA2-GFP) isopropyl- β -thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma) (at an optical density $OD_{600nm} = 0.5$). The cell pellet was lysed and sonicated in 50 ml of lysis buffer (50 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) complemented with EDTA-free cOmplete protease inhibitor (Roche). The lysate was first centrifuged at 3,500 g for 15 min, then at 50,000 g for 45 min, and filtered through a 0.22 μ m membrane. Purification was performed on an AKTA Start chromatography system (GE Healthcare Life Sciences) using HisTrap HP 1 mL columns. Bound proteins were eluted with elution buffer (20 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 , 250 mM imidazole, pH 7.4). Eluted fraction was dialyzed using Amicon Ultra-15 into phosphate buffer (20 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 pH 7.4, EDTA-free cOmplete). Protein concentration was determined by UV-spectroscopy.

For GFP-NT-Lysenin production, the probe was expressed in *E.coli* BL21 (DE3) and was grown at 37°C in LB medium containing 50 μ g/mL kanamycin to an OD of 2.3. Protein expression was induced with 125 μ M IPTG. The culture was continued for 18 hours at 18°C. Bacteria were harvested by centrifugation at 8000 rpm for 5 minutes at 4°C. Harvested bacteria were lysed using BugBuster Master Mix (EMD Millipore) at 4°C for 20 minutes with protease inhibitor with constant shaking. Obtained lysate was clarified by centrifugation at 11000 rpm for 20 minutes at 4°C. For further purification, the obtained supernatant containing His6-GFP-NT-Lysenin was passed through HiTrap TALON crude (GE Healthcare) column. The column was washed with 10 mL Wash buffer (50 mM sodium phosphate buffer, 300 mM NaCl and 10 mM imidazole, pH 7). The bound protein was eluted using 5

mL elution buffer (50 mM sodium phosphate buffer, 300 mM NaCl and 400 mM imidazole, pH 7). The eluted protein was dialyzed for overnight against 1X PBS at 4°C using slide-A-Lyzer Dialysis cassette (10,000 MWC) to remove the imidazole and further purified protein was pooled and concentrated using Amicon Ultra-15 Centrifugal filters (Merck Millipore, regenerated cellulose 10,000 NMWL). The fluorescent proteins were then stored at -20°C after adding glycerol (final concentration 50%).

For confocal acquisitions, cells were grown on glass coverslips, washed with PBS, and incubated in GFP-D4, GFP-lysenin or PlyA2-GFP solution (1:200 in 1x PBS, 1 % BSA) for 30 min at 37°C. After a rapid wash, cells were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS and nuclei were counterstained with Hoechst-33258 dye. Slides were mounted in ProLong Gold (Invitrogen).

For flow cytometry analysis, $5 \cdot 10^5$ cells were plated in a T75 flask 24 h before the experiment. Cells were trypsinized and incubated in a solution of GFP-D4, GFP-lysenin or PlyA2-GFP probe (1:200 in 1 PBS, 1 % BSA) for 30 min at 37°C. Cells were then fixed for 10 min at RT with 4 % paraformaldehyde in PBS, centrifuged, and finally resuspended in PBS before FACS analysis (FACS Celesta BD biosciences). At least 10^4 cells were analyzed in duplicate. Cells were gated (FlowJo) and the mean of fluorescence was measured in this cell population.

Lipids extraction and quantification

One million cells were plated in 150 mm petri dishes 24 h before the experiment. Cells were treated with 10 mM methyl- β -cyclodextrin (M β CD, C4555 Sigma) for 30 min at 37°C for the positive control. Cells were washed three times and scraped in 1 mL of SDS 0.1 % in PBS. Proteins were quantified and the lysate equivalent to 200 μ g of proteins was transferred and the volume was adjusted to 800 μ L with 0.1% SDS. Proteins were mixed with 3 ml of chloroform/methanol (1/2) solution in a screw-cap glass tube. After vortexing, 1 mL of chloroform and 1 mL of water were added. After 5 min of centrifugation at 3000 rpm, the lower phase-containing lipids were transferred in new glass tubes and dried under nitrogen stream. For the lipids quantification, dried lipids were solubilized in EtOH 95% solution. Cholesterol quantification was performed with the AmplexRed cholesterol assay (A12216 Invitrogen) and phospholipids quantification was performed with LabAssay phospholipid (296-63801 Wako Chemicals) according to the manufacturer's instructions.

Viability assay

After 24 hours of siRNAs transfection, cells were counted, seeded in 96-well plates in triplicate (1000-5000 cells/well) and allowed to grow for further 3 days. Cell viability was assessed using an MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-ditetrazolium bromide, M-2128 Sigma). In each well, 100 μ L of MTT (1 mg/ml in PBS)

were added and the plates were incubated at 37°C for 1 h in the dark. After careful aspiration of the culture medium, 100 µL of dimethylsulfoxide (DMSO) were added to each well and the plates were incubated for a further 30 min under shaking. Absorbance was measured at 590 nm using a plate reader.

Clonogenicity assay

After 24 h of siRNAs transfection, the different cell lines were trypsinized and plated at a low density (500-2000 cells/petri dish culture 10 cm). The cells were cultivated for 7-20 days and the medium was refreshed every four days. The colonies were fixed with ethanol for 20 minutes and stained with crystal violet for 20 minutes (0.1% in H₂O) (C-0775 Sigma). The number of colonies was counted for each condition using Icy software.

Anchorage-independent growth

Onto a culture plate, it was poured 0.6 % UltraPure Low Melting Point Agarose (Invitrogen) in the appropriate medium. On the top of this layer, a gel containing 5×10³ MDA-MB-231 cells or 20×10³ NCI-N87 cells in 0.3% UltraPure LMP Agarose in appropriate cell medium was added. After 15 days for MDA-MB-231 or 30 days for NCI-N87, colonies were stained with MTT (1 mg/ml) and counted using Icy software.

SDS-PAGE and Western blot analysis

SDS-PAGE and Western blot analysis were performed as previously described (Alpy et al, 2005) using the following antibodies: STARD3: 3G11; pAbMLN64-Nt-1611 (Alpy et al, 2001); VAP-A: 4C12 sc-293278 (Santa Cruz biotechnology); actin: ACT-2D7 (Euromedex); α-tubulin: B-5-1-2 sc-23948 (Santa Cruz biotechnology); HER2: CB11 ab8054 (Abcam); phospho HER2: Tyr1248 #2247 (Cell Signaling); EGFR: 6F1 sc-57092 (San Cruz biotechnology); phospho EGFR: Tyr1173 53A3 #4407 (Cell Signaling); HER3: C-17 sc-295 (Santa Cruz biotechnology); phospho HER3: Tyr1289 21D3 #4791 (Cell Signaling); Akt : #9272 (Cell Signaling); phospho Akt: Ser473 #4060 (Cell Signaling); ERK: K-23 sc-94 (Santa Cruz biotechnology); phospho ERK: Tyr202/Tyr204 D13.14.4E #4370 (Cell Signaling); mTOR: 7C10 #2980 (Cell Signaling); phospho mTOR: Ser2448 D9C2 #5536 (Cell Signaling); c-Met: 25H2 #3127 (Cell Signaling); phospho c-Met: Tyr1234/1235 D26 #3077 (Cell Signaling); Caveolin-1: 7C8 sc-53564 (Santa Cruz biotechnology).

Proximity ligation assay

Cells were transfected with siRNAs in 6-well plates. After 48h of siRNAs transfection, cells were plated on glass coverslips and allowed to grow for further 24 h. Cells were fixed 10 min at room temperature in 4 % paraformaldehyde in PBS and permeabilized for 10 min

with 0.1 % Triton X-100 in PBS. After blocking in 1 % BSA in PBS, cells were incubated at 4°C overnight with the primary antibodies. The following antibodies were used: mouse anti-HER2 CB11 ab8054 1:1000; rabbit anti-HER2 DAKO 1:1000 ; mouse anti-EGFR 6F1 sc-57092 1:100; rabbit anti-HER3 C-17 sc-295 1:100. PLA was carried out using DuoLink® in situ detection reagents green kit (Sigma) according to manufacturer's instructions. PLA plus and minus probes (Duolink® in situ PLA probe anti-mouse minus and anti-rabbit plus, Sigma) (containing the secondary antibodies conjugated with oligonucleotides) were added and incubated at 37°C for 1 h. The ligase solution was incubated for 30 min at 37°C. The DNA was then amplified (rolling circle amplification) using a polymerase solution incubated for 100 min at 37°C resulting in green fluorescence signals. Finally, cells were counterstained with Hoescht-33258. The slides were mounted with ProLong Gold (Invitrogen). Observations were made with a confocal microscope (Leica SP8 UV, 63x, NA 1.4) and PLA dots were quantified using Icy software.

Protein array

Human phospho-RTK array kit and human phospho-MAPK array kit (Proteome Profiler™ Antibody arrays) were obtained from R&D Systems and used according to the manufacturer's instructions.

Acknowledgments

We thank the members of the Molecular and Cellular Biology of Breast Cancer team (IGBMC) for helpful advice and discussions. We thank the IGBMC cell culture facility (Betty Heller), imaging center (Bertrand Vernay, Elvire Guiot and Erwan Grandgirard) and polyclonal and monoclonal antibody facility (Mustapha Oulad-Abdelghani) for their excellent technical assistance.

L.V. received an allocation from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France; <http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/>). This work was supported by grants from the Institut National Du Cancer INCA (INCA_9269; www.e-cancer.fr), the Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est ; <https://www.ligue-cancer.net>) and SEVE Sein et Vie. We also acknowledge funds from the Institut National de Santé et de Recherche Médicale (<http://www.inserm.fr/>), the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université de Strasbourg (<http://www.unistra.fr>) and the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

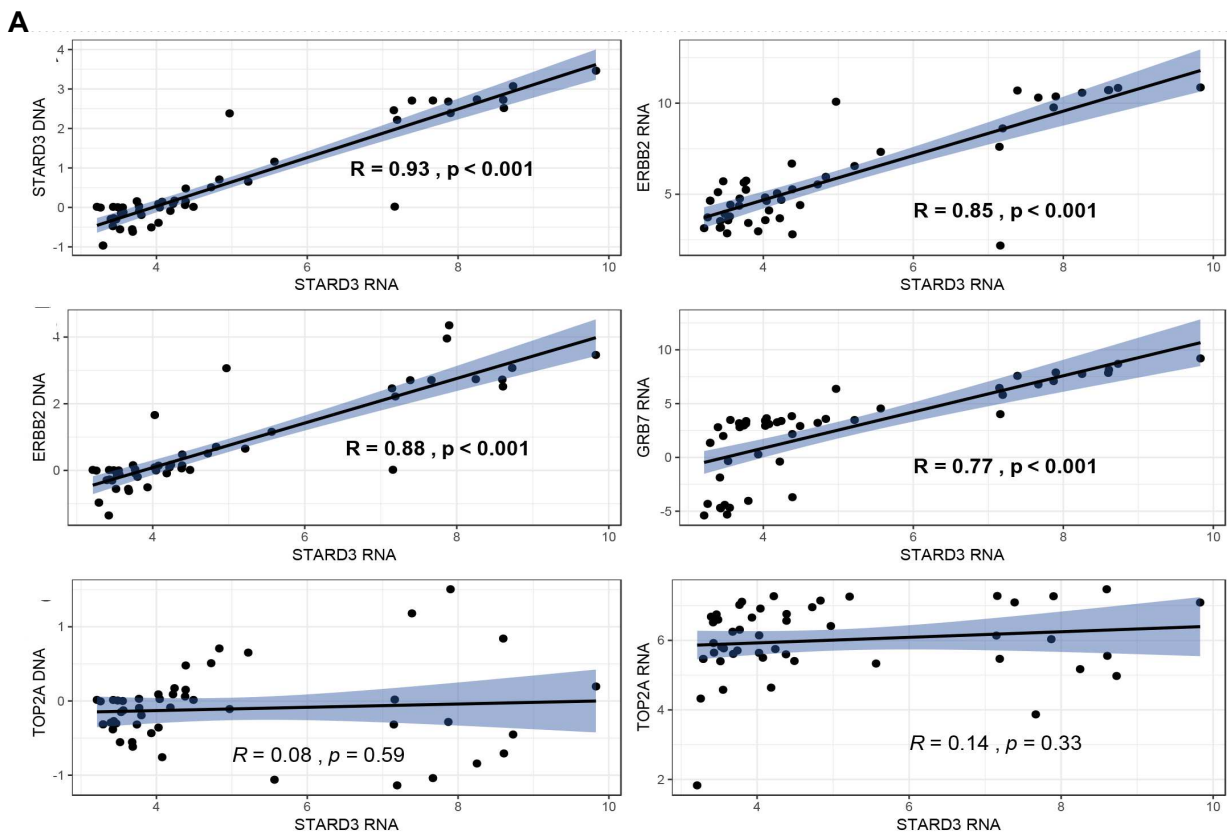
Bibliography

- Alpy, F., and Tomasetto, C. (2014). START ships lipids across interorganelle space. *Biochimie* 96, 85–95.
- Alpy, F., Stoeckel, M.E., Dierich, A., Escola, J.M., Wendling, C., Chenard, M.P., Vanier, M.T., Gruenberg, J., Tomasetto, C., and Rio, M.C. (2001). The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *J. Biol. Chem.* 276, 4261–4269.
- Alpy, F., Latchumanan, V.K., Kedinger, V., Janoshazi, A., Thiele, C., Wendling, C., Rio, M.-C., and Tomasetto, C. (2005). Functional characterization of the MENTAL domain. *J. Biol. Chem.* 280, 17945–17952.
- Alpy, F., Rousseau, A., Schwab, Y., Legueux, F., Stoll, I., Wendling, C., Spiegelhalter, C., Kessler, P., Mathelin, C., Rio, M.-C., et al. (2013). STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *J. Cell Sci.* 126, 5500–5512.
- Andrechek, E.R., Hardy, W.R., Siegel, P.M., Rudnicki, M.A., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (2000). Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3444–3449.
- Bai, T., and Luoh, S.-W. (2008). GRB-7 facilitates HER-2/Neu-mediated signal transduction and tumor formation. *Carcinogenesis* 29, 473–479.
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehár, J., Kryukov, G.V., Sonkin, D., et al. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603–607.
- Bhat, H.B., Kishimoto, T., Abe, M., Makino, A., Inaba, T., Murate, M., Dohmae, N., Kurahashi, A., Nishibori, K., Fujimori, F., et al. (2013). Binding of a pleurotolysin ortholog from *Pleurotus eryngii* to sphingomyelin and cholesterol-rich membrane domains. *J. Lipid Res.* 54, 2933–2943.
- Bièche, I., Tomasetto, C., Régnier, C.H., Moog-Lutz, C., Rio, M.C., and Lidereau, R. (1996). Two distinct amplified regions at 17q11-q21 involved in human primary breast cancer. *Cancer Res.* 56, 3886–3890.
- Bozulis, L., Surucu, B., Hynx, D., and Hemmings, B.A. (2008). PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol. Cell* 30, 203–213.
- Chen, H., Qin, S., Wang, M., Zhang, T., and Zhang, S. (2015). Association between cholesterol intake and pancreatic cancer risk: evidence from a meta-analysis. *Sci. Rep.* 5, 8243.
- Chmielecki, J., Ross, J.S., Wang, K., Frampton, G.M., Palmer, G.A., Ali, S.M., Palma, N., Morosini, D., Miller, V.A., Yelensky, R., et al. (2015). Oncogenic alterations in ERBB2/HER2 represent potential therapeutic targets across tumors from diverse anatomic sites of origin. *The Oncologist* 20, 7–12.
- Citri, A., and Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 505–516.
- Faes, S., and Dormond, O. (2015). PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 21138–21152.
- Fiddes, R.J., Campbell, D.H., Janes, P.W., Sivertsen, S.P., Sasaki, H., Wallasch, C., and Daly, R.J. (1998). Analysis of Grb7 Recruitment by Heregulin-activated erbB Receptors Reveals a Novel Target Selectivity for erbB3. *J. Biol. Chem.* 273, 7717–7724.
- Garrett, J.T., and Arteaga, C.L. (2011). Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications. *Cancer Biol. Ther.* 11, 793–800.
- Gianni, L., Eiermann, W., Semiglazov, V., Manikhas, A., Lluch, A., Tjulandin, S., Zambetti, M., Vazquez, F., Byakhov, M., Lichinitser, M., et al. (2010). Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet Lond. Engl.* 375, 377–384.
- Glynn, R.W., Miller, N., and Kerin, M.J. (2010). 17q12-21 - the pursuit of targeted therapy in breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 36, 224–229.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., and Hynes, N.E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 16, 1647–1655.
- Guillaumond, F., Bidaut, G., Ouaisi, M., Servais, S., Gouirand, V., Olivares, O., Lac, S., Borge, L., Roques, J., Gayet, O., et al. (2015). Cholesterol uptake disruption, in association with chemotherapy, is a promising combined metabolic therapy for pancreatic adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 2473–2478.
- Hynes, N.E., and MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 177–184.
- Iaea, D.B., Dikiy, I., Kiburu, I., Eliezer, D., and Maxfield, F.R. (2015). STARD4 Membrane Interactions and Sterol Binding. *Biochemistry* 54, 4623–4636.
- Jacot, W., Fiche, M., Zaman, K., Wolfer, A., and Lamy, P.-J. (2013). The HER2 amplicon in breast cancer: Topoisomerase IIA and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* 1836, 146–157.
- Järvinen, T.A.H., Tanner, M., Bärlund, M., Borg, Å., and Isola, J. (1999). Characterization of topoisomerase IIα

- gene amplification and deletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 26, 142–150.
- Jernström, S., Hongisto, V., Leivonen, S.-K., Due, E.U., Tadele, D.S., Edgren, H., Kallioniemi, O., Perälä, M., Mælandsmo, G.M., and Sahlberg, K.K. (2017). Drug-screening and genomic analyses of HER2-positive breast cancer cell lines reveal predictors for treatment response. *Breast Cancer Dove Med. Press* 9, 185–198.
- 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 Cancer* 45, 761–769.
- Kauraniemi, P., and Kallioniemi, A. (2006). Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 13, 39–49.
- Kauraniemi, P., Bärlund, M., Monni, O., and Kallioniemi, A. (2001). New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays. *Cancer Res.* 61, 8235–8240.
- Latta, E.K., Tjan, S., Parkes, R.K., and O'Malley, F.P. (2002). The Role of HER2/neu Overexpression/Amplification in the Progression of Ductal Carcinoma In Situ to Invasive Carcinoma of the Breast. *Mod. Pathol.* 15, 1318–1325.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261–1274.
- Mattia, T.D., Wilhelm, L.P., Ikhlef, S., Wendling, C., Spehner, D., Nominé, Y., Giordano, F., Mathelin, C., Drin, G., Tomasetto, C., et al. (2018). Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO Rep.* e45453.
- Moasser, M.M. (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26, 6469–6487.
- Mollinedo, F., and Gajate, C. (2020). Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy. *J. Lipid Res.* jlr.TR119000439.
- Nadler, Y., González, A.M., Camp, R.L., Rimm, D.L., Kluger, H.M., and Kluger, Y. (2010). Growth factor receptor-bound protein-7 (Grb7) as a prognostic marker and therapeutic target in breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 21, 466–473.
- Nelson, E.R., Chang, C., and McDonnell, D.P. (2014). Cholesterol and Breast Cancer Pathophysiology. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 25, 649–655.
- Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Waheed, A.A., Hayashi, M., Inomata, M., Nakamura, M., Maruya, M., and Iwashita, S. (2004). Perfringolysin O, a cholesterol-binding cytolysin, as a probe for lipid rafts. *Anaerobe* 10, 125–134.
- Ou, Y.-H., Torres, M., Ram, R., Formstecher, E., Roland, C., Cheng, T., Brekken, R., Wurz, R., Tasker, A., Polverino, T., et al. (2011). TBK1 Directly Engages Akt/PKB Survival Signaling to Support Oncogenic Transformation. *Mol. Cell* 41, 458–470.
- Peretti, D., Kim, S., Tufi, R., and Lev, S. (2019). Lipid Transfer Proteins and Membrane Contact Sites in Human Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 371.
- Petan, T., Jarc, E., and Jusović, M. (2018). Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World. *Mol. Basel Switz.* 23.
- Piccart-Gebhart, M.J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., et al. (2005). Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 1659–1672.
- Pohlmann, P.R., Mayer, I.A., and Mernaugh, R. (2009). Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 7479–7491.
- van Ramshorst, M.S., van der Voort, A., van Werkhoven, E.D., Mandjes, I.A., Kemper, I., Dezentjé, V.O., Oving, I.M., Honkoop, A.H., Tick, L.W., van de Wouw, A.J., et al. (2018). Neoadjuvant chemotherapy with or without anthracyclines in the presence of dual HER2 blockade for HER2-positive breast cancer (TRAIN-2): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 19, 1630–1640.
- Robert, N., Leyland-Jones, B., Asmar, L., Belt, R., Illegbodu, D., Loesch, D., Raju, R., Valentine, E., Sayre, R., Cobleigh, M., et al. (2006). Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin compared with trastuzumab and paclitaxel in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 2786–2792.
- Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Davidson, N.E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P.A., et al. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 1673–1684.
- Sahlberg, K.K., Hongisto, V., Edgren, H., Mäkelä, R., Hellström, K., Due, E.U., Moen Vollan, H.K., Sahlberg, N., Wolf, M., Børresen-Dale, A.-L., et al. (2013). The HER2 amplicon includes several genes required for the growth and survival of HER2 positive breast cancer cells. *Mol. Oncol.* 7, 392–401.
- Schade, B., Lesurf, R., Sanguin-Gendreau, V., Bui, T., Deblois, G., O'Toole, S.A., Millar, E.K.A., Zardawi, S.J., Lopez-Knowles, E., Sutherland, R.L., et al. (2013). β -Catenin signaling is a critical event in ErbB2-mediated mammary tumor progression. *Cancer Res.* 73, 4474–4487.
- Shogomori, H., and Kobayashi, T. (2008). Lysenin: a sphingomyelin specific pore-forming toxin. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 612–618.

- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177–182.
- Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.-J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.-G., et al. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat. Methods* 3, 995–1000.
- Spears, M., Taylor, K.J., Munro, A.F., Cunningham, C.A., Mallon, E.A., Twelves, C.J., Cameron, D.A., Thomas, J., and Bartlett, J.M.S. (2012). In situ detection of HER2:HER2 and HER2:HER3 protein-protein interactions demonstrates prognostic significance in early breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 132, 463–470.
- Stein, D., Wu, J., Fuqua, S.A., Roonprapunt, C., Yajnik, V., D'Eustachio, P., Moskow, J.J., Buchberg, A.M., Osborne, C.K., and Margolis, B. (1994). The SH2 domain protein GRB-7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER2 in breast cancer. *EMBO J.* 13, 1331–1340.
- 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.
- Tosi, M.R., and Tugnoli, V. (2005). Cholesteryl esters in malignancy. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 359, 27–45.
- Tzahar, E., Pinkas-Kramarski, R., Moyer, J.D., Klapper, L.N., Alroy, I., Levkowitz, G., Shelly, M., Henis, S., Eisenstein, M., Ratzkin, B.J., et al. (1997). Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J.* 16, 4938–4950.
- Ursini-Siegel, J., Schade, B., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (2007). Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 389–397.
- Vanden Bempt, I., Drijkoningen, M., and De Wolf-Peeters, C. (2007). The complexity of genotypic alterations underlying HER2-positive breast cancer: an explanation for its clinical heterogeneity. *Curr. Opin. Oncol.* 19, 552–557.
- Vasseur, S., and Guillaumond, F. (2015). LDL Receptor: An open route to feed pancreatic tumor cells. *Mol. Cell. Oncol.* 3.
- Vincent-Salomon, A., Lucchesi, C., Gruel, N., Raynal, V., Pierron, G., Goudefroye, R., Reyat, F., Radvanyi, F., Salmon, R., Thiery, J.-P., et al. (2008). Integrated genomic and transcriptomic analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 1956–1965.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546–1558.
- Voilquin, L., Lodi, M., Di Mattia, T., Chenard, M.-P., Mathelin, C., Alpy, F., and Tomasetto, C. (2019). STARD3: A Swiss Army Knife for Intracellular Cholesterol Transport. *Contact* 2, 251525641985673.
- Wilhelm, L.P., Wendling, C., Védie, B., Kobayashi, T., Chenard, M.-P., Tomasetto, C., Drin, G., and Alpy, F. (2017). STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *EMBO J.* 36, 1412–1433.
- Wilhelm, L.P., Voilquin, L., Kobayashi, T., Tomasetto, C., and Alpy, F. (2019). Intracellular and Plasma Membrane Cholesterol Labeling and Quantification Using Filipin and GFP-D4. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1949, 137–152.
- Yarar, D., Lahdenranta, J., Kubasek, W., Nielsen, U.B., and MacBeath, G. (2015). Heregulin–ErbB3-Driven Tumor Growth Persists in PI3 Kinase Mutant Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* 14, 2072–2080.
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137.

Figure 1



B

	STARD3 DNA	STARD3 RNA	ERBB2 DNA	ERBB2 RNA	GRB7 DNA	GRB7 RNA	TOP2A DNA	TOP2A RNA
STARD3 DNA	-							
STARD3 RNA	0.93***	-						
ERBB2 DNA	0.95***	0.88***	-					
ERBB2 RNA	0.92***	0.85***	0.88***	-				
GRB7 DNA	1***	0.91***	0.95***	0.92***	-			
GRB7 RNA	0.71***	0.77***	0.71***	0.82***	0.71***	-		
TOP2A DNA	0.08	0.08	0.14	0.07	0.08	0.03	-	
TOP2A RNA	0.06	0.14	0.09	0.07	0.06	0.23	0.47***	-

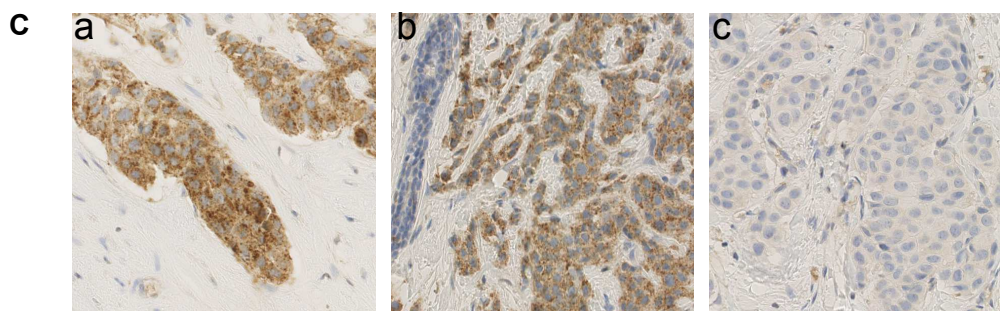


Figure 1. STARD3 and HER2 expression are correlated in breast cancers.

A. Pearson coefficient and regression line showing the correlation between STARD3 DNA, ERBB2 RNA, ERBB2 DNA, GRB7 RNA, TOP2A DNA, TOP2A RNA and STARD3 RNA. RNA and DNA data were obtained from the Cancer Cell Line Encyclopedia database.

B. Pearson correlation coefficient (r) matrix and its significance (***) = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$) between STARD3, HER2 (ERBB2), GRB7, TOP2A DNA and RNA. STARD3 is correlated with ERBB2 and GRB7 but not with TOP2A.

C. Immunohistochemistry on three different HER2-amplified breast tumor sections (Score 3+) using anti-STARD3 3G11 antibody. The subpanels (a) and (b) show STARD3 positive tumors whereas subpanel (c) is STARD3 negative.

Figure S1

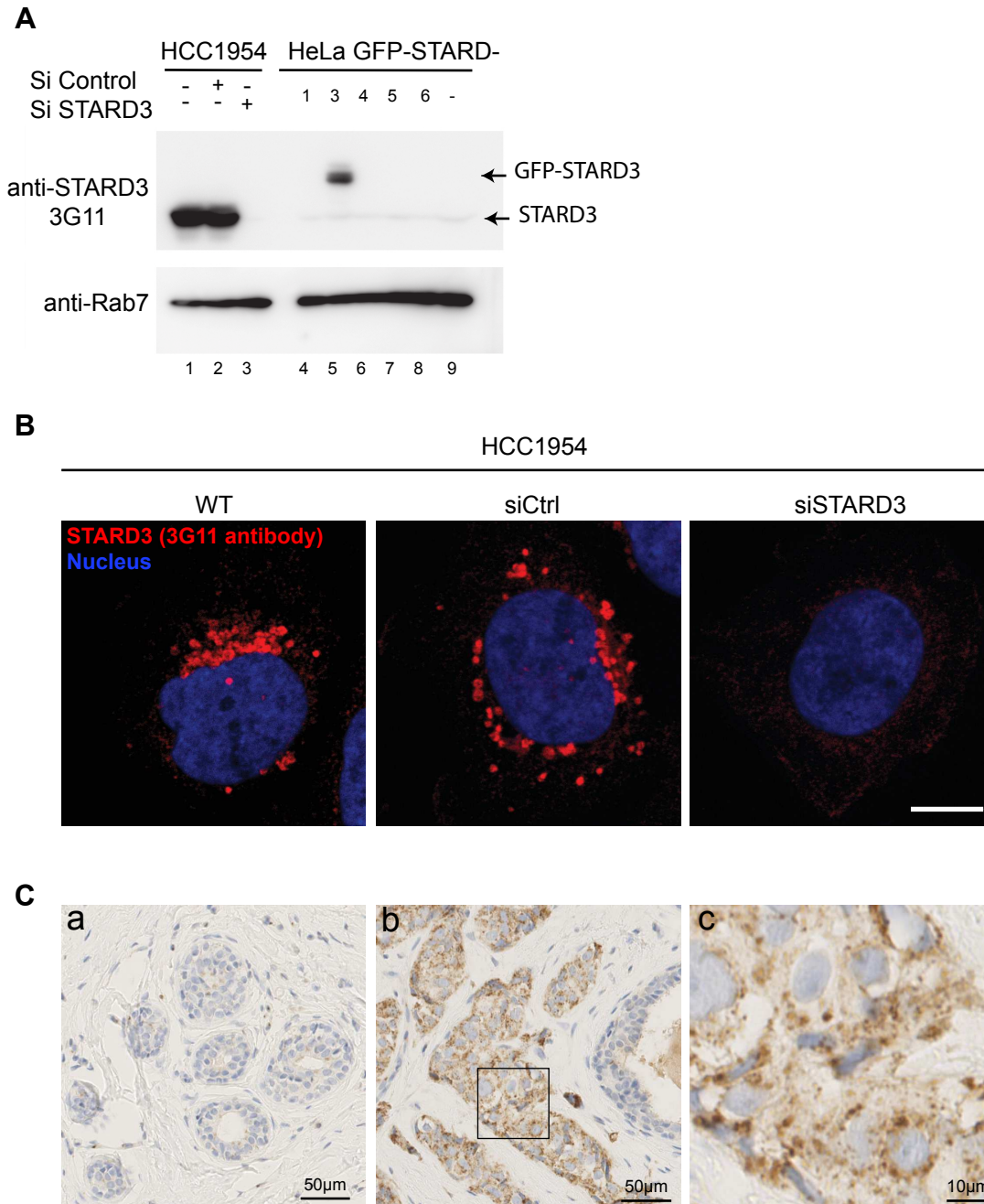


Figure S1. The 3G11 antibody is specific for STARD3.

A. Western blot analysis of HCC1954 cells (wt, siCtrl or siSTARD3) and in HeLa cells transiently expressing STARD1, STARD3, STARD4, STARD5 and STARD6 fused to GFP (GFP-STARD) using anti-STARD3 3G11 antibody. Anti-Rab7 antibody was used as a loading control.

B. HCC1954 cells (WT) and HCC1954 cells transfected with a control siRNA (siCtrl), and with siRNA targeting STARD3 (siSTARD3) were labeled with the anti-STARD3 3G11 antibody (red). Nuclei are stained in blue. Scale bar: 10 µm

C. Immunohistochemistry on HER2- (a) and on HER2+ (b) breast tumor sections using anti-STARD3 3G11 antibody. The subpanel (c) is a higher magnification image (4.5×) of the area outlined in black in (b).

Table S1

Cell line	STARD3 DNA	STARD3 RNA	ERBB2 DNA	ERBB2 RNA	GRB7 DNA	GRB7 RNA	TOP2A DNA	TOP2A RNA
HCC2157_BREAST	0.1564	3.74063845437235	0.1564	5.63829493052793	0.1564	2.96930694015867	-0.3172	5.70830257216067
HS739T_BREAST	-0.0051	3.25807672387796	-0.0051	3.73013280363337	-0.0051	-4.31975230706319	-0.0051	4.3255995827299
HCC38_BREAST	0.7078	4.83359688879628	0.7078	5.9548827461824	0.7078	3.58027605188479	0.7078	7.14424264372184
DU4475_BREAST	0.019	7.1598527096141	0.019	2.18445770149488	0.019	4.02041641170907	0.019	7.2771277426148
MDAMB175VII_BREAST	0.0605	4.37996779284518	0.0605	6.68207346026197	0.0605	3.83357063936939	0.0605	5.59797955459457
YMB1_BREAST	-0.1421		-0.1421		-0.1421		-0.1421	
T47D_BREAST	0.5089	4.72530446715759	0.5089	5.54019935614196	0.5089	3.21078844862327	0.5089	6.95375152798261
HS742T_BREAST	0.0148	3.2110150521835	0.0148	3.13704913657676	0.0148	-5.39582697933276	0.0148	1.82886689518906
KPL1_BREAST	-0.6172	3.68569124041783	-0.6172	4.76386974251808	-0.6172	2.80704030691793	-0.6172	5.60956236391112
MDAMB231_BREAST	0.0894	4.21969512986467	0.0894	3.68157321832868	0.0894	-0.388193728164394	0.0894	7.27015072345395
HCC2218_BREAST	2.7086	7.66630484868248	2.7086	10.3054489294019	2.7086	6.7814142466291	-1.0392	3.87039341247196
HCC1954_BREAST	3.4633	9.8289510304321	3.4633	10.8645630695722	3.4633	9.2044248757925	0.1955	7.08915448210724
CAMA1_BREAST	0.1513	4.38695563351516	0.1513	5.26993721498624	0.1513	2.16993050487664	0.1513	6.56366330194949
HMC18_BREAST	0.4785	4.38825737984208	0.4785	2.80062939135374	0.4785	-3.69812777076163	0.4785	6.7590887625639
AU565_BREAST	2.7059	7.38804094174984	2.7059	10.6940484654529	2.7059	7.5787128929942	1.1804	7.09138873492062
HS578T_BREAST	-0.2712	3.43313713721291	-0.2712	3.18307938383293	-0.2712	-4.73745505381874	-0.2712	5.64634610977208
BT20_BREAST	-0.2918	3.39505867715947	-0.2918	5.11392335112202	-0.2918	2.80711756647533	-0.2918	6.68093528156465
MDAMB361_BREAST	2.2175	7.19202952822555	2.2175	8.61560146354524	2.2175	5.81121993948943	-1.1373	5.46878672132309
MDAMB436_BREAST	-0.555	3.51725548172696	-0.555	2.85581347749338	-0.555	-5.30999595215064	-0.555	5.39903157083463
HCC1143_BREAST	0.1433	4.07595941469333	0.1433	4.11091830262162	0.1433	3.09781289262447	-0.7577	5.5006732949005
HCC1937_BREAST	-0.0018	4.04331520761467	-0.0018	4.63438799130223	-0.0018	3.6424316354395	0.0262	6.91493151789707
HCC1569_BREAST	2.3818	4.97004417169738	3.065	10.0785935405511	3.065	6.37328933572826	-0.1087	6.41174255050665
HCC1395_BREAST	-0.5071	3.93189602393376	-0.5071	2.96718693698403	-0.434	0.282921420263094	-0.434	6.65591477358628
HCC1187_BREAST	-0.3027	3.4654830800928	-0.3027	5.71072100299536	-0.3027	1.99166949086345	-0.3027	6.74667648105317
ZR751_BREAST	-0.0934	3.77062175487836	-0.0934	5.74732125025357	-0.0934	3.37686925989682	-0.0934	6.30642527090342
HCC70_BREAST	-0.5539	3.67819263188211	-0.5539	4.36845410706142	-0.5539	3.17902401647112	-0.5539	6.24890693891603
MCF7_BREAST	-0.9661	3.29188648783331	-0.9661	4.6458804769145	-0.9661	1.35363441226023	-0.3149	5.46644345110357
MCF7_BREAST	-0.9661	3.29188648783331	-0.9661	4.6458804769145	-0.9661	1.35363441226023	-0.3149	5.46644345110357
MDAMB157_BREAST	-0.1929	3.80000100365021	-0.1929	3.42395209518789	-0.1929	-4.0374539635549	-0.1929	7.11015845301091
EFM192A_BREAST	2.7249	8.59930131959605	2.7249	10.7140980178049	2.7249	7.85504172541497	0.8409	7.46975545230188
EVSA1_BREAST	0.1365		0.1365		0.1365		0.6773	
MDAMB453_BREAST	1.1586	5.56520994911134	1.1586	7.32570072243021	1.1586	4.54636968309572	-1.0613	5.33303384278408
EFM19_BREAST	0.6518	5.2169477048811	0.6518	6.54989580461561	0.6518	3.47788101968784	0.6518	7.25859493005535
BT474_BREAST	2.6813	7.87067955753244	3.956	9.7643424545196	2.8149	7.09369528404834	-0.2824	6.03378777919526
HS606T_BREAST	-0.0002	3.55221468031118	-0.0002	3.78199487134591	-0.0002	-4.67899829465597	-0.0002	4.57808920550719
MDAMB415_BREAST	-0.0879	4.18439882854458	-0.0879	5.05475880978133	-0.0879	3.2657426528061	-0.0879	4.63988792675961
MDAMB468_BREAST	-0.3901	4.02676268270358	1.6605	3.57698652531407	-0.358	2.93823121592141	-0.358	6.1436466545837
BT549_BREAST	-0.4759	3.42163431011318	-1.351	3.1576655024163	-0.3831	-1.86834223664296	-0.3831	6.51711956957627
CAL851_BREAST	0.1725	4.23951418615034	0.1725	4.69243001536711	0.1725	3.38726770217246	0.1725	5.75039265194264
HMEL_BREAST	0.0144	4.49089885037763	0.0144	4.405345092458	0.0144	2.91820167160757	0.0144	5.40640770612766
HCC1806_BREAST	-0.1256	3.56085034219227	-0.1256	4.42364965757414	-0.1256	3.48372329183038	-0.1256	5.76913363430976
UACC812_BREAST	2.3893	7.89966927731364	4.3523	10.3662170779417	2.3946	7.89569638197368	1.5054	7.26917620038326
UACC893_BREAST	3.0726	8.72958050107719	3.0726	10.8356523179996	3.0726	8.69945701862981	-0.4519	4.97521395428991
HDQP1_BREAST	0.0894	4.02531650672027	0.0894	4.82636402524222	0.0894	3.41077700869197	0.0894	5.64156813530351
HCC1419_BREAST	2.5161	8.60776205788882	2.5161	10.7187986369465	2.5161	8.14951797197079	-0.7071	5.5550496623068
HS274T_BREAST	0.0059	3.48620407761891	0.0059	3.92191301338029	0.0059	-4.40964001538879	0.0059	6.59511654084131
ZR7530_BREAST	2.7367	8.25017001655364	2.7367	10.5732000246994	2.7367	7.75750446121823	-0.8426	5.17238004661442
HS343T_BREAST	0.0135	3.42626257891994	0.0135	3.5280036895078	0.0135	-4.68550249706072	0.0135	5.92231653786233
CAL51_BREAST	0.0298	3.76819422084561	0.0298	5.24723246371957	0.0298	3.14499906610743	0.0298	7.0210275675462
CAL120_BREAST	-0.1496	3.53044420208868	-0.1496	3.56941005015947	-0.1496	-0.338644954942298	-0.1496	5.81415762664775
JIMT1_BREAST	2.4607	7.14801194873919	2.4607	7.60529616186604	2.4607	6.45840260788093	-0.317	6.1381380314502

Table S1. mRNA expression and DNA copy number for each gene on 51 different breast cancer cell lines. Data were collected from the Cancer Cell Line Encyclopedia website, Broad Institute of MIT & Harvard.

Table S2

		Total n (%)	STARD3 positive n (%)	STARD3 negative n (%)	Difference (p-value, test)
		108 (100)	98 (91)	10 (9)	
Metastatic	M0	90 (83)	80 (74)	10 (9)	0.207, Fisher
	M+	18 (17)	18 (17)	0	
Lymph Node Status	N0	82 (76)	76 (70)	6 (6)	0.249, Fisher
	N+	25 (23)	21 (19)	4 (4)	0.236, Fisher
	ND	1 (1)	1 (1)	0 (0)	> 0.9, Fisher
Histological subtypes	IDC	103 (95)	94 (87)	9 (8)	0.391, Fisher
	others	5 (5)	4 (4)	1 (1)	
Admixed IDC and DCIS	Yes	56 (52)	52 (48)	4 (4)	0.517, Fisher
	No	52 (48)	46 (43)	6 (6)	
Ki67	High ($\geq 30\%$)	82 (76)	75 (69)	7 (6)	0.701, Fisher
	Intermediate (15-29%)	24 (22)	21 (19)	3 (3)	0.689, Fisher
	Low (< 15%)	2 (2)	2 (2)	0 (0)	> 0.9, Fisher
RE	Positive (H- Score > 10)	61 (56)	53 (49)	8 (7)	0.181, Fisher
	Negative (H- Score ≤ 10)	47 (44)	45 (42)	2 (2)	
RP	Positive (H- Score > 10)	46 (43)	43 (40)	3 (3)	0.511, Fisher
	Negative (H- Score ≤ 10)	62 (57)	55 (51)	7 (6)	

Table S2. STARD3 expression and characteristics of the 108 HER2-positive tumors analyzed.

Among the 108 tumors, 98 were STARD3 positive and 10 were negative. No statistical correlations were observed between STARD3 expression and the lymph node status, the histological subtype, the Ki67 score, the estrogen receptor (ER) or progesterone receptor (PR) status of the tumors.

Figure S2

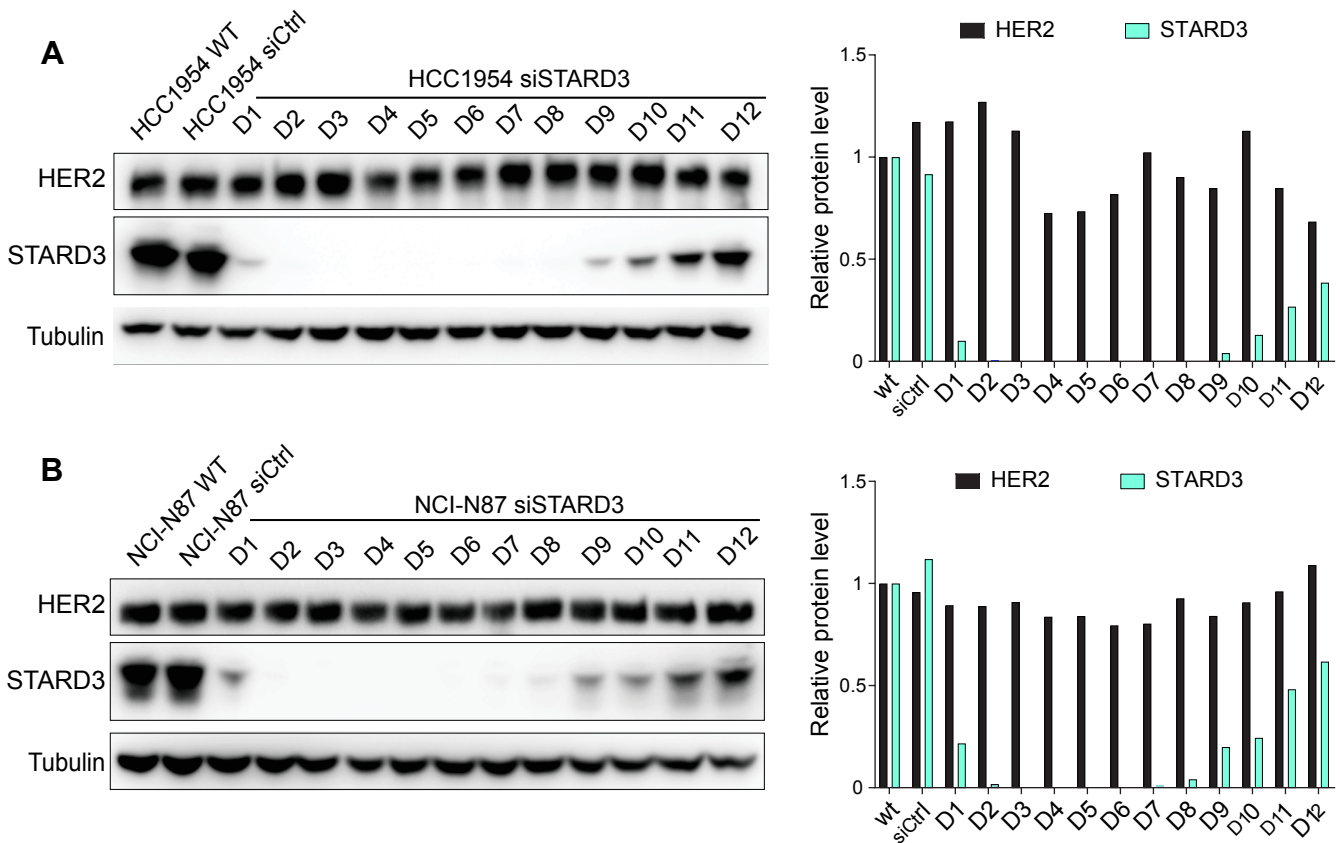
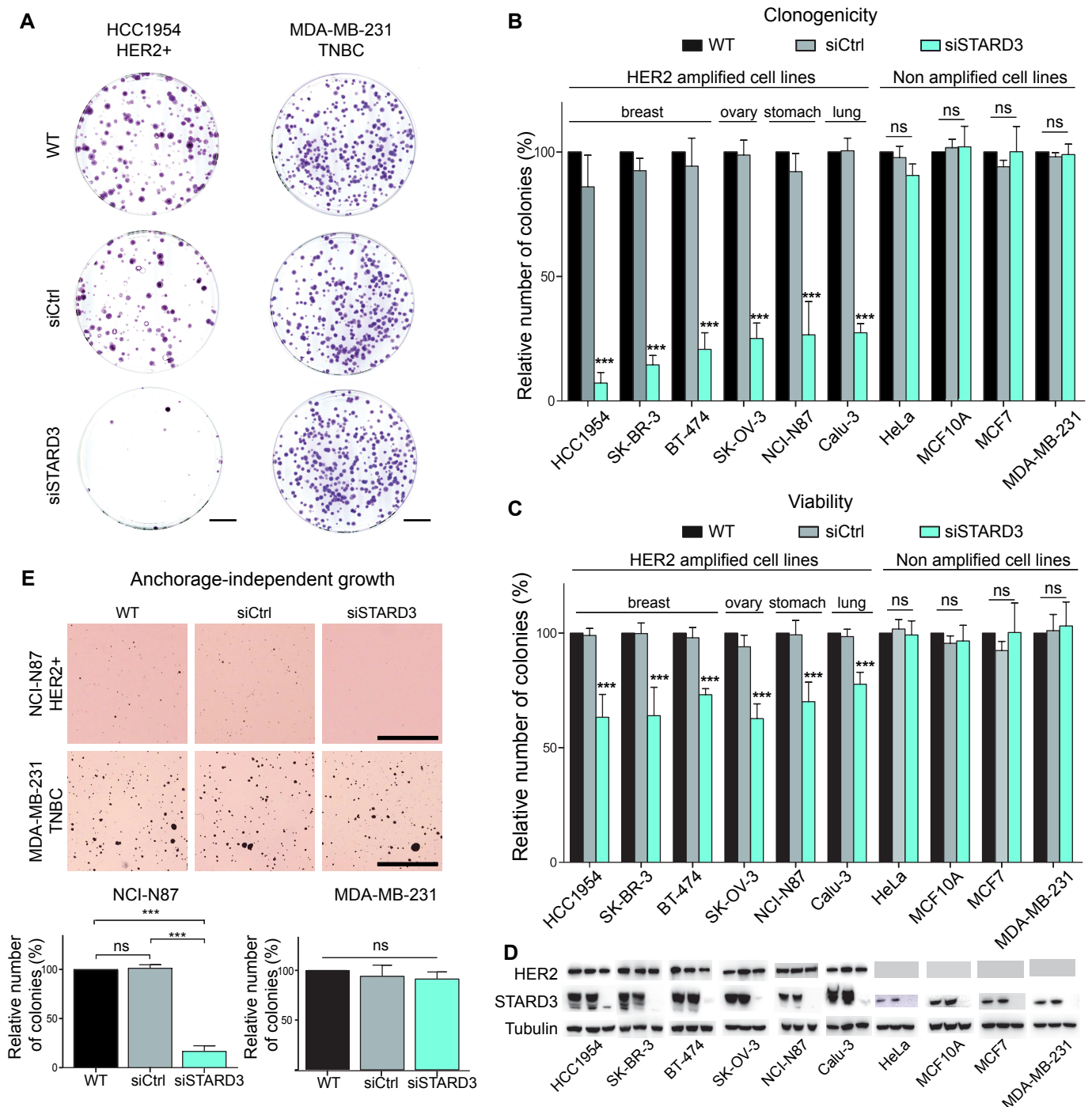


Figure S2. STARD3 is silenced from day 2 to day 8 after siRNA transfection.

Western blot analysis and quantification of STARD3 and HER2 levels in HCC1954 cells (A) and NCI-N87 (B) cells. Cells were transfected with siRNAs targeting STARD3 at Day 0 (D0) and analyzed for 12 days (D1 – D12). Controls correspond to untransfected cells (WT) and cells transfected with a control siRNA (siCtrl; D1). Relative protein levels of STARD3 and HER2 are measured in function of tubulin expression and are normalized to wild type cells.

Figure 2**Figure 2. STARD3 is required specifically for HER2+ cell growth and not for HER2- cells.**

A. Clonogenicity assay of HER2+ (HCC1954) and HER2- (MDA-MB-231) cells untransfected (WT) and transfected with control siRNA (siCtrl) or targeting STARD3 (siSTARD3). After 7 days (MDA-MB-231) or 21 days (HCC1954) of culture, colonies were stained with crystal violet and imaged. Representative images are shown. Scale bars : 25 mm.

B. Quantification of clonogenicity assays performed in HER2-amplified (HCC1954, SK-BR-3, SK-OV-3, NCI-N87, Calu-3) and non-amplified (HeLa, MCF10A, MCF7, MDA-MB-231) cell lines. $n = 3$ independent experiments; mean \pm SD; *** $p < 0.001$, ANOVA with Tukey's multiple comparison test. Statistics are performed between wt, siCtrl and siSTARD3 for each cell line.

C. MTT assay four days after transfection in the same cell lines as in B. $n = 3$ independent experiments; mean \pm SD; *** $p < 0.001$, ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

D. Western blot analysis of STARD3 and HER2 expression in HER2-amplified and non-amplified cell lines used in B and C. Tubulin was used as loading control.

E. Soft agar assays of HER2+ (NCI-N87) and HER2- (MDA-MB-231) cells untransfected (WT) and transfected with control siRNA (siCtrl) or targeting STARD3 (siSTARD3). Colonies were stained with MTT and imaged. Representative images (top) and quantification (bottom) of colonies are shown. $n = 3$ independent experiments; mean \pm SD; *** $p < 0.001$; ANOVA with Tukey's multiple comparison test. Scale bar: 2.5mm (NCI-N87); 5mm (MDA-MB-231).

Figure 3

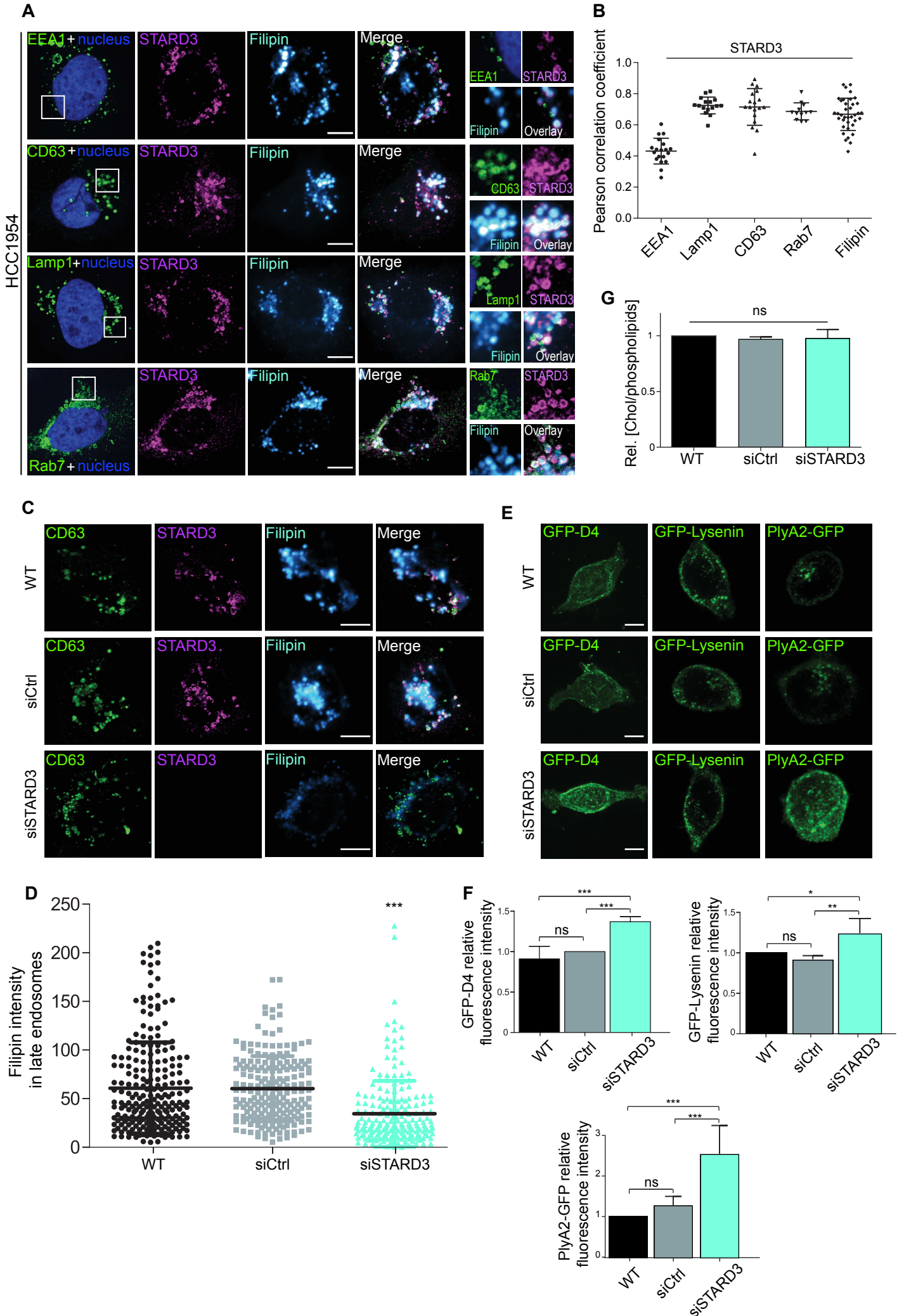


Figure 3. STARD3 modulates cholesterol distribution in HCC1954 cancer cells.

A. HCC1954 cells were co-labeled with anti-STARD3 (magenta), with the fluorescent cholesterol probe filipin (cyan Hot) and with endosomal markers in green: anti-EEA1, anti-CD63, anti-Lamp1 or anti-Rab7 antibodies. Nuclei were stained in blue. Merged images are shown on the right. The subpanels on the right are higher magnification (4.5×) images of the area outlined in white. Scale bars: 10 μm

B. Pearson correlation coefficients between STARD3 and the endocytic markers EEA1, Lamp1, CD63 Rab7, and between STARD3 and filipin are shown; each dot represents one single cell; cells originate from three independent experiments. Horizontal lines show the mean ± SD.

C. Co-staining of CD63, STARD3 and filipin in HCC1954 wt, control and STARD3 knockdown cells. Merged images are shown on the right. Scale bar: 10 μm

D. Filipin quantification in HCC1954 wt, control and STARD3 knockdown cells. Each dot represents one single cell (wt 228 cells; siCtrl 201 cells; siSTARD3 208 cells). Cells originates from four independent experiments. *** $p < 0.001$, ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

E. To mark cholesterol and/or sphingomyelin at the plasma membrane, HCC1954 control and STARD3 knockdown cells were stained with the GFP-D4 probe, the GFP-Lysenin probe and the PlyA2-GFP probe. Scale bar: 10 μm

F. Plasma membrane cholesterol and/or sphingomyelin quantification in HCC1954 wt, control and STARD3 knockdown cells using fluorescent probes by flow cytometry. * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

G. Total free cholesterol quantification after total lipid extraction in control cells and STARD3 knockdown cells (n=3 independent experiments). Mean ± SD.

Figure S3

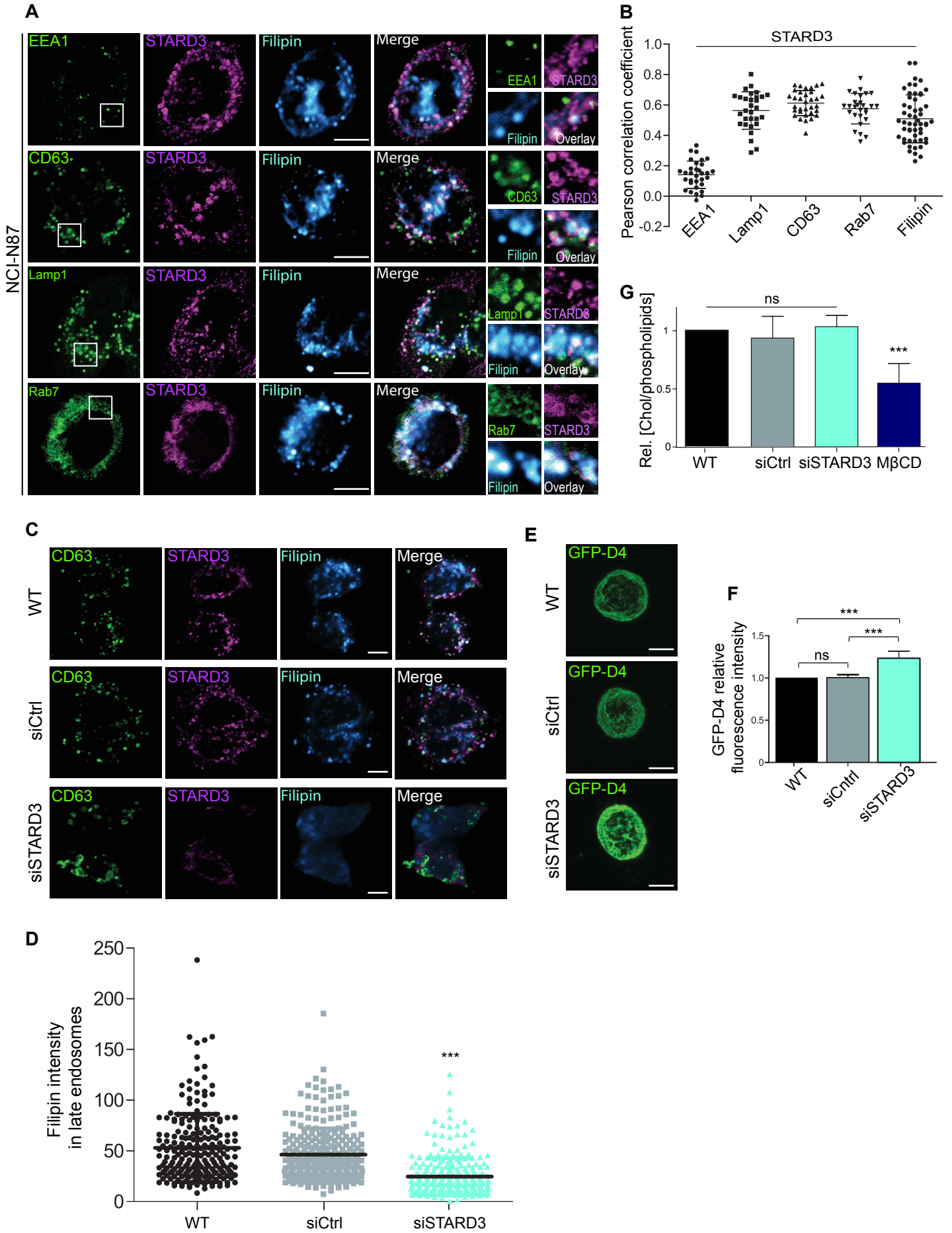


Figure S3. STARD3 modulates cholesterol distribution in NCI-N87 cancer cells.

A. NCI-N87 cells were co-labeled with anti-STARD3 (magenta), with the fluorescent cholesterol probe filipin (cyan Hot) and with endosomal markers in green: anti-EEA1, anti-CD63, anti-Lamp1 or anti-Rab7 antibodies. Nuclei were stained in blue. Merged images are shown at right. The subpanels on the right are higher magnification (5×) images of the area outlined in white. Scale bars: 10 μm

B. Pearson correlation coefficients between STARD3 and the endocytic markers EEA1, Lamp1, CD63 Rab7, and between STARD3 and filipin are shown; each dot represents one single cell; cells originate from three independent experiments. The horizontal lines show the mean ± SD.

C. Co-staining of CD63, STARD3 and filipin in NCI-N87 wt, control and STARD3 knockdown cells. Merged images are shown at right. Scale bar: 10 μm

D. Filipin quantification in NCI-N87 wt, control and STARD3 knockdown cells. Each dot represents one single cell (wt 218 cells; siCtrl 273 cells; siSTARD3 261 cells). Cells originates from four independent experiments. *** $p < 0.001$, ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

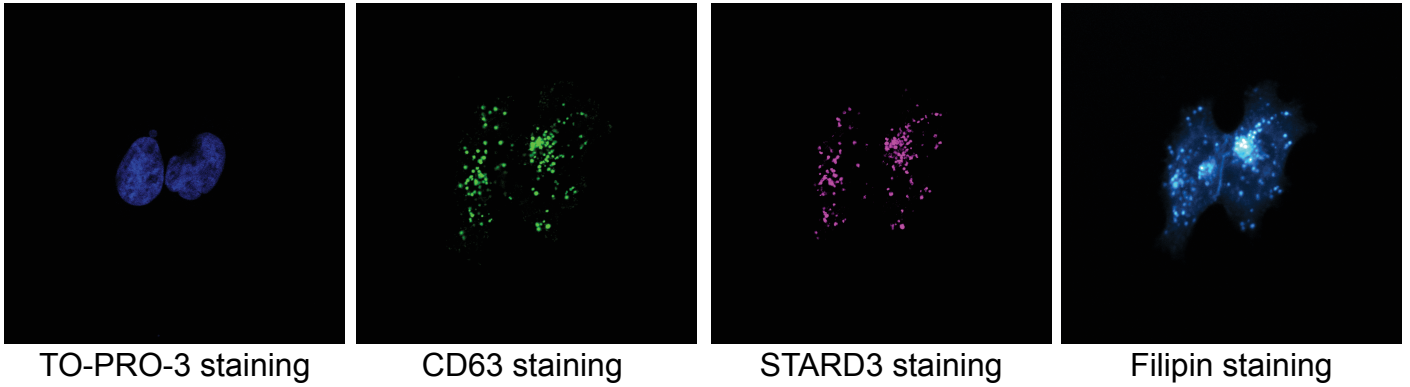
E. To mark cholesterol at the plasma membrane, NCI-N87 control and STARD3 knockdown cells were stained with the GFP-D4 probe. Scale bar: 10 μm

F. Plasma membrane cholesterol quantification in NCI-N87 wt, control and STARD3 knockdown cells using the GFP-D4 probe by flow cytometry. *** $p < 0.001$, ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

G. Total free cholesterol quantification after total lipid extraction in control cells and STARD3 knockdown cells (n=3 independent experiments). Please note that NCI-N87 cells treated with Mβ CD have a significant depletion of total cholesterol. Mean ± SD.

Figure S4

A. Confocal images



B. CD63 mask and filipin quantification

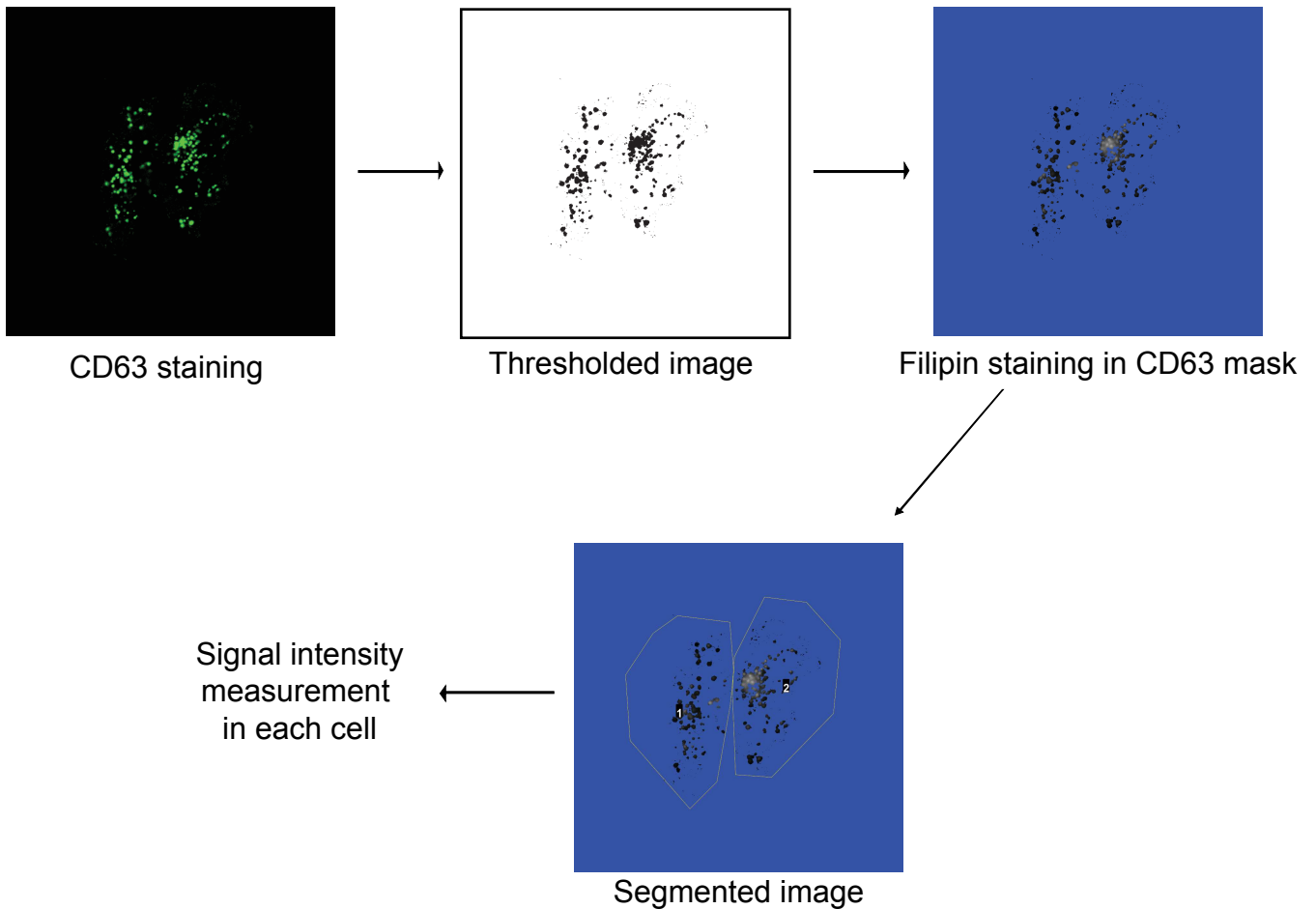


Figure S4. Image analysis procedure for filipin staining intensity quantification.

A. Field containing two cells labeled with TO-PRO-3, anti-CD63, anti-STARD3 and filipin were randomly acquired by confocal microscopy in four-channel images.

B. Image analysis was performed with Fiji (<http://fiji.sc/>). An intensity threshold was applied on the CD63 staining. A mask of the CD63 staining was then applied on the filipin staining to quantify the cholesterol in late endosomes. Cell were segmented manually and the filipin staining intensity was measured in individual cells.

Figure S5

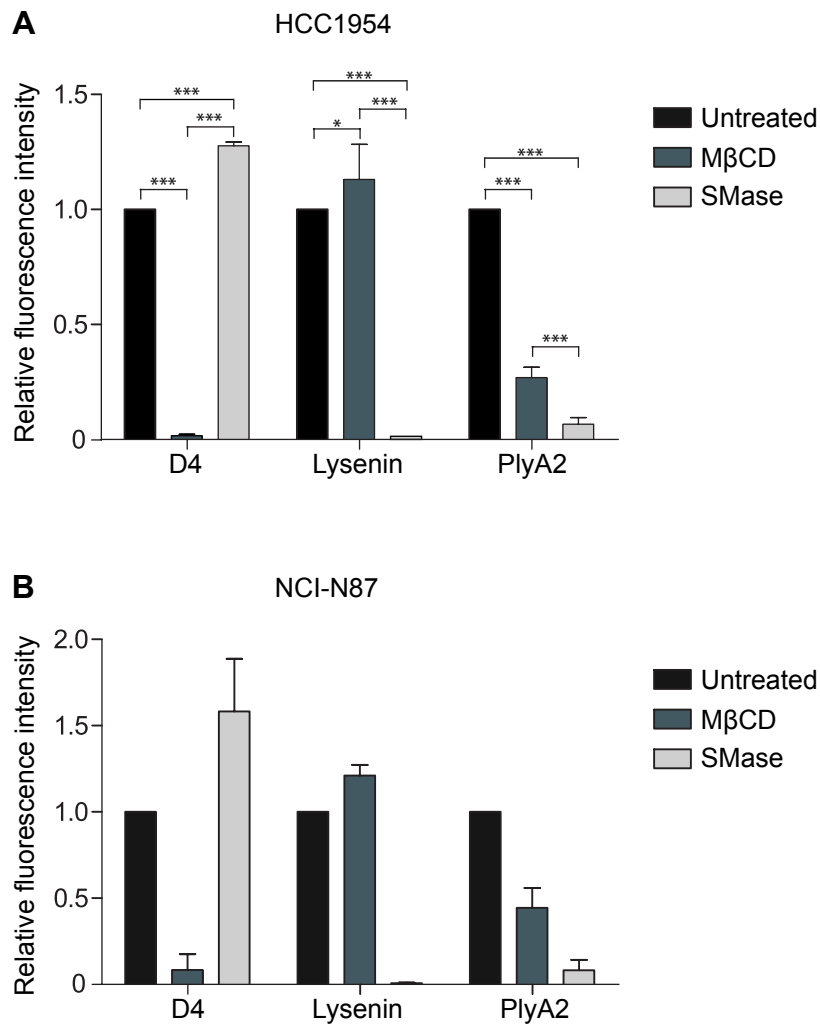


Figure S5. The GFP-D4, Lysenin and PlyA2 probes are specific for cholesterol and/or sphingomyelin.

The fluorescence intensity of the different probes was quantified by flow cytometry in HCC1954 (A) (n=3) and in NCI-N87 (B) (n=2) cells treated for 2 hours with MβCD or SMase. * p < 0.1, *** p < 0.001, ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

Figure 4

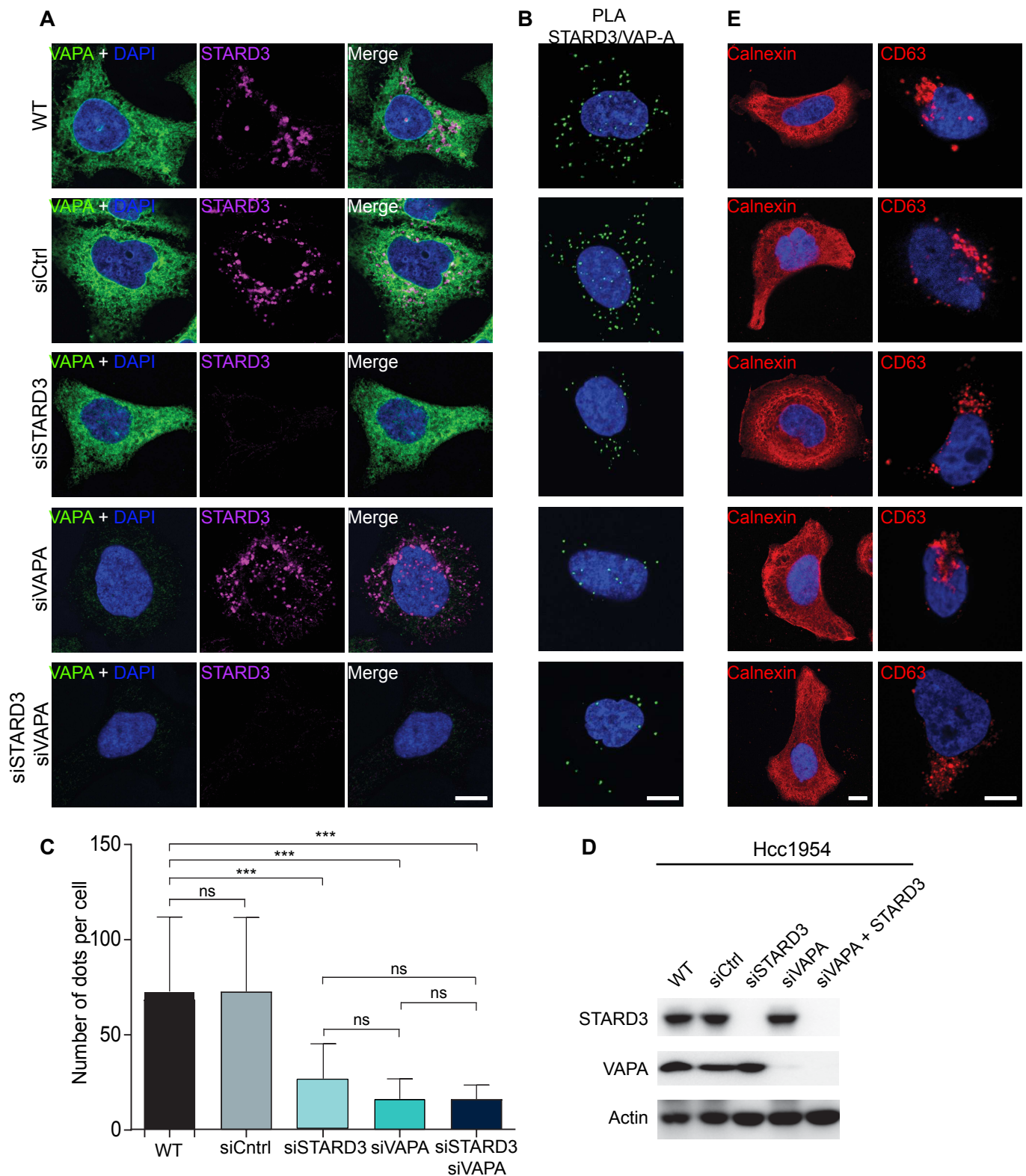


Figure 4. STARD3 and VAP-A are in close proximity in HER2+ cells.

A. Endogenous VAP-A (green) and STARD3 (magenta) labeling in HCC1954 cells transfected with siCtrl, siSTARD3, siVAP-A or siSTARD3 and siVAP-A. Merge images are shown at right. Scale bar: 10 μ m

B. PLA signal (green) obtained in the same cells than in A using anti-VAP-A and anti-STARD3 antibodies. Scale bar: 10 μ m

C. Quantification of the number of PLA dots per cell in HCC1954 cells transfected with siCtrl, siSTARD3, siVAP-A or siSTARD3 and siVAP-A using Icy software (wt 77 cells; siCtrl 76 cells; siSTARD3 65 cells; siVAP-A 50 cells; siVAP-A siSTARD3 72 cells from at least 2 independent experiments).

D. Western blot analysis of STARD3 and VAP-A expression in HCC1954 cells used in A, B and C. Actin was used as a loading control.

E. Labeling of Calnexin (red left) and CD63 (red right) in HCC1954 cells transfected with siCtrl, siSTARD3, siVAP-A or siSTARD3 and siVAP-A showing that the ER and late endosomes are not altered in knockdown cells. Scale bar: 10 μ m

Figure 5

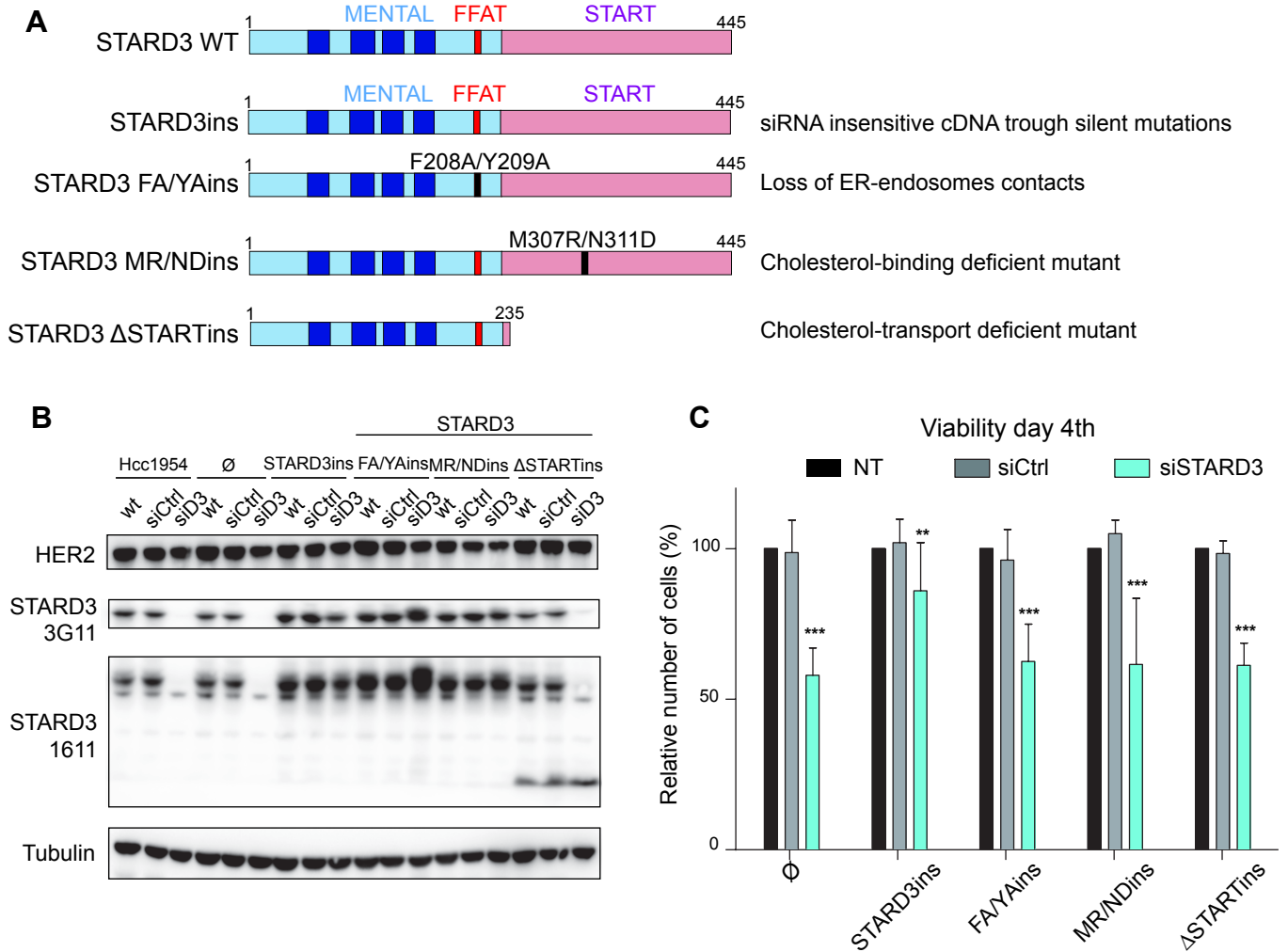


Figure 5. STARD3-mediated cholesterol transport is required for HER2+ cell growth.

A. Schematic representation of the different STARD3 insensitive mutants used in the study. The MENTAL domain in light blue contains 4 transmembrane helices (dark blue) and a FFAT motif (red); the START domain in pink contains two essential residues involved in cholesterol binding (M307 and N311). Point mutation positions are labeled in black. STARD3ins was obtained through silent mutations in the sequences targeted by siSTARD3.

B. Western blot analysis of STARD3 expression in the different cell lines. The expression of HER2 protein is unchanged; tubulin was used as a loading control.

C. MTT assay four days after transfection in the same cell lines than in B. $n = 4$ independent experiments; mean \pm SD; *** $p < 0.001$, ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

Figure S6

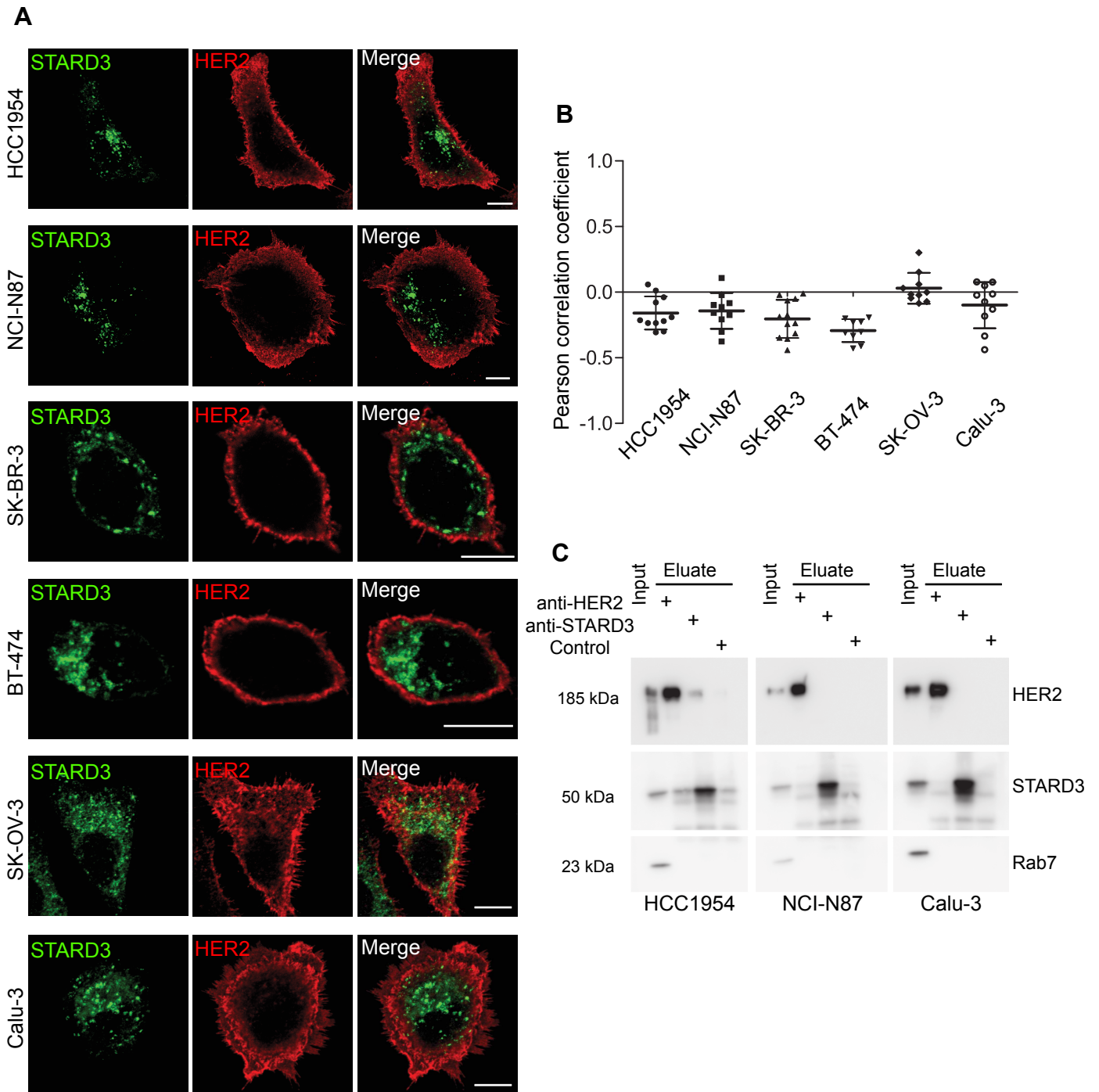


Figure S6. STARD3 and HER2 do not colocalize and do not interact in HER2+ cells.

A. HER2+ cells were labeled with anti-STARD3 (green) and anti-HER2 (red) antibodies. Merge images are shown at right. Scale bars: 10 μ m

B. Pearson correlation coefficients between STARD3 and HER2. Each dot represents a single cell.

C. Immunoprecipitation experiments between STARD3 and HER2 in HCC1954, NCI-N87 and Calu-3 cells using either anti-HER2 antibody, anti-STARD3 antibody or anti-Rab7 antibody as a negative control. Immunoprecipitated material was analyzed using anti-HER2, anti-STARD3 and anti-Rab7 antibodies.

Figure S7

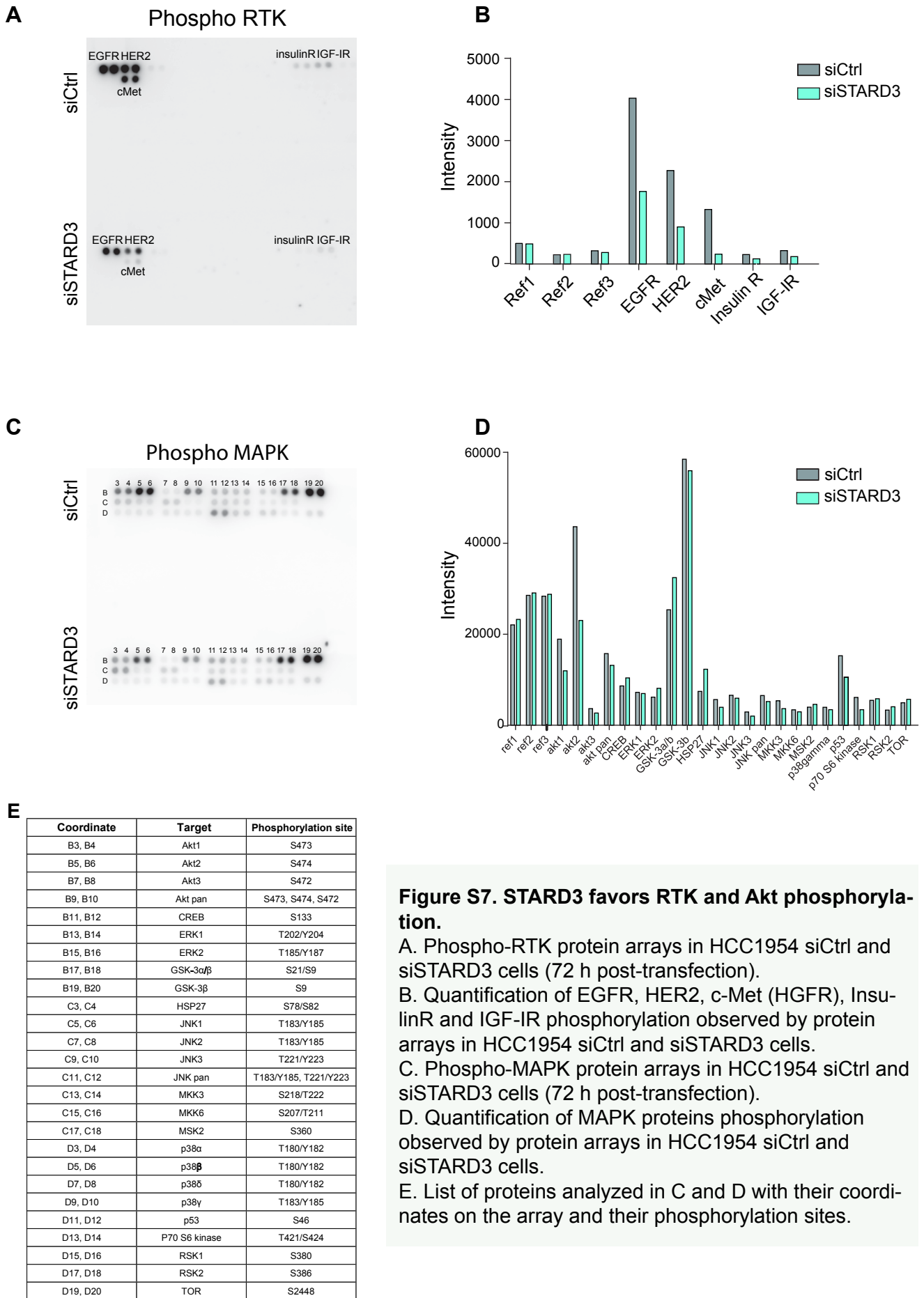


Figure S7. STARD3 favors RTK and Akt phosphorylation.

A. Phospho-RTK protein arrays in HCC1954 siCtrl and siSTARD3 cells (72 h post-transfection).

B. Quantification of EGFR, HER2, c-Met (HGFR), InsulinR and IGF-IR phosphorylation observed by protein arrays in HCC1954 siCtrl and siSTARD3 cells.

C. Phospho-MAPK protein arrays in HCC1954 siCtrl and siSTARD3 cells (72 h post-transfection).

D. Quantification of MAPK proteins phosphorylation observed by protein arrays in HCC1954 siCtrl and siSTARD3 cells.

E. List of proteins analyzed in C and D with their coordinates on the array and their phosphorylation sites.

Figure 6

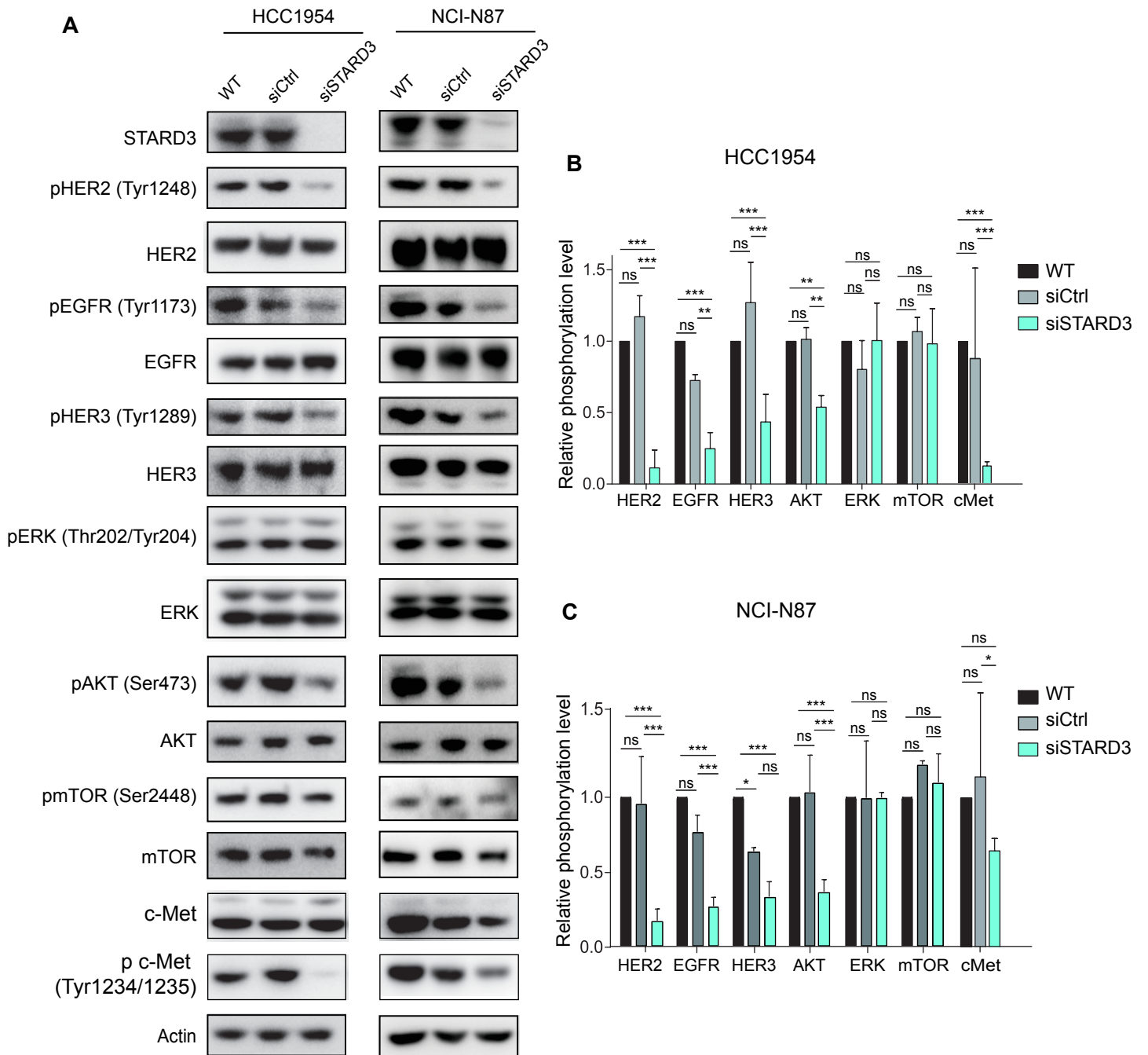


Figure 6. STARD3 favors HER2 signaling.

A. Western blot analysis of RTK, Akt, ERK and mTOR phosphorylation in HCC1954 and NCI-N87 control and STARD3 knockdown cells

B. Quantification of proteins phosphorylation in HCC1954 cells.

C. Quantification of proteins phosphorylation in NCI-N87 cells.

n=3 independent experiments * p < 0.1, ** p < 0.01, *** p < 0.001, ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

Figure 7

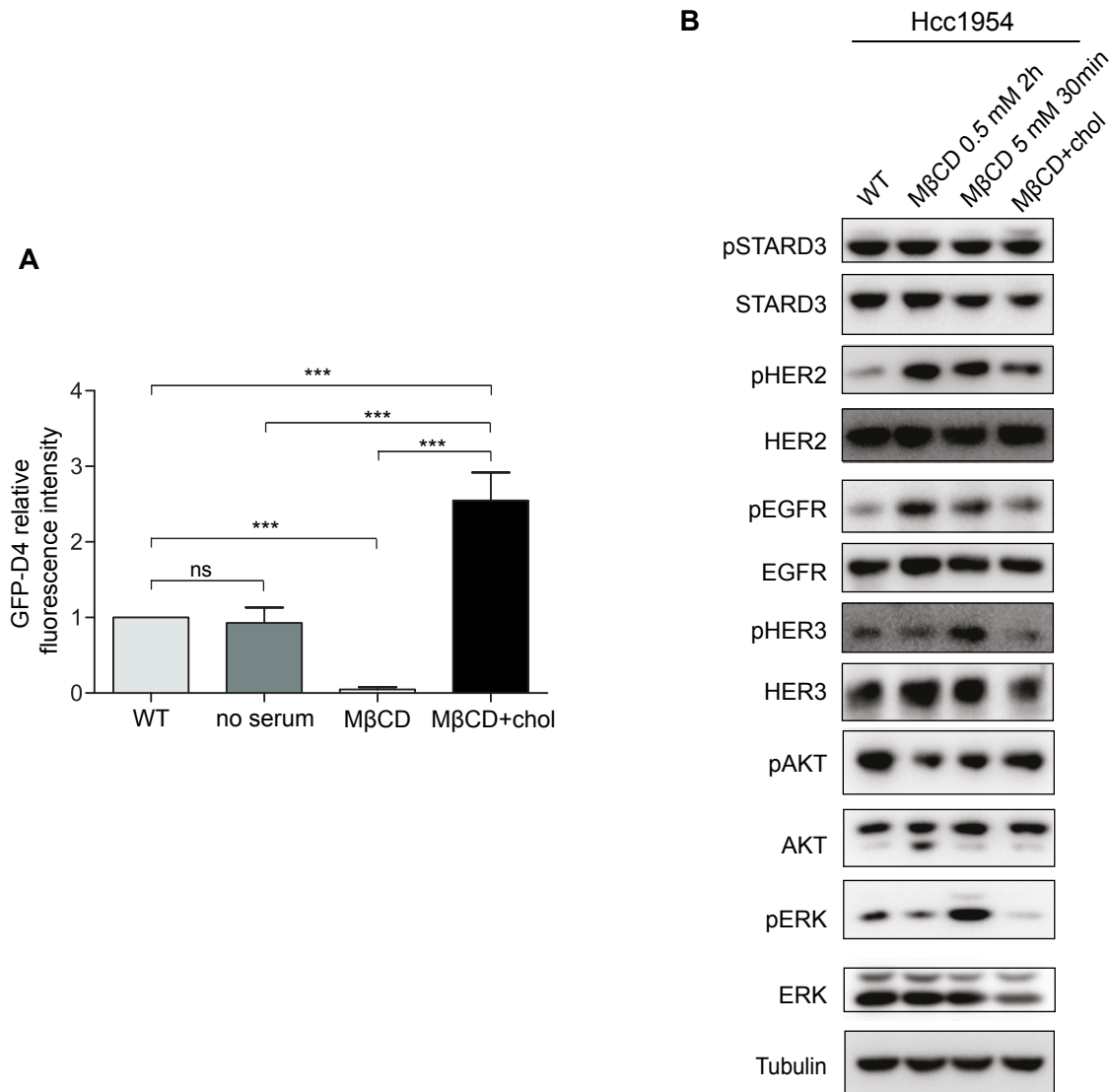


Figure 7. HER2, EGFR and HER3 are sensitive to the PM cholesterol for their activation.

A. Plasma membrane cholesterol quantification in HCC1954 by flow cytometry using the GFP-D4 fluorescent probe. Cells were treated for 2 hours in a medium without serum, with MβCD (1 mM) or MβCD/Cholesterol (500 μM) at 37°C. n=4 independent experiments, *** p < 0.001, ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

B. Western blot analysis of RTK, Akt and ERK phosphorylation in HCC1954 cultured in a medium without serum containing MβCD (0.5 μM for 2 hours or 5 mM for 30 minutes) or MβCD/Cholesterol (500 μM for 2 hours). Wild-type cells were cultured in a medium without serum for 2 hours.

Figure 8

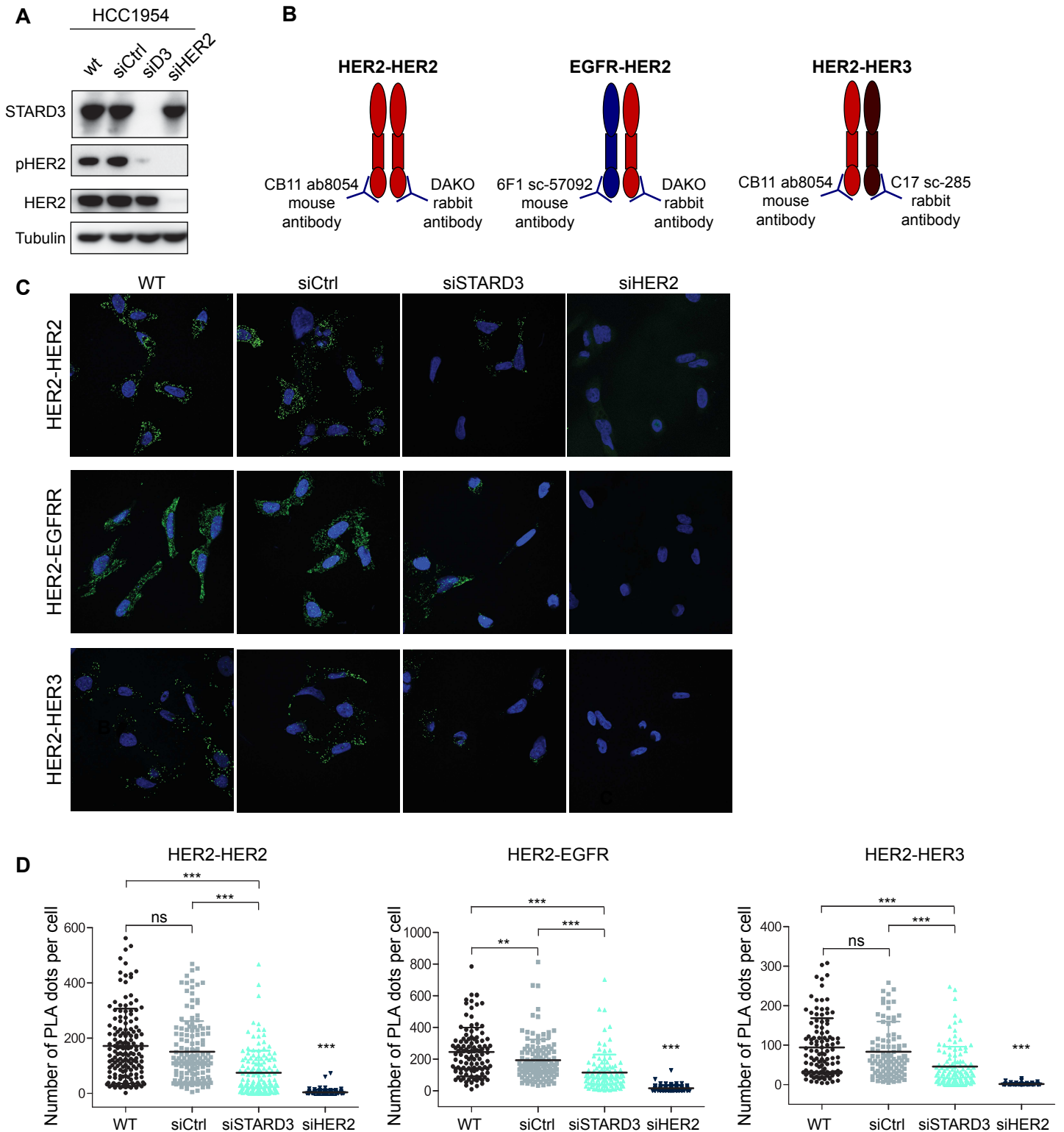


Figure 8. STARD3 favors HER2 homodimers and heterodimers.

A. Western blot analysis of STARD3 expression and HER2 expression and phosphorylation in siRNAs transfected HCC1954 cells.

B. Schematic representation of the antibodies used in the PLA experiment to observe HER2-HER2, HER2-EGFR and HER2-HER3 dimers.

C. PLA signals (green) obtained in HCC1954 cells transfected with siCtrl, siSTARD3 or siHER2.

D. Quantification of the number of PLA dots per cell in the same cells than in C. Each point represents the number of PLA dots for one single cell; cells originates from four independent experiments. The horizontal lines show the mean \pm SD. * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

Figure 9

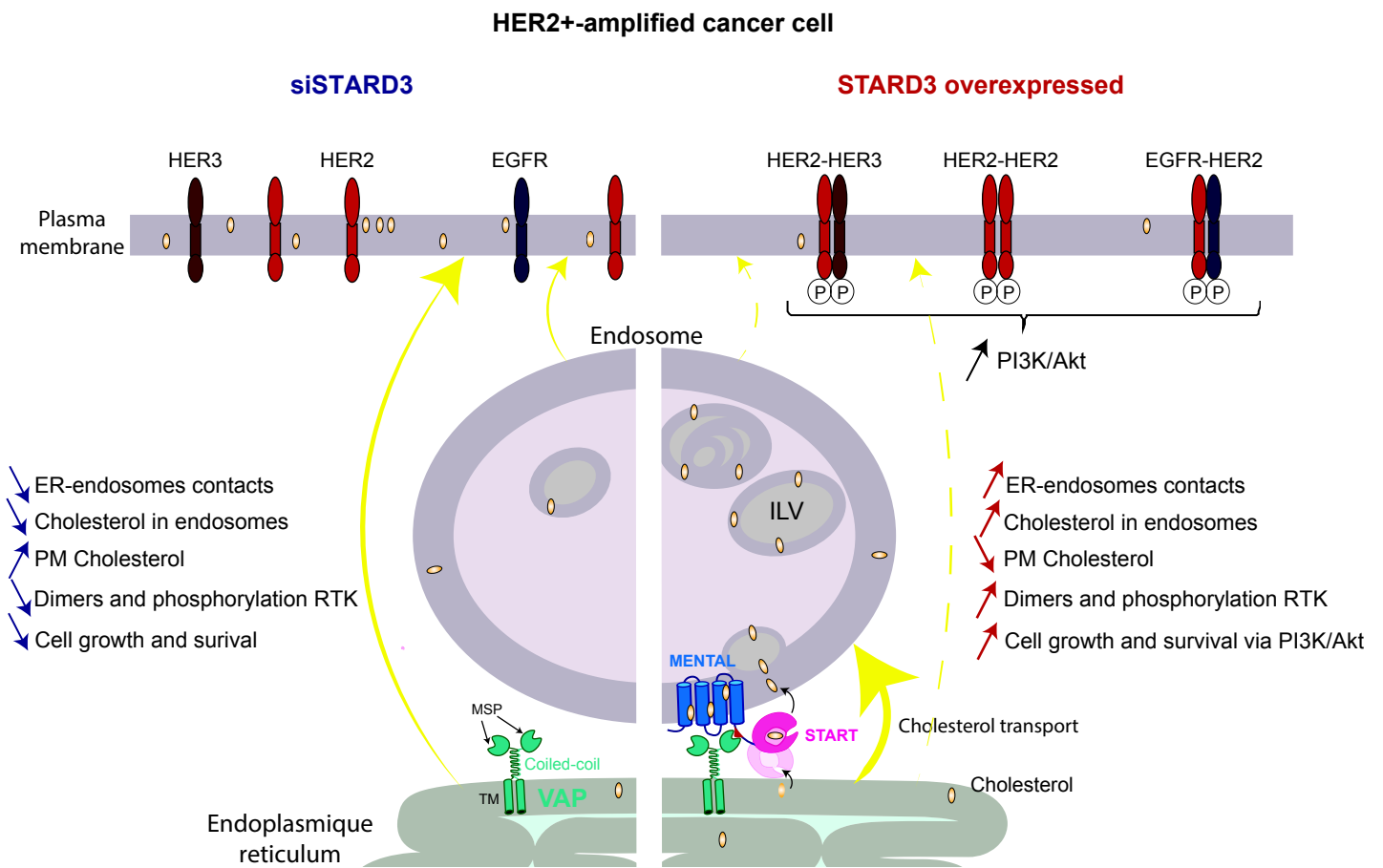


Figure 9. Schematic representation of the molecular mechanism of STARD3 addiction in HER2 tumors.

HER2 and STARD3 are co-amplified and co-expressed in HER2+ cancer cells. STARD3 forms a membrane contact site between the ER and endosomes by interacting with VAPs proteins. At these contacts, STARD3 transports cholesterol from the ER to the late endosomes inducing a cholesterol accumulation in the late endosomes at the expense of the plasma membrane. The decrease in plasma membrane cholesterol promotes the dimerization of EGFR receptors leading to their phosphorylation and to the activation of the PI3K/Akt survival pathway.

III. Processus cellulaires régulés par STARD3

Après avoir confirmé la dépendance de la croissance des cellules HER2 positives pour le transporteur de cholestérol STARD3, j'ai étudié l'effet de la perte d'expression de STARD3 sur le phénotype cellulaire (**Figure R1**).

La croissance cellulaire est la résultante de la prolifération et de la mort cellulaire. Afin de comprendre le rôle de STARD3 sur ces deux processus, j'ai tout d'abord quantifié l'effet de la perte d'expression de STARD3 sur le pourcentage de cellules en prolifération dans les cellules HER2+ HCC1954. Pour cela, j'ai utilisé la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone 3 comme marqueur de prolifération. Cette expérience a montré que la perte d'expression de STARD3 n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire (**Figure R1A**). Ensuite, afin d'étudier la mort cellulaire, j'ai mesuré le pourcentage de cellules en apoptose par cytométrie en flux grâce aux marqueurs Annexine V et Iodure de propidium. Les résultats ont montré que la perte d'expression de STARD3 augmente le pourcentage de cellules apoptotiques (**Figure R1B**). Ainsi, dans les cellules HER2+, STARD3 agit indirectement sur la survie cellulaire et non sur la prolifération. Ces résultats sont en accord avec l'effet de STARD3 sur l'activation de la voie PI3K/Akt.

J'ai ensuite analysé le cycle cellulaire par cytométrie en flux après marquage des cellules à l'iodure de propidium. La perte d'expression de STARD3 n'induit pas de différence significative sur le cycle cellulaire des cellules HER2+ HCC1954 (**Figure R1C**). Enfin, j'ai également étudié la migration cellulaire en utilisant des chambres de Boyden. Les résultats montrent que la perte d'expression de STARD3 réduit drastiquement la migration des cellules HER2+ HCC1954 (**Figure R1D**).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montrent que STARD3 agit sur la survie et la migration des cellules HER2+. Cependant, un certain nombre de processus cellulaires restent à être étudiés comme l'adhésion, la sénescence ou encore l'invasion.

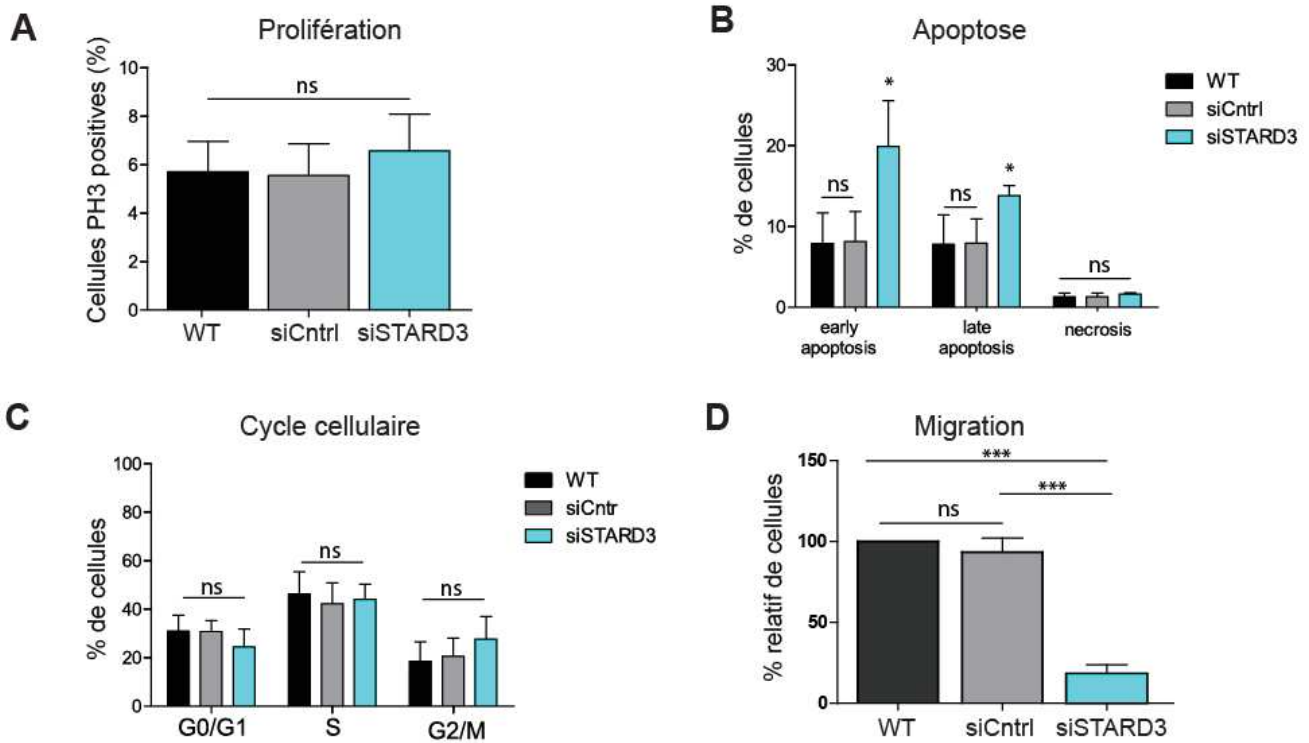


Figure R1 : STARD3 agit sur la survie et la migration des cellules HER2+

A. Le pourcentage de cellules en prolifération est quantifié grâce à un anticorps détectant la phosphorylation de l'histone 3 (PH3) dans les cellules HCC1954 contrôles et siSTARD3. n=5 expériences indépendantes

B. Le pourcentage de cellules HCC1954 apoptotiques est quantifié par cytométrie en flux grâce à un marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium. n=4 expériences indépendantes

C. Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux après marquage des cellules HCC1954 contrôles et siSTARD3 à l'iodure de propidium. n=3 expériences indépendantes

D. Après 6h de culture à 37°C, les noyaux des cellules ayant migré à travers la membrane de l'insert sont colorés au Hoechst. Le pourcentage relatif de cellules ayant migré est quantifié au microscope à épifluorescence. n=5 expériences indépendantes

Moyenne ± Ecart-type; Test ANOVA avec comparaison multiple de Tukey

IV. La phosphorylation de STARD3 régule la formation des MCS et le transfert de cholestérol

Au cours de ma thèse, j'ai participé à un travail collaboratif qui a permis de montrer que les sites de contact membranaire impliquant la protéine STARD3 sont régulés. En effet, la phosphorylation d'une sérine au sein du motif FFAT de STARD3 est essentielle pour l'interaction entre STARD3 et les protéines VAPs/MOSPD2. Les expériences que j'ai réalisées ont permis de montrer que la perte de phosphorylation de la sérine S209 au sein du motif FFAT de STARD3 diminue l'accumulation de cholestérol dans les endosomes tardifs. Ainsi, la phosphorylation du motif FFAT de STARD3 constitue un système « ON-OFF » qui régule la formation des MCS et le transfert de cholestérol (Di Mattia, Martinet et Ikhlef, en révision dans EMBO Journal). Ce travail est actuellement en révision dans EMBO Journal. Le manuscrit intitulé « Phosphorylation switches on inter-organelle contacts » se trouve ci-après.

Phosphorylation switches on inter-organelle contacts

Thomas Di Mattia^{1234§}, Arthur Martinet^{1234§}, Souade Ikhlef^{5§}, Alastair G. McEwen¹²³⁴, Yves Nominé¹²³⁴, Corinne Wendling¹²³⁴, Pierre Poussin-Courmontagne¹²³⁴, Laetitia Voilquin¹²³⁴, Pascal Eberling¹²³⁴, Frank Ruffenach¹²³⁴, Jean Cavarelli¹²³⁴, John Slee⁶, Timothy P Levine⁶, Guillaume Drin⁵, Catherine Tomasetto^{1234*}, Fabien Alpy^{1234*}

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

2 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U 1258, Illkirch, France

3 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7104, Illkirch, France

4 Université de Strasbourg, Illkirch, France

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

6 UCL Institute of Ophthalmology, 11-43 Bath Street, London EC1V 9EL, United Kingdom.

§: these authors contributed equally to this work.

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

Abstract

Organelles are physically connected in membrane contact sites. The endoplasmic reticulum possesses three major receptors, VAP-A, VAP-B and MOSPD2, which interact with proteins at the surface of other organelles to build contacts. VAP-A, VAP-B and MOSPD2 contain an MSP domain which binds a motif named FFAT [two phenylalanines in an acidic tract]. In this study, we identified a non-conventional FFAT motif where a conserved acidic residue is replaced by a serine/threonine. We show that phosphorylation of this serine/threonine is critical for non-conventional FFAT motifs (named Phospho-FFAT) to be recognized by the MSP domain. Moreover, structural analyses of the MSP domain alone or in complex with conventional and Phospho-FFAT peptides revealed new mechanisms of interaction. Using a prototypical tethering complex made by STARD3 and VAP, we showed that phosphorylation is instrumental for the formation of ER-endosome contacts, and their sterol transfer function. Based on these new insights, we produced a novel prediction algorithm which expands the repertoire of candidate proteins with a Phospho-FFAT. This study reveals that phosphorylation acts as a general switch for inter-organelle contacts.

Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) is a membrane-bound organelle primarily involved in protein and lipid synthesis. The ER consists of the nuclear envelope as well as tubes and sheets spreading throughout the cytosol up to the plasma membrane (PM) (Westrate *et al*, 2015). In the cytosol, the ER physically contacts other organelles including mitochondria, endosomes/lysosomes, autophagic structures, peroxisomes, lipid droplets as well as the PM. These contacts, termed membrane contact sites (MCSs), correspond to close appositions, usually within 30 nm, of the ER membrane with the limiting membrane of another organelle; they do not result in the fusion of the two membranes (Levine & Loewen, 2006; Wu *et al*, 2018). MCSs are involved in major cellular processes such as lipid and calcium transport, and organelle positioning and dynamics (Prinz *et al*, 2019; Wu *et al*, 2018).

Contacts between the ER and another organelle require tether proteins that bridge their two membranes via protein-membrane or protein-protein interactions. The ER possesses three major receptors at its surface which allow the recruitment of proteins associated with the membrane of other organelles. These proteins named Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Proteins (VAP) A and B, and Motile Sperm Domain-containing Protein 2 (MOSPD2), are members of the Major Sperm protein (MSP) domain-containing family. VAP-A, VAP-B and MOSPD2 are anchored in the ER membrane by a carboxyl-terminal transmembrane domain with their MSP domain projecting into the cytosol. The MSP domains of VAP-A/VAP-B/MOSPD2 interact with small linear motifs named FFAT [two phenylalanines (FF) in an acidic tract (AT)] (Di Mattia *et al*, 2018; Loewen *et al*, 2003; Murphy & Levine, 2016). Contact sites are built by the direct binding between VAP-A/VAP-B/MOSPD2 at the ER surface and FFAT-containing partners which are bound to another organelle, such as endosomes, mitochondria, peroxisomes, the Golgi, and the plasma membrane (Alpy *et al*, 2013; Amarilio *et al*, 2005; Costello *et al*, 2017a, 2017b; De Vos *et al*, 2012; Dong *et al*, 2016; Johnson *et al*, 2018; Kawano *et al*, 2006; Kirmiz *et al*, 2018, 2; Mesmin *et al*, 2013; Rocha *et al*, 2009; Di Mattia *et al*, 2018).

MCSs are functional structures that physically attach two distinct organelles to each other. Visualization of contacts by microscopy on live cells revealed that they are dynamic, with organelles associating and dissociating over time (Friedman *et al*, 2013; Valm *et al*, 2017). This observation implies that mechanisms regulating these processes must exist. While the molecular organization and function of MCSs are better understood, the regulation of the formation and disassembly of these structures remains quite unknown. In this study, we uncovered that some partners of VAP-A/VAP-B/MOSPD2 possess a special type of FFAT motif that can be phosphorylated on a discrete site, and that we consequently named Phospho-FFAT. The phosphorylation of Phospho-FFATs is essential for the interaction of VAP-A/VAP-B/MOSPD2 with their Phospho-FFAT containing partners. This reveals the existence of a general molecular mechanism regulating the formation of inter-organelle contact formation and function.

Results

Identification and functional characterization of a novel category of FFAT motifs potentially regulated by phosphorylation

Conventional FFATs have 7 core residues: E₁F₂F₃D₄A₅X₆E₇, and an acidic flanking region (Fig. 1A) (Loewen *et al*, 2003; Murphy & Levine, 2016). The residue at the fourth position is invariably acidic, either E or D; its substitution by an alanine precludes the interaction with the MSP domain (Kawano *et al*, 2006; Loewen *et al*, 2003). A survey of the literature revealed that some FFAT sequences differ from the conventional sequence: their core FFAT motif comprises a serine or a threonine residue at the fourth position instead of an acidic residue (Fig. 1A). Because serine and threonine are polar amino acids that can gain a negative charge once their hydroxyl group is phosphorylated, we surmised that these residues might be phosphorylated to be able to bind the MSP domain. We identified 6 distinct VAP-A/VAP-B/MOSPD2 partners with a FFAT motif having this characteristics: STARD3 (Steroidogenic acute regulatory (StAR)-related lipid transfer Domain containing 3), a late endosome (LE) protein involved in ER-LE cholesterol transport; FIP200 also known as RB1-Inducible Coiled-Coil Protein 1 (RB1CC1; RBCC1), a cytosolic protein involved in autophagosome formation (Hara *et al*, 2008; Zhao *et al*, 2018); Mitoguardin2 (MIGA2), also known as FAM73B, a mitochondrial outer membrane protein involved in mitochondria dynamics (Huttlin *et al*, 2015; Murphy & Levine, 2016; Zhang *et al*, 2016; Freyre *et al*, 2019); PTPIP51 (Protein Tyrosine Phosphatase-Interacting Protein-51, aka regulator of Microtubule Dynamics Protein 3, RMDN3; RMD3), a mitochondria protein involved in ER-Mitochondria contact formation and possessing two FFATs, a conventional one and a non-conventional FFAT with a threonine at the 4th position (Di Mattia *et al*, 2018; Huttlin *et al*, 2017; Murphy & Levine, 2016; Stoica *et al*, 2014); Kv2.1 and Kv2.2 (also known as Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily B Member 1 (KCNB1) and KCNB2, respectively) are voltage-gated potassium channels involved in neuronal excitability and in the formation of ER-plasma membrane contacts (Fox *et al*, 2015; Johnson *et al*, 2018; Kirmiz *et al*, 2018; Lim *et al*, 2000).

To test if these non-conventional FFAT motifs are genuine binding sites, we examined the binding of the 6 proteins identified above to VAPs or MOSPD2. More precisely we asked if the phosphorylation of the fourth residue of their FFAT motifs was implicated in binding with the MSP domain. To this end, we carried out pull-down assays of whole cell protein extracts using synthetic biotinylated peptides encompassing STARD3, FIP200, MIGA2, PTPIP51, Kv2.1 and Kv2.2 FFAT sequences whose fourth residue (serine or threonine) was phosphorylated and non-phosphorylated (Fig. 1B). These peptides were attached to streptavidin beads, and incubated with HeLa cell protein extracts. Bound proteins were detected by SDS-PAGE followed by Western blot using antibodies against VAP-A, VAP-B and MOSPD2 (Fig. 1C). Peptides corresponding to the non-phosphorylated FFAT motifs of STARD3, FIP200, MIGA2, PTPIP51, Kv2.1 and Kv2.2 retained none of the three proteins (Fig. 1C). In contrast, VAP proteins were efficiently pulled down by all the peptides whose FFAT motif was phosphorylated (STARD3, FIP200, MIGA2, PTPIP51, Kv2.1 and Kv2.2). MOSPD2 interacted with the phosphorylated FFAT of STARD3, FIP200 and MIGA2, showing that the interaction of MOSPD2 with these FFATs requires phosphorylation. However, MOSPD2 did not interact with the phosphorylated FFAT of PTPIP51, Kv2.1 and Kv2.2. This result was surprising but not unexpected because the candidate proteins were primarily described as VAP-A and B partners in the literature. This suggests that the landscape of MOSPD2 partners is different from that of VAP proteins.

Jointly, these data suggest that the interaction between VAP-A/VAP-B/MOSPD2 and several binding partners is activated by phosphorylation. To differentiate FFAT motifs characterized by a serine

or a threonine in position 4 and turned on by phosphorylation from conventional ones, we named them Phospho-FFATs.

***In silico* identification of Phospho-FFAT motifs in the human proteome**

In order to identify the human proteins possessing a Phospho-FFAT, we used an *in silico* approach. We designed a position weight matrix strategy which served previously to identify FFATs in many proteins (Mikitova & Levine, 2012; Murphy & Levine, 2016; Slee & Levine, 2019). It allows the identification of motifs with variations around an ideal FFAT sequence. Proteins are ranked based on their best FFAT score, with a score 0 for an ideal FFAT sequence, and higher scores (up to 18.5) for distant motifs. We specifically focused on motifs which can be phosphorylated at position 4 of the core FFAT by imposing the presence of a serine or a threonine at that position. Among the 20 373 human proteins which were analyzed, 2079 had an FFAT score below 3 (Table S1). Because VAP-A/VAP-B/MOSPD2 partners have been identified by high-throughput proteomics (Orchard *et al*, 2014; Oughtred *et al*, 2019), we took advantage of these resources to test the 427 potential partners listed in the Biogrid and IntAct databases. For this analysis, we also included the MOSPD2 partners identified by ourselves using a proteomic approach (Di Mattia *et al*, 2018). We screened the 488 known VAP-A/VAP-B/MOSPD2 partners for the presence of a candidate Phospho-FFAT motif. We identified 110 VAP-A/VAP-B/MOSPD2 partners with a significant Phospho-FFAT score (Table S2). As expected, STARD3, FIP200, MIGA2, PTPIP51, Kv2.1 and Kv2.2 were attributed high scores by the algorithm, ranging from 0 to 2.5. Using another version of the algorithm allowing the identification of conventional FFATs, the two algorithms being mutually exclusive, 94 proteins were identified (Fig. 1D and Table S2). Interestingly, some proteins had two FFAT motifs, a conventional one and a Phospho-FFAT. This analysis suggests that Phospho-FFATs and conventional ones are equally distributed in the human proteome.

To further exploit this *in silico* approach, we sought for the presence of proteins containing a Phospho-FFAT motif which were not identified by the original FFAT-prediction algorithm (Mikitova & Levine, 2012; Murphy & Levine, 2016; Slee & Levine, 2019). We chose to describe three proteins of the list of 109 VAP-A/VAP-B/MOSPD2 partners (Table S2) that are already characterized as involved in the formation of MCSs or likely to be involved in the formation of contacts (Fig. 1E). One of the protein is STARD3NL: the algorithm identified a Phospho-FFAT motif in this protein that is consistent with the current knowledge about this protein. STARD3NL is a late endosome protein homologous to STARD3 (Alpy *et al*, 2002), involved in the formation of ER-endosome contacts by interacting with VAP-A/VAP-B/MOSPD2 (Alpy *et al*, 2013; Di Mattia *et al*, 2018). The FFAT of STARD3NL is highly similar to the one of STARD3, with all the characteristics of a Phospho-FFAT, and therefore most likely requires phosphorylation to be active. Another example is RMDN2: this poorly characterized protein is homologous to PTPIP51 (aka RMDN3) notably in the amino-terminal transmembrane region. Interestingly, this region is responsible for the addressing of PTPIP51 to mitochondria (Lv *et al*, 2006). This suggests that RMDN2 is also a mitochondrial protein; supporting this idea, RMDN2 was shown to be associated with the outer mitochondrial membrane in a high throughput proteomics study (Go *et al*, in preparation). The algorithm identified a unique potential Phospho-FFAT motif in RMDN2 which is conserved with PTPIP51. This suggests that RMDN2 could be involved in ER-mitochondria contacts regulated by phosphorylation. The last example is SNX2: the algorithm identified a Phospho-FFAT motif in SNX2 (Fig. 1E), a component of the retromer complex which is implicated in ER-endosome contacts (Bonifacino & Rojas, 2006; Dong *et al*, 2016). Interestingly, Dong *et al*, (Dong *et al*, 2016) made a

mutation analysis which is consistent with the Phospho-FFAT motif identified here. Therefore, it is likely that SNX2's interaction with VAP is regulated by phosphorylation.

To conclude, we developed an algorithm allowing the identification of Phospho-FFATs in an unbiased manner. This algorithm revealed that phospho-FFATs are as common as conventional FFAT motifs in the human proteome.

Phosphorylation of the Phospho-FFAT allows binding with VAP-A and VAP-B

We selected one Phospho-FFAT-containing protein to study in depth its association mechanism. We chose STARD3, one of the 15 human START proteins, a family of lipid binding proteins (LTP) involved in the intracellular transport of lipids. We chose STARD3 because we previously reported that STARD3 makes ER-endosome contact sites by interacting with the ER proteins VAP-A, VAP-B and MOSPD2 (Alpy *et al*, 2013; Di Mattia *et al*, 2018). These ER-endosome contacts are active regions that allow STARD3-mediated ER to endosome cholesterol transport (Alpy & Tomasetto, 2005; Wilhelm *et al*, 2017). The Phospho-FFAT of STARD3 comprises a serine residue at the fourth position (position 209 of the protein, hereafter referred to as S₂₀₉; note that hereafter numberings of FFAT residues are labeled as subscript) (Fig. 1A and 2A). To determine if this particular residue is phosphorylated, we first interrogated the public database PhosphoSitePlus (Hornbeck *et al*, 2015) - which records post-translational modifications in a comprehensive manner - for the presence of phosphorylation in STARD3. We found that a series of phosphorylations in human and mouse STARD3 were described in and around the FFAT motif, on S₂₀₉, and on S₂₁₃, S₂₁₇, and S₂₂₁ (Fig. 2A). To confirm these observations, we sought for STARD3 phosphorylation in HeLa cells, given that STARD3 makes ER-endosome contacts in these cells (Alpy *et al*, 2013). To this aim, we expressed the GST-tagged STARD3 protein in HeLa cells, then purified the protein by affinity chromatography, and analyzed its phosphorylation by mass spectrometry. Once purified, the GST-STARD3 protein was digested with trypsin and chymotrypsin, and subjected to ion trap liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) analysis. Phosphorylation was detected on S₂₀₉, S₂₁₃, S₂₁₇ and S₂₂₁ residues (Fig. 2A and Fig. S1). Together, these data show that STARD3 is phosphorylated on several serine residues in the core of its FFAT motif and in its vicinity.

We then explored whether VAP-A and VAP-B directly associate with the phosphorylated FFAT motif of STARD3 by *in vitro* binding assays using recombinant proteins and synthetic biotinylated peptides corresponding to the FFAT motif of STARD3. We produced in *E. coli* and purified the MSP domains of VAP-A and VAP-B (Fig. 2B). The MSP domain of VAP-A, with a double K94D/M96D mutation (hereafter called KD/MD mutant), which is defective in binding the FFAT motif (Kaiser *et al*, 2005) was a negative control. These proteins were then incubated with streptavidin beads coupled with biotinylated peptides corresponding to either a control, or non-phosphorylated or phosphorylated STARD3 FFAT motifs. We tested peptides bearing a phosphoserine either at position 209 or 213, or at both positions. We also included a peptide corresponding to the conventional FFAT motif of Oxysterol-Binding Protein-related protein 1 (OSBPL1A aka ORP1) (Loewen *et al*, 2003), and a random sequence of the same length, as positive and negative control, respectively (Fig. S4A). Retained proteins were eluted and analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining (Fig. 2C). The MSP domains of VAP-A and VAP-B interacted with the FFAT motif of ORP1, but did not interact with the non-phosphorylated STARD3 FFAT motif (Fig. 2C). Only the peptides with a phosphorylation on serine 209 retained the MSP domain of VAP-A and VAP-B. Indeed, the peptide with a single phosphorylation on

S₂₁₃ did not interact, while the ones with a phosphorylation on S₂₀₉ or two phosphorylations, on S₂₀₉ and S₂₁₃, interacted with the recombinant MSP domains.

Together, these experiments showed that phosphorylation of serine 209 is necessary and sufficient for the direct interaction of the STARD3 Phospho-FFAT with the MSP domains of VAP-A and VAP-B.

Structural insight into the interaction between VAP-A and a Phospho-FFAT

To gain atomistic insights about the interaction between the MSP domain and a Phospho-FFAT motif, we solved the crystal structure of the MSP domain of human VAP-A in complex with a peptide corresponding to the human phosphorylated STARD3 FFAT (residues 197-216) (PDB ID: 6TQR). The structure was resolved to 1.85 Å (from anisotropic data – 3 Å in the worst direction) by molecular replacement using the structure of rat VAP-A with ORP1L FFAT (PDB ID 1Z9O; (Kaiser *et al*, 2005)). The asymmetric unit contains four copies of the MSP domain, two of which have the Phospho-FFAT bound. The structure of human VAP-A was strongly similar to that of rat VAP-A (rmsd of 0.538 Å over 119 residues) (Fig. 2D-I). Overall, the first residues of the core motif of the Phospho-FFAT bound the MSP domain similarly to the conventional FFAT motif of ORP1 (PDB ID: 1Z9O) (Kaiser *et al*, 2005). Indeed, F₂₀₇, the second residue of the FFAT motif, was bound to the hydrophobic pocket at the surface of the MSP domain constituted by aliphatic parts of the side chains of K52, T54, K94, M96, and K125 of VAP-A (Fig. 2G). The hydrogen bonds are also maintained between the main-chain carbonyl and amide of Y₂₀₈ of the peptide and the main-chain of T53 of VAP-A. The phosphorylated serine S₂₀₉ forms ionic bonds with two lysines of VAP-A, K50 and K52. Interestingly, the following core residue binds differently between the conventional and Phospho-FFAT. In the conventional FFAT motif of ORP1, the residue in position 5 is an alanine (Fig. 2I). The side chain of A₄₇₉ rests in a hydrophobic pocket formed by V51, T53, V61, N64 and F95. Hydrogen bonds are also formed between the amide and carbonyl of A₄₇₉ with the carbonyl of V51, and the side-chain amide of N64, respectively. This conformation of the peptide allows L₄₈₀, the 6th residue of the motif, to form hydrogen bonds between its carbonyl and the amide of V61, and a water-mediated contact between its amide and the carbonyls of P56 and Y59. However, in the Phospho-FFAT motif of STARD3, the residues in position 5 and 6 are both prolines (P₂₁₀ and P₂₁₁) (Fig. 2H). This prevents P₂₁₀ from contacting the carbonyl of V51 of VAP-A. The sidechain of P₂₁₀ now no longer sits in the hydrophobic pocket, but instead makes hydrophobic contacts with the side chains of K50 and N64. This prevents any of the other contacts seen for residues 5 and 6 of the conventional FFAT motif. The difference in position of peptide also lifts the phosphoserine in position 4 closer to the side-chain amides of K50 and K52, allowing it to make strong contacts.

The presence of two Phospho-FFAT-bound and two unbound chains in the asymmetric unit revealed conformation changes between the bound and unbound domains (Fig. S2). We noted modifications involving the VAP residue F95 which is buried in the hydrophobic core of the domain, and M96 residue at its surface. These changes notably result in an opening of the hydrophobic pocket which allows F₂₀₇ of the Phospho-FFAT to bind (Fig. 2F, G, and Fig. S2).

Interestingly, depending of the nature of the negatively charged residue in position 4 of the FFAT (aspartate or phosphorylated serine, in a conventional and Phospho-FFAT motif, respectively), the interaction with the MSP domain of VAP-A is different. Indeed, superposition of the FFAT motifs of STARD3 and ORP1 showed that the phosphorylated serine is longer than the aspartate and forms an ionic bond with lysine K50 of VAP-A. To determine whether this ionic bond contributes to the interaction *in vitro*, we produced the recombinant MSP domain of VAP-A in which K50 was replaced

by a leucine (hereafter referred to as VAP-A K50L). Then, we tested the interaction of this mutant VAP-A with synthetic peptides corresponding to the phosphorylated FFAT of STARD3 or the conventional FFAT of ORP1 (Fig. S3). Unlike wild-type VAP-A that interacted equally with the conventional and the Phospho-FFAT, VAP-A K50L only interacted with the conventional FFAT. Thus, the mutation of K50 in VAP-A impedes the interaction of its MSP domain with the Phospho-FFAT of STARD3, without affecting the ability of the protein to interact with the conventional FFAT of ORP1 *in vitro*. Given the high sequence identity (82%) between human VAP-A and VAP-B, we hypothesized that the interaction of FFAT motifs with each protein should be similar. Thus, we mutated the conserved lysine K43 in VAP-B, and tested the interaction of the mutant protein with the conventional and the Phospho-FFAT *in vitro* (Fig. S3). Similarly to VAP-A K50L, VAP-B K43L interacted with the conventional FFAT of ORP1, but not with the Phospho-FFAT of STARD3, while wild-type VAP-B interacted equally with the two types of FFAT motifs.

This structural analysis showed that the overall binding mode of a conventional FFAT and a Phospho-FFAT to VAP is different. While the first half of the core motif binds in an identical manner, it diverges in the other half with specific interactions being involved; more specifically VAP-A K50 and VAP-B K43 residues are predominantly involved in binding the phosphorylated serine of the Phospho-FFAT.

***In vitro* biophysical characterization of VAPs interaction with Phospho-FFATs**

To determine in a quantitative manner the binding affinities between VAP-A and VAP-B, and a conventional FFAT or the Phospho-FFAT motif, we used the optical biosensing Surface Plasmon Resonance (SPR) method. Either control, non-phosphorylated or phosphorylated biotinylated peptides were immobilized onto a sensor chip and several concentrations of recombinant MSP domains were injected. A strong association of every MSP domain with the conventional FFAT motif of ORP1 was measured, as indicated by the interaction profiles typical for a domain / peptide interaction (Fig. S4B). In contrast, no binding was seen with the non-phosphorylated FFAT of STARD3 (Fig. 3A). Corroborating pull-down assays (Fig. 2C), phosphorylation of S₂₀₉ in the peptide induced a dose-dependent signal increase (Fig. 3C), thus confirming that a unique phosphorylation of this residue is critical for the interaction. The sensorgrams reached a steady-state response (R_{eq}) during the association phase which allowed the determination of affinities. The values of R_{eq} were fitted as a function of the MSP domain concentration assuming a Langmuir model. We have previously shown that the recombinant MSP domains of VAP-A and VAP-B form homodimers in solution (Di Mattia *et al*, 2018). Thus, the concentrations used to determine affinities correspond to VAP-A and VAP-B homodimers. Dissociation constants (K_D) of $5.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ and $7.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$ were determined by fitting the binding isotherms obtained for the interaction between the STARD3 FFAT pS₂₀₉ and the MSP domain of VAP-A and VAP-B, respectively (Fig. 3C and not shown).

The presence of 2 phosphorylations on S₂₀₉ and S₂₁₃ slightly increased the affinity with the MSP domains (Fig. 3D, E); this effect is further enhanced by the presence of 3 phosphorylations on S₂₀₃, S₂₀₉ and S₂₁₃. (Fig. S4D, E). Moreover, we found that STARD3 FFAT peptides phosphorylated on pS₂₁₃ only (Fig. 3B) or pS₂₀₃ only (Fig. S4C) did not interact with any of the MSP domains. These data established the crucial role of phosphorylation on S₂₀₉ in the interaction process and showed that additional phosphorylation on residues in the vicinity of the core FFAT motif increased the affinity. The presence of several phosphorylated residues increases the number of negative charges in the FFAT peptide and increases interaction with the MSP domain. In agreement with the idea that ionic bonding plays an

important role, the interaction of the MSP domain of VAP-A and VAP-B with a conventional FFAT or a Phospho-FFAT was found to be highly influenced by the ionic strength of the buffer used (Fig. S4E).

These experiments showed that phosphorylation of serine at the 4th position in the core FFAT motif is critical for the direct interaction of the Phospho-FFAT with the MSP domains of VAP-A and VAP-B; in addition, the interaction occurs with a micromolar affinity, similar to that of a conventional FFAT motif.

Formation of the complex between STARD3 and VAPs requires phosphorylation of the Phospho-FFAT motif

Having established a key role of phosphorylation on serine at position 4 of the Phospho-FFAT of STARD3, the next step was to show that this phosphorylation was required for the assembly of the complex between STARD3 and VAP proteins.

First, we examined whether endogenous VAP-A and VAP-B could be isolated from whole cell protein extracts using synthetic biotinylated peptides corresponding to the FFAT motif of STARD3, either phosphorylated or not, as bait (Fig. S5). We tested peptides bearing a phosphoserine either at position 209 or 213, or at both positions, and to have a comprehensive understanding of the effect of phosphorylation near the FFAT motif, we included peptides containing a phosphoserine at position 203, even though it was not identified as being phosphorylated *in vivo*. To complete our series, we synthesized peptides with pS₂₀₃ + pS₂₀₉ and pS₂₀₃ + pS₂₁₃ combinations, as well as a peptide in which S₂₀₃, S₂₀₉ and S₂₁₃ residues were phosphorylated. Each peptide was attached to streptavidin beads and incubated with HeLa cell protein extract. Bound proteins were eluted and analyzed by SDS-PAGE followed by Western blot using antibodies against VAP-A and VAP-B (Fig. S5). As expected (Di Mattia *et al*, 2018; Rocha *et al*, 2009), the conventional ORP1 FFAT motif, used as positive control, efficiently pulled-down VAP-A and VAP-B from the extract. In contrast, the non-phosphorylated FFAT motif of STARD3 did not pull-down VAP-A or VAP-B (Fig. S5). Consistent with the idea that phosphorylation at position 4 of the FFAT motif is crucial for the binding, we found that among the three mono-phosphorylated peptides, only the one with a phosphorylation on S₂₀₉ was able to trap VAP-A/VAP-B. Moreover, we found that among peptides bearing a combination of phosphorylations (2 or 3 phosphoserines) only the ones having phosphorylated S₂₀₉ efficiently pull-down VAP-A/VAP-B. In line with the SPR experiments, we noted that the presence of another phosphoserine in addition to pS₂₀₉ increased the interaction of the peptide with the VAP proteins, as indicated by the higher and lower amount of each protein in the bound and unbound fractions, respectively (Fig. S5). These data confirmed the crucial role of the phosphorylation of S₂₀₉, corresponding to the 4th position of the core FFAT motif of STARD3, for the interaction of this motif with its ER-located VAP partners. Additional phosphorylations of S₂₀₃ and S₂₁₃ are not essential but strengthen the interaction.

We then analyzed the ability of full-length STARD3 to associate with VAP proteins. To test this, GFP-tagged VAP-A was co-expressed in HeLa cells with wild-type STARD3 or two mutants in which the S₂₀₉ was replaced either by a non-phosphorylatable residue alanine (S₂₀₉A), or a phosphomimetic residue, aspartate (S₂₀₉D). The proteins were then immunoprecipitated using anti-GFP antibodies. The GFP-VAP-A KD/MD mutant was used as a negative control. As we previously showed (Alpy *et al*, 2013), wild-type STARD3 was co-immunoprecipitated with VAP-A. In contrast, the S₂₀₉A mutant was not co-precipitated (Fig. 4A), suggesting that the interaction between VAP-A and STARD3 requires a phosphorylatable serine at position 4 of the FFAT motif. Replacing S₂₀₉ with the phosphomimetic residue D did not, however, restore the VAP-A/STARD3 interaction. The tridimensional structure of

VAP-A in complex with the Phospho-FFAT of STARD3 shows that the proline residue in position 5 of the FFAT motif, by imposing a conformational rigidity in the peptide backbone, would prevent the aspartate residue from properly mimicking a phosphorylated serine, as it possesses a shorter side chain (Fig. 2 D-H). To circumvent this, we replaced this proline P₂₁₀ by an alanine, and serine S₂₀₉ by an aspartate, to generate the STARD3 S₂₀₉D/P₂₁₀A mutant. Remarkably, this mutant was co-immunoprecipitated with VAP-A (Fig. 4A). Thus, STARD3 requires a phosphorylatable serine in position 4 of its FFAT motif to interact with VAP-A; structural constraints explain that a single phosphomimetic mutation does not restore the interaction, only the double mutation restores binding. To substantiate this result, we repeated the experiments with VAP-B (Fig. 4B). Like VAP-A, VAP-B bound to wild-type STARD3, but not with its non-phosphorylatable mutant STARD3 S₂₀₉A (Fig. 4B). VAP-B, similarly to VAP-A, did not interact with STARD3 S₂₀₉D, while it interacted with STARD3 S₂₀₉D/P₂₁₀A.

Jointly, these results show that phosphorylation of the FFAT of STARD3 on its fourth position (S₂₀₉) is indispensable for the protein to interact with its partners VAP-A and VAP-B. Structural constraints explain that a single phosphomimetic mutation does not restore the interaction, only a double mutation S₂₀₉D/P₂₁₀A restores binding. Moreover, additional phosphorylations of serine outside the core motif are not required for the interaction, but when S₂₀₉ is phosphorylated, they increase the binding affinity.

Phosphorylation at the 4th residue of the phospho-FFAT motif of STARD3 is necessary for ER-endosome contact formation *in vivo*

We previously reported that the creation of ER-endosome contacts, arising from the interaction between STARD3 and VAP-A or VAP-B, induces a striking relocalization of these latter 2 proteins from a characteristic ER reticulated pattern to ER subdomains in contact with STARD3-positive endosomes (Alpy *et al*, 2013; Wilhelm *et al*, 2017). In contrast, when a mutant STARD3 deleted from the FFAT motif was expressed, neither VAP-A or VAP-B were delocalized towards ER sub-regions in contact with endosomes. Here, we performed similar experiments to address whether ER-endosome contact formation depends on STARD3 FFAT phosphorylation. We expressed VAP-A alone and in combination with either wild-type STARD3, its non-phosphorylatable counterpart, or its phosphomimetic S₂₀₉D/P₂₁₀A mutant. When expressed alone, VAP-A was evenly present in the ER (Fig. 4G). In the presence of wild-type STARD3, VAP-A was massively recruited towards endosomes (Fig. 4C), with a positive correlation of VAP and STARD3 signals (Fig. 4H). In contrast, in the presence of the S₂₀₉A mutant, VAP-A remained uniformly distributed in the ER (Fig. 4D), with no signal correlation (Fig. 4H). This phenotype was similar to what is observed in cells expressing VAP-A KD/MD or STARD3 F₂₀₇A/Y₂₀₈A (FFAT mutant named FA/YA) mutants unable to form VAP/STARD3 complexes (Fig. 4F, H and not shown) (Alpy *et al*, 2013). Consistent with the biochemistry, the phosphomimetic mutant STARD3 S₂₀₉D/P₂₁₀A induced the enrichment of VAP-A around endosomes (Fig. 4E), and fluorescent signals were as correlated as the ones measured with wild-type STARD3 and VAP-A (Fig. 4H). Jointly, these data showed that STARD3 phosphorylation on S₂₀₉ allows the formation of ER-endosome contacts *in vivo*.

Similar experiments were then performed with VAP-B (Fig. S6). Akin to VAP-A, VAP-B was evenly distributed in the ER when expressed alone, and in the presence of the non-phosphorylatable STARD3 S₂₀₉A mutant, while it was recruited around endosomes by wild-type STARD3 and the phosphomimetic mutant STARD3 S₂₀₉D/P₂₁₀A (Fig. S6).

Together, these data show that *in vivo* the phosphorylation of the STARD3 FFAT motif elicits the assembly of ER-Endosome contacts made by a complex between STARD3 and either VAP-A or VAP-B.

Phosphorylation of the FFAT motif is essential for STARD3 sterol transfer function *in vitro*

Having established a novel mechanism of complex formation for a protein bearing a Phospho-FFAT motif like STARD3, we examined *in vitro* whether the phosphorylation of S₂₀₉ within the non-conventional FFAT motif was mandatory for STARD3 to be active, i.e. to connect the endosome and ER membranes, and to transfer sterol between them. To this end, we reconstituted the tethering complex *in vitro* with liposomes and recombinant proteins. First, we produced and purified recombinant proteins corresponding to the cytosolic part of STARD3 including the Phospho-FFAT motif, the START domain, and an N-terminal cysteine residue enabling the covalent attachment to liposomes doped with thiol-reactive MPB-PE lipid (Fig. 5B). We produced this protein and a form constitutively phosphorylated on S₂₀₉, termed thereafter cSTD3 and pS₂₀₉ cSTD3, respectively. Because production of recombinant proteins phosphorylated on a specific site is not possible using regular *E. coli*, we used a genomically recoded *E. coli* strain engineered to allow phosphoserine incorporation into recombinant proteins to produce pS₂₀₉ cSTD3 (Park *et al*, 2011; Pirman *et al*, 2015). Recombinant proteins were analysed by SDS-PAGE followed by Sypro staining. We observed one and two bands for cSTD3 and pS₂₀₉ cSTD3, respectively (Fig. 5A). To have a tool able to detect STARD3 phosphorylation in the FFAT motif core, we developed a phospho-specific antibody recognizing STARD3 when phosphorylated on S₂₀₉. (Fig. S7). cSTD3 and pS₂₀₉ cSTD3 were detected by the anti-STARD3 antibody, but only the higher species in the pS₂₀₉ cSTD3 sample was additionally detected by the anti phospho-STARD3-pS₂₀₉ antibody thus showing that a fraction of protein is phosphorylated on S₂₀₉ (Fig. 5A). As a confirmation, the analysis of pS₂₀₉ cSTD3 by mass spectrometry showed that it was present as two major species corresponding to the expected masses of the phosphorylated (MW=28,366 Da) and non-phosphorylated (28,286 Da) proteins (Fig. S8A). To confirm that the phosphorylation was indeed on S₂₀₉, recombinant pS₂₀₉ cSTD3 was digested with trypsin, and subjected to ion trap LC/MS/MS analysis (Fig. S8B). This analysis confirmed that the phosphorylation site was on S₂₀₉. Thus, we produced and purified a pS₂₀₉ cSTD3 recombinant protein genuinely phosphorylated on S₂₀₉.

Next, to examine the tethering activity, cSTD3 and pS₂₀₉ cSTD3 proteins were attached to one population of liposomes called hereafter L_A liposomes. Liposome flotation assays confirmed that the two proteins were efficiently bound onto L_A liposomes (Fig. S8 C-D, E), and that liposome-bound pS₂₀₉ cSTD3 remained phosphorylated (Fig. S8F). Then, we examined whether L_A liposomes bound with cSTD3 and pS₂₀₉ cSTD3 were able to physically associate with another population of liposomes (called L_B liposomes) covered with VAP-A by dynamic light scattering (Fig. 5B, C). To prepare L_B liposomes, a recombinant VAP-A-His₆ protein with its carboxyl-terminal transmembrane region deleted was anchored to the surface of liposomes thanks to the presence of NTA-Ni²⁺ lipids (Wilhelm *et al*, 2017). When L_A liposomes covered by pS₂₀₉ cSTD3 were mixed with L_B liposomes bearing VAP-A, a rapid increase in the mean radius of liposomes (from ~90 nm up to 500 nm) occurred, indicating a connection between the two liposome populations (Fig. 5C). This experiment was repeated with L_B liposomes lacking VAP-A, or covered with the VAP-A KD/MD mutant, and in both cases no aggregation was seen (Fig. 5C). For the cSTD3 protein no aggregation was observed even in the presence of a functional VAP (Fig. 5C). These results indicated that a unique phosphorylation of the S₂₀₉ serine in the FFAT-like motif of STARD3 allows the protein to tether membranes in a VAP-dependent manner.

Once demonstrated that pS₂₀₉ cSTD3 protein allows for the tethering of two membranes, a further step was to study the kinetics of sterol transfer between them. To do so, we measured DHE transfer in real time by FRET (Fig. 5D). L_B liposomes including both DHE (10 mol%) and DNS-PE (2.5 mol%), and covered with VAP-A-His₆ were added to L_A liposomes decorated with pS₂₀₉ cSTD3 (Fig. 5B). We observed a fast transport of DHE from the L_B to L_A liposomes within the first seconds and DHE was

entirely equilibrated between the two liposome populations after a few minutes. The initial DHE transport rate was 24.78 ± 1.07 DHE molecules/min per molecule of pS₂₀₉ cSTD3 (Fig. 5E). In contrast, when L_B liposomes were covered by VAP-A KD/MD or were naked, the transport rates were four-time slower (7.10 ± 0.15 and 7.29 ± 1.04 DHE molecules/min per pS₂₀₉ cSTD3, respectively). When cSTD3 was not phosphorylated, the transport rates measured in the presence or absence of functional VAP were similar (6.87 and 10.45 DHE molecules/min per cSTD3, respectively).

Jointly, these results showed that using *in vitro* reconstitution assays, phosphorylation of the Phospho-FFAT motif of a liposome bound STARD3 allows tethering with VAP-covered liposomes. The formation of this complex triggers a fast transfer of sterol between the two connected membranes. Thus, in a complete *in vitro* defined system, the sterol transport function of STARD3 is turned on by phosphorylation of its FFAT motif.

Phosphorylation of the FFAT motif is essential for STARD3 sterol transfer function *in vivo*

To substantiate these data, we used the fluorescent probe filipin to follow cholesterol distribution in cells. As previously described (Wilhelm *et al*, 2017), compared to control cells, HeLa cells expressing STARD3 accumulated cholesterol in late endosomes that were labelled with the CD63 marker (Fig. 6A, B and E). Next, to directly assess the contribution of S₂₀₉ in the cholesterol accumulation phenotype, cholesterol was labelled in cells expressing the non-phosphorylatable STARD3 S₂₀₉A mutant. As expected from the fact that this mutant is unable to make ER–endosome contacts (Fig. 4D), cholesterol did not accumulate in late endosomes of cells expressing STARD3 S₂₀₉A (Fig. 6C, E). Then, to assess the effect of a non-regulatable FFAT on STARD3 function, the STARD3 Conv-FFAT mutant was constructed by replacing the Phospho-FFAT of STARD3 by the conventional FFAT of the yeast transcriptional regulator Opi1p (EFFDASE) (Loewen *et al*, 2003). Cells expressing the STARD3 Conv-FFAT mutant accumulated larger amounts of cholesterol in endosomes than cells expressing the wild-type STARD3 protein (Fig. 6D). This result is consistent with our observation that STARD3 exists in non-phosphorylated and phosphorylated states in cells.

Together, these data show that phosphorylation of S₂₀₉ is necessary for STARD3 function in cholesterol transport towards late endosomes. Of interest, replacement of a phospho-FFAT with a conventional-FFAT motif, transforming it into a constitutively active motif, exacerbated the transport function of STARD3. These results support the idea that the regulation by phosphorylation of the Phospho-FFAT of STARD3 is a way to mitigate the effect of the protein on sterol distribution

MOSPD2 interacts with conventional and Phospho-FFAT motifs

We recently identified the MOSPD2 protein as a third member of the VAP family (Di Mattia *et al*, 2018). To study more precisely the binding characteristics of MOSPD2 with Phospho-FFAT motifs, we produced in *E. coli* and purified the MSP domain of MOSPD2 (Fig. 7A). Next, the recombinant MSP domain of MOSPD2 was incubated with streptavidin beads coupled to biotinylated peptides as described before for VAP. Bound proteins were eluted and analyzed by SDS–PAGE followed by Coomassie blue staining (Fig. 7B). Similarly to VAPs, the MSP domain of MOSPD2 did not interact with the non-phosphorylated FFAT of STARD3, but interacted with peptides with a phosphorylation on S₂₀₉ (Fig. 7B). We used SPR to determine the interaction dissociation constants between the different peptides and the MSP domain of MOSPD2. The concentrations used to determine affinities corresponded to a monomer for MOSPD2 since we have previously shown that the recombinant MSP

domain of the protein is monomeric (Di Mattia *et al*, 2018). The kinetic profile of the MSP domain of MOSPD2 was similar to those of VAPs (Fig. 7C-D), with one obligate phosphorylation site on S₂₀₉, and additional phosphorylation increasing the binding affinity (from $1.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$ for pS₂₀₉, to $0.35 \pm 0.16 \mu\text{M}$ for pS₂₀₉+pS₂₁₃ for instance) (Fig. 7E). Interestingly, the affinity for a conventional FFAT was similar for MOSPD2, VAP-A and VAP-B, as previously reported (Di Mattia *et al*, 2018), while MOSPD2 had a slightly higher affinity for Phospho-FFAT compared to VAP-A and VAP-B (Fig. 3E, 7E and S4E). Together, these data show that MOSPD2 interacts in the micromolar affinity range with the Phospho-FFAT motif only when it is phosphorylated on the fourth residue of the core motif.

We characterized the interaction between a phospho-FFAT and MOSPD2 *in vivo*. To do so, we immunoprecipitated GFP-tagged MOSPD2 from cells co-expressing the wild-type and mutant STARD3 proteins (Fig. 7F). Wild-type STARD3 was co-immunoprecipitated with MOSPD2. In contrast, the non-phosphorylatable STARD3 mutant S₂₀₉A was not co-precipitated (Fig. 7F). We showed before that the single phosphomimetic mutation S₂₀₉D was not sufficient to restore the interaction between STARD3 and VAP-A or VAP-B, while the double mutation S₂₀₉D/P₂₁₀A restored binding (Fig. 4A, B). MOSPD2 behaved differently: it associated, yet only moderately, with the single S₂₀₉D mutant, and not with the S₂₀₉D/P₂₁₀A double mutant (Fig. 7F); one reason could be that the tridimensional structure of the MSP domain of MOSPD2 differs from the one of VAPs.

We next addressed whether in cells MOSPD2 was forming contact sites when co-expressed with STARD3. We imaged MOSPD2 recruitment on endosomes. Since the phosphomimetic mutant of STARD3 could not fully restore the interaction *in vitro*, we only tested the effect of the non-phosphorylatable mutant STARD3 S₂₀₉A (Fig. 7I). Consistently, while wild-type STARD3 expression induced a strong enrichment of MOSPD2 around endosomes, MOSPD2 remained evenly distributed along the whole ER in the presence of the STARD3 S₂₀₉A mutant (Fig. 7 G-J). Similarly, MOSPD2 with the R404D/L406D double mutation (named RD/LD) which is defective in binding FFAT motifs remained uniformly localized in the ER (Fig. 7J).

Together, these data showed that the interaction of the MSP domain of MOSPD2 with the Phospho-FFAT motif depends on the critical phosphorylation of its central serine (S₂₀₉ in STARD3), similarly to the MSP domain of VAP-A and VAP-B. They also unveiled specific features of MOSPD2 in terms of affinity and mode of interaction.

Structural characterization of the MSP domain of MOSPD2 in complex with a conventional FFAT and a Phospho-FFAT

The 3D structure of the MSP domain of human MOSPD2 was not characterized yet. Moreover, interactions studies presented before suggest that structural differences may exist between MOSPD2 and VAP MSP domains. To document the binding mode of MOSPD2 with the two kind of FFAT motifs, we solved the structure of the MSP domain of MOSPD2 unbound (PDB ID: 6TQT), and in complex with peptides corresponding to a conventional FFAT (ORP1) (PDB ID: 6TQS) and a Phospho-FFAT (STARD3) (PDB ID: 6TQU) (Fig. 8). The structure of the apo state of the domain was resolved to 1.5 Å. The structure was broadly similar to that of rat VAP-A (PDB ID 1Z9L; (Kaiser *et al*, 2005); (rmsd of 2.382 Å over 104 residues). The main differences are seen in a flexible loop (residues 337-346 in human MOSPD2, residues 24-33 in VAP-A), and in the α -helix, which contains an extra turn at the N-terminal in MOSPD2. Besides, sequence analysis show that the residues that are conserved between the VAPs and MOSPD2 are mostly found in the region which interacts with FFATs (Fig. S9). In this binding interface, two main differences are present: i) an asparagine and a serine are swapped between the

VAP proteins and MOSPD2: N64 and S65 in VAP-A (N57 and S58 in VAP-B) are replaced with S377 and N378 in MOSPD2, respectively; ii) K52 in VAP-A is replaced with an arginine, R365.

The 3D structure of the MSP domain of rat VAP-A and human MOSPD2 bound with the conventional FFAT motif of ORP1L are similar. Superposition of the domains showed few changes in the binding interface, almost all contacts being maintained. Since N64 in VAP-A is replaced with S377 in MOSPD2, the direct hydrogen bond between sidechain of N64 and the main-chain carbonyl of A₄₇₉ in the peptide is replaced with a water-mediated contact. K52 in VAP-A is replaced with R365, which now makes a hydrogen bond with D₄₇₈ of the peptide (Fig. 8E).

However, a different story is seen when comparing the structures of human VAP-A and MOSPD2 bound to the phosphorylated FFAT of STARD3 (Fig. 8F, G). In the MOSPD2 complex, residues corresponding to positions 5th and 6th of the phospho-FFAT (P₂₁₀ and P₂₁₁) maintain broadly similar orientations than their cognate residues in the conventional FFAT (A₄₇₉ and L₄₈₀). However, a hydrogen bond cannot be maintained between P₂₁₀ of the Phospho-FFAT and the carbonyl of V364 of the MSP domain. In the conventional FFAT, a water mediated contact exists between the amide of position 6 (L₄₈₀ in ORP1) and the carbonyls of P369 and Y372 in the MSP domain. These contacts, again, cannot be maintained with the Phospho-FFAT where a proline is in position 6 of the motif. Another difference is that more residues carboxyl-terminal to the FFAT core sequence can be seen bound to the MSP domain in MOSPD2 than in VAP-A. This can be explained by specific MOSPD2 features. Firstly, as previously noted, N64 in human VAP-A is replaced with S377 in MOSPD2. This shorted side-chain allows the carbonyl and amide of pS₂₁₃ one residue after the end of the phosphorylated FFAT motif to form hydrogen bonds with the amide and hydroxyl of S377. The larger side chain of N64 in VAP-A would prevent these contacts from forming. Secondly, MOSPD2 possesses one extra turn at the N-term of the α -helix, which creates a hydrophobic pocket composed of N378, P420, L423, and T424 into which F₂₁₄, 2 residues after the FFAT motif of STARD3, can bind (Fig. 8I). The lack of this extension in VAP-A, and N378 being replaced by S65 in VAP-A would prevent a hydrophobic residue from binding here. It should be noted that the contacts between pS₂₁₃ and F₂₁₄ are only maintained in one copy of the complex in our structure. In the second copy, F₂₁₄ makes crystal contacts with a symmetry related molecule.

Finally, the structural differences seen between the unbound and complexed forms of VAP-A are not seen between the unbound and complexed forms of MOSPD2, with F405 (F95 in VAP-A) maintained in the same position as in the complexed form of VAP-A. M96 in human VAP-A is replaced in MOSPD2 with a leucine, L406, in the tp rotamer, similar to the conformation of M96 in complexed VAP-A (Fig. 8H).

We next assessed whether K363 in MOSPD2, which is at the same position as K50 in VAP-A and K43 in VAP-B, had a predominant role in binding the Phospho-FFAT. K363 of MOSPD2 was mutated in leucine (K363L mutant), and the interaction of the mutant protein with the different peptides was assessed. Unlike VAP-A and VAP-B, the MOSPD2 K363L mutation only partially affected the binding of both the conventional and the Phospho-FFAT motif (Fig. S3).

Altogether these structural and functional data show that MOSPD2 binds conventional and Phospho-FFAT on a similar interface as VAP-A, but MOSPD2 has unique and specific features which increase the binding interface, in particular a hydrophobic pocket binding the 9th residue of the FFAT motif.

Discussion

Inter-organelle contacts physically attach two distinct organelles (Loewen *et al*, 2003; Wu *et al*, 2018). These links must be reversible, because it is known that organelles associate and dissociate over time (Friedman *et al*, 2011, 2013; Valm *et al*, 2017). Such dynamics imply that there are molecular mechanisms controlling association and dissociation (Alli-Balogun & Levine, 2019). The ER makes physical connections with nearly all cellular organelles (Balla *et al*, 2019). To date no clear molecular mechanism was reported to explain a controlled and/or reversible association, except for the yeast mitochondria-vacuole contacts which were shown to be disrupted by phosphorylation of Vps39 (Hönscher *et al*, 2014). In our study, we focused on contacts made by the ER and other organelles. The ER uses VAP-A/VAP-B/MOSPD2, three distinct membrane-bound proteins, as receptors on its surface to bind proteins from other organelles (Di Mattia *et al*, 2018; Murphy & Levine, 2016). The interaction between VAP-A/VAP-B/MOSPD2 and their partners allows the formation of contacts between the ER and the other organelles of the cell, by binding a short linear motif, named FFAT, present in protein partners that are attached- or integral to other organelle membranes. This single molecular mechanism explains a large part of the formation of contact sites with the ER. How these are controlled remains unclear.

Many proteins binding to VAP-A/VAP-B/MOSPD2 have been identified over the last years (Di Mattia *et al*, 2018; Huttlin *et al*, 2015; Murphy & Levine, 2016). A number of these proteins do not have a conventional FFAT motif however their sequences suggested the presence of a other kind of FFAT motif that could be activated by phosphorylation, that we defined here as a Phospho-FFAT motif. The presence of a phosphorylatable serine/threonine residue at a key position of the motif supported the idea that phosphorylation governs the interaction with VAP-A/VAP-B/MOSPD2. Moreover, the presence of a phosphorylatable residue within the core motif would serve as a reversible switch to make contacts. Modifying the FFAT-research algorithm into a Phospho-FFAT research one allowed to identify many candidate proteins in the human proteome. Interestingly, we found that Phospho-FFAT motifs are equally distributed as conventional FFAT motifs. In addition, both motifs coexist in about half of the candidates. Taking the complex formed by STARD3 and VAP-A/VAP-B/MOSPD2 as a model, we functionally characterized Phospho FFAT motifs. We showed that in the absence of phosphorylation, the motif is not recognized by VAP-A/VAP-B/MOSPD2; phosphorylation on the 4th residue switches the motif on and allows its recognition by VAP-A/VAP-B/MOSPD2, triggers the formation of ER-endosomes contact and enables cholesterol transfer (Fig. 9).

Phosphorylation modifies the chemical properties of a protein, modulating its charge (phosphorylated serine contains 2 negative charges at physiological pH), and sometimes its shape. The FFAT motif was defined as a core flanked by an acidic tract. These adjacent D/E residues bear negative charges that are crucial during the process of recognition of the FFAT sequence by the MSP domain. Nuclear Magnetic Resonance studies revealed that the interaction of the FFAT with the MSP domain occurs in two steps: first the acidic residues make non-specific electrostatic interactions with the electropositive surface of the MSP domain (Furuita *et al*, 2010). Then, this intermediate complex is stabilized by specific interactions, notably by the phenylalanine in 2nd position of the core FFAT. Most importantly, higher numbers of negative charges (including phosphorylation) in the acidic tract, by affecting the formation of the intermediate complex, increases the apparent binding affinity of the MSP domain for the FFAT motif (Furuita *et al*, 2010). This was demonstrated for STARD11 (also known as CERT) which is phosphorylated on S₃₁₅ located in the acidic tract of its conventional FFAT motif. Phosphorylation of this serine enhances the interaction with VAP, and favors its activity of ceramide

transport in ER-Golgi contacts (Kumagai *et al*, 2014). In the case of STARD3, we found that the kinetics of sterol transport *in vitro* were similar when the START domain of STARD3 was associated with a conventional FFAT motif (Wilhelm *et al*, 2017), or with its own Phospho-FFAT motif bearing a single phosphorylation on the fourth core residue S₂₀₉. We can then speculate that in the case of STARD3, additional phosphorylations in the vicinity of the Phospho-FFAT could increase the speed of sterol transport; unfortunately, we could not test this as the production in *E. coli* of the protein with several phosphorylated serines was unsuccessful. However, we did show that additional phosphorylations, such as the one on S₂₁₃, increase the affinity of VAP for the FFAT motif. Thus, phosphorylations are involved in two different types of regulation: phosphorylation can act as a switch to turn on and off the interaction, and it can act as a modulator to increase the affinity between VAP-A/VAP-B/MOSPD2 and their partners, and possibly fine-tune the function of the complex.

Proteins involved in inter-organelle contacts have targeting determinants for two distinct organelles to bridge them (Alli-Balogun & Levine, 2019). Thus, the regulation of these targeting determinants can theoretically modulate MCS formation. For instance, OSBP is targeted to the Golgi by the affinity of its PH domain for PI(4)P (phosphatidylinositol 4-phosphate), and to the ER by its FFAT motif which interacts with VAP (Mesmin *et al*, 2013). The regulation of PI(4)P levels affects OSBP's ability to bind to the Golgi (Mesmin *et al*, 2017), and thus to generate ER-Golgi contacts. Interestingly, protein phosphorylation can also regulate PI(4)P recognition (Kumagai *et al*, 2007; Sugiki *et al*, 2018). In the case of STARD3, only the binding with VAPs or MOSPD2 can be regulated; the other targeting determinant, the anchorage in the endosome membrane, is constitutive. It is intriguing to note that most of the proteins which possess a unique Phospho-FFAT motif that we tested (namely STARD3, MIGA2, PTPIP51, Kv2.1 and Kv2.2) are anchored to membranes by a transmembrane domain, thus regulation must occur on the second determinant of the bridge, i.e. the targeting to the ER, mediated by VAP-A/VAP-B/MOSPD2 interaction.

Our search for Phospho-FFAT motifs was restricted to human proteins but it can be extended to other species. For instance, yeast cells have two VAPs named Scs2 and Scs22 which were shown to be involved in MCS formation (Murphy & Levine, 2016); it would be interesting to know if Phospho-FFAT motifs exist and are functional in other species. Besides, it has been shown that viruses and parasites can hijack resources from the cell by promoting the formation of MCSs. For instance, the obligate intracellular bacterium *Chlamydia trachomatis* resides in a membrane-bound compartment which contacts the ER; the pathogen-containing vacuole bears a *Chlamydia* protein named IncV which interacts with VAP proteins to promote the formation of contacts with the ER (Stanhope *et al*, 2017). IncV possesses both conventional and non-conventional FFAT motifs (threonine in the 4th position) which are equally involved in the interaction with VAP. Norovirus NS2 protein also uses a non-conventional Phospho-FFAT motif: NYMTPPE (McCune *et al*, 2017).

The characterization of the 3D structure of VAP and MOSPD2 bound to conventional and Phospho-FFATs reveals unique features and specific modes of binding. Regarding the type of FFAT, the main difference lies in the geometry as phosphoserine is longer than aspartic acid, which modifies several contacts at the FFAT-MSP interface. Comparing MOSPD2 and VAPA, these three domains are overall similar: the hydrophobic pocket and the charged residues binding the second (F/Y) and fourth (D/E or pS) residue of the FFAT motif, respectively, are conserved. However, a striking difference is found in MOSPD2 which forms a second hydrophobic pocket accommodating an aromatic residue (F₂₁₄) of the Phospho-FFAT of STARD3. This pocket most probably binds hydrophobic residues present in position +9 of some FFAT motifs, and might account for the stronger affinity of FFATs with this feature for MOSPD2 compared to VAPA/B.

VAP-A and VAP-B are more closely related to each other (82% identity; 93% similarity) than they are to MOSPD2 (~30% of identity and ~50% of similarity between VAPs and MOSPD2). Our finding that some FFAT-containing proteins interact with VAPA/B but not with MOSPD2 raises the possibility that the repertoires of proteins bound by these receptors are not identical; some FFATs likely bind the three receptors, while others may have a better affinity or a selectivity for one or the other. This is expected because MOSPD2 appeared more recently than VAP during evolution, and is only found in Metazoan. Comparative proteomics studies will be required to inventory the partner repertoire of these three proteins.

Overall, this study shows that the formation of MCSs by VAP-A/VAP-B/MOSPD2 can be switched on and off by phosphorylation of some of their partners. This mechanism makes contact formation controllable through signaling. Such regulation by phosphorylation of Phospho-FFATs could originate through direct signaling in response to an outside or an inner cell signal, or indirectly via transcription. The kinases and phosphatases regulating this process, as yet unknown, will most probably be different depending on their primary target, i.e. the partner of VAP-A/VAP-B/MOSPD2. The identification of kinases and phosphatases switching on and off Phospho-FFATs is the next step to understand how these regulatory processes are integrated in the cell.

Figure 1: Identification of novel category of FFAT motifs regulated by phosphorylation.

A: Schematic representation of STARD3, FIP200, MIGA2, PTPIP51, KCNB1 and KCNB2 proteins and sequence of their Phospho-FFAT motif (7 core residues and 4 upstream and downstream residues). Note that position 4 of the FFAT (boxed) of these proteins is occupied by a serine or a threonine while conventional FFATs have an aspartic acid. Blue rectangles represent transmembrane helices. TPR: Tetratricopeptide repeat; LDT: lipid droplet targeting domain; BTB: Potassium channel tetramerisation-type BTB domain.

B: Sequence of the peptides used for the pull-down assays. The peptides are composed of an amino-terminal biotin, a linker sequence and the FFAT sequence of STARD3 (residues 200–216), FIP200 (residues 725–741), MIGA2 (residues 286–302), PTPIP51 (residues 151–167), Kv2.1 (residues 584–600) and Kv2.2 (residues 599–615) either without or with a phosphorylated residue (serine or threonine) at position 4 of the core FFAT motif. Acidic (DE) or phosphorylated residues (pS and pT), alcoholic (ST), and aromatic (FY) residues are in red, green and blue, respectively.

C: Western blot analysis of proteins pulled down using the peptides described in B. The input fraction corresponds to HeLa cell total protein extract. Bound proteins were analyzed by Western blot using anti VAP-A, anti VAP-B and anti-MOSPD2 antibodies. Actin was used as a loading control.

D: Venn diagram of VAPs and/or MOSPD2 partners with FFAT scores between 0 and 3. Proteins with a Phospho-FFAT and a conventional FFAT are shown in green and red, respectively. 42 proteins possess both a Phospho and a conventional FFAT. Consensus sequences of the 110 Phospho-FFAT (left) and 94 conventional FFAT (right) identified are shown as sequence logos.

E: List of selected VAP-A, VAP-B or MOSPD2 partners having a potential Phospho-FFAT motif. For a full list, see Table S2.

Figure 2: STARD3 has a non-conventional FFAT motif which needs to be phosphorylated to form a complex with VAP proteins.

A: Schematic representation of STARD3. The Phospho-FFAT motif of STARD3 and the conventional FFAT motif sequences are aligned and highlighted in pink. Upper numbers correspond to the position of residues in STARD3. Lower numbers correspond to the position of residues in the FFAT sequence as described in (Loewen *et al*, 2003). Acidic (DE), alcoholic (ST) and aromatic (FY) residues are in red, green and blue, respectively. Phosphorylated serines identified by LC/MS/MS are boxed, and the phosphosite probability determined with PhosphoRS is indicated.

B: Coomassie blue staining of the recombinant wild-type MSP domains of VAP-A and VAP-B, and of the KD/MD mutant of VAP-A, after SDS-PAGE.

C: Recombinant MSP domains pulled down with peptides corresponding to the Phospho-FFAT motif of STARD3 (unphosphorylated; mono-phosphorylated on S₂₀₉ or S₂₁₃; bi-phosphorylated on S₂₀₉ and S₂₁₃), and with the control peptides were revealed by Coomassie blue staining. The recombinant proteins subjected to the assay are showed in the input fraction.

D-I: Structure of the MSP domain of VAP-A in complex with a Phospho-FFAT motif. Ribbon diagram (D) and surface representation (E) of the MSP domain of VAP-A in complex with the Phospho-FFAT of STARD3 depicted in stick model. The protein surface is colored according to the YRB scheme, showing hydrophobic, negatively and positively charged atoms in yellow, red and blue, respectively; the other atoms are in white (Hagemans *et al*, 2015).

F-G: Close-up view of the hydrophobic pocket region in the Apo (F) and the Phospho-FFAT-bound (G) VAP-A; residues of VAP-A constituting the pocket are indicated.

H: Close-up view of the structure near the Phospho-FFAT motif highlighting critical residues (in stick model) of human VAP-A present in the binding interface. I: Close-up view of the structure near the conventional FFAT of ORP1 as described in (PDBID: 1Z9O; Kaiser et al., 2005), highlighting critical residues of rat VAP-A involved in the interaction. The nomenclature for rat VAP-A residues is based on the Uniprot sequence (Q9Z270) and not on the PDB file 1Z9O.

J: Superposition of the two structures shown in (H) and (I) showing the different trajectories of the C-terminal parts of the peptides.

Phosphorous, nitrogen, oxygen, and sulfur atoms are colored in orange, blue, red, and yellow, respectively. Carbon atoms are shown in green and grey in the MSP domain and the FFAT motif, respectively. The numbers of the peptide residues are noted in subscript.

Figure 3: The MSP domain binds the phosphorylated Phospho-FFAT with an affinity in the micromolar range.

A-D: Surface plasmon resonance analysis of the MSP domain of VAP-A binding onto immobilized unphosphorylated (A), monophosphorylated pS₂₁₃ (B) or pS₂₀₉ (C), and bi-phosphorylated pS₂₀₉+pS₂₁₃ (D) STARD3 FFAT peptides. Representative sensorgrams resulting from the interaction between the MSP domain of VAP-A injected at different concentrations and the different FFAT peptides are shown in A, B, C Left, and D Left. Binding curves display the SPR signal (RU) as a function of time. Concentrations printed in bold indicate samples measured twice. Signal obtained for the negative control peptide immobilized on another flowcell is systematically subtracted, as well as the bulk effect recorded with buffer only.

C (Right) and D (Right): Steady-state analysis of the interaction between pS₂₀₉ (C) and pS₂₀₉+pS₂₁₃ (D) STARD3 FFAT peptide, and the MSP domain of VAP-A. Equilibrium responses (Req) extracted from the left panel in association phase were plotted as a function of the dimeric MSP domain of VAP-A concentration, and fitted with a Langmuir binding model.

E: Interaction dissociation constants between peptides corresponding to different kind of FFAT motifs and the MSP domains of VAP-A and VAP-B. The kinetic experiments were performed at 25 °C in Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 75 mM buffer supplemented with 0.005% (v/v) surfactant polysorbate 20 (P20, GE Healthcare). Mean of n independent experiments: n=2 for pS₂₀₉ and pS₂₀₉+pS₂₁₃; 3 for pS₂₁₃; and 4 for the non-phosphorylated FFAT. Uncertainties are obtained from the standard deviation considering a *t*-distribution coefficient for a risk factor of 32%.

Figure 4: *In vivo*, a unique phosphorylation of the Phospho-FFAT motif allows STARD3 and VAP-A/VAP-B complex formation and the establishment of ER-endosome contacts.

A-B: Binding assays. Immunoprecipitation (GFP-Trap) experiments between GFP-tagged VAP-A (WT and KD/MD mutant; A), VAP-B (B) and Flag-tagged STARD3 (WT and S₂₀₉A, S₂₀₉D and S₂₀₉D/P₂₁₀A mutants). Approximately 5 µg of total protein extracts were analyzed by Western blot using anti-Flag, anti-GFP and anti-Actin antibodies. Immunoprecipitated material was analyzed using anti-Flag and anti-GFP antibodies.

C-G: Recruitment assays. G GFP-VAP-A (C, D, E, G; green) and GFP-VAP-A KD/MD-expressing cells (F; green) were transfected with Flag-STARD3 (C, F), Flag-STARD3 S₂₀₉A (D), Flag-STARD3 S₂₀₉D/P₂₁₀A (E), or left untransfected (G), and labelled using anti-Flag (magenta) antibodies. The subpanels on the right are higher magnification (3.5×) images of the area outlined in white. The Overlay panel shows merged green and magenta images. The Coloc panel displays a colocalization mask on which pixels where the green and the magenta channels co-localize are shown in white. Scale bars: 10 µm.

H: Pearson's correlation coefficients between VAP-A (WT or KD/MD mutant) and STARD3 (WT or S₂₀₉A, S₂₀₉D, S₂₀₉D/P₂₁₀A, FA/YA mutants) staining are shown. Each dot represents a single cell (number of cells: VAP-A–STARD3: 22; VAP-A–STARD3 S₂₀₉A: 25; VAP-A–STARD3 S₂₀₉D: 27; VAP-A–STARD3 S₂₀₉D/P₂₁₀A: 26; VAP-A–STARD3 FA/YA: 20; VAP-A KD/MD–STARD3: 20, from at least three independent experiments). Means and error bars (SD) are shown. Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparison test (**P < 0.01; ***P < 0.001).

Figure 5: Phosphorylation of STARD3 in its Phospho-FFAT motif governs membrane attachment and cholesterol transfer in *in vitro* reconstituted assays.

A: SDS–PAGE gel and western blot analysis of purified cSTD3 and pS₂₀₉ cSTD3 proteins. Top: the gel was stained with Sypro Orange to visualize proteins and molecular weight markers. Bottom: two similar gels were blotted onto nitrocellulose and analysed for the presence of total and STARD3–pS₂₀₉ using specific antibodies.

B: Description of the experimental strategy. L_A liposomes (endosome-like) are decorated with cSTD3 or pS₂₀₉ cSTD3 owing to covalent links with MPB-PE, and mixed with L_B liposomes (ER-like) covered by VAP_{HIS6} attached to DOGS-NTA-Ni²⁺. For DHE transport experiment, L_B liposomes also contain DHE and a dansylated lipid (DNS-PE). The transport of DHE from L_B to L_A liposomes is followed by FRET.

C: Aggregation assays. L_A liposomes (50 μM total lipids) were incubated for 5 minutes with cSTD3 or pS₂₀₉ cSTD3 (380 nM). Then, L_B liposomes (50 μM total lipids) and VAP-A_{HIS6} or VAP-A KD/MD_{HIS6} (700 nM) were successively added. *Left panels*: mean radius (black dots) and polydispersity (shaded area) over time. *Right panels*: size distribution before (grey bars) and after the reaction (black bars).

D: DHE transport assay. DOPC liposomes (62.5 μM total lipids, L_A) containing 3 mol% MPB-PE were mixed with cSTD3 or pS₂₀₉ cSTD3 (475 nM). After 5 min, liposomes (DOPC/DOGS-NTA-Ni²⁺/DNS-PE/DHE liposomes 77.5/10/2.5/10 mol/mol, 62.5 μM total lipids, L_B), covered or not with 1 μM of VAP_{HIS6} or VAP-A KD/MD_{HIS6}, were added.

E: Initial DHE transport rate measured with cSTD3 or pS₂₀₉ cSTD3 in the presence or absence of VAP-A_{HIS6} or VAP-A KD/MD_{HIS6}. Data are represented as mean ± s.e.m. (n = 3 for cSTD3-VAP and n=4 for all other data). Mann-Whitney test (*: P < 0.05).

Figure 6: STARD3-mediated cholesterol transport in endosomes depends on S₂₀₉.

A–D: HeLa/Ctrl (A), HeLa/STARD3 (B), HeLa/STARD3 S₂₀₉A (C) and HeLa/STARD3 Conv-FFAT (D) cells were labeled with anti-STARD3 antibodies (green), anti-CD63 antibodies (magenta) and with the fluorescent cholesterol probe filipin (Cyan Hot). Nuclei are stained in gray (TO-PRO-3). Higher magnification images (2x) of the area outlined in white are shown on the right. The filipin, STARD3 and CD63 merged image is labeled Overlay. Scale bars: 10 μm.

E: Relative fluorescence intensity of intracellular filipin signals in endosomes of HeLa/Ctrl, HeLa/STARD3, HeLa/STARD3 S₂₀₉A and HeLa/STARD3 Conv-FFAT cells. The fluorescence intensity of individual cells from 2 independent experiments is shown. Means and error bars (SD) are shown. Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparison test (*P < 0.05).

Figure 7: MOSPD2 interacts with the Phospho-FFAT motif in a phosphorylation-dependent manner.

A: Coomassie blue staining of the recombinant MSP domain of MOSPD2 after SDS–PAGE.

B: Recombinant MSP domains pulled down with STARD3 FFAT peptides (unphosphorylated, mono-phosphorylated on S₂₀₉ or S₂₁₃, bi-phosphorylated on S₂₀₉ and S₂₁₃, or tri-phosphorylated on S₂₀₃, S₂₀₉

and S₂₁₃ and control peptides were revealed by Coomassie blue staining. The recombinant proteins subjected to the assay are shown in the input fraction.

C-D: Surface plasmon resonance analysis of the MSP domain of MOSPD2 binding onto immobilized unphosphorylated (C) and pS₂₀₉ (D) STARD3 FFAT. Representative sensorgrams resulting from the interaction between the MSP domain of MOSPD2 injected at different concentrations and the different FFAT peptides are shown in C and D Left. Binding curves display the SPR signal (RU) as a function of time. Concentrations printed in bold indicate samples measured twice. Signal obtained for the negative control peptide immobilized on another flowcell is systematically subtracted, as well as the bulk effect recorded with buffer only. D (right): steady-state analysis of the interaction between pS₂₀₉ STARD3 FFAT peptide and the MSP domain of MOSPD2. Equilibrium responses (Req) extracted from the left panel were plotted as a function of the monomeric concentration of the MSP domain of MOSPD2, and fitted with a 1:1 binding model. The experiments were performed at 25 °C in Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 75 mM buffer supplemented with 0.005% (v/v) surfactant polysorbate 20 (P20, GE Healthcare). Mean of 2 independent experiments. Uncertainties are obtained from the standard deviation considering a *t*-distribution coefficient for a risk factor of 32%.

E: Interaction dissociation constants between the different STARD3 FFAT peptides and the MSP domains of MOSPD2.

F: Immunoprecipitation (GFP-Trap) experiments between GFP-tagged MOSPD2 and Flag-tagged STARD3 (WT and S₂₀₉A, S₂₀₉D and S₂₀₉D/P₂₁₀A mutants). Approximately 5 µg of total protein extracts were analyzed by Western blot using anti-Flag, anti-GFP and anti-Actin antibodies. Immunoprecipitated material was analyzed using anti-Flag and anti-GFP antibodies.

G-I: GFP-MOSPD2-expressing cells were left untransfected (G) or transfected with Flag-STARD3 (H) and Flag-STARD3 S₂₀₉A (I), and labelled using anti-Flag (magenta) antibodies. The subpanels on the right are higher magnification (3.5×) images of the area outlined in white. The Overlay panel shows merged green and magenta images. The Coloc panel displays a colocalization mask on which pixels where the green and the magenta channels co-localize are shown in white. Scale bars: 10 µm.

J: Pearson's correlation coefficients between MOSPD2 (WT or RD/LD) and STARD3 (WT, S₂₀₉A or FA/YA) staining are shown. Each dot represents a single cell (number of cells: MOSPD2–STARD3: 22; MOSPD2–STARD3 S₂₀₉A: 21; MOSPD2–STARD3 FA/YA: 20; MOSPD2 RD/LD–STARD3: 17, from at least three independent experiments). Means and error bars (SD) are shown. Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparison test (**P < 0.01; ***P < 0.001).

Figure 8: Structure of the MSP domain of MOSPD2 in its apo form, and in complex with a conventional FFAT and a Phospho-FFAT.

A-C: Ribbon diagram of the MSP domain of MOSPD2 in its apo form (A), in complex with the conventional FFAT of ORP1 (B), and in complex with the Phospho-FFAT of STARD3 (C).

D: Surface representation of the MSP domain of MOSPD2 in complex with the conventional FFAT of ORP1. E: Close-up view of the structure near the conventional FFAT motif highlighting critical residues (in stick model) of human MOSPD2 present in the binding interface.

F: Surface representation of the MSP domain of MOSPD2 in complex with the phosphorylated FFAT of STARD3. G: Close-up view of the structure near the Phospho-FFAT motif highlighting critical residues (in stick model) of human MOSPD2 present in the binding interface.

H and I: Close-up view of the hydrophobic pockets interacting with the second residue (F₂₀₇) (H) and the ninth residue (F₂₁₄) (I) of the Phospho-FFAT of STARD3; residues of MOSPD2 constituting the pockets are indicated.

J: Superposition of the structures shown in (E) and (G) showing the similar trajectories of the peptides. Phosphorous, nitrogen, and oxygen atoms are colored in orange, blue, and red, respectively. Carbon atoms are shown in slate blue, grey and rose in the MSP domain, the classic FFAT motif, and the Phospho-FFAT motif, respectively. D, F, H, I: the protein surface is colored according to the YRB scheme, showing hydrophobic, negatively and positively charged atoms in yellow, red and blue, respectively; the other atoms are in white (Hagemans *et al*, 2015)

Figure 9: Phosphorylation acts as a switch for inter-organelle contacts formation

Schematic representation of the two types of FFATs: (left) conventional FFATs (illustrated here with STARD11/CERT) which allow the formation of a stable complex between VAPs/MOSPD2 and thus the formation of membrane contact sites; (right) a novel type of FFATs, that we named Phospho-FFATs (illustrated here with STARD3), which strictly depend on phosphorylation to be active. Thus, phosphorylation acts as a switch mechanism to turn on the interaction between VAPs/MOSPD2 and their partners possessing a Phospho-FFAT, and thus membrane contact site formation.

Supplementary Figures

Figure S1: MS/MS spectrum of peptides phosphorylated on S₂₀₉, S₂₁₃, S₂₁₇ and S₂₂₁.

MS/MS spectrum of peptides phosphorylated on S₂₀₉ (A), S₂₁₃ (B) S₂₁₇ (C) and S₂₂₁ (D). The molecular weight of peptides is indicated on the right. Spectra are an assembly of ions produced by collision-induced dissociation of the precursor peptides. Fragmentation occurs preferentially at peptide bonds to generate b and y ions, which extend from the amino and carboxy terminus, respectively. The precursor peptide sequence and the different b and y ions identified in the spectrum are shown above. b and y ions peaks are shown in red and blue, respectively. b and y ions with the highest intensity are labeled on the spectrum. Neutral mass losses of H₂O, NH₃, and H₃PO₄ (P) are indicated. Analysis of y and b ion fragmentation patterns showed that S₂₀₉ (A), S₂₁₃ (B), S₂₁₇ (C), and S₂₂₁ (D) were phosphorylated *in vivo*.

Figure S2: Structure comparison of the Phospho-FFAT-bound and unbound MSP domain of VAP-A.

Structure superposition the Phospho-FFAT-bound VAP-A (yellow) and the unbound VAP-A (pink). The main change between the FFAT-bound and unbound VAP-A is related to F95: in the unbound chains, the side-chain of this residue seems to be disordered, but weak density can be seen for both the m-80 (chi angles: 306°, 284°) and t80 (chi angles: 192°, 88°) rotamers (with an associated double conformation of C128). In the chains bound to the peptide the side chain is well ordered in the m-80 rotamer, but slightly rotated away from C128 (chi angles: 277°, 277°). This orientation of the side-chain places it between the side-chains of T53 and V78, forcing T53 to move from the p rotamer (chi: 80°) to the t rotamer (chi: 175°). This rotamer change shifts the hydroxyl of the side-chain to make a contact with the amide of A55, and it now no longer faces the solvent. Instead, the γ carbon of T53 now faces the side chains of Y₂₀₈ and P₂₁₀ of the STARD3 peptide (although the contacts are quite long). This also pushes the side-chain of T53 causing a shift of the main chain positions of residues 51-54. This also shifts the side-chain conformation of K52 which may influence how it can bind to the phosphoserine of the peptide. The conformation of M96 (and by association, D123) is also changed between the unbound and complexed forms of the domain. In the unbound form, M96 is in the MPP rotamer (chi angles: 293°, 77°, 70°) which shifts to the ttp rotamer (chi angles: 188°, 179°, 74°) when bound to the STARD3 peptide. This opens up the hydrophobic pocket which allows F₂₀₇ of the peptide to bind. The change in conformation of D123 allows a hydrophobic interaction with M96. M96 also now forms hydrophobic contacts with the aliphatic part of the side-chain of K52, which may stabilize its conformation. These residues are all conserved between human and rat VAP-A and adopt similar conformations in the structure of rat VAP-A in complex with the conventional FFAT motif of ORP1 (PDB ID: 1Z9O) with the different orientation of the peptide bringing A₄₇₉ in to close proximity to the reoriented T53 (not shown). It should be noted that in the unbound structure of rat VAP-A (PDB ID: 1Z9L) these residues are in similar conformations to the bound form, although a close examination of the electron density suggests that F95 may be partially disordered, and T53 is in a double conformation (not shown). M96 is also in a similar position to the complexed form, though it is making crystals contacts with the side chain of S100 in a symmetry related molecule, which may stabilize it in the ttp rotamer.

Figure S3: Interaction of VAP-A K50L, VAPB K43L and MOSPD2 K363L mutants with conventional and Phospho-FFAT motifs.

Wild-type and mutant MSP domains were pulled down with phosphorylated STARD3 (pS₂₀₉ + pS₂₁₃), ORP1L FFAT peptides, and with the negative control peptide. The input fraction corresponds to the recombinant proteins used in the assay. Input and bound proteins were revealed by Coomassie blue staining. Note that lysine K50 in VAP-A and K43 in VAP-B are required for the interaction with a Phospho-FFAT, and not with a conventional FFAT.

Figure S4: The MSP domain of VAP-A/VAP-B/MOSPD2 binds the phosphorylated Phospho-FFAT with an affinity in the micromolar range.

A: Sequence of the peptides used for SPR and the pull-down assays. The peptides are composed of an amino-terminal biotin, a linker sequence and the FFAT sequence of STARD3 (residues 200–216) either without phosphorylated serine, or with combinations of phosphorylated serines (positions 203, 209 and 213 in STARD3 protein). ORP1 FFAT peptide corresponding to residues 469–485 (Accession Number Q9BXW6-1), and a random sequence (control peptide) are used as positive and negative control, respectively. Acidic (DE) or phosphorylated serine (pS), alcoholic (ST) and aromatic (FWY) residues are in red, green and blue, respectively.

B-D: Surface plasmon resonance analysis of the MSP domain of VAP-A binding onto immobilized ORP1 FFAT peptide (B), pS₂₀₃ (C) or pS₂₀₃+pS₂₀₉+pS₂₁₃ (D) STARD3 FFAT peptides. Representative sensorgrams resulting from the interaction between the MSP domain of VAP-A injected at different concentrations and the different STARD3 FFAT peptides are shown in B Left, C, and D Left. Binding curves display the SPR signal (RU) as a function of time. Concentrations printed in bold indicate samples measured twice. B and D (right): Steady-state analysis of the interaction between ORP1 FFAT (B) and pS₂₀₃+pS₂₀₉+pS₂₁₃ (D) STARD3 FFAT peptide and the MSP domain of VAP-A. Equilibrium responses (R_{eq}) extracted from the left panel were plotted as a function of the dimeric MSP domain of VAP-A concentration, and fitted with a Langmuir binding model.

E: Interaction dissociation constants between the different FFAT peptides and the MSP domains of VAP-A, VAP-B and MOSPD2. MSP concentrations are expressed as dimer for VAP-A and VAP-B, and monomer for MOSPD2. The different ionic strength correspond to the following buffers (pH 7.5): low: Tris HCl 20 mM, NaCl 75 mM; medium: Tris HCl 50 mM, NaCl 75 mM; high: Tris HCl 50 mM, NaCl 300 mM. Buffers were supplemented with P20 (0.005% v/v). ND: not determined. Mean values of *n* independent experiments: *n*=2 for pS₂₀₉, pS₂₀₉+pS₂₁₃ and S₂₀₃+pS₂₀₉+pS₂₁₃ (high); 4 for pS₂₀₃+pS₂₀₉+pS₂₁₃ (low), ORP1 (low and high), and pS₂₀₃+pS₂₀₉+pS₂₁₃ (medium) with MOSPD2; 6 for pS₂₀₃+pS₂₀₉+pS₂₁₃ (medium) with VAP-A and VAP-B; 12, 11 and 7 for ORP1 (medium) with VAP-A, VAP-B and MOSPD2, respectively. Uncertainties are obtained from the standard deviation considering a *t*-distribution coefficient for a risk factor of 32%.

Figure S5: STARD3 and VAP-A/VAP-B or MOSPD2 complex formation requires a unique phosphorylation of the Phospho-FFAT motif.

Western blot analysis of proteins pulled down using the peptides described Fig. S4A. The input fraction corresponds to the HeLa cell total protein extract. The streptavidin beads were first coupled to the indicated biotinylated peptides, or left without peptide (\emptyset). The soluble fraction after the incubation of the protein extract with the beads (Unbound; left), and proteins attached to the beads (Bound; right) were analyzed by Western blot using anti VAP-A, VAP-B and MOSPD2 antibodies. Actin was used as a loading control.

Figure S6: Effect of non-phosphorylatable and phosphomimetic mutations of S₂₀₉ on the formation of ER-endosome contacts involving VAP-B *in vivo*.

A-D: GFP-VAP-B (A-D; green)-expressing cells were left untransfected (A) or transfected with Flag-STARD3 (B), Flag-STARD3 S₂₀₉A (C) and Flag-STARD3 S₂₀₉D/P₂₁₀A (D), and labelled using anti-Flag (magenta) antibodies. The subpanels on the right are higher magnification (3.5×) images of the area outlined in white. The Overlay panel shows merged green and magenta images. The Coloc panel displays a colocalization mask on which pixels where the green and the magenta channels co-localize are shown in white. Scale bars: 10 μm.

E: Pearson's correlation coefficients between VAP-B (WT and KD/MD) and STARD3 (WT, S₂₀₉A, S₂₀₉D, S₂₀₉D/P₂₁₀A or FA/YA mutants) staining are shown. Each dot represents a single cell (number of cells: VAP-B–STARD3: 20; VAP-B–STARD3 S₂₀₉A: 18; VAP-B–STARD3 S₂₀₉D: 27; VAP-B–STARD3 S₂₀₉D/P₂₁₀A: 26; VAP-B–STARD3 FA/YA: 21; VAP-B KD/MD–STARD3: 21, from at least three independent experiments). Means and error bars (SD) are shown. Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparison test (**P < 0.01; ***P < 0.001).

Figure S7: Analysis of the anti phospho-STARD3-pS₂₀₉ antibody recognizing STARD3 when phosphorylated on S₂₀₉.

A: Western blot analysis of protein extracts from HeLa cells transfected with constructs expressing wild-type STARD3 (lane 2), or the STARD3 S₂₀₉A mutant (lane 3). STARD3 was detected with an antibody recognizing both the phosphorylated- and non-phosphorylated protein (herein referred to as anti-STARD3) raised against a different part of the protein (the START domain of STARD3) and with the anti phospho-STARD3-pS₂₀₉ antibody. The anti-STARD3 antibody (total STARD3) recognized equally STARD3 and STARD3 S₂₀₉A proteins, while the anti-phospho-STARD3-pS₂₀₉ antibody recognized only the wild-type form of the protein. The anti phospho-STARD3-pS₂₀₉ antibody is unable to detect the non phosphorylatable mutant STARD3 S₂₀₉A. Actin was used as a loading control.

B: Western blot analysis of endogenous STARD3 immunoprecipitated from HeLa cells. STARD3 was immunoprecipitated and detected using antibodies raised in mouse and rabbit, respectively. STARD3 was equally recognized by the anti-STARD3 and anti phospho-STARD3-pS₂₀₉ antibody thus showing that endogenous STARD3 is phosphorylated on S₂₀₉ in HeLa cells. HeLa cells transfected with siRNAs targeting STARD3 were used as control for the specificity of the antibodies (lane 3). *: aspecific band.

C: Western blot analysis of STARD3 phosphorylation in the HCC1954 breast cancer cell line that naturally expresses high amounts of STARD3. Endogenous STARD3 was immunoprecipitated from HCC1954 cells (lanes 1, 4), and HCC1954 cells transfected with a control siRNA (lanes 2, 5) or an siRNA targeting STARD3 (lanes 3, 6). STARD3 was immunoprecipitated and detected using antibodies raised in mouse and rabbit, respectively. STARD3 was detected with the anti-STARD3 (total STARD3) and the anti phospho-STARD3-pS₂₀₉ antibodies in wild-type cells and in cells transfected with a control siRNA; no band was detected in cells silenced for STARD3. Calf Intestinal Phosphatase (CIP) treatment, that removes the phosphate group from phosphorylated residues, almost completely abolished the recognition of STARD3 by the anti phospho-STARD3-pS₂₀₉ antibody. eIF4A3 was used as a loading control.

Figure S8: Characterization of cSTD3 and pS₂₀₉ cSTD3 purified from *E. coli*

A: Mass spectrometry analysis of pS₂₀₉ cSTD3 protein. Four major proteins are detected: two correspond to the non-phosphorylated (28,286.18 Da; theoretical MW: 28,287.98) and the

phosphorylated (28,365.74 Da; theoretical MW: 28,367.96) cSTD3, respectively. The two other proteins correspond to the non-phosphorylated (27,778.89) and the phosphorylated (27,859.30 Da) cSTD3 exhibiting an N-terminal deletion of 5 residues (GSCLF). The deletion was verified by MS/MS (data not shown).

B: MS/MS spectrum of a peptide phosphorylated on S₂₀₉. The precursor peptide sequence and the different b (red) and y (blue) ions identified in the spectra are shown above. b and y ions with the highest intensity are labeled on the spectrum. Neutral mass losses of H₂O, NH₃, and H₃PO₄ (P) are indicated. The phosphosite probability determined with PhosphoRS was 96%.

C-E: Flotation assays: pS₂₀₉ cSTD3 (C) and cSTD3 (D) (1.5 μM) were incubated with DOPC liposomes doped or not with 3 mol% MPB-PE (750 μM total lipids), in TN buffer for 10 minutes at 25°C, under agitation (850 rpm). After centrifugation, the top and bottom fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE. The 100% lane was used to determine the fraction of cSTD3 present in the top fraction, thus bound to liposomes (E). Error bars show the s.e.m. from three independent experiments.

F: Analysis of the phosphorylation of pS₂₀₉ cSTD3 bound to liposomes. cSTD3 pS₂₀₉ (1.5 μM) was incubated with DOPC liposomes, containing or not 3 mol% MPB-PE (750 μM lipids) for 10 minutes at 25°C under agitation. After centrifugation, the top and bottom fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE. Proteins were stained with Sypro, and analysed by Western Blot using anti-STARD3 and anti-STARD3 pS₂₀₉ antibodies.

Figure S9: Sequence conservation between VAP-A, VAP-B and MOSPD2

A: Sequence alignment of the MSP domains of human MOSPD2, VAP-A, and VAP-B. Numbers refer to amino acid positions. Identical and conserved residues between the three proteins are labeled in red and pink, respectively. Sequences were aligned with ClustalW (Larkin *et al*, 2007) and formatted with Jalview (Waterhouse *et al*, 2009).

B: Structure of the MSP domain of MOSPD2 in complex with a Phospho-FFAT. Identical and conserved residues with VAP-A and VAP-B are labeled in red and pink, respectively.

Tables:

Table S1: List of proteins possessing a Phospho-FFAT score below 3.

Of 20373 proteins analyzed, 3442 proteins had a Phospho-FFAT motif with a score between 0 and 3 (included). This list includes the name, Uniprot ID, length (residues), two best Phospho-FFAT scores (Phospho-FFAT SCORE1 and SCORE2), and the best conventional FFAT score (Conventional FFAT SCORE) of these proteins. For each score, the position of the potential FFAT in the protein, as well as the N-terminal, core and C-terminal sequences are shown. Proteins studied in this article are labelled with a green background. A color scale from orange to blue is used to identified scores (dark to light orange: 0-3, light to dark blue = above 3.5). Acidic, phosphorylatable (S, T only), and aromatic (F, Y only) residues are shown in red, green and blue.

Table S2: Protein partners of VAPs and MOSPD2 possessing a Phospho-FFAT score below 3.

Of the 3442 proteins identified in Table S1, 109 are known VAPs and/or MOSPD2 partners (Biogrid, IntAct and (Di Mattia *et al*, 2018); (Orchard *et al*, 2014; Oughtred *et al*, 2019). This list includes the name, Uniprot ID, length (residues), two best Phospho-FFAT scores (Phospho-FFAT SCORE1 and SCORE2), and the best conventional FFAT score (Conventional FFAT SCORE) of these proteins. For each score, the position of the potential FFAT in the protein, as well as the N-terminal, core and C-terminal

sequences are shown. Proteins studied in this article are labelled with a green background. A color scale from orange to blue is used to identified scores (dark to light orange: 0-3, light to dark blue = above 3.5). Acidic, phosphorylatable (S, T only), and aromatic (F, Y only) residues are shown in red, green and blue.

Materials and Methods

Cloning and constructs

The GFP-VAP-A, GFP-VAP-B, GFP-MOSPD2, Flag-tagged STARD3, STARD3 FA/YA and GST-tagged STARD3 expression vectors were previously described (Alpy *et al*, 2005, 2013; Di Mattia *et al*, 2018). STARD3 S₂₀₉A, STARD3 S₂₀₉D, STARD3 S₂₀₉D/P₂₁₀A, and STARD3 Conv-FFAT were constructed by site-directed mutagenesis using the following primers: 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'; STARD3 Conv-FFAT: 5'- CCGGT GCTCT GGACG ATGAA GAGTT CTTTG ATGCC TCAGA ATCCT TTGCA GGGTC TGACA ATG-3' and 5'- AAAGG ATTCT GAGGC ATCAA AGAAC TCTTC ATCGT CCAGA GCACC GGAGA ACAGC AGGGG TCC-3'.

Plasmids allowing the inducible expression of STARD3 were constructed in the lentiviral vector pLVX-TRE3G (Clontech) using the following primers: 5'-TCCGG GCCCG CGGCC GCCAC CATGA GCAAG CTGCC CAGGG AGCTG-3' and 5'-CTACC CGGTA GAATT TCACG CCCGG GCCCC CAGCT CGCT-3' with the SLiCe method (Okegawa & Motohashi, 2015).

Plasmids encoding the MSP domain of VAP-A [8–212], VAP-B [1-210], and MOSPD2 [282-490] for expression as C-terminal His6-tag proteins in *E. coli* were previously described (Di Mattia *et al*, 2018; Mesmin *et al*, 2013; Wilhelm *et al*, 2017). VAP-A K50L, VAP-B K43L and MOSPD2 K363L were constructed by site-directed mutagenesis using the following primers: VAP-A K50L: 5'-AGAAA AGTGT GTTTC CTAGT GAAGA CTACA GCACC TCGCC GGTAC TGT-3' and 5'-GCGAG GTGCT GTAGT CTCA CTAGG AAACA CACTT TTCTA TCCGA TGG-3'; VAP-B K43L : 5'-CGAAA TGTGT GTTTC CTAGT GAAGA CTACA GCACC ACGTA GG-3' and 5'-TGCTG TAGTC TTCAC TAGAA AACAC ACATT TCGGT CTGTC GG-3'; MOSPD2 K363L : 5'-GGAGC TGTTG TTCTC ACCAG AAATG CCACT ATATT TTTAG TTA-3' and 5'-TAACT AAAAA TATAG TGGCA TTTCT GGTGA GAACA ACAGC TCC-3'. For protein crystallization, a plasmid encoding MOSPD2 [315-445] fused to an N-terminal His6-tag followed by a thrombin cleavage site was generated.

A plasmid encoding STARD3 [196–445] with a cysteine substitution (L₁₉₆C) to link the soluble part of STARD3 to MPB-PE containing liposomes, and fused with an N-terminal GST tag for purification, was generated. The protein encoded by this construct (without GST) is hereafter referred to as cSTD3. To obtain the pS₂₀₉ cSTD3 encoding construct, the S₂₀₉ codon was replaced by an amber codon (TAG) by site-directed mutagenesis using the following primers 5'-GGACA GTTCT ATTAG CCCCC AGAAT CCTTT GCAGG G-3' and 5'-GGATT CTGGG GGCTA ATAGA ACTGT CCCTC GGACA G-3'.

All constructs were verified by DNA sequencing (Eurofins).

Protein expression and purification

For recombinant MSP domains of VAP-A, VAP-B and MOSPD2 [282-490], proteins were expressed in *E. coli* BL21 DE3 strain at 20°C for 16 h upon induction with 1 mM IPTG (at an optical density OD_{600nm} = 0.5). Cells were suspended in Lysis buffer [50 mM sodium phosphate pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, protease inhibitors tablets (cOmplete, Roche)]. Cells were lysed by a Cell Disruptor TS SERIES (Constant Systems Ltd), and the lysate was first centrifuged at 3,500 g for 15 min, then at 50,000 g for 45 min, and filtered through a 0.22 µm membrane. Purification was performed on an AKTA Start chromatography system (GE Healthcare Life Sciences) using HisTrap HP 1 mL columns. Proteins were eluted with Elution buffer [20 mM sodium phosphate, 250 mM Imidazole, pH 7.4], and

further purified by gel filtration (HiLoad 16/60 Superdex 200; GE) in GF Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl). Proteins were concentrated with an Amicon Ultra-15 10 kDa centrifugal filter unit (Merck). Protein concentration was determined by UV-spectroscopy.

For the recombinant MSP domain of MOSPD2 [315-445], purification was performed with NTA-Ni²⁺ agarose beads (His-Select Nickel Affinity Gel, P6611, Sigma). The protein was first bound onto the column. After one washing step with Lysis buffer, the His6-tag was removed to allow the release of MOSPD2 [315-445] by incubating the beads in Digestion Buffer [50 mM sodium phosphate pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 25U Thrombin, CaCl₂ 50μM] during 16 hours at 4°C, under constant agitation. After incubation, Thrombin was inactivated by adding PMSF (200mM). The protein was recovered in the supernatant after centrifugation, and the beads were washed three times with Lysis buffer. The fractions were pooled. The protein was then purified by gel filtration (in GF buffer containing 1 mM TCEP), concentrated and quantified as described above.

GST- pS₂₀₉ cSTD3 was expressed in the *E. coli* C321 ΔA strain transformed with the phosphoserine orthogonal translation system SepOTSλ, a plasmid encoding a phosphoserine-accepting tRNA, a phosphoserine aminoacyl-tRNA synthetase to load the phosphoserine onto a UAG-decoding tRNAPhosphoserine, and a modified elongation factor Tu (EF-Sep) to deliver phosphoserine-tRNAPhosphoserine to the ribosome. These materials were gifts from Jesse Rinehart (Addgene # 68292; # 68306 (Pirman *et al*, 2015)). Bacteria were cultivated in LB medium containing Ampicillin (100 μg/mL), Kanamycin (25 μg/mL), 0,08 % glucose and 2 mM O-phospho-L-serine (P0878, Sigma), at 30°C for 20 hours upon induction with 1 mM IPTG (at an optical density OD_{600nm} = 0.7). All purification steps were conducted in TN1 buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl) containing 2 mM DTT. TN1 buffer was supplemented with 1mM PMSF, 10 μM bestatin, 10 μM pepstatin, 1 mM orthovanadate, 50 mM sodium fluoride and protease inhibitors tablets (cOmplete, Roche) for the first purification steps. Cells were lysed by a Cell Disruptor TS SERIES and the lysate was centrifuged at 186,000 g for 1 h. Then, the supernatant was applied to Glutathione Sepharose 4B beads (17-0756; GE Healthcare). After three washing steps with TN1 buffer containing 2 mM DTT, the beads were incubated with thrombin at 4°C for 16 hours to cleave the GST fusion, and allow the release of pS₂₀₉ cSTD3. The protein was recovered in the supernatant after centrifugation, and the beads were washed three times with TN1 buffer. The fractions were pooled and concentrated. Stock concentration was estimated with a BCA assay. The day of the experiment, in order to attach pS₂₀₉ cSTD3 covalently to MPB-PE-containing liposomes, 100 μL from stock protein was applied onto an illustra NAP-5 column (GE Healthcare) and eluted with freshly degassed TN1 buffer according to manufacturer's indications to remove DTT. The concentration of the eluted protein was determined by UV-spectroscopy.

GST-cSTD3 was expressed in *E. Coli* BL21 at 37°C for 3h upon induction with 1 mM IPTG (at an optical density OD_{600nm} = 0.6). All purification steps were conducted in TN1 buffer containing 2 mM DTT. TN1 buffer was supplemented with 1mM PMSF, 10 μM bestatin, 10 μM pepstatin and protease inhibitors tablets (cOmplete, Roche) for the first purification steps. All the following steps of the purification are the same as GST- pS₂₀₉ cSTD3, in particular the application onto illustra NAP-5 column for the experiments.

Cell culture, transfection and infection

HeLa cells [American Type Culture Collection (ATCC) CCL-2] were maintained in DMEM with 5% fetal calf serum (FCS) and 40 μg/ml gentamycin. 293T cells (ATCC CRL-3216) were maintained in DMEM with 10% FCS, penicillin 100 UI/ml, and streptomycin 100 μg/ml. HCC1954 cells (ATCC CRL-2338) were maintained in RPMI w/o HEPES with 10% FCS and 40 μg/ml gentamycin.

Cells were transfected using X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche). To generate retroviral particles, pQCXIP vectors were co-transfected with pCL-Ampho vector (Imgenex) into 293T retroviral packaging cell line. Retroviral infections were used to generate HeLa/Ctrl, HeLa/GFP-VAP-A, HeLa/GFP-VAP-B and HeLa/GFP-MOSPD2 cell lines. The HeLa/Ctrl cell line was obtained using the empty pQCXIP plasmid. For lentiviral infection, pLVX-TRE3G vectors encoding STARD3 (wild-type and mutants) or pLVX-Tet3G vector encoding the transactivator were co-transfected with three packaging plasmids pLP1, pLP2, and pLP/VSVG (Invitrogen) into the 293T cell line. Viral particles supplemented with 10 µg/ml polybrene and 20 mM HEPES were then incubated with HeLa cells. Selection was performed using 0.5 µg/ml puromycin or 800 µg/ml G418.

Antibody production and purification

The anti phospho-STARD3-pS₂₀₉ antibody (rabbit polyclonal antibody #3144) was raised against the synthetic peptide CDGQFYpSPPPESEA. The peptide was coupled to ovalbumin by its N-terminal cysteine residue, and injected into rabbit. The immunoreactive serum was purified using a two-step protocol: first, the serum was loaded on an affinity chromatography column bearing the non-phosphorylated synthetic peptide (CDGQFYSPPESEA), and the unbound fraction was collected; second, this latter fraction was purified on an affinity chromatography column bearing the phosphorylated synthetic peptide, and the bound fraction was collected. In these experiments, peptides were coupled to Sulfolink coupling gel (Thermo Scientific Pierce) using conditions recommended by the manufacturer.

Peptide synthesis

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

Peptide Pull-Down Assays

For pull-down assays of whole cell protein extracts, the affinity resin was prepared by incubating 60 nmol of biotinylated peptide with 15 µL of streptavidin beads (PureProteome Streptavidin Magnetic Beads, Merck) in a total volume of 1 mL pull-down buffer 1 (PDB1) [50mM Tris-HCl pH 7.4, 75mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, protease inhibitor tablet (cOmplete, Roche)] at room temperature for 1 hour, under constant agitation. The beads were then washed twice with 1 ml of PDB2 [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, protease inhibitors tablets (cOmplete, Roche)], and two times with 1 ml of PDB1. Adherent cells were washed two times with cold PBS (Phosphate Buffer Saline) and lysed in PDB3 [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, cOmplete protease inhibitor cocktail, protease inhibitors tablets (cOmplete, Roche), PhosSTOP (Roche)]. After a 20 min incubation on ice, the protein extract was separated from cell debris by centrifugation (10 min; 9,500 g; 4°C). One mg of proteins was incubated with peptide-coupled streptavidin beads in a total volume of 1 ml of PDB3 at 4°C for 3 hours, under constant agitation. The beads were washed three times with 1 ml of PDB3, and proteins were eluted with Laemmli buffer.

For pull-down assays of recombinant proteins, the affinity resin was prepared by incubating 20 nmol of biotinylated peptide with 15 µL of streptavidin beads (PureProteome Streptavidin Magnetic Beads, Merck) in 1 mL of PDB4 [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1mM DTT, protease inhibitors tablets (cOmplete, Roche)]. The beads were washed three times with 1 ml of PDB4, and aspecific binding sites were blocked with BSA (20 µg) at 4°C for 1 hour, under constant

agitation. The beads were then washed three times with 1 ml of PDB4. Thirty μg of recombinant protein with 20 μg of BSA were incubated in a total volume of 1 ml of PDB5 [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.25 mM DTT, protease inhibitors tablets (cOmplete, Roche)] at 4°C for 2 hours, under constant agitation. The beads were washed five times with 1 ml of PDB5, and proteins were eluted at room temperature with Laemmli buffer.

GFP-Trap

GFP-Trap beads (GFP-Trap_MA; Chromotek) were washed 3 times with 1 mL of cold PDB6 buffer [50mM Tris-HCl pH 7.4, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, protease inhibitors tablets (cOmplete, Roche)]. GFP-VAP-A (WT or KD/MD mutant), GFP-VAP-B or GFP-MOSPD2 stably expressing cells were transfected with plasmids expressing wild-type or mutant STARD3. Two days after transfection, adherent cells were washed 2 times with cold PBS and lysed in PDB6. The protein extract (500 μg of proteins) was incubated with 20 μL of beads in a total volume of 1mL at 4°C for 2 hours, under constant agitation. The beads were washed 3 times with 1 mL of PDB6 and proteins were eluted at room temperature with Laemmli Buffer.

GST Pull-Down

Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare) were washed 3 times with 1 mL of cold PDB7 buffer [50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, protease inhibitors tablets (cOmplete, Roche), PhosSTOP (Roche)]. HeLa cells were transfected with a plasmid expressing the GST-STARD3 fusion protein. Two days after transfection, adherent cells were washed 2 times with cold TBS1 (248 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM NaCl, 27 mM KCl) and lysed in PDB7. The protein extract (1.5 mg of proteins) was incubated with 80 μL of beads in a total volume of 1 mL at 4°C for 2 hours, under constant agitation. The beads were washed twice with PDB2 containing PhosSTOP, 2 times with PDB8 [50mM Tris-HCl pH 7.4, 1 M NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, protease inhibitors tablets (cOmplete, Roche), PhosSTOP (Roche)] and 1 time with PDB7. Proteins were eluted at room temperature with Laemmli Buffer.

SDS-PAGE, Western blot, CIP treatment and Coomassie Blue staining

SDS-PAGE and Western blot analysis were performed as previously described (Alpy *et al*, 2005) using the following antibodies: rabbit anti-GFP (1:5000; GFP-2A3, Merck), rabbit anti-FLAG (1:1000; F7425, Sigma), mouse anti-VAP-A (1:1000; 4C12, Santa Cruz Biotechnology, sc-293278), rabbit anti-VAP-B [1:1000; kind gift from Dr. L. Dupuis (Kabashi *et al*, 2013)], mouse anti-MOSPD2 [1:7; 1MOS-4E10, (Di Mattia *et al*, 2018)], mouse anti-STARD3 [1 :1000 ; 3G11, (Wilhelm *et al*, 2017)], rabbit anti-STARD3 S₂₀₉ (1:1000; 3144), mouse anti-eIF4A3 [1:1000; 2E5, (Daguenet *et al*, 2012)] and mouse anti-actin (1:5000; ACT-2D7, Euromedex). For phospho-specific antibodies, nitrocellulose membranes were blocked and incubated with the primary antibody in TBS2 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM NaCl) containing 5% BSA and 0.1% Tween 20 (TBSBT). Washes and secondary antibody incubation were performed in TBST (TBS2 buffer containing 0.1% Tween 20).

For calf intestinal alkaline phosphatase (CIP) treatment, the nitrocellulose membrane was blocked in TBS2 buffer containing 5 % BSA and 0.1% Triton X-100, at room temperature for 45 min. The membrane was then incubated in CIP buffer (50 mM Tris-HCl pH 9, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂) containing 1 U/mL CIP, at 37°C for 1 h. Primary antibodies were then incubated in TBST at 4°C.

Protein gels were stained with Coomassie blue (PageBlue Protein Staining Solution; Thermo Fisher Scientific) or with fluorescent Sypro Orange stain (Thermo Fisher Scientific).

Mass spectrometry

Samples were reduced (5 mM TCEP for 30 min at RT) and alkylated (10 mM Iodoacetamide for 30 min at RT in dark). Two types of digestion were performed: 1) digestion with LysC (1:100) during 4 hours at 37 °C [in Tris 0.1M pH8.5, CaCl₂ 2mM] followed by trypsin (1:100) digestion overnight at 37 °C. 2) digestion with chymotrypsin [in Tris 0.1 M pH 8.5, CaCl₂ 10 mM] overnight at 25°C. Peptides were then analyzed with a nanoLC-MS/MS system (Ultimate nano-LC and LTQ Orbitrap, Thermo Fisher Scientific). Briefly, peptides were separated on a C18 nano-column with a 1 to 30 % linear gradient of acetonitrile, and analyzed with a TOP20, TOP15 and TOP10 CID or HCD data-dependent MS method. Peptides were identified with SequestHT algorithm in Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Fisher Scientific) using Human Swissprot database (20368 sequences). Precursor and fragment mass tolerance were set at 7 ppm and 0.6 Da, respectively. Trypsin or chymotrypsin were set as enzyme, and up to 2 missed cleavages were allowed. Oxidation (M) and Phosphorylation (S) were set as variable modifications, and Carbamidomethylation (C) as fixed modification. Proteins were identified with a minimum of two unique peptides, and were filtered with a 1% FDR (false Discovery Rate). Probabilities of phosphorylation for all potential phosphorylation sites were determined with PhosphoRS (Taus *et al*, 2011).

cSTD3 recombinant protein was analyzed by liquid chromatography coupled to a mass spectrometer equipped with a heated electrospray ionization (HESI) probe. HPLC was performed using a Dionex U3000 RSCL Instrument. The injection volume was fixed at 5 µl (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific). Protein analysis was performed on a 2.1mm i.d. x 100mm (3.5 µm, 300 Å) Xbridge Protein BEH C4 column at a flow rate of 250 µl/min. The elution program was based on water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) both containing 0.1% formic acid (v/v): 0 min 5% B, 24 min 80% B, 25 min 90% B. The Q-exactive plus spectrometer completely controlled by the Xcalibur software was operating in electrospray positive mode. Typical ESI conditions were as follows: electrospray voltage 4 kV; capillary temperature 320°C, probe temperature 325°C, sheath gas flow 30U and auxiliary gas 10U. The MS scan was acquired in the 500 to 1800 m/z range with the resolution set to 140 000. Data analysis was performed with Biopharma Finder, and intact protein spectra was automatically deconvoluted with ReSpect (precursor mass between 23 000 and 33 000 Da and 20 ppm mass tolerance, charge state range between 15 and 45).

Surface plasmon resonance

Surface plasmon resonance data were collected on a Biacore T200 instrument (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) at 25 °C with autosampler rack base cooled at 15 °C. Briefly, a CM5 sensor surface was first conditioned with 10 mM HCl, 50 mM NaOH, 0.1% SDS and 1 M NaCl pulses and extensively washed before attaching reasonable amount of streptavidin (a few hundred RU) using the standard EDC/NHS protocol provided by the manufacturer, followed by immobilization of biotinylated peptides. In order to minimize SPR artifact effects, the levels of immobilized peptides (50 RU) were kept low by injecting a highly diluted peptide solution (1 to 10 ng/ml) at a high flow rate (90 µl/min). The running buffer for kinetic measurements was 50 mM Tris, 75 mM NaCl, pH 7.0 (filtered through a 0.22 µm membrane), supplemented with 0.005% (v/v) surfactant P20. The control peptide was immobilized on one flow cell of every chip in order to serve as a control for non-specific binding of the analyte to the matrix and for monitoring changes in solution refractive index. Analytes were simultaneously injected over the four flow cells at 8–12 different monomer concentrations ranging between 0 and 20 µM. At least three concentrations have been duplicated in non-consecutive cycles to check for signal

reproducibility. Injection and post-injection times were 120 and 180 s, respectively. The flow rate was 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Data were initially processed using the BiaEvaluation 3.2 software (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) using “double referencing” (Fournane *et al*, 2011) in which sensorgrams were corrected for both buffer effects and bulk refractive index changes. The steady-state binding signal (R_{eq}) was derived by averaging the signals in a five second window at equilibrium. Subsequently, steady-state analysis using in-house Python scripts was performed by fitting the average signal R_{eq} as a function of total analyte concentration, assuming a simple 1:1 interaction binding isotherm model. Note that the analyte concentration was considered according to dimers for VAP-A and VAP-B, and monomers for MOSPD2. The quality of the fit was assessed by two criteria: (i) the match of the fitted maximum capacity of the surface (R_{max}) with the expected maximum capacity (R_{theo}) inferred from the immobilized level of biotinylated peptide and (ii) the Chi2 parameter which is a statistical measure of how closely the model fits the experimental data. The square root of this parameter should always be below 10% of the globally fitted R_{max} values (BiaEvaluation software user manual, 2005). The values and uncertainties of the R_{max} and K_{D} fitted parameters were estimated with a Monte Carlo approach by reproducing the fit using 1000 datasets in which noise fluctuations were introduced, and then calculating the mean and the standard deviation of the obtained parameters, respectively.

Lipids

DOPC (1,3-bis(sn-3'-phosphatidyl)-sn-glycerol); DNS-PE (1,3-bis(sn-3'-phosphatidyl)-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-(5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl)); NBD-PE (1,3-bis(sn-3'-phosphatidyl)-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)); DOGS-NTA-Ni²⁺ (1,3-bis(sn-3'-phosphatidyl)-sn-glycerol-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl]); and 18:1/18:1 MPB-PE (1,3-bis(sn-3'-phosphatidyl)-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-[4-(p-maleimidophenyl)butyramide]) were purchased from Avanti Polar Lipids. Dehydroergosterol (DHE) was from Sigma-Aldrich. The concentration of DHE in stock solution in methanol was determined by UV-spectroscopy using an extinction coefficient of 13,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Liposome preparation

Lipids stored in stock solutions in CHCl_3 or methanol were mixed at the desired molar ratio. The solvent was removed in a rotary evaporator under vacuum. DOGS-NTA-Ni²⁺ and MPB-PE lipid films were pre-warmed to 33°C for 5 min prior to drying. The films were hydrated in TN2 buffer (50mM Tris pH 7.4, 120mM NaCl) to obtain a suspension of multilamellar liposomes. The suspension was extruded through a polycarbonate filter of 0.2 μm pore size using a mini-extruder (Avanti Polar Lipids).

Liposome flotation assay

Each protein (cSTD3 and pS₂₀₉ cSTD3 at 1.5 μM) was incubated with NBD-PE containing liposomes (750 μM total lipids) in 150 μL of TN2 buffer at room temperature for 10 min under agitation. The suspension was adjusted to 28 % (w/w) sucrose by mixing 100 μL of a 60 % (w/w) sucrose solution in TN2 buffer and overlaid with 200 μL of TN2 buffer containing 24 % (w/w) sucrose and 50 μL sucrose-free TN2 buffer. The sample was centrifuged at 240,000 $\times g$ in swing rotor (TLS 55 Beckmann) for 1 h. The bottom (250 μL), middle (150 μL) and top (100 μL) fractions were collected. The bottom and top fractions were analysed by SDS-PAGE using Sypro Orange staining and a FUSION FX fluorescence imaging system.

Dynamic light scattering measurements of liposomes aggregation

The experiments were performed at 25°C in a Dynapro apparatus (Protein Solutions). L_A liposomes (DOPC 97 mol% and MPB-PE 3 mol%, 50 µM total lipids) in 20 µL of freshly degassed TN3 buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 75 mM NaCl) was added to the quartz cell. A first set of about 12 autocorrelation curves was acquired to measure the size distribution of initial liposome suspension. Then cSTD3 or pS₂₀₉ cSTD3 (380 nM final concentration) was added manually and mixed thoroughly. After a 5 min incubation, L_B liposomes (DOPC 90 mol% and DOGS-NTA-Ni²⁺ 10 mol%, 50 µM total lipids) were added followed by the addition of VAP-A_{His6} (700 nM). For all the experiments, the kinetics of aggregation was measured by acquiring one autocorrelation curve every 10 s. At the end of the experiment, a set of 12 autocorrelation functions was acquired. The data were analysed using two different algorithms provided by the Dynamics v6.1 software (Protein Solutions). During the kinetics, the autocorrelation functions were fitted assuming that the size distribution is a simple Gaussian function. This mode, referred as the monomodal or cumulant algorithm, gives a mean hydrodynamic radius, R_H, and the width (or polydispersity). The polydispersity is represented in the kinetics measurements by the shaded area and can reach very large values because of the simultaneous presence of free liposomes and of liposomes aggregates of various size. Before and after the aggregation process, the autocorrelation functions were fitted using a more refined algorithm, referred as a regularization algorithm. This algorithm is able to resolve several populations of different sizes, such as free liposomes and liposome aggregates.

DHE transport assay

Experiments were carried out in a Shimadzu RF 5301-PC fluorimeter equipped with a cylindrical quartz cuvette. A suspension (570 µL) of L_A liposomes (62.5 µM total lipids final concentration) made of DOPC and containing 3 mol % MPB-PE was incubated with 475 nM cSTD3 or pS₂₀₉ cSTD3 at 37°C under constant stirring in TN3 buffer. After 5 min, 30 µL of a suspension of L_B liposomes (77.5 mol% DOPC, 10 mol% DHE, 2.5 mol% DNS-PE, 10 mol% DOGS-NTA-Ni²⁺, 62.5 µM total lipids final concentration), pre-incubated or not with VAP-A_{His6} or VAP-A (KD/MD)_{His6} (1 µM final concentration) was added. Lipid transport was measured by recording the DNS-PE signal at 525 nm (bandwidth 10 nm) upon DHE excitation at 310 nm (bandwidth 1.5 nm). The quantity of DHE transported from L_B to L_A membrane is expressed in term of mol% DHE in L_B liposomes. It is equal to $10 \times ((F - F_0) / (F_{max} - F_0))$ where F_{max} is the signal measured in the absence of pS₂₀₉ cSTD3 upon the addition of L_B liposomes and F₀ is the signal measured upon total DHE extraction by 10 mM methyl-β-cyclodextrin (Sigma). Liposomes and proteins are injected from stock solutions with Hamilton syringes through a guide in the cover of the fluorimeter.

Immunofluorescence

Cells were grown on glass coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS. After blocking with 1% bovine serum albumin in PBS (PBS-BSA), cells were incubated overnight at 4°C with the primary antibody in PBS-BSA (rabbit anti-Flag; 1:1000; F7425, Sigma). Cells were washed twice in PBS and incubated for 30 min with AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit secondary antibodies (ThermoFisher Scientific). After two washes with PBS, the slides were mounted in ProLong Gold (Invitrogen). Observations were made with a confocal microscope (Leica TCS SP5 inverted, 63×, NA 1.4).

For filipin staining, cells transduced with pLVX-TRE3G (encoding STARD3 wild-type and mutants) and pLVX-Tet3G vectors were treated for 48 h with 100 ng/ml doxycycline. Intracellular cholesterol

labeling using filipin was performed as previously described (Wilhelm *et al*, 2017, 2019). The Fiji software was used to quantify filipin fluorescence intensity (<http://fiji.sc/>). Cell contours were manually segmented and CD63 signal was used to build a segmentation mask corresponding to late endosomes. The mask was then applied to the filipin image, and the mean filipin intensity in endosomes for each individual cell was measured.

Colocalization analysis

Colocalization was visualized using the colocalization highlighter plugin for ImageJ.

Pearson correlation coefficient was determined using the Colocalization Threshold plugin in Fiji software. The auto-thresholding was performed using the Costes method (Costes *et al*, 2004).

Crystallization

The crystallization experiments were carried out by the sitting drop vapor diffusion method at 293 K using a Mosquito Crystal nanolitre dispensing robot (TTP Labtech). A mixture of protein solution (in GF buffer) and reservoir solution was equilibrated against 50 μ l of reservoir solution. Several commercially available screens were used, including the JCSG+ suite, the Classics suite, the PACT suite, the PEGs suite (Qiagen), Morpheus, BCS (Molecular Dimensions), Wizard Classic 1 & 2 (Rigaku), and the TOP96 (in-house) (Fazio *et al*, 2014).

Crystallization of VAP-A [8-212] in complex with the phosphorylated FFAT of STARD3 (GALpSEGQFYpSPPEpSFAG): the MSP domain of VAP-A (30 mg/ml) was mixed with the peptide (1:2 molar ratio); 0.2 μ l of this solution was mixed with 0.2 μ l of reservoir solution. One crystal appeared after ten weeks in condition 18 of the PEGS suite (25% PEG 2000 MME, 0.1 M HEPES pH 7.5), reaching full size after a further 3 weeks. The crystal was flash frozen by direct immersion in liquid nitrogen without further cryo-protection.

Crystallization of MOSPD2 [282-490] in complex with the conventional FFAT of ORP1 (Biotin-GAMRSILSEDEFYDALSDSES): the MSP domain of MOSPD2 (25 mg/ml) was mixed with the peptide (1:1.2 molar ratio); 0.15 μ l of this solution was mixed with 0.15 μ l of reservoir solution. Plates were checked for crystal appearance over 6 months without any result. Twelve months later, a final check was made before discarding the plates, and crystals were found in ten drops, all containing a PEG / salt mixture. The best crystal was obtained in condition 18 of the TOP96 screen (20% PEG 3350, 0.2 M sodium sulfate). This crystal was transferred to a solution containing 25% PEG 3350, 0.2 M sodium sulfate and 10% glycerol, and flash frozen in liquid nitrogen.

Crystallization of MOSPD2 [282-490] in apo form: the MSP domain of MOSPD2 was prepared at 19 mg/ml and mixed with the Proti-Ace Kit (Hampton Research) for *in situ* proteolysis experiments. Alpha-Chymotrypsin, Trypsin, Elastase, Papain, Subtilisin and Endoproteinase Glu-C were prepared as described in the protocol and mixed all together with the protein to create a proteases:sample ratio of 1:190 (w/w). A mix of 0.1 μ l protein solution and 0.1 μ l reservoir solution was used. One crystal appeared after only 12 hours in condition 30 of the JCSG+ suite (40% PEG 300, 0.1 M Sodium Phosphate Citrate pH 4.2), reaching full size after 8 days. The crystal was flash frozen by direct immersion in liquid nitrogen without further cryo-protection.

Crystallization of MOSPD2 [315-445] in complex with the phosphorylated FFAT of STARD3 (CLFSGALpSEGQFYpSPPEpSFAG): the MSP domain of MOSPD2 (21 mg/ml) was mixed with the peptide (1:2 molar ratio); 0.2 μ l of this solution was mixed with 0.1 μ l of reservoir solution. Crystals appeared after 3 weeks in condition 53 of the BCS screen (7.5% PEG 2000, 7.5% PEG 3350, 7.5% PEG 4000, 7.5% PEG 5000 MME, 0.05 M Magnesium sulfate, 0.1 M HEPES pH 7.5), reaching full size after a further 2

weeks. Crystals were transferred to the same solution supplemented with 15% glycerol, and flash cooled in liquid nitrogen.

Data collection and structure resolution

All data were collected from crystals at 100K, as detailed below, and processed, integrated and scaled using XDS (Kabsch, 2010). All molecular replacement was performed using PHASER (McCoy *et al*, 2007) in the PHENIX (Adams *et al*, 2010) suite. Refinement of the structures was performed using PHENIX and BUSTER (Bricogne *et al*, 2019; Smart *et al*, 2012) with iterative model building performed in COOT (Emsley *et al*, 2010). The quality of the final refined models was assessed using MOLPROBITY and PROCHECK (Laskowski *et al*, 1993). Data collection and refinement statistics are given in Table S3. Structural figures were prepared using PyMOL (www.pymol.org). Surface coloring was performed with the YRB scheme with all carbon atoms not bound to nitrogen and oxygen atoms in yellow, nitrogen atoms of K and R in blue, oxygen of D and E in red, and all the remaining atoms in white (Hagemans *et al*, 2015). The coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank under the accession codes 6TQR (VAP-A / STARD3 complex), 6TQS (MOSPD2 / ORP1 complex), 6TQT (MOSPD2 unbound), and 6TQU (MOSPD2 / STARD3 complex).

For the complex of VAP-A [8-212: MSP and coiled-coil domains] with the phosphorylated FFAT motif of STARD3 [200-216], data were collected from two fragments of the same crystal on a PILATUS 6M detector (Dectris) at the ID23-1 beamline of the ESRF and using the MxCuBE software (Gabadinho *et al*, 2010). After data processing, the two datasets were scaled together using XSCALE, and anisotropic truncation and correction were performed on the merged dataset using the STARANISO server (Tickle *et al*, 2018). The crystal diffracted anisotropically to 1.85 Å (3.0 Å in the worst direction) and belonged to the primitive triclinic space group P1, with unit cell dimensions $a = 39.1 \text{ \AA}$, $b = 43.8 \text{ \AA}$, $c = 83.7 \text{ \AA}$, $\alpha = 89.46^\circ$, $\beta = 92.91^\circ$, $\gamma = 105.13^\circ$. The structure was solved by molecular a monomer of the MSP domain of rat VAP-A (Kaiser *et al*, 2005) (PDB ID 1Z9O) as a search model. The asymmetric unit contains four copies of the MSP domain (~residues 9-135) and two copies of the peptide, with a corresponding Matthews' coefficient (Matthews, 1968) of $2.21 \text{ \AA}^3\text{Da}^{-1}$ and a solvent content of 44.4%. The asymmetric unit is too small to contain four copies of the construct crystallized, indicating that the coiled-coil domain was cleaved in the drop, and is not present as a disordered domain in the crystal.

For the complex of MOSPD2 [282-490] with the conventional FFAT of ORP1 [469-485] data were collected at on an EIGER X 9M detector (Dectris) at the Proxima 2A beamline of Synchrotron SOLEIL. The crystal diffracted to 2.3 Å and belonged to a primitive hexagonal space group (P6₁22 or P6₅22) with unit cell dimensions $a = b = 126.9 \text{ \AA}$, $c = 184.4 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$. The first model from the NMR structure of the MSP domain of MOSPD2 (PDB ID 1WIC; DOI: 10.2210/pdb1wic/pdb; Endo, H., Asakura, K., Nemoto, N., Takasugi, K., Izumie, K., Yoshida, M., Hayashi, F., Yokoyama, S., RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative; Solution structure of the MSP domain of RIKEN cDNA 6030424E15) was extracted and truncated to the rigid core, and used as a search model in PHASER with a solution found in P6₁22. The asymmetric unit contains six copies of the MSP domain (~residues 315-447) and five copies of the peptide, with a corresponding Matthews' coefficient of $2.16 \text{ \AA}^3\text{Da}^{-1}$ and a solvent content of 43%. As with VAP-A, the asymmetric unit is too small to contain six copies of the construct crystallized, implying that the N- and C-terminal extensions had been cleaved in the drop during the long crystallization time.

For apo MOSPD2 [282-490] data were collected on our in-house diffractometer. The diffractometer comprises an FR-X rotating anode X-ray generator (Rigaku) fitted with Osmic VariMax HF Arc)Sec confocal optics and an Eiger R 4M detector (Dectris). The crystal diffracted to 1.5 Å and

belonged to the primitive orthorhombic space group $P2_12_12_1$ with $a = 28.1 \text{ \AA}$, $b = 51.2 \text{ \AA}$, $c = 78.8 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. The structure was solved by molecular replacement using a monomer of our MOSPD2/ORP1 complex structure. The asymmetric unit contains one copy of the MSP domain (residues 315-445) with a corresponding Matthews' coefficient of $1.97 \text{ \AA}^3\text{Da}^{-1}$ and a solvent content of 37.5%.

For the complex of MOSPD2 [315-445] with the phosphorylated FFAT motif of STARD3 [196-216] data were collected on an EIGER X 9M detector (Dectris) at the Proxima 2A beamline of Synchrotron SOLEIL. The crystal diffracted to 2.35 \AA and belonged to a primitive tetragonal space group ($P4_12_12$ or $P4_32_12$) with unit cell dimensions $a = b = 87.9 \text{ \AA}$, $c = 95.1 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. The structure was solved by molecular replacement in PHASER using our MOSPD2 MSP domain apo structure as a search model with a solution found in $P4_12_12$. The asymmetric unit contains two copies of the MOSPD2 MSP domain / STARD3 FFAT motif complex with a corresponding Matthews' coefficient of $1.97 \text{ \AA}^3\text{Da}^{-1}$ and a solvent content of 37.5%.

In silico identification of Phospho-FFATs

The algorithm used for Phospho-FFAT identification is derived from the position weight matrix shown in Table S4. The scoring system is based on 19 continuous residues: the 7 residues forming the core, 6 residues upstream and it is extended from the matrix previously described to include the 6 residues downstream (Slee & Levine, 2019). These residues were allocated a score in the position weight matrix. All residues in all human protein sequences obtained from Uniprot were scored by scripts enacted in Python. Venn diagrams and sequence logos were constructed using InteractiVenn and Weblogo, respectively (Crooks *et al*, 2004; Heberle *et al*, 2015).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney, or the Kruskal-Wallis non-parametric tests (Prism, Graphpad). In the latter case, all conditions were compared with the Dunn's multiple comparison test.

P-values <0.05 , <0.01 and <0.001 are identified with 1, 2 and 3 asterisks, respectively.

ns: $p \geq 0.05$.

Acknowledgments

We thank the members of the Molecular and Cellular Biology of Breast Cancer team (IGBMC) for helpful advice and discussions. We thank the IGBMC cell culture facility (Betty Heller), imaging center (Bertrand Vernay, Elvire Guiot and Erwan Grandgirard), polyclonal and monoclonal antibody facility (Gilles Duval and Mustapha Oulad-Abdelghani), proteomics platform (Luc Negroni and Bastien Morlet), and structural biology and genomics platform (Catherine Birck) for their excellent technical assistance. We thank Delphine Debayle for helping us to determine the molecular weight of cSTD3 constructs by mass spectrometry. We wish to thank Luc Dupuis (INSERM U118, Strasbourg, FR) for providing the anti-VAP-B antibody. We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility (proposal number MX-1636) and SOLEIL (proposal number 20170871) for provision of beamtime and we would like to thank Andrew McCarty for assistance in using beamline ID23-1, and William Shepard and Martin Savko for assistance in using beamline Proxima 2A.

T.D.M. received a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (<https://www.frm.org/>). A.M. and L.V. received an allocation from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France; <http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/>). This work was supported by grants from the Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est; <https://www.ligue-cancer.net>), SEVE Sein et Vie, the Institut National Du Cancer INCA (INCA_9269; www.e-cancer.fr), the Agence Nationale de la Recherche ANR (grant ANR-19-CE44-0003 ; <https://anr.fr/>), by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INSB-05-01 and INSTRUCT-ERIC. We also acknowledge funds from the Institut National de Santé et de Recherche Médicale (<http://www.inserm.fr/>), the Centre National de la Recherche Scientifique (<http://www.cnrs.fr/>), the Université de Strasbourg (<http://www.unistra.fr>) and the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung L-W, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC & Zwart PH (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**: 213– 7221
- Alli-Balogun GO & Levine TP (2019) Regulation of targeting determinants in interorganelle communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* **57**: 106–114
- Alpy F, Latchumanan VK, Kedinger V, Janoshazi A, Thiele C, Wendling C, Rio M-C & Tomasetto C (2005) Functional characterization of the MENTAL domain. *J. Biol. Chem.* **280**: 17945–17952
- Alpy F, Rousseau A, Schwab Y, Legueux F, Stoll I, Wendling C, Spiegelhalter C, Kessler P, Mathelin C, Rio M-C, Levine TP & Tomasetto C (2013) STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *J. Cell Sci.* **126**: 5500–5512
- Alpy F & Tomasetto C (2005) Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *J. Cell Sci.* **118**: 2791–2801
- Alpy F, Wendling C, Rio M-C & Tomasetto C (2002) MENTHO, a MLN64 homologue devoid of the START domain. *J. Biol. Chem.* **277**: 50780–50787
- Amarilio R, Ramachandran S, Sabanay H & Lev S (2005) Differential Regulation of Endoplasmic Reticulum Structure through VAP-Nir Protein Interaction. *J. Biol. Chem.* **280**: 5934–5944
- Balla T, Kim YJ, Alvarez-Prats A & Pemberton J (2019) Lipid Dynamics at Contact Sites Between the Endoplasmic Reticulum and Other Organelles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **35**: 85–109
- Bonifacino JS & Rojas R (2006) Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 568–579
- Bricogne G, Blanc E, Brandl M, Flensburg C, Keller P, Paciorek W, Roversi P, Sharff A, Smart O, Vonrhein C & Womack T (2019) BUSTER Version 2.10.2. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.
- Costello JL, Castro IG, Hacker C, Schrader TA, Metz J, Zeuschner D, Azadi AS, Godinho LF, Costina V, Findeisen P, Manner A, Islinger M & Schrader M (2017a) ACBD5 and VAPB mediate membrane associations between peroxisomes and the ER. *J Cell Biol*: jcb.201607055
- Costello JL, Castro IG, Schrader TA, Islinger M & Schrader M (2017b) Peroxisomal ACBD4 interacts with VAPB and promotes ER-peroxisome associations. *Cell Cycle* **16**: 1039–1045
- Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G & Lockett S (2004) Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells. *Biophys. J.* **86**: 3993–4003
- Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M & Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**: 1188–1190
- Daguenet E, Baguet A, Degot S, Schmidt U, Alpy F, Wendling C, Spiegelhalter C, Kessler P, Rio M-C, Le Hir H, Bertrand E & Tomasetto C (2012) Perispeckles are major assembly sites for the exon junction core complex. *Mol. Biol. Cell* **23**: 1765–1782

- De Vos KJ, Morotz GM, Stoica R, Tudor EL, Lau KF, Ackerley S, Warley A, Shaw CE & Miller CC (2012) VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. *Hum Mol Genet* **21**: 1299–311
- Di Mattia T, Wilhelm LP, Ikhlef S, Wendling C, Spehner D, Nominé Y, Giordano F, Mathelin C, Drin G, Tomasetto C & Alpy F (2018) Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO Rep.* **19**: e45453
- Dong R, Saheki Y, Swarup S, Lucast L, Harper JW & De Camilli P (2016) Endosome-ER Contacts Control Actin Nucleation and Retromer Function through VAP-Dependent Regulation of PI4P. *Cell* **166**: 408–423
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG & Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**: 486–501
- Fazio VJ, Peat TS & Newman J (2014) A drunken search in crystallization space. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **70**: 1303–1311
- Fournane S, Charbonnier S, Chapelle A, Kieffer B, Orfanoudakis G, Travé G, Masson M & Nominé Y (2011) Surface plasmon resonance analysis of the binding of high-risk mucosal HPV E6 oncoproteins to the PDZ1 domain of the tight junction protein MAGI-1. *J. Mol. Recognit.* **24**:511–523
- Fox PD, Haberkorn CJ, Akin EJ, Seel PJ, Krapf D & Tamkun MM (2015) Induction of stable ER–plasma-membrane junctions by Kv2.1 potassium channels. *J. Cell Sci.* **128**: 2096–2105
- Freyre CAC, Rauher PC, Ejsing CS & Klemm RW (2019) MIGA2 Links Mitochondria, the ER, and Lipid Droplets and Promotes De Novo Lipogenesis in Adipocytes. *Mol. Cell* Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276519306963>
- Friedman JR, DiBenedetto JR, West M, Rowland AA & Voeltz GK (2013) Endoplasmic reticulum–endosome contact increases as endosomes traffic and mature. *Mol. Biol. Cell* **24**: 1030–1040
- Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J & Voeltz GK (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* **334**: 358–62
- Furuita K, Jee J, Fukada H, Mishima M & Kojima C (2010) Electrostatic Interaction between Oxysterol-binding Protein and VAMP-associated Protein A Revealed by NMR and Mutagenesis Studies. *J. Biol. Chem.* **285**: 12961–12970
- Gabardinho J, Beteva A, Guijarro M, Rey-Bakaikoa V, Spruce D, Bowler MW, Brockhauser S, Flot D, Gordon EJ, Hall DR, Lavault B, McCarthy AA, McCarthy J, Mitchell E, Monaco S, Mueller-Dieckmann C, Nurizzo D, Ravelli RBG, Thibault X, Walsh MA, et al (2010) MxCuBE: a synchrotron beamline control environment customized for macromolecular crystallography experiments. *J. Synchrotron Radiat.* **17**: 700–707
- Go et al. (in preparation) A proximity biotinylation map of a human cell. *HttpsCell-Maporg*
- Hagemans D, van Belzen IAEM, Morán Luengo T & Rüdiger SGD (2015) A script to highlight hydrophobicity and charge on protein surfaces. *Front. Mol. Biosci.* **2**: 56
- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan J-L & Mizushima N (2008) FIP200, a ULK- interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **181**: 497–510
- Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP & Minghim R (2015) InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* **16**: 169
- Hönscher C, Mari M, Auffarth K, Bohnert M, Griffith J, Geerts W, van der Laan M, Cabrera M, Reggiori F &

- Ungermann C (2014) Cellular Metabolism Regulates Contact Sites between Vacuoles and Mitochondria. *Dev. Cell* **30**: 86–94
- Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V & Skrzypek E (2015) PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* **43**: D512–D520
- Huttlin EL, Bruckner RJ, Paulo JA, Cannon JR, Ting L, Baltier K, Colby G, Gebreab F, Gygi MP, Parzen H, Szpyt J, Tam S, Zarraga G, Pontano-Vaites L, Swarup S, White AE, Schweppe DK, Rad R, Erickson BK, Obar RA, et al (2017) Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature* **545**: 505–509
- Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, Gebreab F, Gygi MP, Szpyt J, Tam S, Zarraga G, Colby G, Baltier K, Dong R, Guarani V, Vaites LP, Ordureau A, Rad R, Erickson BK, Wühr M, Chick J, Zhai B, Kolippakkam D, et al (2015) The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell* **162**: 425–440
- Johnson B, Leek AN, Solé L, Maverick EE, Levine TP & Tamkun MM (2018) Kv2 potassium channels form endoplasmic reticulum/plasma membrane junctions via interaction with VAPA and VAPB. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**: E7331–E7340
- Kabashi E, El Oussini H, Bercier V, Gros-Louis F, Valdmanis PN, McDearmid J, Mejjier IA, Dion PA, Dupre N, Hollinger D, Sinniger J, Dirrig-Grosch S, Camu W, Meiningner V, Loeffler J-P, René F, Drapeau P, Rouleau GA & Dupuis L (2013) Investigating the contribution of VAPB/ALS8 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **22**: 2350–2360
- Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**: 125–132
- Kaiser SE, Brickner JH, Reilein AR, Fenn TD, Walter P & Brunger AT (2005) Structural basis of FFAT motif-mediated ER targeting. *Structure* **13**: 1035–45
- Karplus PA & Diederichs K (2015) Assessing and maximizing data quality in macromolecular crystallography. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **34**: 60–68
- Kawano M, Kumagai K, Nishijima M & Hanada K (2006) Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J Biol Chem* **281**: 30279–88
- Kirmiz M, Vierra NC, Palacio S & Trimmer JS (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
- Kumagai K, Kawano M, Shinkai-Ouchi F, Nishijima M & Hanada K (2007) Interorganelle trafficking of ceramide is regulated by phosphorylation-dependent cooperativity between the PH and START domains of CERT. *J Biol Chem* **282**: 17758–66
- Kumagai K, Kawano-Kawada M & Hanada K (2014) Phosphoregulation of the Ceramide Transport Protein CERT at Serine 315 in the Interaction with VAMP-associated Protein (VAP) for Inter-organelle Trafficking of Ceramide in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **289**: 10748–10760
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–8
- Laskowski RA, Moss DS & Thornton JM (1993) Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* **231**: 1049–1067

- Levine T & Loewen C (2006) Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 371–8
- Lim ST, Antonucci DE, Scannevin RH & Trimmer JS (2000) A Novel Targeting Signal for Proximal Clustering of the Kv2.1 K⁺ Channel in Hippocampal Neurons. *Neuron* **25**: 385–397
- Loewen CJR, Roy A & Levine TP (2003) A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J.* **22**: 2025–2035
- Lv BF, Yu CF, Chen YY, Lu Y, Guo JH, Song QS, Ma DL, Shi TP & Wang L (2006) Protein tyrosine phosphatase interacting protein 51 (PTPIP51) is a novel mitochondria protein with an N-terminal mitochondrial targeting sequence and induces apoptosis. *Apoptosis* **11**: 1489–1501
- Matthews BW (1968) Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**: 491–497
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC & Read RJ (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**: 658–674
- McCune BT, Tang W, Lu J, Eaglesham JB, Thorne L, Mayer AE, Condiff E, Nice TJ, Goodfellow I, Krezel AM & Virgin HW (2017) Noroviruses Co-opt the Function of Host Proteins VAPA and VAPB for Replication via a Phenylalanine–Phenylalanine–Acidic–Tract–Motif Mimic in Nonstructural Viral Protein NS1/2. *mBio* **8**: e00668-17
- Mesmin B, Bigay J, Moser von Filseck J, Lacas-Gervais S, Drin G & 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
- Mesmin B, Bigay J, Polidori J, Jamecna D, Lacas-Gervais S & Antonny B (2017) Sterol transfer, PI4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP. *EMBO J.* **36**: 3156– 30 3174
- Mikitova V & Levine TP (2012) Analysis of the Key Elements of FFAT-Like Motifs Identifies New Proteins That Potentially Bind VAP on the ER, Including Two AKAPs and FAPP2. *PLOS ONE* **7**: e30455
- Murphy SE & Levine TP (2016) VAP, a Versatile Access Point for the Endoplasmic Reticulum: Review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1861**: 952–961
- Okegawa Y & Motohashi K (2015) A simple and ultra-low cost homemade seamless ligation cloning extract (SLiCE) as an alternative to a commercially available seamless DNA cloning kit. *Biochem. Biophys. Rep.* **4**: 148–151
- Orchard S, Ammari M, Aranda B, Breuza L, Briganti L, Broackes-Carter F, Campbell NH, Chavali G, Chen C, del-Toro N, Duesbury M, Dumousseau M, Galeota E, Hinz U, Iannuccelli M, Jagannathan S, Jimenez R, Khadake J, Lagreid A, Licata L, et al (2014) The MIntAct project—IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic Acids Res.* **42**: D358–D363
- Oughtred R, Stark C, Breitkreutz B-J, Rust J, Boucher L, Chang C, Kolas N, O'Donnell L, Leung G, McAdam R, Zhang F, Dolma S, Willems A, Coulombe-Huntington J, Chatr-aryamontri A, Dolinski K & Tyers M (2019) The BioGRID interaction database: 2019 update. *Nucleic Acids Res.* **47**: D529–D541
- Park H-S, Hohn MJ, Umehara T, Guo L-T, Osborne EM, Benner J, Noren CJ, Rinehart J & Söll D (2011) Expanding the Genetic Code of *Escherichia coli* with Phosphoserine. *Science* **333**: 1151–1154
- Pirman NL, Barber KW, Aerni HR, Ma NJ, Haimovich AD, Rogulina S, Isaacs FJ & Rinehart J (2015) A flexible codon in genomically recoded *Escherichia coli* permits programmable protein phosphorylation. *Nat. Commun.* **6**: 8130

- Prinz WA, Toulmay A & Balla T (2019) The functional universe of membrane contact sites. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*: 1–18
- Rocha N, Kuijl C, Kant R van der, Janssen L, Houben D, Janssen H, Zwart W & Neefjes J (2009) Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7–RILP–p150Glued and late endosome positioning. *J. Cell Biol.* **185**: 1209–1225
- Slee JA & Levine TP (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**: 2515256419883136
- Smart OS, Womack TO, Flensburg C, Keller P, Paciorek W, Sharff A, Vonrhein C & Bricogne G (2012) Exploiting structure similarity in refinement: automated NCS and target-structure restraints in BUSTER. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**: 368–380
- Stanhope R, Flora E, Bayne C & Derré I (2017) IncV, a FFAT motif-containing *Chlamydia* protein, tethers the endoplasmic reticulum to the pathogen-containing vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: 12039–12044
- Stoica R, Vos KJD, Paillusson S, Mueller S, Sancho RM, Lau K-F, Vizcay-Barrena G, Lin W-L, Xu Y-F, Lewis J, Dickson DW, Petrucelli L, Mitchell JC, Shaw CE & Miller CCJ (2014) ER–mitochondria associations are regulated by the VAPB–PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD- associated TDP-43. *Nat. Commun.* **5**: ncomms4996
- Sugiki T, Egawa D, Kumagai K, Kojima C, Fujiwara T, Takeuchi K, Shimada I, Hanada K & Takahashi H (2018) Phosphoinositide binding by the PH domain in ceramide transfer protein (CERT) is inhibited by hyperphosphorylation of an adjacent serine-repeat motif. *J. Biol. Chem.* **293**: 11206–11217
- Taus T, Köcher T, Pichler P, Paschke C, Schmidt A, Henrich C & Mechtler K (2011) Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS. *J. Proteome Res.* **10**: 5354–5362
- Tickle I, Flensburg C, Keller P, Paciorek W, Sharff A, Vonrhein C & Bricogne G (2018) STARANISO (<http://staraniso.globalphasing.org/cgi-bin/staraniso.cgi>). Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.
- Valm AM, Cohen S, Legant WR, Melunis J, Hershberg U, Wait E, Cohen AR, Davidson MW, Betzig E & Lippincott-Schwartz J (2017) Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature* **546**: 162–167
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M & Barton GJ (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**: 1189–1191
- Westrate LM, Lee JE, Prinz WA & Voeltz GK (2015) Form Follows Function: The Importance of Endoplasmic Reticulum Shape. *Annu. Rev. Biochem.* **84**: 791–811
- Wilhelm LP, Voilquin L, Kobayashi T, Tomasetto C & Alpy F (2019) Intracellular and Plasma Membrane Cholesterol Labeling and Quantification Using Filipin and GFP-D4. In *Intracellular Lipid Transport: Methods and Protocols*, Drin G (ed) pp 137–152. New York, NY: Springer New York 11 Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9136-5_11 [Accessed May 9, 2019]
- Wilhelm LP, Wendling C, Védie B, Kobayashi T, Chenard M-P, Tomasetto C, Drin G & Alpy F (2017) STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *EMBO J.* **36**: 1412–1433
- Wu H, Carvalho P & Voeltz GK (2018) Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *Science* **361**: eaan5835

Zhang Y, Liu X, Bai J, Tian X, Zhao X, Liu W, Duan X, Shang W, Fan H-Y & Tong C (2016) Mitoguardin Regulates Mitochondrial Fusion through MitoPLD and Is Required for Neuronal Homeostasis. *Mol. Cell* **61**: 111–124

Zhao YG, Liu N, Miao G, Chen Y, Zhao H & Zhang H (2018) The ER Contact Proteins VAPA/B Interact with Multiple Autophagy Proteins to Modulate Autophagosome Biogenesis. *Curr. Biol.* **28**:221234

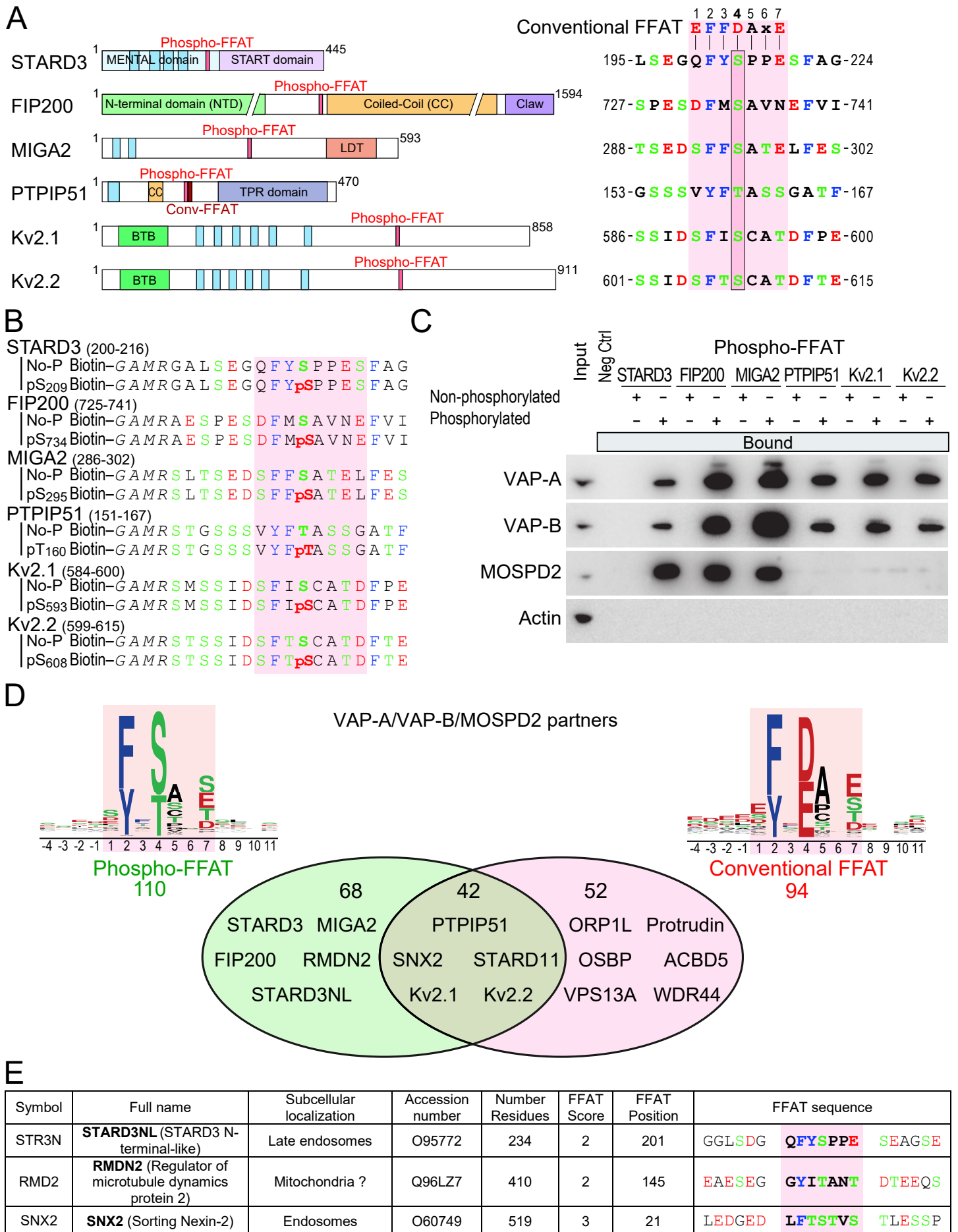


Figure 1

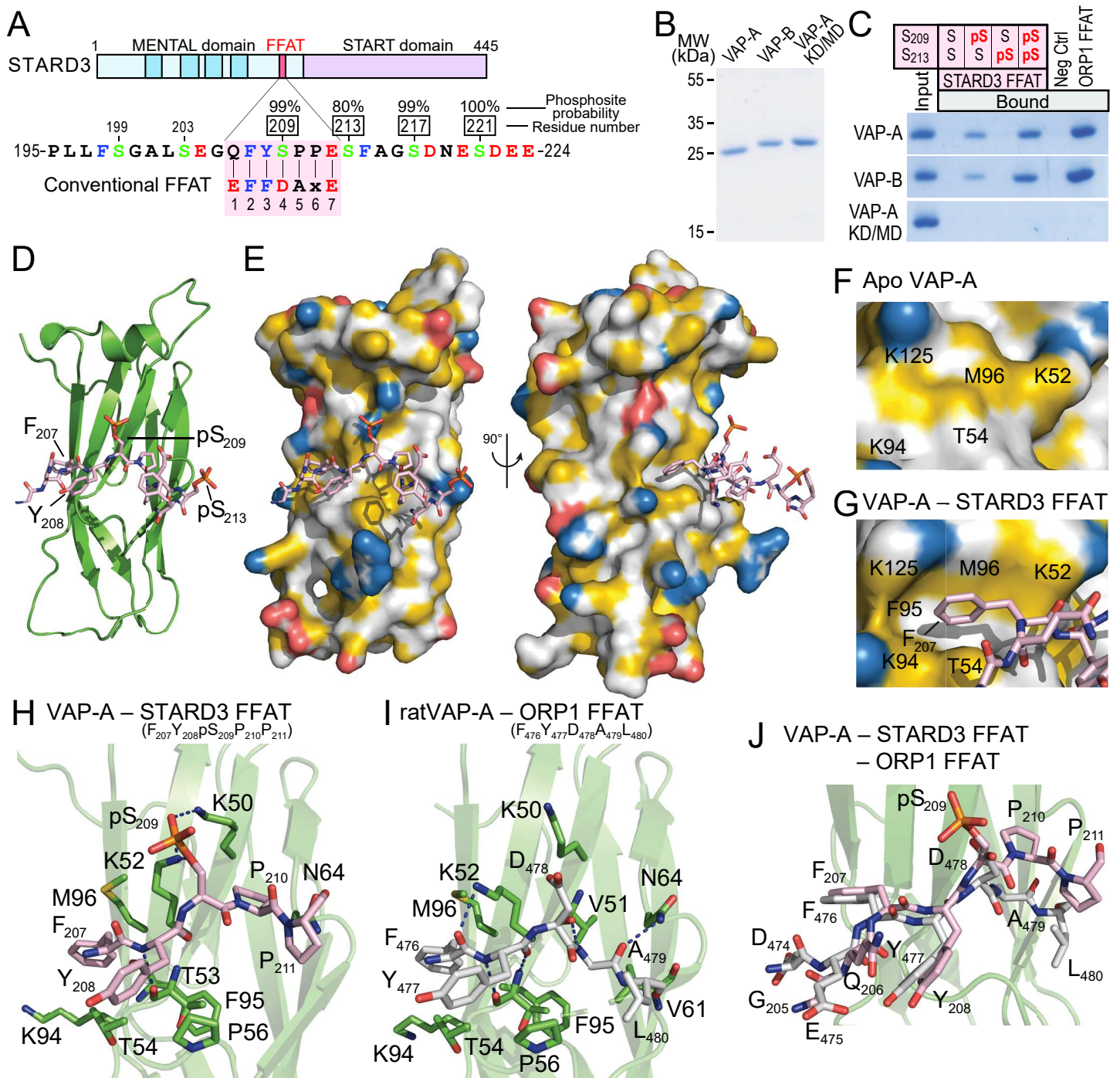
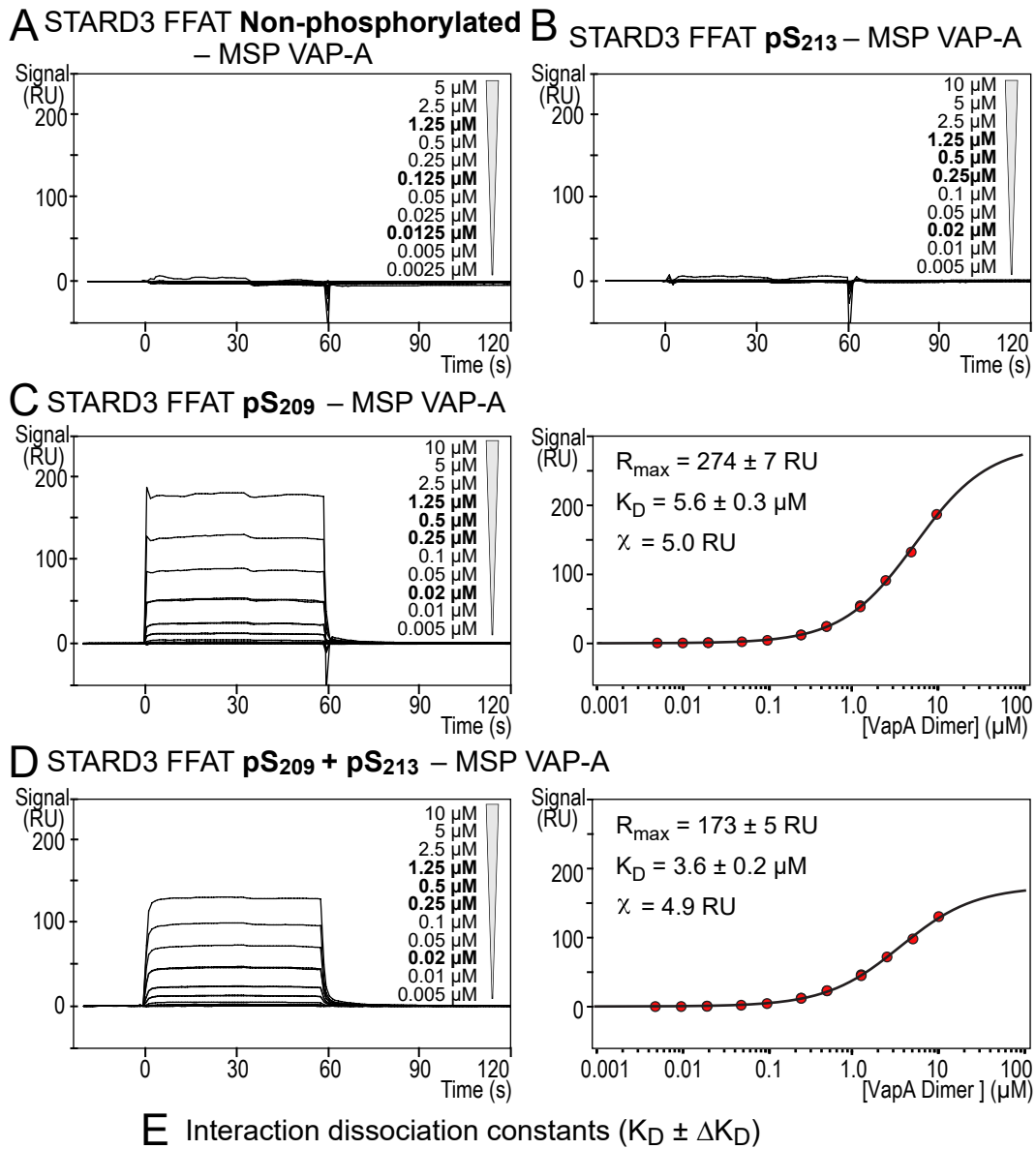


Figure 2



		MSP domain	
		VAP-A	VAP-B
STARD3 FFAT Peptide	Non-phosphorylated	No Binding	No Binding
	pS ₂₀₉	$5.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$	$7.1 \pm 0.4 \mu\text{M}$
	pS ₂₁₃	No Binding	No Binding
	pS ₂₀₉ +pS ₂₁₃	$3.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$	$4.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$

Figure 3

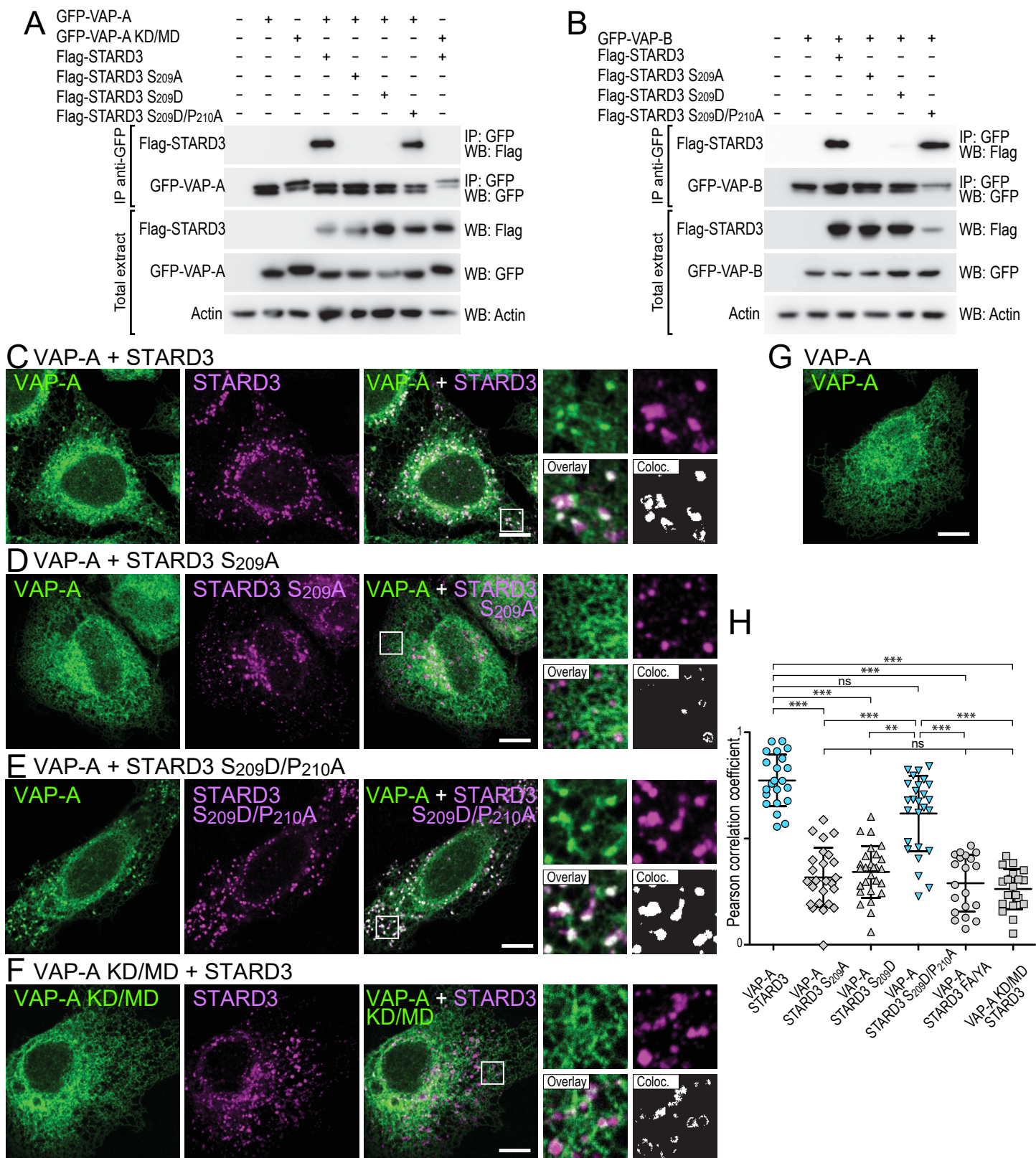


Figure 4

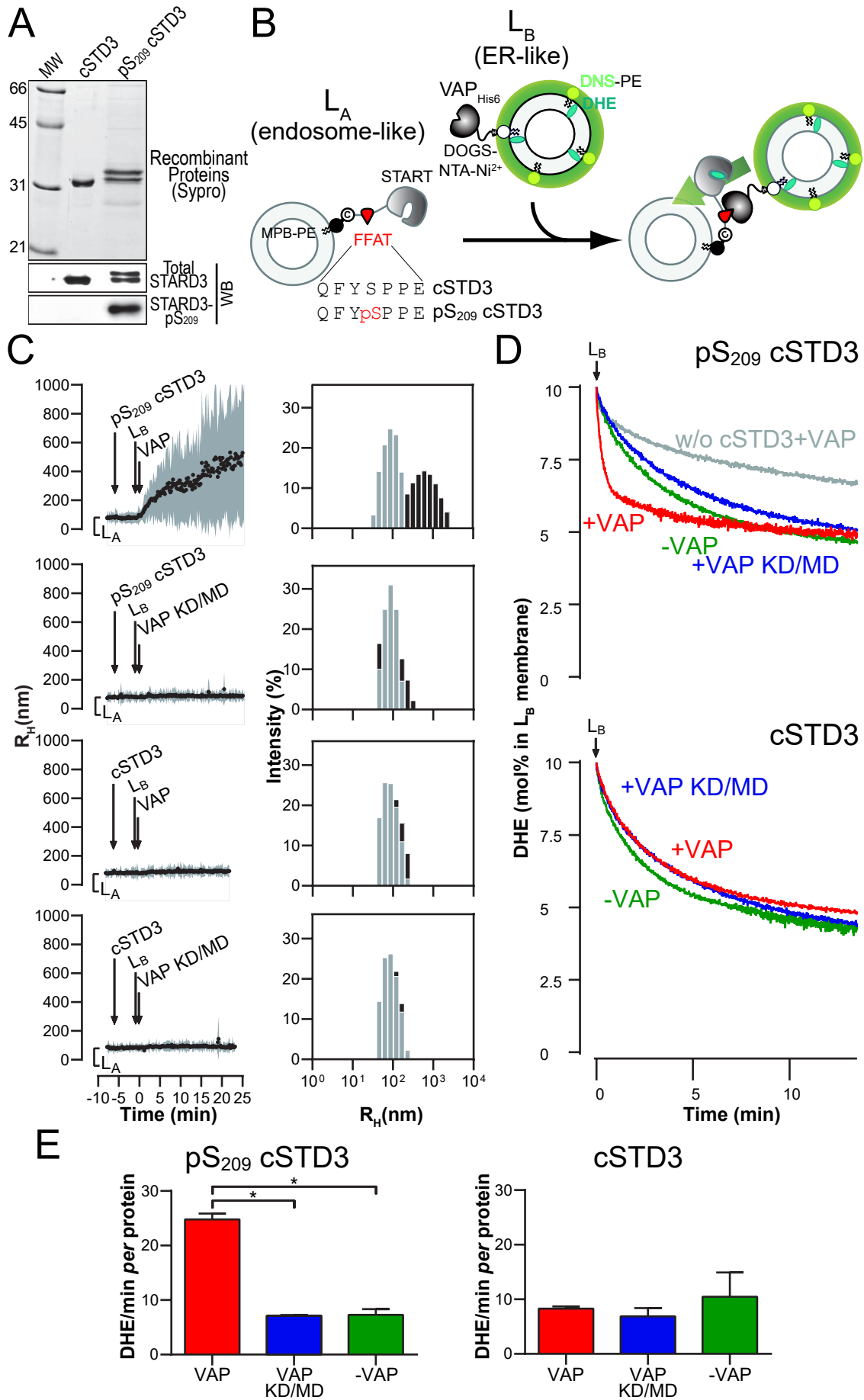
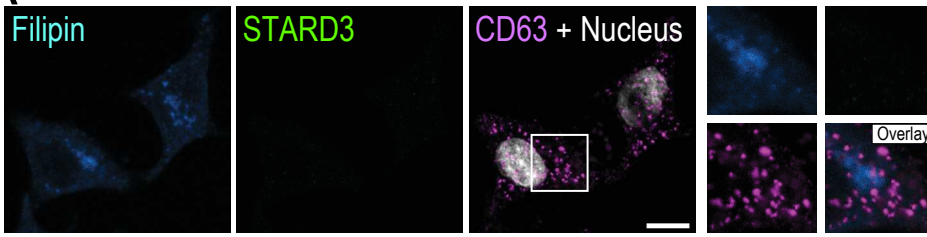
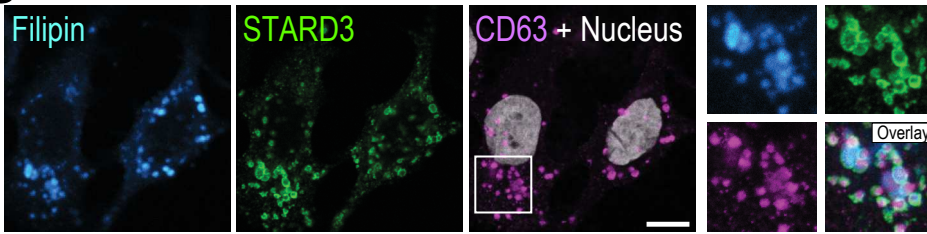


Figure 5

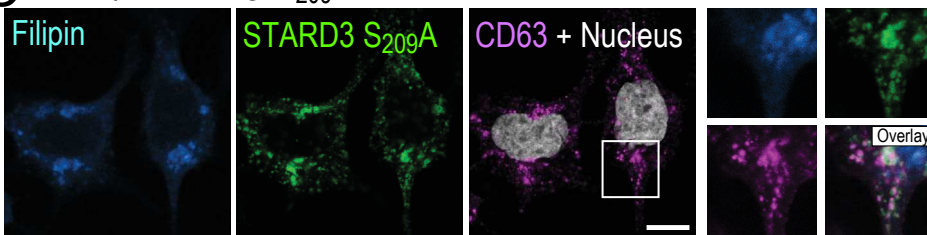
A HeLa/Control



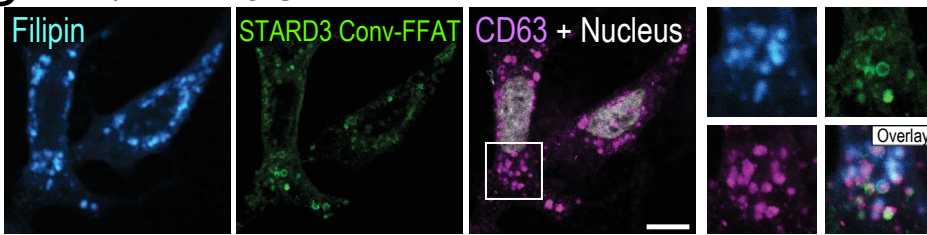
B HeLa/STARD3



C HeLa/STARD3 S₂₀₉A



D HeLa/STARD3 Conv-FFAT



E

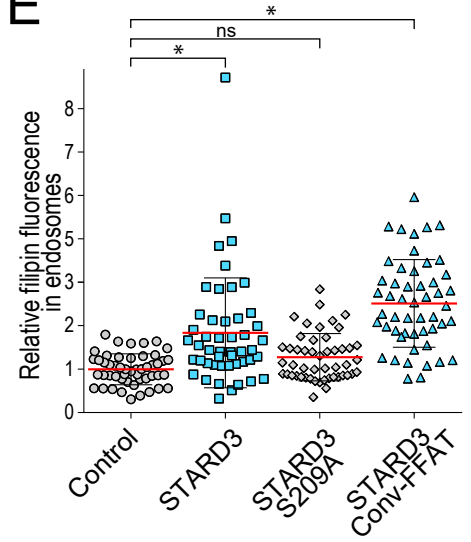


Figure 6

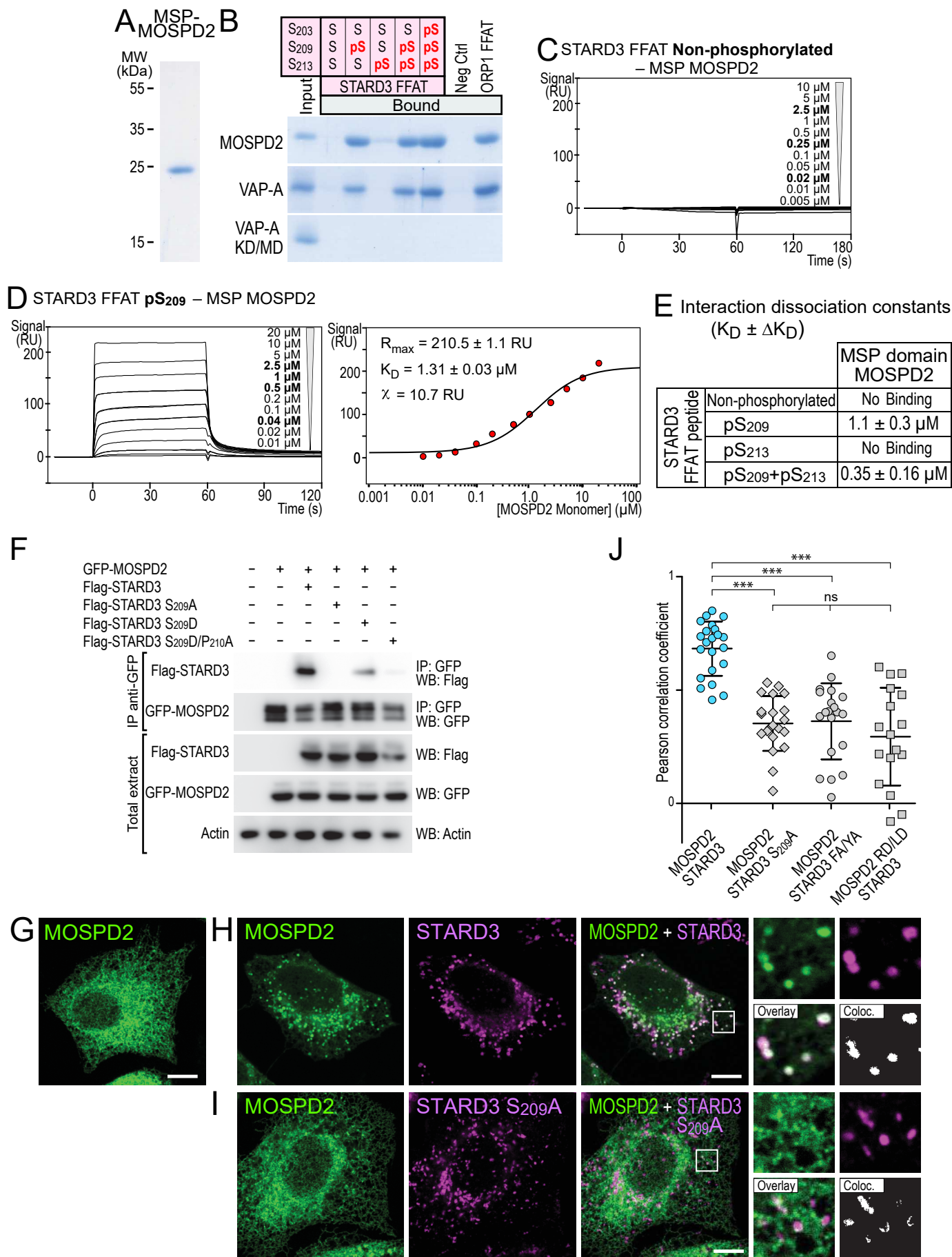


Figure 7

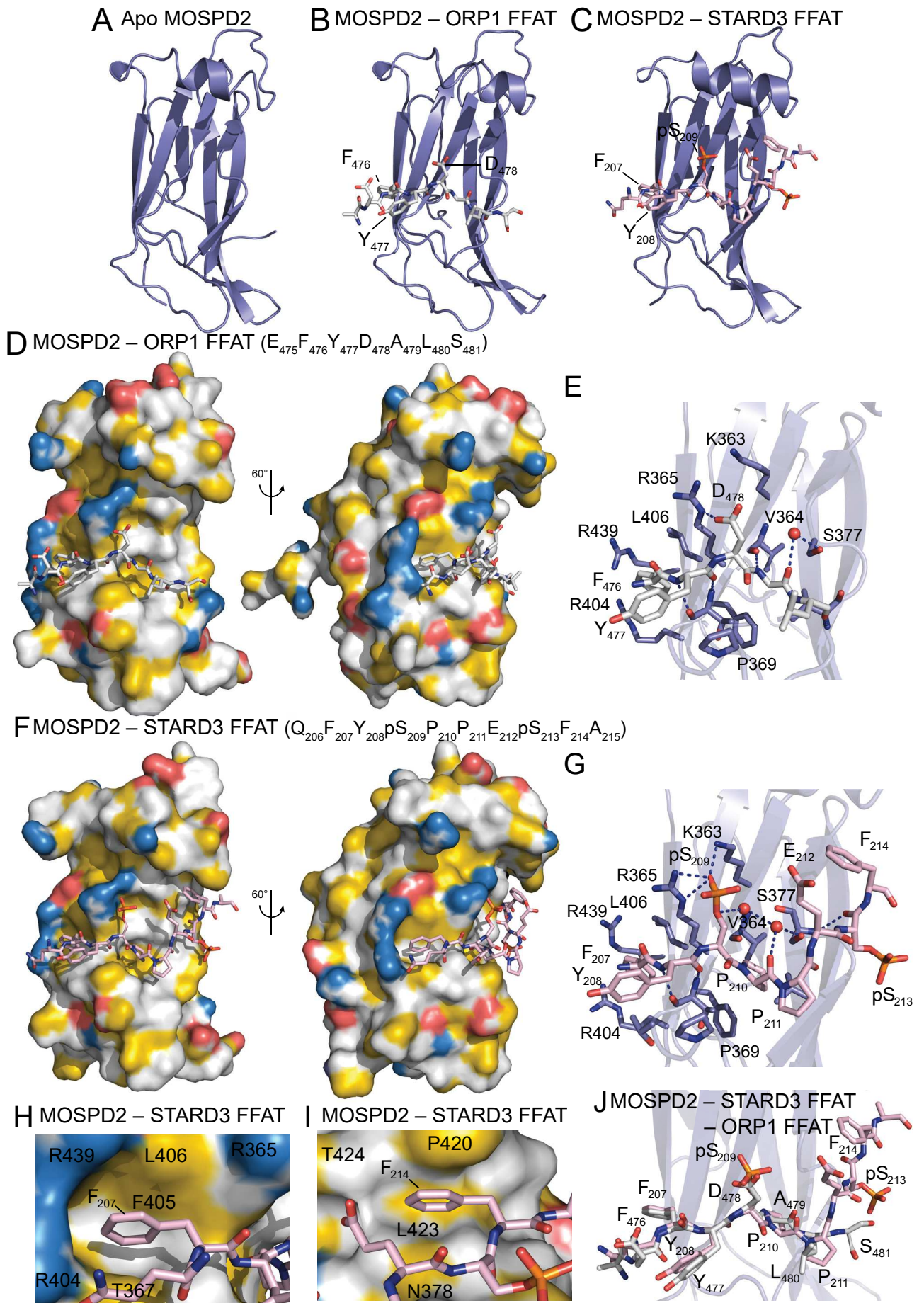


Figure 8

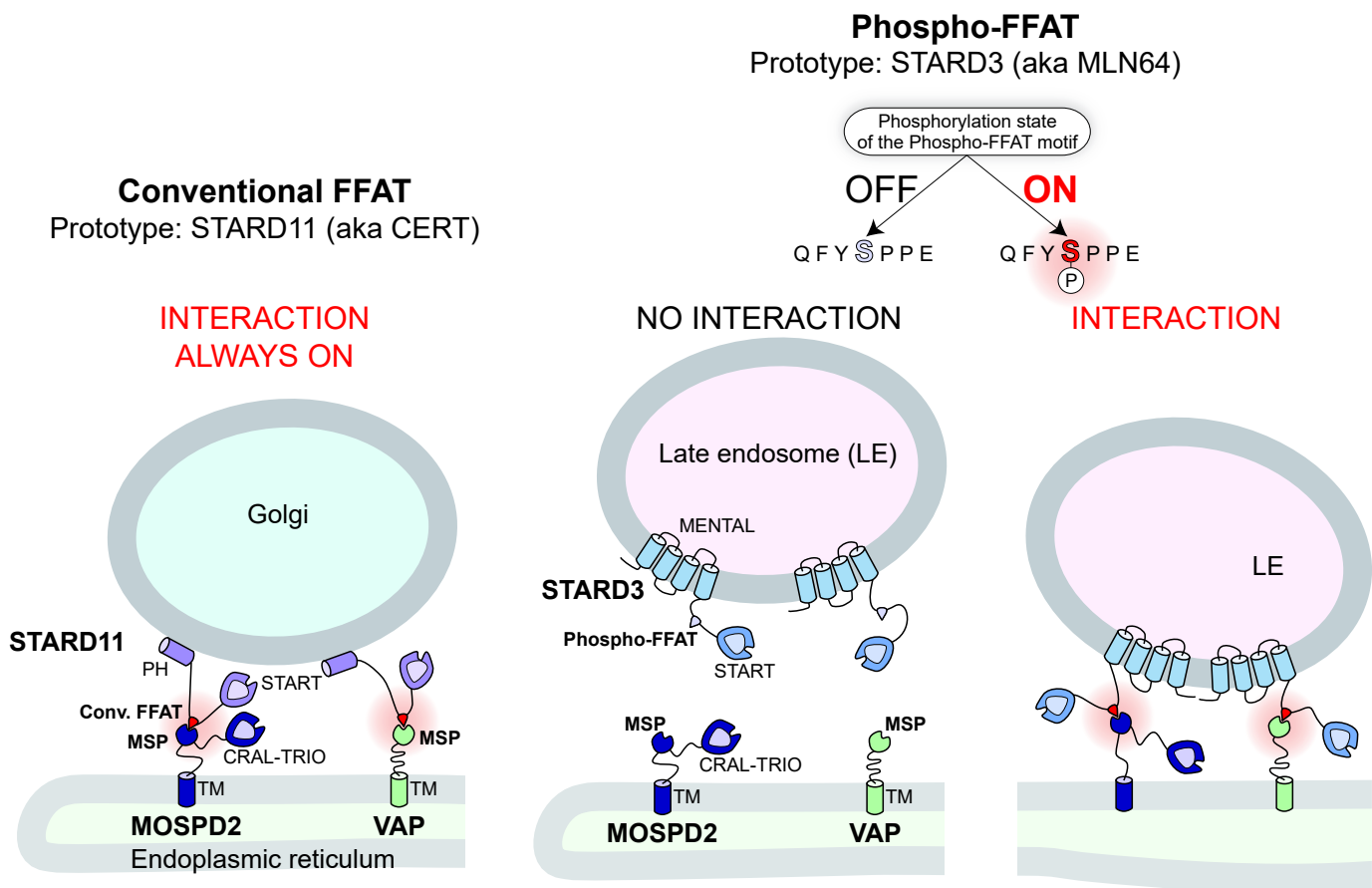
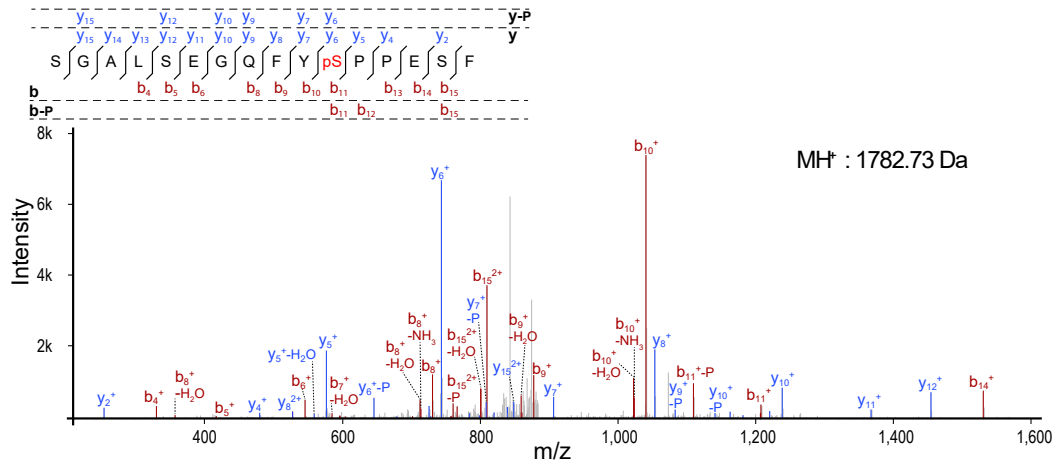
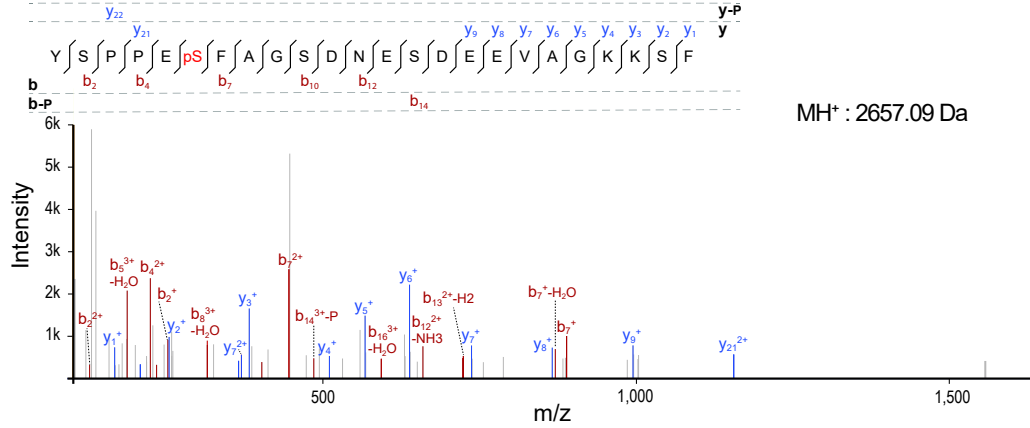


Figure 9

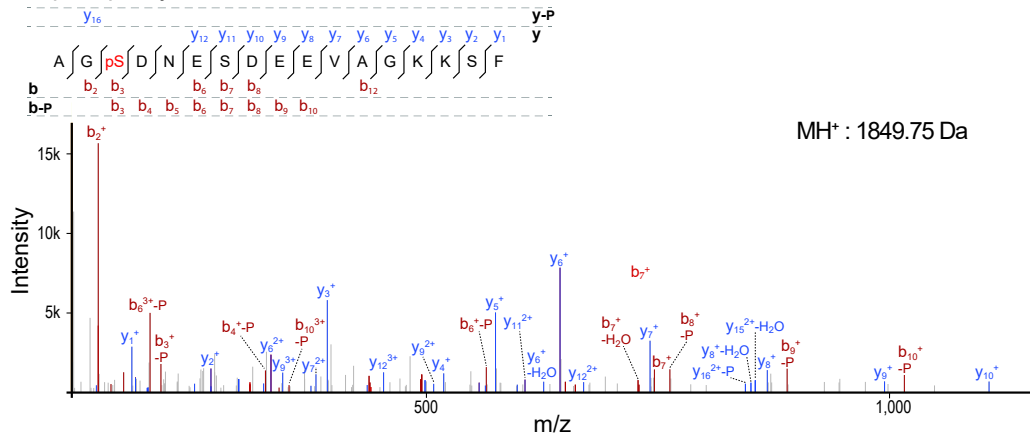
A S₂₀₉ phosphorylation identification



B S₂₁₃ phosphorylation identification



C S₂₁₇ phosphorylation identification



D S₂₂₁ phosphorylation identification

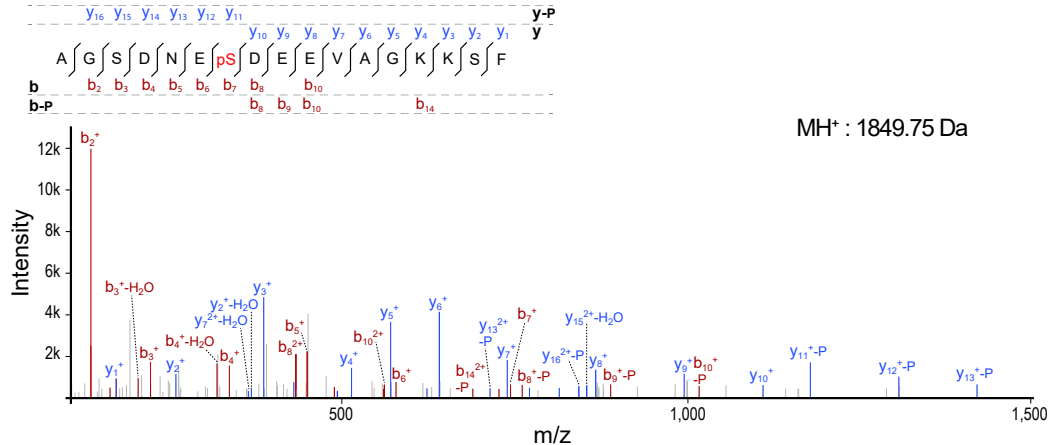


Figure S1

Apo VAP-A (green) and Phospho-FFAT-bound VAP-A (cyan)

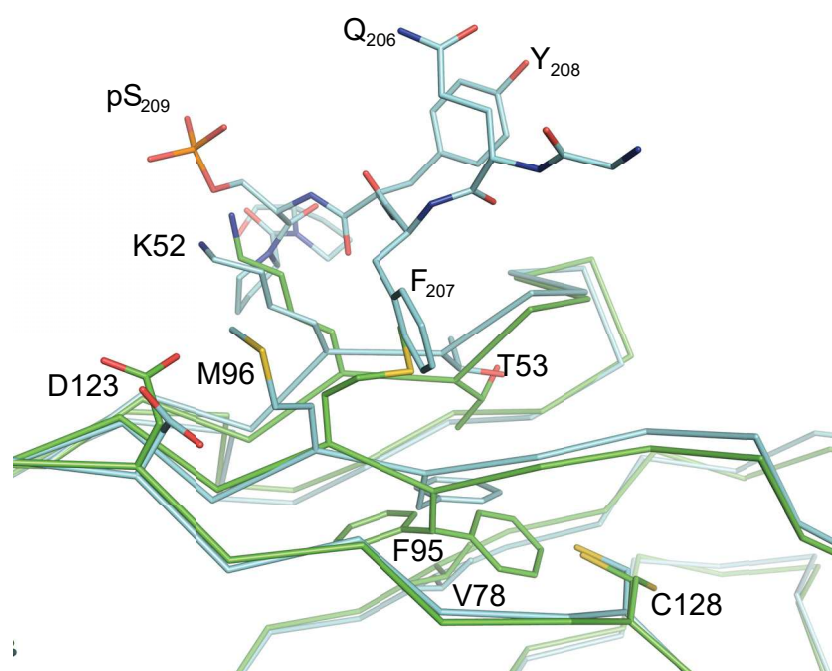


Figure S2

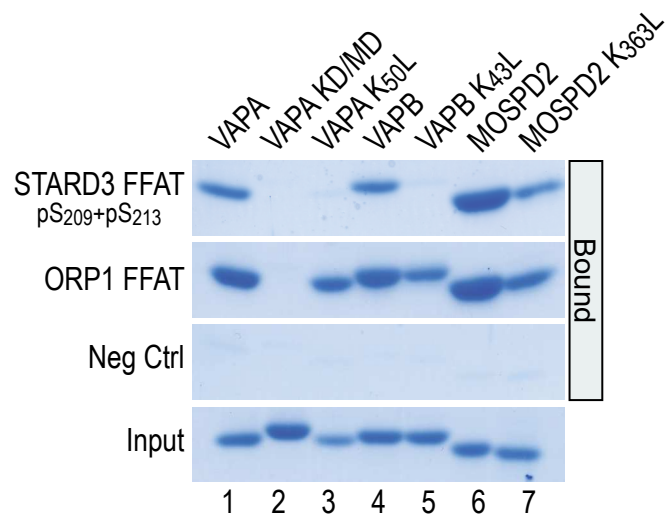


Figure S3

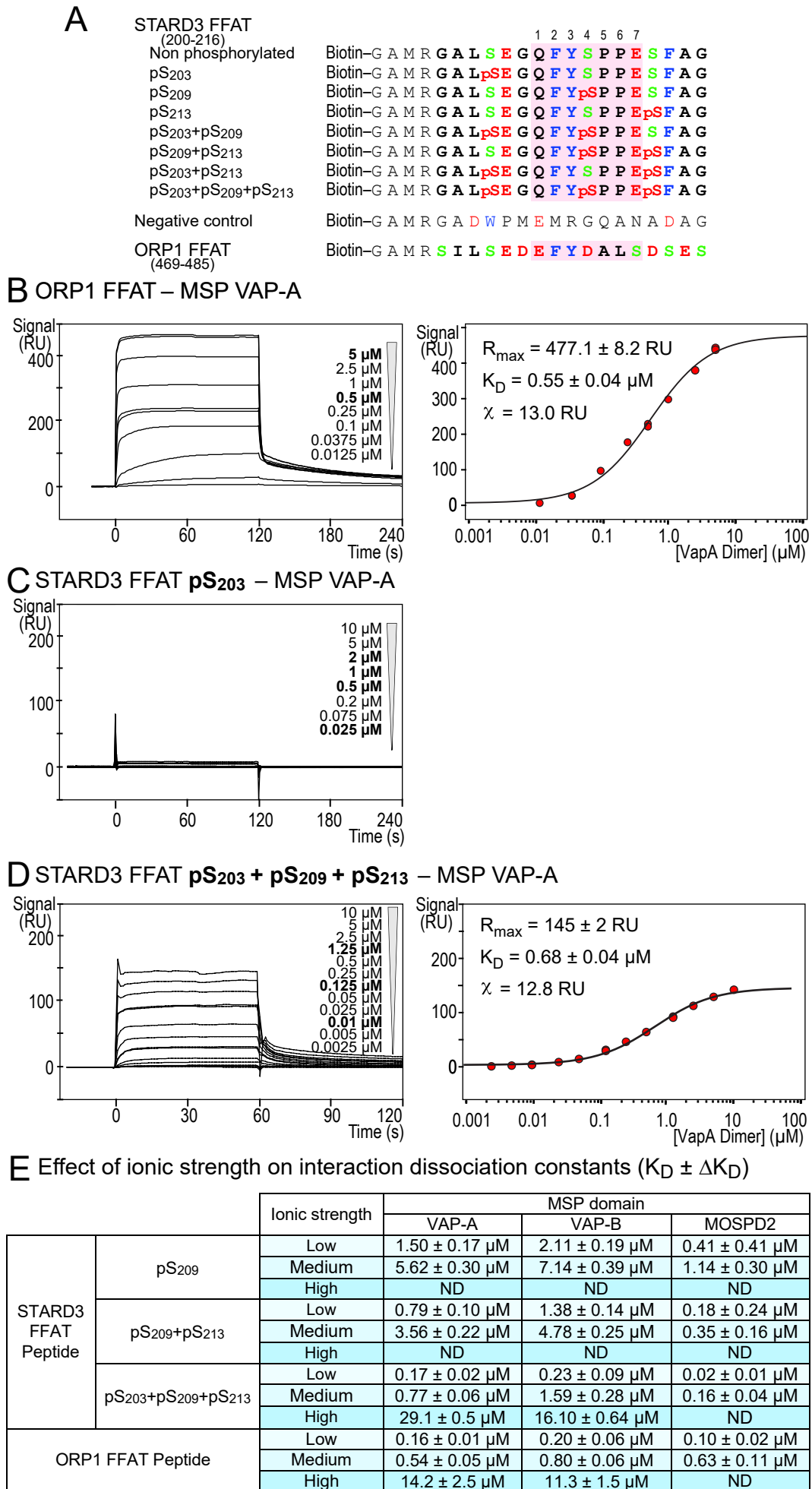


Figure S4

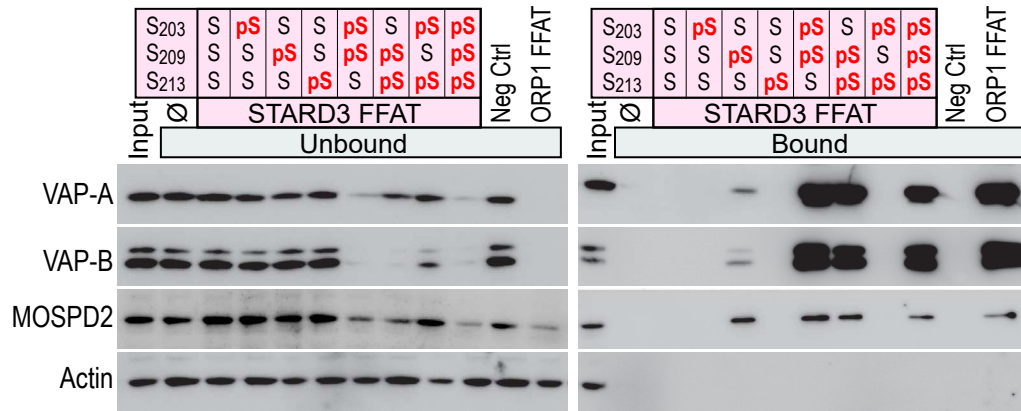


Figure S5

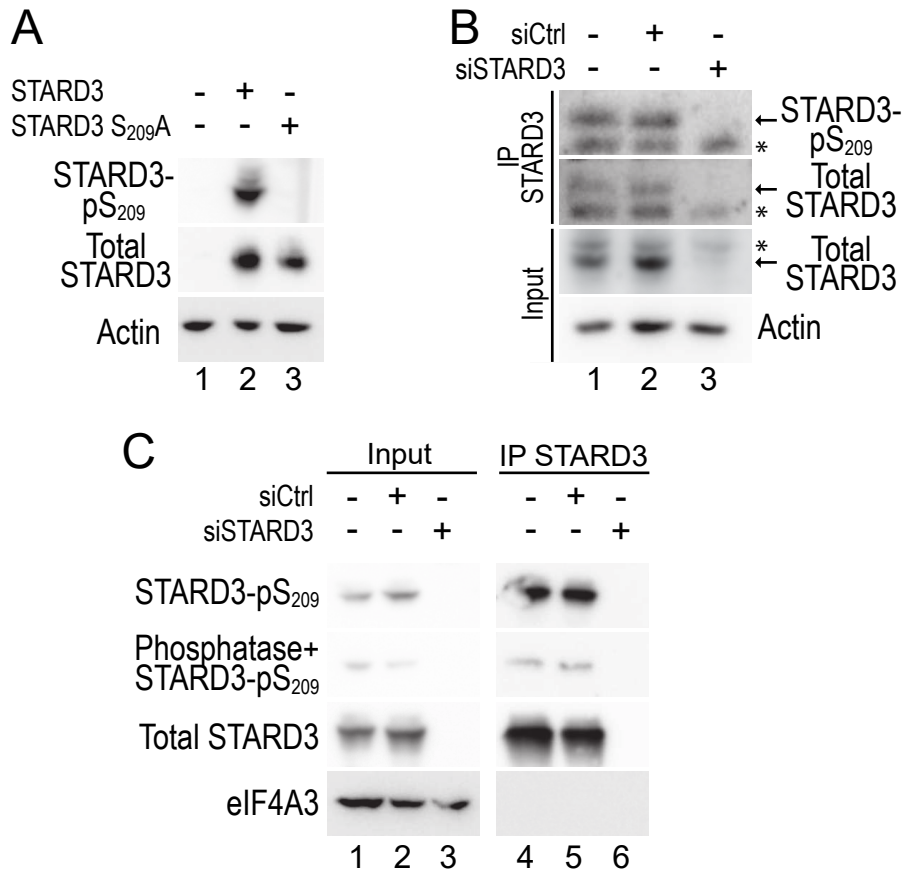
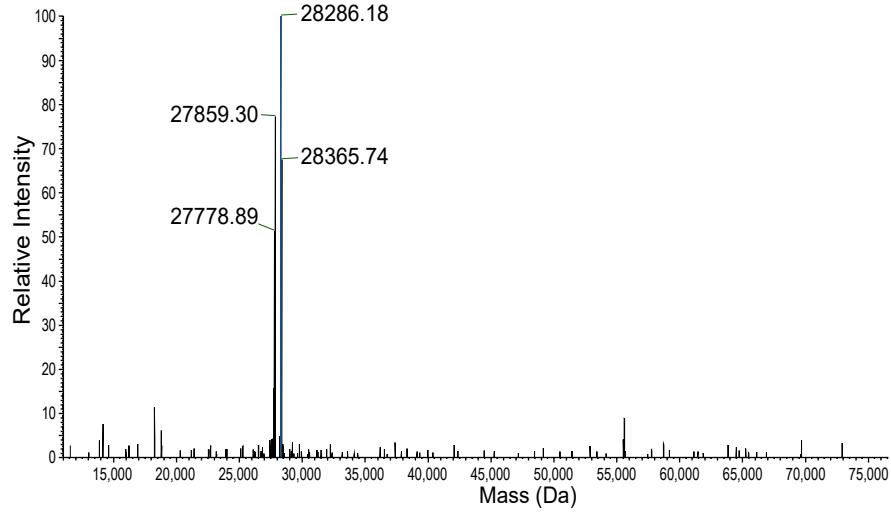
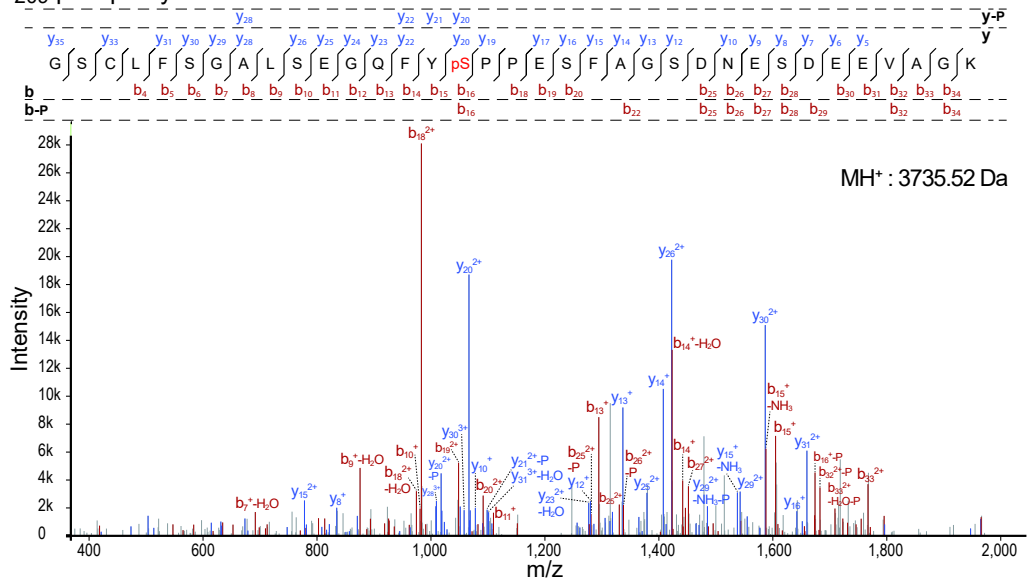


Figure S7

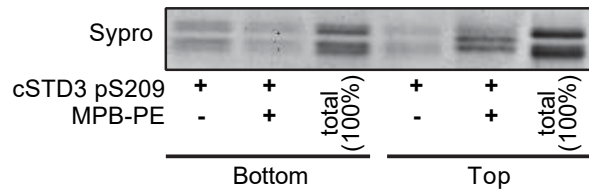
A Mass spectrometry analysis of pS₂₀₉ cSTD3



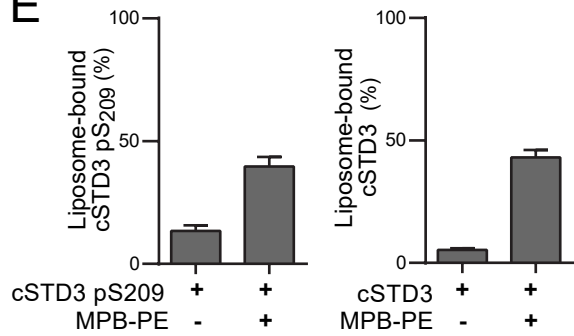
B S₂₀₉ phosphorylation identification



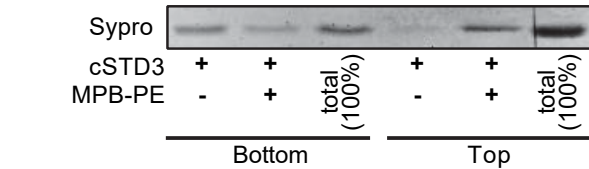
C pS₂₀₉ cSTD3 liposome flotation assay



E



D cSTD3 liposome flotation assay



F

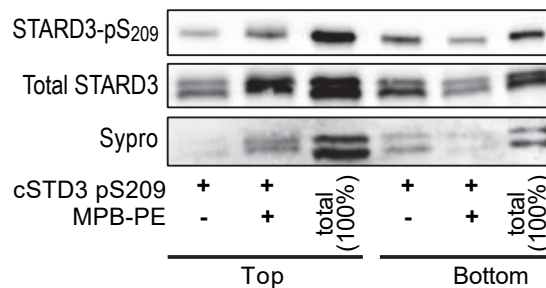


Figure S8

A

MOSPD2	322	V	F	K	G	P	L	L	H	S	P	A	E	E	L	Y	F	G	S	T	E	S	G	E	K	K	T	L	I	V	L	T	N	V	T	K	N	I	V	A	F	K	V	R	T	T	A	P	E	K	Y	R	V	K	P	S	N	S	S	C	D	P	G	A
VAP-A	9	A	K	H	E	Q	I	L	V	L	D	P	P	T	D	L	K	F	K	G	P	F	T	D	V	V	T	N	L	K	L	R	N	P	S	D	R	K	V	C	F	K	V	K	T	T	A	P	R	R	Y	C	V	R	P	N	S	G	I	I	D	P	G	S
VAP-B	2	A	K	V	E	Q	V	L	S	L	E	P	Q	H	E	L	K	F	R	G	P	F	T	D	V	V	T	N	L	K	L	G	N	P	T	D	R	N	V	C	F	K	V	K	T	T	A	P	R	R	Y	C	V	R	P	N	S	G	I	I	D	A	G	A

MOSPD2	386	S	V	D	I	V	S	P	H	G	-	-	G	L	-	T	V	S	A	Q	D	R	F	L	I	M	A	A	E	M	E	Q	S	S	G	T	G	P	A	E	L	T	Q	F	W	K	E	V	P	R	N	K	V	M	E	H	R	L	R	C	H	T	V	445	
VAP-A	73	T	V	T	V	S	V	M	L	Q	P	F	D	Y	D	P	N	E	K	S	K	H	K	F	M	V	Q	T	I	F	A	P	-	P	N	T	S	-	-	-	D	M	E	A	V	W	K	E	A	K	P	D	E	L	M	D	S	K	L	R	C	V	F	E	131
VAP-B	66	S	I	N	V	S	V	M	L	Q	P	F	D	Y	D	P	N	E	K	S	K	H	K	F	M	V	Q	S	M	F	A	P	-	T	D	T	S	-	-	-	D	M	E	A	V	W	K	E	A	K	P	E	D	L	M	D	S	K	L	R	C	V	F	E	124

B

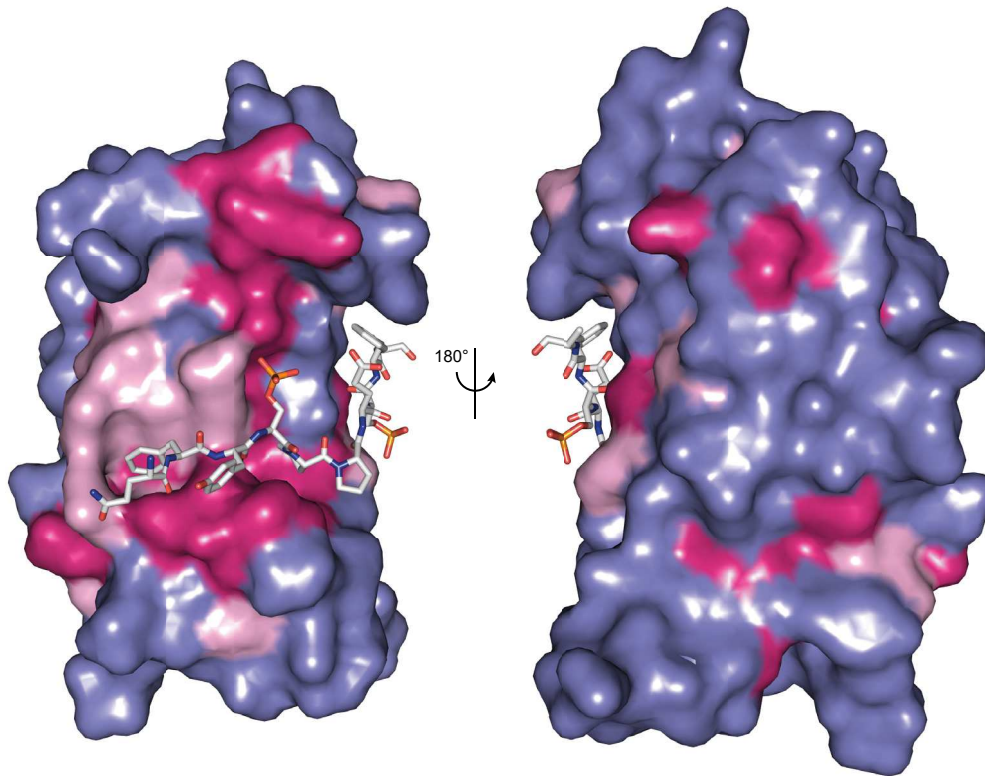


Figure S9

Table S2

NAME	ID	# residues	Phospho-FFAT								Conventional FFAT						
			SCORE1	START	N-ter	CORE	C-ter	SCORE2	START	N-ter	CORE	C-ter	SCORE	START	N-ter	CORE	C-ter
MIGA2	Q7L4E1	593	0	286	SLTSED	SFFSATE	LFESLIQ	4.5	42	PGLRKY	LFATALG	TVALAL	4	286	SLTSED	SFFSATE	LFESLIQ
F170A	A1A519	330	1	50	EVTSIS	EYCSCVS	SSRRLI	1	103	LSLSSY	SYKTCVS	SLCVNK	5	50	EVTSIS	EYCSCVS	SSRRLI
EMD	P50402	254	1	92	DDYYEE	SYFTTRT	YGEPEE	2	183	PTSSST	SFMSSSS	SSSSWL	3	98	SYFTTR	YGEPEE	AGPSRA
KCNB1	Q14721	858	1	584	SMSSID	SFISCAT	DFPEAT	5.5	267	LLAILP	YVVTIFL	TESNKS	2.5	748	FEAGVY	QYIDAT	DDEGQL
SPEG	Q15772	3267	1	704	LESDD	SYVSAGE	EPLAEP	2	823	PITSDE	EYLSPE	EFPEPG	3	830	YLSPPP	EFPEPE	TWTRPE
CSCL2	Q5T3F8	832	1	811	DALTD	DFQSCED	SLIENE	3.5	328	QVEAI	EYTKLE	QKPKED	3	493	TIVYYS	AFPEAHW	TRSGEN
AFTIN	Q6ULP2	936	1	414	NGDSSN	DFVTCND	INEDDF	2	554	DSDDFA	DFSSAGP	SQVVDW	2	454	DSMSDA	TFEESSE	HFPHFS
RASF3	Q86WH2	238	1	9	EEDAED	FFFTART	SFFRRA	4.5	-2		GYSSLEE	DAEDFF	5	9	EEDAED	FFFTART	SFFRRA
M4K3	Q8IVH8	894	1	359	LDSSSE	IYTTARS	NLDLQL	4	836	HGMQGR	SFRSNEV	TQEISD	3	351	ELPDS	GFLDSE	EIYYTA
CMTR1	Q8N1G2	835	1	306	NDFKLE	DFYSASS	ELFEPY	6	20	VAELAL	SLSSSTD	DEPPSS	2.5	151	ACQVVS	WFPECTT	EIPDTQ
SYNE2	Q8WXH0	6885	1	6432	EDEDEG	PYYSALS	GKSID	2.5	6162	PNSSSEV	LYTSAKE	ELKRFE	2	3386	MSSSLP	SYREALE	RLEQSK
KCNB2	Q92953	911	1	599	STSSID	SFTSCAT	DFTE	5	559	DQCEKP	ERPSAYE	EIEIEME	3	797	SSRERR	SFTEDT	GDEEDF
RMD3	Q96TC7	470	1	151	STGSSS	VYFTASS	GATFTD	3	169	DAESEG	GYYTANA	ESDNER	1	160	TASSGA	TFTDAES	EGGYTT
AKA11	Q9UKA4	1901	1	180	VSSIED	DFVTAFE	HLEEBE	2.5	1706	SSKEIE	DFQSSSE	VSSQQM	1	348	SDSEVS	EFFDSFD	QFDELE
INTU	Q9UUL6	942	1	34	RVSDSG	SYSSASS	YDDELE	5	304	NTPHII	MYLTLQL	DSETSK	3.5	24	EEDDYD	FEDFRVS	DSGSYS
SYNRG	Q9UMZ2	1314	1	554	LGESFA	EFRSAGT	DDGFTD	1	566	TDGFT	DKTADS	VSPLEP	2.5	454	EEDDFQ	DFQDASK	SGSLDD
UBP20	Q9Y2K6	914	1	276	RSPSED	EFLSCDS	SSDRGE	5	434	RRRKEQ	RYRSVIS	DIFDGS	4	652	INGQWY	EFDDQYV	TEVHET
NACAD	Q15069	1562	1.5	166	PPPDP	SFFTPTS	TPTKTT	2	213	PASPSG	SYITADG	DSWASS	1	389	SDSDSA	SYAEADD	ERLYSG
FAC2	Q02751	2386	1.5	364	FYNGR	TFYSCCT	EGRODG	2	690	QEVTRF	DFTTTST	STPVTS	3.5	424	FLYNNH	NYTDCIS	EGRRDN
SSRD	P51571	173	1.5	28	EQITP	SYTTSD	AVISTE	6.5	154	AAGLVL	IYLLAFS	AKSHIQ	5.5	28	EQITP	SYTTSD	AVISTE
SCRN1	Q12765	414	1.5	33	DEVQEV	VYFSAAD	HEPESE	3.5	265	VCIDSE	FFLTTAS	GVSVLP	2	395	PAEVDG	LFYDCVD	TEIKFF
RB3GP	Q15042	981	1.5	10	EVFEIT	DFTTASE	WERFIS	3	441	LDNLYN	QKSAAPS	DSLTYK	0	578	WSDEBE	EFFECLD	TDEBLK
WAC2A	Q641Q2	1341	1.5	455	DGDDDD	DFFSAPH	SKPSKT	2	881	DDEDDD	LFSSAKS	QPLVQE	3	371	EDEESD	LFTEAPQ	DRQAGA
DUS9	Q99956	384	1.5	362	AASNPP	SFFTPT	SDGAFE	4	363	ASNPPS	SFFTPTS	DGAFEL	3	262	SQNLBR	FFPEAIE	LDLEAL
FANCU	Q9BX63	1249	1.5	867	QIQHHS	TFESALE	SLAFSS	2	1057	LLNVTNT	PFGSCPO	SETIIS	5	1042	EKSTVL	PFTDKCE	SNNLTV
ZBT22	Q15209	634	2	201	QSPSSS	NYFSPRE	STDFSS	3	422	QGNQIL	VFPSSSS	SSSSQA	4	29	AAVVHV	SFPEVTS	ALLESL
RTN3	Q95197	1032	2	43	SSSCAD	SFVSSSS	SQPVSL	2	79	SEIMTS	SFLSSSE	IHNTEG	2.5	258	DKFKK	SYKESD	DFGWS
STR3N	Q95772	234	2	201	GLSDG	QYFSPPE	SEAGSE	3.5	86	KEVMQY	DYSSYF	DIFLLA	6	201	GGLSDG	QYFSPPE	SEAGSE
BCL10	Q95999	233	2	158	GESSTT	PFSTNS	LNLPV	4	159	ESSTTP	FFYTNSS	LNLPLV	4	118	KSCSCE	PFDDAGT	NNLSRS
NCPR	P16435	677	2	360	PFPCPT	SYRTALT	YVLDIT	3.5	209	DGNLEE	DFITWRE	QFWPAV	3	145	PDNAQ	DFYDWLQ	ETDIDL
IFB2	P20042	333	2	271	LRRYIK	EYVTCR	CRSPDT	6	274	YIKEYV	TCHTCRS	PDITLQ	5	135	DEDEIL	EKDEALE	DEDNKK
VDAC1	P21796	283	2	34	KSENGL	EFSSSGS	ANTETT	3.5	92	ARGLKL	FDSSFS	PNTGKK	5	64	TYEGLT	TFTEKWN	TDLFLG
OST48	P39656	456	2	69	DRGFEL	TFKTADD	PSSLIL	3.5	422	IPSAYP	YYASAFS	MMLGLF	4.5	112	NVETIS	AFIDGGG	SVLVAA
VDAC2	P45880	294	2	45	KSCSGV	EFSTSGS	SNTDTG	2.5	161	LAGYQM	FRDSAKS	KLTRNN	5	75	WCYGLT	TFTEKWN	TDLFLG
RAB1A	P62820	205	2	129	TKKVVV	DYTTAKE	FADSLG	5	66	DTAQEQ	RFRSTIS	SYRGA	3.5	29	LRFADD	TYTEYIS	STIGVD
UBP2L	Q14157	1087	2	525	SEPVLS	DYESTPT	TSASSS	2	729	LHSSSS	TFSTSSS	TVSAPP	3.5	197	GFENPA	DYAEPA	TDNYG
RN111	Q6ZNA4	994	2	271	TEGEED	LFVSAFE	NHQNNP	4.5	328	IVTYGE	SYRSRST	LGHRS	1	127	DEDDSD	SFSDCLL	SFSSSL
RBCC1	Q8TDY2	1594	2	725	ESPES	DFMSAVN	EFVIEE	5	1325	IAEQQT	NFNTVLT	REKMRK	5	687	LEELSP	DSIDAHT	DFDEBI
ELYS	Q8WYF5	2266	2	1708	TKLVKS	AFKTAQE	STFTMT	3.5	816	WLIDHN	EYSGLD	LHFHPA	1	1314	SDETTL	EYQDAPS	PEDELE
RMD2	Q96LZ7	410	2	145	EAESEG	GYITANT	DTEPQS	4.5	35	IAMKLP	EFLSLGN	TFNSIT	4.5	217	MWRPAR	AYGDYME	LSTNTQ
TRPM7	Q96QT4	1865	2	1547	PAMDIN	YYSAVE	RNNLMR	2.5	1349	GSSSGA	LFPSAVS	PPELRQ	3	1338	PQRKEF	NFPEAGS	SSGALF
MET14	Q9HCE5	455	2	370	NAETYA	SYFSAPN	SYLFGC	3	377	YFSAPN	SYLTGCT	EIEIERL	3.5	93	LYPEEB	IYKDSST	FLGTG
ZDBF2	Q9HCK1	2354	2	708	SDSPAS	LYHSAHD	EPQDAL	2.5	480	ISLVDQ	SYESSSS	ETNFD	4.5	940	LHTKEH	MYLENKS	VFETSL
CELR2	Q9HCU4	2923	2	2727	EDDQSG	SYASTHS	SDSEEE	3	457	DVVSPL	DYETKKE	YTLRVR	3.5	441	GNARQG	FYLDAGT	GALDVV
RTN4	Q9NQC3	1192	2	440	SNDDT	SFSPSTE	GIKDRS	3	769	ESLPEE	SFESMIS	SEVSK	3	290	TEFSEL	EYSEMG	SFVSVP
HTR5B	Q9P2D3	2071	2	1985	YLLDEN	SFASASS	ASKDLH	3.5	1504	LPPDGG	AFYTPET	IDTARL	4	1403	KGSSSQ	LYRESAT	TMEKLA
KDIS	Q9UHL0	1771	2	1117	SQPHS	SYSGMT	GFQHPF	3	1453	KRGDVI	DYSSSGV	STNDAS	4	1323	PYTLNF	SFEELNT	LGLDEG
FND3A	Q9Y2H6	1198	2	550	NPSEVV	EFTTCDP	KPGIPV	3.5	442	RLSARN	DYSSSGF	SEEVLY	5	892	ILNYSI	DFGDKQS	LTVGKV
C43BP	Q9Y5P4	624	2	200	VEDDED	DFPTTR	DGDFLH	4	0		SWNSSGS	EEDPET	0.5	315	SLINEE	EYFDALD	RQ
FA83G	A6ND36	823	2.5	713	GFPGFP	RYRSAAD	SVQSS	3	580	EEDDDD	DVVLSD	QDSHSG	2	612	ASSVSE	EYFEVRE	HSPVLR
EYA2	Q00167	538	2.5	112	QGSGFL	SYGSSFS	TSPTGQ	3	116	FLSYGS	SFSTSP	QSSPYT	3	315	LADTHL	FFNDLE	CDQIHV
JTB	Q76095	146	2.5	86	SSSKRN	EFKSCRS	ALMEQR	6	31	EAPYQE	EKLSAST	SNLPCW	5.5	72	PECGPT	FYVKEIT	CSSSKR
CCNB2	Q95067	398	2.5	324	KWNLKQ	QYYTGYT	ENEVLE	7	218	LASKYE	EMFSPNI	EDFVYI	5	148	LQSNP	HFLDGRD	INGRMR
NUCL	P19338	710	2.5	347	RKFGYV	DFESAED	LEKALE	4.5	523	KGYAFI	EFAFED	AKEALN	2.5	526	AFLEFA	SFEDAKE	ALNSCN
FPR2	P25090	351	2.5	10	NEYEEV	SYESAGY	TVLRIL	4	-2		NFTPLN	EYEEVS	4.5	5	FSTPLN	EYEEVS	ESAGYT
MCM7	P33993	719	2.5	593	WASKDA	TYTART	LLAILR	5	396	RLAPRS	QYTTGRG	SSGVGL	4.5	42	HREQVA	LYVDLDD	VAEDDP
PEX19	P40855	299	2.5	118	DMSYQQ	EFSTCLK	ETLSGL	5.5	182	LLSKDV	LYPSLKE	ITEKYP	4	224	VMCKIC	EQFEAT	PDSET
SCOT1	P55809	520	2.5	372	TILPGA	SFFSSDE	SFAMIR	4.5	119	NAEFER	QYLSGEL	EVELTP	4.5	36	AHRHTK	FYTDPE	AVKDI
CEBP2	Q03701	1054	2.5	969	NLNDSS	LFVSAE	FGLHLL	3	850	FEDDDN	FYSGKD	DMDPAG	2	628	ESDDEE	NFIDAND	DEDMEK
ZO1	Q07157	1748	2.5	815	LHDDR	SYLSAPG	SEYSMY	3	924	BASSPV	PYLSPET	NFASST	2.5	836	DSRHTS	DYEDDT	EGGAYT
PSMD2	Q13200	908	2.5	275	MELVED	IFTSCKD	VVVQKQ	5.5	580	LEVVEV	PFRSFDN	TLVDVC	3	307	LSEDEV	EYEDLTE	IMSNVQ
PKP1	Q13835	747	2.5	179	TQNRN	SFYSTCS	GQKAIK	4.5	246	TIPKAV	QYLSQD	EKYQAI	4.5	153	SRSEPD	LYCDPRG	TLRKG
STAR3	Q14849	445	2.5	200	GALSEG	QYFSPPE	SFAGSD	5.5	84	QBIQY	NFKTSFF	DIFVLA	4	260	KFEKNN	EYGDIVY	TIEVFP
S2535	Q3KQZ1	300	2.5	180	SSTQLC	TFSSTKD	LLSQWE	7.5	186	FFSSTK	DLLSQWE	IFPPQS	6	280	HTLTL	FFWDQLR	SLYTYD
DOP1	Q5JWR5	2465	2.5	312	PEEHAT	YFYTTF	KELLVQ	3	1327	DGLDLE	NWYSCGE	GDISEI	3.5	747	FLAACQ	LFLECCS	FPVYIA
ZN318	Q5VUA4	2279	2.5	393	PSMQLE	SFSSSTS	SSQDHP	4	1369	KPAPLN	TFLSIKS	SGTTAK	4.5	521	QEKRRR	SFPDIED	EKFLY
VP13C	Q709C8	3753	2.5	1200	LLNFLN	NFQTAKE	SLSAAT	2.5	1715	LLNFLN	NFQTAKE	ALSTAT	0	871	ESSEDD	EYFDAED	GEPOTC
MICA3	Q7RTP6	2002	2.5	1536	DSSLQE	KFFTPTS	CWPRPE	3.5	1438	KTLGSL	SFNSTSS	AMLTTP	3	1506	REEVKR	SFVESVE	EIPFAD
TECT2	Q96GX1	697	2.5	418	FVVKFL	SYNSGNE	EELSNG	4	97	RWKRGL	DWCSSD	TDSFSE	3.5	346	IVTPKV	EYEAAT	LDKPEI
OSBL9	Q96SU4	736	2.5	28	YNAGLL	SYTSDK	KMMRGS	2.5	281	NIVPEF	SYSSSED	EFYDAD	0	288	YSSSED	EYFDAE	FHQSGS
SNX25	Q9H3E2	840	2.5	646	LRLPLR	DFFSHQE	EETEED	5	613	QSEALY	AFLSPSP	DYLKVI	3.5	309	DKRALI	SFVESVE	HLKNAN
OSBL3	Q9H4L5	887	2.5	155	FPEHVN	HFFSGST	ITDSSS	4	169	TDSSSG	VFDSSS	RKRSSI	0	444	ITDLSL	EFFDQE	VLLSPS
RAI14	Q9P0K7	980	2.5	380	ADLSFD	SYHSTQT	DLGPSL	3	377	EAEADL	SFDSYHS	TQTDLG	3.5	645	VSELSQ	LYKEAQA	ELEDYR
STML2	Q9UJZ1	356	2.5	275	SLTVAE	QYVSASF	KLAKDS	6.5	326	FPDPSL	SSGSSRD	VQGTDA	6	140	KLSDVK	FVERES	LNASIV
VDAC3	Q9Y277	283	2.5	150	LAGYQM	SFDTAKS	KLSQNN	6.5	202	ITTSIN	LAWTAGS	NNTRFG	6.5	150	LAGYQM	SFDTAKS	KLSQNN
PITM1	Q00562	1244	3	373	SNDFID	AFASPVE	AEGTPE	4	343	ENSSEE	EFFDAHE	GFSDS	0	343	ENSSEE	EFFDAHE	GFSDS
OSBL6	Q9BZF3	934	3	347	NLCADI	EFQTPPS	HLTDPL	3.5	192	RDAFSH	IFPSTST	AESSPA	0	488	MSSEVS	EFFDQE	VLLSAS
CCD40	Q4G0X9	1142	3	109	AADTTY	PYFSPFP	ELPGE	5	79	GEEAV	SYGDAES	EESYYY	1	79	GEEAV	SYGDAES	EESYYY
YIPF5	Q969M3	257	3	5	ENLNTD	FYQTSYS	IDDQSQ	6	4	FENLNT	DFYQTSY	SIDDQS	6	4	FENLNT	DFYQTSY	SIDDQS
ERBB2	P04626	1255	3	404	EETIGY	LYISAWP	DSLDPD	4	998	SPLDST	FYRSLE	DDMGD	5	1010	EDDDMG	DLVDAE	YLVPPQ
SCN3B	Q9NY72	215	3	146	TEEAGE	DFTSVVS	EIMMYI	6	16	IYVWSV	CFPVCE	VPSETE	6	16	IYVWSV	CFPVCE	VPSETE
OSBP2	Q969R2																

Table S2

EGFR	P00533	1210	3	1016	YLIPQQ	GFFSSPS	TSRTPL	4	165	RDIVSS	DFLSNMS	MDFQNH	3,5	338	NGIGIG	EFKDLSL	INATNI
ZMYM1	Q5SVZ6	1142	3	114	SIPCIT	EYISSAS	SPVPSK	3,5	480	CQLFCQ	KYFSCGR	ESFATH	4	524	EFWREY	QFCDGAV	SDDLSI
HELLS	Q9NRZ9	838	3	404	VFDDLK	SFESWFD	ITSLSE	4,5	485	NRTIAN	MFGSSEK	ETIELS	4	407	DLKSFE	SWFDITS	LSEETAE
ERLN2	Q94905	339	3	52	MLPFIT	SYKSVQT	TLQTDE	5	48	GFHMLL	PFITSYK	SVQTTL	4,5	78	TSGGVM	IYFDRIE	VVNFV
NANP	Q8TBE9	248	3	57	SKECFH	PYNTCIT	DLRTSH	7,5	11	FDLNNT	LIDTAGA	SRRGML	4,5	3	LSRVRA	VFFDLDN	TLIDTA
PARD3	Q8TEW0	1356	3	1243	NYSPGE	GFQSAKE	NPRYSS	3,5	370	SQSEKN	NYSSRF	SPDSQY	4,5	1073	RQARER	DYAEIQD	FHRTFG
ERLN1	O75477	346	3	52	MLPFIT	TFRSVQT	TLQTDE	3,5	120	IHHELN	QFCSAHT	LQEVYI	5	130	AHTLQE	VYIELEFD	QIDENL
CCG1	Q06432	222	3	90	ESSEIF	EFTTQKE	YSISAA	5	205	PRMPRN	PWESCMD	-	5,5	169	EDTVVI	EYYYSWS	FACACA
VCAM1	P19320	739	3	49	TGCEES	PFPSWRT	QIDSDL	5	213	AVKELQ	VVISPKN	TVISVN	6	445	TILENI	EFLEDD	MKSLEN
TT39B	Q5VTQ0	682	3	98	MATSSL	HFASCDT	QQAPRQ	4,5	209	KYTVVE	SFSSLLS	RGSLAQ	2	76	LEADED	VFEDALE	TISISS
IL18R	Q13478	541	3	50	ETTTKS	WYKSSGS	QEHVEL	5,5	138	ITCENS	YYQTLVN	STSLYK	6,5	113	RRNKHS	CFTERQV	TSKIVE
RPN2	P04844	631	3	465	TSERKI	EFDSASG	TYTLYL	5	239	AIFSKK	NFESLSE	AFSVAS	4	194	LGGVYL	QFEEGLE	TTALFV
CFTR	P13569	1480	3	422	SNGDDS	LFNSNFS	LLGTFV	3,5	1109	IFFIAV	TFISILT	TGEGEG	4,5	398	TAFWEE	GFGELE	KAKQNN
FBW1B	Q9URK1	542	3	112	KPMLQR	DFITALP	EQGLDH	6,5	131	IAENIL	SYLDARS	LCAABL	2,5	131	IAENIL	SYLDARS	LCAABL
LRRK1	Q38SD2	2015	3	1831	HQESLT	DYCSMSS	YSSSPP	4,5	396	PALFLH	SFKSLNS	LNVSRL	3,5	1180	EKSEDV	QYFDMED	CVLTAI
E2AK3	Q9NZJ5	1116	3	354	SLFDDT	SYTSNDD	VLEDEE	4,5	937	DLKPSN	IFFTMD	VVKVGD	4	349	KVIPIQ	LFDDTSY	TSNDDV
SIN3A	Q96ST3	1273	3	581	LNDTWV	SFPSWSE	DSTFVS	3,5	590	SWSEDS	TFVSSKK	TQYEEH	4,5	750	LNEIES	IYDERQE	QATEEN
ITA4	P13612	1032	3	527	AESPPR	FYFSSNG	TSDVIT	4,5	528	ESPPRF	YFSSNGT	SDVITG	5,5	476	PEVNR	TKFDCVE	NGWPSV
SERA	O43175	533	3	488	AGVRLI	SYQTSLV	SDGETW	4	195	EIWPLC	DFITVHT	PLLPST	6,5	281	CPHLGA	STKEAQS	RCGEEI
IF6	P56537	245	3	27	AIGGSE	NFYSVFE	GELSDT	7	207	GLDTS	TELSVVE	SVFKLN	6,5	30	GSENFY	SVFEGEL	SDTIPV
SNX2	O60749	519	3	21	LEDGED	LFSTVS	TLESSP	6	20	DLEDGE	DLFTSTV	STLESS	2	67	DDDRD	LFATE	EVSLDS
S26A2	P50443	739	3	249	SDALLS	GFVTGAS	FTILTS	4	702	KEEENL	LFYSVYE	AMAFAE	5	423	FCNIIP	SFFHCFT	TSAAAL
TPTE2	Q6XPS3	522	3	334	LLIASE	IFLTAE	SLYYFG	6,5	3	ESPTN	EFKGTE	EAPAKE	5	344	ABESLY	YFGERRT	NKTHSN
HNRPF	P52597	415	3	123	TRKEIV	QFFSGLE	IVPNGI	4	177	GHRVIE	VFKSQE	EVRSYS	4,5	269	SGMYDH	RYGSEF	TVQSTT
SYK	Q15046	597	3	526	AMFIDE	NFCTALE	YGLPPT	5,5	333	PEFTTC	EYFMYA	DYHDLM	4,5	256	SFLDEL	GFLEIET	PMMNII

DISCUSSION

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. STARD3, une cible thérapeutique pour le traitement des cancers HER2+

Mon travail de doctorat a permis de montrer que la protéine STARD3 est essentielle à la croissance des cellules cancéreuses amplifiées pour HER2 provenant de différents organes comme le sein, l'estomac, le poumon et l'ovaire. La croissance cellulaire est la résultante de la prolifération et de la survie. Les analyses menées au laboratoire ont montré un rôle de STARD3 sur la mort cellulaire et non sur la prolifération. De plus, l'étude de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses non amplifiées pour HER2 a confirmé que STARD3 agit spécifiquement sur la croissance des cellules cancéreuses HER2+. Cette étude montre que les cancers HER2+ ne dépendent pas uniquement de l'oncogène *HER2* pour leur croissance mais également de *STARD3*. *STARD3* n'est pas directement oncogénique, mais il est devenu nécessaire au maintien et à la progression tumorale. Ceci est conforme au concept d'addiction à des « non oncogènes » dans les cellules cancéreuses (Luo et al., 2009).

Cependant, ces résultats nécessitent d'être confirmés *in vivo*. J'ai réalisé une première expérience de xénogreffes de tumeurs chez des souris immunodéficientes. L'injection sous-cutanée de cellules HER2+ n'exprimant plus STARD3 (cellules HCC1954 siSTARD3) a induit une diminution de la taille des tumeurs de 25 % par rapport aux souris contrôles. Ce résultat est surprenant puisqu'au vu des résultats *in vitro*, nous pensions observer une nette inhibition de la croissance des tumeurs HER2+ après la perte d'expression de STARD3. Une explication possible est le fait que les cellules aient été injectées en présence de matrigel afin de favoriser le développement des tumeurs. Le matrigel contient de nombreux facteurs de croissance qui ont pu influencer la prolifération des cellules tumorales en activant les récepteurs tyrosine kinase indépendamment de STARD3. Ainsi, cette expérience nécessite d'être répétée en utilisant une cohorte d'animaux plus importante et en injectant des cellules HER2+ (cellules HCC1954) ou HER2- (cellules triples négatives MDA-MB-231) wild-type, siCntrl ou siSTARD3 en absence de matrigel afin de confirmer *in vivo* la dépendance des tumeurs HER2+ pour STARD3.

De plus, mon travail a également permis de montrer que les cellules HER2+ du sein, les cellules HCC1954, dépendent du transport de cholestérol médié par STARD3 pour leur croissance. En réalisant une expérience de sauvetage, nous avons montré que les différents mutants de STARD3 qui ne peuvent pas transporter le cholestérol sont incapables de restaurer la croissance des cellules HER2+. Néanmoins, ce résultat a été obtenu grâce à un test de

-Discussion-

croissance au MTT et nécessite d'être confirmé par une deuxième technique comme par exemple un test de clonogénicité. Aussi, ces expériences de sauvetage pourraient être réalisées dans plusieurs lignées cellulaires HER2+ afin de confirmer leur dépendance pour les mouvements intracellulaires de cholestérol médiés par STARD3.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que STARD3 pourrait être une cible thérapeutique pour le traitement des cancers HER2+ qui sont de mauvais pronostic. En effet, bien que les thérapies ciblées anti-HER2 aient montré un réel bénéfice clinique, les résistances aux traitements sont fréquentes (Garrett and Arteaga, 2011). Ainsi, un traitement inhibant le transport de cholestérol médié par STARD3 pourrait être envisagé en association avec une thérapie ciblée anti-HER2 afin d'améliorer la prise en charge des patientes HER2+. C'est pourquoi le laboratoire a initié un travail collaboratif dont le but est de générer et de tester des composés chimiques capables de bloquer l'activité de transport de STARD3. Pour cela, un large panel de dérivés des stérols ainsi que des molécules de structure différente seront criblées afin d'identifier de bons candidats en tant qu'inhibiteurs potentiels de la liaison et du transport de cholestérol au niveau du domaine START de STARD3. Ces inhibiteurs seront ensuite validés *in vitro* par des tests de transport de cholestérol à l'aide de liposomes et par des tests de croissance cellulaire sur des lignées cancéreuses HER2+ et HER2-. Ces composés pourraient à terme être utilisés comme thérapie anticancéreuse ciblée.

En 2019, une étude visant à identifier un inhibiteur de STARD3 a été effectuée par une équipe italienne (Lapillo et al., 2019). Afin d'identifier un composé inhibant le transport de cholestérol médié par STARD3, ils ont réalisé un criblage virtuel basé sur le mécanisme d'interaction entre la molécule de cholestérol et le domaine START de STARD3. Ce criblage leur a permis d'identifier le composé VS1 (virtual screening 1) comme un inhibiteur de l'activité de STARD3. Ils ont ensuite testé l'effet de VS1 sur la capacité clonogénique de deux lignées cellulaires de cancer du sein, les cellules MCF7 et les cellules MDA-MB-231, et ont montré que VS1 possède une activité antiproliférative. Cependant, l'étude est critiquable à plusieurs niveaux. Premièrement, l'effet du composé VS1 n'a pas été testé sur des cellules HER2+ mais sur des cellules de cancer du sein surexprimant le récepteur aux œstrogènes (MCF7) ou sur des cellules de cancer du sein triple négatif (MDA-MB-231). Il serait nécessaire de voir si ce composé est plus efficace sur les cellules HER2+. Deuxièmement, l'effet de VS1 n'a pas été testé en l'absence d'expression de STARD3. La spécificité de ce composé pour STARD3 n'est pas étayée. En effet, la spécificité de l'inhibiteur a uniquement été évaluée en mesurant la dégradation de STARD3 et l'activation de FAK (Focal adhesion kinase). De plus,

mes travaux de thèse ont montré que la perte d'expression de STARD3 n'a pas d'impact sur la croissance des cellules MCF7 et MDA-MB-231. Ainsi, il est possible que l'inhibiteur testé ne soit pas spécifique du transport de cholestérol médié par STARD3 et qu'il présente une toxicité « off target ».

Enfin, un inhibiteur de STARD3 pourrait également être envisagé pour traiter les tumeurs résistantes aux thérapies anti-HER2. En effet, Sahlberg et al. ont montré que l'inhibition de STARD3 potentialise l'apoptose induite par le trastuzumab dans une lignée cellulaire résistante à la drogue (Sahlberg et al., 2013b). De plus, la lignée cellulaire HER2+ du sein principalement utilisée au cours de ma thèse, la lignée HCC1954, est une lignée qui ne répond pas au trastuzumab (Jernström et al., 2017). Ainsi, les résultats obtenus au cours de mon travail de doctorante suggèrent que STARD3 peut être une cible thérapeutique pour traiter les cancers HER2+ résistants ou non aux thérapies ciblées anti-HER2.

II. STARD3, un marqueur diagnostique des cancers HER2+ et prédictif de la réponse aux thérapies ciblées anti-HER2

Une étude visant à comprendre l'intérêt clinique de la surexpression de STARD3 dans les cancers HER2+ est actuellement en cours en collaboration avec le CHU de Strasbourg (Lodi et al., en préparation). Dans cette étude rétrospective, une cohorte de 62 patientes diagnostiquées positives pour un cancer du sein HER2+ entre 2011 et 2017 a été utilisée. Elles présentaient toutes un score HER2 3+ par immunohistochimie et ont été traitées par chimiothérapie néoadjuvante avec trastuzumab puis par chirurgie. Au laboratoire, nous avons développé un anticorps spécifique de STARD3 qui permet de détecter la protéine par immunohistochimie. Grâce à cet anticorps, un immunoscore de STARD3 a été évalué sur la biopsie initiale faite lors du diagnostic pour chaque patiente. Il s'agit de la première étude clinique visant à étudier l'expression et la localisation de la protéine STARD3 dans une cohorte de cancers du sein HER2+. D'après les premiers résultats, toutes les patientes ayant un score négatif de STARD3 par IHC ont présenté une réponse partielle ou absente au traitement. En effet, nous avons trouvé une association statistique entre un score négatif de STARD3 et une réponse partielle ou absente ($p = 0,028$). Ces résultats suggèrent que la surexpression de STARD3 pourrait être utilisée en clinique comme marqueur prédictif de réponse aux thérapies anti-HER2. Aux vues de ces premières conclusions, il est important de poursuivre l'étude en augmentant la cohorte de patientes afin de confirmer l'intérêt potentiel de la protéine STARD3

-Discussion-

comme marqueur prédictif de la réponse au traitement. Le fait de disposer d'un marqueur immunohistochimique pour prédire la réponse thérapeutique pourrait avoir des conséquences pour la pratique clinique. En effet, la connaissance d'une faible probabilité de réponse à la thérapie néoadjuvante pourrait être prise en compte pour décider d'une stratégie thérapeutique optimale pour chaque patiente. De plus, un test pronostique compagnon serait essentiel pour le développement futur d'un traitement anti-STARD3.

La corrélation entre l'absence de STARD3 sur un petit nombre de tumeurs qualifiées HER2+ (STARD3-/HER2+) et l'absence de réponse thérapeutique soulève plusieurs interrogations. Il est possible que les tumeurs présentant un score négatif de STARD3 ne soient pas amplifiées au niveau du locus 17q12. Une autre possibilité est liée à l'hétérogénéité de l'amplicon HER2. En 2008, Arriola et al ont cartographié les limites de l'amplicon HER2 dans 145 cancers du sein (Arriola et al., 2008). Dans cette série, 15 cas présentaient une amplification en 17q12-q21 et la région minimale amplifiée couvrait ~750 kb et incluait 20 gènes dont *HER2*, *PERLD1*, *PNMT*, *PPP1R1B*, *GSDML*, *PSMD3*, *STARD3*, *THRAP4*, *TCAP*, *GRB7*, *THRA* et *PPARBP*. Tous ces gènes exceptés *PPP1R1B* et *PPARBP* étaient surexprimés. L'étude parallèle de 46 lignées cellulaires a défini que 9 d'entre-elles étaient amplifiées au niveau du locus 17q12 et que seuls 5 gènes (*GRB7*, *PERLD1*, *STARD3*, *PNMT* et *ERBB2*) étaient amplifiés et surexprimés. En 2010, Staaf et al. ont réalisé une étude cartographiant les limites de l'amplicon sur 200 tumeurs HER2+ et ont corrélié les données transcriptomiques globales pour 87 d'entre-elles (Staaf et al., 2010). Dans cette étude, les auteurs ont réduit la région commune d'amplification à ~85 kb incluant *TCAP*, *PNMT*, *PERLD1*, *HER2*, *C17orf37* et *GRB7* mais excluant *STARD3* car pour 3 tumeurs sur 200, la limite de l'amplicon se trouvait dans le gène *STARD3*. Il est possible que dans notre cohorte, les cas négatifs pour STARD3 correspondent à des tumeurs dont l'amplicon exclu STARD3, ou ne comprend qu'une partie du gène *STARD3*, ce qui ne permet pas l'expression de la protéine. C'est pourquoi nous prévoyons d'étudier l'amplification des gènes *HER2* et *STARD3* par hybridation *in situ* sur les cas négatifs. En effet, les patientes présentant une surexpression de HER2 due à une dérégulation transcriptionnelle et non à l'amplification du gène ne répondent pas au trastuzumab (Adamczyk et al., 2018; Stocker et al., 2016; Xuan et al., 2015). La raison n'est pas connue mais il est possible que dans ces tumeurs, *HER2* ne soit pas le seul gène « driver » de la maladie. Il est estimé que 20% des patientes diagnostiquées HER2+ ne présentent finalement pas d'amplification du gène *HER2* (Hoang et al., 2000; Nassar et al., 2014). Par conséquent, l'analyse de la surexpression de HER2 conjointement à celle de STARD3 par immunohistochimie pourrait être utilisée en clinique

-Discussion-

pour diagnostiquer les patientes HER2+ et pour confirmer l'indication d'un traitement par thérapie ciblée anti-HER2. En effet, les patientes HER2+ et susceptibles de répondre au trastuzumab présentent une co-amplification de *STARD3* et *HER2*. Cependant, les techniques de FISH permettant de diagnostiquer des amplifications de gènes ne sont réalisées qu'en cas d'immunoscore HER2 intermédiaire du fait du coût élevé de cette méthode. Tout comme Vinatzer l'avait suggéré, *STARD3* ne semble pas être un marqueur indépendant d'HER2 mais pourrait être utilisé comme marqueur additionnel en cas de doute de l'amplification d'*HER2*. En pratique, il est plus simple et moins coûteux de réaliser une immunohistochimie supplémentaire plutôt qu'une FISH. Ainsi, en clinique, on pourrait imaginer une analyse systématique de *STARD3* et *HER2* par immunohistochimie. Si les deux protéines sont surexprimées, cela confirme leur co-amplification et permet donc de diagnostiquer un cancer HER2+ pour lequel le trastuzumab est indiqué. Le laboratoire travaille actuellement sur une cohorte rétrospective plus importante afin de confirmer l'intérêt clinique de *STARD3* lors du diagnostic des cancers HER2+.

III. Les statines pour traiter le cancer HER2+ ?

Les statines sont des médicaments indiqués pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Elles inhibent la néosynthèse du cholestérol en bloquant l'enzyme HMGCoA-réductase et leur effet sur les cellules cancéreuses est très controversé. Dans une étude précédente, le laboratoire a montré que *STARD3* transporte le cholestérol du réticulum endoplasmique vers les endosomes tardifs (Wilhelm et al., 2017). Ainsi, on pourrait émettre l'hypothèse qu'un blocage de la biosynthèse du cholestérol au niveau du RE par les statines pourrait être efficace pour le traitement des cancers HER2+. Au cours de ma thèse, j'ai testé l'effet des statines sur la croissance cellulaire de différentes lignées cancéreuses, les cellules HCC1954 et NCI-N87 qui sont des lignées HER2+ et les cellules HeLa HER2-. Le traitement par statines inhibe la croissance des cellules HCC1954 et des cellules HeLa mais pas celle des cellules NCI-N87. Ce résultat suggère que les voies d'apport du cholestérol utilisées pour soutenir la croissance des cellules tumorales HER2+ HCC1954 et NCI-N87 sont différentes. De plus, ce résultat rejoint une étude antérieure menée sur les cellules HeLa et CHO qui avait montré que l'apport de la source endogène ou exogène du cholestérol varie selon le type cellulaire (Ishitsuka et al., 2011).

-Discussion-

Aussi, Wilhelm et al. ont montré que la surexpression de STARD3 dans des cellules HeLa n'induit pas de changement dans l'activation du facteur de transcription SREBP-2. Dans les cellules HeLa, la redistribution du cholestérol médié par STARD3 ne perturbe donc pas l'homéostasie du cholestérol. Selon notre modèle, lors de la transformation oncogénique, les cellules HER2+ amplifiées au niveau du locus 17q12 se sont adaptées aux changements de la répartition du cholestérol cellulaire médiés par STARD3. Ainsi, il est préférable d'envisager un traitement ciblant le transport de cholestérol médié par STARD3 plutôt que cibler la synthèse ou la capture du cholestérol. En conclusion, le traitement des cancers HER2+ par les statines ne semble pas être une bonne stratégie, car il n'y a pas de réponse commune des cellules cancéreuses HER2+ aux statines. Un traitement ciblant le transport de cholestérol médié par STARD3 serait plus spécifique des cancers HER2+ compte tenu de leur dépendance vis-à-vis de ce transporteur.

IV. Le cholestérol de la membrane plasmique influence l'activation des RTK

Mon travail de doctorat a permis de montrer que la surexpression de STARD3 dans les cellules HER2+ induit une accumulation de cholestérol dans les endosomes tardifs et une réduction au niveau de la membrane plasmique (**Figure D1**). J'ai pu lier cette diminution de cholestérol dans la membrane plasmique à l'activation de la signalisation issue du récepteur HER2. En effet, la perte d'expression de STARD3 dans les cellules HER2+ HCC1954 diminue l'homodimérisation et l'hétérodimérisation d'HER2 (**Figure D1**). Ce résultat a été obtenu par PLA (Proximity Ligation Assay), une technique permettant de révéler par des points fluorescents la proximité entre deux protéines (< 40 nm). Cependant, je souhaiterais utiliser une seconde technique pour confirmer l'effet de STARD3 sur la dimérisation des récepteurs tyrosine kinase. Au laboratoire, nous avons mis au point une technique permettant de détecter les homodimères HER2 par western blot après cross-linking des protéines extraites. Cette étape de cross-linking au glutaraldéhyde permet de conserver les liaisons protéiques. Cela nous permettra d'étudier la dimérisation d'HER2 en fonction de l'expression de STARD3 dans des lignées HER2+.

De plus, une publication a montré que le cholestérol de la membrane plasmique régule la mobilité des récepteurs de la famille de l'EGFR (Orr et al., 2005). En utilisant des techniques d'imagerie par fluorescence d'une seule molécule (single molecule fluorescence imaging), ils ont étudié la mobilité latérale de HER2 et EGFR en fonction de la teneur en cholestérol de la

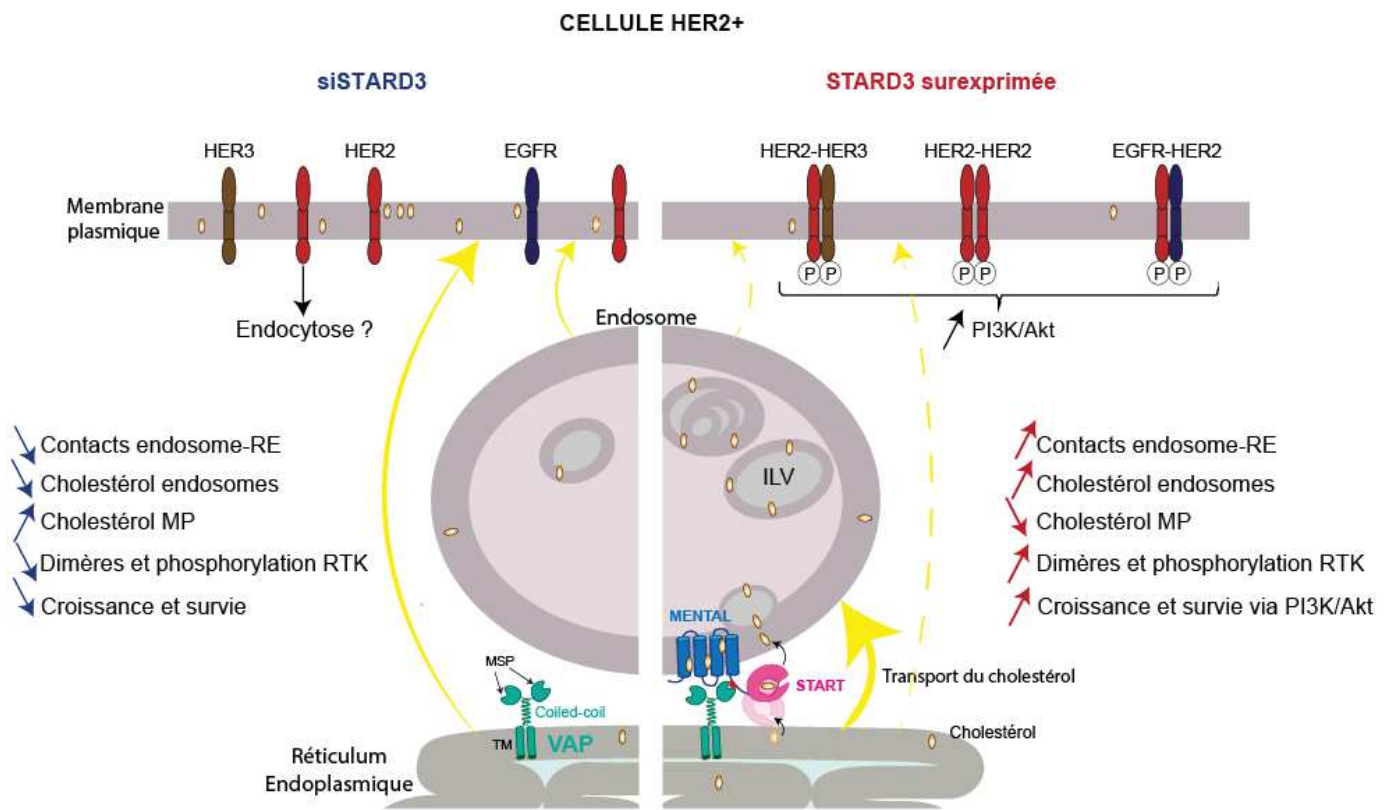


Figure D1 : Mécanisme moléculaire de l'addiction des tumeurs HER2+ pour STARD3

HER2 et STARD3 sont co-amplifiés et co-surexprimés dans les cellules cancéreuses HER2+. STARD3 forme un site de contact membranaire entre le RE et les endosomes en interagissant avec les protéines VAPs. Au niveau de ces contacts, STARD3 transporte le cholestérol du RE vers les endosomes tardifs (D'après Wilhelm et al., 2017). Ce transfert induit une accumulation de cholestérol dans les endosomes tardifs aux dépens de la membrane plasmique. La diminution du cholestérol à la membrane plasmique favorise la dimérisation des récepteurs de la famille de l'EGFR entraînant leur phosphorylation et l'activation de la voie de survie PI3K/Akt.

-Discussion-

membrane plasmique. Ils ont montré qu'une déplétion du cholestérol à la membrane plasmique induit un confinement des récepteurs ce qui pourrait favoriser leur dimérisation. C'est pourquoi au laboratoire, nous prévoyons d'étudier la mobilité du récepteur HER2 en fonction de l'expression de STARD3 dans des cellules HER2⁺ en utilisant la technique de FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching).

Aussi, la perte d'expression de STARD3 dans les cellules HER2⁺ du sein HCC1954 et de l'estomac NCI-N87 concomitamment à l'augmentation du cholestérol membranaire induit une diminution de l'activation d'HER2, de ses deux partenaires de dimérisation EGFR et HER3 et d'Akt (**Figure D1**). Ce résultat confirme le rôle de STARD3 dans la survie et la croissance des cellules HER2⁺ à travers la voie PI3K/Akt. De plus, en utilisant un traitement à la M β CD, qui réduit drastiquement le cholestérol membranaire, nous avons observé une augmentation de la phosphorylation des récepteurs HER2, EGFR et HER3. Cela confirme le fait que l'activation des récepteurs de la famille de l'EGFR dépend du contenu en cholestérol de la membrane plasmique.

L'ensemble de ces résultats est en accord avec plusieurs études publiées dans la littérature. En effet, différents groupes ont établi un lien entre le cholestérol membranaire et l'activation du récepteur EGFR. De manière intéressante, il a été montré qu'un traitement par M β CD diminue le cholestérol de la membrane plasmique en détruisant les radeaux lipidiques, diminuant la mobilité du récepteur EGFR, augmentant la dimérisation et la phosphorylation d'EGFR et activant la voie de signalisation des MAPK (Chen and Resh, 2002; Lambert et al., 2006; Pike and Casey, 2002). Ces résultats suggèrent que les récepteurs EGFR et HER2 sont inactifs lorsqu'ils sont localisés dans les radeaux lipidiques et qu'ils s'activent une fois en dehors de ces radeaux. De plus, le traitement à la M β CD ne mime pas complètement l'action de STARD3. Par exemple, la signalisation par les MAPK n'est pas contrôlée par STARD3 et à l'inverse la voie PI3K n'est pas modulée par la M β CD. Ainsi, du fait de son effet sur la phosphorylation des récepteurs et de sa toxicité importante sur toutes les cellules, la M β CD ne peut pas être envisagée comme thérapie anticancéreuse.

En conclusion, la composition lipidique des membranes est fortement dépendante du type de cancer. Les cellules HER2⁺ dépendent de la redistribution du cholestérol intracellulaire médiée par STARD3, notamment au niveau de la membrane plasmique, afin de maintenir certaines voies de signalisation en aval du récepteur HER2, comme la voie de survie PI3K/AKT.

V. STARD3 et endocytose du récepteur HER2

Dans une revue parue récemment, les auteurs ont émis l'hypothèse que le rôle de STARD3 dans la croissance des cellules HER2+ serait lié au trafic intracellulaire du récepteur HER2 (Peretti et al., 2019). Les sites de contact membranaire RE-endosomes tardifs et l'accumulation de cholestérol dans les endosomes pourraient bloquer la maturation des endosomes en lysosomes. Dans ces conditions, la dégradation lysosomale des récepteurs tyrosine kinase, notamment HER2, serait entravée. Les récepteurs seraient ramenés à la membrane plasmique afin de maintenir la transduction du signal, ce qui entraînerait une croissance cellulaire incontrôlée.

Le trafic intracellulaire et la dégradation d'HER2 sont des domaines très controversés dans la littérature. Cependant, nous ne pouvons pas écarter le fait que la redistribution du cholestérol médiée par STARD3 puisse impacter l'endocytose du récepteur HER2. De manière intéressante, il a été montré que la déplétion du cholestérol de la membrane plasmique par la M β CD inhibe l'internalisation du récepteur EGFR ce qui permet de maintenir sa signalisation (Pike and Casey, 2002). Au cours de ma thèse, je n'ai pas étudié l'endocytose du récepteur HER2. Néanmoins, j'ai réalisé une expérience de cytométrie en flux afin de quantifier le récepteur à la surface de la membrane plasmique mais également la quantité totale de récepteurs dans la cellule en fonction de l'expression de STARD3. Le résultat a montré que la perte d'expression de STARD3 dans les cellules HER2+ HCC1954 induit une diminution des récepteurs HER2 à la surface cellulaire. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et nécessite d'être confirmée mais cela suggère un effet de STARD3 sur l'endocytose d'HER2. Une hypothèse possible est le fait que la perte d'expression de STARD3 induit une augmentation des cavéoles en augmentant le cholestérol membranaire ce qui provoquerait l'endocytose d'HER2 par un mécanisme dépendant des cavéoles. De plus, j'ai montré par cytométrie en flux que la perte d'expression de STARD3 dans les cellules HCC1954 augmente la liaison de la sonde fluorescente PlyA2, une sonde spécifique des domaines riches en cholestérol et sphingomyéline ce qui suggère que STARD3 impacte les radeaux lipidiques. Un western blot permettant d'étudier la protéine cav-1, un marqueur des cavéoles, en fonction de l'expression de STARD3 dans des cellules HER2+ pourrait aider à répondre à cette hypothèse. Ainsi, dans les cellules HER2+, la diminution du cholestérol de la membrane plasmique médiée par STARD3 permettrait de séquestrer le récepteur HER2 à la surface cellulaire et de maintenir

la signalisation. En conclusion, le trafic intracellulaire d'HER2 en fonction de l'expression de STARD3 représente un vaste domaine à explorer dans le futur.

VI. MCS et transport du cholestérol médié par STARD3 dans les cancers HER2+

Une avancée majeure dans le domaine des LTPs a été la découverte des sites de contact membranaire (MCS). Bien que les MCS aient déjà été observés par microscopie électronique dans les années 1950 (Porter, 1953), leurs fonctions physiologiques ne sont apparues que ces dernières années. En effet, de nombreuses études sur les LTP et les MCS ont mis en évidence leur importance dans la régulation de la distribution et de la signalisation des lipides intracellulaires (Di Mattia et al., 2020; Levine, 2004b; Saheki and De Camilli, 2017). De plus, du fait de leur implication dans de nombreux processus biologiques, les MCS font l'objet d'études dans le développement des cancers (Peretti et al., 2019).

Le laboratoire a montré que STARD3 interagit via son motif FFAT avec des protéines résidentes du réticulum endoplasmique, les protéines VAPs et MOSPD2, induisant la formation de sites de contact membranaire entre les endosomes tardifs et le RE (Alpy et al., 2013; Mattia et al., 2018). Dans les cellules cancéreuses HER2+, j'ai confirmé la présence de contacts entre STARD3 et la protéine VAP-A par PLA. Cependant, dû à un manque d'anticorps spécifiques, je n'ai pas pu étudier les contacts entre STARD3 et VAP-B ou STARD3 et MOSPD2. Ainsi, dans les cellules HER2+, nous ne savons pas si STARD3 forme préférentiellement des contacts avec les protéines VAPs ou MOSPD2 ou si des interactions STARD3-VAPs et STARD3-MOSPD2 sont retrouvées au niveau des mêmes contacts. L'étude des MCS dans les cellules HER2+ nécessite d'être approfondie par microscopie électronique par exemple. De plus, au cours de ma thèse j'ai testé la dépendance des cellules HER2+ HCC1954 pour les protéines VAPs et MOSPD2. Les résultats ont montré que la perte d'expression de VAPs et/ou MOSPD2 induit une diminution de la capacité clonogénique des cellules. Cependant, ce résultat doit être réalisé dans des lignées HER2 négatives afin de savoir si les protéines VAPs et MOSPD2 jouent un rôle dans la croissance de toutes les cellules dû à leur implication dans de nombreux processus biologiques ou spécifiquement dans la croissance des cellules HER2+.

Aussi, un travail collaboratif auquel j'ai participé a permis de montrer que les sites de contact membranaire impliquant la protéine STARD3 sont régulés. En effet, la phosphorylation d'une sérine au sein du motif FFAT de STARD3 est essentielle pour l'interaction entre STARD3 et les protéines VAPs/MOSPD2 (**Figure D2**). Ainsi, la phosphorylation du motif

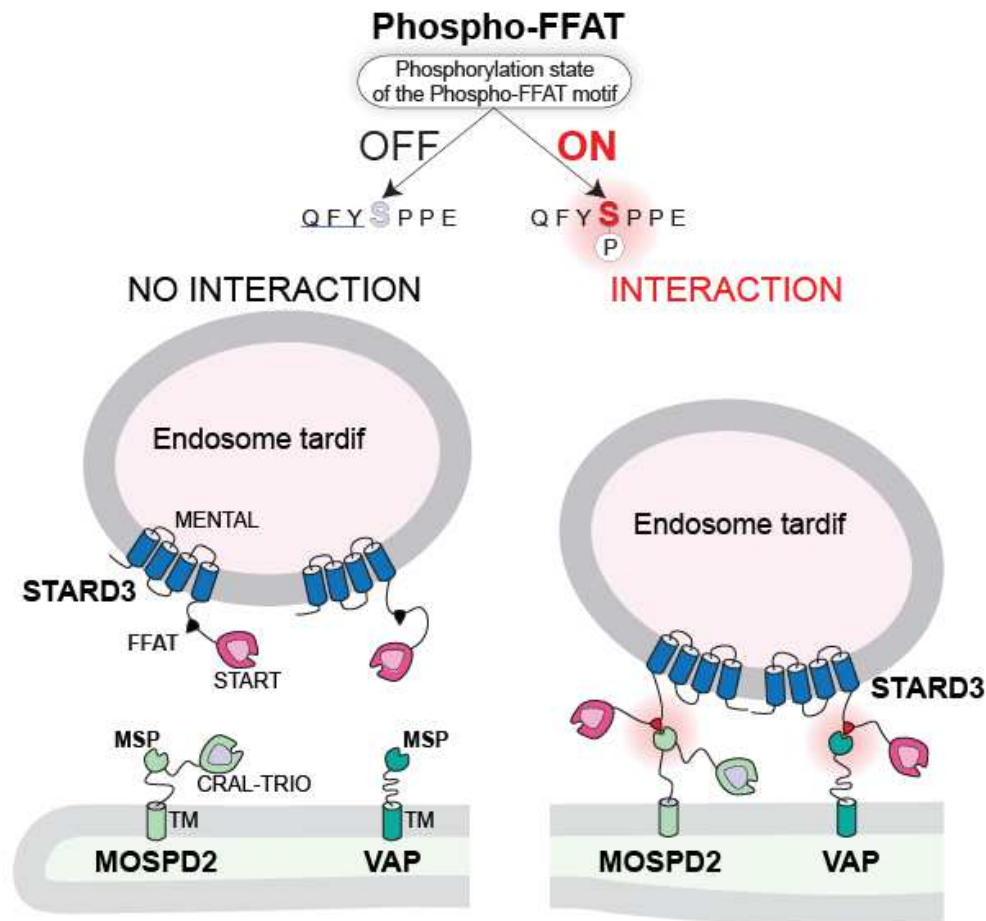


Figure D2 : Régulation de l'interaction STARD3-VAPs/MOSPD2 par phosphorylation du motif FFAT

La phosphorylation de la sérine S209 du motif FFAT de STARD3 induit l'interaction avec le domaine MSP des protéines VAPs et MOSPD2. Cette modification post-traductionnelle permet de réguler la formation des sites de contact membranaire RE-endosomes impliquant les protéines STARD3 et les protéines VAPs/MOSPD2 (D'après Di Mattia, Martinet et Ikhlef).

-Discussion-

FFAT de STARD3 constitue un système « ON-OFF » qui régule la formation des MCS et le transfert de cholestérol (Di Mattia, Martinet et Ikhlef, en révision dans EMBO Journal).

Mes travaux de thèse ont permis de confirmer la redistribution du cholestérol médiée par STARD3 dans les lignées HER2+ du sein HCC1954 et de l'estomac NCI-N87. Au niveau des contacts entre STARD3 et VAPs, STARD3 transporte le cholestérol du RE vers les endosomes ce qui entraîne une accumulation de cholestérol dans les endosomes tardifs et une diminution du cholestérol au niveau de la membrane plasmique (**Figure D1**) (Wilhelm et al., 2017). Néanmoins, le transfert de cholestérol au niveau des contacts entre STARD3 et MOSPD2 reste à être confirmé. Aussi, le transport du cholestérol du RE vers les endosomes semble être contre le gradient de concentration. En effet, le RE est un organite qui contient peu de cholestérol par rapport aux endosomes. Cependant, il a été montré que la majorité du cholestérol des endosomes se trouve dans les membranes internes appelées ILVs (Intraluminal Vesicles) et que la membrane limitante des endosomes est pauvre en cholestérol (Möbius et al., 2003). Ainsi, le cholestérol du RE pourrait être transporté dans la membrane limitante des endosomes tardifs par le domaine START de STARD3 selon le gradient de concentration. Le cholestérol pourrait ensuite être concentré au niveau du domaine MENTAL de STARD3 puis être transféré dans les ILVs par un mécanisme encore inconnu impliquant peut-être le système ESCRT (Boura et al., 2012).

Mais comment ce mécanisme de transport du cholestérol entre le RE et les endosomes tardifs affecte-t-il la membrane plasmique ? Les endosomes, le RE et la membrane plasmique sont des organites clés de l'homéostasie du cholestérol. En effet, le cholestérol est synthétisé dans le RE et est soit acheminé vers la membrane plasmique soit estérifié afin d'être stocké dans les gouttelettes lipidiques. En parallèle, le compartiment endosomal contrôle l'absorption du cholestérol par la voie LDL/LDL-R (Brown and Goldstein, 1979). La surexpression de STARD3 perturbe ces voies de transport du cholestérol. Du fait de la surexpression de STARD3 et de l'augmentation des contacts, le cholestérol néosynthétisé dans le RE s'accumule dans les endosomes tardifs au lieu d'être transporté vers la membrane plasmique. Ainsi, le transport de cholestérol médié par STARD3 au niveau des contacts RE-endosomes se fait aux dépens de la membrane plasmique. Comme expliqué précédemment, le cholestérol accumulé dans les endosomes tardifs est utilisé pour former les ILVs (Wilhelm et al., 2017). Le rôle de ces structures n'est pas complètement compris mais dans les cellules HER2+, il est possible qu'elles servent à réduire le cholestérol de la membrane plasmique en le délocalisant dans les endosomes tardifs (**Figure D1**).

-Discussion-

Enfin, mon travail de doctorante a permis de confirmer l'importance des MCS dans la croissance des cellules HER2+. En effet, le mutant de STARD3 incapable d'interagir avec les protéines VAPs/MOSPD2 ne permet pas de restaurer la croissance des cellules HCC1954 après la perte d'expression de la protéine STARD3 endogène. Ce résultat confirme le fait que la croissance des cellules HER2+ dépend de la formation des sites de contact membranaire entre le réticulum et les endosomes tardifs (**Figure D1**).

Pour conclure, le laboratoire a identifié STARD3 comme étant surexprimé dans les cancers HER2+ il y a plus de vingt ans. Depuis, l'équipe a caractérisé sa fonction et a montré que STARD3 est un transporteur de cholestérol capable de créer des MCS et de moduler la répartition du cholestérol cellulaire. Mon travail de thèse a permis d'identifier le mécanisme d'addiction des tumeurs HER2+ pour STARD3 (**Figure D1**). En effet, la croissance des cellules HER2+ et la signalisation issue du récepteur HER2 dépendent du transport de cholestérol médié par STARD3. Ainsi, ces travaux positionnent STARD3 comme une cible thérapeutique spécifique des cancers HER2+. La perspective majeure de ce projet est d'identifier un inhibiteur de STARD3 qui pourrait être utilisé comme thérapie ciblée en association avec le trastuzumab afin de traiter les cancers HER2+.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abdulkareem, I.H., and Zurmi, I.B. (2012). Review of hormonal treatment of breast cancer. *Niger. J. Clin. Pract.* *15*, 9–14.
- Adamczyk, A., Kruczak, A., Harazin-Lechowska, A., Ambicka, A., Grela-Wojewoda, A., Domagała-Haduch, M., Janecka-Widła, A., Majchrzyk, K., Cichocka, A., Ryś, J., et al. (2018). Relationship between HER2 gene status and selected potential biological features related to trastuzumab resistance and its influence on survival of breast cancer patients undergoing trastuzumab adjuvant treatment. *OncoTargets Ther.* *11*, 4525–4535.
- Aertgeerts, K., Skene, R., Yano, J., Sang, B.-C., Zou, H., Snell, G., Jennings, A., Iwamoto, K., Habuka, N., Hirokawa, A., et al. (2011). Structural analysis of the mechanism of inhibition and allosteric activation of the kinase domain of HER2 protein. *J. Biol. Chem.* *286*, 18756–18765.
- Allott, E.H., Howard, L.E., Cooperberg, M.R., Kane, C.J., Aronson, W.J., Terris, M.K., Amling, C.L., and Freedland, S.J. (2014). Serum lipid profile and risk of prostate cancer recurrence: Results from the SEARCH database. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *23*, 2349–2356.
- Alpy, F., and Tomasetto, C. (2005). Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *J. Cell Sci.* *118*, 2791–2801.
- Alpy, F., and Tomasetto, C. (2014a). START ships lipids across interorganelle space. *Biochimie* *96*, 85–95.
- Alpy, F., and Tomasetto, C.L. (2014b). 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.
- Alpy, F., Stoeckel, M.E., Dierich, A., Escola, J.M., Wendling, C., Chenard, M.P., Vanier, M.T., Gruenberg, J., Tomasetto, C., and Rio, M.C. (2001). The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *J. Biol. Chem.* *276*, 4261–4269.
- Alpy, F., Boulay, A., Moog-Lutz, C., Andarawewa, K.L., Degot, S., Stoll, I., Rio, M.-C., and Tomasetto, C. (2003). Metastatic lymph node 64 (MLN64), a gene overexpressed in breast cancers, is regulated by Sp/KLF transcription factors. *Oncogene* *22*, 3770–3780.
- Alpy, F., Latchumanan, V.K., Kedinger, V., Janoshazi, A., Thiele, C., Wendling, C., Rio, M.-C., and Tomasetto, C. (2005). Functional characterization of the MENTAL domain. *J. Biol. Chem.* *280*, 17945–17952.
- Alpy, F., Legueux, F., Bianchetti, L., and Tomasetto, C. (2009). [START domain-containing proteins: a review of their role in lipid transport and exchange]. *Med. Sci.* *MS 25*, 181–191.
- Alpy, F., Rousseau, A., Schwab, Y., Legueux, F., Stoll, I., Wendling, C., Spiegelhalter, C., Kessler, P., Mathelin, C., Rio, M.-C., et al. (2013). STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *J. Cell Sci.* *126*, 5500–5512.
- Altwaingi, A.K. (2015). Statins are potential anticancerous agents (review). *Oncol. Rep.* *33*, 1019–1039.
- Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Hasty, A.H., Yahagi, N., Yoshikawa, T., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., et al. (2002). Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J. Lipid Res.* *43*, 1220–1235.
- Amoyel, M., Anderson, A.M., and Bach, E.A. (2014). JAK/STAT pathway dysregulation in tumors: a Drosophila perspective. *Semin. Cell Dev. Biol.* *28*, 96–103.
- Anderson, R.G.W., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1977). A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. *Nature* *270*, 695–699.

- Annicotte, J.-S., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2004). Expression of the liver X receptor alpha and beta in embryonic and adult mice. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* *277*, 312–316.
- Antonny, B., Bigay, J., and Mesmin, B. (2018). The Oxysterol-Binding Protein Cycle: Burning Off PI(4)P to Transport Cholesterol. *Annu. Rev. Biochem.* *87*, 809–837.
- Apostolou, P., and Fostira, F. (2013). Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. *BioMed Res. Int.* *2013*.
- Arboleda, V., and Vilain, E. (2016). Chapter 19 - Disorders of Sex Development. In *Genetic Diagnosis of Endocrine Disorders (Second Edition)*, R.E. Weiss, and S. Refetoff, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 259–278.
- Arrata, W.S.M. (1975). The Breast: Morphology, Physiology, and Lactation. *JAMA* *232*, 758–758.
- Arriola, E., Marchio, C., Tan, D.S.P., Drury, S.C., Lambros, M.B., Natrajan, R., Rodriguez-Pinilla, S.M., Mackay, A., Tamber, N., Fenwick, K., et al. (2008). Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *88*, 491–503.
- Austin, C.D., De Mazière, A.M., Pisacane, P.I., van Dijk, S.M., Eigenbrot, C., Sliwkowski, M.X., Klumperman, J., and Scheller, R.H. (2004). Endocytosis and Sorting of ErbB2 and the Site of Action of Cancer Therapeutics Trastuzumab and Geldanamycin. *Mol. Biol. Cell* *15*, 5268–5282.
- Ayoub, N.M., Al-Shami, K.M., and Yaghan, R.J. (2019). Immunotherapy for HER2-positive breast cancer: recent advances and combination therapeutic approaches. *Breast Cancer Targets Ther.* *11*, 53–69.
- Azizi, E., Carr, A.J., Plitas, G., Cornish, A.E., Konopacki, C., Prabhakaran, S., Nainys, J., Wu, K., Kiseliovas, V., Setty, M., et al. (2018). Single-Cell Map of Diverse Immune Phenotypes in the Breast Tumor Microenvironment. *Cell* *174*, 1293-1308.e36.
- Bachman, K.E., Argani, P., Samuels, Y., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Konishi, H., Karakas, B., Blair, B.G., Lin, C., et al. (2004). The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* *3*, 772–775.
- Baek, A.E., Yu, Y.-R.A., He, S., Wardell, S.E., Chang, C.-Y., Kwon, S., Pillai, R.V., McDowell, H.B., Thompson, J.W., Dubois, L.G., et al. (2017). The cholesterol metabolite 27 hydroxycholesterol facilitates breast cancer metastasis through its actions on immune cells. *Nat. Commun.* *8*, 864.
- Baenke, F., Peck, B., Miess, H., and Schulze, A. (2013). Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis. Model. Mech.* *6*, 1353–1363.
- Ballabio, C., Bertino, E., Coscia, A., Fabris, C., Fuggetta, D., Molino, S., Testa, T., Sgarrella, M.C., Sabatino, G., and Restani, P. (2007). Immunoglobulin-A profile in breast milk from mothers delivering full term and preterm infants. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* *20*, 119–128.
- Barok, M., Joensuu, H., and Isola, J. (2014). Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res. BCR* *16*, 209.
- Beloribi-Djefafli, S., Vasseur, S., and Guillaumond, F. (2016). Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* *5*, e189–e189.
- Bensouda, Y., André, F., Boulet, T., Al-Ghuzlan, A., Conforti, R., Troalen, F., Bourgier, C., Errihani, H., Spielmann, M., and Delalogue, S. (2009). [Prevalence of elevated serum CA 15-3 at time of metastatic relapse of breast cancer and correlation with hormone receptor status]. *Bull. Cancer (Paris)* *96*, 923–928.
- Bertelsen, V., and Stang, E. (2014). The Mysterious Ways of ErbB2/HER2 Trafficking. *Membranes* *4*, 424–446.
- Bertero, L., Massa, F., Metovic, J., Zanetti, R., Castellano, I., Ricardi, U., Papotti, M., and Cassoni, P. (2018). Eighth Edition of the UICC Classification of Malignant Tumours: an overview of the changes in the pathological TNM classification criteria-What has changed and why? *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *472*, 519–531.

- Bertherat, J. (2004). Biochimie des hormones et leurs mécanismes d'action. D-Récepteurs nucléaires. EMC - Endocrinol. 1, 133–137.
- Bertucci, F., Borie, N., Ginestier, C., Groulet, A., Charafe-Jauffret, E., Adélaïde, J., Geneix, J., Bachelart, L., Finetti, P., Koki, A., et al. (2004). Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene* 23, 2564–2575.
- Bièche, I., Tomasetto, C., Régnier, C.H., Moog-Lutz, C., Rio, M.C., and Lidereau, R. (1996). Two distinct amplified regions at 17q11-q21 involved in human primary breast cancer. *Cancer Res.* 56, 3886–3890.
- Bjerre, L.M., and LeLorier, J. (2001). Do statins cause cancer? A meta-analysis of large randomized clinical trials. *Am. J. Med.* 110, 716–723.
- Blouin, C.M., Hamon, Y., Gonnord, P., Boularan, C., Kagan, J., Viaris de Lesegno, C., Ruez, R., Mailfert, S., Bertaux, N., Loew, D., et al. (2016). Glycosylation-Dependent IFN- γ R Partitioning in Lipid and Actin Nanodomains Is Critical for JAK Activation. *Cell* 166, 920–934.
- Bocharov, E.V., Mineev, K.S., Volynsky, P.E., Ermolyuk, Y.S., Tkach, E.N., Sobol, A.G., Chupin, V.V., Kirpichnikov, M.P., Efremov, R.G., and Arseniev, A.S. (2008). Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state. *J. Biol. Chem.* 283, 6950–6956.
- Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell* 129, 865–877.
- Bose, H.S., Whittal, R.M., Ran, Y., Bose, M., Baker, B.Y., and Miller, W.L. (2008). StAR-like activity and molten globule behavior of StARD6, a male germ-line protein. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 2277–2288.
- Bose, R., Kavuri, S.M., Searleman, A.C., Shen, W., Shen, D., Koboldt, D.C., Monsey, J., Goel, N., Aronson, A.B., Li, S., et al. (2013). Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer Discov.* 3, 224–237.
- Boura, E., Ivanov, V., Carlson, L.-A., Mizuuchi, K., and Hurley, J.H. (2012). Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) complexes induce phase-separated microdomains in supported lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 287, 28144–28151.
- Bozza, P.T., and Viola, J.P.B. (2010). Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 82, 243–250.
- Bradley, M.N., Hong, C., Chen, M., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Wang, X., Lusic, A.J., Collins, A., Hseuh, W.A., Collins, J.L., et al. (2007). Ligand activation of LXR beta reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking LXR alpha and apoE. *J. Clin. Invest.* 117, 2337–2346.
- Brady, S.W., McQuerry, J.A., Qiao, Y., Piccolo, S.R., Shrestha, G., Jenkins, D.F., Layer, R.M., Pedersen, B.S., Miller, R.H., Esch, A., et al. (2017). Combating subclonal evolution of resistant cancer phenotypes. *Nat. Commun.* 8, 1231.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.*
- Bromberg, J.F. (2001). Activation of STAT proteins and growth control. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 23, 161–169.
- Bromberg, J., and Darnell, J.E. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19, 2468–2473.
- Broutin, I., and Ducruix, A. (2000). Domaines structuraux et signalisation. *médecine/sciences* 16, 611.

- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1979). Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *76*, 3330–3337.
- Brown, A.J., Sun, L., Feramisco, J.D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2002). Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol. Cell* *10*, 237–245.
- Buja, A., Mastrangelo, G., Perissinotto, E., Grigoletto, F., Frigo, A.C., Rausa, G., Marin, V., Canova, C., and Dominici, F. (2006). Cancer incidence among female flight attendants: a meta-analysis of published data. *J. Womens Health* *2002* *15*, 98–105.
- Burg, J.S., and Espenshade, P.J. (2011). Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog. Lipid Res.* *50*, 403–410.
- Burgess, A.W., Cho, H.-S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P.J., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., and Yokoyama, S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol. Cell* *12*, 541–552.
- Cai, W., Ye, L., Sun, J., Mansel, R.E., and Jiang, W.G. (2010). Expression of MLN64 influences cellular matrix adhesion of breast cancer cells, the role for focal adhesion kinase. *Int. J. Mol. Med.* *25*, 573–580.
- Calderon-Dominguez, M., Gil, G., Medina, M.A., Pandak, W.M., and Rodríguez-Agudo, D. (2014). The StarD4 subfamily of steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer (START) domain proteins: new players in cholesterol metabolism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *49*, 64–68.
- Cameron, D., Casey, M., Press, M., Lindquist, D., Pienkowski, T., Romieu, C.G., Chan, S., Jagiello-Gruszfeld, A., Kaufman, B., Crown, J., et al. (2008). A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. *Breast Cancer Res. Treat.* *112*, 533–543.
- Cameron, D., Casey, M., Oliva, C., Newstat, B., Imwalle, B., and Geyer, C.E. (2010). Lapatinib plus capecitabine in women with HER-2-positive advanced breast cancer: final survival analysis of a phase III randomized trial. *The Oncologist* *15*, 924–934.
- Cameron, D., Piccart-Gebhart, M.J., Gelber, R.D., Procter, M., Goldhirsch, A., de Azambuja, E., Castro, G., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., et al. (2017). 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet Lond. Engl.* *389*, 1195–1205.
- Cardoso, F., van't Veer, L.J., Bogaerts, J., Slaets, L., Viale, G., Delalage, S., Pierga, J.-Y., Brain, E., Causeret, S., DeLorenzi, M., et al. (2016). 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* *375*, 717–729.
- Cardwell, C.R., Hicks, B.M., Hughes, C., and Murray, L.J. (2014). Statin use after colorectal cancer diagnosis and survival: a population-based cohort study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *32*, 3177–3183.
- Carmichael, A., Sami, A.S., and Dixon, J.M. (2003). Breast cancer risk among the survivors of atomic bomb and patients exposed to therapeutic ionising radiation. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* *29*, 475–479.
- Caro-Maldonado, A., Camacho, L., Zabala-Letona, A., Torrano, V., Fernández-Ruiz, S., Zamacola-Bascaran, K., Arreal, L., Valcárcel-Jiménez, L., Martín-Martín, N., Flores, J.M., et al. (2017). Low-dose statin treatment increases prostate cancer aggressiveness. *Oncotarget* *9*, 1494–1504.
- Casasent, A.K., Schalck, A., Gao, R., Sei, E., Long, A., Pangburn, W., Casasent, T., Meric-Bernstam, F., Edgerton, M.E., and Navin, N.E. (2018). Multiclonal Invasion in Breast Tumors Identified by Topographic Single Cell Sequencing. *Cell* *172*, 205-217.e12.

- Caswell-Jin, J.L., Plevritis, S.K., Tian, L., Cadham, C.J., Xu, C., Stout, N.K., Sledge, G.W., Mandelblatt, J.S., and Kurian, A.W. (2018). Change in Survival in Metastatic Breast Cancer with Treatment Advances: Meta-Analysis and Systematic Review. *JNCI Cancer Spectr.* 2.
- Cébe-Suarez, S., Zehnder-Fjällman, A., and Ballmer-Hofer, K. (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 601–615.
- Cerqueira, N.M.F.S.A., Oliveira, E.F., Gestó, D.S., Santos-Martins, D., Moreira, C., Moorthy, H.N., Ramos, M.J., and Fernandes, P.A. (2016). Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry (Mosc.)* 55, 5483–5506.
- Chantal Dreyer, Eric Raymond, and Sandrine Faivre (2009). La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. *Cancéro Dig.* 1, 187.
- Chen, X., and Resh, M.D. (2002). Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 49631–49637.
- Chen, L., Ma, M.-Y., Sun, M., Jiang, L.-Y., Zhao, X.-T., Fang, X.-X., Lam, S.M., Shui, G.-H., Luo, J., Shi, X.-J., et al. (2019). Endogenous sterol intermediates of the mevalonate pathway regulate HMG-CoA reductase degradation and SREBP-2 processing. *J. Lipid Res.* jlr.RA119000201.
- Chia, S.K., Bramwell, V.H., Tu, D., Shepherd, L.E., Jiang, S., Vickery, T., Mardis, E., Leung, S., Ung, K., Pritchard, K.I., et al. (2012). A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 4465–4472.
- Chien, A.J., Cockerill, A., Fancourt, C., Schmidt, E., Moasser, M.M., Rugo, H.S., Melisko, M.E., Ko, A.H., Kelley, R.K., Korn, W.M., et al. (2016). A phase 1b study of the Akt-inhibitor MK-2206 in combination with weekly paclitaxel and trastuzumab in patients with advanced HER2-amplified solid tumor malignancies. *Breast Cancer Res. Treat.* 155, 521–530.
- Chimento, A., Casaburi, I., Avena, P., Trotta, F., De Luca, A., Rago, V., Pezzi, V., and Sirianni, R. (2019). Cholesterol and Its Metabolites in Tumor Growth: Therapeutic Potential of Statins in Cancer Treatment. *Front. Endocrinol.* 9.
- Cho, H.-S., Mason, K., Ramyar, K.X., Stanley, A.M., Gabelli, S.B., Denney, D.W., and Leahy, D.J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421, 756–760.
- Chourin, S., Veyret, C., Chevrier, A., Loeb, A., Gray, C., and Basuyau, J.P. (2008). Routine use of serial plasmatic CA 15-3 determinations during the follow-up of patients treated for breast cancer. Evaluation as factor of early diagnosis of recurrence. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 66, 385–392.
- Chung, I., Reichelt, M., Shao, L., Akita, R.W., Koeppen, H., Rangell, L., Schaefer, G., Mellman, I., and Sliwkowski, M.X. (2016). High cell-surface density of HER2 deforms cell membranes. *Nat. Commun.* 7, 12742.
- Chung, W., Eum, H.H., Lee, H.-O., Lee, K.-M., Lee, H.-B., Kim, K.-T., Ryu, H.S., Kim, S., Lee, J.E., Park, Y.H., et al. (2017). Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer. *Nat. Commun.* 8, 1–12.
- Cimino-Mathews, A., Thompson, E., Taube, J.M., Ye, X., Lu, Y., Meeker, A., Xu, H., Sharma, R., Lecksell, K., Cornish, T.C., et al. (2016). PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Hum. Pathol.* 47, 52–63.
- Clutterbuck, R.D., Millar, B.C., Powles, R.L., Newman, A., Catovsky, D., Jarman, M., and Millar, J.L. (1998). Inhibitory effect of simvastatin on the proliferation of human myeloid leukaemia cells in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Br. J. Haematol.* 102, 522–527.
- Cohen, E.E.W., Lingen, M.W., Martin, L.E., Harris, P.L., Brannigan, B.W., Haserlat, S.M., Okimoto, R.A., Sgroi, D.C., Dahiya, S., Muir, B., et al. (2005). Response of some head and neck cancers to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors may be linked to mutation of ERBB2 rather than EGFR. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 8105–8108.

- Colditz, G.A., and Bohlke, K. (2014). Priorities for the primary prevention of breast cancer. *CA. Cancer J. Clin.* *64*, 186–194.
- Collins, A., and Politopoulos, I. (2011). The genetics of breast cancer: risk factors for disease. *Appl. Clin. Genet.* *4*, 11–19.
- Colpaert, R.M.W., and Calore, M. (2019). MicroRNAs in Cardiac Diseases. *Cells* *8*.
- Connell, C.M., and Doherty, G.J. (2017). Activating HER2 mutations as emerging targets in multiple solid cancers. *ESMO Open* *2*.
- Cortese, K., Howes, M.T., Lundmark, R., Tagliatti, E., Bagnato, P., Petrelli, A., Bono, M., McMahon, H.T., Parton, R.G., and Tacchetti, C. (2013). The HSP90 inhibitor geldanamycin perturbs endosomal structure and drives recycling ErbB2 and transferrin to modified MVBs/lysosomal compartments. *Mol. Biol. Cell* *24*, 129–144.
- Cruz, P.M.R., Mo, H., McConathy, W.J., Sabnis, N., and Lacko, A.G. (2013). The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Front. Pharmacol.* *4*.
- Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A.Z., Müller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., Ellenberg, J., Hyman, A.A., and Gerlich, D.W. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* *535*, 308–312.
- Cuzick, J., Dowsett, M., Pineda, S., Wale, C., Salter, J., Quinn, E., Zabaglo, L., Mallon, E., Green, A.R., Ellis, I.O., et al. (2011). Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 4273–4278.
- Dabbs, D.J., Klein, M.E., Mohsin, S.K., Tubbs, R.R., Shuai, Y., and Bhargava, R. (2011). High false-negative rate of HER2 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of the Oncotype DX test: an independent quality assurance study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 4279–4285.
- Daemen, A., Griffith, O.L., Heiser, L.M., Wang, N.J., Enache, O.M., Sanborn, Z., Pepin, F., Durinck, S., Korkola, J.E., Griffith, M., et al. (2013). Modeling precision treatment of breast cancer. *Genome Biol.* *14*, R110.
- Dai, C., Heemers, H., and Sharifi, N. (2017). Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *7*, a030452.
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., and Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am. J. Cancer Res.* *5*, 2929–2943.
- D’Amato, V., Raimondo, L., Formisano, L., Giuliano, M., De Placido, S., Rosa, R., and Bianco, R. (2015). Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* *41*, 877–883.
- D’Andrea, A.D. (2018). Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA Repair* *71*, 172–176.
- Davis, C.G., Lehrman, M.A., Russell, D.W., Anderson, R.G.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). The J. D. mutation in familial hypercholesterolemia: Amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell* *45*, 15–24.
- Dawson, S.-J., Rosenfeld, N., and Caldas, C. (2013). Circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *369*, 93–94.
- Demina, E.P., Miroshnikova, V.V., and Schwarzman, A.L. (2016). [Role of the ABC transporters A1 and G1, key reverse cholesterol transport proteins, in atherosclerosis]. *Mol. Biol. (Mosk.)* *50*, 223–230.
- Di Mattia, T., Tomasetto, C., and Alpy, F. (2020). Faraway, so close! Functions of Endoplasmic reticulum-Endosome contacts. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* *1865*, 158490.

- Disis, M.L., Dang, Y., Coveler, A.L., Marzbani, E., Kou, Z.C., Childs, J.S., Fintak, P., Higgins, D.M., Reichow, J., Waisman, J., et al. (2014). HER-2/neu vaccine-primed autologous T-cell infusions for the treatment of advanced stage HER-2/neu expressing cancers. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 63, 101–109.
- Dong, F., Mo, Z., Eid, W., Courtney, K.C., and Zha, X. (2014). Akt inhibition promotes ABCA1-mediated cholesterol efflux to ApoA-I through suppressing mTORC1. *PLoS One* 9, e113789.
- Doyle, H.A., Koski, R.A., Bonafé, N., Bruck, R.A., Tagliatela, S.M., Gee, R.J., and Mamula, M.J. (2018). Epidermal growth factor receptor peptide vaccination induces cross-reactive immunity to human EGFR, HER2, and HER3. *Cancer Immunol. Immunother.*
- Du, G., Bian, L., Wang, T., Xu, X., Zhang, S., Guo, Y., Zhuo, J., Song, S., and Jiang, Z. (2015). [PTEN loss correlates with the clinical efficacy of lapatinib in HER2 positive metastatic breast cancer with trastuzumab-resistance]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 95, 2264–2267.
- Du, X., Kumar, J., Ferguson, C., Schulz, T.A., Ong, Y.S., Hong, W., Prinz, W.A., Parton, R.G., Brown, A.J., and Yang, H. (2011). A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal cholesterol trafficking. *J. Cell Biol.* 192, 121–135.
- Duell, E.J., Millikan, R.C., Savitz, D.A., Newman, B., Smith, J.C., Schell, M.J., and Sandler, D.P. (2000). A population-based case-control study of farming and breast cancer in North Carolina. *Epidemiol. Camb. Mass* 11, 523–531.
- Duffy, M.J., O’Grady, P., Devaney, D., O’Siorain, L., Fennelly, J.J., and Lijnen, H.J. (1988). Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer* 62, 531–533.
- EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group), McGale, P., Taylor, C., Correa, C., Cutter, D., Duane, F., Ewertz, M., Gray, R., Mannu, G., Peto, R., et al. (2014). Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet Lond. Engl.* 383, 2127–2135.
- Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., and Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86, 839–848.
- Eden, E.R., Sanchez-Heras, E., Tsapara, A., Sobota, A., Levine, T.P., and Futter, C.E. (2016). Annexin A1 Tethers Membrane Contact Sites that Mediate ER to Endosome Cholesterol Transport. *Dev. Cell* 37, 473–483.
- Egelé, C., Algros, M.P., Arnould, L., Barlier, C., Brabencova, E., Huriet, V., Louis, B., Luporsi, E., Roujansky, O., Tissier, F., et al. (2015). Ki67 et cancer du sein pour la pratique clinique – standardisation des examens IHC sur pièce opératoire et des comptes rendus – recommandations 2014 du Grand-Est. *Ann. Pathol.* 35, 470–471.
- Eichhorn, P.J.A., Gili, M., Scaltriti, M., Serra, V., Guzman, M., Nijkamp, W., Beijersbergen, R.L., Valero, V., Seoane, J., Bernards, R., et al. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BE235. *Cancer Res.* 68, 9221–9230.
- Ellis, L.M. (2006). Mechanisms of action of bevacizumab as a component of therapy for metastatic colorectal cancer. *Semin. Oncol.* 33, S1-7.
- Ellsworth, R.E., Ellsworth, D.L., Patney, H.L., Deyarmin, B., Love, B., Hooke, J.A., and Shriver, C.D. (2008). Amplification of HER2 is a marker for global genomic instability. *BMC Cancer* 8, 297.
- Elsberger, B. (2014). Translational evidence on the role of Src kinase and activated Src kinase in invasive breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 89, 343–351.
- Emens, L.A. (2018). Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 24, 511–520.
- Emens, L.A., Kok, M., and Ojalvo, L.S. (2016). Targeting the programmed cell death-1 pathway in breast and ovarian cancer. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 28, 142–147.

- Ersahin, T., Tuncbag, N., and Cetin-Atalay, R. (2015). The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol. Biosyst.* *11*, 1946–1954.
- Estourgie, S.H., Nieweg, O.E., Valdés Olmos, R.A., Rutgers, E.J.T., and Kroon, B.B.R. (2004). Lymphatic Drainage Patterns From the Breast. *Ann. Surg.* *239*, 232–237.
- Fahad Ullah, M. (2019). Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. *Adv. Exp. Med. Biol.* *1152*, 51–64.
- Fala, L. (2018). Yescarta (Axicabtagene Ciloleucel) Second CAR T-Cell Therapy Approved for Patients with Certain Types of Large B-Cell Lymphoma.
- Fantozzi, A., and Christofori, G. (2006). Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* *8*, 212.
- Fatehi Hassanabad, A. (2019). Current perspectives on statins as potential anti-cancer therapeutics: clinical outcomes and underlying molecular mechanisms. *Transl. Lung Cancer Res.* *8*, 692–699.
- Faulkin, L.J., and Deome, K.B. (1960). Regulation of growth and spacing of gland elements in the mammary fat pad of the C3H mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* *24*, 953–969.
- Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.
- Feldinger, K., and Kong, A. (2015). Profile of neratinib and its potential in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Targets Ther.* *7*, 147–162.
- 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.
- Fitzal, F., Filipits, M., Rudas, M., Greil, R., Dietze, O., Samonigg, H., Lax, S., Herz, W., Dubsy, P., Bartsch, R., et al. (2015). The genomic expression test EndoPredict is a prognostic tool for identifying risk of local recurrence in postmenopausal endocrine receptor-positive, her2neu-negative breast cancer patients randomised within the prospective ABCSG 8 trial. *Br. J. Cancer* *112*, 1405–1410.
- Fleeman, N., Bagust, A., Beale, S., Dwan, K., Dickson, R., Proudlove, C., and Dundar, Y. (2015). Pertuzumab in combination with trastuzumab and docetaxel for the treatment of HER2-positive metastatic or locally recurrent unresectable breast cancer. *Pharmacoeconomics* *33*, 13–23.
- Foulkes, W.D., Smith, I.E., and Reis-Filho, J.S. (2010). Triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *363*, 1938–1948.
- Freed-Pastor, W.A., Mizuno, H., Zhao, X., Langerød, A., Moon, S.-H., Rodriguez-Barrueco, R., Barsotti, A., Chicas, A., Li, W., Polotskaia, A., et al. (2012). Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell* *148*, 244–258.
- Fu, N., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2014). The mammary stem cell hierarchy. *Curr. Top. Dev. Biol.* *107*, 133–160.
- Gabriele, V., Benabu, J.-C., Ohl, J., Youssef, C.A., and Mathelin, C. (2017). [Does fertility treatment increase the risk of breast cancer? Current knowledge and meta-analysis]. *Gynecol. Obstet. Fertil. Senol.* *45*, 299–308.
- Gage, M., Wattendorf, D., and Henry, L.R. (2012). Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes. *J. Surg. Oncol.* *105*, 444–451.
- Gallagher, E.J., Zelenko, Z., Neel, B.A., Antoniou, I.M., Rajan, L., Kase, N., and LeRoith, D. (2017). Elevated tumor LDLR expression accelerates LDL cholesterol-mediated breast cancer growth in mouse models of hyperlipidemia. *Oncogene* *36*, 6462–6471.

- Garbarino, J., Pan, M., Chin, H.F., Lund, F.W., Maxfield, F.R., and Breslow, J.L. (2012). STARD4 knockdown in HepG2 cells disrupts cholesterol trafficking associated with the plasma membrane, ER, and ERC. *J. Lipid Res.* *53*, 2716–2725.
- Garcia, R., and Jove, R. (1998). Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J. Biomed. Sci.* *5*, 79–85.
- Garcia, C.K., Wilund, K., Arca, M., Zuliani, G., Fellin, R., Maioli, M., Calandra, S., Bertolini, S., Cossu, F., Grishin, N., et al. (2001). Autosomal Recessive Hypercholesterolemia Caused by Mutations in a Putative LDL Receptor Adaptor Protein. *Science* *292*, 1394–1398.
- Garcia-Estevez, L., and Moreno-Bueno, G. (2019). Updating the role of obesity and cholesterol in breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* *21*, 35.
- Garrett, J.T., and Arteaga, C.L. (2011). Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications. *Cancer Biol. Ther.* *11*, 793–800.
- Garrett, J.T., Olivares, M.G., Rinehart, C., Granja-Ingram, N.D., Sánchez, V., Chakrabarty, A., Dave, B., Cook, R.S., Pao, W., McKinley, E., et al. (2011). Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 5021–5026.
- Garrett, T.P.J., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Kofler, M., Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W., et al. (2003). The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol. Cell* *11*, 495–505.
- Garwood, E.R., Kumar, A.S., Baehner, F.L., Moore, D.H., Au, A., Hylton, N., Flowers, C.I., Garber, J., Lesnikoski, B.-A., Hwang, E.S., et al. (2010). Fluvastatin reduces proliferation and increases apoptosis in women with high grade breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *119*, 137–144.
- Gassmann, A.-S., Gonzalez, M., and Mathelin, C. (2015). [Have female flight attendants an over-risk of breast cancer?]. *Gynecol. Obstet. Fertil.* *43*, 41–48.
- Geenen, J.J.J., Linn, S.C., Beijnen, J.H., and Schellens, J.H.M. (2018). PARP Inhibitors in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Pharmacokinet.* *57*, 427–437.
- Gelissen, I.C., Harris, M., Rye, K.-A., Quinn, C., Brown, A.J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., and Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 534–540.
- Gerin, I., Clerbaux, L.-A., Haumont, O., Lanthier, N., Das, A.K., Burant, C.F., Leclercq, I.A., MacDougald, O.A., and Bommer, G.T. (2010). Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *J. Biol. Chem.* *285*, 33652–33661.
- Geyer, C.E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C.G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B., et al. (2006). Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *355*, 2733–2743.
- Ghoncheh, M., Pournamdar, Z., and Salehiniya, H. (2016). Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* *17*, 43–46.
- Gianni, L., Eiermann, W., Semiglazov, V., Manikhas, A., Lluch, A., Tjulandin, S., Zambetti, M., Vazquez, F., Byakhov, M., Lichinitser, M., et al. (2010). Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet Lond. Engl.* *375*, 377–384.
- Gianni, L., Pienkowski, T., Im, Y.-H., Roman, L., Tseng, L.-M., Liu, M.-C., Lluch, A., Staroslawska, E., de la Haba-Rodriguez, J., Im, S.-A., et al. (2012). Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* *13*, 25–32.

- Giuliano, M., Hu, H., Wang, Y.-C., Fu, X., Nardone, A., Herrera, S., Mao, S., Contreras, A., Gutierrez, C., Wang, T., et al. (2015). Upregulation of ER Signaling as an Adaptive Mechanism of Cell Survival in HER2-Positive Breast Tumors Treated with Anti-HER2 Therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *21*, 3995–4003.
- Goedeke, L., and Fernández-Hernando, C. (2012). Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *69*, 915–930.
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thürlimann, B., Senn, H.-J., and Panel members (2011a). 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. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *22*, 1736–1747.
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thürlimann, B., Senn, H.-J., and Panel members (2011b). 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. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *22*, 1736–1747.
- Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S. (2006). Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell* *124*, 35–46.
- Goldstein Joseph L., and Brown Michael S. (2009). The LDL Receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 431–438.
- Gomes, C., Oh, S.-D., Kim, J.-W., Chun, S.-Y., Lee, K., Kwon, H.-B., and Soh, J. (2005). Expression of the Putative Sterol Binding Protein Stard6 Gene Is Male Germ Cell Specific. *Biol. Reprod.* *72*, 651–658.
- Gonnord, P., Blouin, C.M., and Lamaze, C. (2012). Membrane trafficking and signaling: two sides of the same coin. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 154–164.
- de Gonzalo-Calvo, D., López-Vilaró, L., Nasarre, L., Perez-Olabarria, M., Vázquez, T., Escuin, D., Badimon, L., Barnadas, A., Lerma, E., and Llorente-Cortés, V. (2015). Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer* *15*, 460.
- Gordon, L.I., Burke, M.A., Singh, A.T.K., Prachand, S., Lieberman, E.D., Sun, L., Naik, T.J., Prasad, S.V.N., and Ardehali, H. (2009). Blockade of the erbB2 Receptor Induces Cardiomyocyte Death through Mitochondrial and Reactive Oxygen Species-dependent Pathways. *J. Biol. Chem.* *284*, 2080–2087.
- Gouri, A., Dekaken, A., El Bairi, K., Aissaoui, A., Laabed, N., Chefrour, M., Ciccolini, J., Milano, G., and Benharkat, S. (2016). Plasminogen Activator System and Breast Cancer: Potential Role in Therapy Decision Making and Precision Medicine. *Biomark. Insights* *11*, 105–111.
- Gowda, R., Madhunapantula, S.V., Kuzu, O.F., Sharma, A., and Robertson, G.P. (2014). Targeting Multiple Key Signaling Pathways in Melanoma Using Leelamine. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 1679–1689.
- Grosse, P.Y., Bressolle, F., and Pinguet, F. (1998). Antiproliferative effect of methyl-beta-cyclodextrin in vitro and in human tumour xenografted athymic nude mice. *Br. J. Cancer* *78*, 1165–1169.
- Grunicke, H.H., and Maly, K. (1993). Role of GTPases and GTPase regulatory proteins in oncogenesis. *Crit. Rev. Oncog.* *4*, 389–402.
- Gu, L., Saha, S.T., Thomas, J., and Kaur, M. (2019). Targeting cellular cholesterol for anticancer therapy. *FEBS J.* *286*, 4192–4208.
- Guha, T., and Malkin, D. (2017). Inherited TP53 Mutations and the Li-Fraumeni Syndrome. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *7*.

- Guillaumond, F., Bidaut, G., Ouaisi, M., Servais, S., Gouirand, V., Olivares, O., Lac, S., Borge, L., Roques, J., Gayet, O., et al. (2015). Cholesterol uptake disruption, in association with chemotherapy, is a promising combined metabolic therapy for pancreatic adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 2473–2478.
- Gupta, P., and Srivastava, S.K. (2014). HER2 mediated de novo production of TGF β leads to SNAIL driven epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer. *Mol. Oncol.* *8*, 1532–1547.
- Hagan, C.R., and Lange, C.A. (2014). Molecular determinants of context-dependent progesterone receptor action in breast cancer. *BMC Med.* *12*, 32.
- Han, D.C., Shen, T.-L., and Guan, J.-L. (2001). The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signaling molecules and potential cellular functions. *Oncogene* *20*, 6315–6321.
- Hanada, K. (2018). Lipid transfer proteins rectify inter-organelle flux and accurately deliver lipids at membrane contact sites. *J. Lipid Res.* *59*, 1341–1366.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hao, M., Lin, S.X., Karylowski, O.J., Wüstner, D., McGraw, T.E., and Maxfield, F.R. (2002). Vesicular and Non-vesicular Sterol Transport in Living Cells: THE ENDOCYTIC RECYCLING COMPARTMENT IS A MAJOR STEROL STORAGE ORGANELLE. *J. Biol. Chem.* *277*, 609–617.
- Harari, D., and Yarden, Y. (2000). Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* *19*, 6102–6114.
- Harrison, B.T., and Dillon, D.A. (2018). An Update of Mucinous Lesions of the Breast. *Surg. Pathol. Clin.* *11*, 61–90.
- Haslekås, C., Breen, K., Pedersen, K.W., Johannessen, L.E., Stang, E., and Madshus, I.H. (2005). The inhibitory effect of ErbB2 on epidermal growth factor-induced formation of clathrin-coated pits correlates with retention of epidermal growth factor receptor-ErbB2 oligomeric complexes at the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* *16*, 5832–5842.
- Hassiotou, F., and Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin. Anat. N. Y.* *N 26*, 29–48.
- Helle, S.C.J., Kanfer, G., Kolar, K., Lang, A., Michel, A.H., and Kornmann, B. (2013). Organization and function of membrane contact sites. *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 2526–2541.
- Higgins, M.J., and Baselga, J. (2011). Targeted therapies for breast cancer. *J. Clin. Invest.* *121*, 3797–3803.
- Hirano, Y., Yoshida, M., Shimizu, M., and Sato, R. (2001). Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* *276*, 36431–36437.
- Hoang, M.P., Sahin, A.A., Ordóñez, N.G., and Sneige, N. (2000). HER-2/neu Gene Amplification Compared With HER-2/neu Protein Overexpression and Interobserver Reproducibility in Invasive Breast Carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* *113*, 852–859.
- Höglinger, D., Burgoyne, T., Sanchez-Heras, E., Hartwig, P., Colaco, A., Newton, J., Futter, C.E., Spiegel, S., Platt, F.M., and Eden, E.R. (2019). NPC1 regulates ER contacts with endocytic organelles to mediate cholesterol egress. *Nat. Commun.* *10*, 1–14.
- Holthuis, J.C.M., and Levine, T.P. (2005). Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 209–220.
- Hommelgaard, A.M., Lerdrup, M., and van Deurs, B. (2004). Association with Membrane Protrusions Makes ErbB2 an Internalization-resistant Receptor. *Mol. Biol. Cell* *15*, 1557–1567.

- Hopkins, T.A., Dyck, J.R.B., and Lopaschuk, G.D. (2003). AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 207–212.
- Horie, T., Ono, K., Horiguchi, M., Nishi, H., Nakamura, T., Nagao, K., Kinoshita, M., Kuwabara, Y., Marusawa, H., Iwanaga, Y., et al. (2010). MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 17321–17326.
- Houghton, P.J. (2010). Everolimus. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 1368–1372.
- Howell, A., Anderson, A.S., Clarke, R.B., Duffy, S.W., Evans, D.G., Garcia-Closas, M., Gescher, A.J., Key, T.J., Saxton, J.M., and Harvie, M.N. (2014). Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* *16*.
- Hu, J., La Vecchia, C., de Groh, M., Negri, E., Morrison, H., Mery, L., and Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group (2012). Dietary cholesterol intake and cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *23*, 491–500.
- Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Wang, X. (1993). SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 11603–11607.
- Hullin-Matsuda, F., Taguchi, T., Greimel, P., and Kobayashi, T. (2014). Lipid compartmentalization in the endosome system. *Semin. Cell Dev. Biol.* *31*, 48–56.
- Hunter, T., and Sefton, B.M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 1311–1315.
- Hutchins, P.M., and Heinecke, J.W. (2015). Cholesterol Efflux Capacity, Macrophage Reverse Cholesterol Transport, and Cardioprotective HDL. *Curr. Opin. Lipidol.* *26*, 388–393.
- Hynes, N.E., and MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 177–184.
- Iaea, D.B., Dikiy, I., Kiburu, I., Eliezer, D., and Maxfield, F.R. (2015). STARD4 Membrane Interactions and Sterol Binding. *Biochemistry (Mosc.)* *54*, 4623–4636.
- Iatrakis, G., Iavazzo, C., Zervoudis, S., Koumoussidis, A., Sofoudis, C., Kalampokas, T., and Salakos, N. (2011). The role of oral contraception use in the occurrence of breast cancer. A retrospective study of 405 patients. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* *38*, 225–227.
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 125–138.
- Inazu, A. (2010). Chapter 3 - Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) in Relation to Human Pathophysiology. In *The HDL Handbook*, T. Komoda, ed. (Boston: Academic Press), pp. 35–59.
- Inic, Z., Zegarac, M., Inic, M., Markovic, I., Kozomara, Z., Djuricic, I., Inic, I., Pupic, G., and Jancic, S. (2014). Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *Clin. Med. Insights Oncol.* *8*, 107–111.
- Ishitsuka, R., Saito, T., Osada, H., Ohno-Iwashita, Y., and Kobayashi, T. (2011). Fluorescence image screening for chemical compounds modifying cholesterol metabolism and distribution. *J. Lipid Res.* *52*, 2084–2094.
- Islam, M.M., Yang, H.-C., Nguyen, P.-A., Poly, T.N., Huang, C.-W., Kekade, S., Khalfan, A.M., Debnath, T., Li, Y.-C.J., and Abdul, S.S. (2017). Exploring association between statin use and breast cancer risk: an updated meta-analysis. *Arch. Gynecol. Obstet.* *296*, 1043–1053.
- Jackson-Fisher, A.J., Bellinger, G., Ramabhadran, R., Morris, J.K., Lee, K.-F., and Stern, D.F. (2004). ErbB2 is required for ductal morphogenesis of the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 17138–17143.

- Jacobs, E.J., Newton, C.C., Thun, M.J., and Gapstur, S.M. (2011). Long-term use of cholesterol-lowering drugs and cancer incidence in a large United States cohort. *Cancer Res.* *71*, 1763–1771.
- Jang, Y.-N., and Baik, E.J. (2013). JAK-STAT pathway and myogenic differentiation. *JAK-STAT* *2*, e23282.
- Jänicke, F., Prechtel, A., Thomssen, C., Harbeck, N., Meisner, C., Untch, M., Sweep, C.G., Selbmann, H.K., Graeff, H., Schmitt, M., et al. (2001). Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 913–920.
- Jelinek, T., Dent, P., Sturgill, T.W., and Weber, M.J. (1996). Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 1027–1034.
- Jeong, J., VanHouten, J.N., Dann, P., Kim, W., Sullivan, C., Yu, H., Liotta, L., Espina, V., Stern, D.F., Friedman, P.A., et al. (2016). PMCA2 regulates HER2 protein kinase localization and signaling and promotes HER2-mediated breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E282–290.
- Jeong, J., Kim, W., Kim, L.K., VanHouten, J., and Wysolmerski, J.J. (2017). HER2 signaling regulates HER2 localization and membrane retention. *PloS One* *12*, e0174849.
- Jeong, S.A., Choi, J.M., Park, J.M., Lee, J.Y., Lee, S.J., Lee, S.Y., Lee, S.Y., Park, Y.A., Jeong, H.J., Song, Y.C., et al. (2019). Mechanism of action of the trastuzumab biosimilar CT-P6. *Expert Opin. Biol. Ther.* *19*, 1085–1095.
- Jernström, S., Hongisto, V., Leivonen, S.-K., Due, E.U., Tadele, D.S., Edgren, H., Kallioniemi, O., Perälä, M., Mælandsmo, G.M., and Sahlberg, K.K. (2017). Drug-screening and genomic analyses of HER2-positive breast cancer cell lines reveal predictors for treatment response. *Breast Cancer Dove Med. Press* *9*, 185–198.
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., and Gustafsson, J.-Å. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *29*, 557–568.
- de Jong, M.M., Nolte, I., te Meerman, G.J., van der Graaf, W.T.A., Oosterwijk, J., Kleibeuker, J., Schaapveld, M., and de Vries, E.G.E. (2002). Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J. Med. Genet.* *39*, 225–242.
- Kallioniemi, O.P., Kallioniemi, A., Kurisu, W., Thor, A., Chen, L.C., Smith, H.S., Waldman, F.M., Pinkel, D., and Gray, J.W. (1992). ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 5321–5325.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* *119*, 1420–1428.
- Kao, J., and Pollack, J.R. (2006a). RNA interference-based functional dissection of the 17q12 amplicon in breast cancer reveals contribution of coamplified genes. *Genes. Chromosomes Cancer* *45*, 761–769.
- Kao, J., and Pollack, J.R. (2006b). RNA interference-based functional dissection of the 17q12 amplicon in breast cancer reveals contribution of coamplified genes. *Genes. Chromosomes Cancer* *45*, 761–769.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* *9*, 1603–1614.
- Kauraniemi, P., Bärlund, M., Monni, O., and Kallioniemi, A. (2001). New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays. *Cancer Res.* *61*, 8235–8240.
- Kauraniemi, P., Kuukasjärvi, T., Sauter, G., and Kallioniemi, A. (2003). Amplification of a 280-kilobase core region at the ERBB2 locus leads to activation of two hypothetical proteins in breast cancer. *Am. J. Pathol.* *163*, 1979–1984.
- Kawakami, H., and Yonesaka, K. (2016). HER3 and its Ligand, Heregulin, as Targets for Cancer Therapy. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* *11*, 267–274.

- Kikuchi, T., Nagata, Y., and Abe, T. (1997). In vitro and in vivo antiproliferative effects of simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on human glioma cells. *J. Neurooncol.* *34*, 233–239.
- Kim, C., Gao, R., Sei, E., Brandt, R., Hartman, J., Hatschek, T., Crosetto, N., Foukakis, T., and Navin, N.E. (2018). Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing. *Cell* *173*, 879-893.e13.
- King, C.R., Kraus, M.H., and Aaronson, S.A. (1985). Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* *229*, 974–976.
- Kishida, T., Kostetskii, I., Zhang, Z., Martinez, F., Liu, P., Walkley, S.U., Dwyer, N.K., Blanchette-Mackie, E.J., Radice, G.L., and Strauss, J.F. (2004). Targeted mutation of the MLN64 START domain causes only modest alterations in cellular sterol metabolism. *J. Biol. Chem.* *279*, 19276–19285.
- Kittaneh, M., Montero, A.J., and Glück, S. (2013). Molecular Profiling for Breast Cancer: A Comprehensive Review. *Biomark. Cancer* *5*, 61–70.
- Kloudova, A., Guengerich, F.P., and Soucek, P. (2017). The role of oxysterols in human cancer. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *28*, 485–496.
- Komati, R., Spadoni, D., Zheng, S., Sridhar, J., Riley, K.E., and Wang, G. (2017). Ligands of Therapeutic Utility for the Liver X Receptors. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* *22*.
- Konan, S., Goussot, V., Desmoulins, I., Lorgis, V., Coutant, C., Fumoleau, P., Beltjens, F., Dalban, C., Lizard, S., and Riedinger, J.-M. (2015). Intérêt clinique du CA 15-3 dans la détection précoce des récurrences de cancer du sein localement avancé. *Bull. Cancer (Paris)* *102*, 834–844.
- Korkut, E., Comaru-Schally, A.M., Schally, A.V., and Plowman, P.N. (1991). LHRH analogues and breast cancer. *Br. J. Cancer* *64*, 1190.
- Kutyavin, V.I., and Chawla, A. (2018). Aster: A New Star in Cholesterol Trafficking. *Cell* *175*, 307–309.
- Kuzu, O.F., Gowda, R., Sharma, A., and Robertson, G.P. (2014). Leelamine mediates cancer cell death through inhibition of intracellular cholesterol transport. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 1690–1703.
- Kuzu, O.F., Noory, M.A., and Robertson, G.P. (2016). The Role of Cholesterol in Cancer. *Cancer Res.* *76*, 2063–2070.
- Kwon, M.J., Kim, R.N., Song, K., Jeon, S., Jeong, H.M., Kim, J.S., Han, J., Hong, S., Oh, E., Choi, J.-S., et al. (2017). Genes co-amplified with ERBB2 or MET as novel potential cancer-promoting genes in gastric cancer. *Oncotarget* *8*, 92209–92226.
- Lacroix-Triki, M., and Penault-Llorca, F. Évaluation des lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) dans les cancers du sein : recommandations internationales 2014. *2*.
- Lamb, Y.N. (2018). SB3 (Ontruzant®): A Trastuzumab Biosimilar. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* *32*, 293–296.
- Lambert, S., Vind-Kezunovic, D., Karvinen, S., and Gniadecki, R. (2006). Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 954–962.
- Lamy, P.-J., Romieu, G., and Jacot, W. (2010). [UPA/PAI-1: a tool for breast cancer treatment individualization. Biology, clinical implications and quantification assays]. *Bull. Cancer (Paris)* *97*, 341–348.
- Lamy, P.-J., Fina, F., Bascoul-Molleivi, C., Laberrenne, A.-C., Martin, P.-M., Ouafik, L., and Jacot, W. (2011). Quantification and clinical relevance of gene amplification at chromosome 17q12-q21 in human epidermal growth factor receptor 2-amplified breast cancers. *Breast Cancer Res. BCR* *13*, R15.

- Lapillo, M., Salis, B., Palazzolo, S., Poli, G., Granchi, C., Minutolo, F., Rotondo, R., Caligiuri, I., Canzonieri, V., Tuccinardi, T., et al. (2019). First-of-its-kind STARD3 Inhibitor: In Silico Identification and Biological Evaluation as Anticancer Agent. *ACS Med. Chem. Lett.* *10*, 475–480.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* *122*, 3589–3594.
- 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.
- Lawson, D.A., Kessenbrock, K., Davis, R.T., Pervolarakis, N., and Werb, Z. (2018). Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nat. Cell Biol.* *20*, 1349–1360.
- Lee, K.F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M.C., and Hauser, C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* *378*, 394–398.
- Lemmon, M.A. (2009). Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp. Cell Res.* *315*, 638–648.
- Leonardi, G.C., Rapisarda, V., Marconi, A., Scalisi, A., Catalano, F., Proietti, L., Travali, S., Libra, M., and Fenga, C. (2012). Correlation of the risk of breast cancer and disruption of the circadian rhythm (Review). *Oncol. Rep.* *28*, 418–428.
- Lev, S. (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 739–750.
- Levine, T. (2004a). Ssd: Sterol-sensing direct. *Dev. Cell* *7*, 152–153.
- Levine, T. (2004b). Short-range intracellular trafficking of small molecules across endoplasmic reticulum junctions. *Trends Cell Biol.* *14*, 483–490.
- Levine, A.J., Momand, J., and Finlay, C.A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* *351*, 453–456.
- Lewis Gary F., and Rader Daniel J. (2005). New Insights Into the Regulation of HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport. *Circ. Res.* *96*, 1221–1232.
- Leyland-Jones, B., and Smith, B.R. (2011). Serum HER2 testing in patients with HER2-positive breast cancer: the death knell tolls. *Lancet Oncol.* *12*, 286–295.
- Li, L., Zhao, G.-D., Shi, Z., Qi, L.-L., Zhou, L.-Y., and Fu, Z.-X. (2016). The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC. *Oncol. Lett.* *12*, 3045–3050.
- Li, Y.C., Park, M.J., Ye, S.-K., Kim, C.-W., and Kim, Y.-N. (2006). Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am. J. Pathol.* *168*, 1107–1118; quiz 1404–1405.
- Lièvre, A., and Laurent-Puig, P. (2010). La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro Dig.* *II*.
- Lim, W.A., and June, C.H. (2017). The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell* *168*, 724–740.
- Lim, R.C.C., Price, J.T., and Wilce, J.A. (2014). Context-dependent role of Grb7 in HER2+ve and triple-negative breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* *143*, 593–603.
- Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J.F., Clark, B.J., Stocco, D.M., Saenger, P., Rogol, A., and Miller, W.L. (1995). Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* *267*, 1828–1831.
- Lin, N.U., Dieras, V., Paul, D., Lossignol, D., Christodoulou, C., Stemmler, H.-J., Roche, H., Liu, M.C., Greil, R., Ciruelos, E., et al. (2009). Multicenter Phase II Study of Lapatinib in Patients with Brain Metastases from HER2-Positive Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* *15*, 1452–1459.

- Liu, S., Lachapelle, J., Leung, S., Gao, D., Foulkes, W.D., and Nielsen, T.O. (2012). CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* *14*, R48.
- Lo Russo, G., Spinelli, G.P., Tomao, S., Rossi, B., Frati, L., Panici, P.B., Vici, P., Codacci Pisanelli, G., and Tomao, F. (2013). Breast cancer risk after exposure to fertility drugs. *Expert Rev. Anticancer Ther.* *13*, 149–157.
- Longva, K.E., Pedersen, N.M., Haslekås, C., Stang, E., and Madshus, I.H. (2005). Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2. *Int. J. Cancer* *116*, 359–367.
- Lopez, F., Belloc, F., Lacombe, F., Dumain, P., Reiffers, J., Bernard, P., and Boisseau, M.R. (1991). Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry* *12*, 42–49.
- Louis, L.M., Lerro, C.C., Friesen, M.C., Andreotti, G., Koutros, S., Sandler, D.P., Blair, A., Robson, M.G., and Beane Freeman, L.E. (2017). A prospective study of cancer risk among Agricultural Health Study farm spouses associated with personal use of organochlorine insecticides. *Environ. Health* *16*.
- Luo, J., Solimini, N.L., and Elledge, S.J. (2009). Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell* *136*, 823–837.
- Luo, J., Yang, H., and Song, B.-L. (2020). Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *21*, 225–245.
- Luporsi, E., André, F., Spyrtos, F., Martin, P.-M., Jacquemier, J., Penault-Llorca, F., Tubiana-Mathieu, N., Sigal-Zafrani, B., Arnould, L., Gompel, A., et al. (2012). Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res. Treat.* *132*, 895–915.
- Ma, Z., Deng, C., Hu, W., Zhou, J., Fan, C., Di, S., Liu, D., Yang, Y., and Wang, D. (2017). Liver X Receptors and their Agonists: Targeting for Cholesterol Homeostasis and Cardiovascular Diseases. *Curr. Issues Mol. Biol.* 41–64.
- Maccio, G., Goussot, V., Berriolo-Riedinger, A., and Riedinger, J.-M. (2017). Clinical value of CEA for detection of distant metastases in newly diagnosed breast cancer: comparison with CA 15-3. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* *75*, 431–441.
- MacMahon, B. (2006). Epidemiology and the causes of breast cancer. *Int. J. Cancer* *118*, 2373–2378.
- Maehama, T., and Dixon, J.E. (1999). PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol.* *9*, 125–128.
- Mahmoud, S.M.A., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Grainge, M.J., Lee, A.H.S., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 1949–1955.
- Mansbach, C.M., and Siddiqi, S.A. (2010). The Biogenesis of Chylomicrons. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 315–333.
- Manthei, K.A., Patra, D., Wilson, C.J., Fawaz, M.V., Piersimoni, L., Shenkar, J.C., Yuan, W., Andrews, P.C., Engen, J.R., Schwendeman, A., et al. (2020). Structural analysis of lecithin:cholesterol acyltransferase bound to high density lipoprotein particles. *Commun. Biol.* *3*, 1–11.
- Margolis, B., and Skolnik, E.Y. (1994). Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *5*, 1288–1299.
- Maric, J., Kiss, R.S., Franklin, V., and Marcel, Y.L. (2005). Intracellular lipidation of newly synthesized apolipoprotein A-I in primary murine hepatocytes. *J. Biol. Chem.* *280*, 39942–39949.
- Marquardt, D., Kučerka, N., Wassall, S.R., Harroun, T.A., and Katsaras, J. (2016). Cholesterol's location in lipid bilayers. *Chem. Phys. Lipids* *199*, 17–25.

- Marques, L.R., Diniz, T.A., Antunes, B.M., Rossi, F.E., Caperuto, E.C., Lira, F.S., and Gonçalves, D.C. (2018). Reverse Cholesterol Transport: Molecular Mechanisms and the Non-medical Approach to Enhance HDL Cholesterol. *Front. Physiol.* *9*.
- Martin, M., Holmes, F.A., Ejlersen, B., Delalage, S., Moy, B., Iwata, H., von Minckwitz, G., Chia, S.K.L., Mansi, J., Barrios, C.H., et al. (2017). Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in HER2-positive breast cancer (ExteNET): 5-year analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *18*, 1688–1700.
- Martin, V., Cappuzzo, F., Mazzucchelli, L., and Frattini, M. (2014). HER2 in solid tumors: more than 10 years under the microscope; where are we now? *Future Oncol. Lond. Engl.* *10*, 1469–1486.
- Martirosyan, A., Clendening, J.W., Goard, C.A., and Penn, L.Z. (2010). Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance. *BMC Cancer* *10*, 103.
- Maruyama, I.N. (2014). Mechanisms of Activation of Receptor Tyrosine Kinases: Monomers or Dimers. *Cells* *3*, 304–330.
- Matsui, A., Ihara, T., Suda, H., Mikami, H., and Semba, K. (2013). Gene amplification: mechanisms and involvement in cancer. *Biomol. Concepts* *4*, 567–582.
- Mattia, T.D., Wilhelm, L.P., Ikhlef, S., Wendling, C., Spehner, D., Nominé, Y., Giordano, F., Mathelin, C., Drin, G., Tomasetto, C., et al. (2018). Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO Rep.* e45453.
- Maxfield, F.R., and Wüstner, D. (2002). Intracellular cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* *110*, 891–898.
- McArthur, H.L., Diab, A., Page, D.B., Yuan, J., Solomon, S.B., Sacchini, V., Comstock, C., Durack, J.C., Maybody, M., Sung, J., et al. (2016). A pilot study of preoperative single-dose ipilimumab and/or cryoablation in women with early-stage breast cancer with comprehensive immune profiling. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *22*, 5729–5737.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2007). ROLES OF THE RAF/MEK/ERK PATHWAY IN CELL GROWTH, MALIGNANT TRANSFORMATION AND DRUG RESISTANCE. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1263–1284.
- McDermott, M., Anderson, L., Shields, L., O'Brien, N., Prendergast, A., Kennedy, S., Gallagher, W., Zagozdzon, R., Byrne, A., Crown, J., et al. (2013). Abstract 5634: Increased co-amplification of HER2 and STARD3 in a cell line model of acquired lapatinib resistance. *Cancer Res.* *73*, 5634–5634.
- McDonnell, D.P., Park, S., Goulet, M.T., Jasper, J., Wardell, S.E., Chang, C.-Y., Norris, J.D., Guyton, J.R., and Nelson, E.R. (2014). Obesity, cholesterol metabolism, and breast cancer pathogenesis. *Cancer Res.* *74*, 4976–4982.
- McMahon, G. (2000). VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *The Oncologist* *5 Suppl 1*, 3–10.
- Meek, D.W. (2015). Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem. J.* *469*, 325–346.
- 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.
- Menegaux, F., Truong, T., Anger, A., Cordina-Duverger, E., Lamkarkach, F., Arveux, P., Kerbrat, P., Févotte, J., and Guénel, P. (2013). Night work and breast cancer: a population-based case-control study in France (the CECILE study). *Int. J. Cancer* *132*, 924–931.
- Merarchi, M., Jung, Y.Y., Fan, L., Sethi, G., and Ahn, K.S. (2019). A Brief Overview of the Antitumoral Actions of Leelamine. *Biomedicines* *7*.
- Mesmin, B., and Antonny, B. (2016). The counterflow transport of sterols and PI4P. *Biochim. Biophys. Acta* *1861*, 940–951.

- Mesmin, B., Pipalia, N.H., Lund, F.W., Ramlall, T.F., Sokolov, A., Eliezer, D., and Maxfield, F.R. (2011). STARD4 abundance regulates sterol transport and sensing. *Mol. Biol. Cell* 22, 4004–4015.
- Mesmin, B., Bigay, J., Polidori, J., Jamecna, D., Lacas-Gervais, S., and Antony, B. (2017). Sterol transfer, PI4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP. *EMBO J.* 36, 3156–3174.
- Mester, J., and Eng, C. (2015). Cowden syndrome: recognizing and managing a not-so-rare hereditary cancer syndrome. *J. Surg. Oncol.* 111, 125–130.
- Miles, D.W., Chan, A., Dirix, L.Y., Cortés, J., Pivot, X., Tomczak, P., Delozier, T., Sohn, J.H., Provencher, L., Puglisi, F., et al. (2010). Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 3239–3247.
- Miller, W.L., and Bose, H.S. (2011). Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J. Lipid Res.* 52, 2111–2135.
- Min, Y., Bae, S.Y., Lee, H.-C., Lee, J.H., Kim, M., Kim, J., Lee, S.K., Kil, W.H., Kim, S.W., Lee, J.E., et al. (2013). Tubular Carcinoma of the Breast: Clinicopathologic Features and Survival Outcome Compared with Ductal Carcinoma In Situ. *J. Breast Cancer* 16, 404–409.
- Mittendorf, E.A., Philips, A.V., Meric-Bernstam, F., Qiao, N., Wu, Y., Harrington, S., Su, X., Wang, Y., Gonzalez-Angulo, A.M., Akcakanat, A., et al. (2014). PD-L1 Expression in Triple Negative Breast Cancer. *Cancer Immunol. Res.* 2, 361–370.
- Moasser, M.M. (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26, 6469–6487.
- Möbius, W., van Donselaar, E., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Heijnen, H.F.G., Slot, J.W., and Geuze, H.J. (2003). Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic Cph. Den.* 4, 222–231.
- Moini, J. (2019). Chapter 5 - Epidemiology of Diet and Diabetes Mellitus. In *Epidemiology of Diabetes*, J. Moini, ed. (Elsevier), pp. 57–73.
- Molina, M.A., Sáez, R., Ramsey, E.E., Garcia-Barchino, M.-J., Rojo, F., Evans, A.J., Albanell, J., Keenan, E.J., Lluch, A., García-Conde, J., et al. (2002). NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 347–353.
- Mollinedo, F., and Gajate, C. (2015). Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv. Biol. Regul.* 57, 130–146.
- 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.
- Moretta, J., Berthet, P., Bonadona, V., Caron, O., Cohen-Haguenaer, O., Colas, C., Corsini, C., Cusin, V., De Pauw, A., Delnatte, C., et al. (2018). [The French Genetic and Cancer Consortium guidelines for multigene panel analysis in hereditary breast and ovarian cancer predisposition]. *Bull. Cancer (Paris)* 105, 907–917.
- Morgan, R.A., Yang, J.C., Kitano, M., Dudley, M.E., Laurencot, C.M., and Rosenberg, S.A. (2010). Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2. *Mol. Ther.* 18, 843–851.
- Moulin, P. (1995). La protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP). *Sang Thromb. Vaiss.* 7, 475–486.
- Munsell, M.F., Sprague, B.L., Berry, D.A., Chisholm, G., and Trentham-Dietz, A. (2014). Body Mass Index and Breast Cancer Risk According to Postmenopausal Estrogen-Progestin Use and Hormone Receptor Status. *Epidemiol. Rev.* 36, 114–136.

- Murtola, T.J., Visvanathan, K., Artama, M., Vainio, H., and Pukkala, E. (2014). Statin use and breast cancer survival: a nationwide cohort study from Finland. *PLoS One* *9*, e110231.
- Nagata, Y., Lan, K.-H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F.J., Sahin, A.A., Klos, K.S., Li, P., Monia, B.P., Nguyen, N.T., et al. (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* *6*, 117–127.
- Nagy, J.A., Benjamin, L., Zeng, H., Dvorak, A.M., and Dvorak, H.F. (2008). Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* *11*, 109–119.
- Nagy, P., Vereb, G., Sebestyén, Z., Horváth, G., Lockett, S.J., Damjanovich, S., Park, J.W., Jovin, T.M., and Szölloosi, J. (2002). Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J. Cell Sci.* *115*, 4251–4262.
- Nahta, R., Yuan, L.X.H., Zhang, B., Kobayashi, R., and Esteva, F.J. (2005). Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res.* *65*, 11118–11128.
- Najafi-Shoushtari, S.H., Kristo, F., Li, Y., Shioda, T., Cohen, D.E., Gerszten, R.E., and Näär, A.M. (2010). MicroRNA-33 and the SREBP Host Genes Cooperate to Control Cholesterol Homeostasis. *Science* *328*.
- Nanda, R., Chow, L.Q.M., Dees, E.C., Berger, R., Gupta, S., Geva, R., Pusztai, L., Pathiraja, K., Aktan, G., Cheng, J.D., et al. (2016). Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *34*, 2460–2467.
- Narayan, M., Wilken, J.A., Harris, L.N., Baron, A.T., Kimbler, K.D., and Maihle, N.J. (2009). Trastuzumab-induced HER reprogramming in “resistant” breast carcinoma cells. *Cancer Res.* *69*, 2191–2194.
- Nassar, A., Khor, A., Radhakrishnan, R., Radhakrishnan, A., and Cohen, C. (2014). Correlation of HER2 overexpression with gene amplification and its relation to chromosome 17 aneuploidy: a 5-year experience with invasive ductal and lobular carcinomas. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *7*, 6254–6261.
- Navin, N., Kendall, J., Troge, J., Andrews, P., Rodgers, L., McIndoo, J., Cook, K., Stepansky, A., Levy, D., Eposito, D., et al. (2011). Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* *472*, 90–94.
- Negro, A., Brar, B.K., and Lee, K.-F. (2004). Essential roles of Her2/erbB2 in cardiac development and function. *Recent Prog. Horm. Res.* *59*, 1–12.
- Nicolini, A., Ferrari, P., and Duffy, M.J. (2018). Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. *Semin. Cancer Biol.* *52*, 56–73.
- Nielsen, S.F., Nordestgaard, B.G., and Bojesen, S.E. (2012). Statin Use and Reduced Cancer-Related Mortality. *N. Engl. J. Med.* *367*, 1792–1802.
- Nielsen, T.O., Parker, J.S., Leung, S., Voduc, D., Ebbert, M., Vickery, T., Davies, S.R., Snider, J., Stijleman, I.J., Reed, J., et al. (2010). A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 5222–5232.
- Nofech-Mozes, S., Vella, E.T., Dhesy-Thind, S., Hagerty, K.L., Mangu, P.B., Temin, S., and Hanna, W.M. (2012). Systematic review on hormone receptor testing in breast cancer. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* *20*, 214–263.
- O’Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., and Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* *9*.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* *19*, 3159–3167.

- Orr, G., Hu, D., Ozçelik, S., Opreško, L.K., Wiley, H.S., and Colson, S.D. (2005). Cholesterol dictates the freedom of EGF receptors and HER2 in the plane of the membrane. *Biophys. J.* *89*, 1362–1373.
- Orsetti, B., Nugoli, M., Cervera, N., Lasorsa, L., Chuchana, P., Ursule, L., Nguyen, C., Redon, R., du Manoir, S., Rodriguez, C., et al. (2004). Genomic and expression profiling of chromosome 17 in breast cancer reveals complex patterns of alterations and novel candidate genes. *Cancer Res.* *64*, 6453–6460.
- Pagler, T.A., Rhode, S., Neuhofer, A., Laggner, H., Strobl, W., Hinterndorfer, C., Volf, I., Pavelka, M., Eckhardt, E.R.M., van der Westhuyzen, D.R., et al. (2006). SR-BI-mediated high density lipoprotein (HDL) endocytosis leads to HDL resecretion facilitating cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* *281*, 11193–11204.
- Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., Baehner, F.L., Walker, M.G., Watson, D., Park, T., et al. (2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *351*, 2817–2826.
- Pannu, P.S., Allahverdian, S., and Francis, G.A. (2013). Oxysterol generation and liver X receptor-dependent reverse cholesterol transport: not all roads lead to Rome. *Mol. Cell. Endocrinol.* *368*, 99–107.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 252–264.
- Park, I., Kim, J., Kim, M., Bae, S.Y., Lee, S.K., Kil, W.H., Lee, J.E., and Nam, S.J. (2013). Comparison of the Characteristics of Medullary Breast Carcinoma and Invasive Ductal Carcinoma. *J. Breast Cancer* *16*, 417–425.
- Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C.U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., et al. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 1160–1167.
- Parton, R.G., Del Pozo, M.A., Vassilopoulos, S., Nabi, I.R., Le Lay, S., Lundmark, R., Kenworthy, A.K., Camus, A., Blouin, C.M., Sessa, W.C., et al. (2020). Caveolae: The FAQs. *Traffic Cph. Den.* *21*, 181–185.
- Pedersen, N.M., Madshus, I.H., Haslekås, C., and Stang, E. (2008). Geldanamycin-induced down-regulation of ErbB2 from the plasma membrane is clathrin dependent but proteasomal activity independent. *Mol. Cancer Res. MCR* *6*, 491–500.
- Penault-Llorca, F. (2014a). [Breast cancer classification is evolving]. *Biol. Aujourd'hui* *208*, 251–259.
- Penault-Llorca, F. (2014b). Les signatures moléculaires dans le -cancer du sein : le point de vue du pathologiste. *Mis E Au Point* *4*.
- Penault-Llorca, F., Vincent-Salomon, A., MacGrogan, G., Roger, P., Treilleux, I., Valent, A., Mathieu, M.-C., Antoine, M., Becette, V., Bor, C., et al. (2014). [2014 update of the GEPICs' recommendations for HER2 status determination in breast cancers in France]. *Ann. Pathol.* *34*, 352–365.
- Pereira, P.M.R., Sharma, S.K., Carter, L.M., Edwards, K.J., Pourat, J., Ragupathi, A., Janjigian, Y.Y., Durack, J.C., and Lewis, J.S. (2018). Caveolin-1 mediates cellular distribution of HER2 and affects trastuzumab binding and therapeutic efficacy. *Nat. Commun.* *9*, 5137.
- Peretti, D., Kim, S., Tufi, R., and Lev, S. (2019). Lipid Transfer Proteins and Membrane Contact Sites in Human Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* *7*, 371.
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747–752.
- Perrier, A., Gligorov, J., Lefèvre, G., and Boissan, M. (2018). The extracellular domain of Her2 in serum as a biomarker of breast cancer. *Lab. Invest.* *1*.
- Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O.M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G.M., and Mazoyer, S. (2002). The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 2805–2814.

- Petricevic, B., Laengle, J., Singer, J., Sachet, M., Fazekas, J., Steger, G., Bartsch, R., Jensen-Jarolim, E., and Bergmann, M. (2013). Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients. *J. Transl. Med.* *11*, 307.
- Pickup, M.W., Mouw, J.K., and Weaver, V.M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* *15*, 1243–1253.
- Pike, L.J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* *47*, 1597–1598.
- Pike, L.J., and Casey, L. (2002). Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 10315–10322.
- Pillay, J., and Davis, T.J. (2018). Physiology, Lactation. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Pohlmann, P.R., Mayer, I.A., and Mernaugh, R. (2009). Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 7479–7491.
- Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J.R., Chung, Y.-L., and Schulze, A. (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* *8*, 224–236.
- Porter, K.R. (1953). Observations on a submicroscopic basophilic component of cytoplasm. *J. Exp. Med.* *97*, 727–750.
- Pradip, D., Bouzyk, M., Dey, N., and Leyland-Jones, B. (2013). Dissecting GRB7-mediated signals for proliferation and migration in HER2 overexpressing breast tumor cells: GTP-ase rules. *Am. J. Cancer Res.* *3*, 173–195.
- Press, M.F., Cordon-Cardo, C., and Slamon, D.J. (1990). Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* *5*, 953–962.
- Prinz, W.A. (2014). Bridging the gap: membrane contact sites in signaling, metabolism, and organelle dynamics. *J. Cell Biol.* *205*, 759–769.
- Puglisi, F., Fontanella, C., Amoroso, V., Bianchi, G.V., Bisagni, G., Falci, C., Fontana, A., Generali, D., Gianni, L., Grassadonia, A., et al. (2016). Current challenges in HER2-positive breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *98*, 211–221.
- Qureshi, A., and Pervez, S. (2010). Allred scoring for ER reporting and its impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancers. *JPMA J. Pak. Med. Assoc.* *60*, 350–353.
- Rader, D.J., Alexander, E.T., Weibel, G.L., Billheimer, J., and Rothblat, G.H. (2009). The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S189-194.
- Radhakrishnan, A., Sun, L.-P., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2004). Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol. Cell* *15*, 259–268.
- Rakha, E.A., Ahmed, M.A., and Ellis, I.O. (2016). Papillary carcinoma of the breast: diagnostic agreement and management implications. *Histopathology* *69*, 862–870.
- Ravnskov, U., Rosch, P.J., and McCully, K.S. (2015). Statins do not protect against cancer: quite the opposite. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 810–811.
- Rawlings, J.S., Rosler, K.M., and Harrison, D.A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* *117*, 1281–1283.

- Reix, N., Malina, C., Chenard, M.-P., Bellocq, J.-P., Delpous, S., Molière, S., Sevrin, A., Neuberger, K., Tomasetto, C., and Mathelin, C. (2016). A prospective study to assess the clinical utility of serum HER2 extracellular domain in breast cancer with HER2 overexpression. *Breast Cancer Res. Treat.* *160*, 249–259.
- Rexer, B.N., Ham, A.-J.L., Rinehart, C., Hill, S., Granja-Ingram, N. de M., González-Angulo, A.M., Mills, G.B., Dave, B., Chang, J.C., Liebler, D.C., et al. (2011). Phosphoproteomic mass spectrometry profiling links Src family kinases to escape from HER2 tyrosine kinase inhibition. *Oncogene* *30*, 4163–4174.
- Riccio, G., Coppola, C., Piscopo, G., Capasso, I., Maurea, C., Esposito, E., De Lorenzo, C., and Maurea, N. (2016). Trastuzumab and target-therapy side effects: Is still valid to differentiate anthracycline Type I from Type II cardiomyopathies? *Hum. Vaccines Immunother.* *12*, 1124–1131.
- Ridgway, N.D., and Zhao, K. (2018). Cholesterol transfer at endosomal-organelle membrane contact sites. *Curr. Opin. Lipidol.* *29*, 212–217.
- Riedinger, J.-M., Goussot, V., Desmoulins, I., Lorgis, V., Coutant, C., Beltjens, F., Lizard, S., and Fumoleau, P. (2016). [CEA and early detection of relapse in breast cancer subtypes: Comparison with CA 15-3]. *Bull. Cancer (Paris)* *103*, 434–443.
- Riganti, C., Pinto, H., Bolli, E., Belisario, D.C., Calogero, R.A., Bosia, A., and Cavallo, F. (2011). Atorvastatin modulates anti-proliferative and pro-proliferative signals in Her2/neu-positive mammary cancer. *Biochem. Pharmacol.* *82*, 1079–1089.
- Riscal, R., Skuli, N., and Simon, M.C. (2019). Even Cancer Cells Watch Their Cholesterol! *Mol. Cell* *76*, 220–231.
- Ritter, C.A., Perez-Torres, M., Rinehart, C., Guix, M., Dugger, T., Engelman, J.A., and Arteaga, C.L. (2007). Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 4909–4919.
- Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S.M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., et al. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N. Engl. J. Med.* *377*, 523–533.
- Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Davidson, N.E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P.A., et al. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *353*, 1673–1684.
- Roskoski, R. (2015). Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* *94*, 9–25.
- Rouëssé, J., Sancho-Garnier, H., and members de la commission III (Cancérologie) (2014). [Organized breast cancer screening]. *Bull. Acad. Natl. Med.* *198*, 369–386.
- Roy, R., Chun, J., and Powell, S.N. (2011). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 68–78.
- Rozenberg, S., Vandromme, J., and Antoine, C. (2013). Postmenopausal hormone therapy: risks and benefits. *Nat. Rev. Endocrinol.* *9*, 216–227.
- Rugo, H.S., Delord, J.-P., Im, S.-A., Ott, P.A., Piha-Paul, S.A., Bedard, P.L., Sachdev, J., Tourneau, C.L., Brummelen, E. van, Varga, A., et al. (2016). Abstract S5-07: Preliminary efficacy and safety of pembrolizumab (MK-3475) in patients with PD-L1-positive, estrogen receptor-positive (ER+)/HER2-negative advanced breast cancer enrolled in KEYNOTE-028. *Cancer Res.* *76*, S5-07-S5-07.
- Rugo, H.S., Diéras, V., Gelmon, K.A., Finn, R.S., Slamon, D.J., Martin, M., Neven, P., Shparyk, Y., Mori, A., Lu, D.R., et al. (2018). Impact of palbociclib plus letrozole on patient-reported health-related quality of life: results from the PALOMA-2 trial. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *29*, 888–894.

- Saheki, Y., and De Camilli, P. (2017). Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Contact Sites. *Annu. Rev. Biochem.* *86*, 659–684.
- Sahlberg, K.K., Hongisto, V., Edgren, H., Mäkelä, R., Hellström, K., Due, E.U., Moen Vollan, H.K., Sahlberg, N., Wolf, M., Børresen-Dale, A.-L., et al. (2013a). The HER2 amplicon includes several genes required for the growth and survival of HER2 positive breast cancer cells. *Mol. Oncol.* *7*, 392–401.
- Sahlberg, K.K., Hongisto, V., Edgren, H., Mäkelä, R., Hellström, K., Due, E.U., Moen Vollan, H.K., Sahlberg, N., Wolf, M., Børresen-Dale, A.-L., et al. (2013b). The HER2 amplicon includes several genes required for the growth and survival of HER2 positive breast cancer cells. *Mol. Oncol.* *7*, 392–401.
- Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F.L., Penault-Llorca, F., et al. (2015a). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann. Oncol.* *26*, 259–271.
- Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F.L., Penault-Llorca, F., et al. (2015b). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *26*, 259–271.
- Salminen, T.A., Blomqvist, K., and Edqvist, J. (2016). Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. *Planta* *244*, 971–997.
- Sandhu, J., Li, S., Fairall, L., Pfisterer, S.G., Gurnett, J.E., Xiao, X., Weston, T.A., Vashi, D., Ferrari, A., Orozco, J.L., et al. (2018). Aster Proteins Facilitate Nonvesicular Plasma Membrane to ER Cholesterol Transport in Mammalian Cells. *Cell* *175*, 514-529.e20.
- Sato, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1993). Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 9261–9265.
- Savas, P., Salgado, R., Denkert, C., Sotiriou, C., Darcy, P.K., Smyth, M.J., and Loi, S. (2016). Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *13*, 228–241.
- Scaltriti, M., Nuciforo, P., Bradbury, I., Sperinde, J., Agbor-Tarh, D., Campbell, C., Chenna, A., Winslow, J., Serra, V., Parra, J.L., et al. (2015). High HER2 Expression Correlates with Response to the Combination of Lapatinib and Trastuzumab. *Clin. Cancer Res.* *21*, 569–576.
- Schechter, A.L., Hung, M.C., Vaidyanathan, L., Weinberg, R.A., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Ullrich, A., and Coussens, L. (1985). The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* *229*, 976–978.
- Schedin, P., and Hovey, R.C. (2010). Editorial: The Mammary Stroma in Normal Development and Function. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *15*, 275–277.
- Schlienger, J.-L. (2012). The edifying cholesterol story from “gall stone” to the LDL receptor. *Med. Mal. Metab.* *6*, 97–103.
- Schmitz, G., and Kaminski, W.E. (2001). ABC transporters and cholesterol metabolism. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *6*, D505-514.
- Segovia-Mendoza, M., González-González, M.E., Barrera, D., Díaz, L., and García-Becerra, R. (2015). 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. *Am. J. Cancer Res.* *5*, 2531–2561.
- Sehrawat, A., Kim, S.-H., Hahm, E.-R., Arlotti, J.A., Eiseman, J., Shiva, S.S., Rigatti, L.H., and Singh, S.V. (2017). Cancer-selective death of human breast cancer cells by leelamine is mediated by bax and bak activation. *Mol. Carcinog.* *56*, 337–348.

- Seo, A.N., Lee, H.J., Kim, E.J., Kim, H.J., Jang, M.H., Lee, H.E., Kim, Y.J., Kim, J.H., and Park, S.Y. (2013). Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br. J. Cancer* *109*, 2705–2713.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., and Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 283–296.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* *439*, 84–88.
- Shannon, K.M., and Chittenden, A. (2012a). Genetic Testing by Cancer Site. *Cancer J.* *18*, 310–319.
- Shannon, K.M., and Chittenden, A. (2012b). Genetic Testing by Cancer Site: Breast. *Cancer J.* *18*, 310–319.
- Shattuck, D.L., Miller, J.K., Carraway, K.L., and Sweeney, C. (2008). Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res.* *68*, 1471–1477.
- Shaul, Y.D., and Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1773*, 1213–1226.
- Shibuya, M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis. *Genes Cancer* *2*, 1097–1105.
- Shih, C., Padhy, L.C., Murray, M., and Weinberg, R.A. (1981). Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* *290*, 261–264.
- Silvius, J.R. (2003). Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1610*, 174–183.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 31–39.
- Singh, B., Carpenter, G., and Coffey, R.J. (2016). EGF receptor ligands: recent advances. *F1000Research* *5*.
- Singh, K.B., Ji, X., and Singh, S.V. (2018). Therapeutic Potential of Leelamine, a Novel Inhibitor of Androgen Receptor and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Mol. Cancer Ther.* *17*, 2079–2090.
- Sini, V., Cassano, A., Corsi, D., De Laurentiis, M., Gamucci, T., Mauri, M., Naso, G., Roselli, M., Ruggeri, E.M., Tonini, G., et al. (2016). Bevacizumab as first-line treatment in HER2-negative advanced breast cancer: pros and cons. *Tumori* *102*, 472–480.
- Siow, Z.R., De Boer, R.H., Lindeman, G.J., and Mann, G.B. (2018). Spotlight on the utility of the Oncotype DX® breast cancer assay. *Int. J. Womens Health* *10*, 89–100.
- Sircoulomb, F., Bekhouche, I., Finetti, P., Adélaïde, J., Ben Hamida, A., Bonansea, J., Raynaud, S., Innocenti, C., Charafe-Jauffret, E., Tarpin, C., et al. (2010). Genome profiling of ERBB2-amplified breast cancers. *BMC Cancer* *10*, 539.
- Sjögren, S., Inganäs, M., Lindgren, A., Holmberg, L., and Bergh, J. (1998). Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *16*, 462–469.
- Slamon, D.J., and Clark, G.M. (1988). Amplification of c-erbB-2 and aggressive human breast tumors? *Science* *240*, 1795–1798.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* *235*, 177–182.
- Smith, G.H. (2005). Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 681–687.

- Soccio, R.E., Adams, R.M., Maxwell, K.N., and Breslow, J.L. (2005). Differential gene regulation of StarD4 and StarD5 cholesterol transfer proteins. Activation of StarD4 by sterol regulatory element-binding protein-2 and StarD5 by endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* *280*, 19410–19418.
- Song, B.-L., Javitt, N.B., and DeBose-Boyd, R.A. (2005). Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab.* *1*, 179–189.
- Sperduto, P.W., Kased, N., Roberge, D., Chao, S.T., Shanley, R., Luo, X., Sneed, P.K., Suh, J., Weil, R.J., Jensen, A.W., et al. (2013). The effect of tumor subtype on the time from primary diagnosis to development of brain metastases and survival in patients with breast cancer. *J. Neurooncol.* *112*, 467–472.
- Staaf, J., Jönsson, G., Ringnér, M., Vallon-Christersson, J., Grabau, D., Arason, A., Gunnarsson, H., Agnarsson, B.A., Malmström, P.-O., Johannsson, O.T., et al. (2010). High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in HER2-amplified breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* *12*, R25.
- Stancu, C., and Sima, A. (2001). Statins: mechanism of action and effects. *J. Cell. Mol. Med.* *5*, 378–387.
- Stanton, S.E., and Disis, M.L. (2016). Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J. Immunother. Cancer* *4*, 59.
- Stein, H. (2007). [The grading of invasive breast cancer according to Elston and Ellis]. *Pathol.* *28*, 307.
- Stein, D., Wu, J., Fuqua, S.A., Roonprapunt, C., Yajnik, V., D'Eustachio, P., Moskow, J.J., Buchberg, A.M., Osborne, C.K., and Margolis, B. (1994). The SH2 domain protein GRB-7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER2 in breast cancer. *EMBO J.* *13*, 1331–1340.
- Stephens, P., Hunter, C., Bignell, G., Edkins, S., Davies, H., Teague, J., Stevens, C., O'Meara, S., Smith, R., Parker, A., et al. (2004). Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* *431*, 525–526.
- Stocker, A., Hilbers, M.-L., Gauthier, C., Grogg, J., Kullak-Ublick, G.A., Seifert, B., Varga, Z., and Trojan, A. (2016). HER2/CEP17 Ratios and Clinical Outcome in HER2-Positive Early Breast Cancer Undergoing Trastuzumab-Containing Therapy. *PloS One* *11*, e0159176.
- Stroes, E.S., Thompson, P.D., Corsini, A., Vladutiu, G.D., Raal, F.J., Ray, K.K., Roden, M., Stein, E., Tokgözoğlu, L., Nordestgaard, B.G., et al. (2015). Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *Eur. Heart J.* *36*, 1012–1022.
- Sun, L.-P., Li, L., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2005). Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* *280*, 26483–26490.
- Swinnen, J.V., Brusselmans, K., and Verhoeven, G. (2006). Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *9*, 358–365.
- Tada, H., Kawashiri, M., Ohtani, R., Noguchi, T., Nakanishi, C., Konno, T., Hayashi, K., Nohara, A., Inazu, A., Kobayashi, J., et al. (2011). A novel type of familial hypercholesterolemia: Double heterozygous mutations in LDL receptor and LDL receptor adaptor protein 1 gene. *Atherosclerosis* *219*, 663–666.
- Tang, X., Huang, Y., Lei, J., Luo, H., and Zhu, X. (2019). The single-cell sequencing: new developments and medical applications. *Cell Biosci.* *9*, 53.
- Tartter, P.I., Papatestas, A.E., Ioannovich, J., Mulvihill, M.N., Lesnick, G., and Aufses, A.H. (1981). Cholesterol and obesity as prognostic factors in breast cancer. *Cancer* *47*, 2222–2227.
- The Lancet, null (2017). Breast cancer targeted therapy: successes and challenges. *Lancet Lond. Engl.* *389*, 2350.
- Thompson, E., Taube, J.M., Elwood, H., Sharma, R., Meeker, A., Warzecha, H.N., Argani, P., Cimino-Mathews, A., and Emens, L.A. (2016). The immune microenvironment of breast ductal carcinoma in situ. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *29*, 249–258.

- Thyssel, E., Surowiec, I., Hörnberg, E., Crnalic, S., Widmark, A., Johansson, A.I., Stattin, P., Bergh, A., Moritz, T., Antti, H., et al. (2010). Metabolomic characterization of human prostate cancer bone metastases reveals increased levels of cholesterol. *PLoS One* 5, e14175.
- Tian, S., Roepman, P., Van't Veer, L.J., Bernard, R., de Snoo, F., and Glas, A.M. (2010). Biological functions of the genes in the mammaprint breast cancer profile reflect the hallmarks of cancer. *Biomark. Insights* 5, 129–138.
- Tikhomirov, O., and Carpenter, G. (2000). Geldanamycin Induces ErbB-2 Degradation by Proteolytic Fragmentation. *J. Biol. Chem.* 275, 26625–26631.
- 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.
- Tontonoz, P., and Mangelsdorf, D.J. (2003). Liver X Receptor Signaling Pathways in Cardiovascular Disease. *Mol. Endocrinol.* 17, 985–993.
- Tonyali, O., Coskun, U., Yuksel, S., Inanc, M., Bal, O., Akman, T., Yazilitas, D., Ulas, A., Kucukoner, M., Aksoy, A., et al. (2016). Risk factors for brain metastasis as a first site of disease recurrence in patients with HER2 positive early stage breast cancer treated with adjuvant trastuzumab. *Breast Edinb. Scotl.* 25, 22–26.
- Tremont, A., Lu, J., and Cole, J.T. (2017). Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review. *Ochsner J.* 17, 405–411.
- Trichopoulos, D., MacMahon, B., and Cole, P. (1972). Menopause and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 48, 605–613.
- Trowe, T., Boukouvala, S., Calkins, K., Cutler, R.E., Fong, R., Funke, R., Gendreau, S.B., Kim, Y.D., Miller, N., Woolfrey, J.R., et al. (2008). EXEL-7647 inhibits mutant forms of ErbB2 associated with lapatinib resistance and neoplastic transformation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 2465–2475.
- Uittenbogaard, A., and Smart, E.J. (2000). Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J. Biol. Chem.* 275, 25595–25599.
- Ulloth, J.E., Almaguel, F.G., Padilla, A., Bu, L., Liu, J.-W., and De Leon, M. (2007). Characterization of methyl-beta-cyclodextrin toxicity in NGF-differentiated PC12 cell death. *Neurotoxicology* 28, 613–621.
- Ulven, S.M., Dalen, K.T., Gustafsson, J.-Å., and Nebb, H.I. (2005). LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 73, 59–63.
- Vasconcelos, I., Hussainzada, A., Berger, S., Fietze, E., Linke, J., Siedentopf, F., and Schoenegg, W. (2016). The St. Gallen surrogate classification for breast cancer subtypes successfully predicts tumor presenting features, nodal involvement, recurrence patterns and disease free survival. *Breast Edinb. Scotl.* 29, 181–185.
- Vassilev, B., Sihto, H., Li, S., Hölttä-Vuori, M., Ilola, J., Lundin, J., Isola, J., Kellokumpu-Lehtinen, P.-L., Joensuu, H., and Ikonen, E. (2015). Elevated levels of StAR-related lipid transfer protein 3 alter cholesterol balance and adhesiveness of breast cancer cells: potential mechanisms contributing to progression of HER2-positive breast cancers. *Am. J. Pathol.* 185, 987–1000.
- Venter, D.J., Tuzi, N.L., Kumar, S., and Gullick, W.J. (1987). Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet Lond. Engl.* 2, 69–72.
- Viale, G., Regan, M.M., Maiorano, E., Mastropasqua, M.G., Dell'Orto, P., Rasmussen, B.B., Raffoul, J., Neven, P., Orosz, Z., Braye, S., et al. (2007). Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 3846–3852.
- Vinatzer, U., Dampier, B., Streubel, B., Pacher, M., Seewald, M.J., 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. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 8348–8357.

Visvader, J.E., and Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev.* *28*, 1143–1158.

Voilquin, L., Lodi, M., Di Mattia, T., Chenard, M.-P., Mathelin, C., Alpy, F., and Tomasetto, C. (2019). STARD3: A Swiss Army Knife for Intracellular Cholesterol Transport. *Contact* *2*, 251525641985673.

Völker, H.-U., Weigel, M., Strehl, A., and Frey, L. (2018). Levels of uPA and PAI-1 in breast cancer and its correlation to Ki67-index and results of a 21-multigene-array. *Diagn. Pathol.* *13*, 67.

Vonderheide, R.H., LoRusso, P.M., Khalil, M., Gartner, E.M., Khaira, D., Soulieres, D., Dorazio, P., Trosko, J.A., Rüter, J., Mariani, G.L., et al. (2010). Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 3485–3494.

Vonderheide, R.H., Domchek, S.M., and Clark, A.S. (2017). Immunotherapy for Breast Cancer: What Are We Missing? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *23*, 2640–2646.

Wan, P.T.C., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Project, C.G., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., et al. (2004). Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* *116*, 855–867.

Wang, T., Xu, Y., Sheng, S., Yuan, H., Ouyang, T., Li, J., Wang, T., Fan, Z., Fan, T., Lin, B., et al. (2017). HER2 somatic mutations are associated with poor survival in HER2-negative breast cancers. *Cancer Sci.* *108*, 671–677.

Wang, Y., Waters, J., Leung, M.L., Unruh, A., Roh, W., Shi, X., Chen, K., Scheet, P., Vattathil, S., Liang, H., et al. (2014). Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature* *512*, 155–160.

Weigelt, B., Horlings, H.M., Kreike, B., Hayes, M.M., Hauptmann, M., Wessels, L.F.A., de Jong, D., Van de Vijver, M.J., Van't Veer, L.J., and Peterse, J.L. (2008). Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J. Pathol.* *216*, 141–150.

Weinstein, I.B. (2002). Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* *297*, 63–64.

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

Wong, L.H., Čopič, A., and Levine, T.P. (2017). Advances on the Transfer of Lipids by Lipid Transfer Proteins. *Trends Biochem. Sci.* *42*, 516–530.

Wong, W.W.L., Dimitroulakos, J., Minden, M.D., and Penn, L.Z. (2002). HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* *16*, 508–519.

Wu, Q., Ishikawa, T., Sirianni, R., Tang, H., McDonald, J.G., Yuhanna, I.S., Thompson, B., Girard, L., Mineo, C., Brekken, R.A., et al. (2013). 27-Hydroxycholesterol Promotes Cell-Autonomous, ER-Positive Breast Cancer Growth. *Cell Rep.* *5*, 637–645.

Xuan, Q., Ji, H., Tao, X., Xu, Y., and Zhang, Q. (2015). Quantitative assessment of HER2 amplification in HER2-positive breast cancer: its association with clinical outcomes. *Breast Cancer Res. Treat.* *150*, 581–588.

Yaghjian, L., and Colditz, G.A. (2011). Estrogens in the breast tissue: a systematic review. *Cancer Causes Control* *CCC* *22*, 529–540.

Yamaguchi, R., Perkins, G., and Hirota, K. (2015). Targeting cholesterol with β -cyclodextrin sensitizes cancer cells for apoptosis. *FEBS Lett.* *589*, 4097–4105.

Yang, C., McDonald, J.G., Patel, A., Zhang, Y., Umetani, M., Xu, F., Westover, E.J., Covey, D.F., Mangelsdorf, D.J., Cohen, J.C., et al. (2006). Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J. Biol. Chem.* *281*, 27816–27826.

Yang, J., Wang, L., and Jia, R. (2020). Role of de novo cholesterol synthesis enzymes in cancer. *J. Cancer* *11*, 1761–1767.

Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 127–137.

Yue, S., Li, J., Lee, S.-Y., Lee, H.J., Shao, T., Song, B., Cheng, L., Masterson, T.A., Liu, X., Ratliff, T.L., et al. (2014). Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell Metab.* *19*, 393–406.

Zare, S.Y., Lin, L., Alghamdi, A.G., Daehne, S., Roma, A.A., Hasteh, F., Dell'Aquila, M., and Fadare, O. (2018). Breast cancers with HER2/CEP17 ratio ≥ 2.0 and an average HER2 copy number <4.0 per cell: frequency, Immunohistochemical correlation, and Clinicopathologic features. *Hum. Pathol.*

Zhang, J., and Powell, S.N. (2005). The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. *Mol. Cancer Res. MCR* *3*, 531–539.

Zheng, P.-P., Kros, J.M., and Li, J. (2018). Approved CAR T cell therapies: ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. *Drug Discov. Today* *23*, 1175–1182.

ANNEXES

MATERIELS ET METHODES COMPLEMENTAIRES

Test de prolifération

Deux jours après transfection avec les siARNs, les cellules HCC1954 sont comptées et mises en culture en triplicat dans une plaque 96 puits (5000 cellules par puits). Après 24 heures de culture à 37°C, les cellules sont lavées au TBS 1X puis fixées pendant 10 minutes avec du PBS 1X contenant 4% de paraformaldéhyde. Après perméabilisation pendant 15 minutes dans du PBS 1X contenant 0.1% de Triton X-100, les sites non spécifiques sont saturés par une incubation de 30 minutes dans du TBS 1X contenant 1% de BSA. Les cellules sont ensuite incubées 2 heures à température ambiante avec l'anticorps primaire de lapin anti-phospho-histone 3 (Ser10, Cell Signaling #3377) dilué au 1/1000^{ème} dans du TBS 1X contenant 1% de BSA. Après lavage dans du TBS 1X, les cellules sont incubées une heure avec l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa-488 dilué au 1/1000^{ème} dans du TBS 1X. Les cellules sont lavées et les noyaux sont marqués pendant 2 minutes au Hoechst-33258 dilué au 1/1000^{ème} dans du TBS 1X. Les puits sont ensuite imagés à l'aide de l'appareil CellInsight de Cellomics (ThermoScientific) et le pourcentage de cellules positives est quantifié grâce au logiciel HCSStudio.

Apoptose

Un kit de détection de l'apoptose a été utilisé (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences). Après 96 heures de transfection avec les siARNs, le milieu des cellules est récupéré et les cellules HCC1954 sont décollées à l'acutase. Après deux lavages dans du PBS froid, les cellules sont incubées pendant 15 minutes dans 100 µL de tampon 1X (0.1 M HEPES/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) contenant 5 µL d'annexin V-FITC et 5 µL d'iodure de propidium. Des cellules non marquées et des cellules traitées pendant 24 heures avec du lapatinib (5 µM) sont utilisés respectivement comme contrôles négatif et positif de l'apoptose. Le pourcentage de cellules apoptotiques est analysé par cytométrie en flux (FACS Celesta BD biosciences) et quantifié grâce au logiciel FlowJo.

Analyse du cycle cellulaire

Après 72 heures de transfection avec les siARNs, les cellules HCC1954 sont décollées à la trypsine, centrifugées (1000 rpm, 5 minutes) et resuspendues dans 1 mL de PBS froid pour 1 million de cellules. De l'éthanol 95 % est ajouté goutte à goutte en mélangeant gentiment afin d'obtenir une concentration finale d'éthanol de 70 %. Les cellules sont fixées à 4°C sur la nuit.

Le lendemain, les cellules sont lavées au PBS 1X et incubées pendant 30 minutes dans 1 mL de PBS 1X (pour 1 million de cellules) contenant 100 µg/mL de RNase et 15 µg/mL d'iodure de propidium. Le cycle cellulaire est ensuite analysé par cytométrie en flux (FACS Celesta BD biosciences) et quantifié grâce au logiciel FlowJo.

Migration cellulaire

Après 72 heures de transfection avec les siARNs, les cellules HCC1954 sont comptées etensemencées à raison de 50 000 cellules par chambre de Boyden dans 200 µL de milieu sans sérum et supplémenté avec 0.2 % de BSA. Chaque chambre de Boyden est placée dans un puits d'une plaque 24 puits contenant 800 µL de milieu supplémenté avec 10 % de sérum et 2 % de BSA. Les cellules sont incubées pendant 6 heures à 37°C puis elles sont lavées au PBS 1X, fixées à l'éthanol pendant 20 minutes et colorées au Hoechst-33258 pendant 5 minutes. Après deux lavages au PBS 1X, les cellules de la face supérieure des chambres de Boyden sont enlevées à l'aide d'un coton-tige. Les cellules ayant migré à travers la membrane poreuse sont imagées à l'aide d'un microscope à épifluorescence inversé (grossissement x10, 5 champs différents par condition) et quantifiées grâce au logiciel Icy.

Laëtitia Voilquin

Mécanisme moléculaire de l'addiction des cancers HER2 positifs pour le transporteur de cholestérol STARD3

Les cancers HER2+ sont caractérisés par l'amplification et la surexpression d'HER2. HER2 est un récepteur tyrosine kinase appartenant à la famille de l'EGFR qui joue un rôle central dans la progression tumorale des cancers du poumon, du sein, de l'ovaire et de l'estomac. Notre équipe a identifié STARD3, un gène co-amplifié et co-exprimé avec HER2 dans les cancers. STARD3 est une protéine endosomale de la famille des START qui lie le cholestérol. STARD3 interagit avec les protéines VAPs et MOSPD2 résidentes du réticulum endoplasmique (RE) afin de créer un site de contact membranaire (MCS) entre les endosomes tardifs et le RE. Au niveau de ces contacts, STARD3 transporte le cholestérol du RE vers les endosomes aux dépens de la membrane plasmique. La perte d'expression de STARD3 inhibe spécifiquement la croissance des cellules HER2+. Nos résultats montrent que STARD3 agit sur la croissance des cellules HER2+ de manière indirecte en altérant la distribution normale du cholestérol et en modifiant la composition lipidique de la membrane plasmique. Ces modifications favorisent la dimérisation d'HER2, son activation et l'activation de la voie PI3K/Akt. Les cellules HER2+ dépendent du transport de cholestérol médié par STARD3 pour leur croissance. STARD3 représente donc une cible thérapeutique potentielle des cancers HER2+.

Mots clés : cancers HER2+, STARD3, cholestérol, site de contact membranaire, membrane plasmique, voies de signalisation

HER2+ cancers are characterized by HER2 amplification and overexpression. HER2 is a tyrosine kinase receptor from the EGFR family that plays a central role in tumor progression of lung, breast, ovary, and gastric cancers. Our team identified STARD3, a gene co-amplified and co-expressed with HER2 in cancers. STARD3 is a late endosomal cholesterol-binding protein that belongs to the START protein family. STARD3 interacts with VAPs or MOSPD2 proteins localized in the endoplasmic reticulum (ER) to create membrane contact sites (MCS) between LE and the ER. At these contacts, STARD3 transfers cholesterol from the ER to LE inducing a cholesterol accumulation in LE at the expense of the plasma membrane (PM). Inhibition of STARD3 expression inhibits specifically HER2+ cell growth. Our results show that STARD3 acts on HER2+ cancer cell growth through an indirect mechanism by altering the normal cholesterol distribution and modifying the lipid composition of the PM. These changes promote the dimerization and activation of HER2 and the activation of the PI3K/Akt pathway. HER2+ cell growth depends on STARD3-mediated cholesterol transport at MCS and STARD3 may have a therapeutic potential in HER2+ cancers.

Keywords: HER2+ cancers, STARD3, cholesterol, membrane contact sites, plasma membrane, signaling pathways