



**HAL**  
open science

# Régulation de la métalloprotéase ADAM10 par les tétraspanines

Jean-François Ottavi

► **To cite this version:**

Jean-François Ottavi. Régulation de la métalloprotéase ADAM10 par les tétraspanines. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T057 . tel-00935355

**HAL Id: tel-00935355**

**<https://theses.hal.science/tel-00935355>**

Submitted on 23 Jan 2014

**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 Paris-Sud

*Ecole Doctorale 419 BIOSIGNE – Signalisations et réseaux intégratifs  
en biologie*

Laboratoire INSERM U1004 : Réponses cellulaires au  
microenvironnement et cancers

**Thèse de doctorat**

Soutenue le 30/09/2013

**Jean-François OTTAVI**

# **Régulation de la métalloprotéase ADAM10 par les tétraspanines**

**Directeur de thèse :** Philippe Mauduit

**Président du jury :** Pierre Bobé

**Rapporteurs :** Laurence Cocquerel

Sylvie Claeysen

**Examineur :** François Le Naour

## Abréviations

ADAM: A-Disintegrin And Metalloproteinase  
ADCC: Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity  
ADN: Acide DésoxyriboNucléique  
AICD: Amyloid precursor protein Intracellular Cytoplasmic Domain  
AIDS: Acquired ImmunoDeficiency Syndrome  
AP-HP: Assistance Publique-Hôpitaux de Paris  
APC: AlloPhycoCyanine  
APP: Amyloid Precursor Protein  
ARN: Acide RiboNucléique  
BACE: BetA seCretasE  
BCR: B-Cell Receptor  
BSA: Bovine Serum Albumine  
CDx: Cluster of Differentiation  
CDV: Canine Distemper Virus  
CHO: Chinese Hamster Ovary  
CMV: CytoMegaloVirus  
CSL: CBF-1, Su(H), Lag-1  
DAPI: 4', 6-DiAmidino-2-PhenylIndole  
DARC: Duffy Antigen Receptor for Chemokines  
DCIS: Ductal Carcinoma In Situ  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DO: Densité Optique  
DSP: DithiosbisSuccinimidyl Propionate  
DSS: DiSuccinimidyl Suberate  
EC: ExtraCellular  
EDTA: EthyleneDiamineTetraAcetic acid  
EGF: Epidermal Growth Factor  
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor  
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting  
FDA: Food and Drug Administration  
FRET: Fluorescence/ Förster Resonance Energy Transfer  
GFP: Green Fluorescent Protein  
GPCR: G-Protein Coupled Receptor  
GPI: GlycosylPhosphatidyInositol  
GTP: Guanosine TriPhosphate  
HA: HemAgglutinine  
HB-EGF: Heparin-Binding EGF-like Growth Factor  
HCV: Hepatitis C Virus  
HeLa: Henrietta Lacks  
HER: Human Epidermal Receptor  
HGF: Hepatocyte Growth Factor  
HIV-1: Type 1-Human Immunodeficiency Virus  
HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma  
HSPG: HeparanSulfate ProteoGlycan  
HTLV-1: Human T-Lymphotropic type 1 Virus  
ICAM: InterCellular Adhesion Molecule  
ICLiPs: Intramembrane Cleaving Proteases  
IGF: Insulin-like Growth Factor  
IGFR: Insulin-like Growth Factor Receptor  
IL: InterLeukine  
IP: ImmonuPrecipitation  
KO: Knock-Out  
LTP: Long-Term Potentiation  
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase  
MFI: Mean Fluorescent Intensity  
MMP: Matrix MetalloProtease  
MP: MicroParticle  
NECD: Notch ExtraCellular Domain  
NEXT: Notch EXtracellular Truncation

NHS: N-HydroxySuccinimide  
NICD: Notch IntraCellular Domain  
NK: Natural Killer  
NP-40: Nonyl Phenoxy polyethoxy ethanol  
NSCLC: Non-Small-Cell Lung Carcinoma  
NTM: Notch TransMembrane  
PBS: Phosphate Buffer Saline  
PC3: Prostate Cancer 3  
PDGFR: Platelet-Derived Growth Factor Receptor  
PDI: Protein Disulfide Isomerase  
PKC: Protein Kinase C  
PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate  
PRAP: Proline-Rich Acidic Protein  
PSG: Pregnancy-Specific Glycoprotein  
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog  
PTP1B: Protein-Tyrosine Phosphatase 1B  
PVDF: PolyVinylidene DiFluoride  
RAGE: Receptor for Advanced Glycation Endproducts  
RDS: Retinal Degeneration, Slow  
RIP: Regulated Intramembrane Proteolysis  
ROS: Reactive Oxygen Species  
RPL38: 60S Ribosomal Protein L38  
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium  
RTK: Récepteur Tyrosine Kinase  
RT-qPCR : Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction  
SCID: Severe Combined ImmunoDeficiency  
SDS: Sodium DodecylSulfate  
SDS-PAGE: Sodium DodecylSulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis  
SH: Src Homology  
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription  
SVMP: Snake Venom MetalloProtease

TBS: Tris Buffer Saline

TEM: Tetraspanin-Enriched Microdomain

TGF $\alpha$ : Transforming Growth Factor  $\alpha$

TIMP: Tissue Inhibitor of MetalloProtease

TI-VAMP: Tetanus neurotoxin-Insensitive Vesicle-Associated Membrane Protein

TKI: Tyrosine Kinase Inhibitor

TNF $\alpha$ : Tumor-Necrosis Factor  $\alpha$

TPA: 12-O-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate

VCAM: Vascular Cell-Adhesion Molecule

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

WT: Wild Type



# Table des matières

<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>10</b>
<b>La famille des tétraspanines.....</b>	<b>10</b>
Généralités.....	10
Structure des tétraspanines.....	12
Expression tissulaire et localisation subcellulaire.....	17
Concept de réseau membranaire de tétraspanines .....	19
<b>Fonctions des tétraspanines.....</b>	<b>23</b>
Modulation de la fonction de partenaires.....	23
Trafic intracellulaire.....	23
Potentialisation de l'activité des partenaires.....	23
Transduction de signaux et signalisation.....	24
Les tétraspanines en tant que récepteurs agissant en trans.....	26
Tétraspanines et remaniements membranaires .....	28
Phénomènes de fusion .....	28
Migration cellulaire.....	30
Régulation de fonctions protéolytiques. Interaction avec la métalloprotéase ADAM10.....	31
<b>Tétraspanines et pathologies .....</b>	<b>32</b>
Pathologies rénales.....	32
Troubles du système nerveux.....	33
Fonctions plaquettaires .....	35
Maladies infectieuses .....	36
Hépatite C.....	36
Autres infections virales .....	37
Plasmodium.....	38
Infections bactériennes.....	38
Cancers .....	40
Tétraspanines et progression tumorale .....	40
Rôle des partenaires enzymatiques des tétraspanines .....	41
<b>La famille ADAMs.....</b>	<b>44</b>
Expression et évolution des gènes codant les ADAMs .....	45
Structure des ADAMs.....	48
Rôles cruciaux d'ADAM10 et ADAM17 .....	52
Fonctions biologiques des ADAMs.....	55
Clivage de protéines .....	55
Clivage protéolytique de prodomaines.....	55
« Regulated Intramembrane Proteolysis » physiologique : la signalisation Notch.....	57



« Regulated Intramembrane Proteolysis » pathologique : la maladie d'Alzheimer .....	59
Vascularisation .....	62
Fertilité .....	63
Terminaison de fonctions.....	64
Migration des leucocytes.....	64
Guidage axonal et Eph-éphrines : un modèle de régulation d'ADAM10 .....	65
Régulation de l'activité des ADAMs.....	68
Epigénétique et contrôle transcriptionnel .....	68
Régulation post-traductionnelle .....	69
ADAMs et cancers.....	71
<b>EGFR et cancer .....</b>	<b>75</b>
Généralités.....	75
Contrôle de l'activité de l'EGFR .....	79
EGFR et inhibiteurs de tyrosine-kinase (TKI) .....	81
Anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR .....	81
Dérégulation de l'EGFR et résistance aux traitements anti-EGFR .....	83
Transduction du signal EGFR .....	87
Transactivation du récepteur de l'EGF.....	87
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>91</b>
<b>Cellules.....</b>	<b>91</b>
<b>Anticorps.....</b>	<b>91</b>
<b>Produits divers .....</b>	<b>93</b>
<b>Culture cellulaire.....</b>	<b>94</b>
<b>Transfection et génération de clones stables .....</b>	<b>95</b>
Plasmides utilisés.....	96
<b>RT-PCR quantitative .....</b>	<b>96</b>
Extraction des ARN totaux.....	96
Rétro-transcription .....	97
PCR quantitative .....	97
<b>Transfection d'ARN interférents.....</b>	<b>98</b>
Séquences des différents SiRNA utilisés.....	99
<b>Immunofluorescence indirecte.....</b>	<b>99</b>
Cytométrie en flux .....	99
Immunofluorescence indirecte sur lame.....	100
<b>Mesure de la sécrétion de l'E-cadhérine dans les cellules PC3.....</b>	<b>100</b>
<b>Analyse des protéines par Immunoprécipitation, SDS-PAGE et Western Blot .....</b>	<b>101</b>
Biotinylation des protéines de surface et lyse des cellules .....	101
Immunoprécipitation.....	102

SDS-PAGE et Western Blot.....	102
<b>Analyse de l'activité Notch dans des lignées cancéreuses .....</b>	<b>103</b>
<b>Suivi et mesure de la prolifération cellulaire des cellules PC3 WT ou PC3 GFP-Tspan5 .....</b>	<b>104</b>
Prolifération non-clonale .....	104
Prolifération clonale sur plastique.....	105
Prolifération 3D « indépendante de l'ancrage » en gel d'Agar.....	105
In vivo/ Xénogreffes.....	106
<b>Stimulation par l'éphrineA1 et « Cell rounding » dans les lignées PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5 .....</b>	<b>106</b>
 <b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	 <b>107</b>
<b>Etude du clivage de l'E-cadhérine par les métalloprotéases dans les cellules PC3 .....</b>	<b>107</b>
Stimulation de la sécrétion de l'E-cadhérine par le PMA dans des cellules PC3 et inhibition par les inhibiteurs de métalloprotéases .....	107
Stimulation de la sécrétion de l'E-cadhérine par des anticorps anti-tétraspaines dans les cellules PC3, implication d'ADAM10.....	110
Mise en évidence de la régulation muscarinique de la sécrétion de l'E-cadhérine dans les cellules PC3-M3	114
Interférence ARN des protéases ADAM10 et ADAM17 sur la stimulation muscarinique du clivage de l'E-cadhérine dans les cellules PC3-M3.....	120
Voie PKC et régulation de la sécrétion d'E-cadhérine .....	122
Transactivation de l'EGFR et régulation de la sécrétion de l'E-cadhérine .....	125
 <b>Effet des TspanC8s sur l'adressage d'ADAM10 .....</b>	 <b>131</b>
ADAM10 n'interagit pas de manière directe avec les tétraspaines « classiques ».....	131
A la recherche de la tétraspaine interagissant avec ADAM10 de manière directe .....	133
Liaison entre ADAM10 et l'ensemble des membres d'une sous-famille de tétraspaines .....	135
Niveaux d'expression différentiels d'ADAM10 et des TspanC8s dans différentes lignées carcinomales .....	136
Effets de l'expression des TspanC8s sur la localisation cellulaire d'ADAM10 .....	138
Conséquences de l'expression des TspanC8s sur la voie Notch .....	146
 <b>Etude de l'interaction entre la tétraspaine Tspan5 et la métalloprotéase ADAM10 dans les cellules PC3 ..</b>	 <b>156</b>
Effets de la surexpression de TspanC8s sur l'expression d'ADAM10 dans les cellules PC3. ....	156
Génération de lignées PC3 surexprimant différentes TspanC8 de manière stable et interaction avec ADAM10 .....	158
Diminution d'ADAM10 membranaire .....	161
Spécificité de l'effet de Tspan5 sur l'expression d'ADAM10.....	161
Stabilité d'expression du transgène GFP-Tspan5 .....	166
Perte d'expression de Tspan5 .....	166
Epigénétique et Tspan5.....	169
Interaction entre ADAM10 et Tspan5 dans les cellules surexprimant Tspan5 .....	172
Expression subcellulaire atypique de Tspan5.....	174
La surexpression de Tspan5 entraîne une diminution globale de l'expression d'ADAM10.....	177
Diminution de l'expression totale d'ADAM10.....	177
 <b>Rôles d'ADAM10 et de Tspan5 dans la croissance cellulaire .....</b>	 <b>180</b>
Une baisse d'expression d'ADAM10 et une surexpression de Tspan5 inhibent la croissance cellulaire des cellules PC3 .....	180

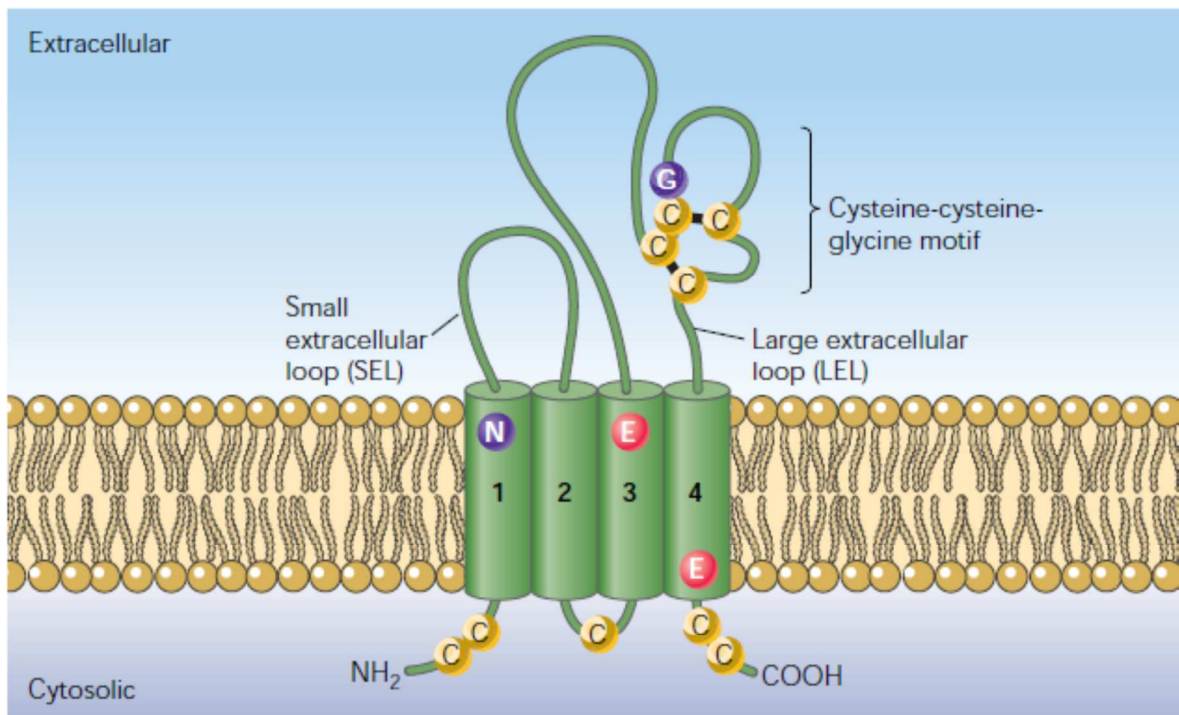
La croissance des cellules PC3 GFP-Tspan5 est dépendante du sérum et ces cellules ne sont pas aptes à l'auto/paracrine .....	187
Rôle des ligands de l'EGFR et de l'activité de celui-ci dans la croissance des cellules PC3.....	191
Rôle du système Eph-ephrine dans la croissance des cellules PC3 .....	200
Altération de la réponse du récepteur EphA2 à son ligand ephrineA1 dans les cellules PC3 GFP-Tspan5 ....	201
Interactions entre les voies EGFR et Eph .....	206
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>210</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>216</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>250</b>
<b>ANNEXE: TABLEAUX .....</b>	<b>252</b>
<b>ANNEXE: PUBLICATION .....</b>	<b>261</b>

# Introduction

## La famille des tétraspanines

### Généralités

Les tétraspanines forment une famille de glycoprotéines membranaires (au nombre de 33 chez *H.sapiens*) à forte homologie de séquence, composées de quatre passages transmembranaires hydrophobes conservés délimitant deux boucles extracellulaires de tailles inégales (**Figure 1**). Les tétraspanines sont constituées d'une seule chaîne d'acides aminés (204 à 335 acides aminés) représentant un poids moléculaire compris entre 24 kDa (CD81) et 80 kDa (CD82). Elles possèdent un certain nombre de caractéristiques qui les différencient des autres protéines à quatre domaines transmembranaires (Boucheix et al., 2001; Todd & Maecker, 1997).



**Figure 1 : Représentation schématique de la structure des tétraspanines.**

SEL/EC1 : petite boucle extracellulaire, LEL/EC2 : grande boucle extracellulaire. Les acides aminés les plus conservés entre tétraspanines (hormis les cystéines de la boucle LEL/EC2)

sont indiqués en violet et rouge (présents dans au moins 80% des tétraspanines). Les cystéines (jaunes) conservées des régions, amino- et carboxy-terminales ainsi que de la boucle intracellulaire sont des sites de palmitoylations potentiels. Les cystéines de la boucle LEL/EC2 forment des ponts disulfures (représentés en noir). La LEL représentée ici est celle de la tétraspanine « canonique » CD81 ayant 2 ponts disulfures. Le nombre de ponts disulfures varie entre 2 et 4 selon les membres de la famille considérés. Adapté de (Levy & Shoham, 2005)

Les tétraspanines sont présentes de manière ubiquitaire dans l'ensemble des cellules de l'organisme. Elles peuvent avoir des localisations intracellulaires (CD63/Tspan30 est localisée majoritairement dans les lysosomes (Rous et al., 2002) en plus de leur forme membranaire en surface des cellules. Cette superfamille est représentée chez tous les métazoaires (Hemler, 2003) tels que *Schistosoma mansoni* (Wu et al., 2011), *Drosophila melanogaster* (Todres et al., 2000) ou *Caenorhabditis elegans* (Dunn et al., 2010; Moribe et al., 2004) et peut être retrouvée également chez les champignons tel *Neurospora crassa* (Gourgues et al., 2002; Lambou et al., 2008) et les plantes telle *Arabidopsis thaliana* (Clergeot et al., 2001; Wang et al., 2012).

Historiquement, les premiers membres de cette famille ont été découverts en 1988 grâce aux clonages de CD63, initialement appelé ME491 (Hotta et al., 1988) et de CD37 (Schwartz-Albiez et al., 1988) puis au début des années 90 lors des clonages de CD81, initialement nommé TAPA-1 (Oren et al., 1990), et CD9 (Boucheix et al., 1991).

Chez *H.sapiens*, presque la moitié des tétraspanines ont été identifiées à partir de banques d'EST (Expressed Sequence Tag) (Puls et al., 1999; Serru et al., 2000; Todd et al., 1998).

Parmi les tétraspanines, on trouve des antigènes identifiés à la surface des leucocytes (CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82 et CD151) et des molécules identifiées à l'origine sur des tumeurs (TALLA-1, Co-029, SAS).

Un nombre assez restreint de membres de cette super famille a été étudié, notamment en raison d'un manque d'outils. Néanmoins, il apparaît de façon notable que les tétraspanines jouent un rôle dans des fonctions aussi diverses que la migration et les interactions intercellulaires, la réponse immunitaire, le développement ou encore la fusion

des gamètes. Certaines jouent un rôle clé dans la formation de tumeurs en accélérant ou inhibant leur croissance ou dans différentes pathologies infectieuses, notamment en tant que co-récepteurs lors des étapes d'infection (diphtérie, paludisme, hépatite C, AIDS) –pour revue (Charrin et al., 2009)-.

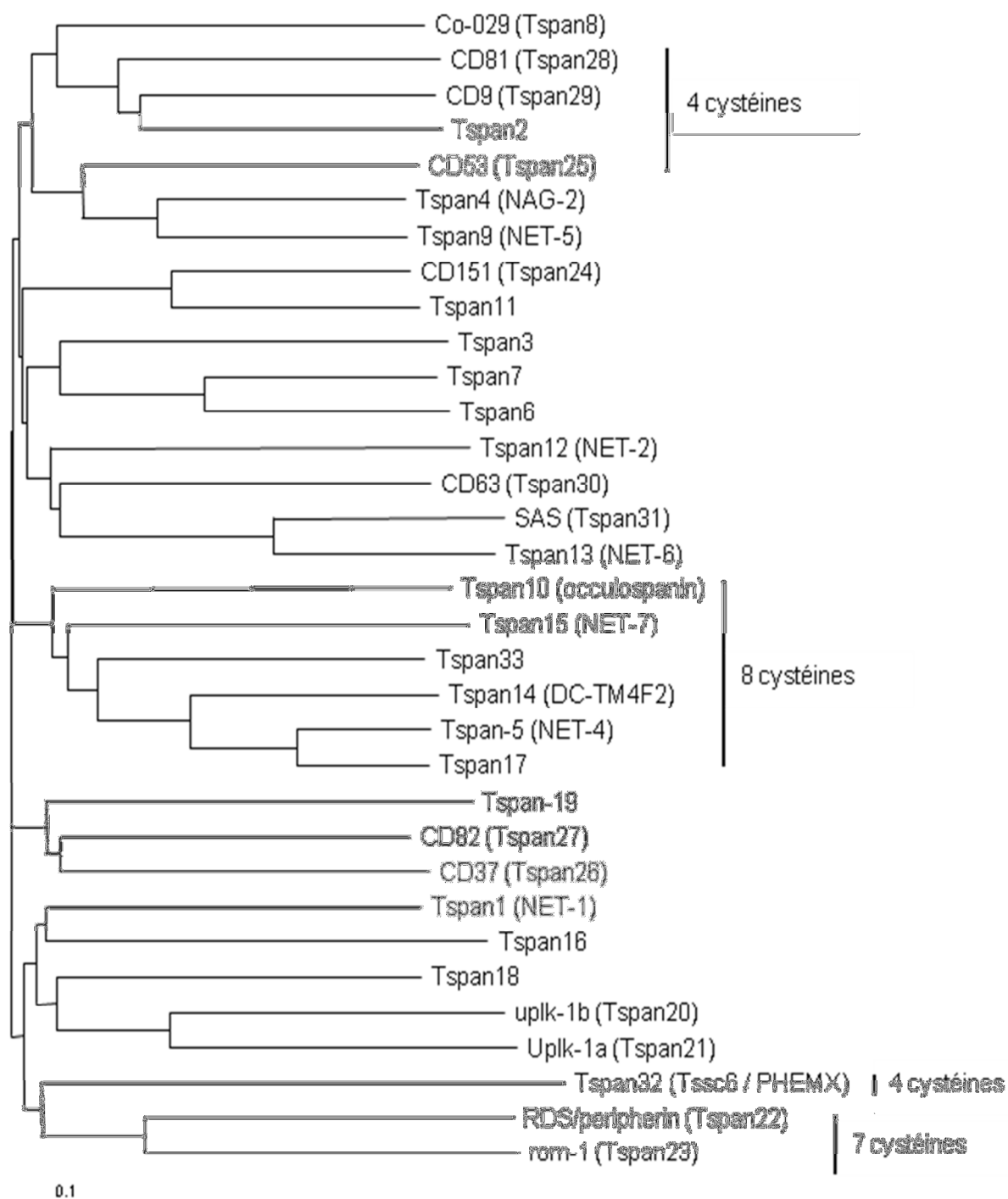
## Structure des tétraspanines

L'alignement des séquences primaires des tétraspanines montre que les plus fortes homologies se retrouvent dans les régions transmembranaires. Il faut noter qu'il existe dans ces régions hydrophobes, des résidus polaires hautement conservés (asparagine, acide glutamique, glutamine). La présence de tels résidus dans la bicouche lipidique est énergétiquement défavorable ce qui laisserait supposer qu'ils pourraient participer soit à la stabilisation intramoléculaire des tétraspanines en interagissant avec d'autres résidus polaires présents dans un des domaines transmembranaires voisins, soit à la formation de complexes avec d'autres protéines transmembranaires par une interaction similaire. Les segments transmembranaires conservés semblent jouer un rôle dans la stabilité ainsi que l'adressage des tétraspanines à la surface cellulaire puisque dans la cas de CD82, les segments 2-4 ou 1 isolés lient la calnexine alors que l'expression des 4 domaines transmembranaires au sein de la tétraspanine permet un échappement du compartiment réticulaire (Cannon & Cresswell, 2001).

La petite boucle extracellulaire (SEL/EC1) comprend 20 à 28 acides aminés et le grand domaine extracellulaire (EC2) 76 à 131 acides aminés. Les extrémités carboxy et amino-terminales de la molécule comprennent une vingtaine d'acides aminés, et le domaine cytoplasmique présent entre les deuxième et troisième régions transmembranaires, moins de 5 acides aminés. La plupart des tétraspanines sont N-glycosylées. Les tétraspanines possèdent également des cystéines dans les régions intracellulaires qui leur permettent d'être S-palmitoylées.

La grande boucle (LEL/EC2), composées de 5 hélices  $\alpha$  (A-E) présente un repliement particulier aux tétraspanines assuré par des acides aminés très conservés, notamment des

cystéines. La majorité des tétraspanines contiennent 6 cystéines dans cette région. Ces cystéines forment des ponts disulfures et sont impliquées dans la conformation du domaine EC2 des tétraspanines. Ce repliement ainsi que le nombre de cystéines présentes dans ce domaine permettent de récapituler la phylogénie des tétraspanines (**Figure 2**). Lorsque le nombre de cystéines est impair, la cystéine non impliquée dans un pont disulfure structurant, peut être disponible pour la formation de pont disulfure avec une autre tétraspanine permettant une augmentation de la cohésion des interactions entre tétraspanines (Seigneuret., 2001) (**Figures 1 et 2**).



**Figure 2 : Arbre phylogénétique des tétraspanines de mammifères**

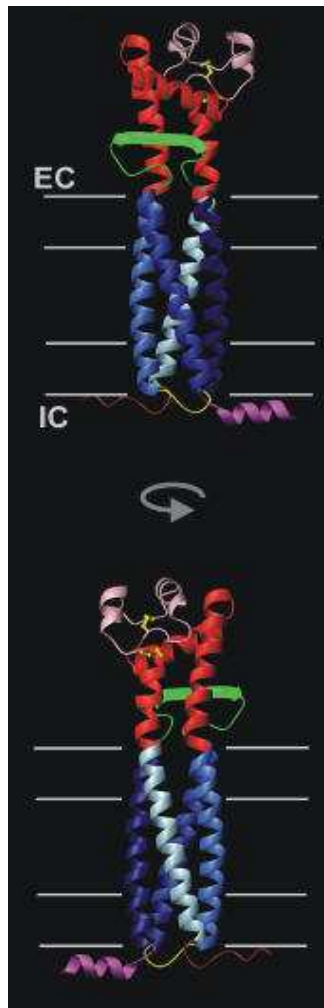
Les séquences des 33 tétraspanines ont été alignées et un arbre de distance réalisé par le logiciel ClustalW. Regroupement des tétraspanines selon le nombre de cystéines dans EC2. Les tétraspanines non annotées possèdent 6 cystéines dans EC2 (Charrin et al., 2009)



La structure tridimensionnelle de la grande boucle du CD81 a été analysée par diffraction des rayons X après cristallisation d'un dimère de domaines EC2. Ce travail a montré l'existence d'un repliement particulier aux tétraspanines et ne se retrouvant pas dans les structures tertiaires d'autres protéines (Kitadokoro et al., 2001). Cette cristallisation a permis de modéliser la structure du domaine EC2 constitué de cinq hélices  $\alpha$  (A-E) organisées en deux domaines : les hélices A et E interagissent entre elles pour former un « pied » coiffé des trois autres hélices (B, C et D). La « coiffe » est stabilisée par deux ponts disulfures formés de 4 cystéines de la région 155-190. Celles-ci seraient donc impliquées dans le maintien de ce repliement alors que cette région présente précisément une hypervariabilité entre les tétraspanines pouvant hypothétiquement jouer un rôle quant à la discrimination entre différents interactants au sein d'un groupe hétérogène de plusieurs tétraspanines. Par la suite, une étude *in silico* (Seigneuret et al., 2001) a mis en évidence que la grande boucle des tétraspanines de manière générale se compose de deux sous-domaines dont le premier est conservé et le second variable en séquence. Le premier correspond aux hélices A, B et E tandis que le second correspond à une insertion de séquence entre ces 3 hélices et diffère en taille et structure secondaire selon les différentes tétraspanines considérées. Ce second sous-domaine ne possède que quelques acides aminés conservés (dont ces 4 cystéines vitales pour la structure tertiaire des tétraspanines). Une telle structure a été identifiée la même année pour la tétraspanine CD82 (Bienstock & Barrett, 2001). Récemment, une équipe a montré par RMN qu'une structure qualifiée de « boucle dynamique » entre les hélices C et E de la grande boucle extracellulaire de CD81 est nécessaire à la liaison d'HCV à cette protéine. Plus précisément, cette boucle contient à la fois le site SNFLK impliqué dans la liaison entre CD81 et la glycoprotéine d'enveloppe E2 et un second site, SGSN permettant une liaison de la grande boucle à la membrane plasmique. Ce second site semble servir à orienter le site SNFLK par rapport à la membrane et à stabiliser l'association entre ce site et E2 mais n'agit pas sur l'efficacité de fixation d'E2 en tant que tel (Rajesh et al., 2012).

M. Seigneuret a poursuivi son travail initial et a montré que la première boucle extracellulaire de taille plus modeste est composée principalement d'un feuillet  $\beta$  accolé aux

résidus particulièrement conservés des hélices A et E de la seconde boucle (Seigneuret, 2006). L'auteur propose, après étude de la structure de CD81 et comparaison *in silico* aux modélisations d'autres tétraspanines, que la variabilité d'interaction des tétraspanines avec d'autres molécules résultent à la fois de différences de séquence au sein de segments à la structure tertiaire conservée (e.g. sous-domaine variable d'EC2) mais aussi à des différences de séquences de segments intracellulaires (**Figure 3**). Dans le cas de CD81, cette région variable du domaine EC2 est constituée des hélices C et D, et contient le site de fixation de la glycoprotéine d'enveloppe E2 du virus de l'hépatite C (Higginbottom et al., 2000). Dans le cas du CD9, elle contient le motif SFQ dont la contribution est essentielle à la fusion des gamètes (Zhu et al., 2002). Le site QRD présent quant à lui dans la coiffe de CD151 est également nécessaire à son interaction latérale avec les intégrines  $\alpha_3$  et  $\alpha_6$  (Kazarov et al., 2002). A contrario, la structure au niveau du « pied » d'EC2 serait particulièrement conservée entre les tétraspanines.



**Figure 3 : Représentation schématique en rubans de la structure tertiaire issue de la modélisation de CD81.**

Les quatre segments transmembranaires (1-4) sont représentés en 4 nuances de bleu. La boucle EC1 est représentée en vert. La boucle intracellulaire liant les segments transmembranaires 2 et 3 est représentée en jaune. Les domaines conservés et variables de la boucle EC2 sont représentés en rouge et rose respectivement. Au sein du domaine variable d'EC2, les ponts disulfures « structurants » sont représentés en jaune. Les régions N- et C-terminales sont représentées respectivement en magenta et marron (Seigneuret 2006).

### Expression tissulaire et localisation subcellulaire

L'expression tissulaire est variable d'une tétraspanine à l'autre, mais de manière générale il semble que toutes les cellules de l'organisme expriment plusieurs tétraspanines

(Boucheix et al., 2001), y compris les spermatozoïdes où CD9 a été récemment identifié à la membrane de l'acrosome (et non à la membrane plasmique) (Ito et al., 2010). Certaines tétraspanines, comme CD9, CD63, CD81, CD82 et CD151, sans être ubiquitaires, sont largement exprimées dans l'organisme. A titre d'exemple, CD81 est exprimée à la surface des cellules épithéliales, des fibroblastes, des cellules endothéliales et de la plupart des cellules du sang en dehors des érythrocytes, des plaquettes et des polynucléaires neutrophiles. D'autres tétraspanines ont un spectre d'expression plus restreint. CD53, par exemple, est un marqueur leucocytaire, alors que CD37 n'est fortement exprimée que sur les cellules lymphoïdes B. Certaines tétraspanines ne sont exprimées qu'au niveau de structures tissulaires spécialisées, comme les uroplakines UPIa et UPIb, qui sont des constituants des plaques urothéliales. De même, les protéines RDS/périphérine et Rom-1, sont localisées uniquement dans la rétine. Cependant, il faut noter que les études de localisation ne peuvent être réalisées uniquement sur des tétraspanines contre lesquelles des anticorps ont été développés, ce qui n'est pas le cas pour tous les membres de la famille comme nous le verrons par la suite.

Comme évoqué auparavant, la plupart des tétraspanines sont exprimées à la surface des cellules, mais certaines sont également présentes en quantités importantes dans des compartiments intracellulaires (Sincock et al., 1999). Certaines tétraspanines telles que CD63, CD37, CD82, CD151, Tspan-1, Tspan-3, Tspan-6, Tspan-7 (A15/TALLA-1) et Co-029 (Tspan8), possèdent à leur extrémité C-terminale un site potentiel d'endocytose à la membrane (YxxΦ où Φ est un acide aminé hydrophobe et x n'importe quel acide aminé) permettant un tri des protéines du réseau trans-golgien vers les lysosomes. Une équipe a montré que la suppression de ce motif d'internalisation dans le CD151 entraîne une perte de la capacité des cellules à migrer sur la laminine, due à une diminution de l'internalisation de trois intégrines  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 1$  en interaction avec CD151 (Liu et al., 2007). Les tétraspanines (ainsi que certaines de leurs protéines associées) s'accumulent par ailleurs dans les corps multivésiculaires, qui fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer dans le milieu extracellulaire des vésicules de 50 à 100 nm appelées exosomes (Théry et al., 1999). Les exosomes permettent une communication intercellulaire efficace et l'échange de protéines telles que des récepteurs de surface, des enzymes ainsi que du matériel génétique de type mRNA ou miRNA –pour revue (Bobrie et al., 2011)-. Les exosomes produits par de

nombreux types cellulaires sont également particulièrement riches en tétraspanines telles que Tspan14, CD37, CD53, CD63, CD9, CD81, Tspan8 ou CD82 (Escola et al., 1998; Morelli et al., 2004) (Abache et al.2007). La présence et l'association entre la tétraspanine Tspan8 et l'intégrine  $\alpha_4$  dans ces structures induit une adhérence préférentielle des exosomes aux cellules endothéliales et favorise l'angiogénèse. Ce phénomène pourrait ainsi avoir un intérêt thérapeutique grâce à un potentiel transport ciblé de drogues via des exosomes artificiels routés vers des zones atteintes particulièrement irriguées (Rana et al., 2011; Rana et al., 2012).

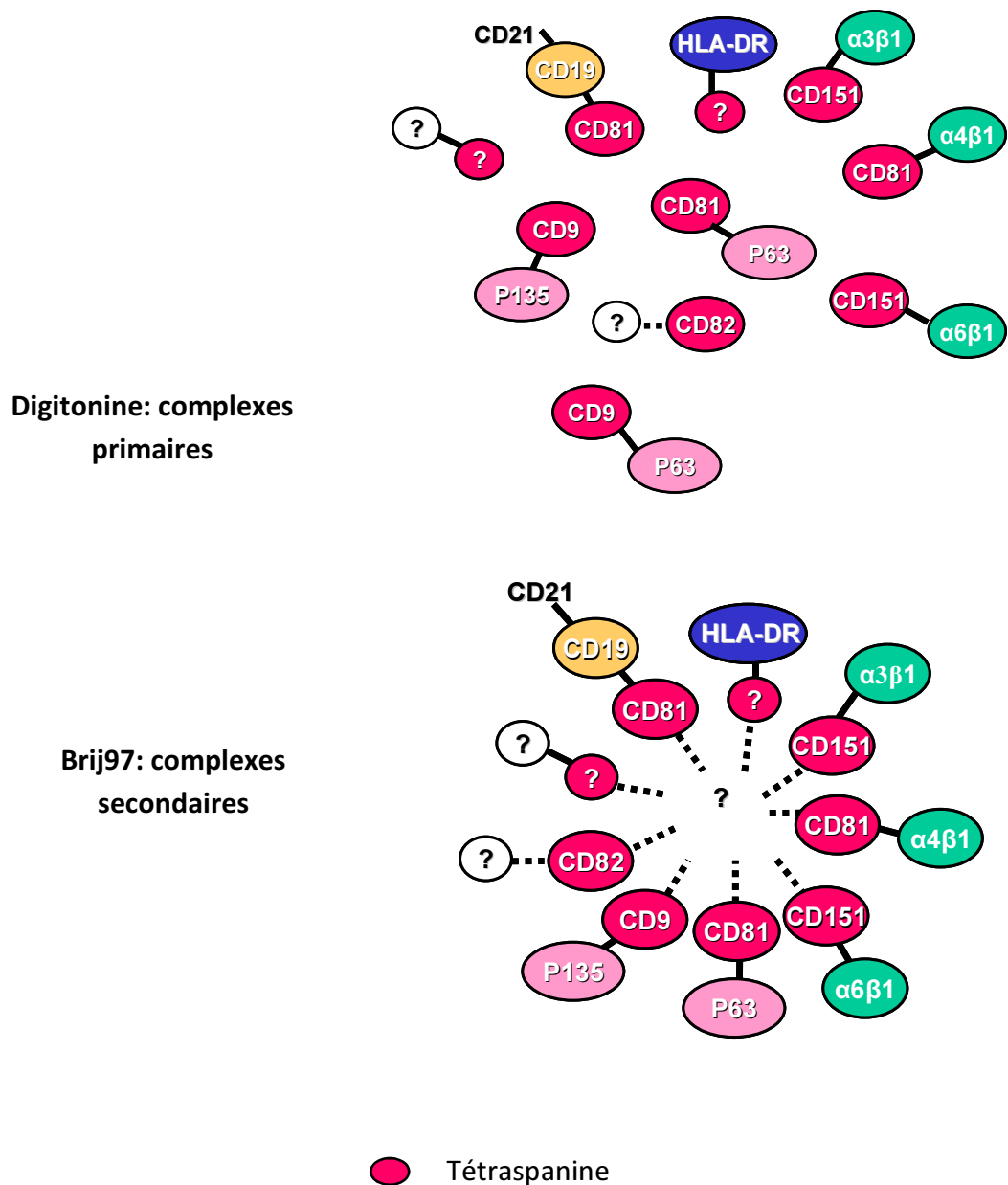
### Concept de réseau membranaire de tétraspanines

La fonction des tétraspanines est probablement en grande partie liée à leur capacité à organiser un réseau d'interactions moléculaires appelé « tetraspanin web » (Boucheix et al., 2001). En effet, les tétraspanines ont la propriété notable de s'associer entre elles ainsi qu'avec d'autres molécules. L'immunoprécipitation du réseau global suivie de l'analyse par spectrométrie de masse des complexes à tétraspanines a permis d'identifier un nombre important de partenaires protéiques (François Le Naour, André, Boucheix, & Rubinstein, 2006). Ainsi, il apparaît que les tétraspanines se lient non seulement à d'autres tétraspanines mais aussi à de nombreuses protéines telles que des intégrines ( $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_4$  et  $\alpha_{11b}\beta_3$ ), d'autres molécules d'adhérence (EpCAM CD44), des protéines impliquées dans la fusion membranaire, des protéines à domaines immunoglobulines (CD9P1, EWI-2), des protéines de signalisation (PKC, protéines G hétérotrimériques) et des ectoenzymes telles que la métalloprotéase ADAM10 (Hemler, 2005; Levy & Shoham, 2005) (**Annexe Tableau I**).

Lors de la lyse des cellules, l'utilisation de détergents doux tels que le Brij96/97 ou le CHAPS permet la solubilisation des protéines membranaires tout en préservant les interactions entre tétraspanines et rend possible l'observation d'un réseau de protéines comprenant des tétraspanines ainsi que de nombreuses autres protéines partenaires (Rubinstein et al., 1996 ; Serru et al., 2000). Le modèle du réseau de tétraspanines a été développé par l'analyse des résultats obtenus par la technique de co-immunoprécipitation combinée à l'utilisation de détergents plus forts. Par exemple, la digitonine (qui précipite le

cholestérol auquel peuvent être associées les tétraspanines palmitoylées) permet l'observation des complexes primaires constitués d'une tétraspanine et d'un nombre restreint de partenaires moléculaires et permet de disséquer le réseau par sa capacité à supprimer les interactions entre tétraspanines. Dans ce même but de mise en évidence des interactions de type primaires, certaines équipes utilisent également la technique de liaison chimique par pontage covalent précédant ou non une étape d'immunoprécipitation en présence de détergents tels que le Brij99 ou le NP-40. Brièvement, le pontage covalent est une technique consistant à générer des liaisons covalentes entre deux protéines présentant une interaction ionique faible et/ou une proximité forte. Les agents pontants chimiques utilisés en général sont de type DSP (DithiosbisSuccinimidyl Propionate)/réactif de Lomant où deux groupements esters NHS capables d'interagir avec les amines primaires des protéines sont espacés par une chaîne carbonée contenant un pont disulfure -ou non, on parle alors de DSS (DiSuccinimidyl Suberate)-. Selon ce modèle, les tétraspanines s'associent tout d'abord directement avec des partenaires moléculaires privilégiés pour former des complexes qualifiés de primaires. Ces complexes interagiraient ensuite entre eux en conséquence d'interactions entre les différentes tétraspanines formant ainsi des complexes d'ordre supérieur résultant de l'association entre plusieurs complexes primaires. Cette organisation est notamment due aux interactions mettant en jeu les tétraspanines palmitoylées et le cholestérol membranaire (Charrin et al., 2003). On ne connaît pas la stœchiométrie des différents composants du réseau et il est probable que son rôle soit non négligeable. Ce réseau agit donc en tant qu'organisateur de la membrane plasmique en « différents » microdomaines (appelés Tetraspanin-Enriched Microdomains ou TEMs) et suggère une implication des tétraspanines dans les phénomènes de compartimentation membranaire (**Figure 4**).

L'ensemble des interactions primaires établies est compilé en **Annexe Tableau I** et l'ensemble des molécules associées au réseau sans qu'une tétraspanine partenaire primaire n'ait été identifiée est compilé en **Annexe Tableau II**.



**Figure 4 : Utilisation de deux détergents permettant de mettre en évidence les complexes à tétraspanines.**

Les tétraspanines sont représentées en fuchsia. Les tétraspanines s'associent avec un nombre restreint de partenaires formant des complexes primaires (observation en présence de digitonine en haut). Secondairement, les interactions entre tétraspanines (observation en présence de Brij97 en bas) permettent la formation d'un réseau membranaire ou « tetraspanin web ». L'arrangement des complexes après lyse en Brij97 est arbitraire.

Ces microdomaines membranaires présentent des analogies avec les radeaux lipidiques conventionnels (« rafts ») de par la présence de cholestérol -plusieurs tétraspanines, incluant CD9, CD81 et CD82, s'associent directement au cholestérol membranaire (Charrin et al., 2003)- et de gangliosides (notamment CD9 qui s'associe directement au ganglioside GM3 (Ono et al.2001), et par leur capacité à « flotter » en gradient de sucrose. En effet, plusieurs études ont montré que les complexes à tétraspanines sont distribués, au moins en partie, dans les fractions légères (riches en lipides) après centrifugation en gradient de sucrose (Charrin et al., 2003; Cherukuri et al., 2004; Claas et al., 2001). Cependant, les microdomaines à tétraspanines présentent des caractéristiques essentielles qui les distinguent des « rafts » classiques. Ils sont notamment en majeure partie dissociés lors d'une lyse en présence de Triton X-100 à 4°C, alors que les rafts sont typiquement résistants dans ces mêmes conditions (Charrin et al., 2003; Claas et al., 2001). Au contraire, l'intégrité des microdomaines enrichis en tétraspanines est maintenue en présence de Brij97 à 37°C, condition qui dissocie les rafts. De plus, des protéines classiquement associées aux rafts comme les protéines membranaires à ancrage GPI covalamment liée à un phosphatidylinositol du feuillet externe membranaire (notamment retrouvées dans la membrane plasmique des globules rouges) ou la cavéoline ne sont pas retrouvées dans les microdomaines à tétraspanines (Berditchevski et al., 2002).

Il est cependant intéressant de noter que les deux types de domaines sont identifiés lors de l'assemblage de HIV-1 et la formation de Virus-Like Particles via une interaction protéique entre la protéine virale Gag, la tétraspanine CD9 et une protéine à ancre GPI (CD55) caractéristique des rafts (Hogue et al., 2011; Krementsov et al., 2010)



## Fonctions des tétraspanines

### Modulation de la fonction de partenaires

#### *Trafic intracellulaire*

Les tétraspanines contribuent à réguler la fonction de leurs partenaires de plusieurs façons. Tout d'abord, elles peuvent jouer un rôle dans le trafic intracellulaire de ces molécules associées. Par exemple, CD81 est nécessaire à l'expression maximale de son partenaire CD19 à la surface des lymphocytes B. En l'absence de CD81, on observe une réduction du niveau d'expression de CD19 à la surface cellulaire associée à un blocage du transit intracellulaire de la molécule au niveau du réticulum endoplasmique (Shoham et al., 2003). La tétraspanine CD9 est associée aux formes membranaires précurseurs de certains ligands du récepteur de l'EGF comme le pro-TGF- $\alpha$  (Imhof et al., 2008), le pro-HB-EGF et la pro-amphiréguline (Inui et al., 1997). L'association avec CD9 augmente l'activité de ces ligands dans les phénomènes de signalisation juxtacrine (Shi et al., 2000). En particulier, CD9 facilite le transport du pro-TGF- $\alpha$  de compartiments intracellulaires vers la membrane et promeut la stabilisation de la forme transmembranaire du pro-TGF- $\alpha$ . *In fine*, cet effet aboutit à une augmentation de l'activation de l'EGFR par TGF $\alpha$  et de la signalisation aval (Imhof et al., 2008). Il a, de plus, été montré que CD9 régule la formation d'un complexe entre ADAM10 et HB-EGF et que la formation de ce complexe était déclenchée par une stimulation de son récepteur de type GPCR par la bombésine. Ainsi donc, une stimulation d'un GPCR pourrait affecter l'activité d'ADAM10 pour son substrat HB-EGF en cis en entraînant un rapprochement de ces deux protéines via CD9 au sein d'un complexe membranaire discret (Yan et al., 2002).

#### *Potentialisation de l'activité des partenaires*

Les tétraspanines peuvent aussi potentialiser les interactions entre leurs partenaires moléculaires et certains ligands. Le premier exemple connu est celui du CD9, cette

tétraspanine augmente l'activité promotrice de croissance du pro-HB-EGF lors de tests de co-culture de cellules transfectées avec des vecteurs codant CD9 ou HB-EGF (Higashiyama et al., 1995). En effet, après la découverte de l'association entre CD9 et HB-EGF (Inui et al., 1997), un complexe constitué de CD9, pro-HB-EGF, intégrine  $\alpha_3\beta_1$ , HSPG a été observé *in vitro* et aurait un effet inhibiteur de la prolifération au contraire du rôle pro-prolifératif de la forme soluble de HB-EGF (Iwamoto & Mekada, 2000). Cette augmentation de l'activité de pro-HB-EGF est spécifique de CD9, et n'est pas observée avec d'autres tétraspanines comme CD63, CD81 et CD82 auxquelles pro-HB-EGF est indirectement associé via CD9 (Nakamura et al. 2000). CD9 permet aussi une augmentation de la sensibilité à la toxine diphtérique via une fixation augmentée de la toxine à son récepteur constitué de la forme membranaire du pro-HB-EGF, lorsque celui-ci est lié à CD9. En effet, de manière intéressante, l'expression de l'homologue simien de CD9 augmente la sensibilité des cellules à l'action de la toxine en augmentant le nombre de sites fonctionnels du pro-HB-EGF (Mitamura et al., 1997) sans modifier le nombre total de molécules pro-HB-EGF à la surface des cellules (Iwamoto et al., 1994).

Un autre exemple est la tétraspanine CD151 qui s'associe aux intégrines  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_4$  et  $\alpha_7\beta_1$ . L'analyse de mutants a permis de mettre en évidence le rôle de CD151 dans la régulation de l'activité de ces intégrines. Par exemple, des mutations du site d'interaction de CD151 avec les intégrines  $\alpha_3\beta_1$  et  $\alpha_6\beta_1$ , qui n'altèrent pas la capacité des cellules à adhérer au substrat, entraînent la perte de la capacité à s'étaler et à former des structures en câbles dans le Matrigel™ (Kazarov et al. 2002). Des mutations dans l'extrémité cytoplasmique C-terminale de CD151 diminuent l'interaction de l'intégrine  $\alpha_6\beta_1$  avec une matrice de laminine, ce qui se traduit également par un retard de l'étalement des cellules sur ce substrat, ou encore par une inhibition de la formation des structures en câbles (Lammerding et al., 2003; Zhang et al., 2002).

### **Transduction de signaux et signalisation**

Au niveau de la transduction du signal aval, l'adhérence de cellules de mélanome humain à une matrice de laminine entraîne une augmentation de l'interaction entre CD151

et  $\alpha_6\beta_1$  et facilite la formation de complexes entre intégrines et petites protéines G Ras, Rac1 cdc42 contribuant à les activer et, *in fine*, à une augmentation de la motilité (Hong et al., 2012). Il a également été montré que les tétraspanines modulent la signalisation en aval de récepteurs de facteur de croissance. Ainsi, la surexpression du CD82 entraîne une diminution de l'activation de la signalisation induite par le récepteur de l'EGF (Odintsova et al., 2000) via une diminution de la capacité de l'EGFR à homodimériser ou hétérodimériser avec ErbB2 après liaison de ligand. Il est intéressant de noter ici que, bien qu'interagissant aussi avec ErbB2 et ErbB3 (en plus de l'EGFR), CD82 n'empêche pas la formation d'hétérodimères ErbB2-ErbB3, démontrant ainsi une distinction notable entre l'interaction et la conséquence de l'interaction vis-à-vis de molécules de séquence et structure proches (Odintsova et al., 2003). D'une manière assez similaire, l'interaction entre CD82 et le récepteur de l'HGF (c-Met) entraîne une diminution de la signalisation aval après liaison d'HGF. Cette diminution de l'activité des petites protéines G de la famille Rho citées plus haut est due à une diminution d'association de protéines adaptatrices (telles que Grb2 et p85) à c-Met et associée à une diminution de la migration de cellules cancéreuses (Takahashi et al. 2007). Enfin, la tétraspanine CD37 est indispensable à la mobilité et au regroupement local des intégrines  $\alpha_4\beta_1$  à la membrane plasmique, permettant une signalisation aval Akt inhibant ainsi l'apoptose dans les cellules sécrétrices d'IgG dans les organes lymphoïdes (Van Spriel et al. Communication Nijmegen 2012).

Les tétraspanines participent donc également à la signalisation induite par les intégrines. Il a été ainsi proposé que les tétraspanines soient des "adaptateurs" entre les intégrines et des molécules de signalisation. Ainsi, la présence d'anticorps anti-tétraspanines module la phosphorylation de la protéine FAK présente au niveau des adhésions focales notamment. Il s'agit de la principale kinase activée dans la signalisation par les intégrines (Berditchevski & Odintsova, 1999). D'autre part, l'activation des PKC $\alpha$  et  $\beta$ II par des esters de phorbol induit leur translocation à la membrane et leur association aux tétraspanines CD9, CD53, CD81, CD82 et CD151 (Zhang et al., 2001) favorisant ainsi la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha_3$  des intégrines -s'associant entre autres à CD151 (Sterk et al., 2000)-. Cette phosphorylation par la PKC joue un rôle prépondérant dans la migration et l'adhérence cellulaire induites par les intégrines  $\alpha_3\beta_1$  (Zhang et al. 2001). Enfin, l'expression ectopique de

CD82 atténue la signalisation en aval de l'EGFR et diminue la migration de cellules épithéliales *in vitro* (Odintsova et al., 2000).

### *Les tétraspanines en tant que récepteurs agissant en trans*

Comme nous l'avons vu auparavant, les tétraspanines ont la propriété notable d'interagir en cis avec d'autres molécules (partenaires particuliers ou tétraspanines) pour former un réseau membranaire aux caractéristiques propres. Cependant, les cas d'interaction en trans avec les tétraspanines ne sont pas légions. Il y a quelques années, il était admis que la glycoprotéine d'enveloppe E2 du HCV interagissait avec CD81 (Pileri, 1998), notamment au niveau d'un acide aminé hydrophobe (la phénylalanine 186) dans le domaine EC2 (Higginbottom et al., 2000) équivalent au site SFQ du domaine EC2 de CD9 impliqué dans la fusion des gamètes (Zhu et al., 2002). Ce dernier site est particulièrement important puisque la mutation de celui-ci en AAA empêche la liaison de la LEL de CD9 à la protéine PSG17 en trans lors d'expériences de liaisons sur billes ou sur des cellules HEK ou œufs exprimant la forme non mutée de CD9 (Ellerman et al., 2003). Parmi les protéines PSG (Pregnancy-Specific Glycoprotein), une seconde a été identifiée par « pull-down » entre un domaine LEL de CD9 (couplé à la GST) et la protéine recombinante PSG19, en tant que protéine capable de se lier à la LEL de CD9 (Ha et al., 2008). Récemment, il a été démontré que la protéine de jonction serrée Claudin-1 et CD81 interagissaient au niveau des résidus T149, E152 et T153 de CD81 et de la région 62-66 de Claudin-1 pour former des complexes de corécepteurs (avec le récepteur scavenger B1 et l'occludine) critiques pour l'entrée du HCV (Davis et al., 2012). La liaison de CD81 avec un produit de clivage (par une protéase non identifiée agissant lors du transit d'Ewi-2 vers la membrane) de son partenaire Ewi-2 (Ewi-2wint) inhibe l'entrée du HCV (Rocha-Perugini et al., 2008 ; Potel et al., Cell. Mic. 2013). De plus en plus de tétraspanines sont identifiées en tant que protéines interagissant avec des protéines virales ou parasitaires et facilitant l'entrée de ces derniers comme par exemple CD63 interagissant avec la glycoprotéine d'enveloppe E2 du HCV (Park et al., PLoS ONE 2013). De même, les virions du papillomavirus type 16 humain colocalisent avec des microdomaines riches en CD151 et CD63 même si une interaction en tant que telle n'a pas

été rapportée (Spoden et al., 2008). En ce qui concerne CD151 précisément, il a été très récemment documenté que la formation de complexes entre CD151 et des intégrines liant la laminine était critique pour l'endocytose d'HPV16 (Scheffer et al., J. Virol. 2013). Un ligand pour la tétraspanine CD63 a été identifié par test de double hybride. Ce ligand est le facteur soluble TIMP-1 qui fait partie de la famille des protéines inhibitrices des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (TIMPs, Tissue Inhibitor of MetalloProteinases). Vue son action sur les métalloprotéases de matrice, TIMP-1 est donc directement impliqué dans la régulation du renouvellement des protéines de la matrice extracellulaire mais également dans la régulation de la prolifération, la survie cellulaire et la différenciation qui dépendent partiellement de l'activité des métalloprotéases. En outre, cette étude montre que l'expression de CD63 est nécessaire à l'effet anti-apoptotique et à la polarisation cellulaire induits par la surexpression de la protéine TIMP-1 (Jung et al., 2006).

Un ligand membranaire en trans de la tétraspanine CD82 a également été identifié. Il s'agit de la protéine DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines), un récepteur leurre (« decoy receptor ») de cytokines présent à la surface des cellules endothéliales, et qui interagit en trans avec CD82 (Bandyopadhyay et al., 2006). En effet, les cellules cancéreuses exprimant le CD82 se lient aux cellules endothéliales via l'interaction du CD82 avec DARC endothélial. Cette interaction entraîne une inhibition de la prolifération de ces cellules cancéreuses circulantes ainsi que le déclenchement chez ces cellules, de signaux de sénescence s'additionnant ainsi en un effet globalement anti-métastatique (Zijlstra & Quigley, 2006). De plus, la capacité de CD82 à être un suppresseur de tumeur est fortement diminuée dans les souris déficientes pour DARC indiquant que DARC est essentiel dans ce mécanisme. Très récemment, une étude en protéomique de l'interactome des microdomaines à tétraspanines a montré une interaction entre CD81 et Rac qui a été confirmée par précipitation et colocalisation lors d'expériences de microscopie confocale et TIRF (Tejera et al., 2013). CD81 est impliquée dans le maintien du turnover de Rac et une interférence ARN dirigée contre CD81 entraîne une augmentation de la formation d'adhésions focales ainsi qu'une diminution de la migration cellulaire (Maria Yàñez-Mò. 2012 communication Nijmegen 2012).

## Tétraspanines et remaniements membranaires

### *Phénomènes de fusion*

Certaines tétraspanines jouent un rôle dans des phénomènes impliquant des mécanismes de remaniement membranaire se déroulant par exemple lors de la fusion entre virus et cellules hôtes (que nous aborderons plus en détail par la suite), la fusion des gamètes ou encore celle des myoblastes. Par exemple, l'inactivation du gène codant pour la protéine CD9 induit une réduction majeure de la fertilité chez les souris femelles à cause d'un défaut de fusion entre l'ovocyte et le spermatozoïde (Kaji et al., 2000; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000) et des anticorps dirigés contre cette même tétraspanine bloquent la fécondation des ovocytes normaux *in vitro* (Chen et al., 1999; Le Naour et al., 2000). De plus, un ovule issu de souris dont l'expression de CD9 et CD81 a été invalidée n'est pas fertilisable alors que les souris simple et double hétérozygotes pour CD9 et CD81 ne présentent aucun défaut de fertilité ce qui laisse supposer que ces deux tétraspanines pourraient avoir des rôles complémentaires et /ou redondants (Rubinstein et al., 2006). Un motif SFQ présent dans la région variable du domaine EC2 de CD9 est nécessaire à la fusion des gamètes (Zhu et al. 2002). Une forme recombinante soluble du domaine EC2 de CD9 est capable de bloquer la fusion quand elle est incubée avec les ovocytes, qui expriment CD9, mais pas avec les spermatozoïdes. Cela suggère que CD9 n'interagit pas en trans avec un récepteur des spermatozoïdes mais intervient au cours de la fusion des gamètes en modulant en cis l'activité d'une molécule partenaire sur l'ovocyte (Zhu & Evans, 2002). D'autres résultats montrent que le CD9 contrôle la formation, sur l'ovocyte, de clusters contenant CD151 et l'un de ses partenaires moléculaires l'intégrine  $\alpha_6\beta_1$ . Ce complexe primaire semble impliqué dans la fusion avec le spermatozoïde puisqu'un anticorps anti-CD151 bloque partiellement ce mécanisme (Ziyyat et al., 2006). Il a récemment été proposé que CD9 génère sur l'ovule des sites d'adhérence préférentielle avec le spermatozoïde (Jégou et al., 2011) et que CD9 et CD81 soient deux protéines au rôle prééminent pour la formation de microvilli et d'exosomes chez l'ovule. Ce dernier point est particulièrement pertinent puisqu'il a été montré que les spermatozoïdes ne sont aptes à la motilité en sortie

des testicules qu'après un contact avec des exosomes issus de l'épididyme, de la prostate ou de l'épithélium génital féminin (Barraud-Lange et al., 2007).

A ce sujet, il semble que les tétraspanines ainsi que les liaisons entre tétraspanines et partenaires au sein même des exosomes permettent de définir des cibles cellulaires préférentielles. En particulier, l'interaction exosomale entre Tspan8 et les intégrines  $\alpha_4$  (Nazarenko et al., 2010) semble augmenter l'absorption d'exosomes par les cellules endothéliales et pancréatiques présentant la protéine CD54/ICAM1 à leur surface (Rana et al. 2012).

Au niveau intracellulaire, la fusion des membranes joue un rôle important, notamment lors de la fusion des endosomes tardifs aux lysosomes. Certaines des protéines majeures effectives dans ce phénomène sont les v-SNARE, TI-VAMP. Une équipe a montré que la déplétion de cette protéine cause une diminution de la quantité de CD82 présent à la membrane plasmique. Cette déplétion de TI-VAMP est responsable par contre d'une forte augmentation de l'endocytose spécifique d'EGFR après son activation (Danglot et al., 2010). Les auteurs expliquent ensuite que CD82 néosynthétisée est au moins partiellement transportée par des vésicules exprimant TI-VAMP lors de leur transit de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique, ce qui pourrait expliquer alors que l'expression de TI-VAMP contrôle l'expression membranaire de CD82. Sachant que CD82 régule la compartimentation d'EGFR (Odintsova et al., 2003), les auteurs suggèrent que la moindre quantité de CD82 à la surface due au transport modifié des vésicules déplétées en TI-VAMP cause une compartimentation et une endocytose altérées d'EGFR (Danglot et al., 2010).

L'implication des tétraspanines a été décrite dans d'autres phénomènes de fusion cellulaire. Ainsi, la reconstitution des muscles squelettiques après lésion nécessite l'expression des deux tétraspanines CD9 et CD81 afin de mener à bien la fusion des myoblastes qui permet la formation des myotubes. De plus, la protéine CD9P-1, une protéine à domaines Ig qui est un partenaire commun à CD9 et CD81, est nécessaire à la régénération musculaire. En effet, *in vitro*, des myotubes déplétés en CD9 et CD81 (et plus radicalement encore lorsque CD9P-1 est absent) fusionnent à une fréquence supérieure à celle des myotubes normaux aboutissant à une dystrophie (Stéphanie Charrin et al., 2013).

De même, des anticorps dirigés contre CD81 et CD9 bloquent la fusion des myoblastes au cours de la différenciation musculaire contrairement à la surexpression de CD9 qui augmente la formation de syncytium dans des cellules de rhabdomyosarcome (Tachibana & Hemler, 1999). Enfin, lors de la résorption osseuse, les tétraspanines Tspan5 et Tspan13 régulent de façon positive et négative respectivement la fusion des ostéoblastes durant le phénomène d'ostéoclastogénèse (Iwai et al., 2007)

Ces observations suggèrent que les tétraspanines constituent un environnement particulièrement favorable aux processus impliquant des remaniements membranaires tels que la fusion et la communication intercellulaire grâce aux exosomes.

## Migration cellulaire

Initialement, la tétraspanine CD9 était aussi appelée MRP-1 (Motility Related Protein-1). Cette protéine a été caractérisée pour sa capacité à inhiber la motilité cellulaire lorsqu'elle est surexprimée (Ikeyama et al., 1993). La régulation de la capacité migratoire des cellules par les tétraspanines est très intimement liée à la formation de complexes entre intégrines et tétraspanines. Par exemple, la répression du gène codant Tspan8 induit une diminution de la capacité migratoire via une augmentation de l'expression de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  liant la laminine et  $\alpha5\beta1$  liant la fibronectine (Guo et al., 2012). Notre laboratoire a récemment mis en évidence à ce titre qu'il existait une coopération entre la E-cadhérine, la p120 caténine et Tspan8 en ce qui concerne la motilité de cellules de carcinome de colon et que le ciblage par un anticorps monoclonal dirigé contre Tspan8 pouvait inhiber la diffusion métastatique de tels cancers (Greco et al., 2010). De même, CD151 peut moduler la fonction des intégrines en interagissant avec l'intégrine  $\beta_1$  dans les podocytes responsables de la filtration glomérulaire. L'interaction entre CD151 et l'intégrine  $\beta_1$  dans les podocytes augmente l'interaction entre l'intégrine  $\beta_1$  et la membrane basale glomérulaire contribuant ainsi à une filtration glomérulaire du sang optimale grâce au maintien de l'intégrité de cette membrane basale glomérulaire (Blumenthal et al., 2012; Sachs et al., 2012). En effet, des souris dont le gène codant CD151 a été invalidé présentent un phénotype de néphropathie (Sachs et al., 2006). Il a aussi été montré que des tétraspanines facilitent l'interaction des



intégrines avec leur(s) ligand(s). Par exemple CD81 facilite le rolling des leucocytes ainsi que la fixation de ceux-ci aux VCAM (Feigelson et al., 2003) et stabilise leur conformation active. C'est aussi le cas pour CD151 qui potentialise la liaison aux ligands de l'intégrine  $\alpha_3\beta_1$  (Nishiuchi et al. 2005) ou pour l'intégrine  $\alpha_3\beta_1$  qui, lorsqu'elle est liée à CD151 augmente sa liaison à la laminine-10 (Yamada et al., 2008). De plus, dans les études *in vitro*, l'utilisation d'anticorps anti-CD151 ou l'expression de mutants de CD151 réduit la migration cellulaire dépendante des intégrines  $\alpha_3\beta_1$  et  $\alpha_6\beta_1$  (Kazarov, 2002; Stipp & Hemler, 2000; Zhang et al., 2002). Egalement, l'inhibition de l'expression de CD151, sans modifier le niveau d'expression des intégrines dans des cellules A431, induit une diminution du recyclage des intégrines  $\alpha_3\beta_1$  durant la migration. Les tétraspanines pourraient ainsi agir sur la migration cellulaire en jouant sur le taux de recyclage des intégrines et plus généralement sur leur trafic intracellulaire (Winterwood et al., 2006).

## Régulation de fonctions protéolytiques. Interaction avec la métalloprotéase ADAM10

Les tétraspanines interagissent avec quelques ectoprotéases membranaires dont les sérines-protéases Matriptase et DPP4 (DiPeptidylPeptidase 4) et la métalloprotéase ADAM10. Cette dernière a été identifiée par protéomique dans notre laboratoire à partir d'un extrait de cellules de cancers du colon soumises à immunoprécipitation avec un anticorps dirigés contre la tétraspanine CD9 (André et al., 2006). De manière plus générale, les résultats de notre laboratoire montrent que la protéase ADAM10 constitue un des partenaires les plus souvent retrouvés dans les complexes à tétraspanines de divers types cellulaires sains ou pathologiques, ce qui corroborerait le fait que cette interaction soit sûrement importante physio-pathologiquement. Il semble que les tétraspanines soient capables d'inhiber l'activité d'ADAM10 puisque cette protéase voit son activité diminuée vis-à-vis du pro-TNF $\alpha$  lorsqu'elle est située dans le réseau de tétraspanines (Arduise et al., 2008). De plus, des anticorps monoclonaux dirigés contre les tétraspanines (en particulier CD82) sont capables de provoquer des regroupements locaux de tétraspanines et d'ADAM10. Ces anticorps peuvent stimuler le clivage non seulement de pro-TNF $\alpha$  mais aussi

de pro-EGF (Arduise et al., 2008). Il a été montré que CD82 agit en tant qu'inhibiteur de l'activation du plasminogène en interférant avec la liaison entre le plasminogène et son récepteur. Cette interférence est indirecte puisque l'expression de CD82 induit une redistribution du récepteur vers les sites d'adhésions focales (où CD82 est particulièrement exprimé) où ce récepteur peut alors se lier aux intégrines  $\alpha_5\beta_1$  (Bass et al., 2005). Récemment, l'équipe de Martin Hemler a mis en évidence que la tétraspanine Tspan12 interagissait aussi avec ADAM10 (un résultat contraire à ceux de notre laboratoire) et régula le clivage de la protéine amyloïde APP (dont nous évoquerons les mécanismes plus tard) dans des cellules de cancer du sein et de neuroblastomes en promouvant le clivage du prodomaine régulateur d'ADAM10 en particulier (Xu et al., 2009). A contrario, il a été aussi rapporté que l'adressage d'ADAM10 aux radeaux lipidiques (où se dérouleraient les activités  $\alpha$ -secrétases) inhibait l'activation de cette protéase vis-à-vis d'APP (Harris et al., 2009). Cependant, l'adressage d'ADAM10 aux rafts en remplaçant les domaines transmembranaires et cytoplasmiques par une ancre GPI semble être une méthode un peu radicale et on ne peut exclure que cet effet soit dû plutôt à la perte de la partie C-terminale d'ADAM10 dont le rôle est loin d'être restreint à un rôle d'adressage de la protéine (B. Harris et al., 2009).

## Tétraspanines et pathologies

### Pathologies rénales

Une mutation due à une insertion G383 du gène codant CD151 conduisant à une forme tronquée de cette protéine a été mise en évidence chez des patients présentant une protéinurie ainsi qu'une hématurie (Karamatic Crew et al., 2004). Cette forme de CD151 ne possède plus de domaine capable de s'associer aux intégrines  $\alpha_3$  et  $\alpha_6\beta$  et empêche donc la formation de complexes capables de se lier aux laminines dans le rein et au niveau de la peau. Les patients qui expriment cette forme mutée de CD151 sont atteints d'épidermolyse bulleuse pré-tibiale, de surdité et développent une néphropathie glomérulaire. Ces symptômes sont également présents et souvent plus sévères dans le cas de mutations de l'intégrine  $\alpha_6\beta_1$  humaine et de la sous-unité  $\alpha_3$  de l'intégrine murine ce qui est en faveur de

l'idée que ces symptômes sont liés à l'altération de fonctions communes aux intégrines et à CD151 (DiPersio et al., 1997; Kreidberg et al., 1996 ; Ruzzi et al., 1997). Quatre laboratoires distincts ont produits des souris déficientes pour cette tétraspanine (Baleato et al., 2008; Sachs et al., 2006; Takeda et al., 2007; Wright et al., 2004). Des défauts de l'épiderme ou de l'ouïe n'ont été rapportés chez aucune de ces souris. En revanche, une des études a montré des anomalies dans le fonctionnement des reins et il a été suggéré que CD151 participe au réassemblage correct des membranes basales des cellules épithéliales présentes dans les glomérules rénaux suite à un stress mécanique (Sachs et al. 2006). La différence de phénotype entre cette souche de souris déficientes en CD151 et celles produites par les deux autres laboratoires peut s'expliquer par une différence de fond génétique ou l'expression d'une forme tronquée de CD151. En effet, pour le cas de la souris knockout CD151 « australienne » (Baleato et al., 2008), le déclenchement de pathologies rénales caractérisées par une protéinurie est de 100% chez les souris au fond génétique FVB et nulle chez celles au fond C57/BL6. Comme nous l'avons mentionné plus haut, CD151 est exprimé au niveau des podocytes et colocalisent avec les intégrines  $\alpha_3\beta_1$  aux sites d'ancrage des podocytes à la membrane basale glomérulaire. Des lésions de la membrane basale sont visibles dans des glomérules de souris knockout CD151 et ces lésions semblent intervenir avant une désorganisation de la morphologie et de l'attachement des podocytes à la membrane. Le fait que des souris knockout conditionnelle de la sous-unité  $\alpha_3$  spécifique des podocytes phénotypent les défauts rénaux observés chez les souris knockout CD151 montrent que ces deux protéines ont un rôle clé dans le maintien de l'activité rénale (Sachs et al.2006).

## Troubles du système nerveux

Plusieurs tétraspanines sont exprimées dans le système nerveux et leur association avec les intégrines a également été confirmée dans ce système (Banerjee et al., 1997; Bronstein, 2000; Stipp & Hemler, 2000). CD9, Tspan2 et CD81 sont exprimées dans les cellules progénitrices d'oligodendrocytes où elles interagissent avec l'intégrine  $\beta_1$ . Ce complexe serait important pour la différenciation des oligodendrocytes mais n'aurait pas

d'effet sur la myélinisation de ces cellules (Terada et al., 2002). Tspan3 est exprimé dans tous les types cellulaires du système nerveux central mais son association avec Claudin-11 et intégrine  $\beta_1$  n'a été observé que dans les oligodendrocytes où elle semble favoriser leur prolifération et leur motilité (Tiwari-Woodruff et al.2004). Tspan5 est exprimé à des niveaux importants dans le neocortex, l'hippocampe, l'amygdale et les cellules de Purkinje du cervelet (Garcia-Frigola et al. 2000). L'importance physiologique des tétraspanines dans le cerveau est suggéré par les effets des anticorps anti-CD9, anti-CD81 et anti-CD151 sur la croissance des neurites (Banerjee et al., 1997; Stipp & Hemler, 2000). Par ailleurs, l'expression de CD81 est fortement augmentée sur les astrocytes et les cellules de la microglie après lésion de la moelle épinière chez le rat (Dijkstra et al., 2000). De plus, les souris déficientes pour CD81 présentent une augmentation de la taille du cerveau accompagnée d'une augmentation du nombre d'astrocytes et de cellules de la microglie (Geisert et al., 2002). Il a été suggéré que la prolifération des astrocytes et des cellules de la microglie peut être régulée par l'engagement par des anticorps dirigés contre les domaines extracellulaires de CD81 au niveau des contacts cellules-cellules (Kelić et al., 2001). La tétraspanine Peripherin/RDS (Farrar et al., 1991) serait impliqué dans la stabilisation et la compaction des disques du segment externe des cellules en cônes et en bâtonnets (contenant la iodopsine responsable de l'initiation de la phototransduction suivant la réception du signal lumineux photonique) ainsi que dans le maintien de la courbure du globe oculaire. Une délétion de 3 bases de ce gène semble causer une forme de rétinite pigmentaire (Jane-Farrar et al., 1991). Peripherin/RDS interagirait avec la protéine Melanoregulin qui semble avoir un rôle dans la fusion des membranes lors de la formation d'organites spécialisées dites « disk membranes », dans les photorécepteurs en bâtonnet de l'oeil (Boesze-Battaglia et al., 2007)

Le complexe  $\gamma$ -secrétase impliqué dans la formation de peptides amyloïdes  $A\beta$  à partir de son substrat membranaire APP (Amyloid Precursor Protein) est un des composants principaux des plaques séniles observées lors de la maladie d'Alzheimer (voir par ailleurs). Il est en interaction avec le réseau de tétraspanines via une interaction directe avec CD9 et CD81 comme l'a montré une comparaison de purifications en tandem de fibroblastes normaux et déficient en complexe  $\gamma$ -secrétase (Wakabayashi et al., 2009). L'analyse globale des niveaux d'expression des gènes de différentes tétraspanines dans le cortex frontal de

patients atteints de la maladie d'Alzheimer de différents stades de sévérités notés selon l'échelle de l'allemand Heiko Braak (Braak et al., 2003) a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre le niveau d'expression de la tétraspanine Tspan6 et la sévérité de la maladie –Supplementary data dans (Bossers et al., 2010)-. Des travaux sont actuellement menés à Louvain, Belgique pour établir un potentiel rôle de Tspan6 dans la modulation de l'activité du complexe  $\gamma$ -secrétase (Francesc Guix. Communication Nijmegen 2012)

## Fonctions plaquettaires

Les tétraspanines CD9, CD151 et CD63 sont fortement exprimées sur les plaquettes et s'associent à des intégrines (Boucheix et al., 2001; Fitter et al., 1999; Israels et al., 2001). La tétraspanine CD9 est le deuxième antigène plaquettaire le plus exprimé. Elle s'associe au récepteur du fibrinogène, l'intégrine  $\alpha_2\beta_3$  (Boucheix et al. 2001) et pourrait prévenir une suractivation de cette intégrine lors de lésions vasculaires (Mangin et al., 2009) en coopération avec un « pool » intracellulaire de CD63 s'associant au complexe  $\alpha_2\beta_3$ -CD9 après activation (Israels et al., 2010). Cependant, les souris déficientes en CD9 ont un taux de plaquettes normal et ne présentent pas de défaut dans l'activation ou l'agrégation plaquettaire. D'une manière assez similaire, CD151 potentialiserait l'activation de l'intégrine  $\alpha_2\beta_3$  (S J Israels et al., 2001). La tétraspanine Tspan9, relativement abondante dans les plaquettes (3000 molécules par plaquette), a pour partenaire le récepteur du collagène GPVI (Protsy et al., 2009) et des résultats préliminaires d'analyses de souris knockout pour Tspan9 semblent indiquer un défaut d'agrégation et d'étalement en réponse au collagène (Elizabeth Haining. Communication Nijmegen 2012). En revanche, les souris déficientes pour CD151 ont mis en évidence le rôle de cette tétraspanine dans l'agrégation plaquettaire et la rétractation du caillot, activités induites suite à l'activation de l'intégrine  $\alpha_2\beta_3$  (Lau et al., 2004). Aucune des souris knockout pour une tétraspanine ne présente jusqu'ici de troubles vasculaires notables durant le développement mais l'angiogénèse pathologique (i.e. lors de la formation de tumeurs) est fortement inhibée chez les souris knockout pour CD151 (Y. Takeda et al., 2007).

## Maladies infectieuses

### *Hépatite C*

Comme nous l'avons évoqué plus haut, de nombreuses tétraspanines ont été identifiées comme importantes dans la fusion entre cellules. Ce mécanisme de fusion est crucial lors des phases infectieuses de diverses maladies puisque elle permet ou non l'entrée de l'agent infectieux. L'exemple le mieux documenté du rôle des tétraspanines au cours des infections est celui de CD81 lors de l'infection par le virus de l'hépatite C (HCV). Le HCV est un petit virus à ARN enveloppé de la famille des flaviridae dont le génome code une polyprotéine. Celle-ci est clivée en plusieurs protéines structurales et non structurales par des protéases cellulaires et virales. Les protéines structurales incluent les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 qui permettent l'attachement du virus et l'entrée dans les cellules hôtes (Beeck et al., 2004). CD81 a été initialement identifié comme étant le récepteur cellulaire d'une forme soluble tronquée de la glycoprotéine E2 de certaines souches du HCV (Pileri, 1998). L'interaction E2-CD81 est spécifique puisque E2 ne se fixe pas sur CD9, CD63 ou CD151 (Flint et al., 1999). L'infectiosité des HCVpp (des particules rétrovirales exprimant les glycoprotéines d'enveloppe du HCV) peut être inhibée par des anticorps anti-CD81 (Bartosch et al., 2003), par une forme recombinante soluble du domaine EC2 de CD81 (Hsu et al., 2003), par inhibition de l'expression de CD81 par interférence ARN (Jie Zhang et al., 2004) ou par Ewi-2wint, un partenaire primaire de CD81 (Montpellier et al., 2011). A contrario, l'expression ectopique de CD81 induit une néo-susceptibilité à l'infection par les HCVpp dans des cellules HepG2 (Mckeating et al., 2004).

Si CD81 a donc initialement été proposé comme récepteur permettant l'entrée du HCV dans les cellules, son rôle exact au cours de l'entrée du virus n'est pas évident. Il semble que l'attachement initial de HCV à la cellule soit relativement non spécifique et dû à des interactions entre les protéines de surfaces E1 et E2 et des protéines telles que le récepteur LDL (Agnello et al., 1999; Chang et al., 2007), l'heparan sulfate (Barth et al., 2003) -remis en cause ensuite par (Helle & Dubuisson, 2008)-. Après cet attachement initial, le virus se lie à un récepteur de plus haute affinité tel que le CD81 plus précisément au niveau de sa boucle EC2. Il avait initialement été montré que la présence de CD81 dans les domaines à

tétraspanines était nécessaire à l'infection par HCV puisqu'une diminution du cholestérol membranaire de la cellule cible inhibe la présence de CD81 à la surface et l'entrée du HCV (Kapadia et al., 2007). Cependant, l'utilisation récente d'anticorps reconnaissant les formes de CD81 associées ou non aux TEMs montrerait plutôt que cette adressage de CD81 aux TEMs n'est pas obligatoire (Rocha-Perugini et al., 2009). De même, un rôle de Ewi-2wint dans le regroupement de molécules CD81 à la membrane ainsi qu'un effet sur sa diffusion a été rapporté (Potel et al., 2013) Le récepteur SR-B1 a aussi été proposé en tant que récepteur spécifique du HCV (Scarselli et al., 2002). De manière intéressante, on note ici que des particules de HCV peuvent se lier à des cellules CHO exprimant SR-B1 mais pas à des CHO exprimant CD81. Ceci suggèrerait alors qu'un contact initial avec SR-B1 est nécessaire avant fixation secondaire du HCV à CD81 (Evans et al., 2007). Ce même article met en évidence de plus un rôle de Claudin1 en tant que co-récepteur de HCV.

Il apparaît donc que l'entrée de HCV dans l'organisme soit due à un mécanisme finement coordonné de corécepteurs (dont CD81) fonctionnant séquentiellement. Cet assemblage de corécepteurs associés à l'enveloppe de HCV serait endocyté de manière clathrine-dépendante (Blanchard et al., 2006) suivie d'une fusion de l'enveloppe lipidique virale avec la membrane plasmique se déroulant probablement dans les endosomes (Meertens et al., 2006).

### *Autres infections virales*

Certaines tétraspanines semblent impliquées dans le cas d'autres infections virales. CD9 est ainsi impliquée dans l'infection par le virus de l'immunodéficience féline (FIV) (Willett et al., 1997), l'infection par le virus de la maladie de Carré chez les canidés -CDV, Canine Distemper Virus (Löffler et al., 1997) -. CD82 et CD81 (en particulier leur boucle EC2, là encore) semblent médier l'interaction entre la cellule hôte et le virus HTLV-1 (Mazurov et al., 2007). Le virus HIV-1 possède de nombreuses tétraspanines dont CD9, Tspan14, CD81, CD82, CD53, CD63. Ceci n'est pas très étonnant puisque l'on sait également que les sites de bourgeonnement des particules virales sont enrichis en tétraspanines (Nydegger et al., 2006). Des anticorps dirigés contre CD63 peuvent inhiber l'infection par HIV-1 de

macrophages et une interférence ARN dirigée contre cette protéine réduit la production de particules HIV-1 (Chen et al., 2008; Lindern et al., 2003). Il a été montré en complément, que les tétraspanines CD9 et CD81 (tétraspanine associée à CD4, récepteur de la protéine virale gp120) jouent un rôle important dans la fusion membranaire induite par le HIV-1 et que leur rôle commun serait plutôt défavorable à l'entrée du virus (Gordón-Alonso et al., 2006).

### *Plasmodium*

Le rôle de CD81 a également été mis en évidence dans l'infection par l'agent responsable du paludisme, le protozoaire parasite *Plasmodium*. L'expression de CD81 à la surface des hépatocytes est nécessaire pour l'infection par *Plasmodium falciparum* chez l'Homme et par *Plasmodium yoelii* chez la souris. En effet, les hépatocytes de souris CD81<sup>-/-</sup> ne sont plus infectables par des sporozoïtes de *Plasmodium yoelii*, tant *in vivo* qu'*in vitro*. De plus, des anticorps anti-CD81 humain et murin ou la réduction de son expression inhibent le développement *in vitro* des deux espèces du parasite (Silvie et al., 2003, 2006) Il semblerait qu'une partie de la grande boucle extracellulaire (EC2) de CD81 soit responsable de la permissivité des hépatocytes à l'infection par ce parasite (Yalaoui et al., 2008). De plus, le « pool » de CD81 présent dans les microdomaines à tétraspanines serait particulièrement impliqué dans l'infection par le parasite. La modulation du niveau de cholestérol, qui affecte le niveau d'organisation des microdomaines à tétraspanines, entraîne parallèlement des modifications du degré d'infection (Silvie et al., 2006).

### *Infections bactériennes*

La toxine diphtérique produite par *Corynebacterium diphtheriae* (bacille de Klebs-Loeffler) est une protéine cytotoxique qui inhibe la synthèse protéique en agissant comme une ADP-ribosyl transférase sur le facteur d'élongation 2 causant ainsi son inactivation. Elle est responsable d'une grande partie de la mortalité infantile jusqu'au XIXème siècle. L'entrée de cette toxine dans les cellules est rendue possible par sa fixation à son récepteur HB-EGF. En utilisant des cellules rénales de singe particulièrement sensible à l'infection par



*Corynebacterium*, Mitamura et ses collègues montrèrent il y a 20 ans que l'expression de l'homologue simien de CD9 entraînait une augmentation du nombre de sites cellulaires capables de lier la toxine diphtérique (Mitamura et al., 1992). Par la suite, il a été montré de manière plus formelle que HB-EGF était en interaction directe avec CD9 (Cha et al., 2000). Il semble dans ce cas que ce soit l'interaction entre CD9 et HB-EGF qui soit importante pour la sensibilité à la toxine et non son association globale au réseau de tétraspanines. En effet, bien que HB-EGF s'associe également avec CD81, CD82 et CD63, ces dernières tétraspanines n'ont pas d'effet sur la fixation de la toxine diphtérique (Nakamura et al., 2000). Enfin, en utilisant des approches de constructions chimériques entre CD9 et CD81 (Lagaudrière-Gesbert et al., 1997) et CD9 et CD63 (Ryu et al., 2000), il a été démontré que l'activité de co-récepteur de CD9 pour la toxine diphtérique était médiée par la grande boucle extracellulaire EC2 pour ce qui est de l'affinité pour la toxine et plutôt par les autres régions (particulièrement les régions transmembranaires) en ce qui concerne l'adressage de CD9 à la membrane.

Nous mentionnerons également ici que l'infection par l'entérobactérie *Escherichia coli* est due aux interactions entre la lectine FimH bactérienne et l'uropodine Ia/Tspan21 située sur les plaques urothéliales. Il est suggéré que cette interaction hôte pathogène entraîne un remodelage des complexes ultra-ordonnés composés de UPIa/UIPb/UIPc/UIPd qui constituent les éléments de base des plaques urothéliales responsables de la formation et du maintien de la barrière de perméabilité de la vessie. Ce remodelage a été observé en particulier par cryomicroscopie électronique (Wang et al., 2009) et permettrait alors une entrée de bactéries initiant ainsi une colonisation bactérienne avec des effets néfastes sur le tractus urinaire. Il semble enfin que la fixation de FimH entraîne également une réponse intracellulaire mettant en jeu une phosphorylation de UIPc par la Casein Kinase II ainsi qu'une élévation de la concentration en calcium intracellulaire ; une inhibition de l'activité de cette caséine kinase II diminue la réponse intracellulaire et l'invasion bactérienne (Thumbikat et al., 2009). De même, il a été montré par une équipe de Paris que l'infection des cellules épithéliales par *Listeria monocytogenes* nécessitait l'expression de la tétraspanine CD81. En effet, *Listeria* se lie à deux récepteurs cellulaires E-cadhérine et Met et parmi 3 tétraspanines se liant à PI4KII $\alpha$  (un effecteur en aval de Met), seul CD81 est nécessaire pour l'internalisation bactérienne (Tham et al., 2010).

## Cancers

### *Tétraspamines et progression tumorale*

De nombreuses études cliniques sur le cancer montrent un lien entre le niveau d'expression de certaines tétraspamines et la formation de métastases. En effet, dans les cancers du sein, du poumon, du colon, de la prostate et du pancréas, un niveau d'expression élevé du CD9 et du CD82 sur les cellules de la tumeur est associé à un pronostic favorable et une diminution de leur expression est souvent corrélée avec l'apparition de métastases - pour revue. (Boucheix et al., 2001; Zöller, 2009)-. A contrario, la surexpression de CD151 dans les cancers du poumon, du colon et de la prostate est corrélée avec un mauvais pronostic (Ang et al., 2004; Hashida et al., 2003; Tokuhara et al., 2001). En outre, les expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré que le CD9 (Ikeyama et al., 1993) et le CD82 (White et al., 1998) sont des suppresseurs de métastases tandis que le CD151 et le Co-029 (Szala et al., 1990) augmentent le potentiel métastatique (Claas et al., 1998; Gesierich et al., 2006).

Cependant, de manière générale, la plupart des tétraspamines n'ont pas de rôle sur la croissance de la tumeur primaire. Tspan13 peut néanmoins inhiber la prolifération de cellules tumorales *in vitro* et leur développement lors d'une xénogreffes dans des souris SCID (Huang et al.2007) et de manière opposée, CD151 promeut la croissance tumorale de xénogreffes de cellules de cancers du sein (Yang et al., 2008). Il est probable que les tétraspamines jouent un rôle dans la nidation des métastases dans des organes distants du foyer initial. En effet, la surexpression de CD9 ou CD82 réduit la formation de colonies cancéreuses secondaires (Ikeyama et al., 1993; Yang et al., 2001). De par les effets des tétraspamines sur la migration et l'attachement aux intégrines détaillés plus haut, il est évident qu'une dérégulation de ces processus peut se manifester lorsque l'homéostasie des tétraspamines est affectée.

Les mécanismes entraînant le développement et la progression d'un cancer font intervenir notamment les intégrines lors de la migration cellulaire et les facteurs de croissance lors de la phase de croissance et la prolifération des cellules cancéreuses. Nous

avons vu précédemment que les tétraspanines modulent ces différents mécanismes. On peut donc très raisonnablement penser qu'une modification de l'équilibre établi entre tétraspanines et interacteurs puisse avoir comme conséquence une bascule de la cellule vers un état de croissance dérégulé, potentiellement cancéreux. Cette commutation entre un état sain et un état dérégulé de la cellule pourrait être liée alors à un changement du pattern d'expression local des tétraspanines de la cellule considérée. Ceci pourrait alors entraîner une dérégulation (par perte de localisation membranaire par exemple) de la fonction des partenaires associés.

### *Rôle des partenaires enzymatiques des tétraspanines*

Nous avons vu que les tétraspanines, de par leur capacité à organiser la membrane plasmique en microdomaines à la chimie et la composition particulières, permettent à leurs partenaires « d'effectuer leur rôle » avec des efficacités variables. Il semble de plus, que les tétraspanines aient un rôle de maintien de l'homéostasie et qu'une dérégulation de leur expression puisse avoir des conséquences pathologiques assez importantes médiées principalement par leurs partenaires. Parmi ces partenaires particulièrement étudiés dans le cadre de pathologies de type cancéreuses, nous mettrons particulièrement en avant les métalloprotéases. En effet, certaines de celles-ci ont été retrouvées associées au réseau de tétraspanines lors de différentes études.

Quelques relations entre tétraspanines et des métalloprotéases de matrice (MMPs) ou collagénases solubles ont été rapportées. Le niveau d'expression des tétraspanines CD81, CD9 ou CD82 semble entraîner une modulation de l'expression des protéases MMP1 (collagénase interstitielle) et MMP2 (72kDa type IV collagenase) dans plusieurs lignées cancéreuses (mélanomes, myélomes, cancer à petites cellules). Ceci peut avoir des conséquences pathologiques non négligeables puisque l'activité des collagénases est comme leur nom l'indique, la dégradation de composants de la matrice extracellulaire favorisant la dissémination de cellules cancéreuses. MMP1 par exemple voit son expression corrélée avec un pronostic défavorable de l'évolution de nombreux cancers tels que les cancers colorectaux et mammaires (Poola et al., 2005).

La métalloprotéase ancrée à la surface MT1-MMP régulant la protéolyse de l'environnement matriciel lors de l'invasion cancéreuse et l'angiogénèse, notamment en maturant MMP2, peut se trouver incluse dans le réseau de tétraspanines via notamment une interaction avec CD151 ainsi que l'intégrine  $\alpha3\beta1$  (Yañez-Mó et al., 2008). De même, dans un certain nombre de tumeurs, MT1-MMP a été trouvée associée aux tétraspanines CD9, CD81, Tspan12 et la perte de l'une ou l'autre de ces tétraspanines a pour conséquence un défaut d'expression de MT1-MMP à la membrane et un guidage préférentiel de cette dernière vers la voie de dégradation lysosomale (Lafleur, Xu, & Hemler, 2009). A l'inverse, une surexpression de CD63 entraîne une augmentation de la dégradation lysosomale de MT1-MMP (Takino et al., 2003).

Au sein du laboratoire, nous avons démontré auparavant qu'une importante fraction d'ADAM10 est associée avec plusieurs tétraspanines « classiques » telles que CD9, CD81 et CD82. Cette étude montre que cette métalloprotéase est une protéine partenaire associée au réseau de tétraspanines. Une étape supplémentaire dans la compréhension de cette association est que l'engagement de certaines tétraspanines par des anticorps monoclonaux spécifiques entraîne une stimulation du clivage de l'ectodomaine de deux substrats d'ADAM10, TNF $\alpha$  et EGF. Ce clivage en cis est ADAM10-dépendant et l'engagement des tétraspanines ne modifie pas l'interaction d'ADAM10 avec le réseau de manière générale. Ainsi donc, la localisation d'ADAM10 dans un compartiment membranaire riche en tétraspanines pourrait avoir un rôle fonctionnel pertinent de régulation de l'activité enzymatique de cette protéase (Arduise et al., 2008).

L'association d'ADAM10 avec les tétraspanines a également été rapportée par le groupe de M. Hemler au cours d'une recherche par spectrométrie de masse de partenaire de la tétraspanine Tspan12. Ainsi, l'association d'ADAM10 avec cette tétraspanine aurait également des conséquences fonctionnelles puisqu'elle accélère la maturation d'ADAM10 (i.e. le clivage du prodomaine) avec pour conséquence que le clivage d'APP par ADAM10 (Xu et al., 2009).

De plus, le groupe de M. Yanez-Mô a également identifié ADAM17, la plus proche voisine évolutive d'ADAM10, en tant que partenaire de la tétraspanine CD9 à la surface de leucocytes et de cellules endothéliales. Cette interaction a là encore comme conséquence de

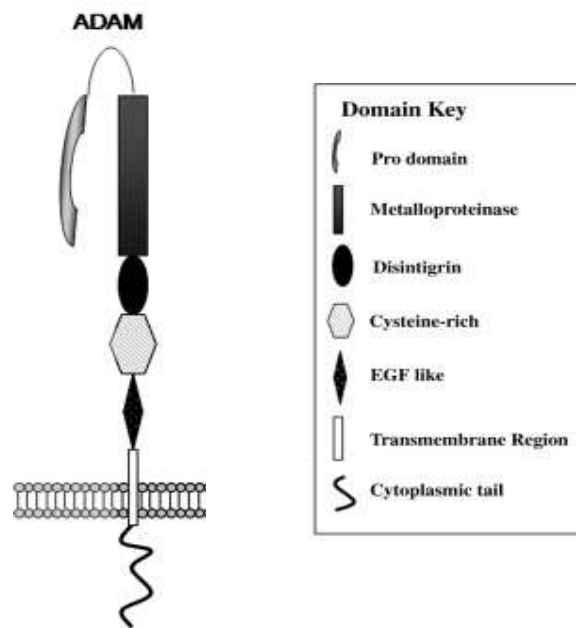
moduler l'activité enzymatique de la protéase associée. En effet, dans ce cas CD9 aurait un rôle inhibiteur du clivage de TNF $\alpha$  médié par ADAM17 (Gutiérrez-López et al., 2011). Ce travail est d'autant plus intéressant qu'il est en accord avec des résultats obtenus dans ce même laboratoire quelques années auparavant dans des cellules de carcinomes de colon humain dans lesquelles CD9 avait un rôle inhibiteur de la prolifération et de la tumorigénicité. L'effet des tétraspanines vis-à-vis d'ADAM17 est aussi détectable lorsque l'on examine le clivage ADAM17-dépendant des substrats ICAM-1 et VCAM-1 impliqués entre autres dans des maladies inflammatoires et tumorales. En effet, CD9 permet de maintenir sous contrôle l'activité d'ADAM17 vis-à-vis d'ICAM-1 dans des cellules endothéliales activées (HUVECs) et de préserver un niveau d'expression d'ICAM-1 membranaire permettant un recrutement leucocytaire efficace (Barreiro et al., 2005). On propose que l'arrêt du « rolling » des leucocytes dans la circulation soit dû à des nanoplateformes membranaires endothéliales constituées de fortes concentrations locales de CD9-ICAM-1 et CD151-VCAM-1. Ainsi, la forte densité d'interactions entre ICAM-1 et VCAM-1 endothéliaux et respectivement LFA-1 et intégrine  $\alpha_4\beta_1$  leucocytaires serait un prérequis à l'extravasation ultérieure des leucocytes (Barreiro et al., 2008).

Un mécanisme similaire est rapporté également pour la tétraspanine CD63 qui lie la protéine P-sélectine au sein de microdomaines endothéliaux riches en tétraspanines. La P-sélectine ainsi contrainte par le réseau, se lie à la molécule leucocytaire PSGL-1 et cette interaction promeut le recrutement leucocytaire (Doyle et al., 2011). La perte de CD63 empêche la localisation dans des microdomaines membranaires de P-sélectine dans des cellules endothéliales activées et inhibe fortement le recrutement leucocytaire.

Il semble donc que les tétraspanines, de par leur rôle dans la ségrégation de protéines en microdomaines membranaires, puissent avoir un rôle modulateur de l'activité de métalloprotéases. En effet, la présence ou le recrutement de ces enzymes ainsi que quelques-uns de leurs substrats dans ces microdomaines pourrait permettre une régulation des phénomènes de clivage médiés par ces protéases par action sur la proximité et/ou l'accessibilité des substrats ainsi que l'efficacité enzymatique.

## La famille ADAMs

Les ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease) forment une famille (dite ADAMALYSIN) de glycoprotéines membranaires de type I d'environ 750 acides aminés. Cette famille fait elle-même partie de la super famille des protéases à zinc (Metzincines). Au sein de cette super famille, les ADAMs sont des metzincines. Elles sont impliquées dans la régulation de fonctions cellulaires variées telles que l'adhérence, la migration, la fusion ou la prolifération cellulaire. Ce sont des protéines multidomaines dont le produit initial de traduction est constitué d'un peptide signal, d'un pro-domaine, d'un domaine métalloprotéase dépendant du zinc, d'un domaine désintégrine à la séquence très conservée, d'un domaine riche en cystéines, d'un domaine EGF-like, d'un domaine transmembranaire hydrophobe et d'une extrémité carboxy-terminale cytoplasmique de taille variable (Wolfsbergt et al., 1993) (**Figure 5**). Les premières ADAMs identifiées en tant que telles sont les fertilines  $\alpha$  et  $\beta$  des cellules sexuelles nommées par la suite ADAM1 et ADAM2 (Blobel et al., 1990). Ces protéines sont liées à des processus fonctionnels tels que les interactions entre ovule et spermatozoïdes, la différenciation des cellules nerveuses, la migration cellulaire, le guidage des axones, le développement des fibres musculaires ainsi que de nombreuses réactions immunitaires et manifestations pathologiques telles que la maladie d'Alzheimer, des encéphalopathies ou de très nombreux cancers.



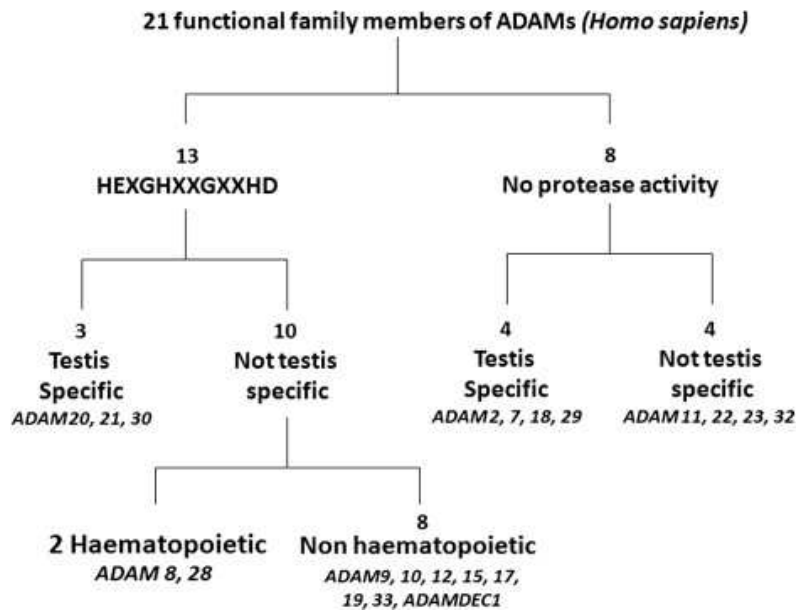
**Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation modulaire des ADAMs.** (Edwards et al., 2008)

## Expression et évolution des gènes codant les ADAMs

Les ADAMs sont présentes des invertébrés (*C.elegans*, *D.melanogaster*) aux mammifères mais absentes chez *E.coli*, *S.cerevisiae* et chez les plantes. Cependant, il existe, chez *Arabidopsis thaliana*, des protéines (famille EGY) à la membrane des chloroplastes qualifiées de métalloprotéases ayant un site HExxH prédit pour pouvoir coordonner un atome de zinc, mais celles-ci ont huit domaines transmembranaires et ne semblent pas génétiquement liées aux ADAMs (Chen et al., 2005). De même, il existe des séquences ADAM-like chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* mais non chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les ADAMs sont au nombre de 40 chez les mammifères. A ce jour, 25 gènes codant des ADAMs ont été recensés chez *H. sapiens* dont 4 pseudogènes. Parmi ces 21 ADAMs réellement exprimées, seules 12 possèdent un domaine métalloprotéase actif extracellulaire et semblent fonctionnelles en termes d'activité protéasique (ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30, 33). On suppose que les autres ADAMs dont le site de liaison du zinc est altéré, ont un domaine métalloprotéase ayant un rôle dans le repliement et les

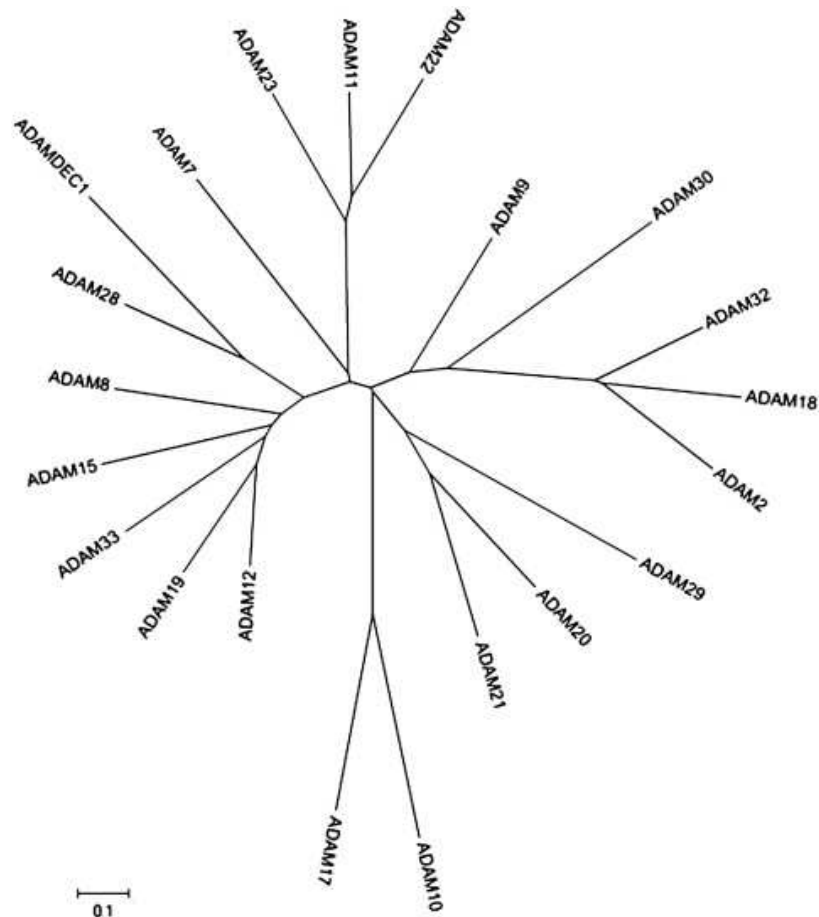
interactions entre protéines plutôt qu'une fonction catalytique. Le profil d'expression des ADAMs est variable : certaines sont exprimées de façon très restreinte par exemple dans le testicule (ADAM2, 7, 18, 20, 21, 29, 30) et ont un rôle important dans la spermatogénèse et la fonctionnalité des spermatozoïdes alors que d'autres sont exprimées de façon plus large dans les tissus somatiques (ADAM9, 10, 11, 12, 15, 17, 19, 22, 23, 28, 33). ADAM8 est quant à lui restreint aux lignées cellulaires hématopoïétiques (**Figure 6**). Comme c'est souvent le cas pour les protéines membranaires de type I, l'épissage alternatif du pré-ARN conduit soit à la forme « normale » transmembranaire, soit à une forme dépourvue du domaine transmembranaire et soluble et potentiellement sécrétée dans le milieu extracellulaire. Ainsi, l'homologue murin d'ADAM10 par exemple, présente une forme dite « longue » correspondant à une classique protéine membranaire de type I alors que la forme dite « courte » est uniquement constituée des domaines extracellulaires qui est sécrétée par la cellule (Yavari et al., 1998). Le même type de formes a aussi été observé chez l'homme avec ADAM12 (Wewer et al., 2006), ADAM9 (Mazzocca et al., 2005) et ADAM28 (Fourie et al., 2003)... De façon générale, l'épissage alternatif induit chez les ADAMs des différences de taille du domaine cytoplasmique. A cet égard, le cas le plus extrême est ADAM15 qui compte 13 variants (Kleino et al., 2007) dont on sait qu'ils sont évolutivement assez proches des ADAMs 8, 9, 12, 19, 28 mais dont l'activité enzymatique n'a pas été testée. Cette diversité peut avoir des conséquences non négligeables puisque, dans le cas d'ADAM15, certaines formes ainsi traduites permettent une multiplicité de combinaisons de sites de liaison SH3 en carboxy-terminal. Cette hétérogénéité permet une modulation des capacités d'interaction avec certaines protéines « cibles » comme nous l'avons évoqué plus haut (Kleino et al. 2009).





**Figure 6: Classification des 21 ADAMs humaines fonctionnelles ou présumées selon leur site d'expression et leur activité protéasique.** (Edwards et al., 2008)

Lorsqu'une phylogénie des gènes codants les ADAMs humaines est effectuée sur la base de leur domaine métalloprotéase, on observe une séparation nette des ADAM10 et 17 du reste des ADAMs (**Figure 7**). Cette « dichotomie » est extrêmement conservée au cours de l'évolution puisqu'on observe un même phénomène aussi loin que chez *Ciona intestinalis* qui est un des invertébrés les plus proches des vertébrés. En effet, chez cette espèce, il existe 4 gènes codant des ADAMs parmi lesquels ADAMa et ADAMb respectivement orthologues d'ADAM17 et ADAM10 définissent un sous-groupe A-ADAM alors que les gènes ADAMc1 et ADAMc2 sont regroupés en B-ADAM en tant qu'ancêtres de la grande majorité des autres ADAMs (Huxley-Jones et al., 2007). Par la suite, une organisation similaire a été obtenue par comparaison des séquences codantes totales des ADAMs chez *Mus musculus* et *Homo sapiens* (Kleino et al., 2007). Cette séparation nette et conservée d'ADAM10 et 17 par rapport aux autres a, de fait, suscité l'intérêt de la communauté pour ces deux ADAMs apparentées.



**Figure 7 : Arbre phylogénétique des ADAMs basé sur la séquence des domaines métalloprotéases.**

L'échelle représente 10% de substitution par acide aminé. (Edwards et al. 2008).

## Structure des ADAMs

En se basant sur le modèle des métalloprotéases de la matrice (MMP), il a été proposé que le prodomaine des ADAMs permette d'inhiber à l'état basal l'activité protéasique de la protéine. Pour ce faire, il y a liaison entre une cystéine orpheline (i.e. non impliquée dans un pont disulfure) du pro-domaine et le domaine métalloprotéase au niveau de l'atome de zinc nécessaire à l'activité protéasique. Cette liaison empêche la coordination de la molécule d'eau nécessaire à l'hydrolyse de la liaison peptidique. Le pro-domaine permet ainsi un strict contrôle de l'activation de la métalloprotéase en la maintenant en

conformation inactive à la façon d'un interrupteur à cystéine. Ce pro-domaine est clivé au besoin lors du transport dans les vésicules golgiennes (Schlöndorff et al., 2000) par des protéases convertases de type furine qui reconnaissent un motif conservé Rx(R/K)R. Il semble en effet qu'ADAM10 soit catalytiquement active dès le compartiment golgien (Skovronsky et al., 2000). Récemment, une étude a mis en évidence le rôle d'une metzincine, méprine $\beta$ , en tant que protéase chargée de cliver le prodomaine d'ADAM10 et de la rendre active (Jefferson et al., 2012). Cependant, il a également été proposé que l'inhibition d'ADAM10 durant son trafic intracellulaire n'est pas due à cette cystéine orpheline mais plutôt à la partie C-terminale du prodomaine et qu'un prodomaine d'ADAM10 recombinant et soluble agit en tant qu'inhibiteur compétitif sur une forme active d'ADAM10 (débarassée de son prodomaine) (Moss et al., 2007). Le prodomaine agirait également en tant que chaperon intramoléculaire permettant un repliement et un trafic intracellulaire corrects de la protéine (Fahrenholz et al., 2000).

L'activité protéolytique du domaine métalloprotéase dépend de la présence d'une séquence HEXGHXXGXXHD (reprolysin-type) du site actif. La moitié des ADAMs connues ne possède pas cette séquence. L'atome de zinc nécessaire à l'activité protéolytique est lié aux trois histidines de ce site actif. Bizarrement, aucune séquence consensus n'a été identifiée en tant que cible de l'activité protéasique des ADAMs même s'il existe quelques positions de certains acides aminés favorables à ce clivage. La seule caractéristique commune des sites de clivage identifiés est qu'ils sont très proches de la membrane (à une douzaine d'acides aminés, en général).

Le domaine désintégrine des ADAMs est analogue en termes de structure à celui des SVMPs (Snake Venom MetalloProtease) qui se lient aux plaquettes et bloquent leur agrégation via l'interaction entre ce domaine désintégrine et les intégrines à la surface des plaquettes (Scarborough et al., 1993). Il est constitué d'environ 90 acides aminés et contient une boucle dite « disintegrin loop » de 14 acides aminés fermée par un pont disulfure. L'interaction entre les intégrines et les ADAMs est qualifiée de RGD dépendante ou de RGD indépendante selon la présence ou non de cette séquence dans le domaine désintégrine. La présence de cette séquence dans ADAM15 lui permet de se lier par exemple à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_5\beta_1$  à la surface plaquettaire (Jeon et al., 2007).

Toutes les autres ADAMs à l'exception d'ADAM10 et d'ADAM17 possèdent une séquence consensus de type  $Rx_6DLPEF$  connues pour se lier à certaines intégrines (Eto et al., 2002). De nombreuses interactions de ce type ont pu être mise en évidence telles qu'ADAM2 et 9 avec  $\alpha_6\beta_1$  (Almeida et al., 1995), ADAM23 avec  $\alpha_v\beta_3$  (Cal et al., 2000), ADAM1, 2, 3 et 9 avec  $\alpha_9\beta_1$  (Eto et al., 2002) ou encore ADAM28 et 7 avec  $\alpha_4\beta_1$  et  $\alpha_4\beta_7$  (Bridges et al., 2005). Il semble également qu'une séquence  $xECD$  soit nécessaire à l'interaction entre ADAM2 et 9 avec  $\alpha_6\beta_1$  (Nath et al., 2000; Wolfsberg & White, 1996). Dans le cas d'ADAM10 et ADAM17, l'absence de motif consensus de type RGD ou de preuve d'une liaison de ces protéases aux intégrines fait que l'on qualifie le domaine de ces deux ADAMs de « disintegrin-like ». Cependant, très récemment, une étude a montré que, bien qu'ADAM17 ne possède ni séquence RGD ni motif  $RX_6DLPEF$ , elle peut se lier à l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  *in vitro*, mais le site de liaison reste encore à déterminer (Gooz et al., 2012).

Les domaines riches en cystéines et EGF-like des ADAMs sont les deux régions de ces protéines dont les fonctions respectives sont les moins connues. Même si de nombreuses études sont menées sur le domaine riche en cystéines, sa fonction reste encore mal comprise.

Certaines ADAMs (1, 3, 12 et 14) présentent dans leur domaine riche en cystéines une région hydrophobe ayant des similarités avec des peptides de fusion de protéines virales (Blobel et al., 1992). Il a donc été proposé que certaines ADAMs puissent jouer un rôle dans la fusion cellulaire.

Une autre hypothèse concernant le rôle de ce domaine est qu'il favoriserait l'interaction des ADAMs avec d'autres protéines. En effet, une équipe a montré qu'une protéine recombinante soluble, contenant uniquement les domaines riche en cystéine et désintégrine d'ADAM13, peut se lier à la fibronectine (Gaultier et al., 2002). Il a également été montré que l'adhérence de fibroblastes en culture via l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  à la fibronectine nécessitait comme corécepteur de l'intégrine l'« heparan sulfate proteoglycan » syndecan-4 (Saoncella et al., 1999). Syndecan-4 a ensuite été montré comme pouvant se lier au domaine riche en cystéine de la métalloprotéase ADAM12 (Iba et al., 2000). Il est donc possible qu'ADAM13 aide le complexe intégrine  $\alpha_5\beta_1$ -syndecan à interagir avec la fibronectine en se liant à la fois à la fibronectine et à syndecan. On peut également penser qu'ADAM13 puisse

contribuer à stabiliser l'interaction de ces 3 molécules via son domaine riche en cystéines. De plus, chez *Macaca fascicularis*, il a été montré que le domaine riche en cystéines d'ADAM2 était capable de lier des molécules présentes à la surface des spermatozoïdes par une interaction hydrophobe, ce qui pourrait s'accorder avec l'hypothèse initiale de Blobel (Kim et al., 2010).

Quant au domaine EGF-like, il a longtemps été considéré qu'il était absent chez ADAM10 et 17 (Janes et al., 2005). Il est difficile de dégager un rôle pour ce domaine puisque ce domaine est au mieux étudié en tandem avec le domaine riche en cystéines de sorte qu'aucune conclusion précise quant au rôle de ce domaine précis n'est vraiment possible. Certains lui attribuent un simple rôle d'espaceur entre le domaine métalloprotéase et le domaine transmembranaire (S. Takeda, 2009). Cependant, une étude récente a montré qu'ADAM17 était présent sous forme de multimères fonctionnels dans des cellules HEK-293 et que cette multimérisation nécessitait la présence du domaine EGF-like (Lorenzen et al., 2011).

Le domaine cytoplasmique des ADAMs est extrêmement variable, à la fois par sa taille et sa séquence peptidique. Il contient des motifs qui sont des cibles potentielles des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la régulation de l'activité métalloprotéasique et/ou dans le contrôle de la maturation et de la localisation subcellulaire. Le motif le plus fréquemment retrouvé est PxxP, qui est un motif de fixation de protéines ayant un domaine SH3. Il est présent chez un quart des ADAMs. Il a ainsi été montré que les épissages alternatifs d'ADAM15 conduisait à la synthèse de protéines possédant différents domaines cytoplasmique influençaient le recrutement potentiel de protéines à domaines SH3 de type nexine33 et nephrocystine (Kleino et al.2009). Plusieurs ADAMs possèdent également des sites de phosphorylation par des sérine/thréonine kinases et/ou des tyrosines kinases. Ces motifs permettent à des protéines ayant un domaine SH2 de se fixer. Il existe plusieurs protéines pouvant être associées aux ADAMs via leur région cytoplasmique telles que Abl,  $\alpha$ -actinin-1 et 2, Bcr-Abl, endophiline I, ERK, Fyn, Grb2, Hck, Lck, MAD2, MAD2 $\beta$ , PACSIN2, PI3kinase, PKC $\delta$ , SH3PX1, SAP97, Src et Yes -récapitulés dans la revue (Seals & Courtneidge, 2003)-.

Certaines ADAMs possèdent plusieurs motifs identiques dans leur domaine cytoplasmique. Par exemple, le domaine intracellulaire d'ADAM15 est composé de huit domaines SH3 et de quatre motifs de phosphorylation par des tyrosines kinases (Howard, 1999). Ce domaine ainsi que les interactions qu'il propose est extrêmement important car c'est le siège de plusieurs phénomènes de régulation de l'activité enzymatique des ADAMs.

Le rôle de ce domaine intracellulaire des ADAMs dans la régulation de leur fonction peut aussi dépendre des conditions de stimulation et/ou des substrats étudiés. Ainsi, si le domaine intracellulaire d'ADAM17 est dans certains cas dispensable comme le montre l'activité d'une forme tronquée d'ADAM17 vis-à-vis du clivage de TNF $\alpha$ . Cependant la phosphorylation de la thréonine 735 de ce même domaine est indispensable à la stimulation par l'IL1 $\beta$  ou à l'activation de la voie MAPKinase p38 dans la régulation du clivage de ligands de l'EGFR (Hall & Blobel, 2012; Xu & Derynck, 2010).

## Rôles cruciaux d'ADAM10 et ADAM17

Le clivage protéolytique des protéines membranaires de type I ou II est extrêmement important pour la physiologie et la pathologie humaine. On considère qu'au moins 4% des protéines présentes à la surface des cellules sont sujettes à un clivage protéolytique (Arribas & Massagué, 1995). La caractéristique principale (et la plus étudiée) des ADAMs est la capacité à effectuer de tels clivages sur des cibles diverses permettant la libération de facteurs actifs dans le milieu extérieur, la génération de fragments protéiques ou le décrochage des cellules. Parmi les ADAMs, la génération de souris KO pour ADAM10 ou ADAM17 a permis de montrer que ces protéines étaient cruciales puisque ces souris présentaient une mort embryonnaire ou périnatale (Hartmann et al., 2002; Peschon et al., 1998). Ceci a entraîné logiquement que les ADAMs les plus étudiées sont ADAM17 et sa plus proche voisine évolutive ADAM10.

L'identification en 1997 d'ADAM17 en tant que protéase responsable de la sécrétion de TNF $\alpha$  constitue l'élément fondateur de la biologie des protéases de cette famille car il s'agit de la découverte du premier substrat physiologique d'une ADAM précise (Black et al.,

1997; Moss et al., 1997). Un modèle de souris KO ADAM17 ayant une délétion dans le site de liaison au zinc du domaine catalytique a été généré et a permis de mettre en évidence une mort périnatale importante indépendante de la diminution de clivage de TNF $\alpha$  puisque des souris KO pour le TNF $\alpha$  ou ses récepteurs ne meurent pas prématurément signant ainsi l'importance de cette protéase pour cliver et libérer d'autres facteurs solubles essentiels, eux, à la survie et au développement. Outre des problèmes oculaires (cornée atténuée, absence de sac conjonctif et de réflexe de clignement des yeux), les quelques souris survivantes ont un poids faible à cause d'un hypermétabolisme (Gelling et al., 2008) et divers problèmes épithéliaux, pigmentaires et pileux (Peschon et al., 1998). Le fait que les souris à ADAM17 inactif aient un phénotype proche de celui de souris knockout pour TGF $\alpha$  ou pour EGFR (Miettinen et al. 1995) a mis la puce à l'oreille à quelques équipes et il a été démontré qu'ADAM17 était une, sinon la métalloprotéase impliquée dans le clivage de TGF $\alpha$  (Peschon et al.1998). Un même raisonnement et des résultats similaires ont été obtenus à propos de l'implication d'ADAM17 dans le clivage d'autres substrats d'EGFR (Lee et al., 2003) (**Tableau 1**).

ADAM10 a été découverte en tant que métalloprotéase capable de dégrader la myéline dans des préparations de cerveau bovin. Par la suite, sa présence a été documentée dans la plupart des tissus du développement embryonnaire jusqu'à l'âge adulte. L'inactivation du gène d'ADAM10 chez la souris entraîne une létalité embryonnaire précoce à 9.5 jours post-coitum. Les souris présentent alors de nombreux défauts au niveau du développement du système nerveux central, du système cardiovasculaire et des somites. Une observation très similaire est faite chez des souris chez lesquelles la signalisation Notch/Delta est déficiente (Hartmann et al., 2002). Il est très intéressant au niveau évolutif de constater que l'orthologue d'ADAM10 chez *Drosophila melanogaster*, Kuzbanian, clive protéolytiquement le récepteur Notch et est essentiel pour la spécialisation et la différenciation des cellules neurales lors du développement du système nerveux (Pan & Rubin, 1997). De plus, ce lien potentiel entre ADAM10 et Notch est renforcé par le fait que les souris invalidées pour le gène Notch phénotypent les souris KO ADAM10. Similairement, chez *Caenorhabditis elegans*, l'orthologue d'ADAM10, Sup17, supprime le phénotype

observé chez des vers pour lesquels Notch/Lin12 est constitutivement actif. Il semble donc que le rôle d'ADAM10 vis-à-vis de cette cible soit très important et grandement conservé.

APP a été proposé comme substrat d'ADAM10 (Kojro et al., 2001). Cependant, les fibroblastes issus de souris knockout pour ADAM10 n'ont pas de déficience notable vis-à-vis de l'activité  $\alpha$ -secrétase sur APP. Il a donc été proposé que ceci soit dû à une compensation fonctionnelle assurée par ADAM17 (Hartmann et al., 2002). Cependant, il est intéressant de noter en ce qui concerne la compensation éventuelle pouvant s'exercer entre ADAM10 et ADAM17 que les souris knockout pour ADAM17 ne présentent pas de défaut de la signalisation Notch/Delta (Shi et al., 2003). Ceci tendrait à prouver que la compensation n'est pas dépendante stricto-sensu de la proximité évolutive des enzymes mais plutôt des cibles de ceux-ci. La redondance *in vivo* ne semble pas si évidente puisqu'il a été montré *in vivo* qu'ADAM17 ne pouvait pas cliver certains ligands de l'EGFR habituellement clivés par ADAM10 (EGF et bétacelluline) (Sahin et al., 2004). Néanmoins, on peut raisonnablement penser qu'ADAM10 est une  $\alpha$ -secrétase fonctionnelle puisque lorsque ADAM10 et APP sont co-surexprimés dans des souris transgéniques, la production de sAPP $\alpha$  est augmentée et la formation de plaques amyloïdes inhibée. Lorsque APP est co-surexprimé cette fois avec une forme inactive d'ADAM10, les plaques amyloïdes observées et les déficits cognitifs sont importants (Postina et al., 2004). Enfin, il a été montré que des souris KO conditionnelles pour ADAM10 dans les cellules progénitrices neuronales présentent un défaut de production de sAPP $\alpha$  ainsi que de clivage de Notch (Jorissen et al., 2010)

Vus le nombre important de cibles d'ADAM10 (**Tableau 2**) identifiées pour la plupart *in vitro* et l'importance des défauts causés par l'altération de la signalisation Notch/Delta chez les souris knockout pour ADAM10, il est probable que d'autres effets dus à l'absence d'activité ADAM10 chez les souris KO soient masqués. Ceci explique la tendance actuelle à générer des souris KO conditionnelles comme mentionné ci-dessus.



## Fonctions biologiques des ADAMs

### *Clivage de protéines*

#### Clivage protéolytique de prodomaines

Les rôles majeurs des protéases ADAMs leur sont conférés par leur capacité enzymatique à cliver des protéines membranaires (plus de 70 protéines cibles potentielles identifiées) et de permettre ou stopper leur action dans le milieu extérieur ou sur une cellule proche. La caractéristique principale (et la plus étudiée) des ADAMs est de permettre la sécrétion de facteurs de croissance (ligands du récepteur de l'EGF tels que pro-EGF, pro-bétacelluline, pro-TGF $\alpha$ , pro-HB-EGF, pro-amphiréguline, pro-epigen, pro-epiréguline) ou de cytokines (pro-TNF $\alpha$ ) synthétisés sous forme de précurseurs membranaires et de contrôler ainsi leur biodisponibilité à l'extérieur de la cellule, ou bien de rompre les attaches d'une cellule à ses « comparses » au sein d'un tissu en supprimant par exemple les interactions homophiliques entre les domaines extracellulaires de molécules d' E-cadhérines situées sur des cellules adjacentes.

Ce clivage peut se dérouler en cis (maturation de facteurs de croissance) ou en trans (cas du clivage du ligand ephrine) mais il arrive également que ce clivage se déroule sur une cellule potentiellement relativement éloignée du site de production de la protéase. En effet, lors du développement des plaques d'athérosclérose, des vésicules de membranes plasmiques appelées MP (MicroParticles) sont libérées. Ces MPs présentent à leur surface des protéines transmembranaires originaires du lieu de la lésion inflammatoire ; en particulier, il a été montré qu'une protéase telle qu'ADAM17 située sur ces MPs étaient capables d'y exprimer son activité de clivage de proTNF $\alpha$  et du récepteur TNF1R (Canault et al., 2007). Les auteurs proposent en outre que la forte concentration en molécules ADAM17 actives à la surface de ces MPs soit due à la forte concentration en radeaux lipidiques à la surface de ceux-ci. Le fait que les MPs puissent fusionner avec la membrane de néo-cellules hôtes pourraient indiquer qu'il s'agit ici d'un transfert de protéases actives après induction de l'athérosclérose (Del Conde et al., 2005).

Les ADAMs sont donc capables de cliver de nombreux proligands de l'EGFR comme nous l'avons évoqué auparavant. Ainsi, ADAM17 (**Tableau 1**) est impliquée dans le clivage de la majorité des proligands de l'EGFR sous stimulation par des esters de phorbols (pro-TGF $\alpha$ , pro-amphiréguline, pro-épigène, pro-épiréguline et pro-HB-EGF). ADAM10 (**Tableau 2**), quant à elle, peut cliver la pro-bétacelluline, le pro-EGF et la pro-amphiréguline. Le clivage de ces substrats dans la région juxtamembranaire n'a bizarrement pas lieu au niveau d'une séquence consensus identifiée mais aboutit néanmoins toujours à la libération dans le milieu extracellulaire des ligands fonctionnels et capables de lier et activer aussi l'EGFR.

Les ADAMs peuvent aussi agir sur des récepteurs de façon à produire par clivage juxtamembranaire des formes solubles agissant en tant que récepteurs decoy/leurre inactifs. Ces formes solubles peuvent alors piéger les ligands à l'extérieur de la cellule et réguler ainsi leur disponibilité vis-à-vis des récepteurs membranaires capables d'émettre une signalisation aval. C'est notamment le cas pour le récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) impliqué dans les inflammations aiguë et chronique (Raucci et al., 2008).

Facteurs de croissances/cytokines	Molécules d'adhérence/récepteurs	Autres
Pro-TNF $\alpha$	Récepteur du TNF	APP
Pro-TGF $\alpha$	Récepteur d'IL-1/ d'IL6	Delta-like Ligand 1
Pro-amphiréguline	Notch1	Kit ligand 1/2
Pro-HB-EGF	L-sélectine	PrPc
Pro-épiréguline	Récepteur de neurotrophine	LAG-3
Epigène	ErB4/HER4	Klotho
Neuréguline	CD44	Semaphorine 4D
TRANCE/RANKL	CD40	MHC-class I-related chain A/B
CX3CL1	Growth hormone receptor	PTP-LAR
Pre-adipocyte factor-1	L1-CAM	
	VCAM-1	
	Desmogléine-2	
	Nectin-4	
	N-CAM	
	Collagène XVII	
	NPR	

**Tableau 1: Substrats d'ADAM17 répertoriés fin 2012**

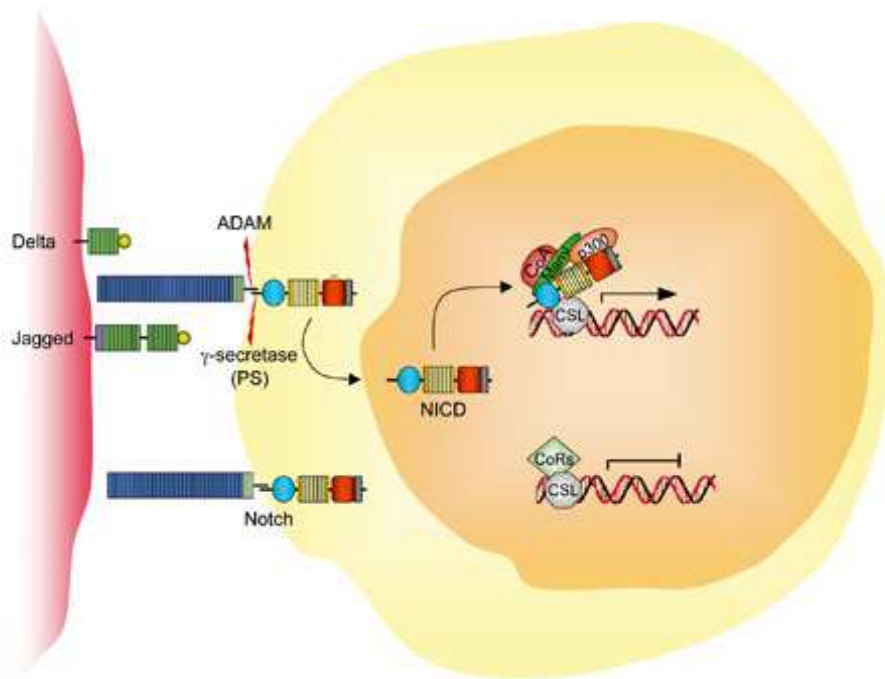
Facteurs de croissances/cytokines	Molécules d'adhérence/récepteurs	Autres
Pro-Amphiréguline	Axl	APP
CXCL1	c-Met	Annexin A1
CXCL16	CADM1	APP-like protein-2
JamA	CD23	Bri2
Pro-bétacelluline	CD30	Collagène XVII
Pro-EGF	CD44	Delta-like Ligand 1
TRANCE/RANKL	CD84	EphB2
	Desmogléine-2	Ephrine A5
	E-Cadhérine	Fas Ligand
	Her2/ErbB2	Klotho
	L1-CAM	LAG-3
	N-Cadhérine	MICA
	Nectine1	PrPc
	Notch	Sortiline
	Proto-cadhérine	
	RAGE	
	VE-Cadhérine	
	Récepteur de la thyrotropine	

**Tableau 2 : Substrats d'ADAM10 répertoriés fin 2012**

### « Regulated Intramembrane Proteolysis » physiologique : la signalisation Notch

Dans de nombreux cas, ce clivage juxtamembranaire n'est qu'une première étape en vue d'une transduction de signal. En effet, après clivage constitutif ou en réponse une stimulation des cellules conduisant à la sécrétion du domaine extracellulaire (ectodomaine), la partie restante liée à la membrane (CTF/ CarboxyTerminal Fragment) peut subir une deuxième coupure protéolytique à l'intérieur même du domaine transmembranaire. Ceci aboutit donc au relargage dans le cytosol d'une partie intracellulaire appelé IntraCellular Domain (ICD). On parle alors de « Regulated Intramembrane Proteolysis » (RIP). Ce phénomène peut se dérouler à la membrane de toutes les vésicules de trafic cellulaire ainsi qu'à la membrane plasmique et on identifie un nombre croissant de protéines subissant ce RIP. Le fragment cytosoluble issu du RIP fait généralement partie intégrante de la signalisation aval.

C'est le cas de la voie de signalisation Notch impliquée de *C. elegans* (travaux d'Iva Greenwald du milieu des années quatre-vingts) jusqu'à *H. sapiens* dans la différenciation cellulaire, le développement, l'angiogénèse. Il existe 4 isoformes de récepteurs Notch (Notch 1-4). Chacun de ces récepteurs est issu de la maturation protéolytique d'une forme précurseur. Chez les mammifères, le récepteur Notch actif est constitué d'un dimère. La protéine Notch est maturée au sein du trans-Golgi où elle subit un premier clivage S1 catalysé par une activité de type proprotéine convertase et assurée par une furine. Ce clivage dans la partie intravésiculaire extracellulaire de Notch permet l'obtention de la forme mature hétérodimérique et fonctionnelle du récepteur Notch bon déroulement de sa maturation ainsi que la création d'une forme récepteur hétérodimérique de Notch (Blaumueller et al., 1997). La masse molaire de ce récepteur est d'environ 180kDa et est constituée de la partie N-terminale extracellulaire (NEC) ainsi que d'une petite partie du fragment extracellulaire, du fragment transmembranaire et du domaine cytoplasmique (NTM) et son assemblage est calcium dépendant (Rand et al. 2000). L'activation du récepteur transmembranaire Notch est déclenchée par son interaction en trans avec un ligand transmembranaire de la famille DSL (Delta Serrate Ligand). L'activation de Notch est consécutive à un clivage au niveau extracellulaire juxtamembranaire (clivage S2). Ce clivage est assuré par une  $\alpha$ -secrétase qui, chez les mammifères, a été identifiée comme pouvant être ADAM10 et/ou ADAM17 (Hartmann et al., 2002; Six et al., 2003) au niveau extracellulaire. Ce clivage est une étape absolument nécessaire et indispensable à un clivage secondaire dit « S3 » effectué par une activité  $\gamma$ -secrétase (médiée par un complexe de type iCLiPs constitué, entre autres, de préséniline et nicastrine) au sein du domaine transmembranaire. Ainsi, le domaine intracellulaire du récepteur activé nommé NICD (Notch IntraCellular Domain) est libéré dans le cytoplasme et migre vers le noyau où il va interagir avec des facteurs de transcription de la famille CSL (CBF1/Suppressor of Hairless/Lag1) et les activer en levant l'action inhibitrice des répresseurs transcriptionnels CoRs et moduler *in fine*, la transcription de gènes cibles de ces facteurs de transcription –pour revue (Ehebauer et al., 2006)- **(Figure 8)**.

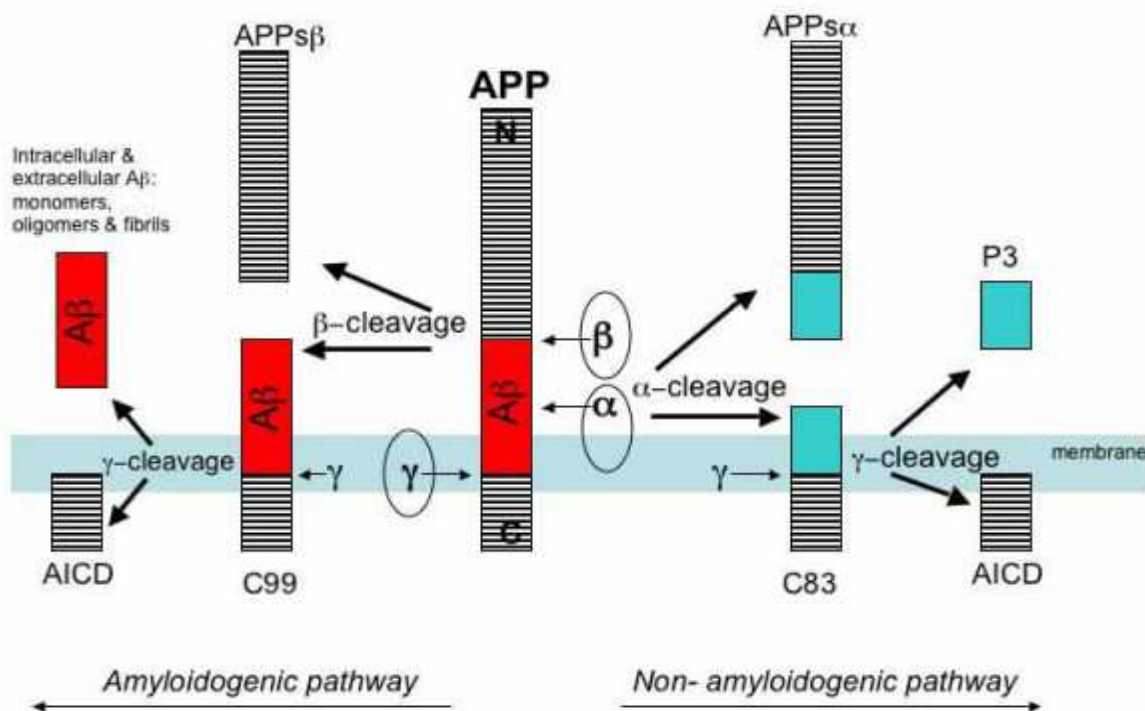


**Figure 8 : Représentation schématique de l'activation de la molécule Notch par Delta ou Jagged ainsi que de ses sites de clivage de Notch par les  $\alpha$ - (« S2 ») et  $\gamma$ -secrétases (« S3 »). Le clivage « S1 » n'est pas représenté.**

### « Regulated Intramembrane Proteolysis » pathologique : la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la première cause de démence mentale au monde. Elle se manifeste par des symptômes tels que perte de mémoire, troubles du langage, de l'orientation, du comportement ou de la personnalité. Initialement, le déclenchement de cette maladie pour le moment incurable, a été expliqué par l'apparition d'une mutation non-sens dans le gène codant la protéine précurseur amyloïde (APP) (Goate et al., 1991). Les protéines de la famille APP forment un groupe de glycoprotéines transmembranaire de type I exprimées de manière ubiquitaire. Les 3 membres de la famille APP humaine (APP, APLP1, APLP2) sont soumis au RIP. L'étiologie de la maladie d'Alzheimer ne s'explique jusqu'à maintenant que par l'hypothèse de la cascade amyloïdogénique formulée en 1992 par Hardy et Higgins. Leur hypothèse encore valide aujourd'hui est que les dépôts de peptides A $\beta$  insolubles générés par clivage de la protéine initiale APP, sont les composants principaux

d'une plaque dite sénile responsable des symptômes sus-cités (Hardy & Higgins, 1992). En effet, lors du déroulement du métabolisme cellulaire normal, cette protéine APP donne naissance soit à une forme soluble sAPP si elle est clivée par une  $\alpha$ -secrétase (voie de clivage non amyloïdogénique), soit à de multiples formes de peptide  $\beta$ -amyloïdes A $\beta$  si elle est clivée successivement par une  $\beta$  puis une  $\gamma$ -secrétase (voie amyloïdogénique). Ces peptides A $\beta$  ont la capacité de s'oligomériser pour former des plaques séniles caractéristiques de l'anatomo-pathologie de la maladie d'Alzheimer (**Figure 9**).



**Figure 9 :** Représentation schématique d'APP ainsi que de ses différents sites de clivage par les  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -secrétases. Adapté de (Cole & Vassar, 2007).

Il semble que dans les neurones primaires, le clivage par  $\alpha$ -secrétase soit dû à ADAM10 à la membrane plasmique (Lammich et al., 1999) mais des implications d'ADAM9 et 17 ont aussi été rapportées (Asai et al., 2003). Après clivage, un fragment N-terminal soluble sAPP $\alpha$  est généré. Il aurait un rôle neuroprotecteur et favoriserait le renforcement de la mémorisation (en activant la potentialisation à long-terme neuronale notamment) (Taylor et

al., 2008). La partie C-terminale restante à la membrane est ensuite clivée à son tour par un complexe  $\gamma$ -secrétase constitué notamment des presenilines 1 et/ou 2 donnant naissance *in fine* à un peptide cytosolique nommé AICD qui pourrait agir de manière analogue au NICD issu de Notchen tant que facteur transcriptionnel mais paraît plus vraisemblablement non fonctionnel. De par le site de clivage de l' $\alpha$ -secrétase situé à l'intérieur de la séquence du peptide A $\beta$ , toute formation secondaire de peptide A $\beta$  est impossible. La voie amyloïdogénique, quant à elle, nécessite le clivage par la  $\beta$ -secrétase BACE1/2 incluse dans les radeaux lipidiques libérant un fragment N-terminal sAPP $\beta$  (Ehehalt et al., 2003) et d'une manière analogue à la voie non-amyloïdogénique, le fragment C-terminal est pris en charge par un complexe enzymatique de type  $\gamma$ -secrétase et conduit à la production du peptide  $\beta$ -amyloïde, A $\beta$ . Il est possible que le clivage par BACE1/2 d'APP se déroule également dans les endosomes. En effet, il a été montré qu'APP et BACE1 ont un trafic intracellulaire similaire et que le pH acide trouvé dans le compartiment endosomal soit particulièrement adéquat pour l'activité catalytique de BACE1 (Huse et al., 2000; Walter et al., 2001)

L'expression et la stimulation de certains GPCRs tels que les récepteurs muscariniques M1 et M3 (entre autres) peuvent entraîner une augmentation de la production de peptides sAPP $\alpha$  par stimulation de l'activité  $\alpha$ -secrétase -pour revue (Thathiah & De Strooper, 2011)-. A ce sujet, il a été montré que la stimulation du récepteur à la sérotonine 5-HT $_4$ R induit également une production augmentée de sAPP $\alpha$  dans des cultures neuronales (Cho & Hu, 2007; Cochet et al., 2013). Le rôle de ce récepteur est particulièrement intéressant puisque l'activation de celui-ci stimule la sécrétion d'acétylcholine dans le cortex préfrontal et l'hippocampe contribuant ainsi aux processus d'apprentissage et de mémorisation altérés lors de la progression de la maladie d'Alzheimer (Bockaert et al., 2011). Ce récepteur pourrait donc à la fois renforcer les phénomènes cognitifs mais aussi empêcher la formation de plaques amyloïdes par stimulation directe d'une activité  $\alpha$ -secrétase et/ou consécutivement à la sécrétion d'acétylcholine et activation des récepteurs muscariniques. Dans ce contexte, il a été montré que ce récepteur s'associe physiquement à la métalloprotéase ADAM10, que l'expression de ce récepteur induit un clivage accru d'APP en sAPP $\alpha$  et que cet effet est au moins partiellement dépendant d'ADAM10 (Cochet et al., 2013).

Si la plupart des différentes étapes conduisant à la génération des différents métabolites de la protéine APP ont été identifiées sur des modèles cellulaires *in vitro*, leur pertinence est confirmée par un certain nombre d'observations *in vivo*. Ainsi, lorsqu'ADAM10 est surexprimé dans des souris transgéniques, on observe une augmentation du clivage de type  $\alpha$  d'APP qui s'accompagne d'une réduction de la formation de plaques amyloïdes (Postina et al., 2004). De plus, lorsqu'ADAM10 et APP sont co-surexprimées dans des souris, la synaptogénèse et l'apprentissage ainsi que la mémorisation sont augmentés (Bell et al., 2008; Schmitt et al., 2006). Ces phénomènes pourraient cependant également être dus à un effet neuroprotecteur de la molécule L1 qui est également un substrat d'ADAM10 (et ADAM17) dans le cerveau. Afin de mettre l'accent sur ce rôle clé de l' $\alpha$ -secrétase ADAM10 dans ce contexte, notons le travail d'une équipe milanaise qui a montré qu'un blocage du routage d'ADAM10 vers les synapses aboutit à la génération d'un modèle murin de maladie d'Alzheimer (Epis et al., 2010).

Pour illustrer enfin la complexité de ces processus de maturation protéolytique pouvant conduire à des pathologies graves, une équipe a identifié la métalloprotéase meprin $\beta$  à la fois en tant qu' $\alpha$ -secrétase générant des fragments N-terminaux d'APP non neurotoxiques (Jefferson et al., 2011) et en tant que  $\beta$ -secrétase générant des peptides A $\beta$  indépendamment de l'activité de BACE1/2 (Bien et al., 2012).

## **Vascularisation**

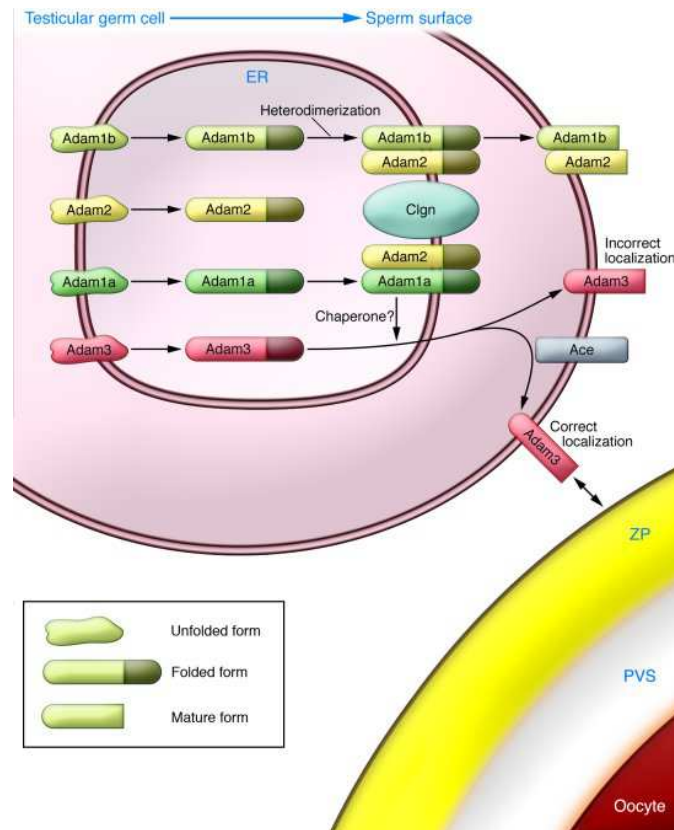
Quelques ADAMs sont impliquées dans les phénomènes de vascularisation en condition physiologique (guérison de blessure) ou pathologique (cancers et athérosclérose). ADAM10 médie le clivage de VEGFR2 et le VEGF induit le clivage de la VE-cadhérine par ADAM10, augmentant la perméabilité vasculaire et facilitant ainsi la migration des cellules endothéliales (Donners et al., 2010). De même, le VEGF-A active le clivage ADAM17-dépendant de VEGFR2 ainsi que de TNF $\alpha$ , TGF $\alpha$ , HB-EGF (Swendeman et al., 2008). De plus, ADAM17 semble être impliqué dans l'architecture même des capillaires sanguins puisque sa présence est nécessaire à l'établissement de contacts intercellulaires et de réseaux capillary-like en 2 et 3 dimensions sur des modèles de cellules HUVEC (Goöz et al., 2010).



In vivo, l'angiogénèse peut être modulée par l'absence de certaines ADAMs. ADAM8 inhiberait (Guaïquil et al., 2010) alors qu'ADAM9 (Guaïquil et al., 2009) et ADAM15 (Horiuchi et al., 2003) seraient activateurs de vascularisation dans des modèles de souris KO conditionnelles et lors de tests de vascularisation rétinienne.

## *Fertilité*

Le phénomène de fécondation d'un ovule par un spermatozoïde débute par l'adhérence de ces deux cellules et se poursuit par la fusion de leur membrane plasmique. Les membres de la famille ADAM jouent un rôle clé lors de cette première étape. Les ADAM 1 (fertiline  $\alpha$ ), 2 (fertiline  $\beta$ ) (premières ADAMs identifiées en tant que facteurs essentiels à l'adhérence du spermatozoïde à la zone pellucide) et 3 sont essentielles à la fécondation. En effet, le complexe fertiline est constitué de sous-unités  $\alpha$  (ADAM1) et  $\beta$  (ADAM2) et ADAM1 a deux isoformes ADAM1a, 1b (chez la souris). ADAM1b forme un complexe avec ADAM2 à la surface du spermatozoïde alors qu'ADAM1a est restreint au réticulum endoplasmique des cellules germinales testiculaires. La perte de la forme ADAM1a ou ADAM2 a pour effet une perte de fertilité due à des défauts de mouvements des spermatozoïdes et une incapacité à se lier à la zone pellucide (Nishimura et al., 2004). Ceci pourrait être une conséquence de la perte d'expression d'ADAM3 consécutive à l'inactivation d'ADAM2 dans les cellules germinales testiculaires (Stein et al., 2005). La manière dont fonctionnent ADAM 1, 2 et 3 reste à ce jour mal comprise. Il est cependant clair qu'il existe de très importantes interactions en termes de co-expression et co-régulation des gènes codant ces protéines et certains autres tels que Clgn codant une chaperone du réticulum endoplasmique spécifique aux testicules (Yamaguchi et al., 2006) ou Ace codant l'angiotensin converting enzyme (Hagaman et al., 1998). En effet, Clgn est requise pour la dimérisation d'ADAM1b avec ADAM2 ainsi que d'ADAM1a avec ADAM2. Ce dernier dimère semble quant à lui nécessaire à la localisation correcte d'ADAM3 à la surface cellulaire du spermatozoïde (potentiellement via une autre molécule chaperone) (Nishimura et al., 2004). La perte d'Ace conduit, elle à une localisation aberrante d'ADAM3 et à l'impossibilité de lier l'ovocyte (Yamaguchi et al., 2006) (**Figure 10**).



**Figure 10 : Maturation des ADAMs impliquées dans la fertilisation.** Repris de (Ikawa et al., 2010)

### *Terminaison de fonctions*

#### Migration des leucocytes

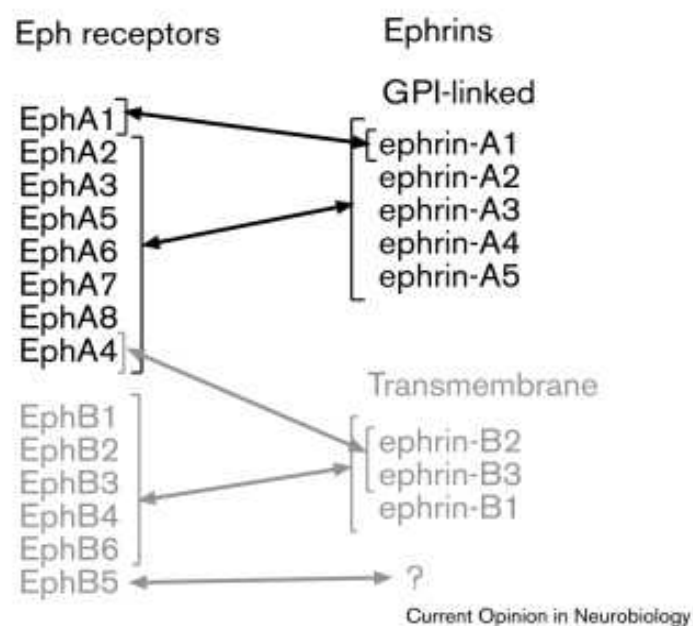
Les ADAMs sont capables de médier le phénomène de migration des leucocytes lors du phénomène inflammatoire. En effet, lors d'un stimulus inflammatoire, une protéine appelée L-sélectine exprimée à la surface des leucocytes, peut s'associer à des protéines glycosylées de l'endothélium vasculaire afin d'initier la transmigration des leucocytes. L'étape nous intéressant particulièrement ici est celle suivant la liaison des cellules à la surface endothéliale. Il y a alors diminution rapide de l'expression de L-sélectine à la surface grâce à un clivage protéolytique du domaine extracellulaire de cette dernière. Ce clivage n'a pas lieu lorsque les cellules sont déplétées en ADAM17 (Condon et al., 2001; Li et al., 2006) mais a pourtant lieu dans des cellules issues de souris ADAM17<sup>-/-</sup>. Ceci suggère l'implication

d'une autre métalloprotéase redondante ou activité ADAM17 résiduelle dans le premier cas. Alors que l'on s'attendrait comme souvent à ce qu'ADAM10 prenne le relais, il s'avère que bien qu'elle soit exprimée à la surface leucocytaire, elle est incapable de cliver la L-sélectine. Au contraire, c'est cette fois-ci ADAM8 qui voit son expression cellulaire augmenter après adhérence de neutrophiles à la paroi endothéliale. De plus, l'équipe menant cette étude a également noté un plus fort taux d'ADAM8 soluble circulant. Après adhérence de neutrophiles. L'ensemble de ces protéines circulantes et membranaires aboutit à l'augmentation du clivage de la L-sélectine (Gómez-Gavero et al., 2007). De manière assez intéressante, on notera que lorsqu'un neutrophile se lie à de la E-sélectine, il se produit des remaniements membranaires déclenchant un regroupement fonctionnel de molécules d'ADAM17 et de L-sélectines permettant un clivage efficace de celles-ci (Schaff et al., 2008). Pour l'instant, la seule tétraspanine interagissant avec non pas la L- mais la P-sélectine est CD63 (Doyle et al., 2011). Elle permet un regroupement des P-sélectines et augmente la capacité de recrutement des leucocytes. Dans le cadre de notre interrogation sur le rôle des interactions entre tétraspanines et métalloprotéases, nous pouvons poser la question de savoir si une tétraspanine non encore identifiée pourrait être responsable du rapprochement fonctionnel des deux entités ADAM17 et L-sélectine.

### Guidage axonal et Eph-éphrines : un modèle de régulation d'ADAM10

Les ADAMs semblent participer à d'autres processus biologiques. En effet, chez *D. melanogaster*, des mutations du gène codant pour la protéase Kuzbanian (orthologue d'ADAM10) entraînent des altérations du développement du système nerveux central à cause du blocage de l'extension des axones émergeant du tube neural (Famborough et al. 1996). Le guidage des axones nécessite en effet, un mécanisme d'attraction par certaines cellules environnantes couplé à une répulsion par d'autres afin de donner un sens au guidage. Les ADAMs sont impliquées à ce niveau de par leur action sur une famille de ligands nommés éphrines et leurs récepteurs à tyrosine kinase de la famille Eph. Ces derniers forment la plus grande famille des récepteurs tyrosine-kinase (RTKs) et sont divisés en une sous-classe A (EphA1 à EphA10 chez les mammifères), et une sous-classe B (EphB1 à EphB6) à la structure globale proche mais différant par leur séquence peptidique et leurs affinités

relatives envers leurs ligands éphrines. Ceux-ci sont de même divisés en deux sous-classes A et B. Les éphrines A (ephrinA1-ephrinA5) présentent un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique court alors que les éphrines B (ephrinB1-ephrinB3) sont liées à la membrane par une ancre GPI. Fort logiquement sémantiquement parlant, les récepteurs de type A lient la plupart des ligands de type A et de même pour les récepteurs de type B et les ligands de ce même type, à quelques exceptions près comme EphB4 qui peut lier des éphrines A et B ou l'éphrine A5 se fixant à EphB2 (Himanen et al., 2004) (**Figure 11**).



**Figure 11 : Spécificités de liaison entre récepteurs Eph et éphrines connues.**

Les affinités relatives d'un récepteur donné pour différentes éphrines peuvent varier. Repris de (O'Leary & Wilkinson, 1999)

Il est intéressant de noter que le mécanisme d'activation consiste en la fixation non pas d'un facteur soluble, mais d'une protéine transmembranaire fixe à son récepteur. Une étude de cristallisation de complexes EphB2-éphrineB2 montre que la fixation entre Eph et éphrine entraîne une hétérotétramérisation puis une agrégation entre tétramères pour former des complexes d'ordre supérieur (Himanen et al., 2001). Ceci permet potentiellement une association avec d'autres protéines de surface et entraîne classiquement une signalisation aval via son domaine tyrosine kinase au niveau de la cellule

présentatrice de récepteur Eph mais également une signalisation réverse via le domaine de liaison PDZ des éphrinesB au niveau de la cellule présentatrice d'éphrine –pour revue (Kullander & Klein, 2002)-.

De manière assez paradoxale au premier abord, une interaction en trans entre Eph et éphrine est nécessaire pour déclencher une répulsion entre cellules (des interactions en cis sont également documentées). Il a été proposé que la liaison entre récepteurs Eph et éphrines entraîne une endocytose de complexes Eph-éphrine fragilisant les contacts intercellulaires et permettant alors la répulsion entre les cellules. Il semblerait que le domaine intracellulaire des récepteurs Ephs ait un rôle crucial médiateur de ces évènements. En effet, des cellules présentant des récepteurs EphB2 tronqués en position carboxy-terminale ne présentent aucun phénotype d'endocytose de ces récepteurs et une réduction de la vitesse de répulsion quand elles sont comparées à des cellules présentant des récepteurs EphB normaux (Zimmer et al., 2003). La fragilisation des contacts entre cellules après fixation de ligands éphrines peut aussi être expliquée par le fait que la transfection du récepteur Eph3 entraîne un clivage de l'éphrineA2 et son relarguage dans le milieu de culture de cellules de neuroblastome ou dans des neurones primaires. ADAM10 et l'éphrineA2 formant des interactions stables, l'implication d'ADAM10 dans le clivage de l'éphrineA2 a été étudiée. Le clivage de l'éphrine-A2 est inhibé dans les cellules ADAM10<sup>-/-</sup> et peut être rétabli en transfectant ADAM10. Des fibroblastes exprimant une forme non clivable de l'éphrineA2 présentent une diminution de leur capacité à repousser les neurites montrant ainsi que ce clivage joue un rôle important dans le phénomène (Hattori et al., 2000).

Répondant à une problématique similaire, un autre groupe a montré qu'ADAM10 interagit avec EphA3 de manière constitutive. La liaison du ligand éphrineA5 avec le récepteur EphA3 entraîne « l'autophosphorylation » d'EphA3 qui conduit à un changement conformationnel. Celui-ci permet le rapprochement d'ADAM10 du complexe EphA3-éphrineA5, le clivage de l'éphrineA5 et l'internalisation dans la cellule présentant ADAM10 ainsi que le complexe clivé (Janes et al., 2005, 2009). L'étroite régulation de l'activité métalloprotéasique peut donc être critique lors de la croissance précoce de l'axone et lors du guidage impliqué dans la mise en place du système nerveux central.

## Régulation de l'activité des ADAMs

Si le chapitre précédent montre un exemple de régulation et de spécificité d'action d'une métalloprotéase telle qu'ADAM10, il ne s'agit pas à l'heure actuelle d'un mécanisme général. En effet, on note que différentes ADAMs peuvent cliver un même substrat et qu'une ADAM peut avoir une grande diversité de cibles. Les ADAMs ne présentant aucune séquence consensus de clivage identifiée sur leurs cibles, une des questions fondamentales à poser est la manière dont les ADAMs reconnaissent leur(s) substrat(s) et de manière plus générale, il convient d'examiner la régulation de leur activité enzymatique. Celle-ci peut se manifester par différents mécanismes se déroulant lors de la synthèse des ADAMs et de leur transit intracellulaire, mais aussi par des interactions avec divers facteurs cytosoliques, membranaires ou extracellulaires.

### *Epigénétique et contrôle transcriptionnel*

Tout d'abord, l'induction de la transcription des gènes codant les ADAMs peut être régulée par une modification épigénétique telle que l'acétylation des histones. A titre d'exemple, le pattern d'expression d'ADAM19 se caractérise par une forte expression dans les cellules dendritiques par rapport aux macrophages aux rôles assez proches. Il a été montré à ce sujet que l'hyperacétylation des histones H3 liées à la région promotrice du gène codant ADAM19 dans les cellules dendritiques par rapport aux macrophages était responsable de cette expression différentielle d'ADAM19 (Ehrnsperger et al., 2005). Par ce mécanisme, les cellules peuvent « maintenir leur identité post-mitotique » (pour reprendre l'expression de Gary Stein (Stein et al., 2011) en termes d'expressions spécifiques de protéines. Lorsque cette régulation épigénétique est compromise, la cellule peut rapidement dériver jusqu'à présenter un phénotype de cellule cancéreuse. Par exemple, une équipe du Missouri a montré que la surexpression d'ADAM12 observée -voir Table 3 dans (Mochizuki & Okada, 2007)- dans un grand nombre de cancers était due à la levée d'inhibition de son expression par la perte de l'interaction entre un élément Z-DNA avec des îlots CpG (suivant

une méthylation de ceux-ci) et les protéines MeCP2 et NF1, formant un élément NRE (Negative Regulatory Element) (Ray et al., 2012).

La transcription peut également être régulée par la concentration locale de certaines protéines du milieu extracellulaire. En effet, il a été montré que la transcription du gène codant ADAM17 ainsi que l'expression de la protéine résultante, étaient augmentées dans des cellules MBE stimulées par une de ses cibles, le TNF $\alpha$  (Bzowska et al., 2004). D'une façon assez similaire, il a été montré que la liaison entre VEGF et son récepteur VEGFR2 entraînait une augmentation de la transcription du gène codant ADAM15 ainsi que de son expression protéique chez des patients atteints de rétinopathie (Xie et al., 2008) ou d'arthrite rhumatoïde (Komiya et al., 2005) bien que ni VEGF ni son récepteur ne soient identifiés en tant que cibles d'ADAM15. Une approche de microdissection au laser puis RT-qPCR a permis en outre de montrer que le récepteur VEGFR1 présentait une transcription augmentée chez ce même type de patients (Hashimoto et al., 2007). Enfin, il a été montré que la concentration en hormones LH et FSH pouvait influencer la transcription du gène codant ADAM17 dans des ovocytes porcins (Yamashita et al., 2007).

De manière très générale, il a été suggéré que lorsqu'au sein d'une même cellule, plusieurs métalloprotéases de type ADAM sont exprimées et clivent une même cible, c'est l'abondance relative de ces protéases (donc le contrôle de leur présence au lieu de clivage ainsi que de la concentration locale en agents inhibiteurs de ces protéases au temps t) qui permet d'établir une hiérarchie d'importance entre ces protéases dans un contexte donné (Hikita et al. 2009).

### *Régulation post-traductionnelle*

L'activité protéolytique de nombreuses ADAMs peut être inhibée par les TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteases) qui sont des inhibiteurs protéiques physiologiques des métalloprotéases. Les TIMPs sont au nombre de quatre, possèdent un haut degré de similarité de séquence (50-60%) et un même domaine à six boucles très structuré par des ponts disulfures conservés. Les TIMPs interagissent au niveau de trois boucles N-terminales avec le domaine métalloprotéase des ADAMs. Bien que dans la plupart des cas, la pertinence

physiologique des TIMPs reste mal comprise, elle ne peut être négligée. En effet, l'inactivation du gène codant pour TIMP3 entraîne chez la souris une augmentation de l'activité d'ADAM17, se traduisant par une augmentation du clivage du proTNF $\alpha$  dans le foie (Mohammed et al., 2004). Il avait été auparavant démontré que TIMP3 peut interagir avec ADAM17 et entraîner une régulation négative de son activité (Murphy et al. 2003). Dans le cancer de la prostate, il existe une corrélation inverse entre les expressions d'ADAM17 et de TIMP3 (Karan et al., 2003). TIMP3 régule également le relargage par ADAM17 de VCAM-1 soluble des cellules endothéliales stimulées par des cytokines (Singh et al., 2005). De même, des expériences mettant en œuvre un substrat (basé sur le proTNF $\alpha$ ) fluorescent quençable d'ADAM10 montrent que TIMP3 et TIMP1 inhibent l'activité *in vitro* d'ADAM10 (Amour et al., 2000).

En plus de pouvoir être régulées par interaction avec des protéines, les ADAMs disposent d'une activité catalytique pouvant être modulée par l'environnement lipidique. A ce sujet, E. Kojro a montré qu'une faible concentration en cholestérol membranaire pouvait non seulement structurer les TEMs comme nous l'avons vu précédemment, mais aussi stimuler le clivage non amyloïdogénique du substrat APP par l'activité  $\alpha$ -secrétase d'ADAM10 (Kojro et al., 2001). En effet, après déplétion en cholestérol, la membrane plasmique voit sa fluidité augmentée (analysée par anisotropie de fluorescence) et parallèlement l'activité  $\alpha$ -secrétase d'ADAM10 est accrue, ce qui aboutit donc phénotypiquement à un effet potentiellement protecteur vis-à-vis de l'accumulation de peptides A $\beta$  (Kojro et al., 2001). Ceci est à mettre en relation avec le traitement à base de statines développé contre la maladie d'Alzheimer. En effet, cette même équipe a ensuite mis en évidence que les statines ainsi que l'acide zaragozique inhibant la synthèse du cholestérol stimulent le clivage non-amyloïdogénique d'APP par ADAM10. De plus, l'adressage préférentiel d'ADAM10 dans des compartiments de type rafts riches en cholestérol via une substitution du domaine cytoplasmique par une ancre GPI s'oppose au clivage amyloïdogénique (Kojro et al., 2010). Enfin, les auteurs semblent sous-entendre que la concentration endogène en lovastatine suffirait à l'activation de la fonction  $\alpha$ -secrétase dans un contexte physiologique.



L'activation des ADAMs peut enfin être augmentée par la phosphorylation de celles-ci sous l'action d'une protéine kinase activée par des messagers secondaires. En effet, dès 1998, une équipe japonaise a montré que la PKC $\delta$  se lie à ADAM9 et qu'une forme mutante inactive de l'une ou l'autre de ces protéines inhibait le clivage de proHB-EGF sous stimulation par un ester de phorbol (Izumi et al., 1998). Par la suite, il a été montré que la kinase Erk peut phosphoryler ADAM17 sur le résidu Thr735 en réponse à une stimulation de PKC par le PMA. Cette phosphorylation permet de cliver la forme holorécepteur de TrkA dans des cellules CHO (Diaz-Rodriguez et al., 2002). Cette même phosphorylation est de plus, nécessaire à la maturation et à la localisation d'ADAM17 à la membrane plasmique comme le montrent Soond et ses collègues en établissant un modèle de routage d'ADAM17 vers la surface inductible par la stimulation de Erk (Soond et al., 2005). D'une façon similaire, des cellules soumises à un stress environnemental génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) capables d'activer la MAPKinase p38 agissant sur l'activité catalytique de certaines ADAMs et promouvant la transactivation de l'EGFR par sécrétion de ligands HB-EGF (Fischer et al., 2004). Au cours de la transactivation de l'EGFR, la stimulation de métalloprotéases semble donc due à des kinases agissant sur les ADAMs. Ce phénomène semble finement régulé puisque lorsque la tyrosine phosphatase PTPH1 est surexprimée et que l'on stimule des cellules avec le PMA, PTPH1 interagit avec ADAM17 et inhibe fortement la sécrétion de TNF $\alpha$  par cette protéase (Zheng et al., 2002)

## ADAMs et cancers

De manière très générique, le cancer se caractérise par une prolifération cellulaire anarchique et augmentée par rapport à la structure tissulaire saine environnante. Les cellules cancéreuses sont clonales et ont les propriétés particulières de présenter une capacité proliférative illimitée, une moindre dépendance vis-à-vis des signaux stimulateurs « sains », un échappement aux signaux antiprolifératifs et proapoptotiques et une forte propension à suractiver les phénomènes d'angiogénèse, voire de néoangiogénèse. A partir d'un foyer cancéreux initial et selon le type de foyer, les cellules ont la possibilité de migrer

via les systèmes sanguin et lymphatique puis s'implanter dans un organe généralement voisin du foyer initial et y former des foyers cancéreux secondaires appelés métastases

De nombreuses ADAMs sont surexprimées lors de cancers. En effet, de par leur capacité à cliver entre autres des facteurs de croissance, d'angiogénèse, des protéines d'adhérence, les ADAMs ont un rôle particulièrement proéminent dans les cancers et participent, si elles sont dérégulées, à plusieurs étapes du processus de cancérisation (Tableau 3).

<b>Métalloprotéase</b>	<b>Surexpression tumorale</b>
ADAM8	Cerveau, rein, poumon, pancréas
ADAM9	Sein, estomac, foie, poumon, pancréas, prostate
ADAM10	Colon, estomac, leucémie, prostate, utérus, ovaire
ADAM12	Vessie, cerveau, sein, colon, estomac, foie
ADAM15	Sein, estomac, poumon, prostate
ADAM17	Cerveau, sein, colon, estomac, rein, foie, poumon, ovaire, pancréas, prostate
ADAM19	Cerveau, rein
ADAM28	Sein, rein, poumon

**Tableau 3 : Sites tumoraux où la surexpression des ADAMs a été rapportée.** Adapté de (Murphy, 2008)

ADAM17 est par exemple surexprimée au niveau ARN ou protéique dans des cancers du cerveau (Zheng et al., 2007), de colon (Blanchot-Jossic et al., 2005), de pancréas (Ringel et al., 2006), de prostate (Karan et al., 2003), de foie (Ding et al., 2004). Ce rôle d'ADAM17 est documenté depuis l'in vitro jusqu'à l'in vivo puisque l'inactivation d'ADAM17 par des anticorps dirigés contre cette protéase inhibe la croissance de lignées cellulaires de cancer du sein (Lendeckel et al. 2005) et la surexpression d'ADAM17 corrèle avec un taux de survie amoindri chez des patientes souffrant de cancer du sein (McGowan et al., 2008).

De même, ADAM10 est surexprimée dans le cancer du colon (Gavert et al., 2005), de la prostate (McCulloch et al., 2004), des ovaires (Fogel et al., 2003). La surexpression d'ADAM10 entraîne une augmentation de la croissance de cellules de cancers gastriques (Yoshimura et al., 2002) alors que son inactivation par des oligonucléotides antisens dirigés contre ADAM10 réduit cette prolifération (Ko et al., 2007). Un cas d'inhibition de croissance par des anticorps dirigés contre une ADAM est aussi rapporté pour ADAM9 (Carl-McGrath et al., 2005). On peut nettement lier ces proliférations anormales à l'activité des ADAMs et par extension, à leur capacité à cliver des substrats de type facteurs de croissance pro-prolifératifs.

Les ADAMs jouent un rôle prééminent lors du processus de dispersion de métastases. En effet, lors de ce phénomène, les cellules doivent, dans un premier temps, se libérer de la masse formant la tumeur primaire, dégrader la matrice extracellulaire séparant la tumeur du tissu sain environnant avant de transiter dans la circulation et de s'établir en un lieu différent. Il a été montré qu'ADAM10 clive la N et l'E-cadhérine (Maretzky et al., 2005; Reiss et al., 2005). Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires formant des interactions homotypiques et lient la  $\beta$ -caténine et le cytosquelette. Elles sont impliquées dans l'adhérence des cellules entre elles et l'inhibition de contact des cellules épithéliales (i.e. la perte de l'information physique signalant la présence jointive d'une autre cellule et donc l'inopportunité de déclencher une mitose). A un niveau similaire, CD44 est une protéine transmembranaire se liant en partie extracellulaire à l'acide hyaluronique de la matrice et en partie intracellulaire aux molécules ERM (ezrin, radixin, moesin) du cytosquelette assurant ainsi une rigidité et une cohérence des tissus. CD44 peut être clivé par ADAM10 ou ADAM17 (Nagano et al., 2004) sous l'action d'une élévation de concentration en calcium intracellulaire ou d'une activation de PKC et donc contribuer à déstabiliser la matrice extracellulaire et permettre le début de l'extravasation. Il a été montré que l'activation de l'EGFR pouvait induire, via la voie Erk, le clivage de CD44 par ADAM10 dans les cellules tumorales et entraîner une augmentation de la migration des cellules (Murai et al., 2006). De la même manière que pour Notch, le clivage par ADAM10 est nécessaire pour l'accomplissement d'un RIP aboutissant à la translocation au noyau d'un fragment CD44

intracellulaire capable de réguler la transcription de gènes dont le gène codant CD44 lui-même permettant ainsi une régénération rapide de la forme membranaire de CD44 (Okamoto et al., 2001) et prévenir dans ce cas une migration trop accentuée des cellules. Des études ont montré que des molécules d'adhérence telles qu'ICAM-1 et L-sélectines sont clivées par ADAM17 *in vitro* alors que le clivage *in vivo* de ces substrats semble restreint à certains types de cellules circulantes (Tang et al., 2011). Ainsi donc, les ADAMs seraient impliquées de façon prééminente dans la transition épithélio-mésenchymateuse, véritable reprogrammation de la cellule afin de changer son phénotype global épithélial en phénotype mésenchymateux aux niveaux de la perte des jonctions homophiliques et de la progression métastatique.

La surexpression de récepteurs Eph et de ligands éphrines a été notée dans de nombreux cancers tels que les cancers du sein (Fox & Kandpal, 2004), de la prostate (Guan et al., 2009), des ovaires (Herath et al., 2006)... De manière générale, la surexpression des gènes Eph (EphA2 est notamment très étudié) corrèle avec une survie moindre, un potentiel métastatique ainsi qu'une angiogénèse tumorale augmentée. En effet, il peut se dérouler une activation des récepteurs de type EphA indépendante de la fixation de ligand mais impliquant ADAM10 ainsi que tous les effecteurs en aval promouvant la prolifération (Akt), la transformation (PI3K) ou la migration (RhoA). Un groupe a montré qu'il existait un lien entre les voies EGFR et Eph. En effet, dans des lignées cellulaires cancéreuses, la stimulation de l'expression d'EphA2 dépend de l'activité tyrosine kinase d'EGFR et de la cascade MAPK (Larsen et al., 2010). De plus, la stimulation d'EphA2 induit une perte de motilité par induction EGF des cellules (Larsen et al., 2007). Ces résultats indiquent donc un rôle majeur de la voie EGFR dans les phénomènes cancéreux.

## EGFR et cancer

### Généralités

Le récepteur de l'EGF est le récepteur d'un des premiers facteurs de croissance à avoir été identifié et purifié, l'EGF. Le récepteur de l'EGF (EGFR, ErbB-1, HER1 chez l'homme) fait partie de la famille de récepteurs ErbB à activité tyrosine kinase. Les membres de cette famille sont au nombre de 4 qui sont en plus de l'EGFR, HER2/c-neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3) et Her4 (ErbB-4). Ce sont des protéines membranaires de type I, qui sont exprimées de manière assez ubiquitaire. Le récepteur est constitué d'un domaine extracellulaire responsable de la liaison du ligand, d'un passage transmembranaire, d'un domaine tyrosine kinase cytoplasmique et d'une extrémité carboxy-terminale riche en tyrosines. Afin d'accomplir leur fonction de signalisation, ces récepteurs subissent une homo- ou une hétérodimérisation après fixation de leur ligand (Earp et al., 1995) (Yarden, 2001).

Parmi les membres de la famille de l'EGFR, seul ErbB-1 est capable de lier l'EGF et le récepteur de l'EGF (EGFR) à proprement parler est le résultat de l'homodimérisation de 2 récepteur ErbB-1. HER2 est un « récepteur » qui ne possède pas de domaine de liaison de ligand. Cependant, il peut s'hétérodimériser avec ErbB-1 et l'activation de ErbB-1 par son ligand conduit à la transactivation de la kinase intrinsèque de HER2 mais aussi avec ErbB-3. A ce titre, un anticorps monoclonal humanisé (Pertuzumab/rhuMab 2C4) a été développé pour se lier compétitivement au domaine d'hétérodimérisation d'HER2 et est utilisé en combinaison avec d'autres drogues dirigées contre HER2 dans le cadre du traitement de cancer du sein (Baselga et al., 2012). HER3 n'a pas de domaine à activité tyrosine-kinase intrinsèque. Cependant, les voies de signalisation en aval sont activées dans ce cas par hétérodimérisation avec un récepteur à activité kinasique valide (Wallasch et al., 1995). Dans le cas d'une hétérodimérisation avec HER2, on a donc affaire à un dimère fonctionnellement asymétrique.

Les ligands des membres de la famille de l'EGFR sont l'EGF, le TGF- $\alpha$  et l'amphiréguline qui lient l'EGFR, la bétacelluline, l'heparin-binding-EGF (HB-EGF) et l'épiréguline qui lient à la fois l'EGFR et HER4, et le groupe des neurégulines qui lient HER3 et HER4 (pour neurégulines 1 et

2) ou seulement HER4 (pour neurégulines3 et 4) (Harris et al., 2003). HER2, quant à lui, n'a pas de ligand comme nous l'avons précisé précédemment. Ces différents ligands sont synthétisés sous la forme de précurseurs membranaires de type I. Ces précurseurs sont de tailles très variables pouvant aller de 20 kDa pour le pro-TGF- $\alpha$  jusqu'à 170-180 kDa (Harris et al., 2003; Le Gall et al., 2003; Maréchal et al., 2013) pour le pro-EGF. La séquence peptidique de clivage du ligand est située dans la région juxtamembranaire du domaine extracellulaire. Dans le cas des ligands de l'EGFR (EGF, TGF- $\alpha$ , amphireguline, HB-EGF, bétacelluline, épireguline) il a été proposé que la forme précurseur soit capable de lier l'EGFR et d'établir ainsi un mode de communication juxtacrine (Massagué & Pandiella, 1993). Dans la plupart des cas cependant, le précurseur est clivé dans sa région juxtamembranaire et l'ectodomaine libéré dans le milieu extracellulaire. Cet ectodomaine subit généralement au moins une maturation protéolytique supplémentaire permettant la libération de la forme mature du facteur de croissance. Le clivage du précurseur libérant l'ectodomaine et préalable à la sécrétion d'un des ligands de l'EGFR est assurée par une activité de type  $\alpha$ -secrétase impliquant les métalloprotéases de la famille ADAM (plus particulièrement ADAM17 et ADAM10) (Gall et al., 2009; Ohtsu et al., 2006). Les ligands ainsi sécrétés assurent alors des modes de communication intercellulaires à plus ou moins longue distance de type autocrine/paracrine et endocrine.

Les ligands de l'EGFR se lient aux parties riches en leucines du domaine de liaison de l'EGFR (appelés domaines I et III). Historiquement, il était accepté que l'EGFR possédait des sites de haute et basse affinité pour l'EGF correspondant aux formes dimériques et monomériques de l'EGFR respectivement. Dans ce modèle, c'est la liaison du ligand sur la forme monomère qui induisait la dimérisation. Ce modèle de coopération positive n'étant pas conciliable avec l'analyse des résultats des expériences de liaison de ligands et leur modélisation, il a donc été proposé un modèle de coopération négative entre les deux sites de liaison de l'EGF. Dans ce modèle, le ligand se lierait non pas sur le récepteur à l'état de monomère mais sur le récepteur préalablement dimérisé. Le ligand se lierait alors avec une haute affinité à un premier site, cette liaison entraînant une baisse d'affinité pour le deuxième site du dimère (Macdonald & Pike, 2008). Enfin, très récemment, certains ont montré, dans des cellules CHO, que la liaison d'une seule molécule de ligand pouvait conduire à l'activation de l'EGFR (Liu et al., 2012). Dans ce cas, la liaison du ligand sur le

récepteur monomère entraîne une modification conformationnelle du récepteur qui voit alors sa boucle de dimérisation (appelé domaine II du domaine de liaison de l'EGFR) exposée à d'autres récepteurs membranaires. Ceci entraîne alors une homo- ou hétéro- dimérisation avec d'autres membres de la famille HER mais aussi certains membres de la famille du récepteur de l'IGF (IGFR). Cette dimérisation entraîne l'activation de l'activité tyrosine-kinase du domaine cytoplasmique et conduit à la transphosphorylation de l'extrémité carboxy-terminale de la paire de récepteurs. De manière plus précise, il a été montré que la kinase de l'EGFR est activée par la formation d'un dimère de kinases asymétriques dans lequel le lobe carboxy-terminal de la kinase dite « activatrice » interagit avec le lobe amino-terminal de la kinase « acceptrice » qui phosphoryle alors la queue C-terminale de la kinase activatrice (Zhang et al., 2006). Il a été suggéré que ce mécanisme d'interactions séquentielles entre les deux domaines tyrosine kinase était concomitant avec la fixation des ligands de l'EGFR selon le modèle de coopération négative évoqué précédemment (Adak et al., 2011). Cette même équipe conclue même en affirmant que le modèle de coopération négative appliqué à la fixation des ligands EGF est dû au fait qu'une partie de l'énergie issue de la fixation du premier ligand est utilisée pour réarranger les domaines kinasiques sous-jacents, ce qui diminue *in fine* l'affinité du second site de liaison de l'EGF encore disponible. Une autre équipe a proposé un modèle basé sur des modélisations informatiques de l'activation entre deux molécules d'EGFR. Ils décrivent ainsi que le lobe amino-terminal sus-cité est intrinsèquement désordonné et que son ordre augmente après dimérisation. Cet état désordonné est inactif et son maintien semble être au moins partiellement dû au résidu L858. Or, la mutation de ce résidu en arginine entraîne une tendance à dimériser plus importante bien que l'emplacement de la mutation soit éloigné de l'interface de dimérisation du lobe amino-terminal. Ainsi donc, une mutation oncogénique peut supprimer le désordre intrinsèque du domaine tyrosine kinase, favoriser sa dimérisation et son activité basale ainsi que l'intensité de la réponse à un ligand

Les tyrosines phosphorylées dans la région carboxy-terminale de l'EGFR consécutivement à la liaison du ligand et à l'augmentation de l'activité tyrosine-kinase intrinsèque servent en tant que sites de recrutement pour des protéines cytoplasmiques ayant un domaine SH2. La liaison de ligands de l'EGFR permet l'activation aval de nombreuses voies de signalisation dont les voies Erk, Akt et STAT avec des conséquences sur

des phénomènes fondamentaux tels que la migration, la différenciation ou la prolifération (Figure 12).

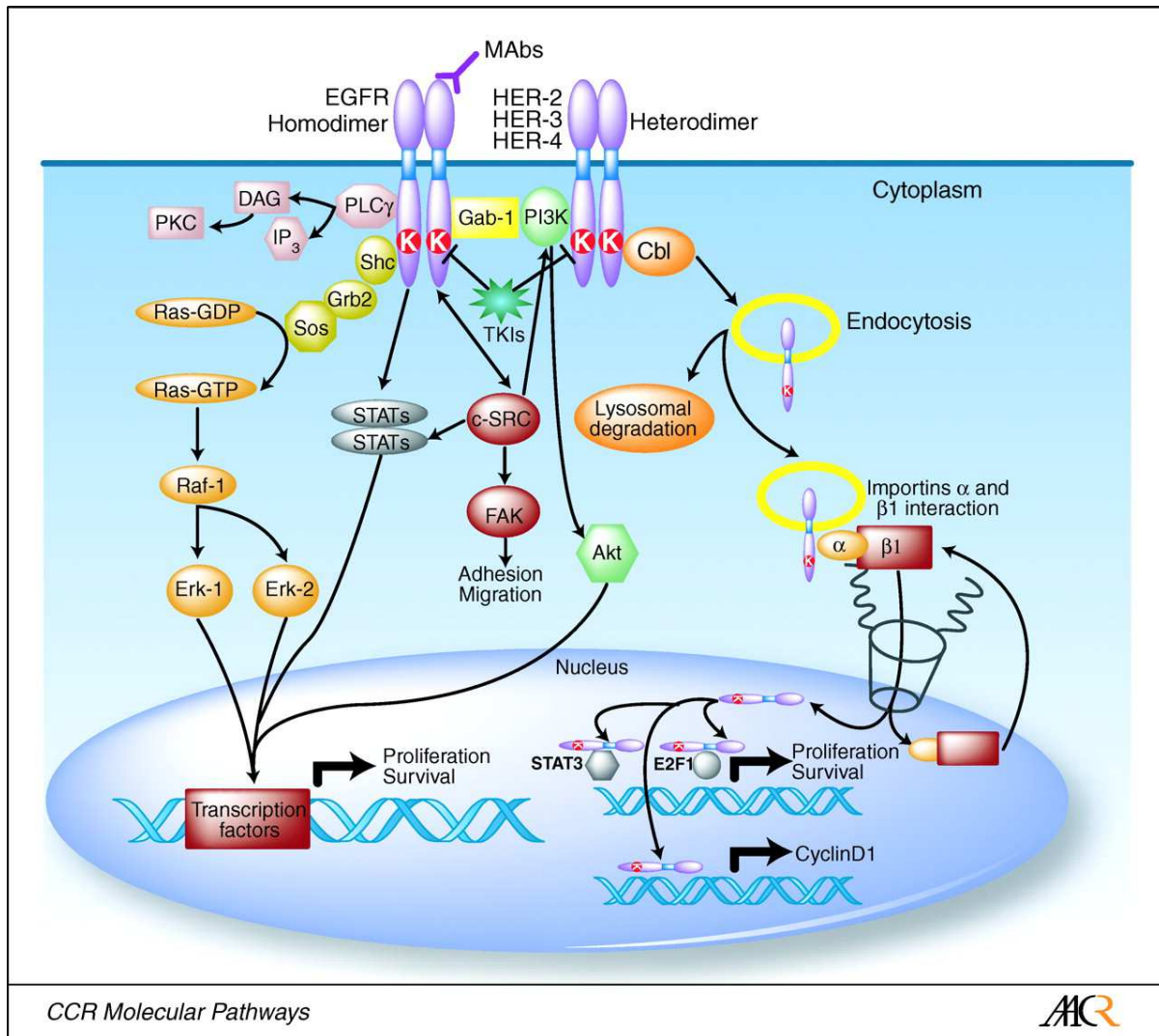


Figure 12 : Conséquences intracellulaires de l'activation du récepteur de l'EGF après homo, hétérodimérisation ou transactivation. (Scaltriti & Baselga., 2006)

Parmi les très nombreux sites phosphorylables de l'EGFR (environ deux douzaines identifiés et de nombreux autres suspectés) suite à son activation par un ligand, certains sont particulièrement sensibles aux inhibiteurs de la famille des TKIs (Tyrosine\_Kinase Inhibitors) et la mutation d'autres entraîne une activation dérégulée de l'EGFR (G. Zhang et al., 2011)



De par leur rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire, les récepteurs de la famille ErbB sont très souvent impliqués dans les troubles hyperprolifératifs cellulaires comme le cancer. Lorsqu'ils sont surexprimés, les récepteurs ErbB ainsi que leurs ligands, peuvent contribuer au passage d'une cellule d'un état physiologique normal à un état pathologique. En effet, dès 1981, une étude montrait que l'expression endogène de TGF $\alpha$  (un ligand de l'EGFR) par des cellules était suffisante pour induire une « transformation » des cellules et ainsi cette étude introduisait le concept d'autocrinie (Todaro et al. 1981).

## Contrôle de l'activité de l'EGFR

La dérégulation de l'activité de l'EGFR est un des facteurs responsables du développement, de la progression et de la capacité à former des métastases de cancers tels que HNSCC (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma), NSCLC, cancer colorectal, cancer du sein, du pancréas, des ovaires, de l'estomac (Harris & McCormick, 2010; Laurie & Goss, 2013; Leemans et al., 2011)...

Dans la plupart de ces pathologies, l'EGFR peut être sur-activé à cause de l'amplification génique du locus de l'EGFR, de délétions des exons 2-7 de l'EGFR (EGFRvIII) (Malden et al., 1988), de mutations ponctuelles de la séquence codant le récepteur (Humphrey et al., 1990), de dérégulation du feedback négatif de l'EGFR (Peschard & Park, 2003) ou d'excès de ligand disponible (Sizeland & Burgess, 1992).

La fixation de ligands aux dimères d'EGFR, entraîne une accélération du phénomène de recyclage constitutif (indépendant de la fixation de ligand) par endocytose médiée par puits de clathrine. Par la suite, les récepteurs activés suivent la voie de dégradation endosomale ou un recyclage vers la membrane. Il semblerait que la signalisation EGFR ne soit pas restreinte stricto sensu aux récepteurs activés situés en surface mais aussi à ceux activés et internalisés dans les compartiments endosomaux précoces. En effet, l'EGFR phosphotyrosylé et capable de lier la protéine adaptatrice Shc a été identifié dans les endosomes précoces de cellules HeLa (Oksvold et al., 2000). De plus, une équipe japonaise a montré, dans un modèle de cellules NSCLC, que la résistance à un inhibiteur perméant de

l'activité kinasique de l'EGFR (Gefitinib) coïncidait avec un trafic endosomo-lysosomal altéré de l'EGFR (Nishimura et al., 2008). En outre, nous savons que la phosphorylation de résidus autres que des tyrosines peut avoir un rôle quant à la stabilité et au routage interne rétrograde de l'EGFR. En effet, la phosphorylation de la thréonine 654 de l'EGFR par la PKC entraîne une inhibition de la translocation de l'EGFR activé vers les compartiments de dégradation et une augmentation de sa localisation dans les compartiments endosomaux précoces associés aux voies de recyclage (Bao et al., 2000). Au contraire, la phosphorylation des tyrosines permet le recrutement de c-Cbl qui dirige le complexe vers les endosomes tardifs et la machinerie lysosomale. En complément, on note que l'activation de la PKC semble permettre également une augmentation de l'endocytose de molécules d'EGFR n'ayant pas lié de ligands (Bao et al., 2000).

Des rapports ont récemment mis en évidence que la clusterisation ou regroupement fonctionnel d'entités telles que l'EGFR pouvaient avoir un rôle quand à son activation. Par exemple, après liaison de son ligand et phosphorylation des domaines kinases, il est décrit que les molécules d'EGFR se regroupent en clusters. Une équipe a mis au point un système de molécules de ligands EGF immobilisés ou non sur des matrices à deux dimensions et a observé que l'EGF devait être mobile pour un clustering du complexe ligand-récepteur et que la taille du cluster de complexes ligand-récepteur pouvait influencer le taux de phosphorylation par molécule d'EGF engagée (Stabley et al. 2013). Une autre équipe a également proposé qu'une dimérisation après fixation de ligand puisse entraîner secondairement des tyrosine-phosphorylations intracellulaires sur des molécules d'EGFR situées à proximité de l'EGFR activé initial. Ces phosphorylations secondaires, particulièrement sur la tyrosine835 entraîne le passage de l'état inactif désordonné de l'EGFR à l'état activé ordonné (Shan et al., 2012). Selon les auteurs, ce phénomène permettrait une amplification du signal quasi-indépendante du nombre de molécules de ligands engagées. Ce signal serait contrebalancé par l'activation de tyrosines-phosphatases membranaires dont l'inhibition par le pervanadate conduit à l'augmentation de la propagation de signaux de manière latérale et indépendamment de la liaison de ligands de l'EGFR (Reynolds et al., 2003).

## *EGFR et inhibiteurs de tyrosine-kinase (TKI)*

Ainsi, vue l'importance et la diversité de la régulation de l'EGFR et son implication très fréquente dans l'établissement et le maintien des pathologies cancéreuses, des stratégies visant à l'inhibition de l'activité tyrosine-kinase de l'EGFR ont été développées.

Tout d'abord, de petites molécules perméantes se liant de manière réversible et compétitive au site de liaison de l'ATP du domaine tyrosine-kinase ont été utilisées, les EGFR Tyrosine-Kinase Inhibitors ou EGFR-TKIs. On trouve 3 de ces types de molécules utilisées en tant que traitements anticancéreux, l'Erlotinib (Tarceva/OSI-774), le Gefitinib (Iressa/ZD1839) et le Lapatinib (Tykerb/GW572016). Bien qu'efficaces en première ligne, ces drogues induisent presque inévitablement l'apparition d'une résistance permettant aux cellules d'échapper à leur dépendance vis-à-vis de l'activation de l'EGFR pour le maintien de leur état prolifératif ou hyperprolifératif et/ou de leur résistance à l'apoptose. Cette résistance peut être obtenue via divers accidents génétiques tels que la mutation T790M dans l'exon 20 du gène codant l'EGFR (représentant presque la moitié des cas de résistance aux EGFR-TKIs dans le cas des cancers NSCLC). Cette mutation augmente l'affinité du site catalytique pour l'ATP réduisant ainsi l'efficacité d'un inhibiteur compétitif pour ce site (Yun et al., 2008) cette résistance peut aussi être la conséquence de l'amplification du gène codant pour un autre récepteur comme le récepteur à l'Hépatocyte Growth Factor (MET) dans le cas de cancers pulmonaires entre autres (Bean et al., 2007) ou encore causée par l'hyperphosphorylation du récepteur à l'IGF de type 1 (IGF1R) (Guix et al., 2008).

## *Anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR*

A la suite des progrès du génie génétique en particulier, des anticorps monoclonaux a été développés et sont, à l'heure actuelle, utilisés pour cibler et bloquer le domaine de liaison des ligands de l'EGFR (Gill et al., 1984). Ces anticorps monoclonaux développés à l'origine par les équipes de J.D. Sato et T. Kawamoto au milieu des années 80 pouvaient lier l'EGFR humain, bloquer 95% de la liaison de l'EGF ainsi que la phosphorylation du récepteur

induite par celui-ci et le potentiel prolifératif dans des cellules humaines de carcinome épidermoïde A431 (Kawamoto et al., 1983; Masui et al., 1984).

L'anticorps Cetuximab (Erbix/ICM-225) est un des anticorps murins anti-EGFR produits par cette équipe (mAb 225). Il a été humanisé avec un isotype IgG1-Fc. Il se lie au domaine III de l'EGFR, obstrue partiellement le domaine de liaison du ligand et par encombrement stérique, empêche le changement conformationnel du domaine II de dimérisation (S. Li et al., 2005). De plus, il a été montré que le Cetuximab promeut l'internalisation de l'EGFR (Sunada et al., 1986). A titre d'exemple, le traitement par le Cetuximab conduit à des effets aussi divers que : in-vitro, un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 grâce à une augmentation de la concentration en p27<sup>kip1</sup> et en conséquence celle du complexe p27<sup>kip1</sup>-Cdk2 (Huang et al., 1999). et in-vivo, à l'inhibition de l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, interleukine-8 et bFGF (Perrotte et al., 1999). Il est efficace en tant qu'inhibiteur de la prolifération ainsi que de la dissémination métastatique de carcinomes (Bruns et al., 2000). Le traitement par le Cetuximab peut induire l'apoptose par surexpression des caspases 3-8-9 (Liu et al., 2000) en augmentant l'expression d'un facteur pro apoptotique tel que Bax et sa redistribution du cytoplasme vers le noyau. Cette apoptose induite par le Cetuximab peut être contrecarrée par ajout d'EGF dans le cas de cellules ayant des affinités équivalentes pour l'anticorps et EGF -par exemple, des cellules de carcinome rectal DiFi (Wu et al., 1995)-. Enfin, Cetuximab peut provoquer une réponse immunitaire anti-tumorale grâce au mécanisme de cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ADCC) via son squelette Fc IgG1 humain. En effet, lorsque les tumeurs (ici des tumeurs de cancers du poumon) qui surexpriment l'EGFR lient le Cetuximab, le fragment Fc (humain) de celui-ci est reconnu par les cellules NK et les monocytes. Cette reconnaissance déclenche une réponse cytolytique ciblant de manière privilégiée les cellules tumorales (qui surexpriment l'EGFR) et médiée par des perforines et des granzymes (Kurai et al., 2007).

Le Cetuximab a obtenu en 2004 l'approbation de la FDA pour son utilisation en tant que traitement sur des patients atteints de cancer colorectal avec surexpression de l'EGFR et résistance au traitement par irinotecan (prodrogue dont le métabolite actif SN-38 inhibe la topoisomérase I et donc la réplication et la transcription de l'ADN).

Il existe un second anticorps monoclonal IgG<sub>2</sub>k humain cette fois (Jakobovits et al., 2001), utilisé en clinique et ciblant l'EGFR, le Panitumumab. Il est validé en tant que monothérapie aux Etats Unis pour les patients résistants aux chimiothérapies standards et ayant un statut KRAS non muté. Cependant, l'ajout de Panitumumab à un traitement chimiothérapeutique semble favoriser une baisse significative du risque de progression et de décès pour des patients au KRAS non muté (Peeters et al., 2010). Il s'agit d'un anticorps de haute affinité pour EGFR se liant de manière compétitive au site de liaison aux ligands (domaine III) de l'EGFR. Après liaison avec l'EGFR, Panitumumab et EGFR sont rapidement internalisés et on observe une inhibition de la phosphorylation de l'EGFR et des voies de signalisation MAPkinase et Akt, c'est-à-dire des deux grandes voies de stimulation de la prolifération et de la survie cellulaire..

Il a été montré enfin qu'un anticorps monoclonal de rat ciblant l'EGFR, l'ICR62, dans des tumeurs HNSCC surexprimant EGFR, a pour effet de diminuer l'expression de métalloprotéases de la matrice extracellulaire. Cette diminution et plus particulièrement celle de MMP9, contribue ainsi à une diminution des capacités de migration de ces cellules tumorales et de leur phénotype invasif (O-Charoenrat et al., 2000).

## Dérégulation de l'EGFR et résistance aux traitements anti-EGFR

Bien que l'EGFR soit la seule cible identifiée du Cetuximab, il a été montré que des patients atteints de tumeurs colorectales n'exprimant pas d'EGFR détectable par la technique d'immunohistochimie (conduisant les auteurs à émettre un sérieux doute concernant la sensibilité de cette méthode de détection utilisée en routine en clinique), répondent à un traitement par cet anticorps (Chung et al., 2005). Ceci contredit les recommandations de la FDA et prouve que le niveau d'expression d'EGFR ne peut pas être utilisé en tant que facteur prédictif de réponse à ce type de traitement.

Il semble que le réseau de signalisation incluant l'IGF1 son récepteur IGF1R ainsi que les protéines liant l'IGF (IGFBPs) ait un rôle crucial dans la régulation de la prolifération, la différenciation, l'angiogénèse ou l'apoptose des cellules de cancer colorectal. De plus,

l'IGF1R et l'EGFR ont des effecteurs aval communs tels que les voies de signalisation des MAPkinases et PI3K/Akt et l'EGFR et l'IGF1R peuvent hétérodimériser (Ahmad et al., 2004). Ainsi, dans un modèle de carcinome hépatique (cellules HepG2), le traitement des cellules cancéreuses conjointement par du Gefitinib et un anticorps dirigé contre l'IGF1R aboutit à un effet antiprolifératif supra-additif. L'action des deux molécules est donc synergique et la cellule est capable dans certains cas de passer, suivant le traitement, d'une croissance dépendant majoritairement de la signalisation induite par l'EGFR à une croissance dépendant d'IGF1R (Desbois-Mouthon et al., 2009). Il est intéressant de noter également que l'hétérodimérisation d'IGF1R et de HER2 induit une résistance à un traitement du cancer du sein basé sur un anticorps dirigé contre HER2, Trastuzumab (Nahta et al., 2005). En outre, il a été montré que dans un modèle de cellules épidermoïdes telles qu'A431, résistantes au Gefitinib et présentant une hyperphosphorylation de l'IGF1R conduisant à une association constitutive de la PI3K via la protéine IRS-1 et une stimulation de la voie Akt, l'inhibition de l'IGF1R restaure la dépendance à l'EGFR et la sensibilité au Gefitinib (Guix et al., 2008).

Certaines mutations « gain de fonction » de l'EGFR entraînent une sensibilité accrue aux inhibiteurs tels qu'Erlotinib et Gefitinib (Paez et al., 2004). C'est le cas, par exemple de la substitution L858R dans l'exon 21 qui est associée à une sensibilité accrue des cellules cancéreuses NSCLC au Gefitinib (Tracy et al., 2004). A l'opposée, la substitution T790M dans le domaine tyrosine kinase de l'EGFR est indicatrice d'une résistance aux inhibiteurs du domaine tyrosine kinase de l'EGFR tel que le Gefitinib (Pao et al., 2005). Cependant, cette mutation n'engendre pas de résistance au traitement par le Cetuximab (Barber et al., 2004) et l'inhibition de la traduction de la forme mutante T790M de l'EGFR par ajout de SiARN spécifiques de celle-ci restaure une sensibilité au Gefitinib. Ces derniers exemples montrent l'intérêt d'un traitement clinique des patients conjointement par les inhibiteurs de l'activité tyrosine-kinase (Gefitinib) et les anticorps anti-récepteur (Cetuximab) dans le cas de tumeurs cancéreuses dépendantes de l'EGFR permettant ainsi de limiter l'apparition de résistance... Le mécanisme de résistance induite due à une substitution ponctuelle n'est pas spécifique à la kinase de l'EGFR et se retrouve par exemple dans le cas de résistances à l'Imatinib (T315I dans BCR-Abl, T674I dans PDGFR- $\alpha$ , T670I dans Kit). Dès la mise en évidence de la mutation T790M de l'EGFR, Pao et ses collègues (voir plus haut) ont émis l'hypothèse selon laquelle des clones résistants pré-existent au sein d'une population cancéreuse primaire, même à

faible fréquence et que ce n'est qu'après traitement avec un inhibiteur de kinase de l'EGFR que ces clones présentant un avantage sélectif deviennent majoritaires. A ce sujet, une équipe de Kobe, Japon a rapporté le cas d'un patient présentant un adénocarcinome pulmonaire diagnostiqué au départ uniquement avec une mutation L858R. Ce patient a ensuite été traité par Gefitinib durant 2 ans après lesquels une double mutation L858R et T790M a été observée. On retira le Gefitinib du traitement et un an plus tard, seule restait la mutation L858R. Cette observation clinique validerait donc l'hypothèse de l'existence de tumeurs hétérogènes en terme de populations TKI-sensibles et TKI-résistantes dont les proportions respectives varierait selon la pression sélective induite par l'ajout de TKI (Hata et al., 2013).

Des molécules impliquées en aval d'EGFR lors des cascades d'activation des voies de signalisation peuvent également avoir un rôle quant à la résistance des patients au traitement par le Cetuximab. C'est le cas de KRAS dont certaines mutations (codons 12 et 13) corrélient fortement avec une résistance au Cetuximab (De Roock et al., 2008). KRAS est une GTPase se liant à l'EGFR, dont l'activation permet un changement conformationnel de RAF et l'activation des voies RAF/MEK/ERK et PI3K. Le lien entre le statut de KRAS et la résistance au traitement par le Cetuximab a été confirmé un tel nombre de fois (Karapetis et al., 2008; Laurent-Puig et al., 2009) que l'American Society of Clinical Oncology a émis en 2009 une note stipulant que le Cetuximab ne devait pas être employé en tant que traitement du cancer colorectal en présence de telles mutations de KRAS (Allegra et al., 2009). Par la suite, d'autres mutations de KRAS ainsi que certaines de BRAF (serine-thréonine kinase de la famille RAF activant MEK) furent identifiées comme coïncidant avec la résistance au Cetuximab (Di Nicolantonio et al., 2008; Loupakis et al., 2009).

Il est possible que certains cancers colorectaux apparaissent et persistent indépendamment du statut mutationnel de KRAS/BRAF à cause de l'établissement de boucles auto/paracrines impliquant les ligands de la famille de l'EGF et rendant dépendantes les cellules à l'activation soutenue de l'EGFR. Dans ces cas, l'interruption de la liaison entre les ligands et leur récepteur par les anticorps serait particulièrement efficace. Le cancer colorectal est la troisième cause de décès au monde et environ la moitié des patients

diagnostiqués présentent la forme métastatique de ce cancer qui est associée avec une haute morbidité (Ferlay et al., 2007). Le traitement de ce type de patients avec des anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR est effectif depuis 2004 en association avec une chimiothérapie (Saltz et al., 2004). Cependant, seuls 10 à 20% des patients souffrant de ce cancer tirent un bénéfice du traitement par Cetuximab ou Panitumumab puisqu'une résistance au traitement se manifeste en général assez rapidement. La résistance au traitement par anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR ne semble pas due à l'apparition de mutations somatiques activatrices de l'EGFR comme dans les cas d'apparition de résistances au Gefitinib (Moroni et al., 2005; Paez et al., 2004). De même, une amplification génique de l'EGFR ne se traduit pas nécessairement par une augmentation de l'expression d'EGFR, ni par une réponse aux anticorps inhibée ; la réponse est même plutôt plus efficace dans ce dernier cas (Sartore-Bianchi et al., 2007).

Les raisons précises de l'apparition et de l'établissement des résistances secondaires ne sont pas vraiment claires. En général, dans le cas de tumeurs au statut KRAS/BRAF sauvage, l'établissement d'une résistance au traitement par anticorps anti-EGFR apparaît après 12 à 18 mois (Cunningham et al., 2004). Cependant, il n'est pas certain que celles-ci s'établissent pour les mêmes raisons et avec les mêmes acteurs que les résistances primaires.

Récemment, une mutation secondaire S492R dans le domaine extracellulaire de l'EGFR a été identifiée. Cette mutation interdit la reconnaissance de l'EGFR par le Cetuximab mais pas par le Panitumumab. Cette mutation serait ainsi responsable de la résistance de certains patients au Cetuximab mais n'empêcherait pas l'action anti-proliférative du Panitumumab (Montagut et al., 2012) rendant ainsi possible l'utilisation alternative de cet anticorps. Certaines équipes commencent à évoquer d'autres modes de mise en place de résistances telles que la possibilité de court-circuiter la voie EGFR en activant les autres récepteurs de la famille comme HER2 ou HER3 et même IGF1R vu la capacité de ceux-ci à hétérodimériser avec l'EGFR (Desbois-Mouthon et al., 2009). L'implication d'un tel nombre d'acteurs causant ou non une résistance aux anticorps dirigés contre l'EGFR pousse à



évoquer la nécessité absolue d'une thérapie ciblée et personnalisée selon le génotype et la/les cause(s) identifiée(s) de résistances potentielles ou certaines.

### *Transduction du signal EGFR*

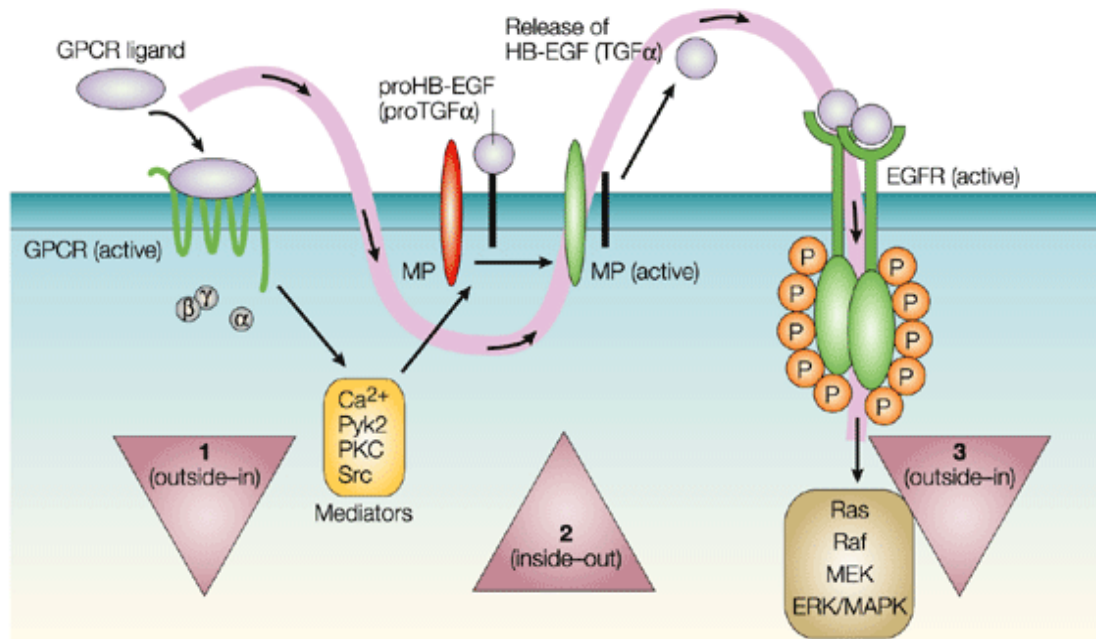
#### Transactivation du récepteur de l'EGF

L'intégration d'un grand nombre de stimuli reçus par une cellule au sein d'un réseau complexe d'interactions moléculaires est cruciale pour le fonctionnement correct de celle-ci. A ce titre, il a été montré que plusieurs récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) pouvaient activer l'EGFR sans que les agonistes de ces GPCR n'interagissent avec l'EGFR (Daub, et al., 1996). La transactivation de l'EGFR est consécutive à l'activation du récepteur GPCR par un de ses ligands, au recrutement de différentes voies de signalisation intracellulaire conduisant à la mise en jeu d'activités protéasiques de type métalloprotéases (Prenzel et al., 1999). L'activation de cette/ces protéase conduit au clivage de précurseurs membranaire de ligands de l'EGFR et à l'activation de celui-ci (Fischer et al., 2003; Ohtsu et al., 2006).

De nombreux couples ligands-GPCR ont été impliqués dans la transactivation de l'EGFR via l'action de métalloprotéases identifiées. A titre d'exemple, l'angiotensine 2, hormone cardiovasculaire qui, après liaison à son récepteur AT1, médie le clivage d'HB-EGF par ADAM17 dans des fibroblastes (Mifune et al., 2005) et dans le cancer rénal (Lautrette et al., 2005) ou par ADAM12 dans les myocytes cardiaques (Asakura et al., 2002). De même, le LPA se lie à ses récepteurs (LPA1-4) et induit la transactivation de l'EGFR, l'activation de Erk et la croissance cellulaire via le clivage de HB-EGF par ADAM10 ou 17 selon les lignées cellulaires étudiées. Dans une lignée de carcinome cellulaire, SSC-9, ADAM17 clive un autre ligand de l'EGFR, l'amphiréguline, en réponse à l'activation du récepteur muscarinique par le carbachol ou du récepteur du LPA par son ligand (Gschwind et al., 2003). Dans des lignées de cancer de la vessie, ce rôle est dévolu à ADAM15 (Schäfer et al., 2004).

Depuis 1996 et sa mise en évidence, la transactivation de l'EGFR a été très étudiée et a permis de montrer un rôle prépondérant de plusieurs métalloprotéases de la famille des ADAMs (ADAM10, 12, 15, 17) dans ce phénomène.

La transduction du signal entre GPCR et l'EGFR se déroule selon un modèle de triple passage transmembranaire. L'activation du GPCR par un ligand du milieu extracellulaire induit un signal entrant impliquant les effecteurs cytoplasmiques des GPCR ainsi que des messagers secondaires tels que le calcium, les kinases de la famille Src, Pyk2 et des activités kinasiques de type PKC selon le type cellulaire considéré. Ces messagers secondaires activent, par des mécanismes qui, dans leur grande majorité demandent à être établis, une ou plusieurs métalloprotéases membranaires (ectoprotéases) de type ADAM. L'activation de ces protéases conduit au clivage juxtamembranaire des précurseurs des ligands de l'EGFR, étape préalable à leur sécrétion dans le milieu extracellulaire. C'est le signal sortant. Puis, les ligands sécrétés dans le milieu se lient à leur récepteur, l'EGFR, situé sur la même cellule ou sur une cellule adjacente, établissant un mécanisme de communication autocrine et/ou paracrine. Ils y induisent un second signal entrant correspondant aux voies de signalisation spécifiques de l'EGFR (**Figure 13**).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 13 : Représentation schématique de la transactivation du récepteur à l'EGF par un ligand de GPCR et via le clivage d'HB-EGF par une métalloprotéase. Adapté de (Wetzker & Böhmer, 2003)**

Ce mécanisme comporte cependant plusieurs exceptions comme l'implication des protéines tyrosine-kinase de la famille Src qui pourraient court-circuiter l'action des ADAMs et activer directement l'EGFR par phosphorylation de son domaine intracellulaire (Biscardi et al., 1999). De manière générale, les mécanismes aboutissant à la stimulation de l'EGFR sont très variés et au sein d'une même cellule, la transactivation serait le résultat d'une intégration de multiples signaux (Rodland et al., 2008). Une activation particulièrement intéressante des ADAMs se déroule via l'augmentation de la concentration locale en espèces réactives de l'oxygène (ROS). En effet, la génération de ROS tels que  $H_2O_2$  par les cellules induit l'activation de l'EGFR via ADAM10 et 17 et partiellement par ADAM9 (Fischer et al., 2004) et il a été proposé que l'activation des ADAMs ne soit pas consécutive à des interactions physiques entre molécules effectrices mais plutôt à cause de modifications post-traductionnelles telles qu'une oxydation du group thiol de la cystéine du prodomaine

inhibiteur des ADAMs qui ne pourrait alors plus coordiner l'atome de zinc du site catalytique (Zhang et al., 2001).

Parmi les messagers secondaires et les différentes voies de signalisation intracellulaires activant les ADAMs, il a été montré que les MAPkinases Erk ou p38 peuvent phosphoryler et activer les ADAMs (Diaz-Rodriguez et al., 2002, Yuste, & Pandiella, 2002; Fischer et al., 2004) alors que la tyrosine-phosphatase PTPH1 interagit avec ADAM17 et inhibe le clivage de TNF $\alpha$  induit par PMA (Zheng et al., 2002). Ces résultats suggèrent que des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation (cf. chapitre précédent concernant les ADAM) pourraient être impliquées dans la régulation de ces protéases. Egalement, les interactions entre protéines membranaires pourraient être modifiées après stimulation des GPCRs et ainsi permettre une activation des ADAMs par rapprochement physique de ces dernières et de leur(s) cible(s). A ce sujet, une interaction entre la tétraspanine CD9, la métalloprotéase ADAM10 et le ligand de l'EGFR HB-EGF, a été démontrée après stimulation avec la bombésine et donc pourrait valider cette hypothèse d'un rôle de la compartimentation fonctionnelle de la membrane (Yan et al., 2002). Cette idée est de plus renforcée par le fait qu'une déplétion en cholestérol membranaire par la cyclodextrine qui conduit à la déplétion de cholestérol membranaire, augmente par exemple le clivage d'APP par ADAM10 (Kojro et al., 2001).

# Matériel et méthodes

## Cellules

Dans cette étude, nous avons utilisé principalement des lignées établies de cellules adhérentes humaines :

Les cellules PC3 générées à partir d'une métastase osseuse de grade IV issue d'un cancer de la prostate chez un patient de 62 ans de type caucasien.

Les cellules HeLa générées à partir d'une tumeur du col de l'utérus et qui constituent la première lignée cellulaire immortelle humaine établie –mise en perspective historique dans (Lucey et al., 2009)-.

Les cellules HCT116 générées à partir d'un carcinome colorectal.

Les cellules HEK293 générées à partir de cellules de rein embryonnaire prélevé chez un fœtus sain.

Les cellules U2OS établies à partir d'un ostéosarcome

Les cellules OP9 générées à partir de cellules souches embryonnaires murines.

Nous avons également eu recours à des souris immunodéprimées SCID pour les expériences de xénogreffes.

## Anticorps

Les anticorps monoclonaux produits au laboratoire et utilisés dans cette étude sont les anticorps anti-tétraspansines TS9 (CD9), 5A6 (CD81), 12A12 (CD55), 1F11 (CD9-P1), TS151 (CD151), 4G10 (pan-phosphotyrosine), intégrine  $\beta$ 1 (12G10) et 11G2 (ADAM10) -décrit dans (Arduise et al., 2008)-. Nous avons également utilisé un anticorps neutralisant l'amphiréguline (R&D) et des anticorps dirigés contre les domaines extracellulaires de

différentes protéines membranaires : anticorps anti-EphA2 (371805, R&D), anti-EGFR(Sc-03, SantaCruz), anti-ADAM17(11623, R&D) et E-cadhérine (AF648, R&D) d'ADAM10 (mab1427, R&D) ainsi que deux anticorps dirigés contre le domaine intracellulaire de l'E-cadhérine (clone36, BD-Biosciences). Lors des quantifications de phosphorylation, des anticorps dirigés contre pErk (E10, Cell Signaling) et pAkt (Cell Signaling) sont mis à contribution. Des anticorps dirigés contre des protéines « constitutives » du cytosquelette telles que la tubuline (Tub2-1, Sigma-Aldrich) et l'actine (ac-74, Sigma-Aldrich) ont aussi été utilisés pour la normalisation de certaines expériences analysées par Western-blot et un anticorps dirigé contre la PhosphoDisulfidIsomerase (PDI, Abcam) pour marquer le réticulum endoplasmique. Les anticorps humanisés Cetuximab (anti-EGFR) et Trastuzumab (anti-HER2) utilisés en clinique humaine sont des dons du service Pharmacie de l'AP-HP de l'hôpital Paul Brousse. Ont aussi été utilisés plusieurs anticorps dirigés contre des étiquettes « Tag » ajoutées aux séquences des différents transgènes utilisés dans ce travail : l'anticorps HA-11 (Covance), dirigé contre l'étiquette HA (YPYDVPDYA), l'anticorps 9E10 contre l'étiquette c-Myc (EQKLISQQDL), l'anticorps V8137 (Sigma-Aldrich) contre l'étiquette V5 (GKPIPPELLGLDST) et deux anticorps dirigés contre l'étiquette GFP, l'un monoclonal JL-8 (Clontech), l'autre polyclonal (sc-8334) et généré chez le lapin (Santa Cruz Biotechnologies). Les anticorps secondaires utilisés pour les expériences de Western-blot sont des anticorps polyclonaux (i.e. des anticorps de chèvre anti-immunoglobulines totales de souris ou de lapin) couplés à des sondes fluorescentes Alexa Fluor 680 et 800 (Invitrogen). Alternativement, les protéines de surface biotinylées et analysées par SDS-PAGE peuvent être révélées par de la streptavidine couplée à la sonde Alexa800 (Invitrogen). Lors des expériences d'immunofluorescence sur lame, l'anticorps secondaire utilisé est un anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre les immunoglobulines totales de souris et couplé aux sondes Alexa488 et Alexa568 (Invitrogen) et pour les expériences de cytométrie en flux à l'allophycocyanine ou la phycoérythrine (Beckman Coulter). Enfin, le DAPI est utilisé pour marquer les noyaux des cellules.

## Produits divers

Atropine (Sigma-Aldrich): Antagoniste compétitif non sélectif des récepteurs cholinergiques de type muscariniques

PMA (Sigma-Aldrich): Activateur réversible spécifique des PKC conventionnelles ( $\alpha$  / $\beta$ / $\gamma$ )

EGF (Sigma-Aldrich): ligand du récepteur de l'EGF (EGFR)

Carbamylcholine (Sigma-Aldrich): Agoniste cholinomimétique des récepteurs muscariniques et nicotiniques

Lactacystine (Calbiochem): Inhibiteur spécifique agissant par alkylation irréversible du cœur catalytique 20S du complexe 26S du protéasome

Gö6976 (Calbiochem): Inhibiteur réversible ATP-compétitif spécifique des PKC conventionnelles et nouvelles  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes

Rottlerin (Calbiochem): Inhibiteur spécifique de PKC  $\delta$

Tapi-2 (Calbiochem): Inhibiteur à large spectre des métalloprotéases dépendantes du zinc

MG-132 (Calbiochem): inhibiteur réversible du protéasome

DAPT (Calbiochem): inhibiteur de l'unité catalytique (préséniline) du complexe  $\gamma$ -secrétase

CpE (Calbiochem): inhibiteur non compétitif de l'unité catalytique (préséniline) du complexe  $\gamma$ -secrétase

Epoxomycine (Calbiochem): inhibiteur irréversible des activités chymotrypsin-like, trypsin-like et d'hydrolyse du peptidyl-glutamylpeptide du protéasome

U0126 (Sigma-Aldrich): Inhibiteur non compétitif des MAPKinase-kinases MEK1 et MEK2

AG1478 (Calbiochem) et Gefitinib (SantaCruz): Inhibiteurs compétitifs (avec l'ATP) spécifiques de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR

Cetuximab : Anticorps monoclonal « humanisé » se liant au domaine extracellulaire de l'EGFR et inhibant la fixation de ses ligands

Trastuzumab : Anticorps monoclonal « humanisé » se liant au domaine extracellulaire du récepteur ErbB2 et inhibant la fixation de ses ligands

GI254023X et GW280264X (Dons d'Andreas Ludwig) : Inhibiteurs sélectif d'ADAM10 (GI254023) ou non sélectif d'ADAM10 et ADAM17 (GW280264)

EphrineA1-Fc (R&D) : Construction protéique liant un homodimère d'éphrineA1 capable de se fixer à l'ensemble des récepteurs de type EphA à un fragment constant (Fc) d'IgG1

Trichostatine A (Sigma-Aldrich): inhibiteur réversible d'histone déacétylases

5-aza-2-déoxycytidine (Sigma-Aldrich) : inhibiteur irréversible de DNAméthyltransférases

## Culture cellulaire

L'entretien des cultures de cellules est réalisé en milieu DMEM-Glutamax (PAA) dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup>. Le milieu de culture est supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (ATGC) et les antibiotiques streptomycine (100µg/ml) et pénicilline (100UI/ml) (Gibco) constituant le milieu DMEM complet. Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide de 5% CO<sub>2</sub>.

A 80-90% de confluence (entre 2.10<sup>7</sup> et 3.10<sup>7</sup> cellules par flacon de 75 cm<sup>2</sup>), les monocouches de cellules sont lavées par 5 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline) dépourvu de calcium et magnésium (PAA) puis décollées en présence de 5 ml de trypsine (Sigma-Aldrich) (10000 BAEE unités/mg) en milieu PBS. Suivant la lignée de cellules utilisée, l'action de la trypsine est arrêtée après 5 à 15 min par ajout de 30 ml de milieu de culture complet. Les cellules sont alors centrifugées 5 min à 300g, le surnageant est éliminé et le culot contenant les cellules est remis en suspension dans du milieu de culture que l'on redistribue ensuite soit pour l'entretien des cultures à une dilution des cellules comprise entre 1/5 et 1/7 suivant les besoins et dans la limite de 10 à 15 « passages », soit dans des plaques multi-puits pour les différentes expériences (cf.ci-dessous).



## Transfection et génération de clones stables

Les cellules sontensemencées à environ 70% de confluence dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> en milieu DMEM complet 24 heures avant la transfection. Pour un flacon de 25 cm<sup>2</sup>, 7.5µg d'ADN plasmidique codant pour les transgènes d'intérêt sont mélangés avec 25µL de Lipofectamine2000 (Invitrogen) en milieu dépourvu d'antibiotiques et les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence des complexes comme décrit par le fabricant. Le lendemain, le milieu de transfection est remplacé par du milieu de culture complet. Ces cellules sont alors analysées 48h après transfection par Western-blot ou utilisées pour des expériences en particulier de co-immunoprécipitation. Alternativement, les cellules peuvent également être transfectées avec l'agent transfectant FuGENE6 (Promega) selon le protocole du fabricant.

Pour générer des clones stables, les cellules transfectées par un plasmide codant le transgène d'intérêt portant une étiquette GFP ainsi que la résistance à la néomycine, sont sélectionnées 48 à 72 heures après la transfection en ajoutant de la neomycine (G418, Invivogen) dans le milieu de culture. La culture est maintenue pendant au moins 15 jours en présence de G418 à raison de 800 µg/ml. Les cellules résistantes à l'issue de cette sélection sont analysées et triées par un trieur de cellules (Facs Vantage - Beckton Dickinson). Les cellules exprimant la GFP et ayant le plus fort marquage sont ainsi récoltées et remises en culture, elles constituent une lignée polyclonale dite « stable ».

Lors des expériences visant à déterminer l'influence de l'expression des tétraspanines sur l'activité de Notch, les cellules OP9 exprimant le ligand de Notch DLL1 et les cellules U2OS exprimant le récepteur Notch1 de manière stable ont été obtenues par infection par des rétrovirus comportant l'ADN complémentaire de DLL1 cloné dans le vecteur MSCV-IRES-GFP ou l'ADN complémentaire de Notch1 cloné dans le vecteur pBabe.

## Plasmides utilisés

Les plasmides codant les tétraspanines humaines ont été obtenus par amplification des régions codantes par PCR à partir de plasmides précédemment décrits -(Serru et al. 2000) pour CD9 et les Tspan1, 5, 12 et 15, de plasmides obtenus auprès d'OpenBiosystems (Tspan10 et 33), d'un plasmide codant pour la Tspan17 de souris (don de Mike Tomlinson) ou d'un clonage par RT-PCR à partir de cellules HCT116 (Tspan14). Dans tous les cas, les séquences codantes ont été confirmées par séquençage et sous-clonées dans différents vecteurs permettant l'insertion d'étiquettes (HA, c-Myc, V5 et GFP). Dans le cas de la GFP, les vecteurs utilisés sont les vecteurs pEGFP de Clontech.

Lors des expériences sur la régulation de l'activité  $\gamma$ -secrétase s'exerçant sur Notch, les vecteurs d'expression utilisés contiennent soit la séquence codant  $\Delta E$  correspondant à une version murine de Notch1 comportant une délétion  $\Delta 21-1703$  (Kopan et al., 1996) soit NICD correspondant une version de Notch1 comportant seulement la partie en aval de l'acide aminé 1753 (Nye et al., 1994) clonées dans un vecteur pCS2+MT.

## RT-PCR quantitative

### Extraction des ARN totaux

Les ARN sont extraits à partir d'une quantité de cellules de l'ordre de  $5 \cdot 10^6$ , à l'aide du kit SV Total RNA Isolation System (Promega) incluant une étape de digestion de l'ADN sur colonne et selon les instructions du fabricant. Dans le cas où les cellules ont préalablement subi une interférence ARN, les ARN sont extraits 48 heures après l'interférence. Les ARN totaux sont ensuite quantifiés par mesure de la DO à 260 nm, une valeur de DO de 1 correspondant à une solution d'ARN de 40  $\mu\text{g}$  par ml. On contrôle leur degré de pureté par mesure du rapport de DO 260/280 nm qui doit être de l'ordre de 1.8. Les échantillons sont ensuite conservés à  $-20^\circ\text{C}$  ou  $-80^\circ\text{C}$ .

## Rétro-transcription

Cette rétrotranscription consistant à synthétiser de l'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée en 2 étapes à partir d'ARN totaux et dans les conditions suivantes :

*1<sup>ère</sup> étape :* ARN totaux (volume pour une quantité comprise entre 1.5 et 5 µg).

1 µL dNTP (10mM)

0.5 µL/250 ng d'amorces aléatoires (Hexamères, Promega)

H<sub>2</sub>O qsp 14µL

Ce mélange est incubé pendant 5 min à 65°C afin d'éliminer les structures secondaires de l'ARN puis refroidit très rapidement et laissé pendant au moins 1 minute à 4°C.

*2<sup>ème</sup> étape :* Ajout de 4µL de tampon (5x) (250 mM tris HCl pH=8,3 ; 375 mM KCl ;15 mM MgCl<sub>2</sub>)

1 µL DTT (100mM)

1 µL Superscript III reverse transcriptase (200 unités/µL) (Invitrogen)

H<sub>2</sub>O qsp 20 µL

Le mélange est d'abord incubé 5 min à 25°C puis 1 heure à 50°C et la réaction stoppée par une incubation de 15 min à 70°C et refroidissement à 4°C. Les ADNc ainsi synthétisés sont conservés à -20°C.

## PCR quantitative

La réaction de PCR quantitative elle-même se déroule dans un volume de 25 µl final contenant 12,5 µl de réactif (2x Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix de chez Agilent Technologies ou GoTaq® qPCR Master Mix de chez Promega), 0.4µM d'amorces Sens et Antisense et 0.25µL d'ADNc soit généralement 62.5 µg d'équivalent ARN et de l'eau (qsp 25 µl. L'incubation et la quantification sont réalisées grâce à un appareil Mx3005P et traitées

avec le logiciel MxPro de chez Agilent Technologies. Chaque échantillon de cDNA est analysé en triplicates et normalisés à l'expression du gène de ménage rpl38 selon la méthode de  $\Delta$ Ct.

Les amorces utilisées pour les PCR sont :

rpl38 : GTTGCTGCTGCTGTGAGTG (sens) et CAGATTTGGCATCCTTTCGTC (antisens)

Tspan5 : ACAAGGGTCCTGAAGTCAGTT (sens) et TGATGGAAGAGATGTTGGACAGA (antisens)

Tspan10 : CTGCGTCAAGTATCTGATCTTCC (sens) et AAGCCACGTAACAGGCAGG (antisens)

Tspan14 : GGCTCTGCGGGAGAATATCTG (sens) et GCACTGGTTAGCTTTCTGAAGG (antisens)

Tspan15 : ACTTCCTGAACGACAACATTCG (sens) et CGCCACAGCACTTGAACCTTTT (antisens)

Tspan17 : CTGCTGCGGGAAATACTTCCT (sens) et GATGTTTCGAGAGAACGCCCTT (antisens)

Tspan33 : CTACGCTCGGCTAATGAAGCA (sens) et TGAGCAGGAACATGAGGACAC (antisens)

ADAM10: AACACCAGCGTGCCAAAAG (sens) et CCCTCTTCATTCGTAGGTTGAAA (antisens)

## Transfection d'ARN interférents

Les cellules détachées par l'action de la trypsine (cf. précédemment) sont lavées et reprises dans du milieu RPMI 1640 (PAA) à la concentration de  $12,5 \cdot 10^6$  cellules/ml. Elles sont ensuite électroporées (Gene Pulser - Biorad) dans des cuves de 0.4 cm de côté à raison de  $10^7$  cellules dans 800 $\mu$ L après ajout de 10  $\mu$ l de Si RNA (20 nM final). Les caractéristiques électriques lors de l'électroporation sont une tension de 300V et une capacitance de 500 $\mu$ F. Les cellules sont ensuite re-suspendues délicatement à la pipette puis mises en culture pour 48h ou 72h (dans le cas de Si ADAM10) en milieu DMEM complet.

Alternativement, lorsque l'expérience nécessite de s'affranchir de l'étape d'adhérence des cellules, celles-ci peuvent être étalées dans le récipient adéquat et transfectées in situ, une fois adhérentes, en présence d'INTERFERin (PolyPlus) et de SiRNA (20 nM final) selon le protocole décrit par le fabricant. Comme précédemment, les cellules sont incubées en milieu DMEM complet pendant au moins 48 heures avant analyse de l'effet de l'interférence ARN.

## Séquences des différents SiRNA utilisés

- ADAM10 : UACACCAGUCAUCUGGUUUUCCU (Invitrogen)  
GGAUUAUCUUACAAUGUGG (Eurogentech)
- Tspan5 : CCUGAAGUCAGUUGUUGCAUCAAU (Invitrogen)  
ACAUCAGAGCAUAUCGGGAUGACAU (Invitrogen)  
UCAGUGUGGCUAUGAUGCCAGGCAA (Invitrogen)
- Tspan14 : CGCCAUCUCGCGUUGCAGAUUUU (Invitrogen)
- Tspan15 : ACAACCUGUACCUUCUCCAAGCAUU (Invitrogen)
- CD81 GCACCAAGUGCAUCAAGUA (Eurogentech)
- EphA2: SiGenome SMARTpool (Dharmacon)
- Ctrl Stealth RNAi Negative Control Med GC (Invitrogen)

## Immunofluorescence indirecte

### Cytométrie en flux

Les cellules préalablement incubées dans diverses conditions expérimentales (voir résultats) sont lavées et détachées par incubation en présence de trypsine ou d'acutase (PAA) et 100 000 à 200 000 cellules par puits d'une plaque 96 puits sont incubées dans 50 µl de milieu complet en présence d'une concentration saturante d'anticorps primaire (10 µg/ml ou ascite au 1/200<sup>ème</sup>) pendant 45 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite centrifugées quelques secondes à 400g et lavées 3 fois par centrifugation/resuspension en milieu complet. Un anticorps anti-immunoglobuline secondaire couplé à l'allophycocyanine ou à la phycoérythrine est alors ajouté à une concentration finale de 10 µg/ml pendant 45 minutes à froid. Les cellules sont de nouveau lavées par 3 fois en milieu complet. La

fluorescence est analysée immédiatement par cytométrie en flux (FacsScan/FacsCalibur, Becton-Dickinson ; C6 Flow Cytometer, BD-Accuri).

### **Immunofluorescence indirecte sur lame**

Des lamelles de verre sont dégraissées à l'alcool puis déposées au fond de plaques à 6 puits. Les cellules sont mises en culture en milieu DMEM complet dans les puits contenant ces lamelles de verre à une concentration d'environ 200 000 cellules par puits. Après adhérence et croissance des cellules pendant 24h, celles-ci sont lavées en PBS puis fixées par incubation dans une solution de PBS-4% formaldéhyde à 4°C pendant 30 minutes. Les cellules sont perméabilisées ou non par incubation avec une solution de PBS-0.1% Triton X-100 (Roche Applied Science) à 4°C pendant 2 minutes. Afin d'éliminer le marquage non spécifique, les cellules sont incubées dans une solution de milieu complet contenant 10% de sérum de chèvre pendant 30 minutes à température ambiante. Après lavage, une analyse par immunofluorescence indirecte est alors effectuée avec les mêmes temps d'incubation à température ambiante cette fois, sur ces cellules fixées de la même façon que pour la cytométrie en flux en remplaçant les anticorps secondaires utilisés pour la cytométrie par des anticorps secondaires couplés aux sondes Alexa488 ou Alexa568. Les cellules sont montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage Moviol-488 (Sigma-Aldrich) et observées grâce à un microscope à épifluorescence DMR ou au microscope confocal SP5 (Leica) en utilisant un objectif à immersion en huile 63X et les images numérisées grâce au logiciel MetaMorph (Molecular Devices)

### **Mesure de la sécrétion de l'E-cadhérine dans les cellules PC3**

La veille de l'expérience, les cellules PC3 cultivées dans des plaques à 12 puits ensemencées à raison de 3 à 400 000 cellules par puits, sont privées de sérum par lavage et incubée en présence de DMEM dépourvu de sérum pendant au moins 16 heures. L'expérience de sécrétion proprement dite est réalisée en milieu DMEM sans sérum. Les

cellules, après pré-incubation ou non dans diverses conditions, sont généralement stimulées pendant deux ou trois heures par 250 µL de milieu comme mentionné dans les résultats. Suite à cette incubation, les milieux de culture (milieux conditionnés) sont récupérés et centrifugés à 4°C à 1000g pendant 5 min pour éliminer les éventuelles cellules en suspension. Les cellules adhérentes sont lysées à 4°C pour une durée de 20 min par 250 µl de tampon de lyse (NaPO<sub>4</sub> 50 mM PH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, 1% Triton X-100). Les lysats cellulaires sont centrifugés à 4°C à 15 000g pendant 15 min et le culot obtenu contenant les protéines insolubles, éliminé.

Une fraction aliquote de 200 µL des différents milieux conditionnés et des lysats cellulaires est prélevée et solubilisée dans du tampon d'électrophorèse pour l'analyse des produits de sécrétion par Western blot.

## **Analyse des protéines par Immunoprécipitation, SDS-PAGE et Western Blot**

### **Biotinylation des protéines de surface et lyse des cellules**

Dans certaines expériences, une biotinylation préalable des protéines de surface par un réactif non perméant tel que l'EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) à été réalisé sur les cellules adhérentes. Brièvement, toutes les incubations suivantes sont généralement réalisées en plaque 6 puits, sur des cellules pré-confluentes (80-90 % de confluence) et à 4°C pour limiter au maximum un marquage de protéines intracellulaires. Les cellules sont préalablement lavées 3 fois avec 1 ml de tampon de Hank's (Hank's buffered saline, PAA) puis incubées 20 minutes dans 0,5 ml de tampon HEPES (10 mM, pH 7.3) contenant 150 mM NaCl, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM MgCl et 0.5 mg/ml du réactif EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin.

Après cette incubation, l'incorporation de réactif est stoppée par lavage des cellules avec du tampon TBS (Tris Buffer Saline) froid et les cellules lysées dans du tampon de lyse (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.5 µg/ml de leupeptine, 1 µg/ml de pepstatineA et 10 KIU (Kallikreine Inactivating Unit)/ml d'aprotinine)

contenant 1% de détergent à raison de 2 ml de tampon pour 5-10 millions de cellules. Suivant les expériences, les détergents utilisés sont le Triton X-100, la digitonine ou le Brij97 (Calbiochem). Après 30 minutes d'incubation à 4°C sous agitation, le matériel insoluble est éliminé par une centrifugation à 15 000g pendant 15 minutes toujours à 4°C. Le surnageant qui contient les protéines solubles mais aussi les protéines membranaires solubilisées est recueilli et analysé soit directement après séparation par électrophorèse et Western-blot soit après immunoprécipitation.

## Immunoprécipitation

Le matériel contenu dans les lysats cellulaires et pouvant être immunoprécipité en se fixant de manière non spécifique est éliminé par addition de sérum de chèvre (1 µl/ml) et 10 µl de billes de Sépharose couplées à de la protéine G (Amersham Pharmacia Biotechnologie) pour 1 ml de lysat pendant 2 heures sous agitation à 4°C.

Après une centrifugation et élimination du culot de protéines G-Sépharose, les protéines du surnageant « prépurifié » sont immunoprécipitées à froid à l'aide de 10 µg/ml d'anticorps (ou d'ascite au 1/200<sup>ème</sup>) et 30 µL de billes de Sépharose couplées à de la protéine G pour 1 ml de lysat pendant une nuit sous agitation. Les billes sont ensuite lavées 5 fois par centrifugations et resuspensions du culot de protéines G-Sépharose dans 1 mL de tampon de lyse contenant 1% du détergent utilisé lors de la phase de lyse. Le culot est finalement repris dans 40 µl de tampon d'échantillon Laemmli 2X (150 mM Tris-HCl pH 6.8, SDS 6%, EDTA 3mM, bleu de bromophénol 0.003%, glycérol 30%).

## SDS-PAGE et Western Blot

Les protéines immunoprécipitées et les protéines issues des différents milieux conditionnés et des lysats cellulaires (cf. expériences de sécrétion) sont séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (Euromedex) linéaire (8%) ou en gradient (5-15%) et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose (Hybond, Amersham Biosciences)



ou une membrane de type PVDF (Hybond, Amersham Biosciences) en présence de tampon contenant 25 mM de Tris, 192 mM de glycine, 0,005% SDS et 20% d'éthanol pendant 18-20 heures sous une tension constante de 12V (3V/cm) ou 2 heures à 100V (12V/cm). La membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante, dans une solution de blocage TBS-Tween 0.1%(v/v)-BSA 1%(w/v) ou la solution de blocage Odyssey (LI-COR Biosciences), de composition inconnue, afin de saturer les sites de liaisons non spécifiques.

Les protéines d'intérêt sont révélées par incubation avec un anticorps primaire dirigé contre une protéine ou une étiquette particulières en tampon TBS contenant du Tween-20 0,1% pendant 2 heures à température ambiante ou 18 heures à 4°C. Après trois lavages en tampon TBS-Tween, l'immunoréactivité est révélée par incubation des membranes pendant 1 heure à température ambiante dans du tampon TBS-Tween en présence d'anticorps anti-immunoglobuline (dilués au 1/10000) couplé à une sonde fluorescente AlexaFluor680 ou 800. L'immunoréactivité des différentes protéines ainsi analysées est révélée et quantifiée grâce à un détecteur de fluorescence infrarouge ODYSSEY (LI-COR Biosciences) et au logiciel ODYSSEY Infrared Imaging System Application software v1.2 (LI-COR Biosciences).

Dans le cas d'une révélation des protéines de surfaces biotinylées, la solution de blocage est impérativement remplacée par du tampon Odyssey et les protéines biotinylées révélées par une étape unique d'incubation de 2 heures à température ambiante dans une solution de tampon TBS-Tween 0.1% contenant 1/50000 de streptavidine couplée à une sonde fluorescente AlexaFluor800.

## **Analyse de l'activité Notch dans des lignées cancéreuses**

Des cellules U2OS exprimant de manière stable le récepteur Notch1 (U2OS-N1) ou HeLa sont détachées par la trypsine, comptées et étalées à raison de 25000 cellules par cm<sup>2</sup>. Lorsque cela est nécessaire, ces cellules subissent concomitamment à leur étalement une étape d'interférence ARN selon le protocole INTERFERin décrit plus haut. 24 heures après interférence ARN, les cellules adhérentes sont transfectées avec des vecteurs codant le gène rapporteur firefly-luciférase sous le contrôle du promoteur CSL (activé en aval de Notch

après fixation de ligand) et le gène rapporteur TK-Renilla à activité luciférase constitutive (qui nous sert en tant que contrôle de transfection puisque son expression n'est pas sous le contrôle du promoteur CSL inductible mais sous le contrôle du promoteur de la thymidine kinase) en utilisant le FuGENE6 (Promega). Lorsque des cellules HeLa sont utilisées, ces gènes rapporteurs peuvent être co-transfectés avec des plasmides codant les protéines de fusion GFP-Tspan5, GFP-Tspan14 ou GFP-Tspan15.

24 heures après transfection, des cellules OP9 ou OP9 exprimant le ligand de Notch, Delta1 (OP9-DLL1) sont mises en co-cultures avec les cellules ayant subi l'interférence/transfection à raison de 35 000 cellules par  $\text{cm}^2$ . Dans le cas des cellules U2OS-N1, les deux gènes rapporteurs peuvent être transfectés avec différentes constructions codant des formes tronquées de Notch1 ( $\Delta E$  et NICD) dont l'activité promotrice est indépendante de l'activation en trans de Notch par un de ses ligands.

Les activités respectives des luciférases firefly et Renilla sont déterminées à l'aide du kit Dual luciferase reporter assay (Promega) selon les instructions du fabricant en utilisant un luminomètre (Berthold). Une analyse statistique est effectuée sur les résultats bruts en utilisant un test one-way ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey. Pour plus de précisions, le protocole initial est présenté dans (Moretti et al., 2010).

## **Suivi et mesure de la prolifération cellulaire des cellules PC3 WT ou PC3 GFP-Tspan5**

### **Prolifération non-clonale**

Les cellules sont décollées par un traitement par la trypsine, comptées puisensemencées en milieu DMEM complet en plaques de culture à 6 ou 12 puits à une concentration de 300 000 et 150 000 cellules par puits respectivement. Elles sont laissées à adhérer pendant 24 heures puis subissent ou non un traitement comme indiqué dans la partie « Résultats » et des comptages sont effectués après 24, 48 et 72 heures de traitements après mise en suspension par la trypsine. Ces comptages sont effectués en

cellule de Mallassez (ce qui permet également un comptage des cellules positives en marquage Bleu-Trypan), ou grâce au compteur de cellules Scepter (Millipore). La variabilité de comptage manuel entre individus a été testée en double aveugle et ne montre aucune différence de comptage significative. De même, la variabilité entre comptages manuels et automatisés a été testée avec des résultats similaires. Chaque condition est réalisée en triplicates.

## **Prolifération clonale sur plastique**

Lors de l'expérience de prolifération clonale, les cellules sont mises à adhérer en milieu DMEM complet à raison de 2000 cellules par puits de P6 puis incubées pendant 5 jours, le milieu étant remplacé chaque jour par du milieu complet neuf. Les cellules sont enfin lavées en PBS et colorées avec une solution de 2% éthanol contenant 5mg/mL de Cristal-Violet à 37°C pendant 10 minutes. Après trois lavages successifs en eau distillée, des photos sont prises à l'aide d'un appareil photo numérique  $\mu$ 850 SW (Olympus).

## **Prolifération 3D « indépendante de l'ancrage » en gel d'Agar**

Toutes les préparations suivantes doivent être réalisées en conditions stériles. Une solution d'agar à 6% dans l'eau est préparée par solubilisation de l'agar (Lonza) par chauffage au four micro-ondes et maintenue à 56°C au bain-marie. Une solution d'agar 0.6% est préparée par dilution au  $1/10^{\text{ème}}$  de la solution initiale à 6% en milieu DMEM complet préchauffé à 37°C. 2mL de cette solution sont déposés comme « base » dans chaque puits d'une boîte 6 puits. L'agar est laissé à gélifier à température ambiante. Les cellules mises en suspension par la trypsine et reprises dans du milieu DMEM complet à 37°C à raison de 20 000 cellules par ml sont ensuite diluées au  $\frac{1}{2}$  avec la solution d'agar 0.6% préparée ci-dessus. 1 ml de cette solution (soit 10 000 cellules) additionné ou non de Cetuximab 25  $\mu$ g/ml ou AG1478 5  $\mu$ M est ensuite déposé sur la base d'agar gélifié au fond des puits. Les cellules sont alors incubées pendant 5 jours dans cette matrice à 3 dimensions puis marquées avec une solution de 2% éthanol contenant 5 mg/ml de Cristal-Violet à 37°C pendant 10 minutes.

Après trois lavages successifs en eau distillée, les cellules sont observées et photographiées sous loupe binoculaire (grossissement x10) avec le logiciel d'acquisition LAS (Leica).

## **In vivo/ Xénogreffes**

Les cellules préalablement mises en suspension par la trypsine sont comptées puis centrifugées et resuspendues à raison de 20 millions de cellules dans 1 ml de PBS. 100 µl de cette suspension cellulaire sont injectés en une fois en sous-cutané dans la région dorso-latérale dans deux lots de souris SCID recevant chacun soit des cellules PC3 WT (8 souris), soit des cellules PC3 GFP-Tspan5 (7 souris). La présence ou non de tumeurs se développant est contrôlée de manière visuelle tous les 3 jours et leurs dimensions (largeur (l) et longueur (L) maximales) mesurées au pied à coulisse pendant une durée totale de 35 jours. Le volume approximatif de chaque tumeur est estimé par  $(l^2 + L^2)/2$  et exprimé en mm<sup>3</sup>. Après un maximum de 35 jours après injection des cellules, les souris sont sacrifiées et les éventuelles tumeurs disséquées.

## **Stimulation par l'éphrineA1 et « Cell rounding » dans les lignées PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5**

Les cellules sont mises en suspension, comptées etensemencées en plaques de culture à 6 puits à une concentration de 150 000 cellules par puits. Elles sont laissées à adhérer en milieu complet pendant au moins 15 heures. Le milieu est changé par un milieu DMEM supplémenté de 1% BSA et les cellules sont laissées ainsi pendant 20 heures supplémentaires. Après un nouveau lavage en présence de DMEM-BSA 1%, les cellules sont incubées à 37°C pendant 15 minutes dans 0.5 ml de DMEM-BSA 1% dans lequel sont ajoutés de l'éphrineA1-Fc ou de l'IgG1-Fc humaine recombinante à la concentration finale de 0.5 µg/ml (R&D). Après cette incubation, chaque puits est lavé en présence de PBS puis observés directement dans du PBS. L'observation est réalisée à l'aide d'une loupe binoculaire (Nikon) et des photos sont prises grâce à une caméra (Infinity 4 - Lumenera) ainsi qu'au logiciel d'acquisition (Infinity Camera Software - Lumenera).

## Résultats et discussion

D'après les données de la littérature, la métalloprotéase ADAM10 est impliquée dans le clivage juxtamembranaire d'un nombre grandissant de protéines membranaires (**cf. Tableau 2**). Parmi celles-ci figurent le pro-TNF $\alpha$  (Arduise et al., 2008), le précurseur de l'EGF (Horiuchi et al., 2007; Sahin et al., 2004) et l'E-cadhérine (Maretzky et al., 2005). Nous avons pu montrer récemment dans le laboratoire que l'engagement de différentes tétraspanines par des anticorps monoclonaux conduit à une augmentation de la sécrétion de TNF $\alpha$  (une cytokine) par différents types de cellules lymphoïdes (Arduise et al., 2008). Cette sécrétion accrue de TNF $\alpha$  est la conséquence de l'augmentation du clivage juxtamembranaire de son précurseur par la métalloprotéase ADAM10. Cet effet des anticorps anti-tétraspanines a par ailleurs été confirmé vis-à-vis du précurseur de l'EGF (un facteur de croissance) dans les cellules HEK (des cellules embryonnaires de rein). Dans le but de généraliser ce processus de régulation et surtout d'en identifier les mécanismes, dans un autre modèle de cellules adhérentes d'origine totalement différente, nous avons décidé d'étudier la régulation du clivage juxtamembranaire d'une protéine d'adhérence endogène telle que l'E-cadhérine. Le travail qui suit a donc été réalisé dans les cellules PC3, cellules adhérentes issues d'une métastase osseuse d'un adénocarcinome prostatique.

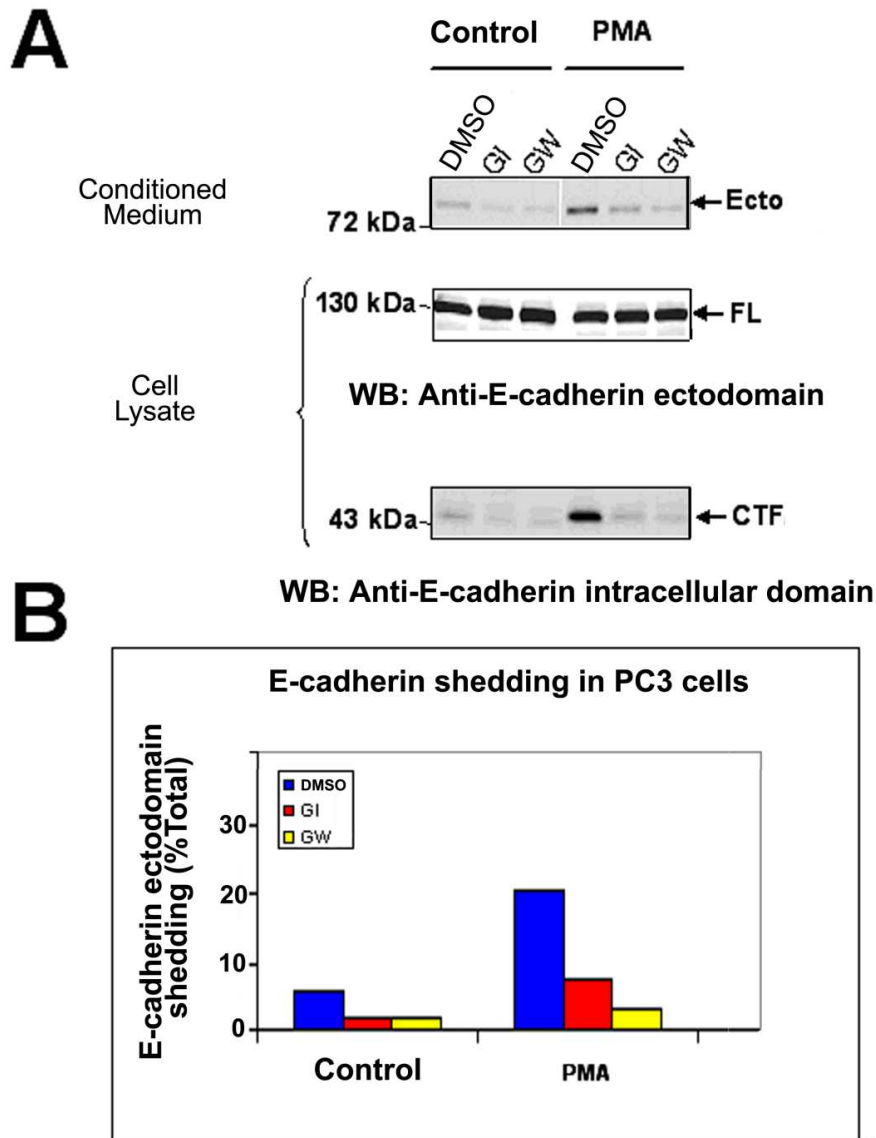
### Etude du clivage de l'E-cadhérine par les métalloprotéases dans les cellules PC3

#### Stimulation de la sécrétion de l'E-cadhérine par le PMA dans des cellules PC3 et inhibition par les inhibiteurs de métalloprotéases

Dans le but d'obtenir des preuves expérimentales en faveur de l'implication de métalloprotéase(s) dans le clivage de l'ectodomaine de l'E-cadhérine, nous avons dans un premier temps eu recours à des inhibiteurs sélectifs permettant la discrimination entre les activités dues à ADAM 10 et ADAM 17 (GW280264X et GI254023X, Dons d'Andreas Ludwig). L'effet de ces inhibiteurs a été testé sur un agent bien connu pour sa capacité à stimuler le

clivage juxtamembranaire et donc la sécrétion de l'ectodomaine d'un grand nombre de protéines membranaires, le PMA (un ester de phorbol). La capacité du PMA à induire le clivage de l'ectodomaine du pro-TNF $\alpha$  dans diverses cellules d'origine lymphoïde et du pro-EGF dans les cellules HEK a préalablement été montrée dans notre laboratoire (Arduise et al., 2008). Le PMA est aussi capable d'induire une forte stimulation du clivage de l'E-cadhérine dans les cellules PC3 (**Figure 14A**). Elle se traduit par une accumulation de l'ectodomaine (80 kDa) dans le milieu d'incubation due à un clivage juxtamembranaire de l'E-cadhérine (125 kDa). La stimulation se manifeste aussi par une accumulation de la contrepartie cellulaire de l'ectodomaine, le fragment carboxyl-terminal (CTF), dans les lysats cellulaires. Celui-ci, de taille 45-50 kDa, n'est observé qu'avec l'anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire (**Figure 14A, bas**) et non avec l'anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire (non montré).

L'identité de la protéase impliquée dans le clivage de l'E-cadhérine peut être appréhendée par l'utilisation des inhibiteurs « sélectifs » que sont GI254023X (GI) et GW280264X (GW). Ces inhibiteurs de métalloprotéases ont été décrits comme capable de discriminer, en particulier, entre les ADAM10 et ADAM17 (Hundhausen et al., 2003). Comme on peut le voir sur la **figure 14A**, les deux inhibiteurs GI et GW utilisés à la même concentration de 2,5  $\mu$ M sont capables d'inhiber non seulement la stimulation du clivage induite par le PMA mais aussi le clivage constitutif. Cet effet inhibiteur est observé à la fois sur la production de l'ectodomaine mais aussi sur l'accumulation du fragment C-terminal (CTF). Ceci indique que c'est bien l'étape de clivage juxtamembranaire qui est inhibée et que la protéase impliquée est de type métalloprotéase. L'inhibiteur GI inhibe cent fois plus efficacement ADAM10 qu'ADAM17, tandis que GW n'est pas sélectif entre ces deux ADAMs (Hundhausen et al., 2003). La quantification (**Figure 14B**) montre que si ces deux inhibiteurs inhibent presque totalement le clivage constitutif, ils ne conduisent qu'à une diminution et non une abolition de la stimulation par le PMA. Ce résultat suggère qu'ADAM10 est impliquée dans les clivages constitutif (condition contrôle) et régulé de l'E-cadhérine dans les cellules PC3 mais qu'elle n'est peut être pas l'unique protéase à jouer un rôle dans ce phénomène. Ainsi, le clivage de l'E-cadhérine par une serine protéase telle que la kallikreïne 6 (Klucky et al., 2007) et une métalloprotéase telle que la meprin  $\beta$  (Huguenin et al., 2008) a récemment été rapporté.



**Figure 14 : Stimulation de la sécrétion de l'E-cadhérine par le PMA dans les cellules PC3 et inhibition par des inhibiteurs « sélectifs » des métalloprotéases.**

**A :** Après déplétion en sérum, les cellules PC3 sont pré-incubées 30 minutes en présence de DMSO ou d'une concentration de 2,5  $\mu$ M des inhibiteurs GI254023 (GI) ou GW280264 (GW) puis stimulées ou non (Control) en présence de PMA 1  $\mu$ M pendant 2 heures. Le clivage de l'E-cadhérine est analysé par Western-blot pour quantification de l'ectodomaine libéré dans le milieu d'incubation (Conditioned medium) et de l'E-cadhérine complète (FL) dans les lysats cellulaires (Cell lysate).

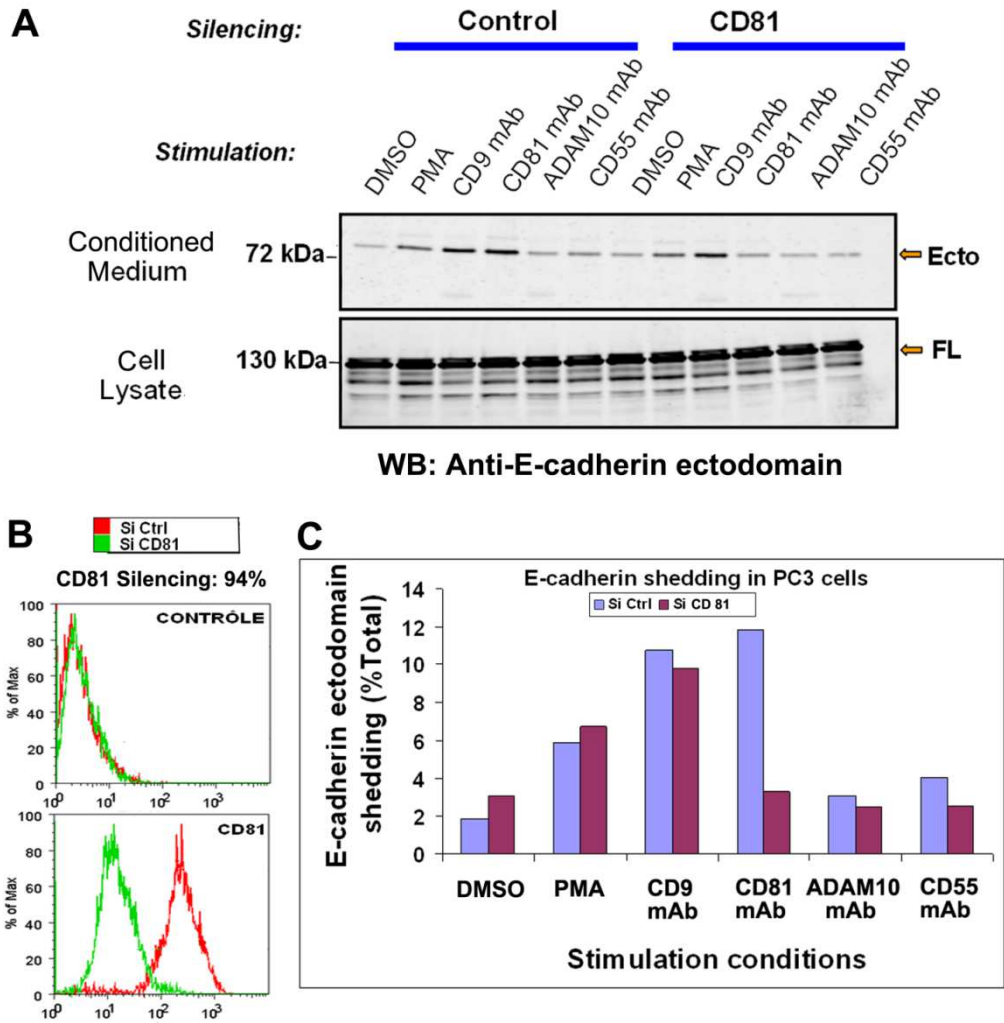
**B :** Quantification de la sécrétion de l'E-cadhérine. Les résultats sont exprimés en pourcentage de sécrétion (rapport entre la quantité d'ectodomaine sécrété (conditioned medium) et quantité d'E-cadhérine contenue dans les cellules avant incubation (ectodomaine sécrété + cadhérine (FL) dans les lysats cellulaires).

## Stimulation de la sécrétion de l'E-cadhérine par des anticorps anti-tétraspaines dans les cellules PC3, implication d'ADAM10

On observe sur la **figure 15A** qu'outre le PMA, les anticorps anti-CD81 (5A6) et anti-CD9 (TS9) stimulent le clivage de l'E-cadhérine et l'accumulation de son ectodomaine dans le milieu extracellulaire. Cette stimulation n'est pas observée avec n'importe quel anticorps monoclonal anti-tétraspaine puisqu'un autre anticorps anti-CD81, le TS81 et 2 anticorps anti-CD82 (TS82 et TS82b) sont sans effet (non montré). Sont aussi sans effet des anticorps dirigés contre la métalloprotéase ADAM10 (anticorps 11G2) ou une autre protéine de surface telle que CD55 (anticorps 12A12). Cet ensemble de résultats indique que l'effet des anticorps anti-tétraspaines présente une spécificité certaine. Celle-ci est confirmée par les expériences d'interférence ARN dirigée contre la tétraspaine CD81. Dans des conditions où l'expression de CD81 à la surface de la cellule PC3 est inhibée de plus de 90% (**Figure 15A**), la stimulation du clivage de l'E-cadhérine par l'anticorps anti-CD81 (5A6) est totalement inhibée (**Figure 15B**). Les réponses au PMA et à un anticorps anti-CD9 ne sont pas affectées. Ces résultats indiquent clairement que la réponse cellulaire à l'anticorps anti-CD81 nécessite la présence de son antigène.

D'une manière plus générale, si la présence de la tétraspaine cible de l'anticorps anti-tétraspaine n'est pas suffisante pour la réponse à l'anticorps (cf. l'absence de réponse à l'anticorps TS81), elle est absolument nécessaire. Ainsi en va-t-il de l'absence d'effet des anticorps anti-CD82 dans les cellules PC3 (non montrée) ou cette tétraspaine est absente ou présente en très faible quantité à la surface de ces cellules alors que sa présence dans les cellules Raji y permet l'activation du clivage du pro-TNF $\alpha$  par ces mêmes anticorps –cf. Figure 3A, (Arduise et al., 2008)-. De même, les cellules Raji qui n'expriment pas la tétraspaine CD9 ne répondent aux anticorps anti-CD9 qu'après expression stable de cette protéine -cf. Figure 3B, (Arduise et al., 2008)-.





**Figure 15 : Stimulation de la sécrétion de l'E-cadhérine par des anticorps anti-tétraspanines dans des cellules PC3. Effet de l'interférence ARN de la tétraspanine CD81.**

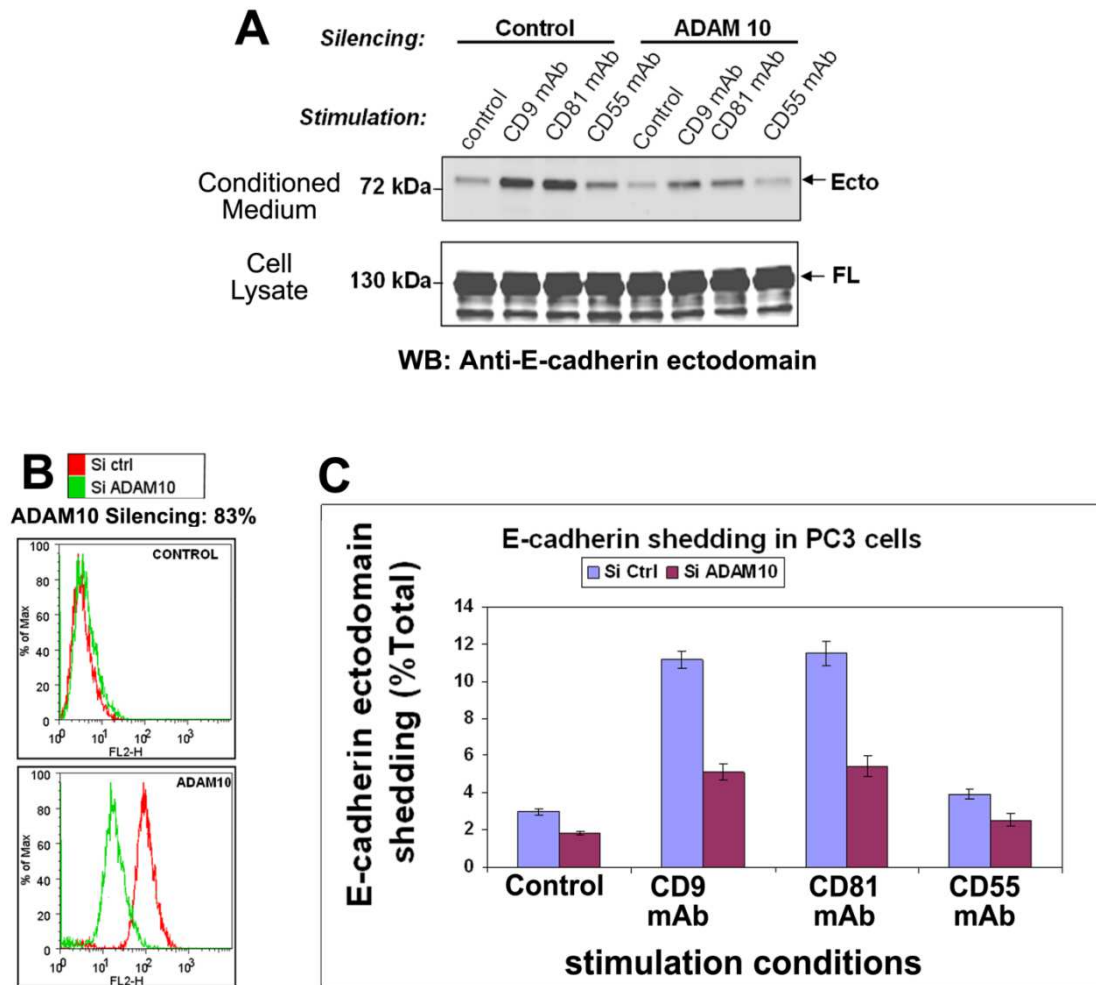
**A :** Après incubation en milieu sans sérum, les cellules ayant préalablement subi une interférence ARN contrôle ou dirigée contre CD81 sont incubées en présence de PMA 1  $\mu$ M ou de 10  $\mu$ g/ml d'anticorps dirigés contre les tétraspanines CD9 ou CD81, ou d'autres antigènes de surface tels que CD55 ou la métalloprotéase ADAM10 pendant 2 heures. Le clivage de l'E-cadhérine est analysé par Western-blot pour quantification de l'ectodomaine libéré dans le milieu d'incubation (Conditioned medium) et de l'E-cadhérine complète (FL) dans les lysats cellulaires (Cell lysate).

**B :** Analyse par cytométrie en flux (FACS) de l'effet de l'interférence ARN contre CD81 dans les cellules PC3.

**C :** Quantification de la sécrétion de l'E-cadhérine. Les résultats sont exprimés en pourcentage de sécrétion (rapport entre la quantité d'ectodomaine sécrété (conditioned medium) et quantité d'E-cadhérine contenue dans les cellules avant incubation (ectodomaine sécrété + cadhérine (FL) dans les lysats cellulaires).

L'interférence ARN dirigée contre ADAM10 confirme l'implication de cette métalloprotéase dans l'activation du clivage de l'E-cadhérine par les anticorps anti-tétraspaines. Ainsi, une inhibition de plus de 80% de l'expression de cette ADAM à la surface des cellules PC3 (**Figure 16B**) inhibe fortement la réponse aux anticorps anti-CD9 et anti-CD81 (**Figure 16A et 16C**). De même, la sécrétion constitutive de l'E-cadhérine apparaît elle aussi dépendre de l'activité de cette métalloprotéase. L'inhibition partielle en présence de l'anticorps anti-CD55 n'est que le reflet de cette dépendance.

Nos résultats montrent donc clairement qu'il est possible d'induire le clivage de l'E-cadhérine par stimulation de la voie PKC par un ester de phorbol comme le PMA mais aussi lors de l'engagement de certaines tétraspaines par des anticorps monoclonaux. Dans les deux cas, un rôle pour la métalloprotéase ADAM10 peut être suspecté. On sait par ailleurs qu'ADAM10 est présente dans les complexes à tétraspaine sans que l'on sache le rôle joué par cette localisation privilégiée dans la régulation de sa fonction (André et al., 2006; Arduise et al., 2008). Pour cette raison, nous avons tenté d'identifier une voie d'activation « physiologique » du clivage de l'E-cadhérine par ADAM10 qui pouvait nous permettre d'y étudier la contribution des tétraspaines. Au début de ce travail, les données bibliographiques indiquaient que des récepteurs de type GPCR étaient de bons candidats potentiels. Un grand nombre de ces récepteurs sont en effet responsables de la transactivation du récepteur de l'EGF par activation de métalloprotéases de la famille des ADAM (Kasina et al., 2009; Ohtsu et al., 2006; Prenzel et al., 1999). Cette transactivation est la conséquence d'une stimulation du clivage juxtamembranaire de précurseurs de ligands de l'EGFR. Cette transactivation peut être induite par l'activation de récepteurs à la bombésine et le PMA dans la lignée PC3 (Prenzel et al., 1999). D'autre part, ADAM10 a été impliquée dans ce mécanisme après stimulation de ces mêmes récepteurs à la bombésine dans les cellules COS7 (Yan et al., 2002). Il a été proposé que l'activation de ces récepteurs y régule la formation d'un complexe entre la tétraspaine CD9, la protéase ADAM10 et son substrat, l'HB-EGF, favorisant ainsi le clivage juxtamembranaire de celui-ci, sa sécrétion dans le milieu extracellulaire et l'activation de l'EGFR (Yan et al., 2002).



**Figure 16 : Stimulation de la sécrétion de l'E-cadhérine par des anticorps anti-tétraspanines dans des cellules PC3. Effet de l'interférence ARN de la métalloprotéase ADAM10.**

**A :** Après incubation en milieu sans sérum, les cellules ayant préalablement subi une interférence ARN contrôle ou dirigée contre ADAM10 sont incubées en présence de 10 µg/ml d'anticorps dirigés contre les tétraspanines CD9, CD81 ou la protéine membranaire CD55 pendant 2 heures. Le clivage de l'E-cadhérine est analysé par Western-blot pour quantification de l'ectodomaine libéré dans le milieu d'incubation (Conditioned medium) et de l'E-cadhérine complète (FL) dans les lysats cellulaires (Cell lysate).

**B :** Analyse par cytométrie en flux (FACS) de l'effet de l'interférence ARN contre ADAM10 dans les cellules PC3.

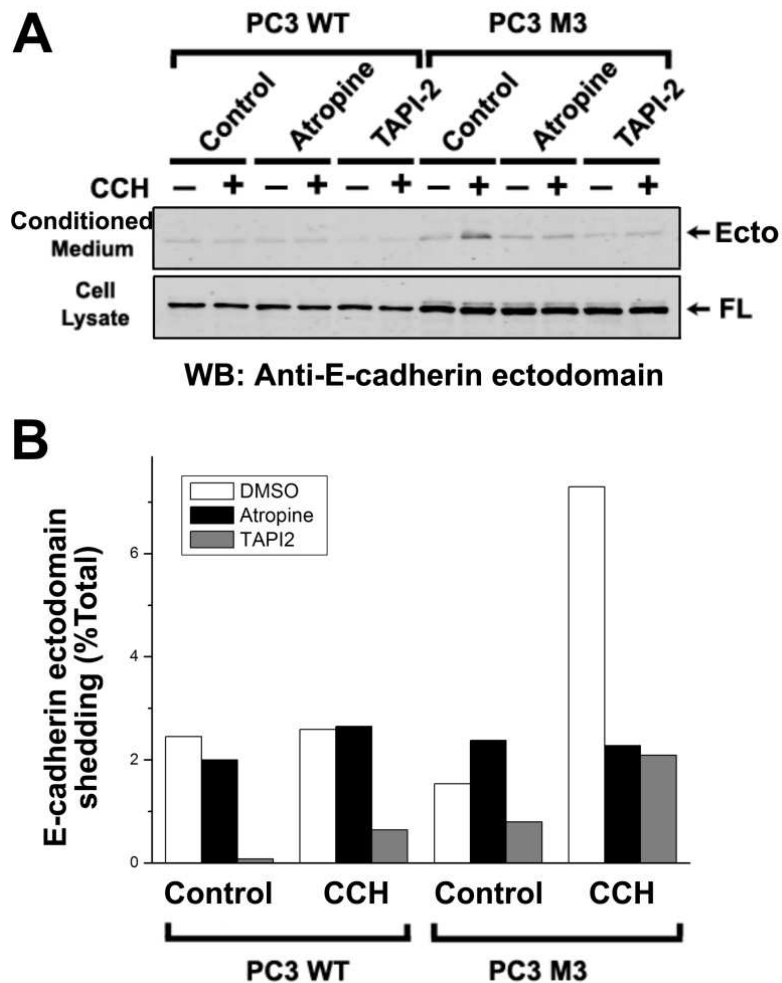
**C :** Quantification de la sécrétion de l'E-cadhérine. Les résultats sont exprimés en pourcentage de sécrétion (rapport entre la quantité d'ectodomaine sécrété (conditioned medium) et quantité d'E-cadhérine contenue dans les cellules avant incubation (ectodomaine sécrété + cadhérine (FL) dans les lysats cellulaires). Les résultats sont la moyenne +/- SEM de trois déterminations.

## Mise en évidence de la régulation muscarinique de la sécrétion de l'E-cadhérine dans les cellules PC3-M3

Les fibres nerveuses cholinergiques présentent un réseau dense dans la prostate, y suggérant non seulement un rôle secréto-moteur pour l'acétylcholine mais aussi que les récepteurs muscariniques pourraient être impliqués dans la régulation des croissances normale et maligne de la prostate (Ventura et al., 2002). La présence de récepteurs muscariniques dans des lignées issues de cancers ou de métastases issues de la prostate, telle la lignée de cellules PC3, a été précédemment rapportée (Ruggieri et al., 2012). Leur activation y conduit à une stimulation de la synthèse d'ADN et de la prolifération cellulaire.

Nous avons porté notre choix sur un récepteur GPCR tel que le récepteur muscarinique M3 à l'acétylcholine. En effet, ce récepteur est couplé positivement à la Phospholipase-C et à l'activation des PKCs (Mauduit et al, 1993). Son activation conduit au clivage juxtamembranaire de différentes protéines d'importance telles que le précurseur de la protéine amyloïde (APP) (Kim JH & Kim HJ. 2005) ou de la protéine prion cellulaire (PrPc) (Alfa Cissé et al., 2007). Ces récepteurs muscariniques sont aussi impliqués dans la transactivation du récepteur de l'EGF (Cheng et al., 2003; Gschwind et al., 2003; Prenzel et al., 1999) et seraient exprimés à la surface des cellules PC3 (Luthin et al., 1997).

Cependant, nos tentatives pour tenter d'identifier la présence de ce type de récepteur dans notre lignée se sont avérées infructueuses. Nous nous sommes donc tournés vers l'utilisation d'une lignée de cellules PC3 exprimant de manière stable le récepteur muscarinique M3, la lignée PC3-M3. Comme on peut l'observer sur la **figure 17**, cette lignée cellulaire répond positivement à un ligand cholinergique tel que la carbamylcholine (CCH) par une libération accrue de l'ectodomaine de l'E-cadhérine dans le milieu extracellulaire (**Figure 17A**). Cette réponse est bien médiée par le récepteur muscarinique car elle est absente dans la lignée PC3-WT et est totalement inhibée par un antagoniste spécifique, l'atropine, dans la lignée PC3-M3. Comme l'activité constitutive des cellules PC3 WT et PC3-M3, la stimulation du clivage de l'E-cadhérine est bien médiée par une activité de type métalloprotéase car elle est inhibée par un inhibiteur spécifique mais non-sélectif des métalloprotéases tel que le TAPI-2 (**Figure 17B**).

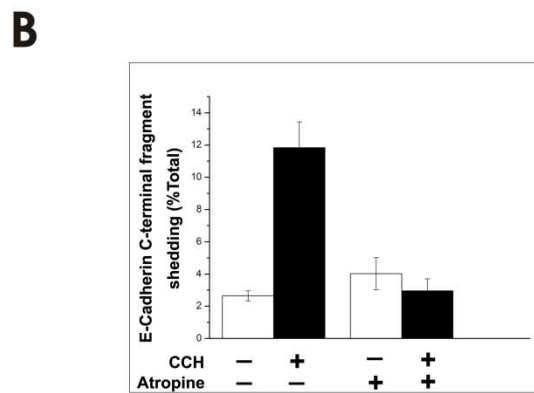
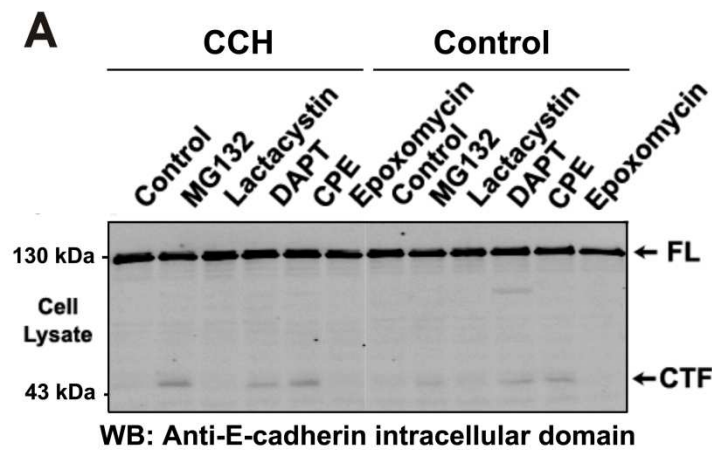


**Figure 17 : Mise en évidence de la régulation muscarinique de la sécrétion de l'E-cadhérine dans les cellules PC3-M3.**

**A :** Après incubation en milieu sans sérum, les cellules PC3 « sauvages » (PC3-WT) ou exprimant le récepteur muscarinique M3 à l'acétylcholine (PC3-M3) sont pré-incubées ou non pendant 15 minutes en présence de 10  $\mu$ M d'Atropine ou 5  $\mu$ M de TAPI-2 puis incubées ou pendant deux heures en absence ou en présence de 100  $\mu$ M de Carbamylcholine (CCH). Le clivage de l'E-cadhérine est analysé par Western-blot pour quantification de l'ectodomaine libéré dans le milieu d'incubation (Conditioned medium) et de l'E-cadhérine complète (FL) dans les lysats cellulaires (Cell lysate).

**B :** Quantification de la sécrétion de l'E-cadhérine. Les résultats sont exprimés en pourcentage de sécrétion (rapport entre la quantité d'ectodomaine sécrété (conditioned medium) et quantité d'E-cadhérine contenue dans les cellules avant incubation (ectodomaine sécrété + cadhérine (FL) dans les lysats cellulaires).

Lors de la stimulation du clivage de l'E-cadhérine par le PMA, nous avons pu observer non seulement la sécrétion de son ectodomaine dans le milieu extracellulaire mais aussi la production de sa contrepartie membranaire dans la cellule (**cf. Figure 14**). Les premières expériences destinées à identifier ce fragment C-terminal (CTF) sous stimulation muscarinique ont été négatives. Par contre, nous avons pu montrer que l'incubation concomitante des cellules PC3-M3 avec des inhibiteurs d'activités  $\gamma$ -secrétase (DAPT et CpE) mais aussi du protéasome (MG132) permettait sa détection (**Figure 18A**). L'inhibition de cet effet par l'atropine confirme le rôle joué par le récepteur muscarinique dans l'effet de la carbamylcholine (**Figure 18B**).



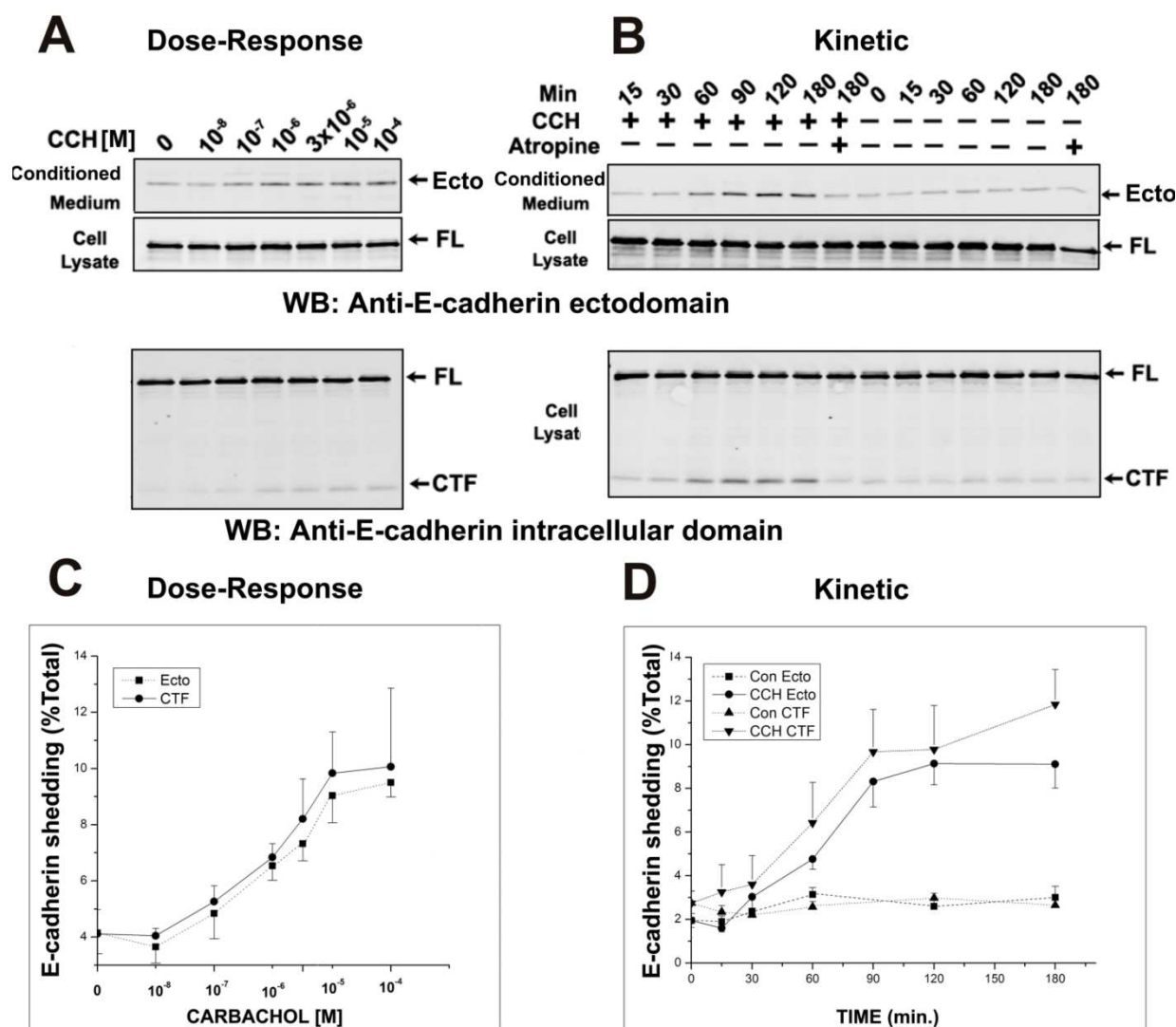
**Figure 18 : Effet de la stimulation muscarinique sur la production du domaine C-terminal de l'E-cadhérine dans les cellules PC3 M3. Inhibition de l'activité  $\gamma$ -sécrétase.**

**A :** Après incubation en milieu sans sérum, les cellules PC3-M3 sont pré-incubées ou non pendant 15 minutes en présence d'inhibiteurs du protéasome (20  $\mu$ M MG132, 1  $\mu$ M Lactacystin ou 1  $\mu$ M Epoxomycin) ou de  $\gamma$ -sécrétase (5  $\mu$ M DAPT, 1  $\mu$ M CpE) puis incubées ou pendant deux heures en absence (Control) ou en présence de 100  $\mu$ M de Carbamylcholine (CCH). Le clivage de l'E-cadhérine est analysé par Western-blot pour quantification du fragment C-terminal dans le lysat cellulaire en présence d'un anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire de l'E-cadhérine.

**B :** Les cellules PC3-M3 préalablement incubées (+) ou non (-) pendant 15 minutes en présence d'Atropine 10 uM ont ensuite été stimulées (+) ou non (-) pendant 2 heures en présences de 10 uM de Carbamylcholine (CCH). Après analyse par Western-blot comme décrit en A, le domaine intracellulaire de l'E-cadhérine (CTF) produit a été quantifié et les résultats sont exprimés en pourcentage (rapport entre la quantité de CTF produit et quantité d'E-cadhérine contenue dans les cellules avant incubation (CTF+Cadhérine (FL) dans les lysats cellulaires). Les résultats sont la moyenne +/- SEM de trois déterminations.

Les productions de l'ectodomaine (Ecto) et du fragment C-terminal (CTF) sont indiscernables aussi bien en terme de courbe dose-réponse à la carbamylcholine (**Figure 19A et 19C**) qu'en terme de cinétique de réponse (**Figure 19B et 19D**). Ces derniers résultats ainsi que l'inhibition par l'atropine (**Figure 18B**) indiquent clairement que la production d'ectodomaine et de CTF sont liés. La nécessité de la présence d'inhibiteurs de  $\gamma$ -secrétase pour observer le CTF sous stimulation cholinergique pourrait provenir du fait que cette stimulation est de moindre amplitude que la stimulation par le PMA (**cf. Figure 15**) et/ou que cette stimulation conduit aussi à une augmentation d'activité  $\gamma$ -secrétase. Dans ces conditions, le fragment intracellulaire soluble (ICD, pour IntraCellular Domain) produit par l'action de la secrétase sur le CTF serait rapidement dégradé et non détectable dans nos expériences et cela même en présence d'un inhibiteur du protéasome tel que le MG132. A ce sujet, il peut sembler étonnant que le MG132, au même titre que les inhibiteurs de  $\gamma$ -secrétase (DAPT et CpE), conduise à une accumulation du CTF tandis que d'autres inhibiteurs du protéasome tels que Lactacystine et Epoxomycine sont sans effet. L'activité inhibitrice du MG132 sur l'activité  $\gamma$ -secrétase précédemment documentée dans la littérature pourrait être l'explication la plus simple de ces résultats (Anders et al., 2006). L'hypothèse d'une activation de l'activité  $\gamma$ -secrétase lors de la stimulation cholinergique n'a pas été testée plus avant.



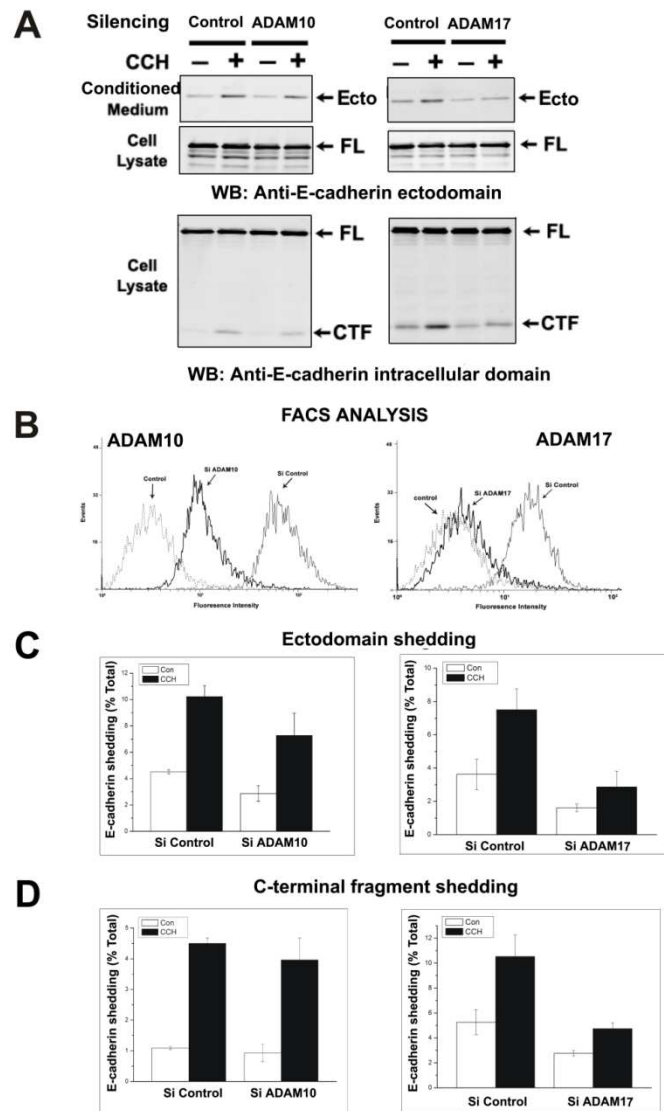


**Figure 19 : Dose-réponse et cinétique de la stimulation muscarinique du clivage de l'E-cadhérine dans les cellules PC3-M3.**

Après incubation en milieu sans sérum, les cellules PC3-M3 sont pré-incubées pendant 15 minutes en présence de 20  $\mu$ M MG132 puis incubées pendant deux heures en présence de concentrations croissantes de carbamylcholine (CARBACHOL) **(A)** ou en présence ou non de carbamylcholine 100  $\mu$ M (CCH) pendant un temps croissant **(B)**. Le clivage de l'E-cadhérine est analysé par Western-blot pour quantification de l'ectodomaine (Ecto) libéré dans le milieu d'incubation (Conditioned medium) et de l'E-cadhérine complète (FL) dans les lysats cellulaires (Cell lysate) ou par quantification du fragment C-terminal dans le lysat cellulaire (CTF). Les résultats sont exprimés comme décrit précédemment dans la légende des figures 3 et 4 et rapportés en **(C)** pour la courbe dose-réponse et **(D)** pour la cinétique. Les résultats sont la moyenne +/- SEM de trois déterminations.

## Interférence ARN des protéases ADAM10 et ADAM17 sur la stimulation muscarinique du clivage de l'E-cadhérine dans les cellules PC3-M3

Nous avons montré précédemment que la majeure partie sinon la totalité du clivage de l'ectodomaine de l'E-cadhérine pouvait être attribué à la métalloprotéase ADAM10 lors de l'engagement des tétraspanines CD9 et CD81 par des anticorps monoclonaux (**cf. Figure 16**). Des expériences similaires d'interférence ARN visant sélectivement les protéases ADAM10 et ADAM17 ont été réalisées sur les cellules PC3-M3 et conduisent à environ 85% d'inhibition de l'expression de ces 2 protéases à la surface des cellules (**Figure 20B**). L'étude de la stimulation cholinergique du clivage de l'E-cadhérine que ce soit par la mesure de la sécrétion de l'ectodomaine (**Figure 20A haut et 20C**) ou la production cellulaire de CTF (**Figure 20A bas et 20D**) après interférence ARN a donc été réalisée. Nos résultats indiquent que sous stimulation muscarinique, le clivage de l'E-cadhérine est beaucoup plus sensible à l'interférence ARN d'ADAM17 que d'ADAM10. Ce résultat est assez inattendu puisque jusqu'à présent, les données de la littérature impliquaient ADAM10 et non ADAM17 dans le clivage de l'E-cadhérine (Grabowska et al., 2011; Maretzky et al., 2005, 2008). Ceci nous a poussé à poursuivre l'étude de cette régulation bien que nous nous écartions de notre but initial qui était, je le rappelle, d'établir un modèle permettant de décrypter le rôle des tétraspanines dans la régulation d'ADAM10.



**Figure 20 : Stimulation de la sécrétion de l'E-cadhérine par la carbamylcholine dans des cellules PC3-M3. Effet de l'interférence ARN des métalloprotéases ADAM10 et ADAM17.**

**A :** Après incubation en milieu sans sérum, les cellules ayant préalablement subi une interférence ARN contrôle ou dirigée contre les métalloprotéases ADAM10 ou ADAM17 sont pré-incubées en présence de 20  $\mu$ M MG132 puis incubées en présence (+) ou non (-) de carbamylcholine 100  $\mu$ M (CCH) pendant 2 heures. Le clivage de l'E-cadhérine est analysé par Western-blot pour quantification de l'ectodomaine libéré dans le milieu d'incubation (Conditioned medium) et de l'E-cadhérine complète (FL) dans les lysats cellulaires (Cell lysate) ou par quantification du fragment C-terminal (CTF) dans le lysat cellulaire (Cell lysate).

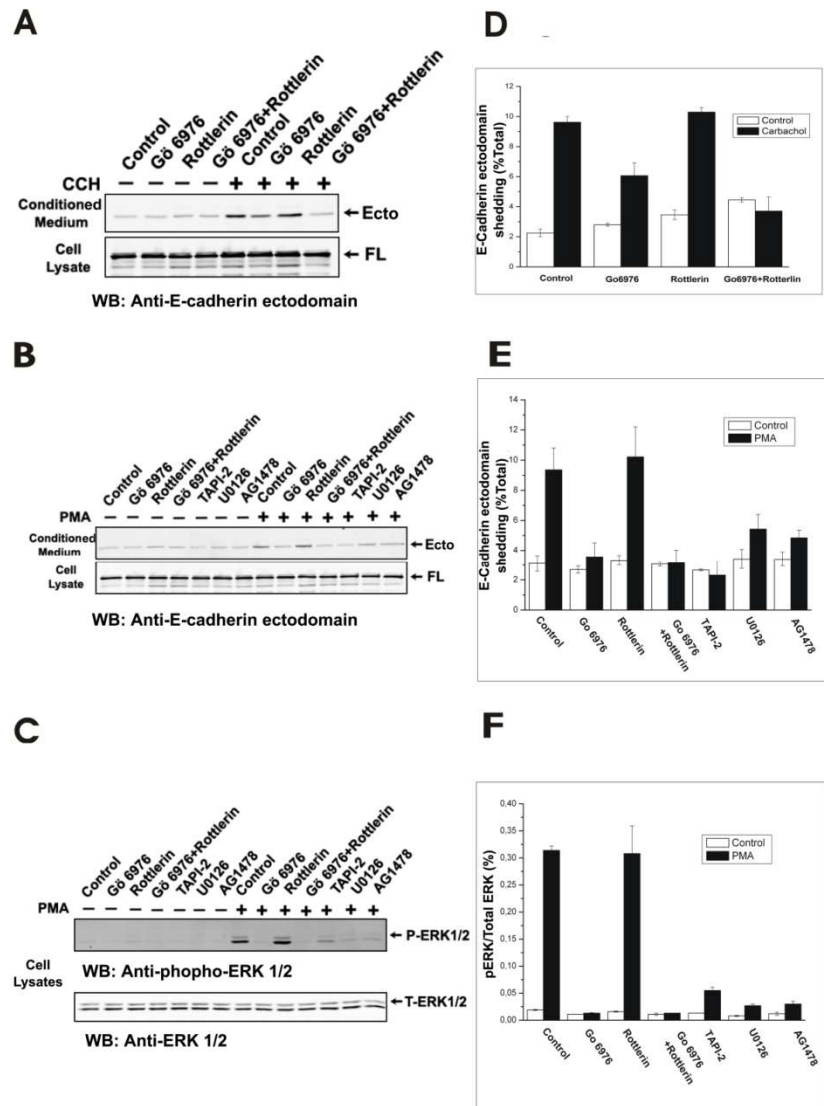
**B :** Analyse par cytométrie en flux (FACS) de l'effet de l'interférence ARN contre ADAM10 ou ADAM17 dans les cellules PC3-M3.

**C et D :** Les résultats sont exprimés comme décrit précédemment dans la légende des figures 3 et 4 et rapportés en **(C)** pour la sécrétion de l'ectodomaine dans le milieu extracellulaire et **(D)** pour la production du fragment C-terminal. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SEM de trois déterminations.

## Voie PKC et régulation de la sécrétion d'E-cadhérine

Le récepteur muscarinique M3 à l'acétylcholine est connu pour être couplé positivement à la voie de la phospholipase C (PLC) (Mauduit et al, 1993) et à l'activation de différentes voies de transduction du signal (Rozengurt, 2007). Parmi ces voies figure la voie PKC et nous avons montré précédemment qu'un activateur bien connu de cette voie, le PMA, stimule le clivage de l'E-cadhérine (cf. **Figures 14 et 15**). L'inhibition totale de l'effet du PMA par un inhibiteur de PKC comme le Gö6976 confirme bien l'implication de cette voie de transduction du signal (**Figure 21B et 21E**). D'autre part, cet inhibiteur est spécifique des PKC dépendantes du diacylglycérol (DAG) et du calcium que sont les PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , ce résultat suggère un rôle restreint à une ou plusieurs de celles-ci dans l'effet du PMA. Dans le cas de la stimulation cholinergique, l'effet inhibiteur du Gö6976 n'est que partiel (**Figure 21A et 21D**) et indique soit l'implication d'un autre type de PKC soit d'une autre voie de transduction. La présence de la PKC  $\delta$  et d'une signalisation l'impliquant a été décrite dans les lignées PC3 (Kharait et al., 2006). Cette PKC appartient au groupe des PKC activées par le DAG indépendamment du calcium, constituant avec les PKC  $\epsilon$ ,  $\eta$  et  $\theta$  le groupe dit des « nouvelles PKC ». Dans le but d'incriminer la contribution possible de cette PKC  $\delta$  dans la stimulation muscarinique du clivage, nous avons utilisé la rottlerin qui a été décrite et utilisée comme inhibiteur « sélectif » de cette PKC (Gschwendt et al. 1994) Les résultats obtenus montrent que la rottlerin n'a aucun effet seule ou sur les stimulations exercées par le PMA (**Figure 21B et 21E**) ou la carbamylcholine (**Figure 21A et 21D**). Par contre, son utilisation conjointe avec le Gö6976 (Gö6976+rottlerin) conduit à une inhibition complète de la stimulation muscarinique (**Figure 21A et 21D**) tout en étant sans effet inhibiteur supplémentaire, dans les mêmes conditions, sur la stimulation par le PMA (**Figure 21B et 21E**). Pris ensemble, nos résultats suggèrent que l'activation des récepteurs muscariniques conduit à une stimulation du clivage de l'E-cadhérine par activation de PKC appartenant à la fois à la famille des PKC « conventionnelles », PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ , et « nouvelles », PKC  $\delta$  et qu'une redondance existe permettant à la PKC  $\delta$  de prendre le relais dans la transduction du signal lors de l'inhibition complète des PKC « conventionnelles » par le Gö6976. La spécificité de l'effet inhibiteur de la rottlerin sur la PKC  $\delta$  a été mise en question. En particulier, il a été proposé que la rottlerin agisse comme découplant des mitochondries conduisant ainsi à une

diminution de la concentration d'ATP et indirectement à une inhibition de l'activité kinasique de PKC  $\delta$  (Soltoff, 2007). Si telle est l'explication de l'effet inhibiteur de la rottlerin, il semble alors étonnant qu'elle n'ait aucun effet lorsqu'elle est utilisée seule et nécessite la présence du Gö6976. D'autre part, il faut signaler que la contribution d'une signalisation exercée par la PKC  $\delta$  dans les cellules PC3 a précédemment été étudiée par l'utilisation de la rottlerin et confirmée par interférence ARN (Kharait et al., 2006).



**Figure 21 : Voie dépendante des PKCs, régulation de la sécrétion d'E-cadhérine et transactivation du récepteur de l'EGF.**

Après incubation en milieu sans sérum, les cellules PC3-M3 sont préincubées pendant 15 minutes en absence (control) ou en présence de :

**A** : 10  $\mu$ M Gö6976, 10 $\mu$ M Rottlerin ou une combinaison des deux puis stimulées (+) ou non (-) pendant deux heures en présence de carbamylcholine 100  $\mu$ M (CCH).

**B et C** : 10  $\mu$ M Gö6976, 10 $\mu$ M Rottlerin ou une combinaison des deux, 5  $\mu$ M TAPI-2, 10  $\mu$ M U0126 ou 5  $\mu$ M AG1478 puis stimulées (+) ou non (-) pendant 15 minutes (**C**) ou deux heures (**B**) en présence de PMA 1  $\mu$ M (PMA).

Le clivage de l'ectodomain de l'E-cadhérine (**A**) et (**B**) est analysé par Western-blot comme décrit dans la légende de la Figure 3. Le taux de phosphorylation des MAPkinase 1 et 2 contenues dans les lysats cellulaires (**C**) est analysé par Western-blot en présence d'un anticorps dirigé contre les phospho-MAPkinase 1 et 2 (P-ERK1/2) ou contre toutes les formes de ERK 1/2 (T-ERK1/2). Les résultats des Western-blot montrés en (**A**) et (**B**) sont exprimés comme décrit précédemment dans la légende de la figure 3 et rapportés respectivement en (**D**) et (**E**). Le taux de p-ERK des lysats cellulaires est calculé comme le rapport pERK / T-ERK et rapporté en (**F**). Les résultats sont la moyenne +/- SEM de trois déterminations.

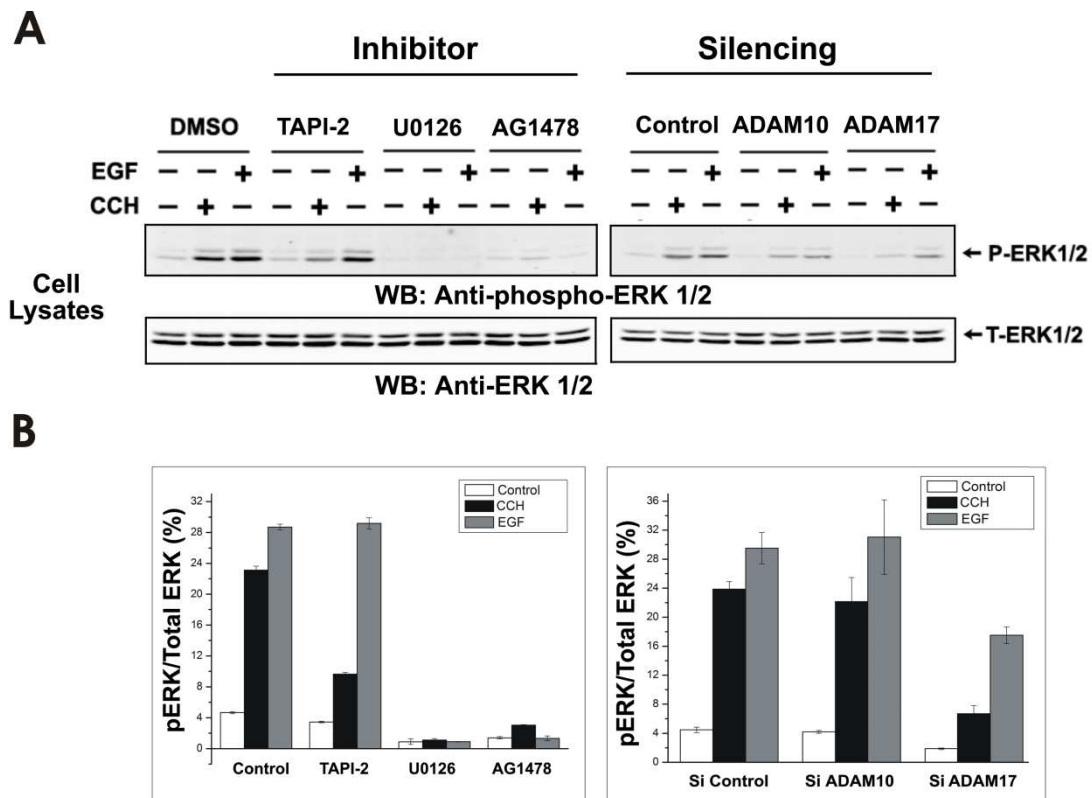
## Transactivation de l'EGFR et régulation de la sécrétion de l'E-cadhérine

Au cours de notre étude de la stimulation des cellules PC3-M3 par le PMA, nous avons voulu savoir si la voie MAPkinase et plus particulièrement la MAPkinase ERK était impliquée dans la régulation du clivage de l'E-cadhérine. Un certain nombre de données de la littérature indique que cette voie MAPkinase est une composante de la signalisation intracellulaire conduisant à l'augmentation du clivage de diverses protéines membranaires et plus particulièrement des ligands de l'EGFR (Diaz-Rodriguez et al., 2002; Fan & Derynck, 1999; Ohtsu et al., 2006)

Comme on peut l'observer sur les **figures 21C et 21F**, le PMA stimule fortement la phosphorylation des MAPK ERK1 et ERK2. Comme la stimulation de la sécrétion d'E-cadhérine, cet effet est entièrement inhibé par le Gö6976 et comme on pouvait s'y attendre par un inhibiteur de MAPkinase kinase, le U0126. Par contre, nous avons obtenu un résultat à priori inattendu, à savoir une inhibition par l'inhibiteur de métalloprotéase TAPI-2 et de la kinase de l'EGFR, l'AG1478. Un résultat identique est obtenu concernant la stimulation de la sécrétion de l'ectodomaine d'E-cadhérine (**Figure 21B et 21E**). L'ensemble de ces données suggère fortement que l'effet stimulant du PMA s'exerce bien par l'intermédiaire de la voie PKC (sensible au Gö6976) et que cette activation conduit à la transactivation de l'EGFR (sensible au TAPI-2 et à l'AG1478), à l'activation de la voie ERK 1/2 (sensible à l'U0126) et finalement à l'augmentation du clivage de l'E-cadhérine (sensible au TAPI-2).

L'activation du récepteur muscarinique des cellules PC3-M3 conduit aussi à une stimulation de la phosphorylation de ERK. Cette stimulation, comme celle obtenue avec l'EGF est inhibée par l'U0126. Par contre, contrairement à l'effet de l'EGF, elle est fortement inhibée par l'inhibiteur de métalloprotéases TAPI-2, suggérant la contribution de la transactivation de l'EGFR en conséquence de la libération d'un ligand par une activité métalloprotéase. Cette transactivation est bien confirmée par l'effet inhibiteur exercé par l'inhibiteur de la kinase de l'EGFR, l'AG1478 (**Figure 22A et 22B, partie gauche**). Des expériences d'interférence ARN visant à nouveau les métalloprotéases ADAM10 et ADAM17 montrent que la stimulation de la voie ERK par la carbamylcholine est inhibée suite à

l'interférence ARN d'ADAM17 et non d'ADAM10 tandis que dans ces deux conditions, la stimulation directe de l'EGFR par l'EGF est peu ou pas affectée. Cet ensemble de données indique donc que comme pour la régulation du clivage de l'E-cadhérine (cf. plus haut), ADAM17 et non ADAM10 est la métalloprotéase impliquée dans la transactivation de l'EGFR lors de l'activation du récepteur M3 muscarinique des cellules PC3-M3.



**Figure 22 : ADAM protéases et transactivation du récepteur de l'EGF dans la régulation des MAPkinase.**

**A (partie gauche) :** Après incubation en milieu sans sérum, les cellules PC3-M3 sont pré-incubées pendant 15 minutes en absence (DMSO) ou en présence de 5  $\mu$ M TAPI-2, 10  $\mu$ M U0126 ou 5  $\mu$ M AG1478 puis stimulées (+) ou non (-) pendant 15 minutes en présence de Carbamylcholine 100  $\mu$ M (CCH) ou d'EGF 100 ng/ml.

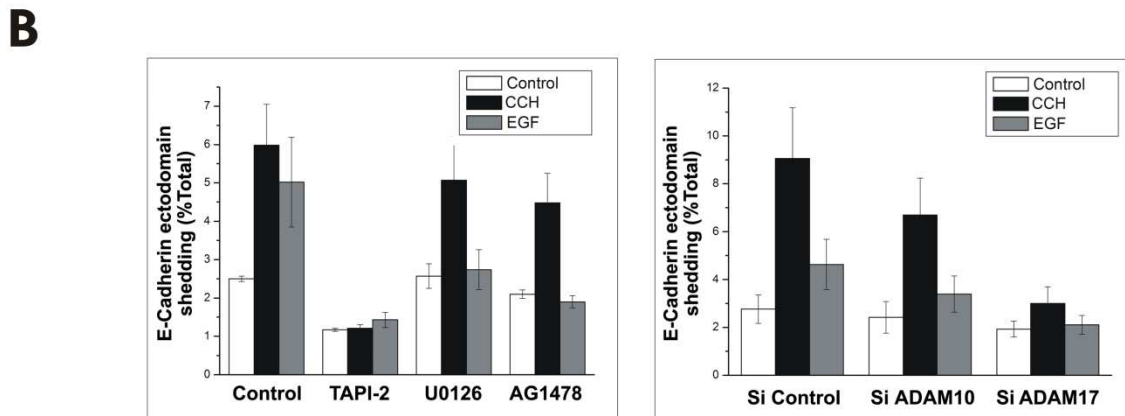
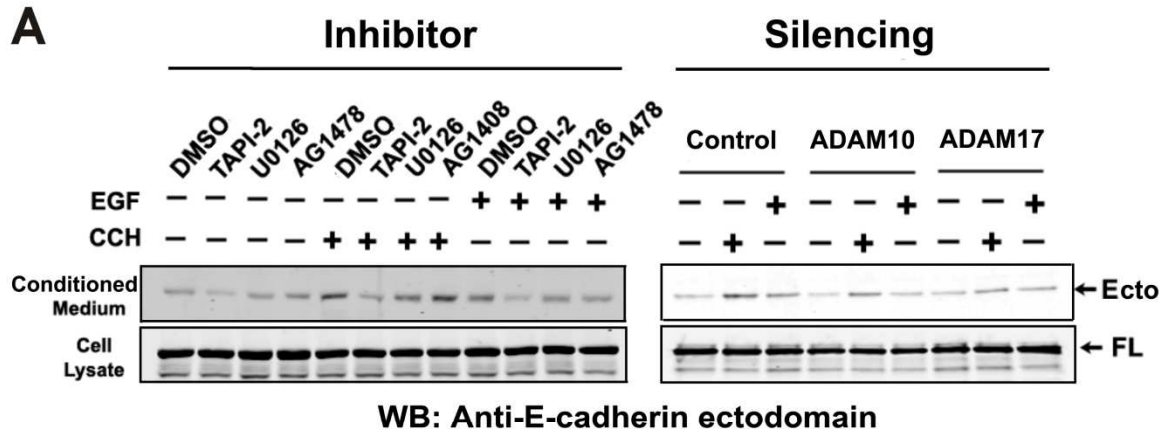
**A (partie droite) :** Après incubation en milieu sans sérum, les cellules ayant préalablement subi une interférence ARN contrôle ou dirigée contre les métalloprotéases ADAM10 ou ADAM17 sont incubées pendant 15 minutes en absence (-) ou en présence (+) de Carbamylcholine 100  $\mu$ M (CCH) ou d'EGF 100 ng/ml.

Le taux de phosphorylation des MAPkinase 1 et 2 contenues dans les lysats cellulaires (C) est analysé par Western-blot en présence d'un anticorps dirigé contre les phospho-MAPkinase 1 et 2 (P-ERK1/2) ou contre toutes les formes de ERK 1/2 (T-ERK1/2).

**B :** Le taux de pERK des lysats cellulaires est calculé comme le rapport pERK / T-ERK et rapporté en (%). Les résultats sont la moyenne +/- SEM de trois déterminations.



Il a été montré récemment que la stimulation de l'EGFR dans des cellules épithéliales de prostate non transformées induit le clivage de l'ectodomaine de l'E-cadhérine par l'activation de métalloprotéases ADAM10 (Grabowska et al., 2011). Nous avons donc voulu savoir si la transactivation de l'EGFR mise en évidence dans ce travail (cf. ci-dessus) était impliquée dans la régulation muscarinique du clivage de l'E-cadhérine. Dans les cellules PC3-M3, la sécrétion d'E-cadhérine est bien augmentée lors d'une incubation en présence d'EGF. Cet effet met en jeu l'activité kinasique de l'EGFR (inhibition par l'AG1478), un recrutement de la voie ERK (inhibition par l'U0126) et finalement d'une activité de type métalloprotéase (inhibition par le TAPI-2) (**Figure 23A et 23B, partie gauche**). Les expériences d'interférence ARN suggèrent qu'ADAM17 est, comme dans le cas de la stimulation muscarinique (**cf Figure 20**), la principale métalloprotéase mise en jeu dans cette voie de régulation (**Figure 23A et 23B, partie droite**). Si l'activation du récepteur M3 muscarinique est bien responsable d'une transactivation de l'EGFR (**cf. Figure 22**), celle-ci n'est pas impliquée dans la stimulation de la sécrétion de l'E-cadhérine. En effet, la stimulation de la sécrétion de l'ectodomaine de l'E-cadhérine par la carbamylcholine n'est affectée ni par la présence de l'U0126, ni de l'AG1478 (**Figure 23A et 23B partie gauche**).



**Figure 23 : ADAM protéases et transactivation du récepteur de l'EGF dans la régulation de la sécrétion de l'ectodomaine de l'E-cadhérine.**

**A (partie gauche) :** Après incubation en milieu sans sérum, les cellules PC3-M3 sont pré-incubées pendant 15 minutes en absence (DMSO) ou en présence de 5  $\mu$ M TAPI-2, 10  $\mu$ M U0126 ou 5  $\mu$ M AG1478 puis stimulées (+) ou non (-) pendant 2 heures en présence de Carbamylcholine 100  $\mu$ M (CCH) ou d'EGF 100 ng/ml.

**A (partie droite) :** Après incubation en milieu sans sérum, les cellules ayant préalablement subi une interférence ARN contrôle ou dirigée contre les métalloprotéases ADAM10 ou ADAM17 sont incubées pendant 2 heures en absence (-) ou en présence (+) de Carbamylcholine 100  $\mu$ M (CCH) ou d'EGF 100 ng/ml.

Le clivage de l'ectodomaine de l'E-cadhérine est analysé par Western-blot comme décrit dans la légende de la Figure 3.

**B :** La quantification de la sécrétion de l'ectodomaine de l'E-cadhérine est réalisée comme décrit dans la légende de la figure 3. Les résultats sont exprimés en pourcentage de sécrétion et sont la moyenne +/- SEM de trois déterminations.

Pour conclure sur cette partie de mon travail, l'étude de la régulation de la sécrétion de l'ectodomaine de l'E-cadhérine dans les cellules PC3 nous a permis de montrer que :

- l'engagement de certaines tétraspanines par des anticorps monoclonaux conduit à un clivage juxtamembranaire accru de l'E-cadhérine et à la libération de son ectodomaine dans le milieu extracellulaire. Ce clivage implique la métalloprotéase ADAM10
- l'activation des récepteurs muscariniques M3 à l'acétylcholine conduit, elle aussi, à une stimulation accrue du clivage juxtamembranaire de l'E-cadhérine et à la libération de son ectodomaine dans le milieu extracellulaire. Ce clivage n'implique pas la métalloprotéase ADAM10 mais plutôt ADAM17.
- la transactivation de l'EGFR n'est pas impliquée dans la régulation muscarinique du clivage de l'E-cadhérine alors que l'activation directe de l'EGFR par un de ses ligands conduit, elle, à une stimulation de ce clivage.

Cette partie du travail pourrait être poursuivie en particulier en ce qui concerne la contribution des différentes voies de transduction du signal qui pourraient être mises en jeu. Nous n'avons par exemple pas du tout abordé leur étude dans le cas de la stimulation des cellules par les anticorps anti-tétraspanines. De même, la contribution réelle des différents types de PKC dans la régulation du clivage comme de la transactivation de l'EGFR est à préciser comme l'est le positionnement de la kinase ERK dans l'effet du PMA. Cette MAPkinase est-elle impliquée dans l'activation de la protéase conduisant à la libération du ligand de l'EGFR ou, activée par l'EGFR, impliquée dans l'activation de la protéase responsable du clivage de l'E-cadhérine ? (L'étude de l'effet d'un anticorps anti-EGFR bloquant comme le Cetuximab par exemple pourrait permettre de répondre à cette question).

Cependant, comme je l'ai énoncé précédemment, le but initial de mon travail était d'établir un modèle permettant de décrypter le rôle des tétraspanines dans la régulation d'ADAM10. Un certain nombre d'arguments nous avaient conduits à postuler que l'activation du clivage de l'E-cadhérine par un récepteur GPCR comme le récepteur

muscarinique M3 à l'acétylcholine pouvait être un tel modèle. Cependant, et contrairement à notre attente, si l'activation de ces récepteurs conduit bien à une stimulation du clivage membranaire de l'ectodomaine de l'E-cadhérine, celle-ci implique la métalloprotéase ADAM17 et non ADAM10. Ce résultat, s'il est potentiellement important pour l'étude des mécanismes cellulaires impliquant une protéine d'adhérence telle que l'E-cadhérine, est clairement défavorable pour l'étude de la contribution des tétraspanines dans le mécanisme de régulation de la métalloprotéase ADAM10. Afin de trouver un autre modèle permettant l'étude de la régulation d'ADAM10 par les tétraspanines, nous nous sommes éloignés de l'étude de l'activation du clivage de l'E-cadhérine par les métalloprotéases pour nous recentrer sur le thème de l'interaction entre ADAM10 et les tétraspanines, ses conséquences vis-à-vis de la localisation de la métalloprotéase ainsi que de son action sur un autre substrat, le récepteur Notch.

## Effet des TspanC8s sur l'adressage d'ADAM10

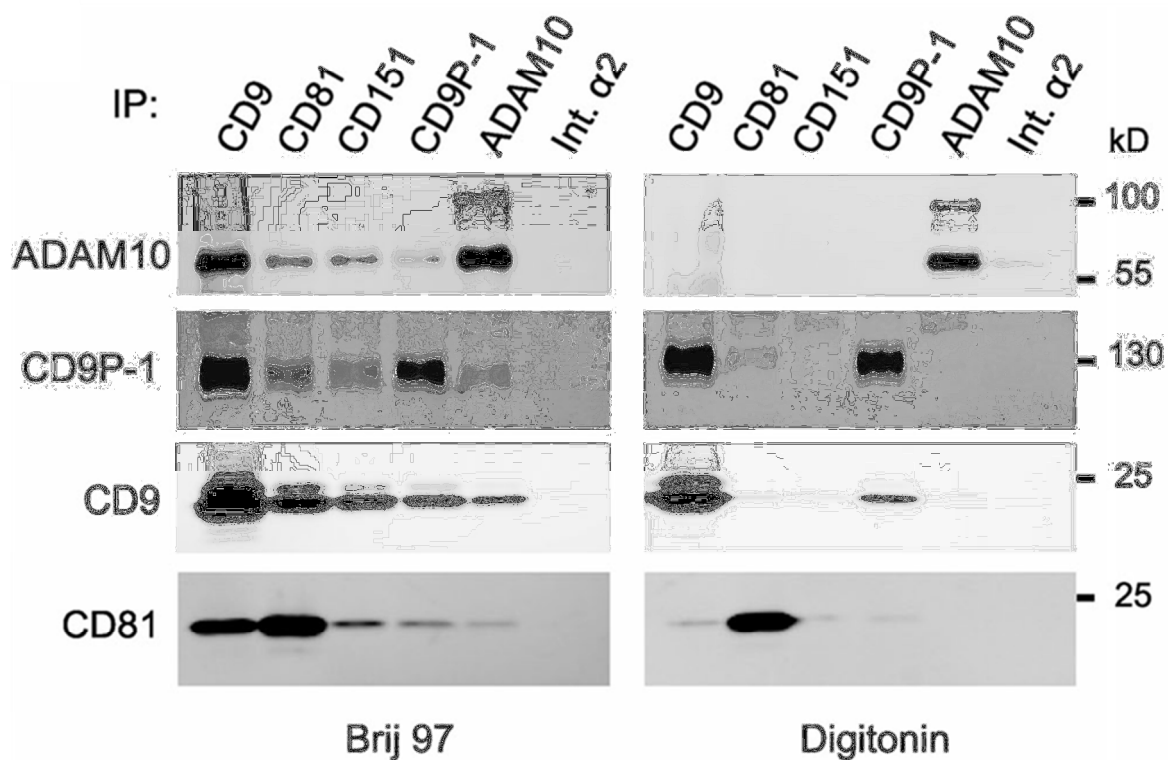
### ADAM10 n'interagit pas de manière directe avec les tétraspanines « classiques »

Nous apprenons dès nos premières années à l'université qu'historiquement, la membrane plasmique était considérée comme une « mosaïque fluide » composée de lipides et protéines flottant et diffusant sans contrainte. Par la suite, le modèle présenté se complexifia : la diffusion latérale des protéines est physiquement restreinte par le cytosquelette sous-jacent aboutissant même quelquefois à une polarisation de la cellule en termes de morphologie mais aussi de distribution de protéines membranaires. Un degré supplémentaire de complexité et de compartimentation est apporté par le modèle de radeaux lipidiques selon lequel certaines protéines interagissent préférentiellement avec des lipides saturés constituant ainsi des compartiments particulièrement enrichis en certaines protéines permettant une initiation ainsi qu'un regroupement d'effecteurs spécialement efficaces. Dans le cas d'activités enzymatiques, la compartimentation est très importante. A titre d'exemple, il a été suggéré que les microdomaines de types rafts ou caveolae sont un environnement négatif pour la transactivation de l'EGFR via la métalloprotéase ADAM17 dans des cellules de muscles lisses (Takaguri et al., 2011). Par la suite, en complément de ce concept de compartimentation membranaire par radeaux lipidiques, est apparu celui des microdomaines enrichis en tétraspanines.

Notre laboratoire a contribué à identifier en détail la composition des microdomaines à tétraspanines dans des lignées de cancer colorectal par des expériences de spectrométrie de masse. Brièvement, les complexes à tétraspanines ont été solubilisés à l'aide d'un détergent Brij97 maintenant les interactions entre tétraspanines et « purifiés » par une immunoprécipitation utilisant un anticorps dirigé contre CD9 puis les composants de ces immunoprécipitats ont été séparés par un détergent plus fort, le Triton X-100, et analysés en spectrométrie de masse (André et al., 2006; Le Naour et al., 2006). Parmi les protéines identifiées de manière extrêmement récurrente dans des cellules SW480, SW620 et Isreco 1-2 et 3 figurait en particulier la métalloprotéase ADAM10 -Table3 dans (André et al., 2006) ;

Table1 dans (Le Naour et al., 2006)-. De plus, il a été démontré au sein du laboratoire et également par l'équipe de M. Hemler que la métalloprotéase ADAM10 s'associait aux tétraspanines. Ce travail a été effectué au sein de lignées de lymphomes (Arduise et al., 2008) et de fibrosarcomes et cancers mammaires (Xu et al., 2009). Cependant, il faut garder à l'esprit que l'ensemble de ces interactions protéiques a été mis en évidence en utilisant des conditions de lyse conservant les liaisons entre tétraspanines (i.e. en Brij97). Ces associations pouvaient donc tout à fait être une conséquence d'interactions secondaires entre tétraspanines plutôt qu'une association directe entre la tétraspanine CD9 et un partenaire ADAM10.

Afin de dissiper ce doute et mettre en évidence des interactions spécifiques et directes, nous avons tenté de coimmunoprécipiter cette métalloprotéase en digitonine cette fois, par des anticorps dirigés contre les tétraspanines que le travail précédent de Cécile Arduise avait permis d'identifier comme associées à ADAM10 en Brij97 (**Figure 24**). Ce travail a été réalisé en cellules de cancer colique HCT116 dans lesquelles l'expression endogène d'ADAM10 est particulièrement élevée. Les résultats de la **figure 24** montrent qu'aucune interaction entre ADAM10 et les tétraspanines « classiques » CD9, CD81, CD151 (pourtant observées en Brij97) n'est observée en digitonine alors que l'interaction entre CD9 et son partenaire direct CD9-P1 –identifiée dans (Charrin et al., 2001)- est, elle, aisément visible.



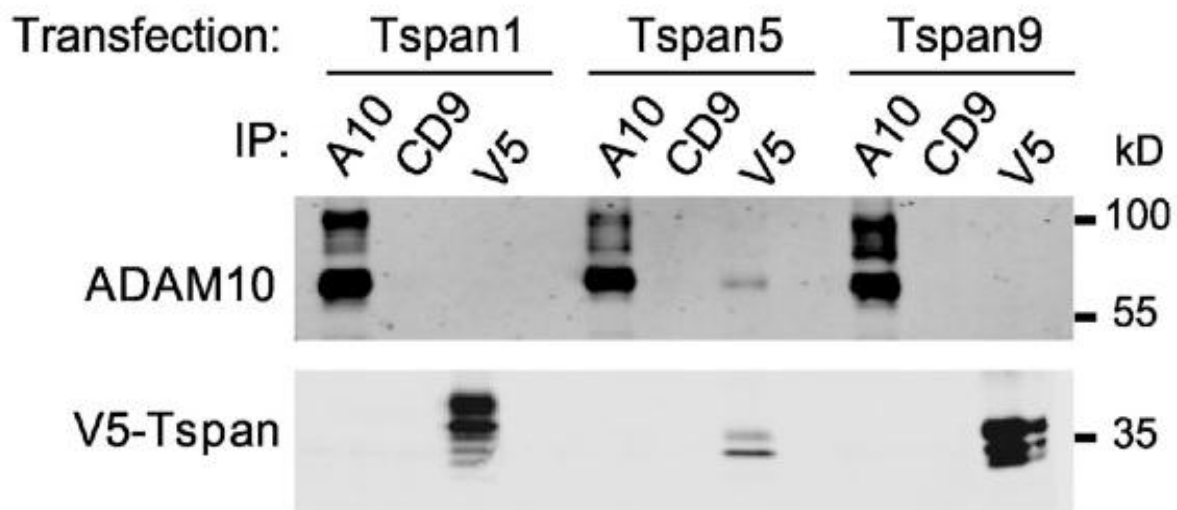
**Figure 24 : ADAM10 n'est pas un partenaire primaire des tétraspanines « canoniques » / « historiques »**

Des cellules HCT116 sont lysées en présence de 1% Brij97 (gauche) ou digitonine (droite) et les lysats sont soumis à une précipitation (IP) par différents anticorps. Les protéines immunoprécipitées sont séparées par SDS-PAGE et la présence d'ADAM10, CD9P-1, CD9 et CD81 dans les immunoprécipités est détectée par Western-blot.

### **A la recherche de la tétraspanine interagissant avec ADAM10 de manière directe**

Suivant la démarche de recherche d'une tétraspanine s'associant avec ADAM10 de façon directe et voyant que les tétraspanines « historiques » ne se liaient pas de façon directe avec ADAM10, nous avons dans un second temps mis à l'épreuve d'autres tétraspanines beaucoup moins étudiées. Pour ce faire, nous avons testé des tétraspanines précédemment identifiées et clonées au laboratoire à partir de banques d'EST, les tétraspanines Tspan1, 5 et 9. Ces tétraspanines n'ont pour l'instant reçu que très peu d'intérêt de la part de la communauté scientifique du fait de l'absence d'outils et plus

particulièrement d'anticorps. Nous avons donc dû générer des constructions codant pour des protéines de fusion associant les séquences codant l'une ou l'autre de ces tétraspanines et portant l'étiquette V5 à leur extrémité carboxy-terminale. Ces constructions ont été utilisées pour transfecter des cellules PC3 issues d'une métastase osseuse de cancer de la prostate, elles aussi particulièrement riches en ADAM10. De la même façon qu'auparavant, une immunoprécipitation par un anticorps dirigé contre l'étiquette V5 succédant à une lyse en digitonine et suivie d'une révélation en Western blot par un anticorps dirigé contre ADAM10 ou l'étiquette V5, montre que la tétraspanine Tspan5 interagit de manière directe avec ADAM10 contrairement aux deux autres tétraspanines testées, Tspan1 et 9 (**Figure 25**).



**Figure 25 : Tspan5 et ADAM10 interagissent de manière digitonine-résistante**

Des cellules PC3 sont transfectées transitoirement avec des vecteurs codant les protéines de fusion Tspan1, 5 ou 9 couplées à l'étiquette V5. Elles sont lysées en présence de 1% digitonine et les lysats sont soumis à une précipitation (IP) par différents anticorps. Les protéines immunoprécipitées sont séparées par SDS-PAGE et la présence d'ADAM10 ou V5-Tspan dans les immunoprécipités est détectée par Western-blot.

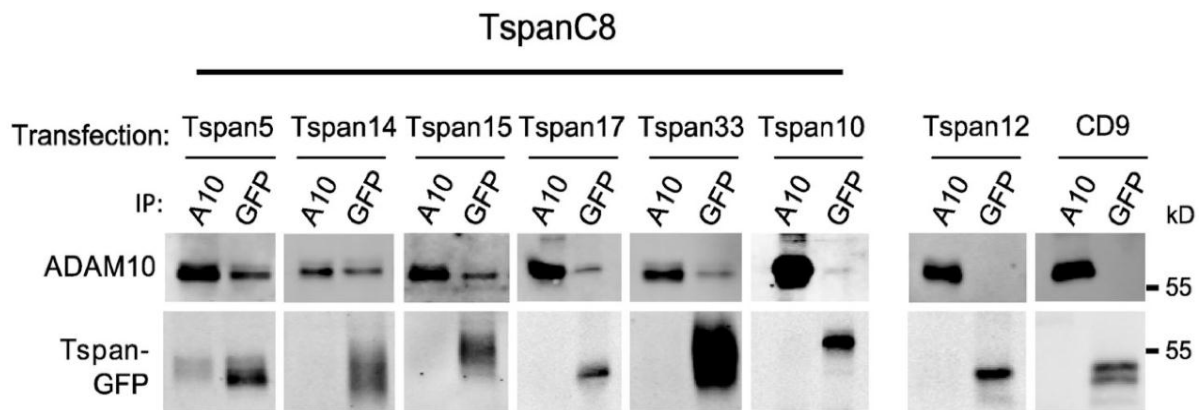


## Liaison entre ADAM10 et l'ensemble des membres d'une sous-famille de tétraspanines

Ayant identifié cette interaction avec une tétraspanine très peu connue (une recherche PubMed avec le mot-clé « Tspan5 » donnait 6 résultats en 2008 dont une revue et un article en chinois), nous nous sommes intéressés à sa phylogénie (avec l'aide de Raphaël Oriol et Emmanuel Dornier) et avons constaté qu'elle faisait partie d'une sous-famille de tétraspanines dont la propriété commune était de présenter 8 cystéines dans leur large boucle extracellulaire EC2. Nous avons nommé « TspanC8s » cet ensemble de tétraspanines très conservées puisque présentes des mammifères jusqu'aux invertébrés. Elle comprend les tétraspanines Tspan5, 10, 14, 15, 17 et 33 chez *H. sapiens*.

Ces tétraspanines présentent en plus de ces huit cystéines, de fortes homologies et il nous est apparu logique de chercher à déterminer jusqu'à quel point l'interaction entre ADAM10 et Tspan5 pouvait être étendue aux autres membres de la sous-famille TspanC8. L'absence d'outils adéquats pour l'étude ces tétraspanines nous a amené à générer des plasmides codant des protéines de fusion associant les séquences codant les TspanC8s et l'étiquette GFP. L'étiquette GFP a été choisie dans ce cas car elle permettait, si nécessaire, un tri aisé des cellules exprimant le transgène de par sa fluorescence intrinsèque lors d'une excitation à 488nm. Un autre choix possible était d'insérer une étiquette dans les domaines extracellulaires de ces différentes tétraspanines. Cependant, compte tenu du rôle potentiel joué par les boucles EC1 et surtout EC2 dans l'interaction entre tétraspanines ou avec les partenaires, ce choix n'a pas été retenu. Ces différentes constructions ont donc été transfectées et exprimées dans un premier temps de manière transitoire, dans des cellules PC3 et des lysats cellulaires soumis à la même technique d'immunoprécipitation en présence de digitonine avec un anticorps dirigé à présent contre l'étiquette GFP. Comme le montrent les résultats de la **figure 26**, les tétraspanines Tspan5, 14, 15, 17, 33 (et très légèrement Tspan10) précipitent ADAM10 dans de telles conditions. Il semble donc que toutes les TspanC8s aient la capacité de se lier de façon directe à ADAM10. Le résultat obtenu avec la tétraspanine CD9 étiquetée GFP (absence de coimmunoprécipitation d'ADAM10) confirme celui de la **figure 24**. Dans le cas de Tspan12-GFP, nous ne confirmons pas le résultat obtenu par l'équipe de M. Hemler (Xu et al., 2009), suggérant une interaction directe entre Tspan12

et ADAM10, vraisemblablement à la suite de l'utilisation de conditions de lyse différentes et plus strictes dans le cas de notre étude. Les propriétés physico-chimiques du Brij96 et du Brij97 utilisés dans l'étude de M. Hemler permettent tout ou partie des interactions entre tétraspanines au contraire de la digitonine.



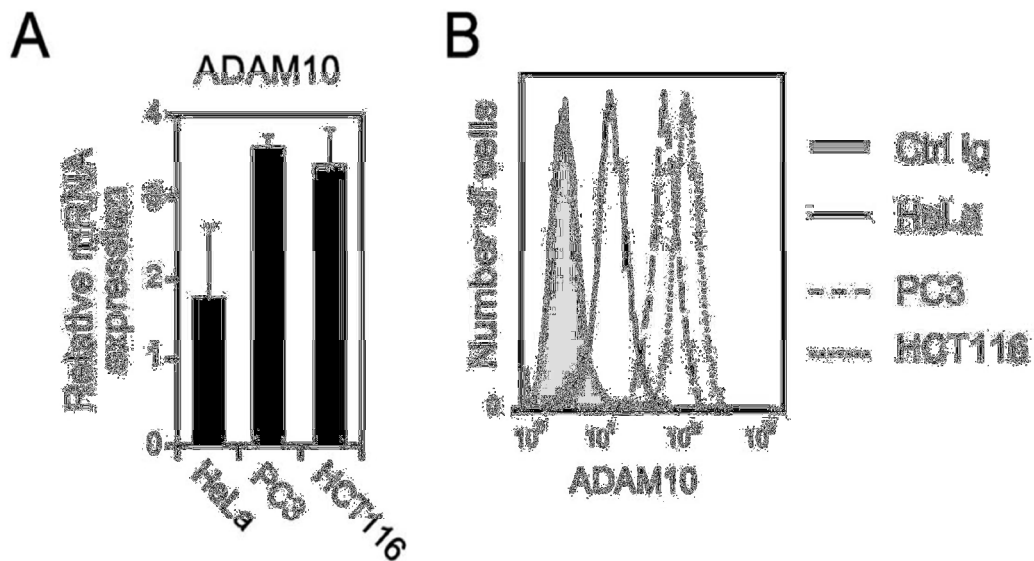
**Figure 26 : L'ensemble des TspanC8s interagit avec ADAM10 de manière directe**

Des cellules PC3 sont transfectées transitoirement avec des vecteurs codant les protéines de fusion TspanC8s ainsi que Tspan12 et CD9 couplées à l'étiquette GFP. Elles sont lysées en présence de 1% digitonine et les lysats sont soumis à une précipitation (IP) par différents anticorps. Les protéines immunoprécipitées sont séparées par SDS-PAGE et la présence d'ADAM10 et Tspan-GFP dans les immunoprécipités est détectée par Western-blot.

### Niveaux d'expression différentiels d'ADAM10 et des TspanC8s dans différentes lignées carcinomales

Ayant identifié une interaction entre un ensemble de tétraspanines évolutivement proches et conservées et une enzyme telle qu'ADAM10, nous nous sommes penchés sur le rôle potentiel d'une telle liaison en particulier dans un cadre pathologique. En effet, vu l'implication notoire de nombreux substrats d'ADAM10 dans les phénomènes de cancérisation, nous avons examiné l'expression ainsi que la localisation d'ADAM10 dans différentes lignées de carcinomes. Une analyse par RT-qPCR de la quantité de transcrits ADAM10 montre que les lignées HCT116 et PC3 présentent une transcription équivalente du gène codant ADAM10 légèrement supérieure à celle de la lignée HeLa (**Figure 27A**). L'expression d'ADAM10 à la surface des cellules analysée par cytométrie en flux (**Figure 27B**)

est particulièrement faible à la surface des cellules HeLa. Ce résultat ne semble pas pouvoir être directement corrélé à la quantité d'ARNm observé sur la **figure 27A**.



**Figure 27 : Niveaux d'expression d'ADAM10 dans trois lignées carcinomales HeLa, HCT116 et PC3.**

**A.** Analyse par RT-qPCR de la quantité d'expression d'ARNm issu du gène codant ADAM10 dans 3 lignées cellulaires d'origine carcinomale normalisée par rapport à la transcription du gène codant la protéine ribosomale RPL38 (résultats de trois expériences indépendantes effectuées en triplicates)

**B.** Niveau d'expression de surface d'ADAM10 dans ces 3 lignées analysé en cytométrie en flux (FACS) avec l'anticorps dirigé contre ADAM10 (11G2).

Nous avons parallèlement procédé à la quantification des ARNm issus de la transcription des gènes codant les différentes TspanC8s dans ces différentes lignées. A la lecture des résultats obtenus en **figure 28**, nous observons que les cellules HeLa expriment très peu les TspanC8s mis à part une faible transcription de Tspan14. Les cellules PC3 et HCT116 quant à elles, expriment au contraire un éventail non négligeable de TspanC8s. Plus particulièrement, nous notons que la tétraspanine majoritairement transcrite est Tspan15 dans le cas de PC3 et Tspan14 dans le cas de HCT116 (Tspan14 n'étant pas exprimé dans les cellules PC3). Par ailleurs, on note une intéressante corrélation entre les niveaux d'expression d'ADAM10 à la surface des cellules (**cf. Figure 27B**) et le niveau d'expression des TspanC8s dans ces lignées. Ainsi, nous pouvons raisonnablement nous demander si le

taux d'expression des TspanC8s peut avoir une incidence quant à la localisation membranaire d'ADAM10 à la surface de la cellule. Ainsi, à un niveau d'expression d'ARNm codant pour ADAM10 équivalent, les cellules exprimant le plus de transcrits pour les TspanC8s semblent exprimer plus d'ADAM10 à leur surface.

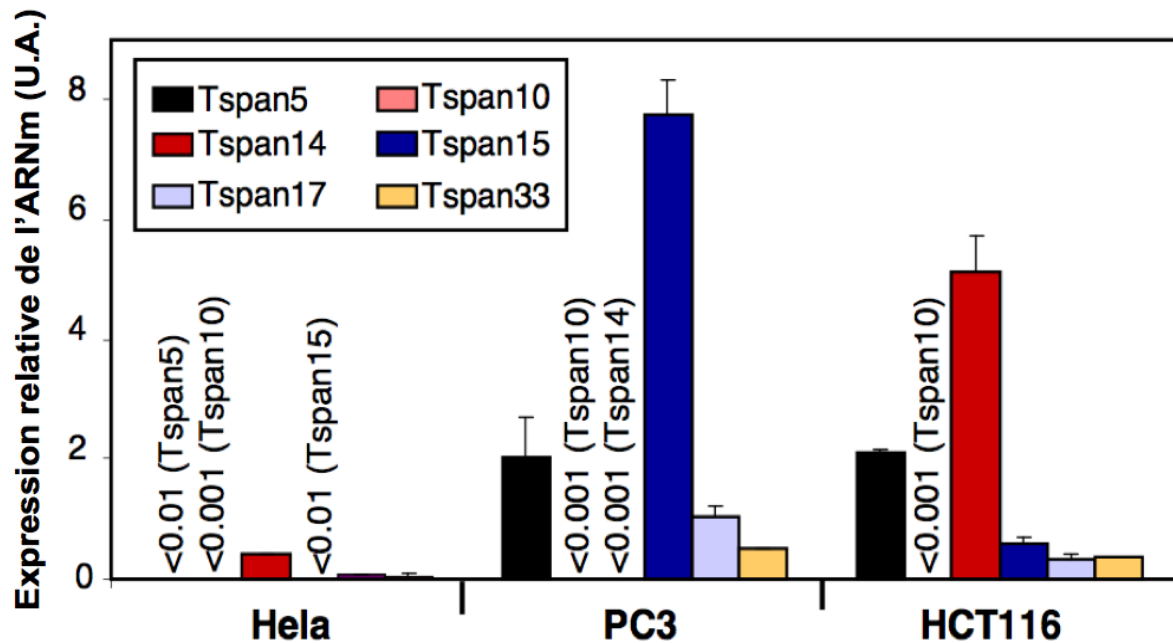


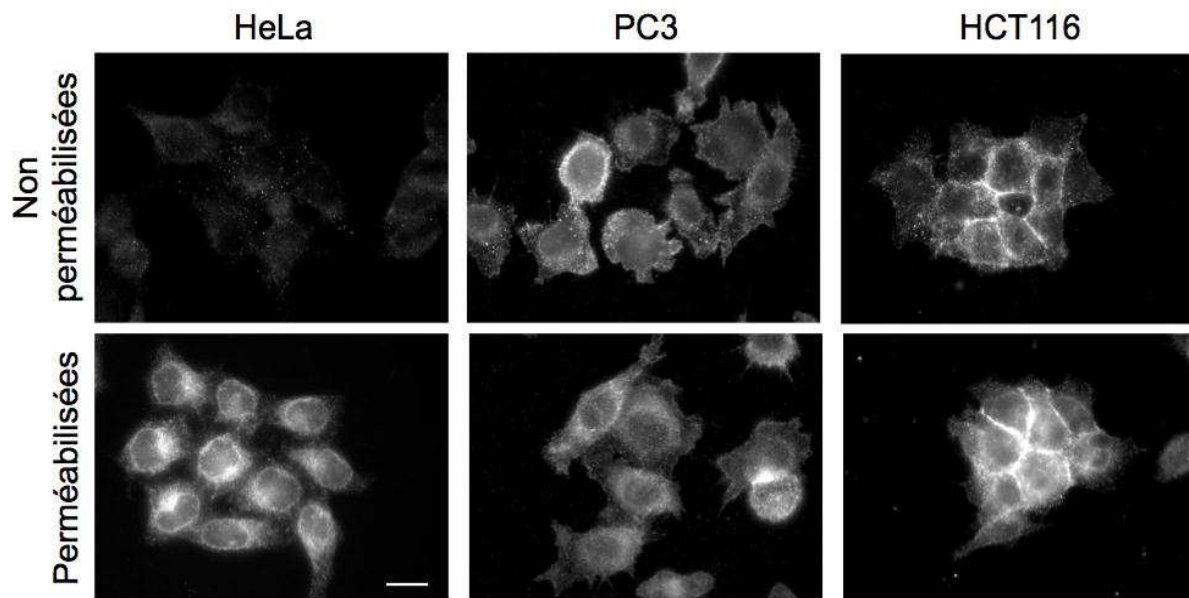
Figure 28 : Profil d'expression des TspanC8s dans trois lignées carcinomales HeLa, HCT116 et PC3

Analyse par RT-qPCR des niveaux d'expression des différentes TspanC8 dans les cellules PC3, HCT116 et HeLa normalisée par rapport à la transcription du gène RPL38 (résultats de trois expériences indépendantes effectuées en triplicates).

### Effets de l'expression des TspanC8s sur la localisation cellulaire d'ADAM10

Afin de visualiser la localisation d'ADAM10 de manière endogène dans les différentes lignées considérées, nous avons procédé à des marquages en immunofluorescence par un anticorps monoclonal spécifique d'ADAM10 (11G2) sur des cellules perméabilisées ou non par le détergent Triton X-100 (**Figure 29**). Lorsque les cellules ne sont pas perméabilisées, nous observons une intensité de marquage récapitulant celle obtenue auparavant lors de l'expérience de cytométrie en flux ; à savoir un marquage d'ADAM10 membranaire à la

surface des cellules HeLa particulièrement faible comparativement à celui obtenu avec les deux autres lignées. Lorsque nous nous penchons à présent sur les mêmes marquages mais en condition perméabilisée, nous observons un marquage très similaire d'ADAM10 à la surface des cellules PC3 et HCT116 mais nous notons surtout un fort marquage intracellulaire d'ADAM10 dans les cellules HeLa.

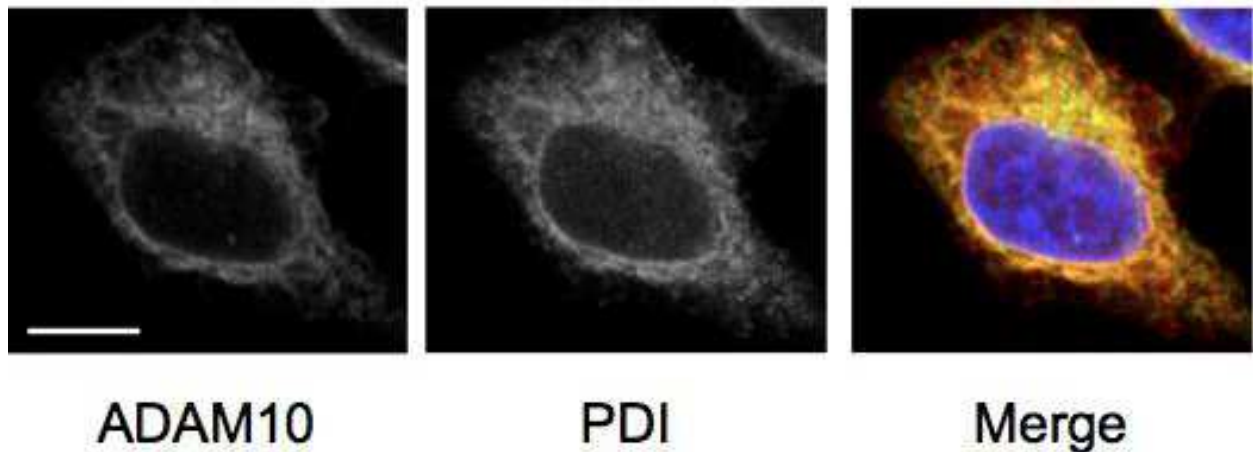


**Figure 29 : ADAM10 est exprimé principalement à la membrane des cellules PC3 et HCT116 et plutôt dans un compartiment intracellulaire dans les cellules HeLa**

Des cellules HeLa, PC3 ou HCT116 sont fixées en paraformaldéhyde 4%, perméabilisées ou non avec 0.1% Triton-X100 puis immunomarquées avec un anticorps dirigé contre ADAM10 (11G2) et enfin analysées en microscopie à épifluorescence avec des temps d'illumination identiques (images représentatives de trois expériences indépendantes, barre d'échelle : 10 $\mu$ m).

Désirant en savoir plus sur cette localisation intracellulaire d'ADAM10 dans les cellules HeLa, nous avons effectué des observations par microscopie confocale à fluorescence après marquage des cellules par des anticorps dirigés contre ADAM10 et des protéines caractéristiques de différents compartiments intracellulaires (**Figure 30**). Nous observons un comarquage d'ADAM10 et d'une protéine abondante du réticulum endoplasmique (Protéine Disulfo-Isomérase/PDI). Nous en concluons que le compartiment intracellulaire où est retenu un « pool » important d'ADAM10 dans les cellules HeLa

exprimant très peu de TspanC8s est constitué par le réticulum endoplasmique. Ainsi, la faible expression d'ADAM10 à la surface des cellules HeLa (**cf. Figure 27B**) n'est pas la conséquence d'une faible expression de cette protéine de manière générale mais plus vraisemblablement due à la rétention de cette protéine à l'intérieur de la cellule la rendant inatteignable par l'anticorps 11G2.

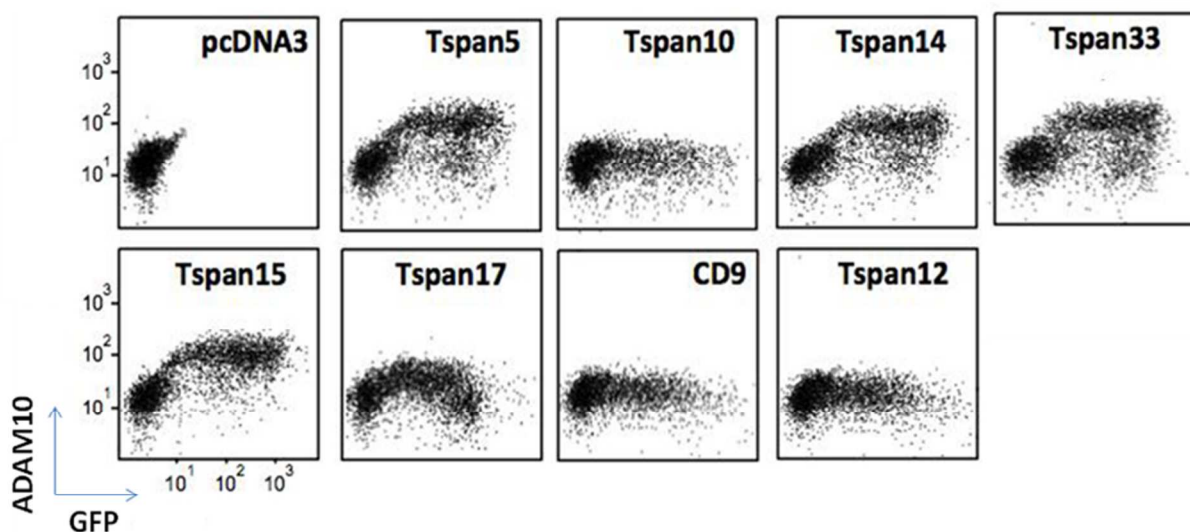


**Figure 30 : Dans les cellules HeLa, ADAM10 est exprimé dans le réticulum endoplasmique**

Des cellules HeLa cultivées sur lamelles de verre, sont fixées en paraformaldéhyde 4%, perméabilisées avec 0.1% Triton-X100 puis immunomarcuées avec un anticorps dirigé contre ADAM10 ou PDI et analysées en microscopie confocale à fluorescence (barre d'échelle : 10µm).

En appliquant le raisonnement inverse, nous avons cherché à déterminer si l'expression de différentes TspanC8s dans un contexte de faible expression de l'ensemble du panel de TspanC8s entraînerait alors une relocalisation du « pool » réticulaire d'ADAM10 vers la membrane plasmique. Tirant partie de nos constructions TspanC8s-GFP, nous avons effectué des analyses biparamétriques en cytométrie en flux, de marquage ADAM10 sur des cellules HeLa transfectées par ces constructions. De cette manière, nous pouvons déterminer un diagramme représentant la quantité d'ADAM10 présent à la membrane des cellules en fonction de la fluorescence GFP issue de l'expression des différentes protéines de fusion TspanX-GFP. Cette analyse (**Figure 31**) nous permet de montrer que la transfection des constructions codant les Tspan5, 14, 15 et 33 permet une augmentation de la quantité d'ADAM10 détectée à la surface des cellules HeLa et que cet effet est absent lorsque l'on

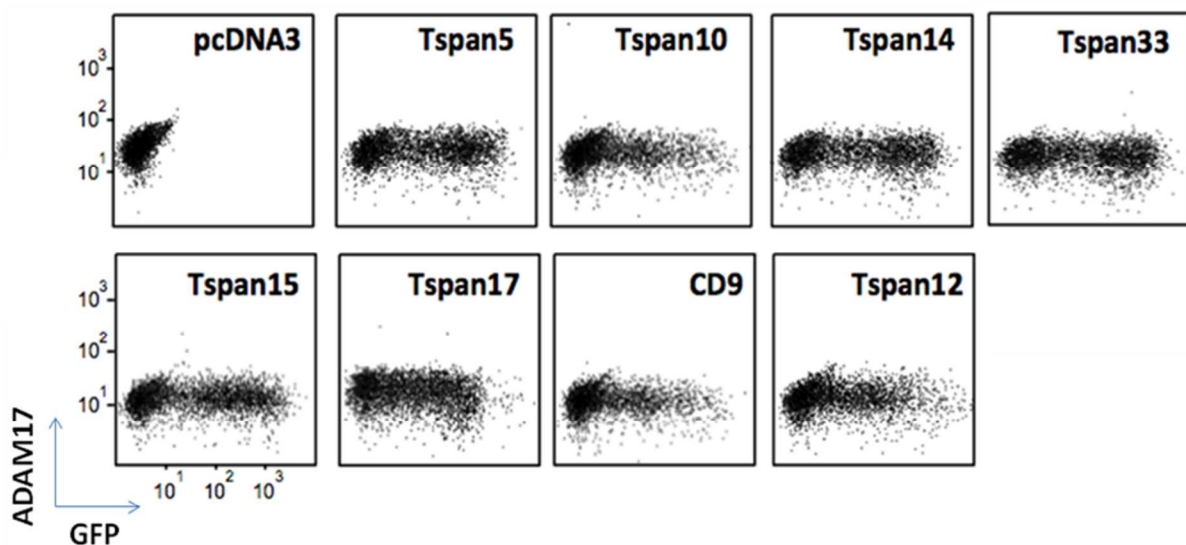
transfecte les constructions codant CD9 ou Tspan12-GFP. On notera cependant que la transfection de Tspan10 (qui est la TspanC8 pour laquelle l'interaction directe avec ADAM10 n'était pas si évidente dans les HCT116) n'a pas d'effet quantitatif sur la localisation membranaire d'ADAM10. En ce qui concerne Tspan17, on qualifiera l'effet de la transfection de « biphasique » puisqu'un faible niveau d'expression du transgène semble conduire à une augmentation de la quantité d'ADAM10 présent à la membrane alors qu'une expression plus forte de cette construction ne semble pas modifier notablement l'expression membranaire d'ADAM10. Cette dernière observation pourrait suggérer que, pour certaines TspanC8s, le niveau d'expression soit particulièrement important vis-à-vis de la localisation membranaire de leurs partenaires. Il est possible donc que le phénomène de compartimentation des partenaires des TspanC8s puisse être finement régulé par la composition locale du réseau de tétraspanines (particulièrement la présence de TspanC8s en ce qui nous concerne) mais aussi par les quantités relatives des différentes TspanC8s.



**Figure 31 : L'expression des TspanC8s augmente l'expression de surface d'ADAM10**

Des cellules HeLa sont transfectées transitoirement avec des vecteurs codant les protéines de fusion TspanC8s ainsi que Tspan12 et CD9 couplées à l'étiquette GFP. Elles sont ensuite immunomarquées par un anticorps dirigé contre ADAM10. On analyse par cytométrie en flux et représentation biparamétrique l'expression de surface d'ADAM10 en fonction de l'expression de la TspanC8-GFP transfectée.

Afin de vérifier que la propriété de routage différentiel par les TspanC8s était bien spécifique à ADAM10 et corrélait avec l'interaction directe de cette dernière avec le spectre des TspanC8s étudiées, nous avons procédé à la même approche d'analyse biparamétrique en cytométrie en considérant cette fois l'expression membranaire de la métalloprotéase ADAM17 (**Figure 32**). Cette protéase de la famille des ADAMs est phylogénétiquement la plus proche d'ADAM10 mais n'est pas retrouvée dans les microdomaines à tétraspanines. Il apparaît que l'expression membranaire d'ADAM17 n'est pas modifiée par l'expression (ou surexpression) des TspanC8s dans les cellules HeLa. La propriété de modulation de l'adressage d'ADAM10 à la surface par les TspanC8s est donc spécifique à la métalloprotéase ADAM10.



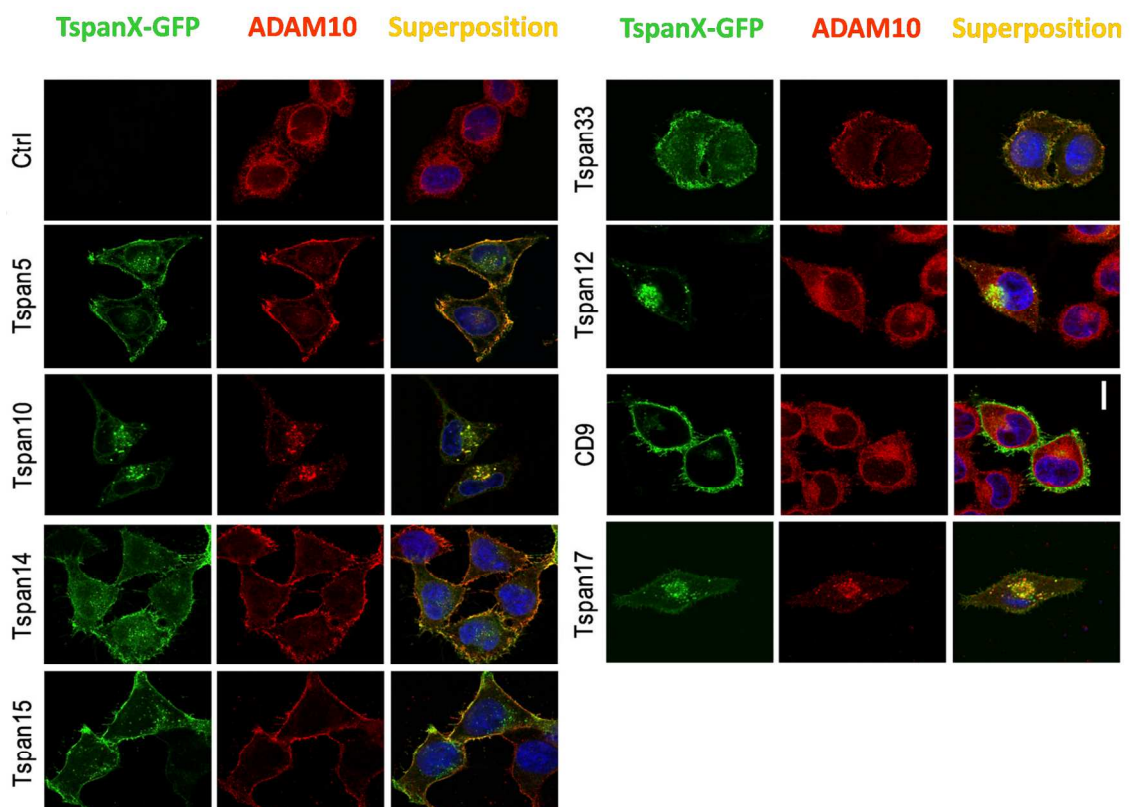
**Figure 32 : L'expression des TspanC8s ne fait pas varier l'expression de surface d'ADAM17**

Des cellules HeLa sont transfectées transitoirement avec des vecteurs codant les protéines de fusion TspanC8s ainsi que Tspan12 et CD9 couplées à l'étiquette GFP. Elles sont ensuite immunomarquées par un anticorps dirigé contre ADAM17. On analyse par cytométrie en flux et représentation biparamétrique l'expression de surface d'ADAM17 en fonction de l'expression de la TspanC8-GFP transfectée.

En complément de ces observations en cytométrie, nous avons analysé la localisation subcellulaire d'ADAM10 dans les cellules HeLa transfectées ou non avec les plasmides codant les TspanC8s-GFP par microscopie confocale à fluorescence (**Figure 33**). Notons avant



toute chose que dans les cellules HeLa, l'expression de ces protéines de fusion (i.e. fluorescence verte) est majoritairement localisée à la membrane plasmique. De plus, on observe nettement que la transfection des cellules HeLa par Tspan5, 14, 15 et 33 induit un changement de localisation du « pool » réticulaire d'ADAM10 vers la membrane (fluorescence rouge). Dans ce dernier compartiment, ADAM10 colocalise alors avec les protéines de fusion étiquetées avec la GFP (fluorescence jaune). A contrario, l'expression des constructions Tspan17, 10, 12 ou CD9 n'induit pas un tel changement.

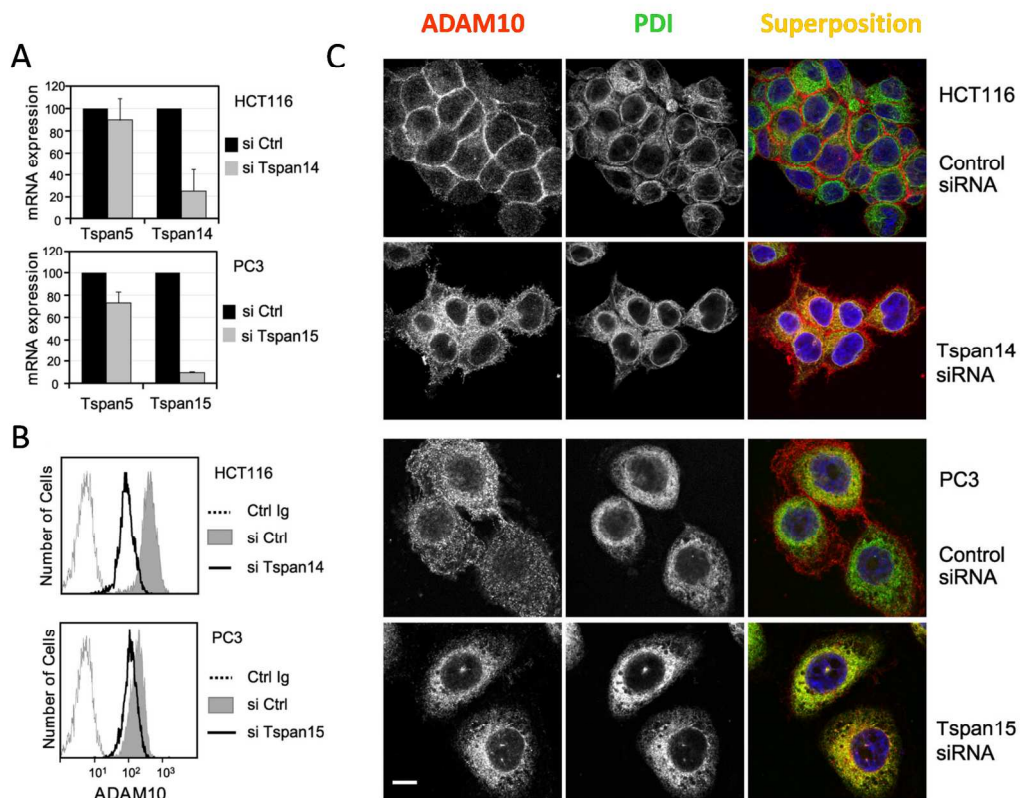


**Figure 33 : L'expression de certaines TspanC8s entraîne la relocalisation membranaire d'ADAM10 dans les cellules HeLa**

Des cellules HeLa sont transfectées transitoirement avec des vecteurs codant les protéines de fusion TspanC8s ainsi que Tspan12 et CD9 couplées à l'étiquette GFP. Les cellules sont ensuite fixées en paraformaldéhyde 4%, perméabilisées avec 0.1% Triton-X100 puis immunomarquées avec un anticorps dirigé contre ADAM10 et analysées en microscopie confocale à fluorescence (barre d'échelle : 10µm).

Au cours de notre propre travail sur le rôle des TspanC8s, cette question de l'adressage d'ADAM10 vers un compartiment particulier de la cellule via une interaction avec les tétraspanines a été soulevée par deux autres groupes. Ainsi, Prox et ses collègues ont montré que la forme murine de la tétraspanine Tspan15 s'associait avec la forme murine d'ADAM10 après cotransfection de ces protéines dans des cellules HeLa et que ce complexe accélérât la sortie d'ADAM10 du réticulum endoplasmique (Prox et al., 2012). De même, Elizabeth Haining dans le laboratoire de Mike Tomlinson a montré que la manipulation de l'expression de différentes TspanC8s dans des cellules de la lignée mégacaryocytaire conduisait aux mêmes modifications de l'expression membranaire d'ADAM10 (Haining et al., 2012). Nos résultats sont donc en parfait accord avec ces études mais ils ont l'intérêt d'étendre les propriétés de routage des TspanC8s vis-à-vis d'ADAM10 à tous les membres de cette famille dans un même type cellulaire et d'utiliser comme cible l'ADAM10 endogène.

Nous avons donc établi que l'expression exogène de certaines TspanC8s entraînait l'accumulation d'ADAM10 à la surface de cellules n'exprimant quasiment aucune de ces TspanC8s. Cette absence d'expression n'étant pas le cas général, nous nous sommes demandé si une manipulation de l'expression des TspanC8s pouvait avoir un effet sur l'expression et la localisation subcellulaire d'ADAM10. Afin de vérifier ceci, nous avons inhibé la synthèse des TspanC8s majoritaires des cellules PC3 et HCT116 par interférence ARN (**Figure 34A**) et observé en parallèle le niveau d'expression membranaire et la localisation d'ADAM10 en cytométrie en flux (**Figure 34B**) et microscopie confocale à fluorescence (**Figure 34C**). Ces expériences nous démontrent bien que l'interférence ARN effective des TspanC8s Tspan14 dans les cellules HCT116 et Tspan15 dans les cellules PC3 entraîne une diminution du « pool » d'ADAM10 à la surface cellulaire. Plus précisément, on notera que le « pool » d'ADAM10 situé à la membrane plasmique des PC3 et HCT116 « normales » se retrouve dans un compartiment cellulaire délimité par le marqueur de réticulum PDI après une interférence ARN dirigée contre la TspanC8 majoritaire des deux modèles. Il apparaît donc que l'ensemble de protéines ADAM10 présent à la surface des cellules PC3 et HCT116 soit relocalisé vers le réticulum endoplasmique lorsque l'on inhibe l'expression de la tétraspanine majoritairement exprimée dans ces deux types cellulaires. Ces tétraspanines sont donc nécessaires à l'adressage d'ADAM10 à la surface cellulaire.



**Figure 34 : L'inhibition de l'expression des TspanC8s majoritaires dans les cellules HCT116 et PC3 entraîne la rétention d'ADAM10 dans le réticulum endoplasmique**

Les cellules HCT116 et PC3 ont subi une interférence ARN dirigée contre Tspan14 et 15 respectivement et ont été analysées suivant différents protocoles.

A. Après 48 heures, la transcription des Tspan5, 14 et 15 a été vérifiée par RT-qPCR normalisée par l'expression du gène RPL38 puis exprimée en fonction de la transcription obtenue lorsqu'une interférence contrôle est effectuée. L'expression de l'ARN de la TspanC8, Tspan5 sert de contrôle de spécificité de l'interférence.

B. Les cellules sont marquées par un anticorps dirigé contre ADAM10 et une analyse par cytométrie en flux de l'expression d'ADAM10 à la surface est effectuée.

C. Les cellules sont fixées en paraformaldéhyde 4%, perméabilisées avec 0.1% Triton-X100 puis immunomarquées avec un anticorps dirigé contre ADAM10 ou PDI et analysées en microscopie confocale à fluorescence (barre d'échelle : 10 μm).

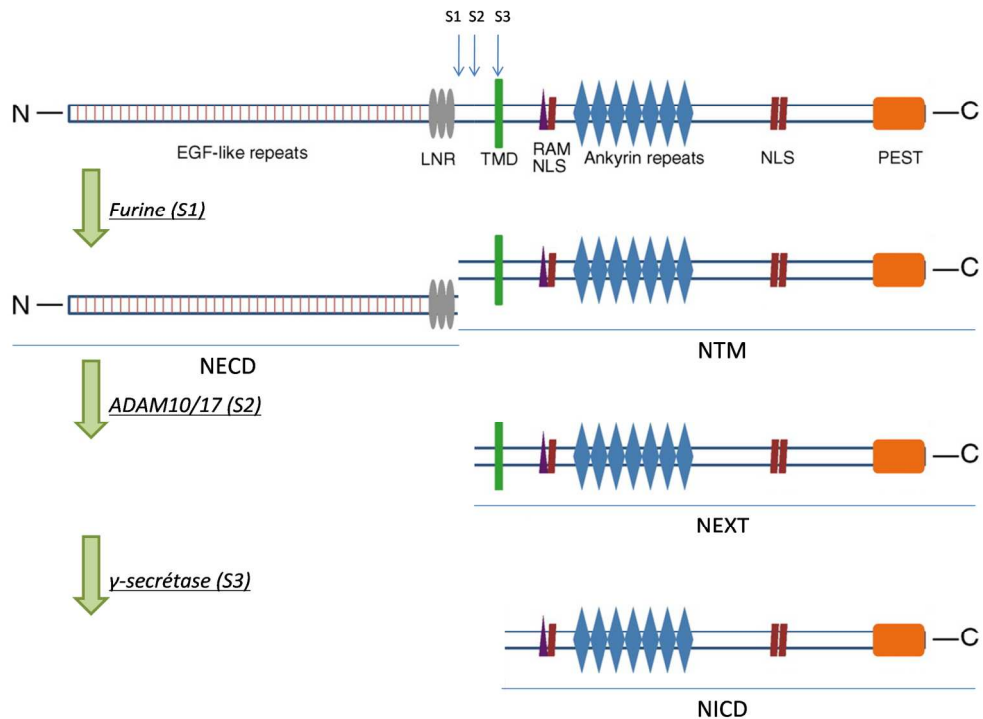
Ainsi, par deux approches différentes, l'une étudiant les conséquences de la surexpression des TspanC8s dans un modèle cellulaire (HeLa) ne les exprimant pas ou peu et l'autre étudiant les conséquences de la diminution de leur expression endogène dans des modèles cellulaires différents (PC3 et HCT116), nous sommes amenés à la même conclusion (confirmée par les études concomitantes de deux autres équipes) qui est que la présence

d'au moins une des TspanC8s parmi Tspan5, 14, 15, 33 est nécessaire à l'expression d'ADAM10 à la membrane plasmique.

### Conséquences de l'expression des TspanC8s sur la voie Notch

Forts de ces observations, nous nous sommes ensuite demandés si ce mécanisme d'adressage particulier d'ADAM10 basé sur l'expression et l'interaction directe avec des protéines membranaires évolutivement proches, pouvait avoir des conséquences vis-à-vis de l'activité de cette enzyme envers certains de ses substrats. En particulier, nous nous sommes intéressés au clivage du récepteur Notch par ADAM10 de par son implication et son importance dans l'embryogénèse et le développement (Artavanis-Tsakonas & Muskavitch, 2010).

Comme nous l'avons abordé auparavant, Notch est un récepteur membranaire dont la fixation du ligand entraîne de manière séquentielle un premier clivage extracellulaire assuré par une activité de type  $\alpha$ -secrétase suivi d'un second clivage intramembranaire assuré par une activité de type  $\gamma$ -secrétase. Ces deux clivages permettent la libération dans le cytoplasme d'un fragment intracellulaire de Notch appelé NICD (**Figure 35 haut**). Ce fragment est capable de transloquer dans le noyau et d'y agir en tant que facteur de transcription (**Figure 35 bas**).



Cellule présentatrice de ligand

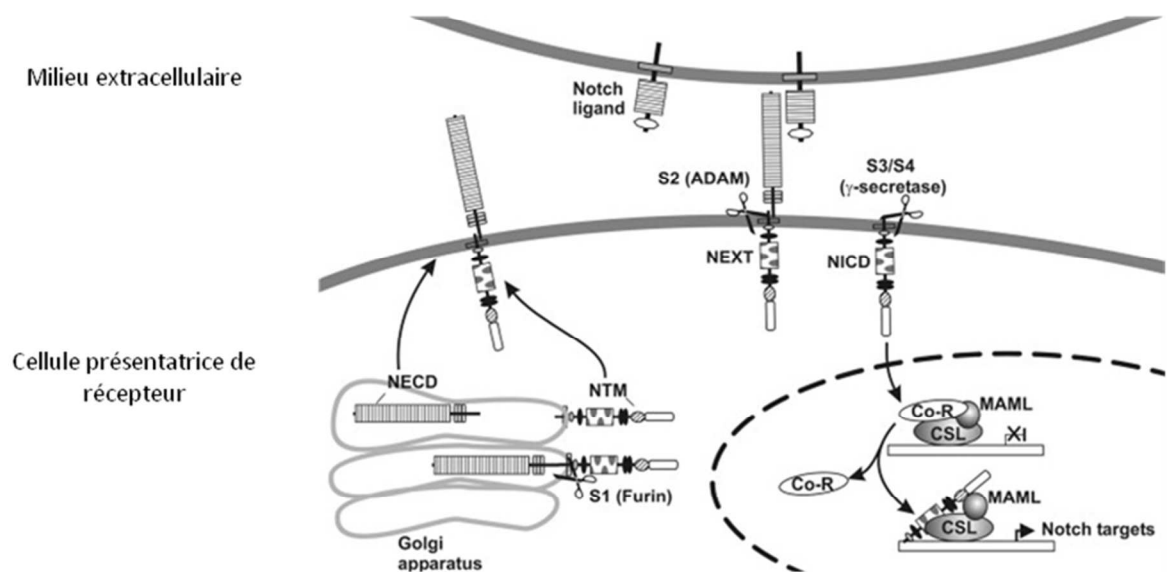
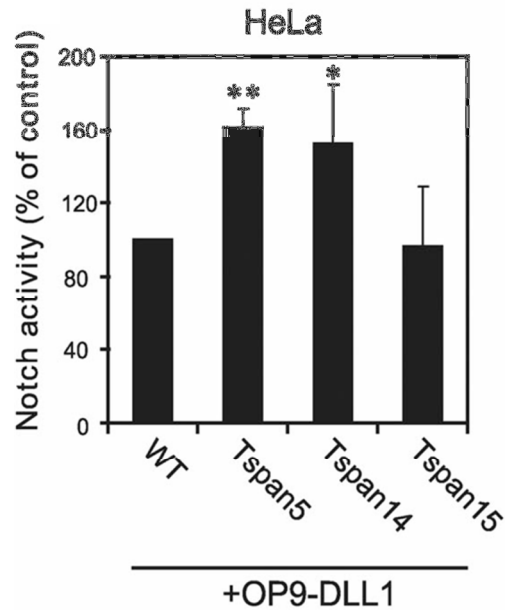


Figure 35 : Représentation schématique de la protéine Notch ainsi que de ses clivages successifs par les différentes activités sécrétases (haut). Représentation schématique de l'activation de Notch après fixation de son ligand (bas). Adapté de (Schwanbeck et al., 2011)

Afin de tester l'effet de l'expression des TspanC8s sur l'activité de Notch, nous avons établi des lignées de cellules HeLa exprimant de manière stable Tspan5, 14 ou 15. Ces cellules ont ensuite été co-transfectées avec un vecteur codant le rapporteur d'activité de Notch, CSL-luciférase. L'activité du rapporteur CSL-luciférase récapitule l'effet modulateur de la transcription exercée par le fragment intracellulaire NICD issu de Notch, sur ses cibles nucléaires. Les cellules ainsi transfectées ont ensuite été co-cultivées avec des cellules souches embryonnaires (ES) murines OP9 exprimant le ligand du récepteur Notch, DLL1.

Lors d'une stimulation par liaison du ligand DLL1 porté par les cellules OP9 du récepteur Notch porté par les cellules HeLa, nous observons une augmentation significative de l'activité promotrice de Notch dans les cellules HeLa exprimant Tspan5 et 14. Une telle augmentation n'est pas observée dans des cellules HeLa exprimant Tspan15 (**Figure 36**). Ceci indique donc que l'expression de Tspan5 ou 14 favorise l'activation du récepteur Notch dans des cellules HeLa. A la lumière des résultats précédemment obtenus, une possible explication serait que ces deux tétraspanines entraînent la relocalisation de la métalloprotéase ADAM10 vers la membrane plasmique où Notch est aussi localisé. Cette relocalisation favoriserait le clivage S2 de Notch lors de son activation en trans par son ligand DLL1. Ce clivage serait donc assuré par l'activité  $\alpha$ -secrétase d'ADAM10. Ce clivage S2 étant un prérequis pour la réalisation du clivage S3 générant le fragment NICD, l'activité du rapporteur CSL-luciférase en serait alors augmentée. A contrario, la surexpression de Tspan15 dans ce même contexte ne semble pas activer cette cascade de clivages. Ainsi, seule l'expression des tétraspanines Tspan5 et 14 issues de la sous-famille TspanC8s aurait un rôle régulateur positif de l'activité Notch en conséquence de la relocalisation d'ADAM10 à la membrane plasmique.



**Figure 36 : L'expression de Tspan5 et Tspan14 augmente l'activation de Notch par son ligand DLL1 dans les cellules HeLa**

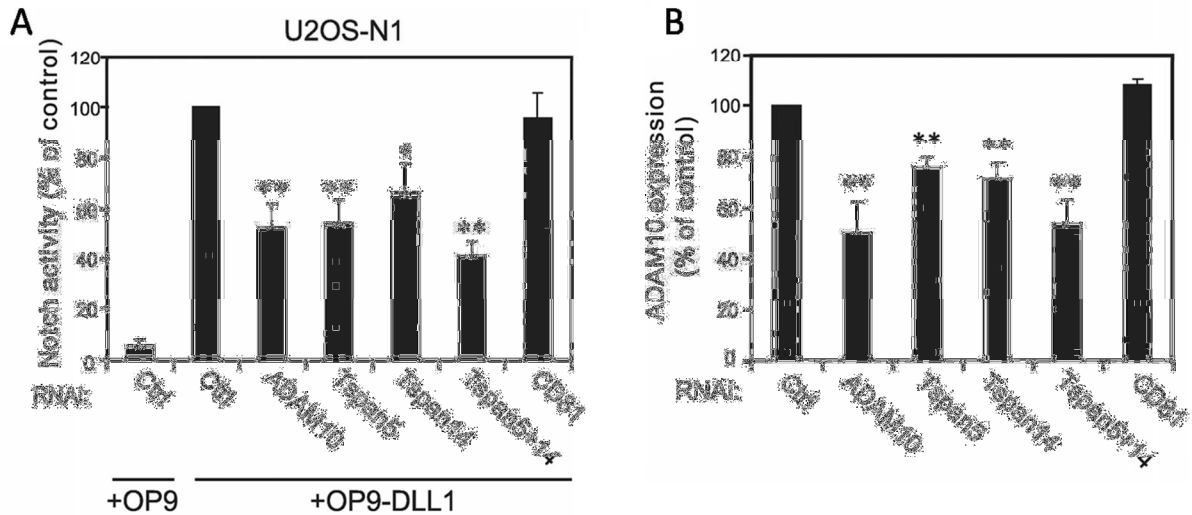
Des cellules HeLa exprimant de manière stable Tspan5, 14 ou 15 et transfectées avec un vecteur codant le rapporteur d'activité Notch, CSL-luciférase, sont activées par incubation avec des cellules OP9 exprimant le ligand de Notch DLL1 (OP9-DLL1). L'activité de Notch est déterminée par mesure de l'activité luciférase vis-à-vis d'un substrat luminescent, luciférine. Représentation de quatre expériences indépendantes en duplicates.

Afin de confirmer ou non nos interprétations dans un autre modèle cellulaire sans modifier le taux d'expression endogène des TspanC8s, nous avons utilisé un modèle de stimulation de clivage ADAM10-dépendant de la protéine Notch précédemment développé par l'équipe de C. Brou à l'institut Pasteur, Paris. En effet, il s'avère que l'expression endogène de Notch dans les cellules HeLa est assez faible en terme de quantité de transcrits et que le transcrit majoritaire de la famille Notch (Notch 1-4) est Notch2 (non montré). Un modèle de cellules surexprimant Notch a donc été utilisé. Brièvement, des cellules d'ostéosarcomes U2OS transduites avec un vecteur codant la protéine Notch1 humaine et exprimant de manière stable le récepteur Notch1 après sélection, sont transitoirement co-transfectées avec le vecteur contenant le gène rapporteur d'activité de Notch CSL-luciférase puis mises en co-culture avec des cellules souches embryonnaires (ES) murines OP9 exprimant ou non le ligand DLL1. Comme le montrent les résultats de la **figure 37**, la

coculture de cellules U2OS-N1 avec des cellules OP9-DLL1 conduit à une forte augmentation de l'activité de Notch1 comparé à la coculture en présence de cellules OP9 contrôles. Une interférence ARN dirigée contre ADAM10 entraîne une forte diminution de l'activité de Notch montrant ainsi que cette activation est régulée par cette protéase. Les U2OS ont de plus la particularité d'exprimer quasi exclusivement les Tspan5 et 14. Une interférence ARN dirigée contre ces deux tétraspanines aboutit à une réduction de 60% de l'activité luciférase **(Figure 37A)** ainsi que du niveau d'expression membranaire d'ADAM10 **(Figure 37B)**. Cependant, on peut se demander si une diminution plus drastique de l'expression d'ADAM10 (i.e. une interférence ARN plus efficace), ou un traitement chimique inhibant spécifiquement l'activité d'ADAM10, entrainerait une activité de Notch nulle ou proche de la condition où les cellules U2OS-N1 ne sont pas stimulées. En effet, il a été documenté que la métalloprotéase ADAM17 peut également agir en tant qu' $\alpha$ -secrétase vis-à-vis de Notch. (Parr-Sturgess et al., 2010) bien que cela soit remis en cause (Groot et al., 2013) Il se peut dans ce cas que l'activité Notch résiduelle mesurée après stimulation dans un contexte où la traduction du gène codant ADAM10 est inhibée, soit due à une activité  $\alpha$ -secrétase imputable à ADAM17 (ou une autre métalloprotéase non encore identifiée).

Ainsi, les résultats obtenus concernant la régulation de l'activation de Notch dans ce modèle de cellules U2OS-N1 sont tout à fait interprétables dans le cadre de notre hypothèse : l'interférence ARN conduisant à la baisse d'expression des Tspan5 et/ou 14 endogènes conduit à une diminution de l'expression d'ADAM10 à la surface des cellules et une inhibition de la réponse de Notch lors de son activation par DLL1.





**Figure 37 : L'inhibition de l'expression de Tspan5 et Tspan14 entraîne une diminution de l'activité Notch**

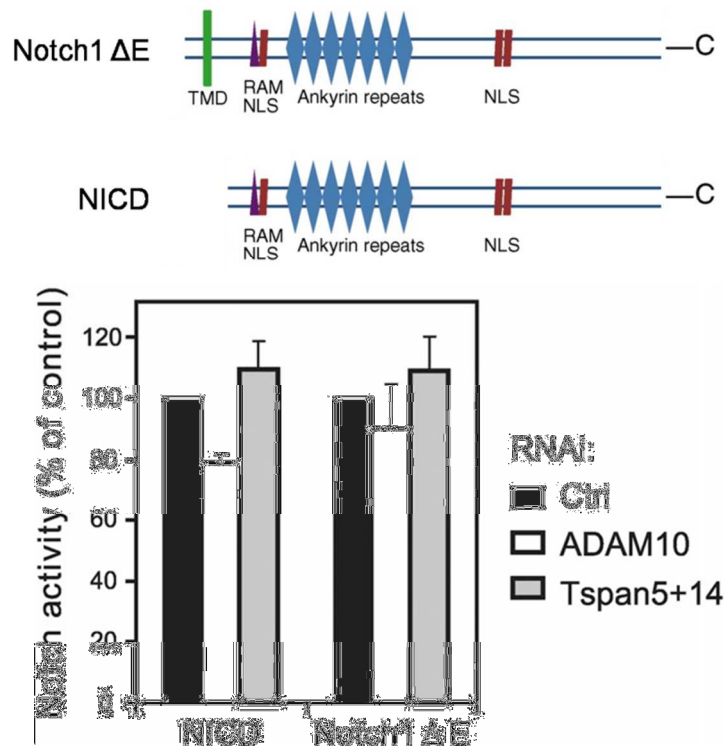
Des cellules U2OS exprimant de manière stable le récepteur Notch1 (U2OS-N1) subissent une interférence ARN dirigée contre ADAM10, Tspan5 et/ou 14, CD81.

A. Les U2OS N1 sont activées par incubation avec des cellules OP9 exprimant le ligand de Notch, DLL1 et l'activité de Notch est déterminée par mesure de l'activité luciférase vis-à-vis d'un substrat luminescent, luciférine. Représentation de trois expériences indépendantes en duplicates.

B. On mesure l'expression de surface de la protéase ADAM10 dans les U2OS non stimulées par cytométrie en flux. Représentation de trois expériences indépendantes.

Le test utilisé lors de nos expériences consiste donc en une mesure de la production du fragment NICD en conséquence de l'activation de Notch par fixation de son ligand DLL1. Cette étape dite « clivage S3 » est régulée par une protéase de type  $\gamma$ -secrétase. En amont de ce clivage S3, ADAM10, en tant qu' $\alpha$ -secrétase, est supposée assurer une étape limitante préalable de clivage du domaine extracellulaire dit « clivage S2 », libérant l'ectodomaine et permettant la production du fragment NEXT, substrat de la  $\gamma$ -secrétase. Rien n'exclut donc que les effets observés jusqu'ici de la manipulation des différentes TspanC8s sur le trafic d'ADAM10 soit seuls et uniques responsables de la régulation de la voie Notch. Une contribution dans la régulation du clivage S3 et donc de l'étape spécifique assurée par la  $\gamma$ -secrétase a été étudiée.

Pour cela, nous avons transfecté transitoirement des cellules U2OS-N1 avec des vecteurs codant soit pour une protéine substrat de la  $\gamma$ -secrétase (Notch1  $\Delta E$ ) et non de l' $\alpha$ -secrétase, soit pour une protéine produit de l'activité  $\gamma$ -secrétase (NICD). La première construction Notch1  $\Delta E$  code une protéine Notch1 possédant un domaine extracellulaire tronqué, le domaine transmembranaire et le domaine intracellulaire (sans PEST) de Notch1. De par son architecture, cette protéine a une « activité Notch » indépendante d'ADAM10 ou d'une autre  $\alpha$ -secrétase mais dépendante de la  $\gamma$ -secrétase. La seconde de ces constructions, nommée « NICD », correspond au domaine intracellulaire de Notch1 (**Figure 38 haut**). L'activité de cette construction est indépendante du clivage S2 induit par ADAM10 ainsi que du clivage S3 induit par l'activité  $\gamma$ -secrétase. Dans les deux cas, ces constructions sont dépourvues du domaine PEST intracellulaire (séquence riche en Proline-Glutamate-Serine-Threonine responsable de la dégradation par ubiquitination de Notch). Nous avons mis en évidence dans la **figure 38** que la diminution d'expression des deux TspanC8s Tspan5 et 14 consécutivement à une interférence ARN, n'avait pas d'effet inhibiteur sur l'activité promotrice de ces deux constructions lorsque celles-ci sont transfectées dans les cellules U2OS. Par conséquent, on peut dire que l'effet modulateur de l'activité Notch par Tspan5 et 14 ne se situe pas au niveau du clivage S3 par le complexe  $\gamma$ -secrétase. Le rôle régulateur de ces TspanC8s se déroule donc en amont de cette étape  $\gamma$ -secrétase, ce qui est compatible avec un rôle d'ADAM10 dans le clivage S2 de Notch après fixation de ligands.



**Figure 38 : La modulation de l'activité Notch exercée par Tspan5 et 14 n'a pas lieu au niveau du clivage S3 par le complexe  $\gamma$ -secrétase**

Des cellules U2OS-N1 sont transfectées avec des vecteurs codant les constructions NICD et Notch1  $\Delta$ E (représentées schématiquement en haut) et subissent une interférence ARN dirigée contre ADAM10 ou Tspan5 et Tspan14. L'activité de Notch est mesurée comme précédemment décrit. Représentation de trois expériences indépendantes en duplicate.

Une étude menée en Allemagne dans le laboratoire de P. Saftig révèle une interaction similaire entre Tspan15 et ADAM10 et montre une modulation du clivage d'autres cibles d'ADAM10 que sont N-cadhérine et APP (Prox et al., 2012) par la surexpression de Tspan15. Ce résultat pourrait ajouter alors un niveau de complexité supérieur concernant l'interaction entre tétraspanines et ADAM10. Ainsi donc, il serait possible que certaines tétraspanines non seulement entraînent un adressage d'ADAM10 à la membrane plasmique mais également que la présence d'une ou la combinaison de plusieurs tétraspanines puisse induire le clivage préférentiel d'un substrat. Ainsi l'expression de Tspan15 comme Tspan5 et 14 favoriserait l'expression d'ADAM10 à la membrane plasmique

permettant ainsi le clivage d'APP et N-cadhérine par ADAM10. Par contre, elle ne serait pas suffisante pour permettre la signalisation Notch en absence de Tspan5 et/ou Tspan14.

Cette interaction privilégiée entre la famille des TspanC8s et ADAM10, sa conséquence sur l'expression d'ADAM10 à la surface des cellules et la régulation de la signalisation Notch n'est pas limitée aux trois modèles de cellules humaines cancéreuses que nous avons étudiées (HeLa, PC3, HCT 116). En effet, à l'occasion d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Schweisguth, Institut Pasteur, Paris, nous avons pu montrer une conservation de ce mécanisme de régulation d'ADAM10 par des tétraspanines de la sous-famille TspanC8 chez *Drosophila melanogaster* et que, chez cet organisme modèle, il existe 3 orthologues de Tspan5 appelés Tsp3A, Tsp86D et Tsp26A. Nous avons montré que la localisation à la membrane plasmique de l'orthologue d'ADAM10 chez la mouche (Kuzbanian) était elle aussi régulée par l'expression de Tsp86D et Tsp3A *in vitro* et *in vivo* dans des ovocytes de drosophile. De plus, nous avons mis en évidence que l'expression de ces gènes était nécessaire à la mise en place des soies thoraciques (micro et macrochaetes), un processus développemental hautement contrôlé par l'activité de la voie Notch (Hartenstein et Posakony, 1990). En particulier, la perte d'expression d'un ou plusieurs de ces tétraspanines entraîne une quasi-absence de soies thoraciques, ce qui est signe d'une activité de Notch très amoindrie. N'ayant pas personnellement réalisé d'expérience dans cette partie de travail, je ne décrirais pas plus avant les résultats obtenus qui ont été publiés en 2012 dans *Journal of Cell Biology* « TspanC8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals – Dornier E, Coumailleau F, Ottavi JF, Moretti J, Boucheix C, Mauduit P, Schweisguth F, Rubinstein E » **(Voir en Annexe)**.

Nous avons donc montré dans cette partie de l'étude que la majorité des tétraspanines appartenant à la sous-famille des TspanC8s interagissaient avec la métalloprotéase ADAM10 et régulaient sa sortie du réticulum endoplasmique. Parmi les TspanC8s, Tspan5, 14, 15 et 33 régulent l'expression d'ADAM10 à la surface des cellules. Enfin, les tétraspanines Tspan5 et 14 régulent positivement l'activité du récepteur Notch1 après fixation de son ligand DLL1. Cette activité nécessite l'activité d'une  $\alpha$ -secrétase qui pourrait être ADAM10 ainsi que d'une  $\gamma$ -secrétase dont l'activité enzymatique vis-à-vis du

fragment NEXT issu de Notch n'est pas affectée par l'expression de ces deux tétraspanines (Dornier, Ottavi, Coumilleau et al., 2012).

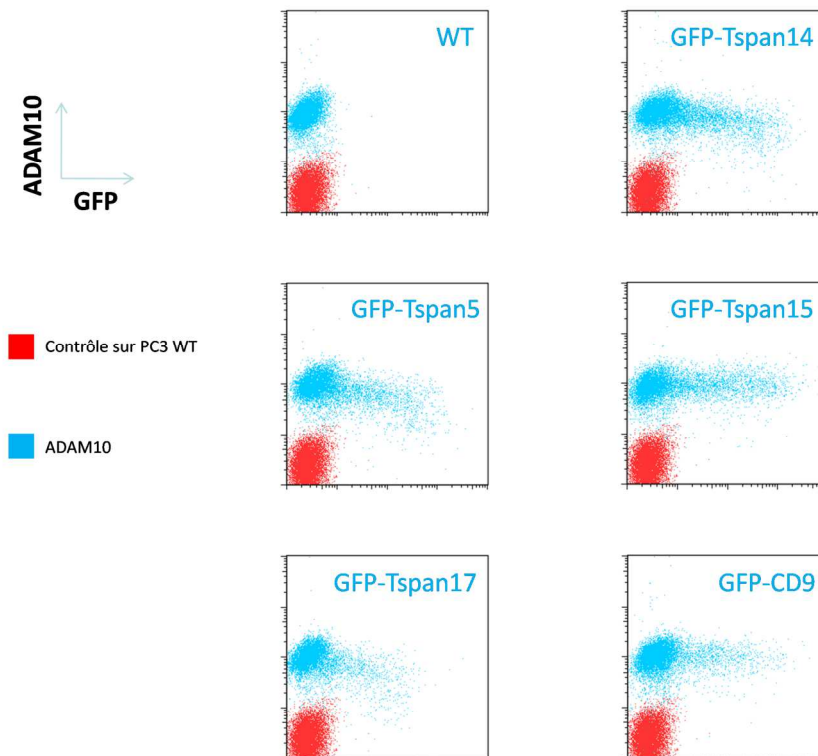
## Etude de l'interaction entre la tétraspanine Tspan5 et la métalloprotéase ADAM10 dans les cellules PC3

Nous avons montré grâce au modèle de cellules HeLa exprimant faiblement les TspanC8s que l'expression de certaines d'entre elles pouvait induire une relocalisation de la protéase ADAM10 du réticulum endoplasmique vers la surface. De plus, en utilisant deux modèles cellulaires exprimant les TspanC8s ainsi qu'ADAM10 (HCT116 et PC3), nous avons montré que l'inhibition de la traduction de la TspanC8 majoritaire de chacune de ces cellules entraînait au contraire une relocalisation d'ADAM10 de la surface cellulaire vers le réticulum. Les données obtenues avec une TspanC8 comme Tspan15 par (Prox et al., 2012) ainsi que nos propres résultats, suggèrent que ces tétraspanines, de par leur capacité à compartimenter la membrane pourraient moduler non seulement l'expression d'ADAM10 à la surface cellulaire mais aussi sa capacité à « rencontrer » ses substrats. La balance entre les niveaux d'expression de différentes TspanC8 pourrait alors être un des paramètres critiques de la capacité d'ADAM10 à interagir et à cliver ses substrats. Dans ce contexte, nous avons voulu savoir ensuite quelle serait la conséquence d'une surexpression de TspanC8s dans un modèle en exprimant déjà de manière endogène. A ce titre, les cellules PC3 constituaient un modèle cellulaire déjà étudié, manipulé et validé au laboratoire au contraire par exemple des cellules HCT116 qui n'étaient utilisées que très ponctuellement. De plus, nous avons vu dans la première partie de ce travail sur les cellules PC3, que l'engagement de tétraspanines telles que CD9 et CD81 (qui ne font pas partie de la sous-famille des TspanC8 et n'affectent pas le trafic d'ADAM10) par des anticorps monoclonaux, conduit à un clivage juxtamembranaire de l'E-cadhérine dépendant d'ADAM10, confirmant ainsi un travail précédent réalisé par Cécile Arduise (Arduise et al., 2008) dans notre laboratoire.

### Effets de la surexpression de TspanC8s sur l'expression d'ADAM10 dans les cellules PC3.

Comme nous l'avons montré précédemment (**cf. Figure 26**), la transfection transitoire des TspanC8s étiquetées avec la GFP dans les cellules PC3 nous a permis d'identifier ADAM10 comme étant un de leurs partenaires primaires communs. De manière

analogue aux expériences précédemment réalisées sur les cellules HeLa (**cf. Figure 31**), nous avons dans un premier temps, transfecté transitoirement des cellules PC3 avec les plasmides codant les différentes TspanC8s étiquetées avec la GFP et observé l'expression membranaire d'ADAM10 en fonction de leur surexpression par cytométrie en flux et représentation biparamétrique (**Figure 39**).



**Figure 39 : La surexpression transitoire des TspanC8s Tspan5 et 17 dans les cellules PC3 induit une diminution de la quantité d'ADAM10 détectable à la surface**

Les cellules PC3 WT sont transfectées avec des plasmides codant pour différentes TspanC8s ou pour la tétraspanine CD9 couplées à la GFP. 48 heures après la transfection, les cellules sont décollées à la trypsine et sont marquées avec un anticorps dirigé contre ADAM10 et analysées par cytométrie en flux et représentation biparamétrique

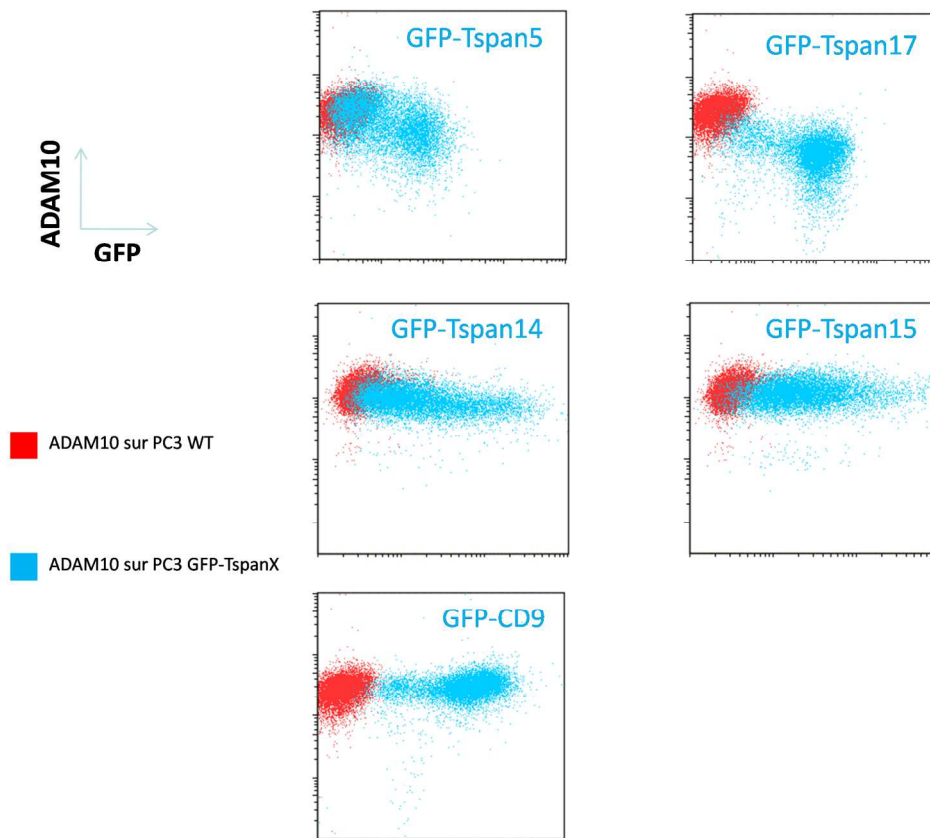
Il apparaît clairement ici que contrairement à ce que nous avons pu observer avec les cellules HeLa (**cf. Figure 31**), les tétraspanines Tspan5 et Tspan17 (les plus fortement apparentées) (**Figure 39 gauche**) induisent non pas une augmentation mais une diminution de l'expression de surface d'ADAM10. Les autres TspanC8s ainsi que la tétraspanine

canonique CD9 (**Figure 39 droite**) n'ont que très peu (Tspan14) ou pas d'effet. Cependant, nous nous sommes interrogés sur le fait de savoir si cet effet était bien spécifique ou s'il n'était que la conséquence de l'expression transitoire, massive et « toxique » de protéines membranaires affectant le trafic et la sortie du réticulum endoplasmique par saturation des systèmes de transport. Afin de tenter de s'affranchir de ce biais potentiel, nous avons eu recours à l'établissement de lignées stables de cellules PC3 exprimant certaines TspanC8s et avons réalisé la même expérience de cytométrie biparamétrique que précédemment.

### **Génération de lignées PC3 surexprimant différentes TspanC8 de manière stable et interaction avec ADAM10**

Comme le montrent les résultats rapportés sur la **figure 40**, il ressort que cette analyse sur différentes lignées de cellules PC3 exprimant de manière stable les TspanC8s telles Tspan5, Tspan14, Tspan15 ou Tspan17 ainsi que la tétraspanine CD9 étiquetées GFP confirme les résultats précédents. Ainsi, la surexpression des Tspan5 et 17 entraîne bien une diminution (de l'ordre de 50%) de la quantité d'ADAM10 à la surface des cellules (au contraire des autres TspanC8s) et cette caractéristique ne dépend pas d'un éventuel encombrement de la machinerie de trafic entre les différents organites mise en jeu lors de la synthèse et de l'adressage des protéines puisque la surexpression des différentes TspanC8s testées est ici « stabilisée ». Un effet sur le trafic intracellulaire est ainsi difficile à réconcilier avec le fait que les autres GFP-Tspans qui empruntent au moins initialement les mêmes voies, soient sans effet.





**Figure 40 : La surexpression stable des TspanC8s Tspan5 et 17 dans les cellules PC3 induit une diminution de la quantité d'ADAM10 détectable à la surface.**

Les cellules PC3 WT sont transfectées avec des plasmides codant des TspanC8s ou CD9 couplées à la GFP puis sélectionnées par l'antibiotique G418 et triées selon leur fluorescence GFP la plus élevée. Les cellules sont ensuite décollées à la trypsine et sont marquées avec un anticorps dirigé contre ADAM10 et analysées par cytométrie en flux et représentation biparamétrique.

Nous avons identifié précédemment Tspan5 comme étant le membre de la famille des TspanC8s capable de précipiter ADAM10 de la manière la plus efficace lorsqu'il était transfecté de manière transitoire dans les cellules PC3 (**cf. Figure 26**). Il s'avère que Tspan5 est une protéine extrêmement conservée parmi les mammifères et de manière plus générale chez les métazoaires (**Figure 41**). Il est donc plus que probable vu la pression de sélection que cette protéine ait un rôle important dans ces organismes.

A

	Homme	Chimpanzé	Souris	Rat	Chien	Bœuf	Tortue	Xénope	Danio
Homme	0/0								
Chimpanzé	0/1	0/0							
Souris	0/53	0/53	0/0						
Rat	0/58	0/58	0/23	0/0					
Chien	1/35	1/34	1/47	1/55	0/0				
Bœuf	1/43	1/43	1/57	1/61	0/34	0/0			
Tortue	1/93	1/98	1/109	1/107	0/93	0/100	0/0		
Xénope	9/136	9/136	9/132	9/135	10/140	10/137	11/150	0/0	
Danio	17/167	17/167	17/168	17/164	16/166	16/164	16/176	14/183	0/0

B

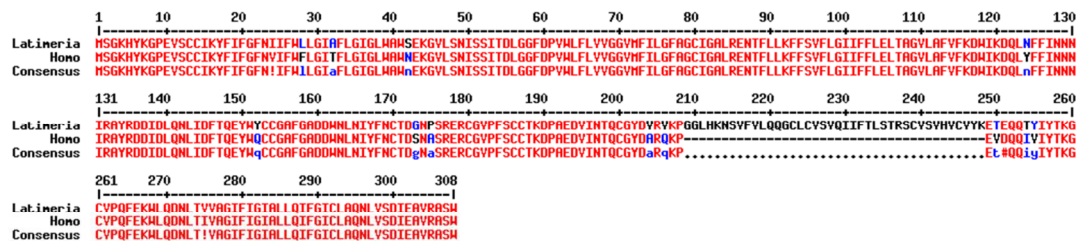


Figure 41 : Conservation de la tétraspanine Tspan5

A. Comparaison de séquences protéiques d'orthologues de Tspan5. Pour chaque couple, le nombre de différences en acides aminés est représenté en noir et en rouge pour les bases de la séquence codante

B. Exemple de comparaison de séquences protéiques de Tspan5 chez le Coelacanthe - séquencé dans (Amemiya et al., 2013)- et l'Homme (11 acides aminés substitués et insertion possible mais sujette à caution de 40 acides aminés dans la région de la boucle EC2)

Ainsi, l'extrême conservation de cette protéine (pas de différence entre les séquences humaine et murine et seulement une avec celle chez la tortue par exemple) peut aisément expliquer qu'aucun anticorps n'ait pu être produit jusqu'à présent, en particulier chez la souris. Cette absence de mutation n'est pas la conséquence d'une séquence nucléotidique invariante puisque la comparaison Homme/Souris montre 53 différences à ce niveau. Il est donc très probable que cette extrême conservation au niveau protéique soit le reflet d'un rôle conservé et important chez tous ces organismes. La duplication de gène ayant permis l'émergence de l'ensemble des tétraspanines de la sous-famille TspanC8

conduit à des variations de séquences protéiques beaucoup plus importantes pour chacune des TspanC8 « filles » entre ces différents organismes (non montré).

Compte tenu de cet ensemble d'informations, nous avons donc décidé de poursuivre notre étude en nous concentrant spécifiquement sur le rôle possible de l'interaction entre cette tétraspanine et ADAM10 dans le contexte de la régulation fonctionnelle de cette enzyme.

Pour cela, nous avons utilisé quasi-exclusivement des cellules PC3 présentant une expression stable des protéines de fusion GFP-Tspan5 ou GFP-CD9. Brièvement, des cellules PC3 ont été électroporées avec des plasmides codant la protéine de fusion GFP-Tspan5 ainsi qu'un gène de résistance à la néomycine. Après sélection par cet antibiotique durant un mois les cellules sont triées sur le critère de leur fluorescence GFP. Les cellules ayant la plus forte expression de GFP devraient a priori être celles présentant la plus forte expression de la protéine de fusion totale ; elles sont donc conservées et mises en culture.

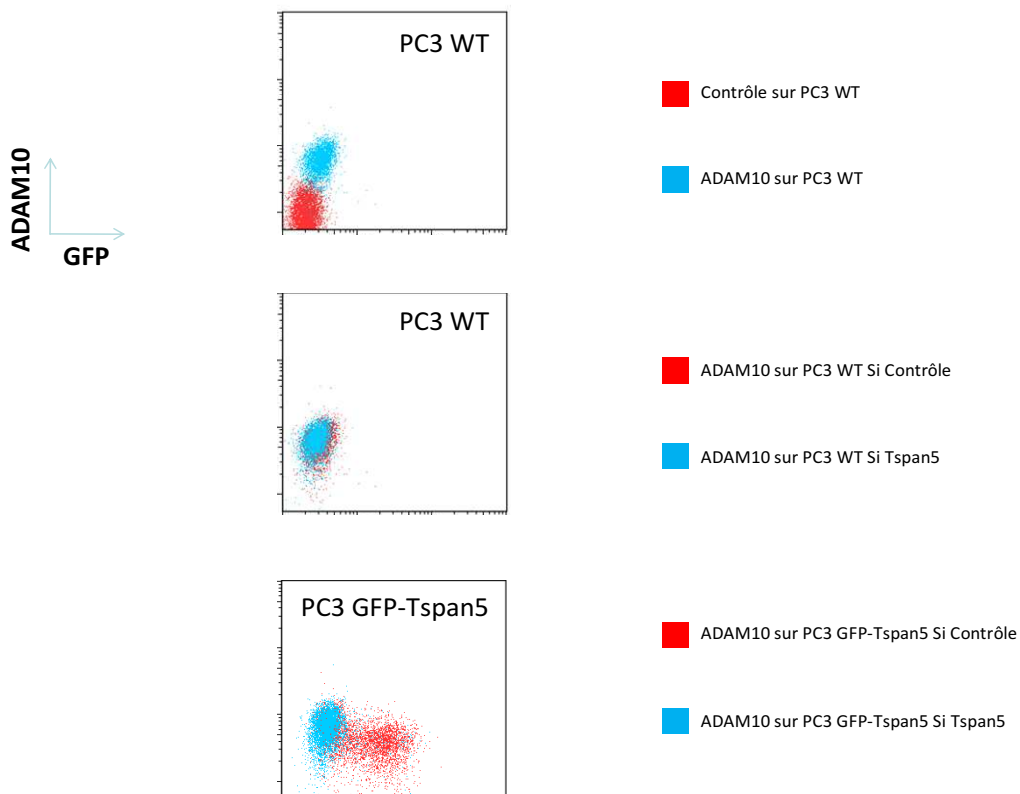
Il convient ici d'expliquer brièvement les raisons de la stratégie consistant à générer des lignées PC3 présentant une expression stable de la protéine de fusion GFP-Tspan5. Comme je l'ai écrit précédemment, l'extrême conservation de cette protéine n'a pas permis, jusqu'à présent, de générer des anticorps spécifiques. Le seul moyen adéquat de suivre l'expression qualitative et quantitative de Tspan5 était donc d'exprimer cette protéine en l'associant au sein d'une construction de fusion avec l'étiquette fluorescente GFP. Cette GFP est en effet détectable aussi bien directement en raison de sa fluorescence intrinsèque qu'indirectement grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques permettant son immunoprécipitation ou son identification par Western-blot.

### *Diminution d'ADAM10 membranaire*

#### Spécificité de l'effet de Tspan5 sur l'expression d'ADAM10.

Afin de vérifier que la diminution d'expression d'ADAM10 à la surface cellulaire après surexpression de GFP-Tspan5 n'était pas artéfactuelle et la conséquence de la sélection

d'une sous-population particulière de cellules postérieurement au tri, nous avons réalisé une interférence ARN dirigée contre Tspan5. Les cellules ayant subi cette interférence ont ensuite été analysées par cytométrie en flux dans le but d'y quantifier ADAM10 à leur surface. Comme on peut le voir sur la **figure 42**, l'interférence ARN de Tspan5 est sans effet sur l'expression d'ADAM10 dans les cellules PC3 WT (**Figure 42 milieu**). Par contre, cette interférence ARN dans les PC3 GFP-Tspan5 conduit à une suppression quasi-totale de l'expression du transgène GFP-Tspan5 et une ré-expression d'ADAM10 à la surface cellulaire (**Figure 42 bas**). Il apparaît donc clairement que l'effet inhibiteur de l'expression membranaire d'ADAM10 observé dans les cellules PC3-GFP-Tspan5 est parfaitement réversible. Cette réversibilité indique que cet effet n'est pas dû par exemple à un effet d'insertion du transgène dans une région de l'ADN nucléaire particulière entraînant *in fine* une diminution de l'expression d'ADAM10 qui ne serait pas liée à l'expression/surexpression de la tétraspanine.

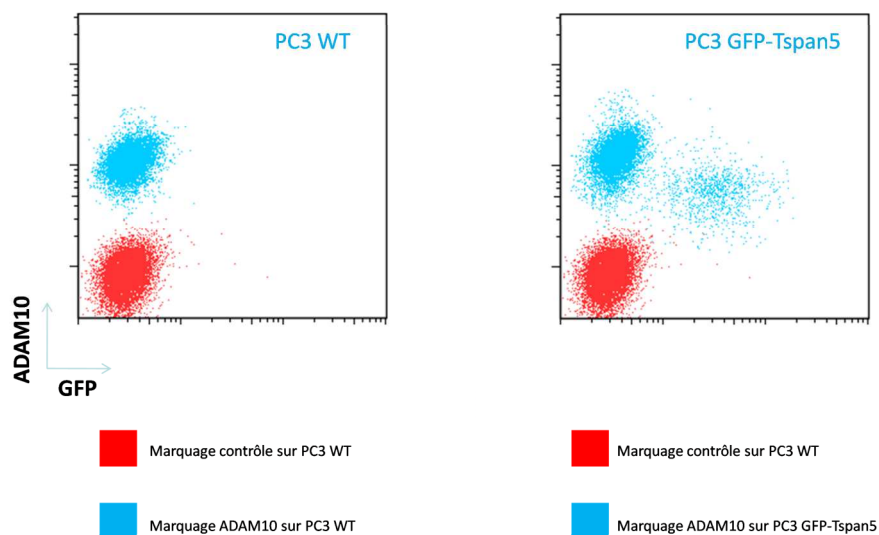


**Figure 42 : La diminution de la quantité d'ADAM10 à la surface dans des cellules PC3 surexprimant Tspan5 est réversible**

Les cellules PC3 WT et PC3 exprimant de manière stable le transgène codant Tspan5 couplée à une étiquette GFP à son extrémité NH2 (GFP-Tspan5) subissent une interférence ARN contrôle (Si Ctrl) ou dirigée contre Tspan5 (Si TSPAN5) pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite décollées à la trypsine et sont marquées avec un anticorps dirigé contre ADAM10 et analysées par cytométrie en flux en représentation biparamétrique

L'utilisation d'un seul anticorps monoclonal dirigé contre ADAM10 soulevait la question de savoir si la diminution de la quantité d'ADAM10 membranaire selon le degré de surexpression de GFP-Tspan5 pouvait être due non pas à une diminution réelle de son expression mais à une interférence au niveau de sa détection comme un hypothétique masquage progressif par Tspan5 de l'épitope d'ADAM10 reconnu par l'anticorps monoclonal 11G2. Afin de s'affranchir de ce doute, nous avons effectué une expérience de cytométrie en flux en marquant des cellules surexprimant ou non GFP-Tspan5 par un autre anticorps dirigé contre « l'ectodomaine d'ADAM10 » (mab1427, R&D) (**Figure 43**). Les résultats sont rigoureusement semblables à ceux obtenus avec l'anticorps monoclonal dirigé contre

ADAM10 produit au laboratoire (anticorps 11G2) et montrent donc qu'il est assez improbable, sans pouvoir l'exclure dans ce type d'expérience, que la diminution de la quantité d'ADAM10 membranaire détectable soit due à une altération de la reconnaissance de l'épitope reconnu par les deux anticorps anti-ADAM10. En accord avec l'interprétation de ces résultats par une baisse réelle de l'expression d'ADAM10, une analyse par Western blot montre que c'est la quantité totale d'ADAM10 dans les cellules PC3 et pas seulement le « pool » détectable à la surface qui est très significativement diminué (voir plus loin **Figure 53**).

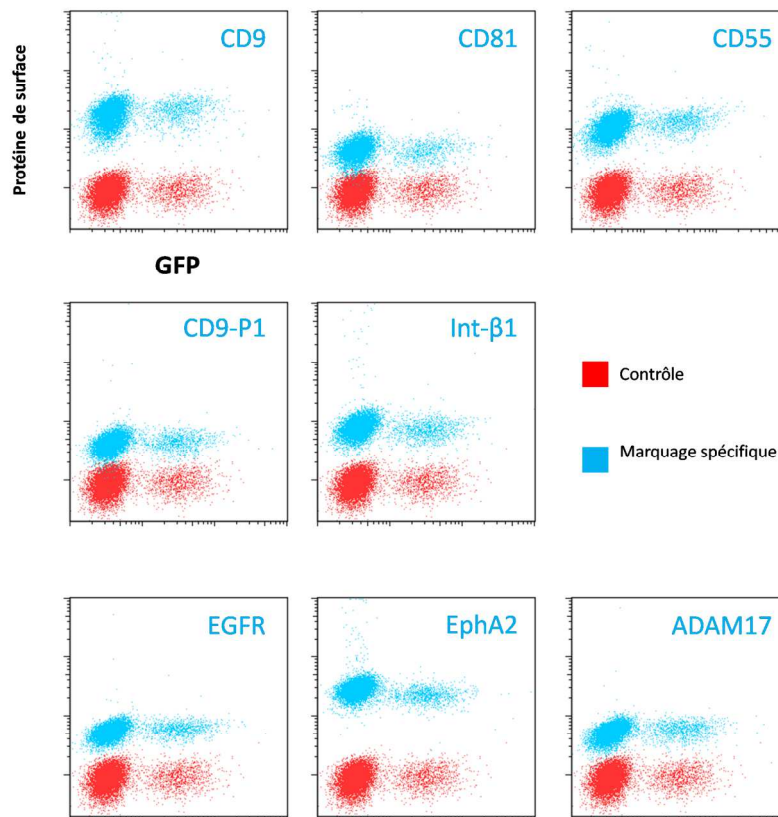


**Figure 43 : La détection de la diminution d'ADAM10 à la surface n'est pas épitope-dépendante**

Les cellules PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5 sont décollées à la trypsine et marquées avec un anticorps dirigé contre « l'ectodomaine d'ADAM10 » distinct de celui utilisé en routine et analysées en cytométrie en flux et représentation biparamétrique.

Enfin, ayant jusqu'ici concentré notre attention sur les TspanC8s et la métalloprotéase ADAM10, il convenait de vérifier si la surexpression de Tspan5 entraînait une diminution globale de l'expression des protéines de surface ou si ce phénomène était spécifique du partenaire direct identifié de Tspan5, ADAM10. Pour cela, nous avons testé par

cytométrie en flux, l'expression membranaire de différentes protéines à la surface des cellules PC3 GFP-Tspan5 (**Figure 44**). Il s'avère que parmi les protéines testées, regroupant des tétraspanines (CD9 et CD81), des partenaires de tétraspanines (CD9-P1 et Int- $\beta$ 1), une protéine membranaire retrouvée dans les rafts (CD55), l'ADAM la plus proche d'ADAM10, ADAM17 ainsi que des récepteurs comme EphA2 et l'EGFR (l'appartenance de ce dernier au réseau de tétraspanine est possible puisqu'il a été montré coimmunoprécipité avec CD82 en tampon de lyse contenant le détergent Brij98 (Odintsova et al., 2000)-. Les résultats rapportés sur la **figure 44**, indiquent clairement qu'aucune de ces protéines membranaires ne voit son expression à la surface des cellules altérée. Ainsi, parmi l'ensemble des protéines de surface testées seule l'expression membranaire d'ADAM10 est notablement altérée par une surexpression de GFP-Tspan5.



**Figure 44 : La surexpression de Tspan5 n'affecte pas l'expression membranaire d'autres protéines de surface.**

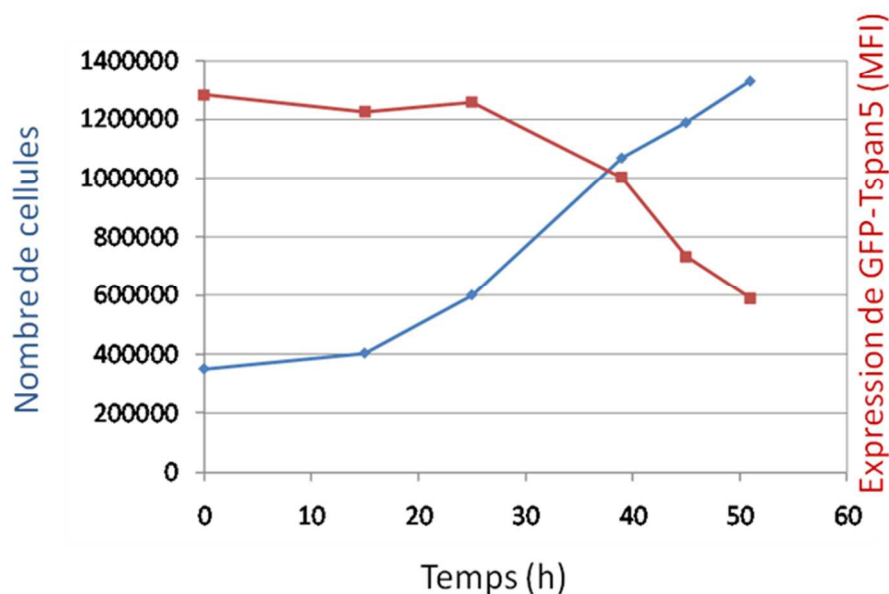
Les cellules PC3 GFP-Tspan5 sont décollées à la trypsine et marquées avec des anticorps dirigés contre des tétraspanines (CD9, CD81), des partenaires de tétraspanines (CD9-P1, Intégrine  $\beta$ 1), une protéine de raft (CD55), d'autres protéines de surface (EGFR, EphA2,

ADAM17). Les cellules sont analysées par cytométrie en flux et représentation biparamétrique

## Stabilité d'expression du transgène GFP-Tspan5

### Perte d'expression de Tspan5

Nous nous sommes rapidement aperçus que le transgène codant GFP-Tspan5 supposément stabilisé au sein des cellules PC3 semblait avoir une expression instable et conduisant à une perte presque totale d'expression au fil du temps.. Plus le nombre de repiquages était important, moins il y avait de cellules exprimant la GFP comme nous le contrôlions par cytométrie en flux. De plus, les cellules exprimant toujours la GFP après une douzaine de passages ne l'exprimaient plus avec une intensité aussi forte que lors des premiers passages en culture (non montré). Une partie de ce phénomène semble être lié à l'état de confluence des cellules puisque la diminution de l'expression de GFP-Tspan5 est corrélée avec l'augmentation du nombre de cellules (donc à leur densité) (**Figure 45**).

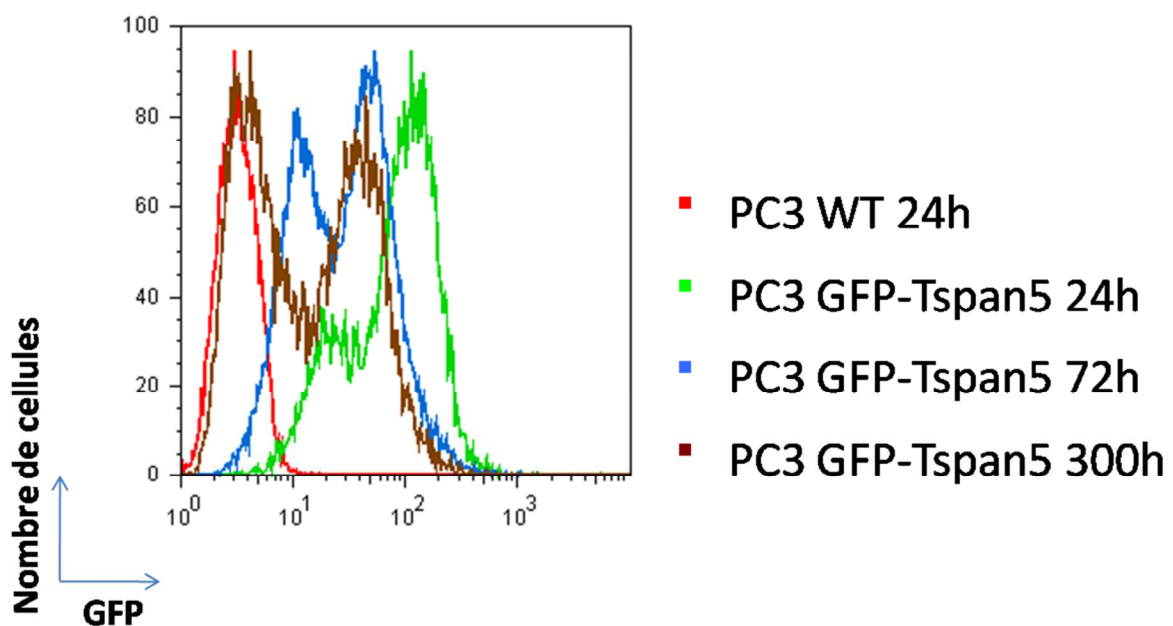


**Figure 45** : L'expression du transgène GFP-Tspan5 décroît lorsque la confluence cellulaire augmente.



Les cellules PC3 GFP-Tspan5 croissent en milieu complet et on contrôle leur croissance par comptage des cellules ainsi que l'expression du transgène GFP-Tspan5 en cytométrie en flux au cours du temps.

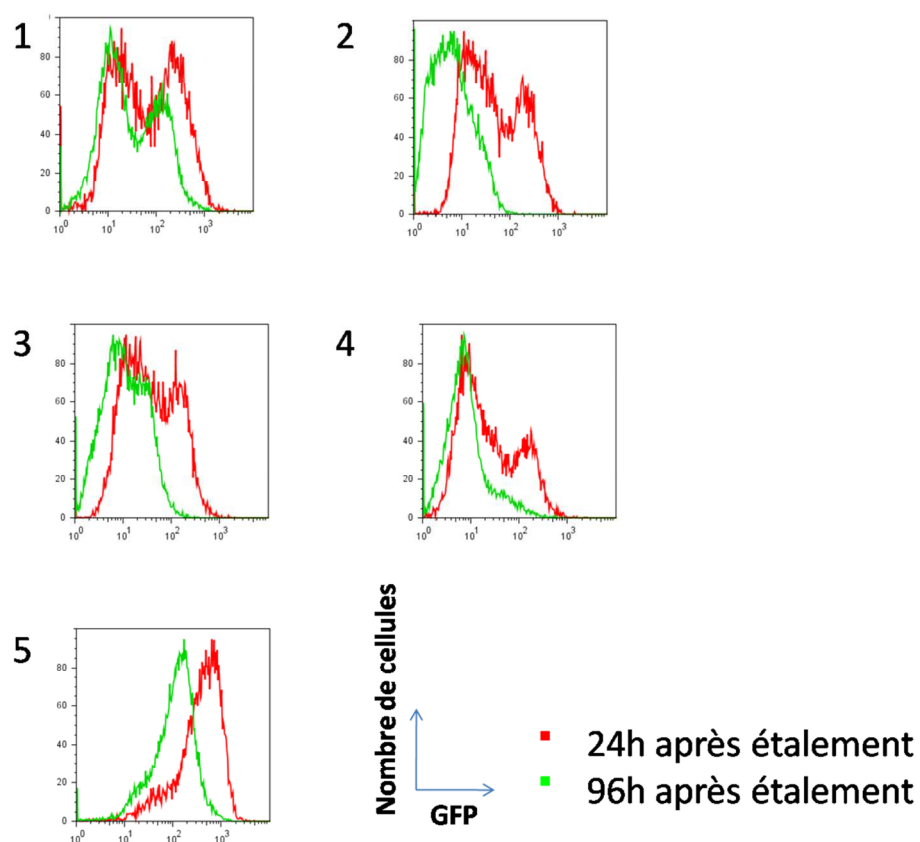
En faveur de cette hypothèse, nous avons pu observer que dans les 48 heures après un « repiquage », la proportion de cellules exprimant la GFP pouvait quelquefois diminuer de moitié en une quinzaine d'heures jusqu'à atteindre 10-15% du nombre total. Puis après plusieurs repiquages et ré-étalements, cette proportion pouvait remonter à plus de 60%. La confluence cellulaire ne semble pas être le seul paramètre mis en jeu puisque nous avons pu observer une baisse constante de l'expression du transgène avec le nombre de « repiquages » même en ayant soin d'empêcher les cellules d'atteindre cette confluence entre deux « repiquages » (**Figure 46**).



**Figure 46 : L'expression du transgène GFP-Tspan5 décroît lorsque le nombre de repiquages augmente**

Les cellules PC3 GFP-Tspan5 croissent en milieu complet et sont repiquées au 1/5 toutes les 48 heures. On contrôle l'expression du transgène en cytométrie en flux au cours du temps.

Nous avons émis l'hypothèse que le tri cellulaire n'ayant pas abouti à une population totalement homogène et positive en terme d'expression du transgène, les cellules exprimant le moins le transgène GFP Tspan5 aurait pu se multiplier plus vite et aux dépends des autres. Nous avons testé cette hypothèse en clonant un certain nombre de cellules par dilution limite. Après clonage et expansion des clones, tous apparaissent hétérogènes en terme d'expression de GFP-Tspan5 et une même perte de fluorescence GFP est observée après quelques jours de culture quelque soit le niveau d'expression de GFP-Tspan5 du clone de départ (**Figure 47**). Ce résultat est clairement défavorable à notre hypothèse de départ.



**Figure 47 : L'ensemble de la population PC3 GFP-Tspan5 voit l'expression du transgène GFP-Tspan5 décroître avec la durée de culture**

Des cultures clonales (1-5) de PC3 GFP-Tspan5 sont générées par dilution limite de la population initiale. Après expansion, les clones sont repiqués dans un flacon à la surface assez importante pour permettre une prolifération sur une semaine entière et l'expression du transgène GFP-Tspan5 est contrôlée par cytométrie en flux au cours du temps en culture.

Il ne s'agit pas d'un effet dû au site d'insertion du transgène et à la sélection d'une population faussement polyclonale puisque ce même phénomène s'est reproduit avec une autre population polyclonale « stable » de cellules PC3-GFP-Tspan5 indépendante de celle-ci. De plus, l'expression stable de ce même transgène dans des cellules HEK entraîne une régulation négative de son expression bien moins efficace que dans le contexte des cellules PC3. Cet effet semble donc être dû à la combinaison d'un type cellulaire et d'un transgène particulier et ne pourrait donc probablement pas être solutionné par une technique de transfection virale. Il semble que la cellule PC3 régule l'expression du transgène sans toutefois l'expulser totalement ce qui favorise l'idée d'un rôle important mais non toxique à faible niveau d'expression pour Tspan5.

Le plasmide (pcDNA3) utilisé pour les transfections et expressions des différents transgènes porte un gène de sélection, le gène de la résistance à la néomycine, sous la dépendance du promoteur SV40. Le transgène proprement dit est sous la dépendance du promoteur CMV. Il apparaît que les cellules présentant une diminution de la fluorescence sont toujours résistantes à l'action de la néomycine. D'autre part il a été décrit que le promoteur CMV pouvait, sous certaines conditions être « éteint ». Une extinction du promoteur CMV pourrait donc expliquer la perte d'expression du transgène dans les cellules transfectées, parallèlement à une conservation de la résistance à la néomycine portée par le plasmide.

### *Epigénétique et Tspan5*

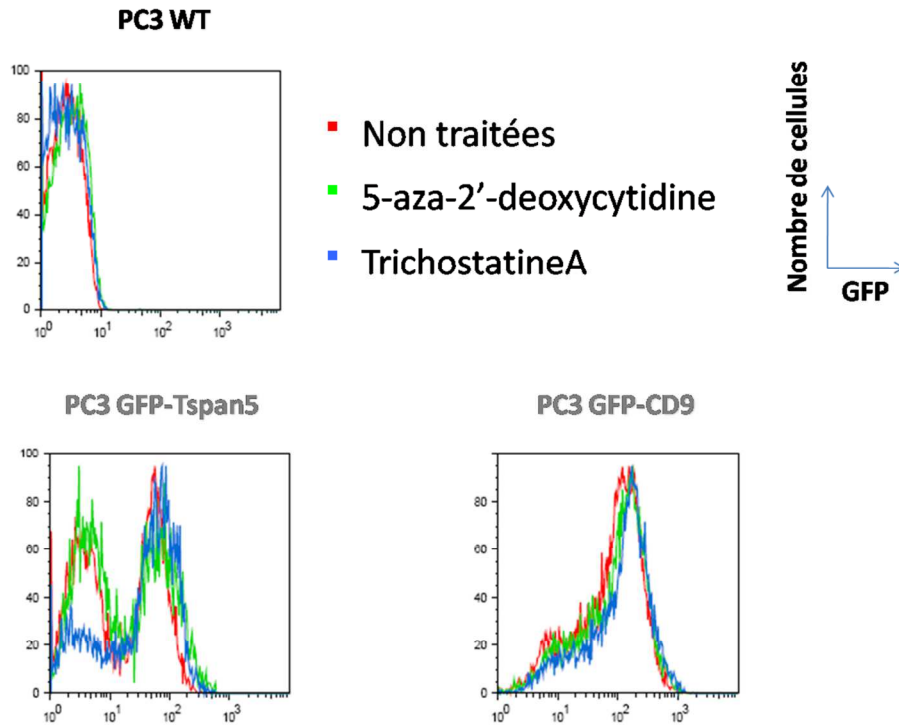
Il n'est pas rare que les transgènes soient sujets à une forte régulation de la part de la machinerie cellulaire. Un exemple parmi tant d'autres est le cas de la reconnaissance et la suppression de certains plasmides ayant un promoteur p21 (ou quelques autres testés) par la protéine ZNF511-PRAP1 dont l'expression est induite par la transfection. De manière très intéressante d'un point de vue évolutif, ZNF511-PRAP1, protéine jouant un rôle hypothétique dans l'homéostasie de croissance (Zhang et al., 2003), ne se lie qu'aux promoteurs transgéniques et non aux promoteurs endogènes et empêche la transcription de ces transgènes par régulation de la déacétylation des histones. Ce mécanisme permet donc

une protection contre l'envahissement du génome par les ADN étrangers et est d'autant plus important dans les cellules épithéliales en interaction avec l'environnement (Qiu et al., 2011).

Les octamères d'histones peuvent subir des modifications post traductionnelles dont l'acétylation -pour revue « historique », (Strahl & Allis, 2000)-. L'association histone-ADN est facilitée par des charges négatives des acides aminés lysine et arginine localisés au niveau de queues N-terminales des monomères constituant l'histone. L'acétylation de ces résidus par les histones acétyltransférase va apporter des charges positives au niveau de ces « queues » N-terminales et diminuer l'affinité de l'histone pour l'ADN. L'association ADN-histone est alors moins intime et la machinerie transcriptionnelle va pouvoir être mise en route. La déacétylation est catalysée par des histones déacetylases.

La méthylation de l'ADN, via les DNAméthyltransférases, peut également permettre d'influer sur le degré de condensation de l'ADN. Les bases les plus susceptibles d'être méthylées sont les cytosines si tuées dans les îlots CpG. Le groupement méthyl va se loger dans le grand sillon de l'ADN et perturber les interactions entre l'ADN et les enzymes de la machinerie de transcription.

Des expériences réalisées en présence de trichostatineA qui inhibe les histones déacetylases ou de 5-aza-2-déoxycytidine (Sigma-Aldrich) qui inhibe les DNAméthyltransférases ont montré qu'une incubation de cellules ayant subi une diminution de l'expression du transgène GFP-Tspan5, avec la trichostatineA et non avec la 5-aza-2-déoxycytidine permettait une restauration assez efficace de l'expression du transgène (**Figure 48**). Cette effet est spécifique des cellules surexprimant Tspan5 et n'est pas observé dans celles exprimant CD9. Un résultat vraisemblablement lié au fait que l'expression de GFP-CD9 dans ces cellules ne semble pas influencé ni par les conditions ni par le temps de culture.



**Figure 48 : Une histone déacétylase est responsable de la perte du transgène GFP-Tspan5**

Après repiquage et étalement des cellules pendant 24 heures, les cellules PC3 WT, GFP-Tspan5 et GFP-CD9 sont incubées pendant 48 heures en absence ou présence de trichostatineA (0.5µg/mL) ou de 5-aza-2'-deoxycytidine (5µM) et le niveau d'expression des transgènes GFP est analysé ensuite en cytométrie en flux.

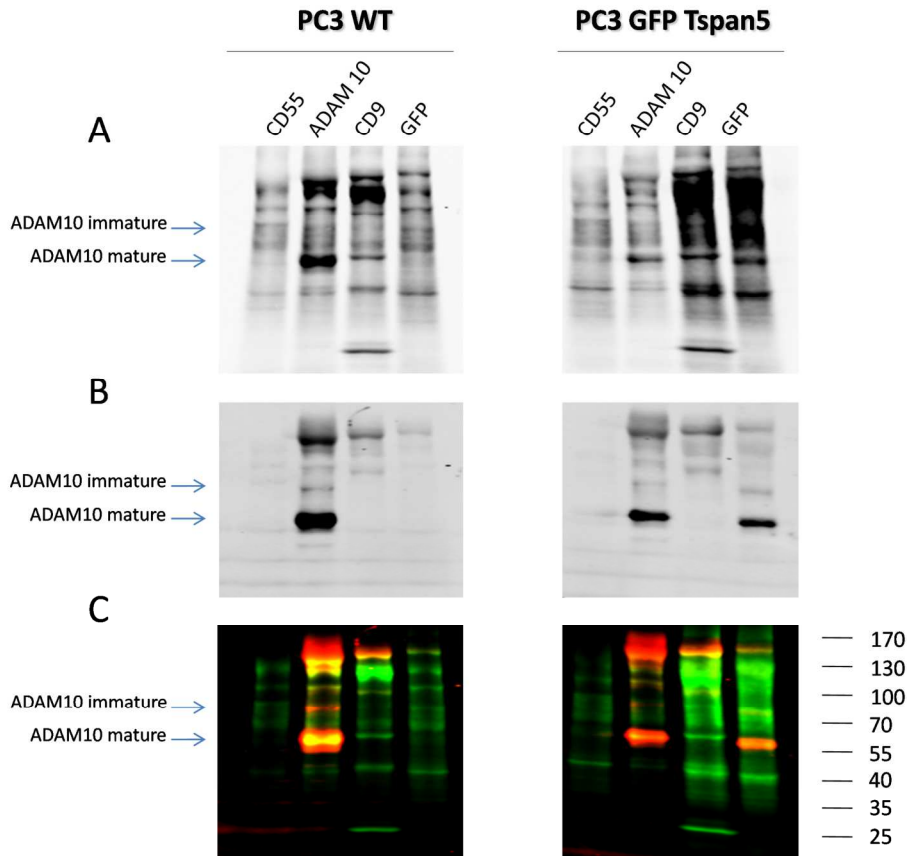
D'après nos résultats, il semble donc que la perte d'expression du transgène GFP-Tspan5 soit pour tout ou partie, sous la dépendance de mécanismes de régulation épigénétiques. De par le coût ainsi que la toxicité potentielle de la trichostatineA, nous avons donc décidé pour la suite du travail de contrôler la perte d'expression du transgène en effectuant des repiquages des cellules assez rapprochés pour limiter la confluence et de limiter le nombre de repiquages successifs pour une culture donnée. L'expression du transgène GFP-Tspan5 est donc contrôlée à chaque « repiquage » par cytométrie en flux et lorsque la proportion de cellules « positives » diminue en dessous de 50%, nous procédons à la décongélation d'une nouvelle aliquote de cellules. Il faut noter cependant que cette hétérogénéité de population apparaissant au cours du temps ne présente pas que des

désavantages puisqu'elle nous fournit, en particulier lors des expériences de cytométrie ou d'immunofluorescence sur lame, des témoins internes de cellules exprimant peu ou plus le transgène.

### Interaction entre ADAM10 et Tspan5 dans les cellules surexprimant Tspan5

Afin de vérifier que l'interaction entre GFP-Tspan5 surexprimé transitoirement et ADAM10 n'était là encore pas une conséquence indésirable liée à la transfection transitoire, nous avons procédé à une lyse des cellules PC3 WT et PC3-GFP-Tspan5 stables en présence de détergent Brij97 (conservant les liaisons entre tétraspanines) ou de digitonine (ne conservant que les liaisons entre partenaires primaires) suivie d'une coimmunoprécipitation et d'une analyse en Western-blot de la même façon qu'énoncé précédemment. Nous observons que lorsque les interactions entre tétraspanines sont conservées (**Figure 49 gauche**), ADAM10 est immunoprécipitable par un anticorps dirigé contre CD9 quelque soit le background des cellules considérées. A contrario, lorsque ces interactions sont rompues (**Figure 49 droite**), seul l'anticorps dirigé contre l'étiquette GFP dans un contexte de surexpression de GFP-Tspan5 permet une coimmunoprécipitation d'ADAM10. On observe de plus qu'ADAM10 est précipité sous deux formes, l'une ayant une taille apparente (environ 90 kDa) compatible avec la forme immature de la protéase, l'autre compatible (environ 65 kDa) avec la forme mature de la protéase car débarrassée de son prodomaine.





**Figure 50 : ADAM10 exprimé à la surface cellulaire est un partenaire primaire de la tétraspanine Tspan5.**

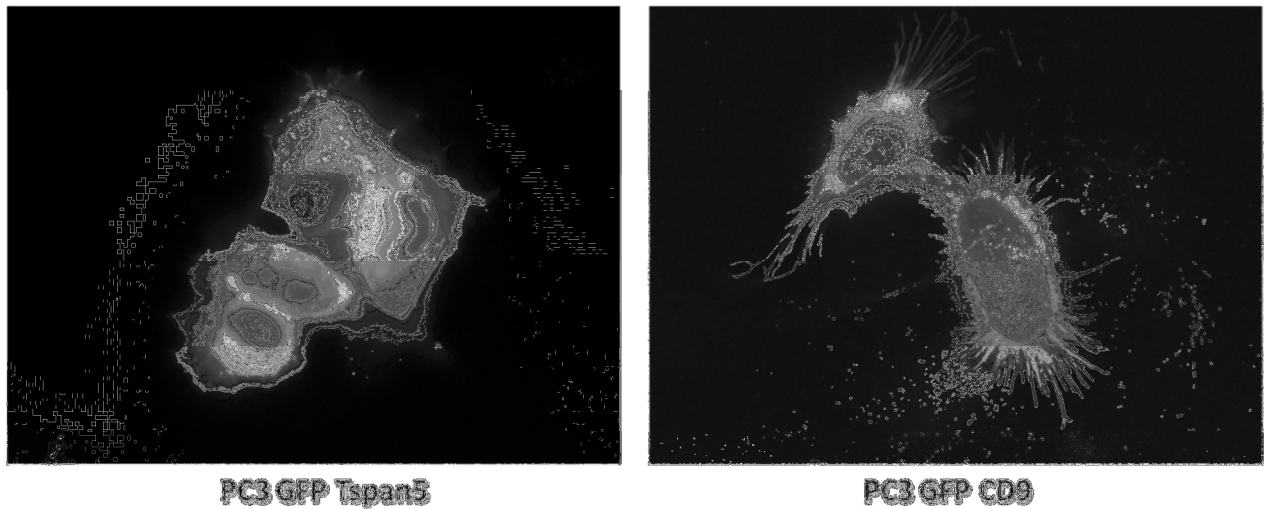
Après marquage des protéines de surface par la biotine, les cellules PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5 sont lysées en présence de 1% digitonine et les lysats sont soumis à une précipitation par différents anticorps. Les protéines immunoprécipitées sont séparées par SDS-PAGE et la présence des protéines de surface co-immunoprécipitées (A) et ADAM10 (B) sont détectées par Western-blot. Les détections A et B sont superposées en C

### *Expression subcellulaire atypique de Tspan5*

Ayant donc vérifié l'interaction directe entre Tspan5 et ADAM10 (notamment à la membrane plasmique) dans notre modèle de lignées cellulaires « stables » nous avons tiré profit de l'étiquette GFP de notre protéine de fusion GFP-Tspan5 et vérifier la localisation membranaire subcellulaire de Tspan5 et d'ADAM10 par la technique d'immunofluorescence sur lame. Comme le montre les photos de la **figure 51**, l'expression de la protéine GFP-CD9 est conforme aux données de la littérature et montre une expression quasi exclusivement à



la membrane plasmique. La localisation de GFP-Tspan5 n'est clairement pas aussi restreinte puisqu'elle est aussi observée dans un compartiment interne, « réticulo-périnucléaire ».

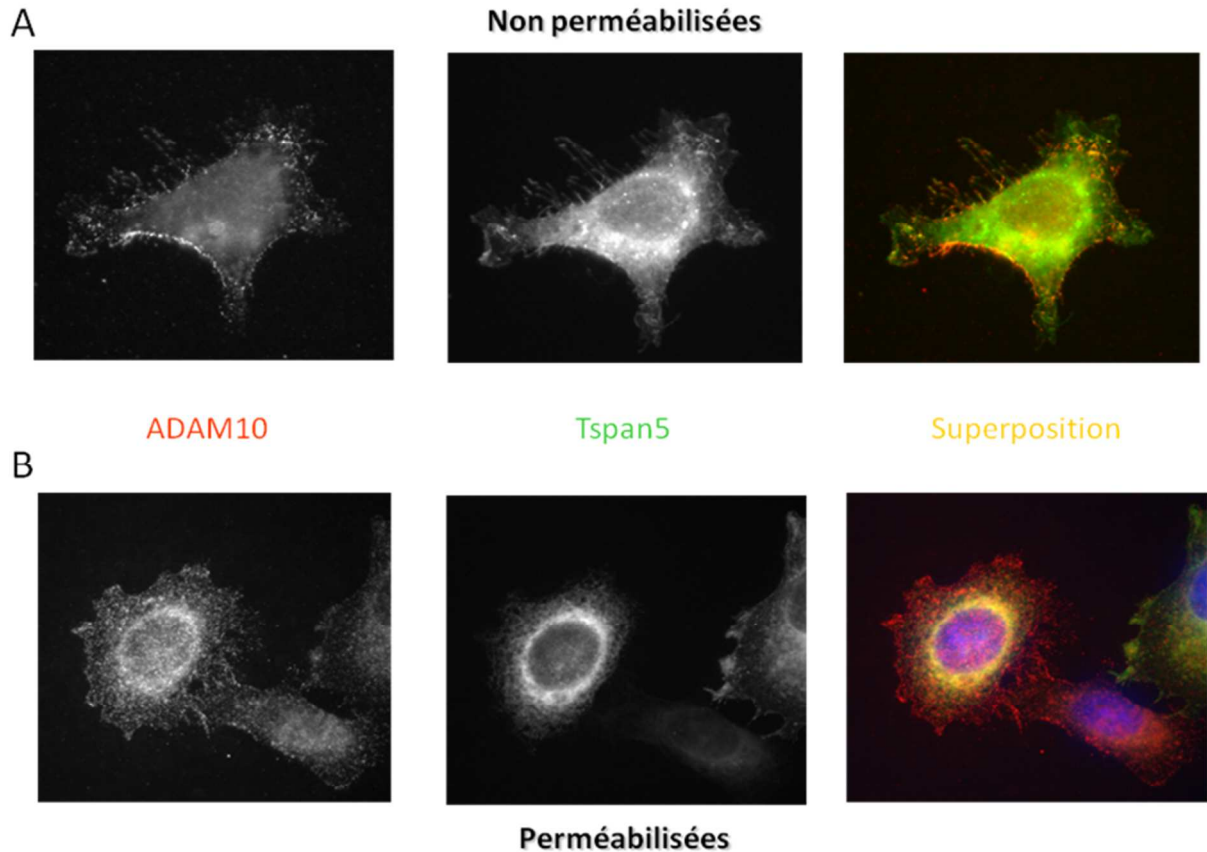


**Figure 51 : Localisation subcellulaire de la protéine GFP-Tspan5**

Les cellules sont mises à adhérer pendant 24 heures sur des lamelles de verre puis montées sur lame en PBS et observées au microscope à épifluorescence (grossissement x630)

Nous avons d'abord pensé à un effet de l'étiquette GFP assez volumineuse (ayant un poids moléculaire proche de celui de Tspan5) sur le transit de la protéine de fusion. La localisation correcte de GFP-CD9 va à l'encontre de cette interprétation. De même, l'utilisation de constructions de protéines de fusions utilisant les étiquettes V5, HA et Myc sur les protéines Tspan5 et CD9 montre que cette localisation « atypique » de Tspan5 n'est pas due à un effet d'étiquette et est bien spécifique de Tspan5 (non montré). Dans tous les cas, les différentes constructions de CD9 présentent une localisation à la membrane plasmique assez stricte.

En ce qui concerne ADAM10, cette protéine est détectable à la fois à la surface (cellules non perméabilisées) et en quantités non-négligeables dans des compartiments intracellulaires (cellules perméabilisés). Dans les conditions d'expression de GFP-Tspan5 les plus favorables (cellules à forte expression) on peut observer une colocalisation de Tspan5 et d'ADAM10 aussi bien à la surface que dans les compartiments intracellulaires (**Figure 52**).



**Figure 52 : ADAM10 et Tspan5 co-localisent à la surface et à l'intérieur de la cellule**

A. Les cellules PC3 GFP-Tspan5 sont fixées en paraformaldéhyde puis marquées par un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire d'ADAM10 (11g2) et observées au microscope à épifluorescence (grossissement x630)

B. Les cellules PC3 GFP-Tspan5 sont fixées et perméabilisées en acétone puis marquées par un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire d'ADAM10 et par le DAPI et observées au microscope à épifluorescence (grossissement x630)

On note donc ici que, bien que GFP-Tspan5 soit apparemment relativement peu abondant à la membrane plasmique, il permet néanmoins d'y coimmunoprécipiter ADAM10 (cf. figure 50) et sa colocalisation avec ADAM10, si elle n'est pas totale, est visible à la fois à la membrane plasmique mais aussi dans les compartiments membranaires internes de la cellule.

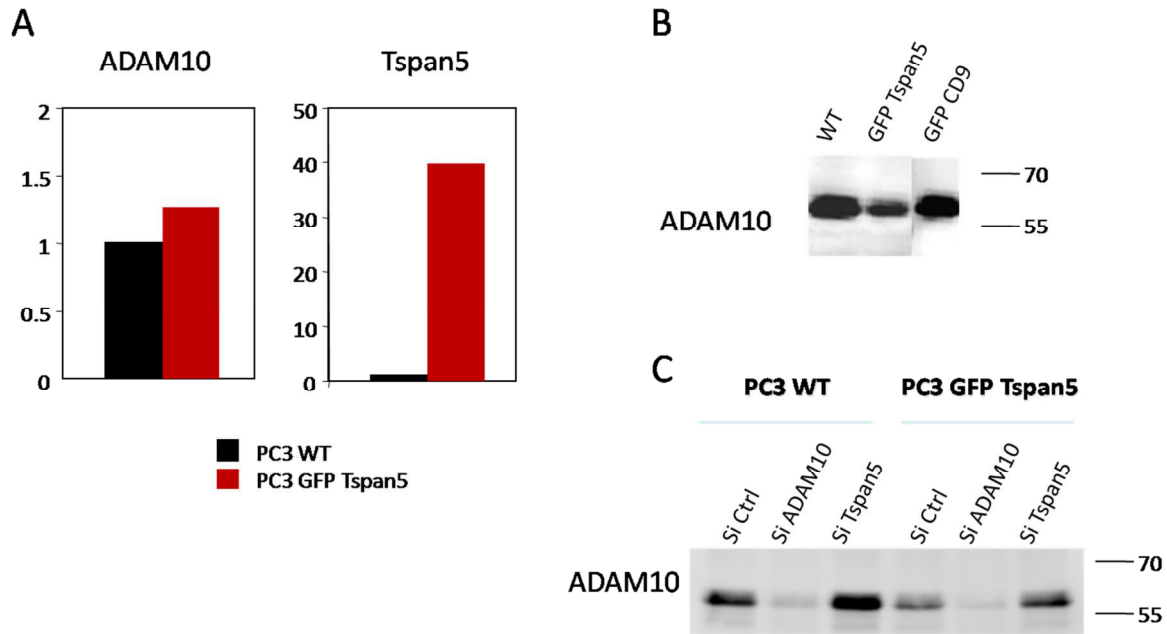
De manière assez inattendue, Tspan5 s'exprime donc non seulement à la membrane plasmique comme une grande majorité des tétraspanines mais aussi dans un compartiment interne périnucléaire. Nos résultats suggèrent que cette localisation « atypique » pour une

tétraspamine n'est pas artéfactuelle. Cette localisation de Tspan5 dans des compartiments internes et son interaction forte avec la métalloprotéase ADAM10 pourrait assez facilement expliquer des données de la littérature montrant une localisation majoritairement intracellulaire pour cette ADAM (McCulloch et al., 2004).

## La surexpression de Tspan5 entraîne une diminution globale de l'expression d'ADAM10

### *Diminution de l'expression totale d'ADAM10*

Nous avons poursuivi notre étude en nous demandant si la diminution de l'expression d'ADAM10 à la surface des cellules visualisée par cytométrie en flux était restreinte à ce compartiment ou la conséquence directe d'une baisse de l'expression globale de cette protéase en conséquence de la surexpression de Tspan5. Des cellules PC3 WT, PC3-GFP-Tspan5 et PC3-GFP-CD9 ont été lysées, en quantité égale, en présence de Triton X-100 puis la composition de ces lysats analysés par SDS-PAGE suivi d'un Western-blot (**Figure 53B**). Les résultats montrent que l'expression de GFP-Tspan5 et non l'expression de GFP-CD9 conduit à une forte (>60%) diminution de la quantité totale d'ADAM10 contenue dans les cellules. Comme nous l'avons montré pour l'expression de surface d'ADAM10, cet effet de l'expression de Tspan5 sur la quantité totale d'ADAM cellulaire est réversible. Une interférence ARN de Tspan5 entraîne en effet, au bout de 2 jours, une ré-augmentation de la quantité totale d'ADAM10 de 50% (**Figure 53C**). L'effet de Tspan5 n'est pas due à une régulation transcriptionnelle puisque la quantité d'ARNm codant pour ADAM10 n'est pas modifiée dans ces conditions (**Figure 53A**). Le phénomène de régulation négative de l'expression totale d'ADAM10 lorsque Tspan5 est surexprimé, est donc obligatoirement de nature post-transcriptionnelle.



**Figure 53 : La surexpression de Tspan5 entraîne une diminution post-transcriptionnelle de l'expression totale d'ADAM10**

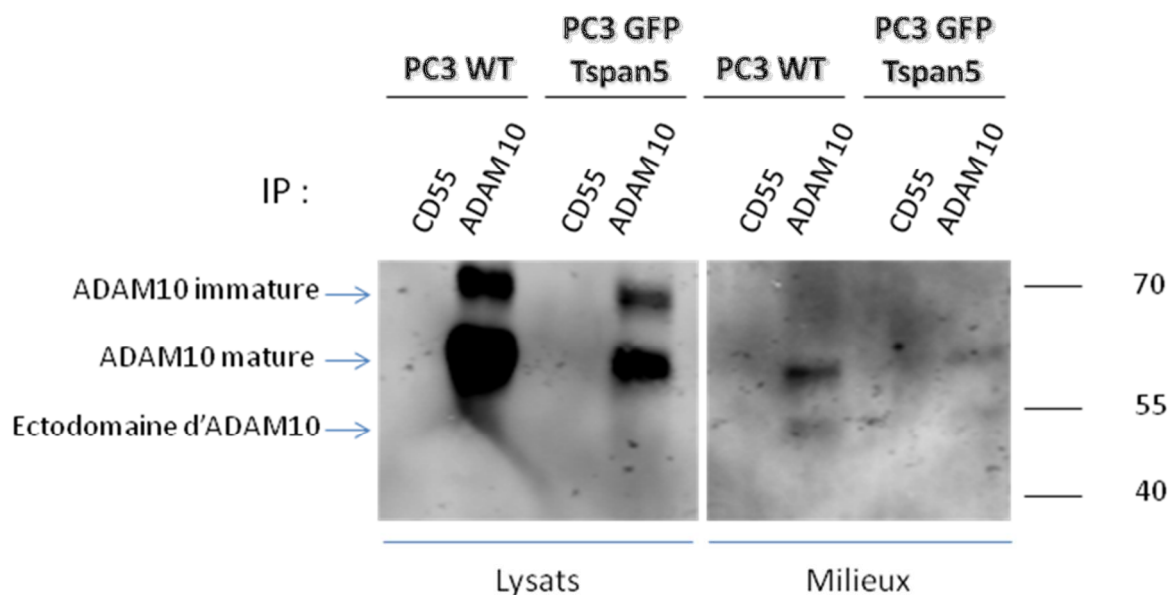
A. Les cellules PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5 sont décrochées et subissent une RT-PCR quantitative avec des amorces spécifiques d'ADAM10 et Tspan5. Les quantités de transcrits observées en PC3 GFP-Tspan5 sont représentées relativement à celles observées en PC3 WT (normalisées à l'expression du transcrit RPL38).

B. Les cellules PC3 WT, GFP-Tspan5 et GFP-CD9 sont lysées en présence de 1% Triton X-100 puis les protéines de ces lysats sont séparées par SDS-PAGE. Les niveaux d'expression d'ADAM10 sont quantifiés par analyse en Western-blot avec l'anticorps dirigé contre ADAM10 (11g2).

C. Les cellules PC3 WT et GFP-Tspan5 ayant préalablement subi une interférence ARN dirigée contre ADAM10 ou Tspan5 pendant 48 heures, sont lysées en présence de 1% Triton X-100 puis les protéines de ces lysats séparées par SDS-PAGE. Les niveaux d'expression d'ADAM10 sont quantifiés par analyse en Western-blot avec l'anticorps dirigé contre ADAM10 (11G2).

Parmi les régulations post-transcriptionnelles pouvant conduire à une diminution de la quantité d'ADAMP10 observable au niveau cellulaire figure le clivage de son ectodomaine et la libération de celui-ci dans le milieu extracellulaire. A titre d'exemple, une telle maturation d'ADAM10 assurée par des métalloprotéases telles qu'ADAM9 (Harris et al., 2009) ou meltrin  $\beta$  (Jefferson et al., 2013) est connue. Nous avons donc examiné un possible rôle possible d'une sécrétion accrue d'ADAM10 appauvrissant ainsi le « pool » membranaire dans le cas des cellules exprimant GFP-Tspan5. Les résultats obtenus montrent que si une

immunoréactivité ADAM10 pouvant correspondre à son ectodomaine (55kDa) est bien sécrété par les cellules PC3 (**Figure 54 Milieux**), cette sécrétion apparaît limitée en quantité et proportionnelle à la quantité immunoprécipité à partir des lysats cellulaire respectifs (**Figure 54, Lysats**). En tout état de cause, pour rendre compte de la plus faible expression d'ADAM10 dans les cellules PC3 GFP-Tspan5, il aurait fallu observer une sécrétion beaucoup plus forte d'ADAM10 à partir de ces cellules comparée à celle observée dans les cellules PC3 WT. Tel n'est pas le cas, et cet effet « inhibiteur » de Tspan5 devra donc être recherché à un autre niveau qui pourrait être, par exemple, la production accrue de miRNA dirigés contre ADAM10 en conséquence directe ou indirecte de la surexpression de Tspan5.



**Figure 54 : Sécrétion comparative d'ADAM10 par les cellules PC3 WT et GFP-Tspan5**

Après 48 heures d'incubation en milieu DMEM complet, les cellules PC3 WT et GFP-Tspan5 ont été lysées en présence de 1% Triton X-100 dans un volume de tampon de lyse égal au volume du milieu d'incubation. Les lysats et milieux d'incubation ont été prélevés et des volumes égaux immunoprécipités en présence d'un anticorps anti-CD55 (contrôle) ou de l'anticorps anti-ADAM10 (11g2). La présence d'ADAM10 dans les immunoprécipités est révélée par Western blot après SDS-PAGE.

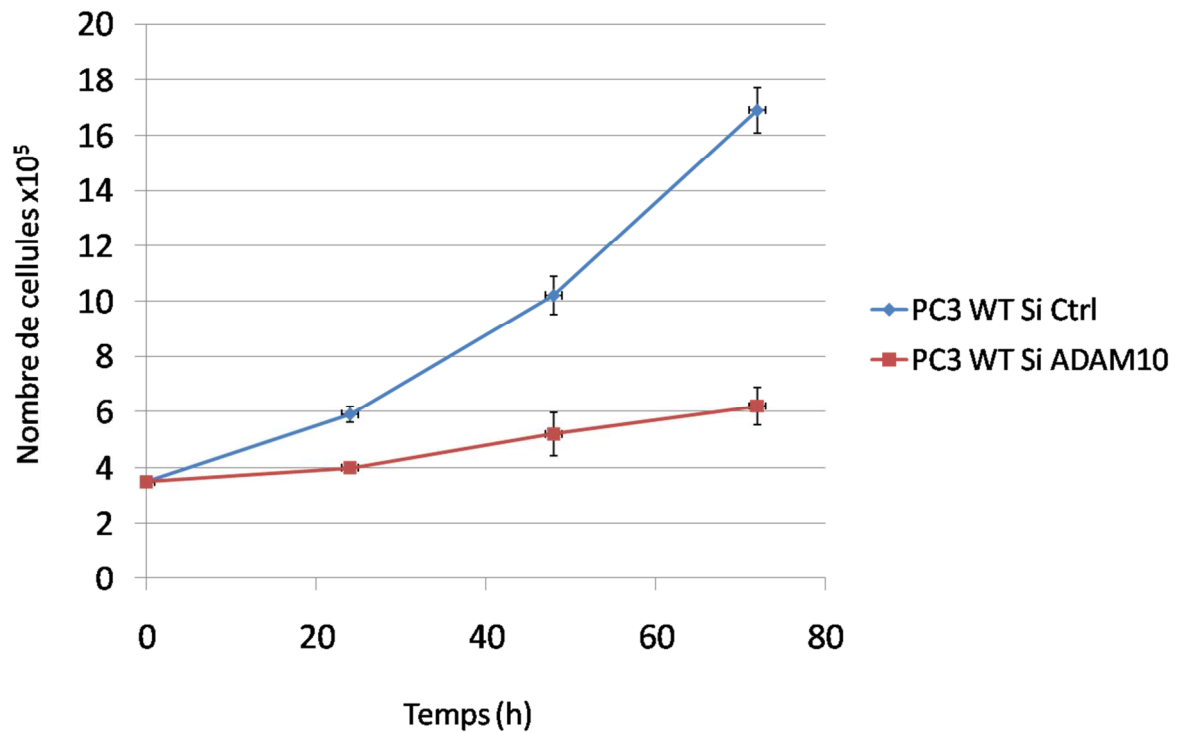
## Rôles d'ADAM10 et de Tspan5 dans la croissance cellulaire

### Une baisse d'expression d'ADAM10 et une surexpression de Tspan5 inhibent la croissance cellulaire des cellules PC3

La métalloprotéase ADAM10 est donc connectée au réseau de tétraspanines de façon directe via plusieurs tétraspanines de la famille des TspanC8, dont Tspan5. La surexpression de Tspan5 entraînant une diminution de la quantité d'ADAM10 dans les cellules PC3, nous avons voulu savoir s'il était possible d'observer une conséquence fonctionnelle de cette diminution.

En particulier, ADAM10 est une métalloprotéase capable de cliver différents substrats. Parmi ces derniers, figurent un certain nombre de protéines membranaires impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire dont des précurseurs des ligands du récepteur de l'EGF (voir introduction). Afin d'évaluer le rôle modulateur de la tétraspanine Tspan5 sur l'activité d'ADAM10, nous nous sommes intéressés à la prolifération cellulaire en tant que « read-out » impliquant ADAM10 en particulier à travers sa capacité à sécréter les ligands de l'EGFR.

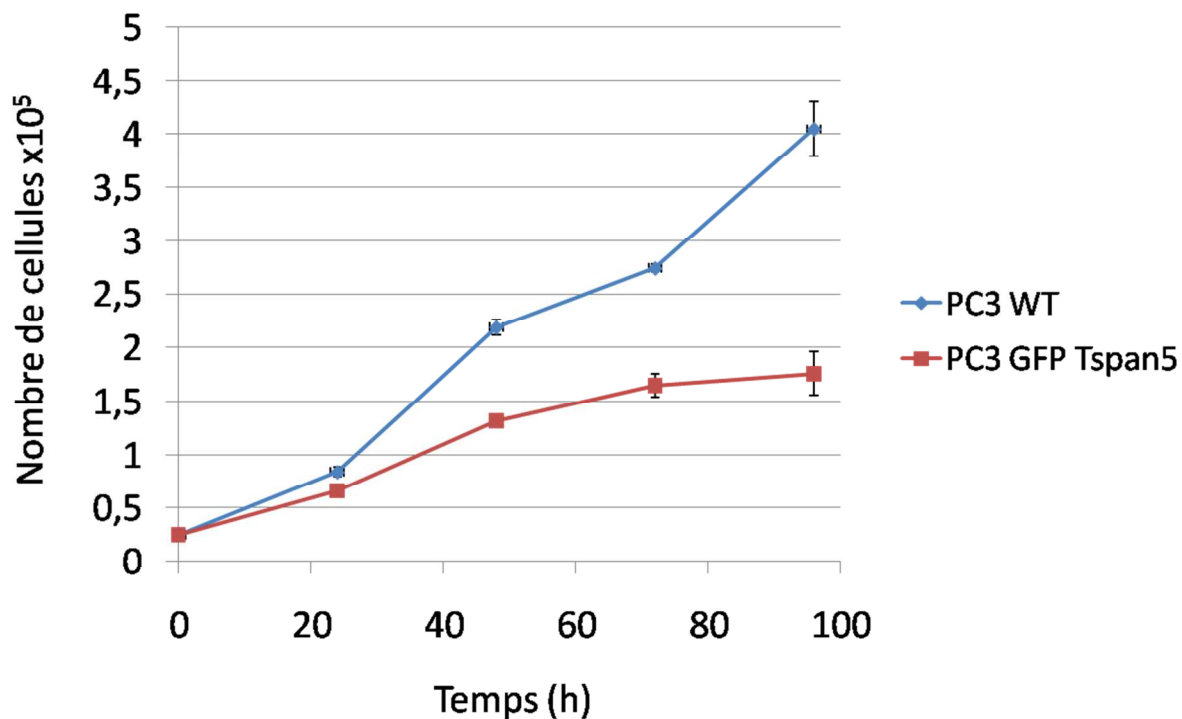
Pour ce faire, après ensemencement de boîtes de culture par un nombre défini de cellules (habituellement 30 000 cellules par  $\text{cm}^2$ ) la prolifération cellulaire a été mesurée par comptages manuels ou électroniques du nombre de cellules à intervalles de temps de 24 heures et jusqu'à 72 ou 96 heures. Tout d'abord, il était nécessaire de vérifier si, comme nous l'avions raisonné, la protéase ADAM10 avait un rôle dans la prolifération de notre modèle cellulaire PC3. Pour cela, 24 heures après leur ensemencement, les cellules ont subi une interférence ARN (utilisant l'INTERFERin (PolyPlus) et suivant le protocole reverse décrit par le fabricant) destinée à inhiber l'expression d'ADAM10 et nous avons mesuré la croissance des cellules PC3 WT sur une période de 72 heures en présence de milieu DMEM complet. La conséquence de cette interférence ARN est une inhibition presque totale de la à la fois de l'expression d'ADAM10 (**cf. Figure 53C**) et de la prolifération cellulaire (**Figure 55**).



**Figure 55 : L'expression d'ADAM10 est nécessaire à la croissance des cellules PC3 WT**

Les cellules PC3 WT subissent une interférence ARN contrôle ou dirigée contre ADAM10 et on suit leur prolifération du début de l'interférence jusqu'au 3ème jour suivant celle-ci en milieu DMEM complet. Résultats de 3 expériences +/-SEM.

Suivant notre raisonnement, il convenait de savoir ensuite si l'inhibition de l'expression d'ADAM10, non par ARN interférence, mais par surexpression de Tspan5 avait un effet similaire de diminution de la prolifération cellulaire. En comparant les courbes de croissances de cellules PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5, nous observons bien (**Figure 56**) que ces dernières poussent moins vite que leurs homologues PC3 WT. La surexpression de Tspan5 induit donc également une diminution de la croissance des cellules PC3.

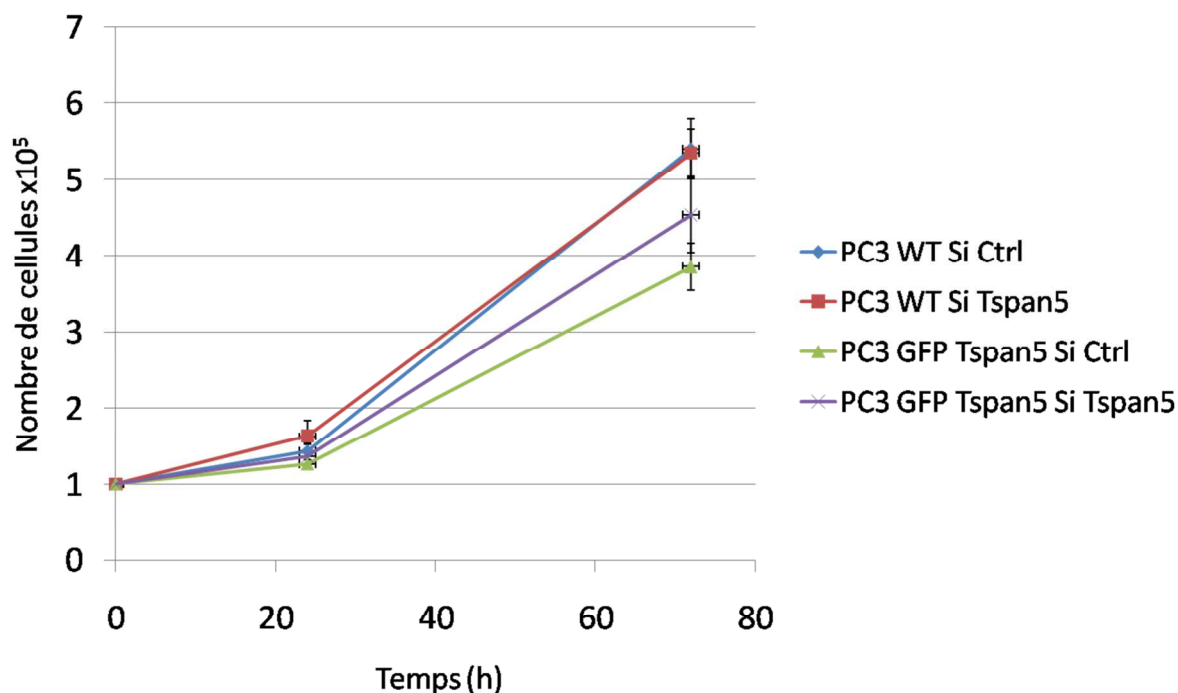


**Figure 56 : L'expression du transgène GFP-Tspan5 induit une diminution de la prolifération des cellules PC3**

Les cellules PC3 WT, GFP-Tspan5 sont ensemencées et incubées en milieu DMEM complet. Leur croissance dans ce milieu est suivie pendant 96 heures et des comptages effectués toutes les 24h. Résultats de 3 expériences +/-SEM.

Suivant les mêmes interrogations que précédemment, nous avons vérifié que ce ralentissement induit par la surexpression de Tspan5 était réversible lorsque l'on inhibait la l'expression de Tspan5 par interférence ARN. Cette réversibilité est à nouveau confirmée puisque l'effet inhibiteur de la prolifération exercé par la surexpression de Tspan5 est bien atténué lorsque la traduction de cette protéine est diminuée (**Figure 57**).



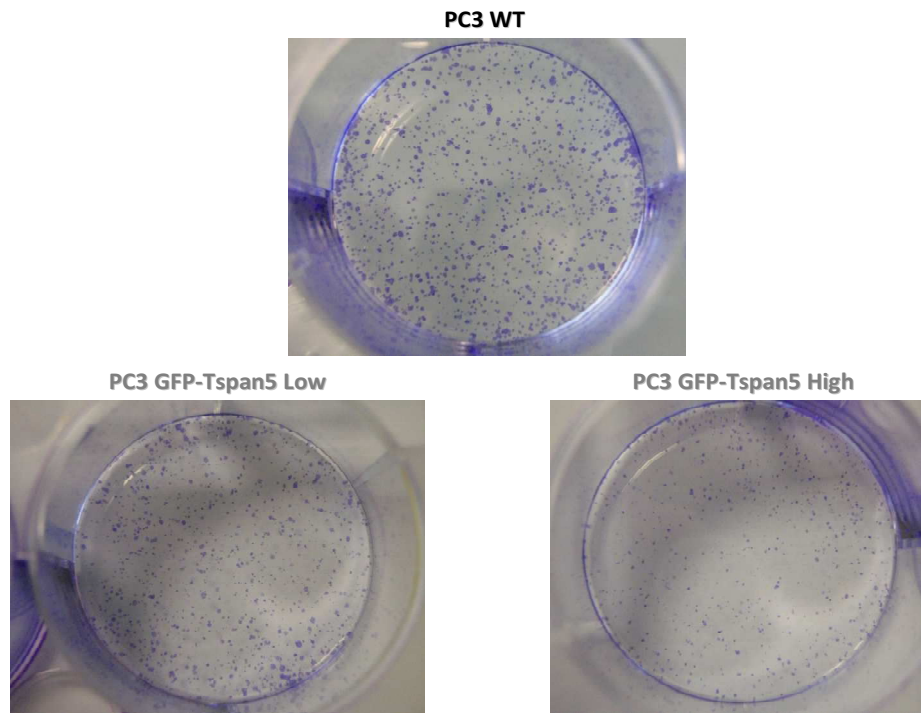


**Figure 57 : La surexpression de GFP-Tspan5 est responsable de la diminution de la croissance des cellules PC3**

Les cellules PC3 WT, GFP-Tspan5 subissent une interférence ARN contrôle (Si Ctrl) ou dirigée contre Tspan5 (Si Tspan5) et on suit leur croissance du début de l'interférence jusqu'au 3ème jour suivant celle-ci. Résultats de 3 expériences +/-SEM.

Les expériences précédentes ont été réalisées avec un ensemencement des cellules important permettant clairement une communication rapide entre celles-ci. Nous avons donc voulu savoir si l'inhibition de la croissance cellulaire observée avec les cellules PC3-GFP-Tspan5 s'exerçait aussi dans le cas d'une croissance clonale. Pour nous placer dans les meilleures conditions expérimentales compte tenu de l'hétérogénéité de cette population, un tri des cellules a été réalisé préalablement permettant d'obtenir 2 populations, l'une exprimant faiblement (Tspan5 Low) et l'autre fortement (Tspan5 High) le transgène. Les cellules ainsi obtenues ainsi que des cellules témoin PC3 WT ont immédiatement été mises en culture en milieu DMEM complet à raison de 2000 cellules par puits d'une boîte P6. Dans tous les cas la présence de clones peut être observée au bout de 5 jours de culture (**Figure 58**). Cependant, on constate que les clones obtenus avec les cellules Tspan5 Low apparaissent moins nombreux et plus petit que ceux obtenus avec les cellules PC3-WT. Ce

phénomène est amplifié dans le cas des cellules Tspan5 High. Ainsi, si la prolifération clonale des cellules exprimant Tspan5 n'est pas totalement supprimée, elle est fortement altérée et cet effet est corrélé à l'efficacité d'expression du transgène (**Figure 58**). Plus le transgène GFP-Tspan5 est exprimé dans les cellules PC3, moins nous observons de colonies clonales.

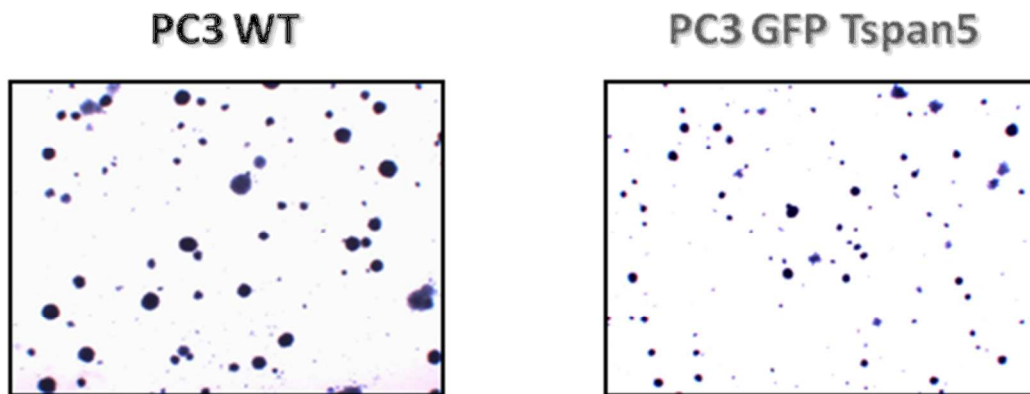


**Figure 58 : La diminution de prolifération des cellules PC3 dépend du taux d'expression de GFP-Tspan5**

Les cellules sont triées par cytométrie en flux en fonction de l'expression de GFP-Tspan5 et sont mises à adhérer à raison de 2000 cellules par puits de P6 pendant 5 jours. Le milieu est remplacé chaque jour par du milieu complet neuf. Les cellules sont enfin marquées en Cristal-Violet et prises en photo. Images représentatives de 3 expériences.

Les expériences de croissance cellulaire réalisées jusqu'à présent l'ont été en condition d'adhérence des cellules au support (culture en 2 dimensions). Dans le but de savoir si cet ancrage au support était un paramètre impliqué dans l'effet inhibiteur de Tspan5, nous avons réalisé des expériences de culture cellulaire dans un contexte en trois dimensions (i.e. des cultures tridimensionnelles en milieu contenant de l'agar). Les résultats obtenus montrent à nouveau que dans ces conditions les cellules PC3 surexprimant Tspan5 prolifèrent moins que leurs homologues WT (**Figure 59**). Ce résultat suggère donc que l'effet

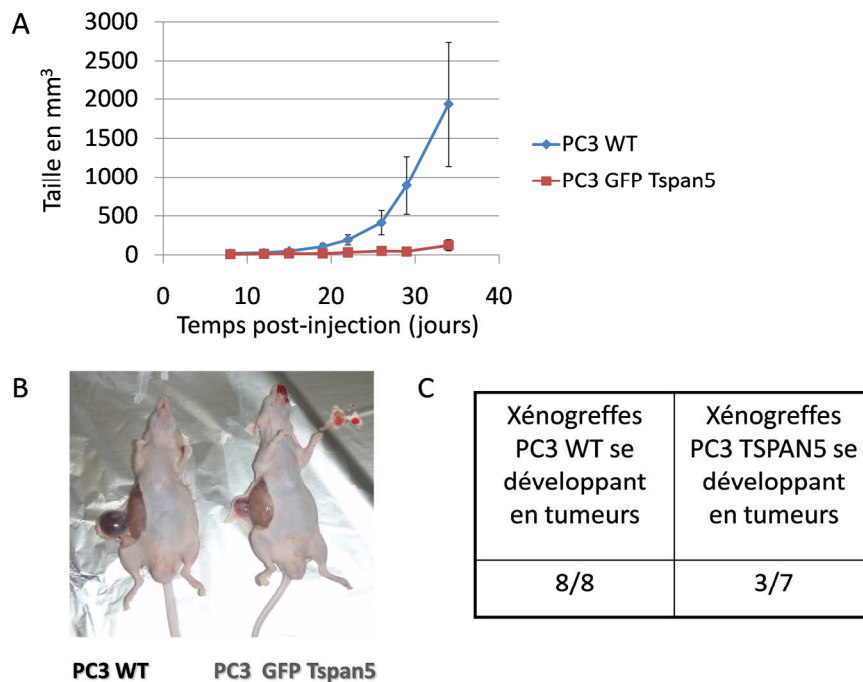
inhibiteur de la surexpression de Tspan5 sur la croissance des cellules PC3 ne s'exerce vraisemblablement pas sur une fonction cellulaire impliquant l'adhérence au substrat.



**Figure 59 : La surexpression de Tspan5 cause une diminution de la prolifération indépendamment de l'ancrage des cellules**

Les cellules PC3 WT ou GFP-Tspan5 sont incluses dans une matrice à 3 dimensions à base d'agar et de milieu DMEM complet à raison de 10000 cellules/puits de P6 et laissées à proliférer pendant 21 jours. Puis les cellules sont marquées en Cristal-Violet et photographiées sous une loupe (10x). Photos représentatives de 3 expériences.

L'ensemble des résultats obtenus jusqu'ici l'ont été lors d'expériences réalisées *in vitro*. Nous avons donc voulu tester les conséquences de la surexpression de Tspan5 précédente dans des conditions plus « physiologiques ». Nous avons donc réalisé des expériences, *in vivo*, de xénogreffes de cellules PC3 dans des souris SCID. Lorsque des cellules PC3 WT ou GFP-Tspan5 sont injectées en sous-cutané à des souris SCID, les xénogreffes de PC3 WT se développent en totalité en tumeurs et plus efficacement que leurs homologues PC3 GFP-Tspan5 (**Figure 60**).



**Figure 60 : Les xénogreffes PC3 WT se développent plus efficacement que leurs homologues PC3 GFP-Tspan5 dans des souris immunodéprimées**

Des xénogreffes de 10 millions de cellules PC3 WT ou GFP-Tspan5 sont injectées en sous-cutané dans la région dorso-latérale de 2 lots de souris SCID. La présence et la taille des tumeurs se développant sont contrôlées et mesurées tous les 3 jours pendant une durée totale de 35 jours (A).

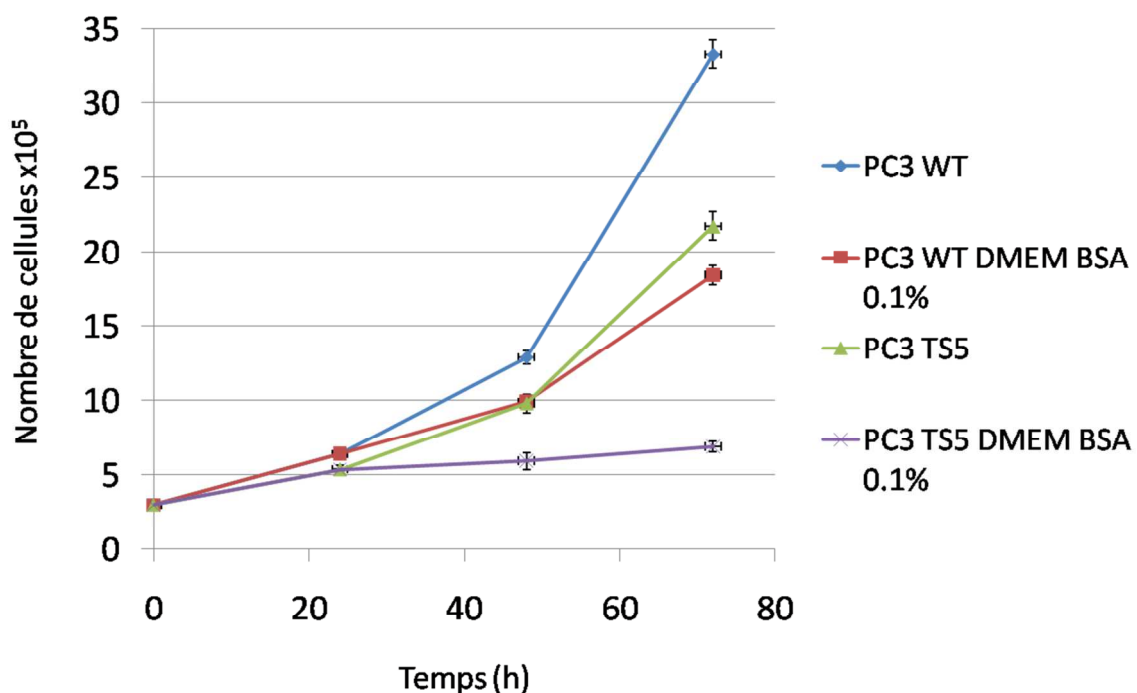
Après 35 jours de développement des tumeurs, les souris sont sacrifiées et un exemple de tumeurs représentatives photographié (B) et la proportion de xénogreffes s'étant développées en tumeurs est relevée (C).

Seules 3/7 des greffes de cellules PC3-GFP-Tspan5 conduisent à la formation des tumeurs détectables et celles-ci sont d'une taille beaucoup plus petite que celles résultant de greffes de cellules PC3 WT. Ainsi, l'effet inhibiteur de la tétraspanine Tspan5 est aussi confirmé, *in vivo*, par ces expériences de mesure de croissance tumorale.

Cet ensemble de données recueillies dans différentes conditions expérimentales de la mesure de la prolifération cellulaire suggère que la tétraspanine Tspan5, tout comme CD9, pourrait avoir un rôle antitumoral. L'absence totale de données concernant les taux d'expression de cette tétraspanine (au niveau ARN comme protéique) aussi bien dans des tissus sains que tumoraux ou métastatiques ne permet pas jusqu'à présent d'étayer cette dernière hypothèse.

## La croissance des cellules PC3 GFP-Tspan5 est dépendante du sérum et ces cellules ne sont pas aptes à l'auto/paracrinie

ADAM10 est, comme nous l'avons mentionné précédemment, impliquée dans le clivage et la sécrétion d'un certain nombre de protéines impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire. On peut se demander dès lors, si la prolifération des cellules PC3 pourrait être dépendante d'un facteur auto/paracrine (dont la concentration dans le milieu serait sous contrôle de l'activité d'ADAM10) et qui ne serait plus sécrété par les cellules PC3 GFP-Tspan5. Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé les capacités prolifératives des cellules dans un milieu de culture DMEM enrichi en sérum de veau foetal (activateur de croissance) ou un milieu DMEM uniquement supplémenté en sérum-albumine bovine (c'est-à-dire dépourvu en facteurs de stimulation externe) (**Figure 61**).

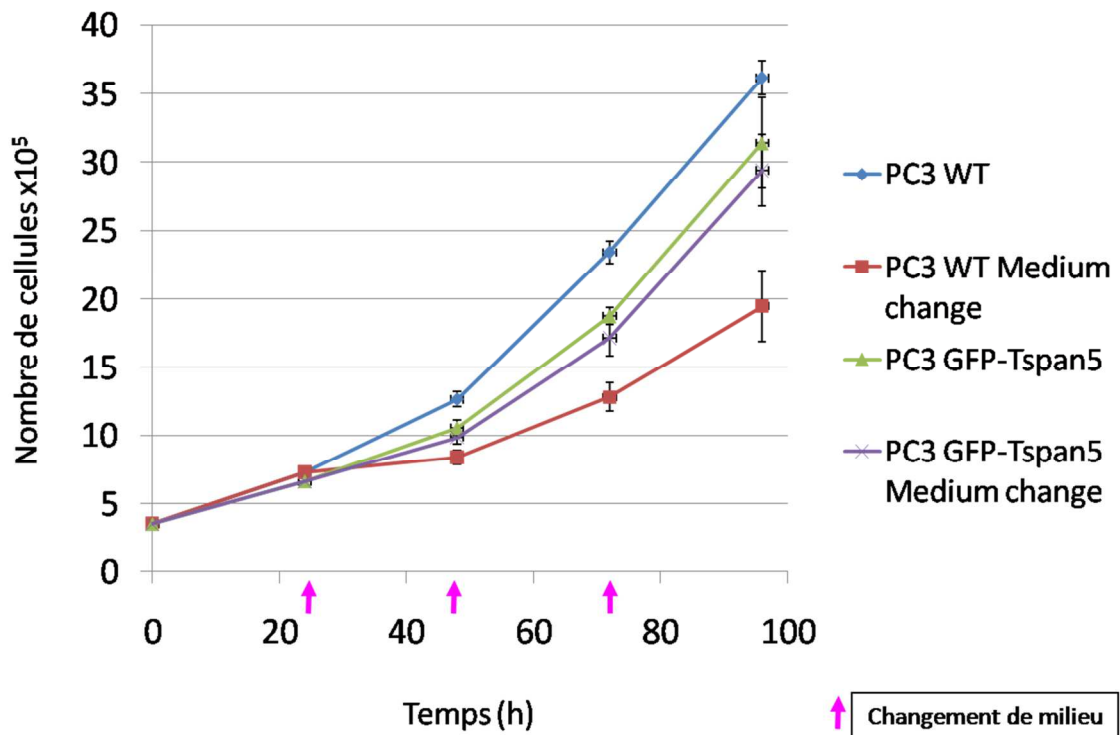


**Figure 61 : Les PC3 GFP-Tspan5 ont une réponse proliférative réduite à un milieu dépourvu de sérum**

Les cellules sont mises à adhérer en milieu complet pendant 24h puis cultivées en milieu complet ou en milieu dépourvu de sérum et enrichi en BSA pendant 48 heures. La

prolifération est contrôlée par comptage toutes les 24 heures. Résultats de 3 expériences +/- SEM.

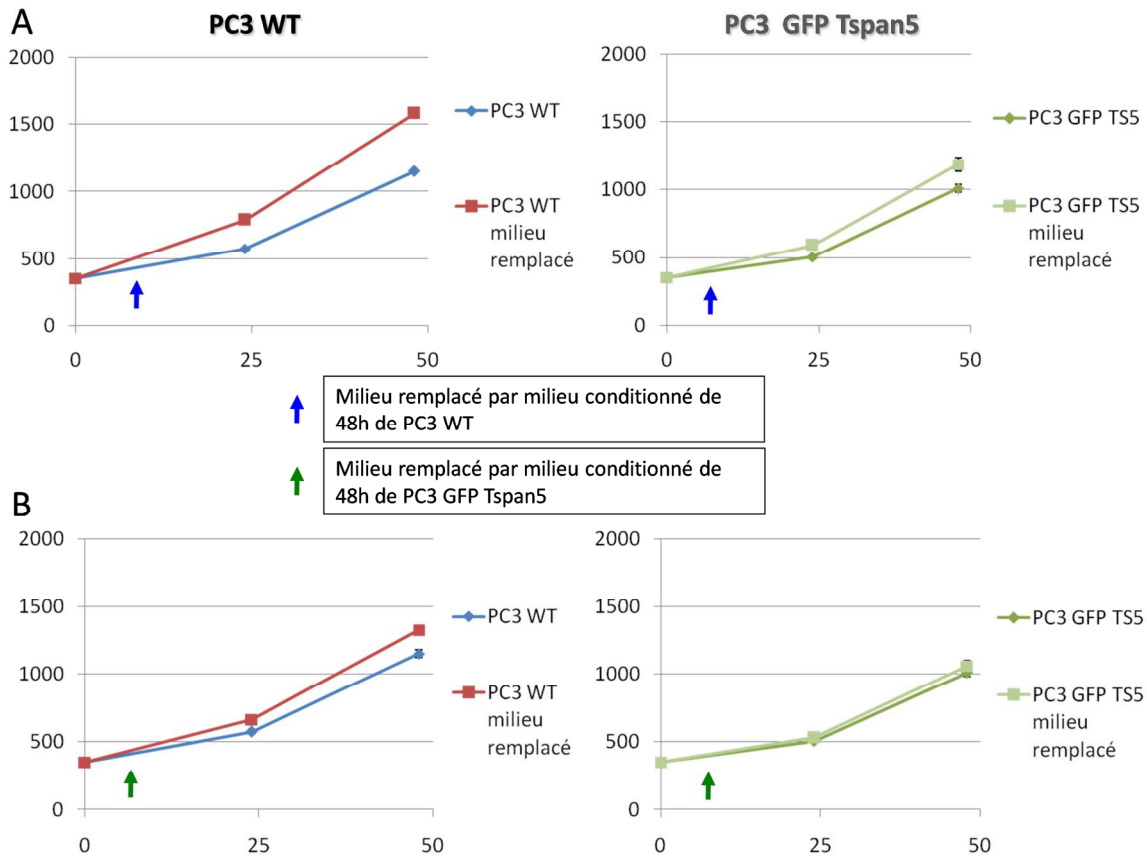
Il apparaît que les cellules surexprimant Tspan5 ont une prolifération quasi-nulle en milieu dépourvu de facteurs stimulateurs alors que leurs homologues sauvages sont encore capables de se multiplier dans de telles conditions. Cette croissance assez soutenue ne peut être la conséquence que d'un facteur pro-prolifératif spontanément sécrété par les cellules PC3 WT elles-mêmes puisque le changement périodique de milieu (empêchant donc l'accumulation d'éventuels produits de sécrétion) diminue fortement la prolifération des cellules PC3 WT (**Figure 62**). Dans ces mêmes conditions, les cellules PC3 GFP-Tspan5 ne sont pas affectées. Ceci indique que leur croissance est certainement sous la dépendance de la présence d'un facteur sérique et qu'elles sont, soit incapables de sécrétion d'un ou plusieurs facteur(s) auto/paracrine(s), soit/et/ou qu'elles ne sont plus capables de réponse proliférative à ce ou ces facteurs.



**Figure 62 : Les cellules PC3 GFP-Tspan5 ne sont pas dépendantes de la concentration d'un facteur sécrété**

Les cellules PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5 sont mises à adhérer 24 heures en milieu complet et celui-ci est remplacé ou pas toutes les 24 heures par du milieu complet neuf. Les cellules sont comptées toutes les 24 heures. Résultats de 3 expériences +/-SEM.

Nous avons réalisé dans cette optique une expérience complémentaire dans laquelle les deux lignées ont été mises en croissance en présence de milieux conditionnés issus des PC3 WT ou des PC3 GFP-Tspan5. Il s'avère qu'un milieu conditionné issu de PC3 WT active plus intensément la croissance des PC3 WT (**Figure 63A gauche**) que celle des PC3 GFP-Tspan5 (**Figure 63A droite**) alors qu'un milieu conditionné issu de PC3 GFP-Tspan5 ne stimule que très légèrement la croissance des PC3 WT (**Figure 63B gauche**) mais en aucune manière celle des PC3 GFP-Tspan5 (**Figure 63B droite**).



**Figure 63 : La composante soluble impliquée dans la stimulation de la prolifération est plus efficacement sécrétée par les PC3 WT**

Les cellules PC3 WT (gauche) ou PC3 GFP Tspan5 (droite) sont mises à adhérer pendant 8 heures en milieu complet puis cultivées en milieu complet ou en milieu complet conditionné issu de 2 jours de culture de cellules PC3 WT (A) ou PC3 GFP Tspan5 (B). La prolifération est contrôlée par comptage à 24 et 48 heures post-adhérence.

Ainsi donc, il ressort de ces expériences que non seulement les cellules PC3-GFP-Tspan5 génèrent un milieu moins stimulateur de croissance que les PC3 WT mais également, que les cellules surexprimant Tspan5 ont une sensibilité très amoindrie aux milieux conditionnés par les cellules PC3 WT. Le délai de croissance des PC3 GFP-Tspan5 pourrait donc être en partie causé par une sensibilité plus faible vis-à-vis d'un ou plusieurs facteurs solubles activateurs de croissance et vraisemblablement sécrétés plus efficacement par les PC3 WT que par les PC3 GFP-Tspan5. Ce défaut de sécrétion pourrait être la conséquence directe de l'inhibition de l'expression d'ADAM10, ou pourrait être dû à une interaction entre Tspan5 et un facteur de croissance qui stabiliserait ce dernier et empêcherait sa sécrétion



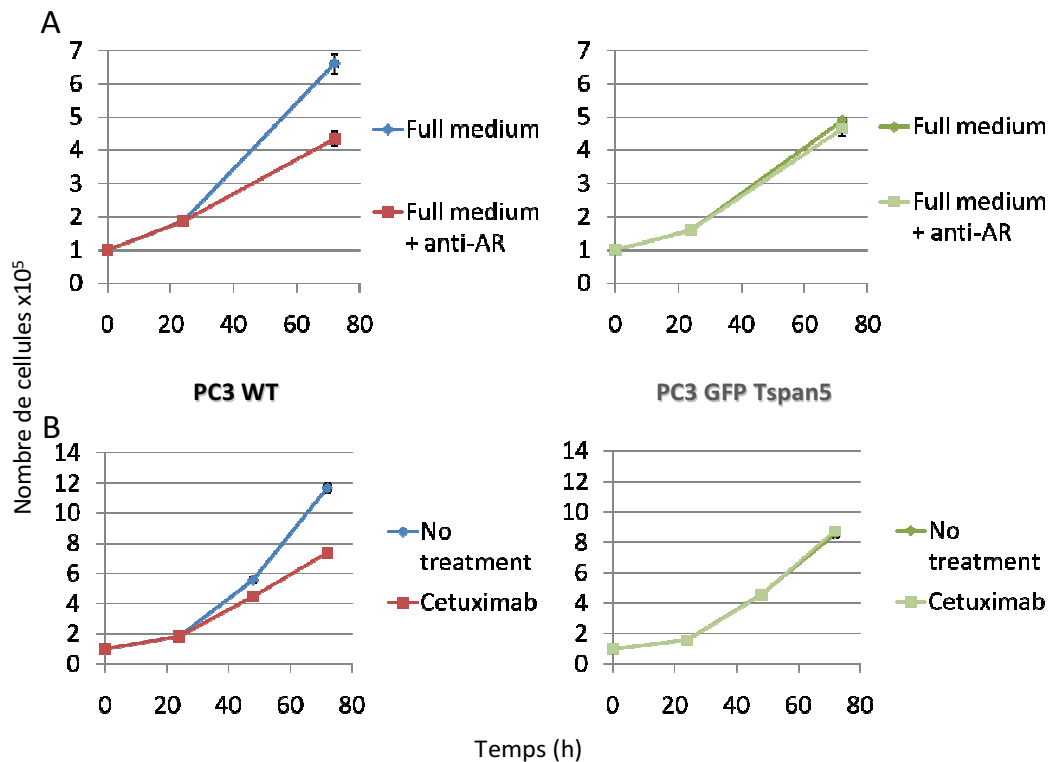
par une métalloprotéase. Il a été montré à ce sujet que CD9 pouvait interagir avec le TGF $\alpha$  via le domaine extracellulaire de ce dernier et inhiber sa conversion en TGF $\alpha$  soluble (Shi et al., 2000). CD9, en effet, semble amener le TGF $\alpha$  stocké dans le Golgi vers la surface et l'y stabilise sans modifier l'expression ou la biosynthèse de TGF $\alpha$  mais en augmentant sa demi-vie à la membrane. Cette augmentation résulte dans ce cas, en une stimulation juxtacrine de l'EGFR et une croissance accrue (Imhof et al., 2008). Cependant, on peut spéculer que dans notre modèle d'étude, le facteur limitant n'est pas la concentration en facteur pro-prolifératif à la surface mais plutôt sa potentielle conversion en forme soluble qui pourrait être moindre dans les cellules surexprimant Tspan5 en conséquence d'une diminution de la quantité totale de la métalloprotéase ADAM10. Les capacités prolifératives des cellules PC3-GFP-Tspan 5 sont entièrement dépendantes d'un ou plusieurs facteurs exogènes contenus dans le sérum de veau fœtal. La nature et le mécanisme d'action de ce ou ces facteurs ne sont pas connus. Cependant, il ne semble pas que leur effet prolifératif soit la conséquence d'une stimulation de la sécrétion d'un facteur de croissance endogène. En effet, les milieux conditionnés par ces cellules sont sans effet prolifératif ou presque sur les cellules PC3 WT. En première hypothèse, la différence de capacité proliférative entre les cellules PC3 WT et PC3-GFP-Tspan5 en présence de sérum serait donc majoritairement due à la capacité moindre ou à l'incapacité de ces dernières à produire un facteur autocrine/paracrine.

### Rôle des ligands de l'EGFR et de l'activité de celui-ci dans la croissance des cellules PC3

Parmi les substrats potentiels d'ADAM10, les ligands du récepteur de l'EGF sont massivement impliqués dans la prolifération cellulaire. A ce titre, il est possible que le facteur recherché appartienne à cette famille de protéines à clivage ADAM-dépendant. Afin de tester cette possibilité, nous avons effectué des tests de croissance en milieu contenant un anticorps neutralisant l'EGFR, le Cetuximab. Nous observons que dans ces conditions, les cellules PC3 WT ont leur croissance inhibée (**Figure 64B gauche**) alors que les PC3 GFP-Tspan5 ne sont pas affectées (**Figure 64B droite**). Il en découle que la fixation d'un ligand à ce récepteur est nécessaire à la croissance de PC3 WT alors que ce n'est pas le cas pour les cellules surexprimant GFP-Tspan5. Il est donc probable que le facteur sécrété par les cellules

WT et capable d'entretenir leur croissance en absence de sérum (**cf. Figure 61**) soit un ligand de l'EGFR. L'absence d'effet du Cetuximab sur la croissance des cellules surexprimant Tspan5 est en accord avec l'hypothèse formulée précédemment que ces cellules présentent un déficit de sécrétion d'un facteur auto/paracrine.

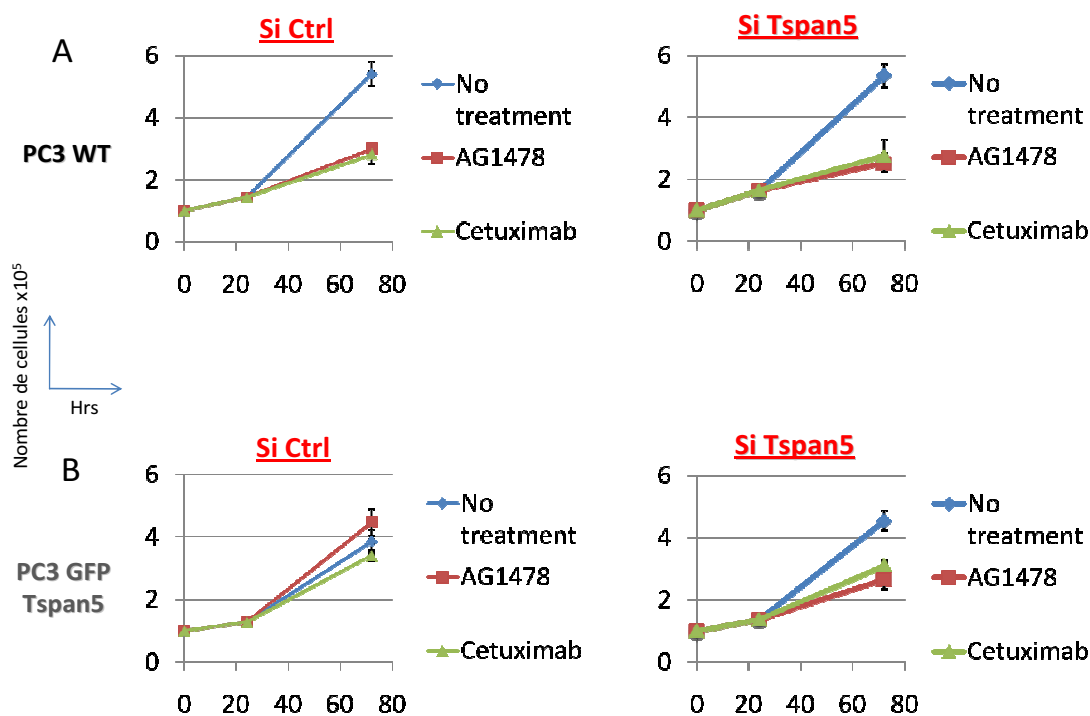
Lorsque l'on examine la littérature au sujet des ligands de l'EGFR sécrétés par les cellules PC3, on se rend compte que l'amphiréguline est détectable par ELISA dans de telles cellules et sécrétée dans le milieu extérieur, au contraire du TGF $\alpha$ , de l'HB-EGF ou de l'EGF (Kasina et al., 2009). Afin de savoir si le ligand de l'EGFR sécrété par les PC3 WT pouvait être l'amphiréguline, nous avons procédé à un test de prolifération en présence d'anticorps neutralisant ce ligand. Il apparaît que lorsque l'amphiréguline du milieu extracellulaire est neutralisée, seules les cellules PC3 WT voient leur croissance ralentie (**Figure 64A gauche**), la croissance des cellules PC3-GFP-Tspan5 n'est pas affectée (**Figure 64A droite**). Si de prime abord ce résultat conforte à nouveau notre hypothèse de travail, un dosage par ELISA de la quantité d'amphiréguline sécrétée par les cellules PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5 révèle que ces quantités sont quasiment identiques. La prolifération ralentie des cellules surexprimant Tspan5 n'est donc pas explicable par une baisse de sécrétion d'amphiréguline. L'absence de baisse de sécrétion de l'amphiréguline par des cellules dont l'expression d'ADAM10 est altérée n'est pas forcément étonnante puisque nous avons montré dans la première partie de ce travail que la transactivation de l'EGFR lors de l'activation du récepteur GPCR tel que le récepteur M3 muscarinique est médiée par un ligand de l'EGFR (potentiellement l'amphiréguline) dont la sécrétion implique la métalloprotéase ADAM17 et non ADAM10. De plus, la majorité des études réalisées jusqu'à présent ont identifié ADAM17 ou ADAM15 (Sahin et al., 2004; Schäfer et al., 2004) et non ADAM10 comme la protéase responsable du clivage et de la sécrétion de son ectodomaine et nous avons vu que l'expression d'ADAM17 dans nos cellules n'est pas modifiée (**Figure 44**). L'absence de réponse des PC3-GFP-Tspan5 à l'amphiréguline serait donc plutôt le reflet d'un effet de Tspan5 s'exerçant sur la capacité de réponse de la cellule à cette stimulation.



**Figure 64 : Les cellules PC3 GFP-Tspan5 ne nécessitent pas la fixation d'un ligand de l'EGFR pour leur croissance**

Les cellules PC3 WT et PC3 GFP Tspan5 sont cultivées en milieu complet pendant 24 heures puis traitées ou non avec (A) un anticorps dirigé contre l'amphiréguline (anti-AR) ou (B) contre l'EGFR (Cetuximab). La prolifération est contrôlée par comptage aux temps indiqués sur la figure. Résultats de 3 expériences +/-SEM.

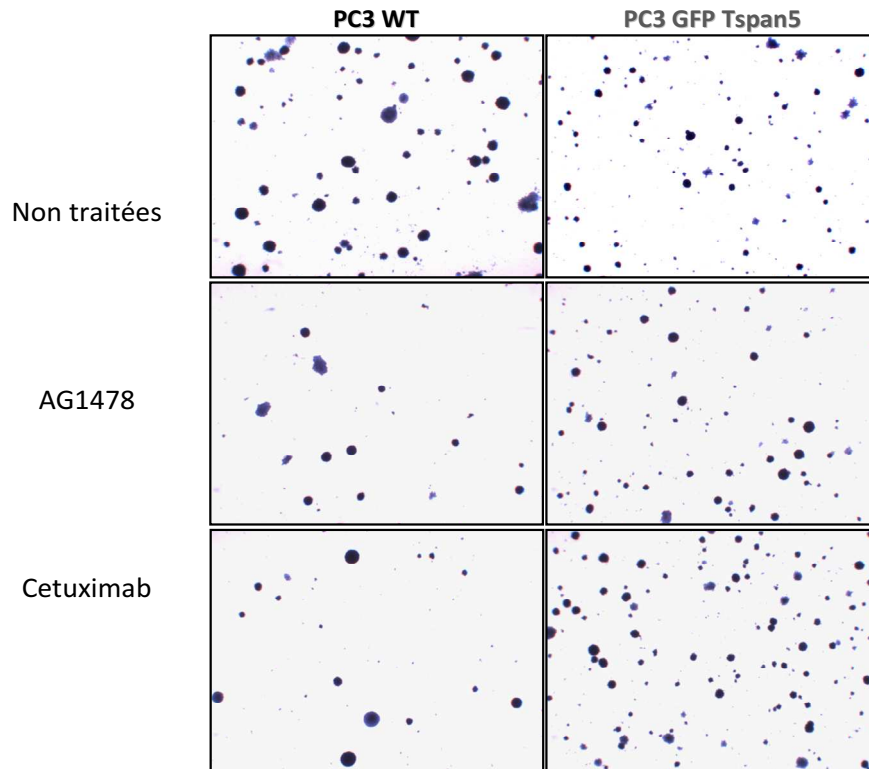
Néanmoins, ces résultats indiquent que la prolifération des PC3 WT est au moins partiellement dépendante de la sécrétion d'un ligand de l'EGFR et de l'activation du récepteur. L'insensibilité des PC3 GFP-Tspan5 au Cetuximab pourrait s'expliquer alors par une activation intracrine de l'EGFR comme rapporté précédemment par exemple dans (Kuwada & Li, 2000). Afin de vérifier ceci, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de l'activité kinasique intrinsèque du récepteur de l'EGF tels que l'AG1478 ou le Gefitinib (Iressa). Comme le montrent les résultats, l'AG1478, comme le Cetuximab, inhibe la croissance des PC3 WT (en accord avec les résultats précédents) et est sans effet sur la prolifération des PC3 GFP-Tspan5 que ce soit lors de cultures en 2 dimensions (**Figure 65A et B gauche**) ou en 3 dimensions (**Figure 66**).



**Figure 65 : La surexpression de Tspan5 cause une perte d'effet antiprolifératif d'inhibiteurs de la signalisation EGF lors de croissances cellulaires en deux dimensions.**

Les cellules PC3 WT (A) ou GFP-Tspan5 (B) subissent une interférence ARN contrôle (gauche) ou dirigée contre Tspan5 (droite) pendant 24 heures puis sont cultivées en présence de 5 $\mu$ M d'inhibiteur d'activité tyrosine kinase de l'EGFR (AG1478) ou de 25 $\mu$ g/mL d'anticorps monoclonal bloquant la fixation de ligands de l'EGFR (Cetuximab) pendant 48 heures. La prolifération est contrôlée par comptage avant et après traitement des cellules. Résultats de 3 expériences +/-SEM.

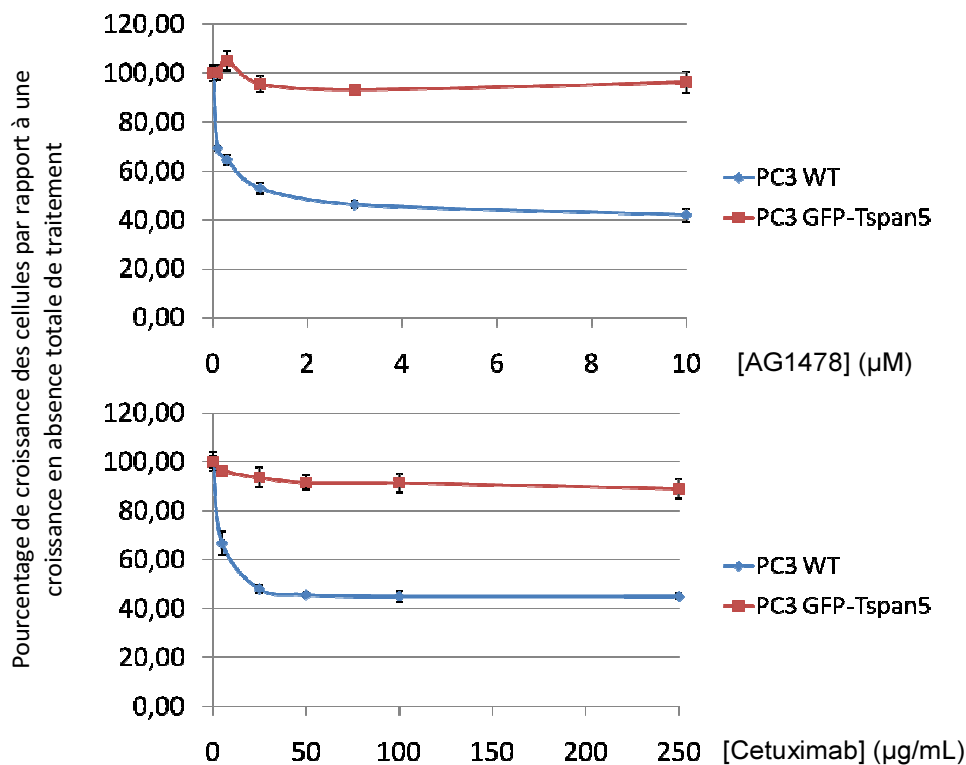
L'absence d'effet antiprolifératif des inhibiteurs de l'EGFR est bien la conséquence de la surexpression de Tspan5 puisque l'interférence ARN dirigée contre cette tétraspanine restaure complètement la sensibilité des cellules PC3-GFP-Tspan5 à leur action (**Figure 65B droite**). Ces résultats indiquent clairement que l'activité kinasique de l'EGFR n'est pas impliquée dans la prolifération des cellules PC3 surexprimant Tspan5 et que la prolifération des cellules PC3-GFP-Tspan5 en présence de sérum, n'est pas sous la dépendance d'une boucle intracrine faisant intervenir ce récepteur à activité tyrosine-kinase.



**Figure 66 : La surexpression de Tspan5 cause une perte d'effet antiprolifératif d'inhibiteurs de la signalisation EGF lors de la prolifération indépendante de l'ancrage.**

Les cellules PC3 WT ou GFP-Tspan5 sont cultivées en présence de 5 $\mu$ M d'inhibiteur d'activité tyrosine kinase de l'EGFR (AG1478) ou de 25 $\mu$ g/mL d'anticorps monoclonal bloquant la fixation de ligands de l'EGFR (Cetuximab) pendant 5 jours dans une matrice à 3 dimensions à base d'agar et de DMEM complet puis marquées en Cristal-Violet et photographiées sous loupe (x10). Images représentatives de 3 expériences.

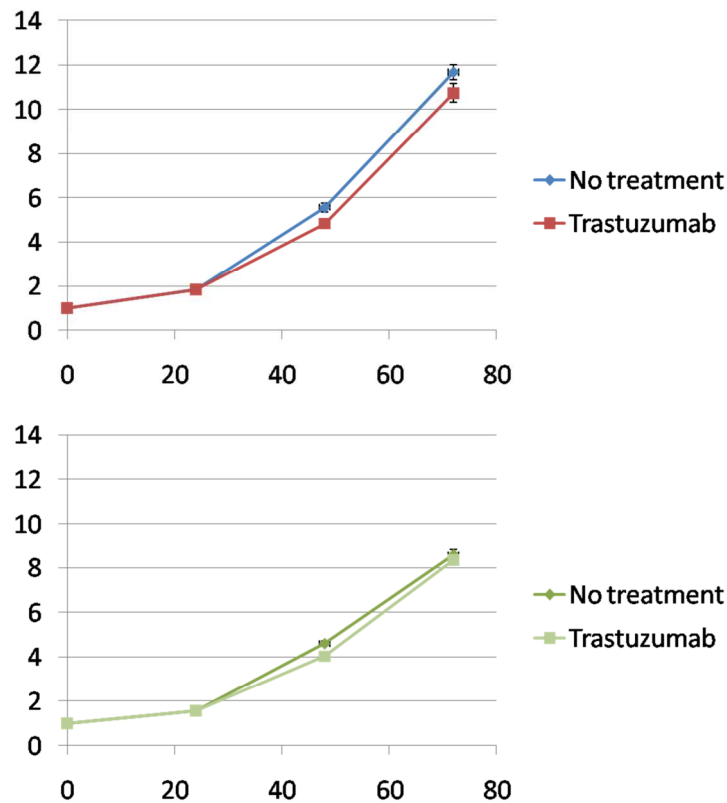
Enfin, nous avons effectué des expériences où nous avons testé l'effet de doses croissantes de Cetuximab ou d'AG1478 sur la croissance des cellules PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5 (**Figure 67**). Ces expériences montrent que l'absence d'effet de ces inhibiteurs sur la lignée PC3 GFP-Tspan5 n'est pas due à l'utilisation de concentrations trop faibles de ces inhibiteurs puisque les concentrations maximales utilisées sont plus élevées que la concentration minimale donnant l'effet inhibiteur maximal sur la lignée PC3 WT (1 $\mu$ M et 25 $\mu$ g/ml respectivement pour l'AG1478 et le Cetuximab). L'absence d'inhibition totale de la prolifération des cellules WT signe l'indépendance d'une partie de la prolifération vis-à-vis de la régulation exercée par la signalisation EGFR.



**Figure 67 : Dose-réponse de la croissance des PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5 en présence d'AG1478 ou de Cetuximab**

Les cellules PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5 sont mises à adhérer 24 heures puis traitées avec différentes concentrations d'AG1478 (haut) ou Cetuximab (bas) pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite comptées et on calcule la croissance des cellules traitées en fonction de celles des cellules non traitées. Ce pourcentage est représenté ici en fonction de la concentration en inhibiteurs de l'EGFR. Résultats de 3 expériences +/-SEM.

Comme nous l'avons vu auparavant, l'EGFR peut former des homo- ou des hétérodimères lors de son activation. La composante EGFR nécessaire à la croissance des PC3 WT pourrait donc être partiellement tributaire de l'activation de l'EGFR par HER2 lors de la formation d'hétérodimères (HER1-HER2). La possibilité d'un rôle pour HER2 dans la régulation de la prolifération de nos lignées de cellules PC3 a donc été testée par l'utilisation d'un anticorps monoclonal neutralisant ce récepteur, le Trastuzumab (Herceptin). Les résultats montrent que ni la croissance des cellules PC3 WT ni celle des PC3 GFP-Tspan5 n'est affectée par l'ajout de Trastuzumab laissant ainsi penser que la composante EGFR est exclusivement dépendante de la formation d'homodimères d'HER1 (**Figure 68**).



**Figure 68 : Les cellules PC3 présentent une prolifération insensible à l'inhibition de HER2**

Les cellules sont mises à adhérer pendant 24 heures en milieu complet puis traitées avec 25 $\mu$ g/mL d'anticorps neutralisant HER2 (Trastuzumab/Herceptin). Les cellules sont comptées toutes les 24 heures. Résultats de 3 expériences +/-SEM.

Afin de vérifier qu'une mutation de la protéine EGFR elle-même ou d'une protéine de la voie de signalisation EGFR, apparue lors de la sélection de notre lignée PC3 GFP-Tspan5, n'était pas responsable de la perte de sensibilité aux molécules ciblant l'EGFR, nous avons profité de l'acquisition récente au niveau de l'hôpital Paul-Brousse, d'un analyseur Sequenom® pour comparer les statuts mutationnels de l'EGFR ainsi que de multiples effecteurs de la voie EGFR dans les cellules PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5. Grâce à l'aimable collaboration du Dr. Raphaël Saffroy, nous avons pu établir que dans les deux cas, aucune des 238 mutations référencées n'était retrouvée dans nos deux types cellulaires (**Figure 69**).

Oncogene	Mutations Detected with the OncoCarta Panel v1.0
<b>ABL1</b>	G250E, Q252H, Y253H, Y253F, E255K, E255V, D276G, F311L, T315I, F317L, M351T, E355G, F359V, H396R
<b>AKT1</b>	V461L, P388T, L357T, E319G, V167A, Q43X, E17del
<b>AKT2</b>	S302G, R371H
<b>BRAF</b>	G464R, G464V/E, G466R, F468C, G469S, G469E, G469A, G469V, G469R, D594V/G, F595L, G596R, L597S, L597R, L597Q, L597V, T599I, V600E, V600K, V600R, V600L, K601N, K601E
<b>CDK4</b>	R24C, R24H
<b>EGFR</b>	R108K, T263P, A289V, G598V, E709K/H, E709A/G/V, G719S/C, G719A, M766_A767insAI, S768I, V769_D770insASV, V769_D770insCV, D770_N771>AGG/V769_D770insASV, D770_N771insG, N771_P772>SVDNR, P772_H773insV, H773>NPY, H773_V774insNPH/PH/H, V774_C775insHV, T790M, L858R, L861Q, E746_T751del, E746_A750del, S752D, L747_E749del, L747_T750del, L747_T751del, L747_S752del, P753S, A750P, T751A, T751P, T751I, S752I/F, S752_I759del, L747_Q ins, E746_T751del, I ins (combined), E746_A750del, T751A (combined), L747_E749del, A750P (combined), L747_T750del, P ins (combined), L747_S752del, Q ins (combined)
<b>ERBB2</b>	L755P, G776S/LC, G776V/C/V, A775_G776insYVMA, P780_Y781insGSP, S779_P780insVGS
<b>FGFR1</b>	S125I, P252T
<b>FGFR3</b>	G370C, Y373C, A391E, K650Q/E, K650T/M
<b>FLT-3</b>	I836del, D835H/Y
<b>JAK2</b>	V617F
<b>KIT</b>	D52N, Y503_F504insAY, W557R/R/G, V559D/A/G, V559I, V560D/G, K550_K558del, K558_V560del, K558_E562del, V559del, V559_V560del, V560del, Y570_L576del, E561K, L576P, P585P, D579del, K642E, D816V, D816H/Y, V825A, E839K, M552L, Y568D, F584S, P551_V555del, Y553_Q556del
<b>MET</b>	R970C, T992I, Y1230C, Y1235D, M1250T
<b>PDGFRA</b>	V561D, T674I, F808L, D846Y, N870S, D1071N, D842_H845del, I843_D846del, S566_E571>K, I843_S847>T, D842V
<b>PIK3CA</b>	R88Q, N345K, C420R, P539R, E542K, E545K, Q546K, H701P, H1047R/L, H1047Y, R38H, C901F, M1043I
<b>HRAS</b>	G12V/D, G13C/R/S, Q61H/H, Q61L/R/P, Q61K
<b>KRAS</b>	G12C, G12R, G12S, G12V, G12D, G12A, G12F, G13V/D, A59T, Q61E/K, Q61L/R/P, Q61H/H
<b>NRAS</b>	G12V/A/D, G12C/R/S, G13V/A/D, G13C/R/S, A18T, Q61L/R/P, Q61H, Q61E/K
<b>RET</b>	C634R, C634W, C634Y, E632_L633del, M918T, A664D

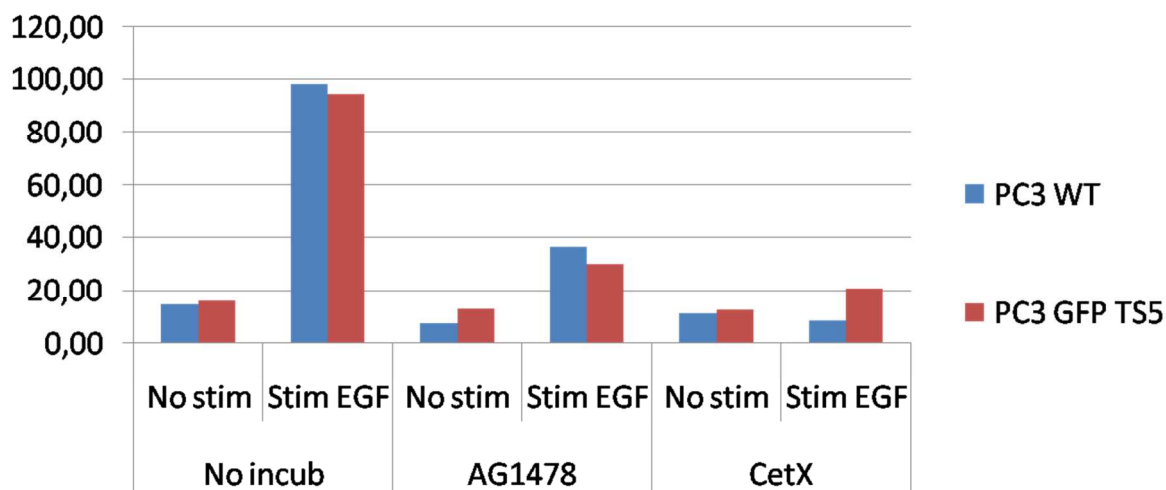
PC3 WT	PC3 GFP-Tspan5
Non muté	Non muté

**Figure 69 : Les PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5 ne présentent aucune des mutations identifiées des composants de la signalisation EGFR**

L'ADN issu de cellules PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5 est amplifié par PCR grâce à des amorces nucléotidiques spécifiques et la présence ou nom de mutations connues au préalable est analysée grâce à un analyseur SEQUENOM® en utilisant la banque de primers OncoCarta Panel v1.0.

Cette croissance ralentie pourrait-elle alors s'expliquer par une altération de la « stimulabilité » de l'EGFR lorsque Tspan5 est surexprimé ? Lorsque nous stimulons des cellules par de l'EGF, nous nous apercevons que la phosphorylation de l'EGFR est aussi efficace dans les deux types cellulaires WT et GFP-Tspan5 et sensible à l'inhibition aussi bien par le Cetuximab que par l'AG1478 (**Figure 70**). La « stimulabilité » de l'EGFR est donc équivalente dans les deux types cellulaires et ne peut expliquer cette différence de croissance.





**Figure 70 : Les PC3 sont réceptives à une stimulation de l'EGFR et celle-ci est efficacement inhibée par AG1478 et Cetuximab**

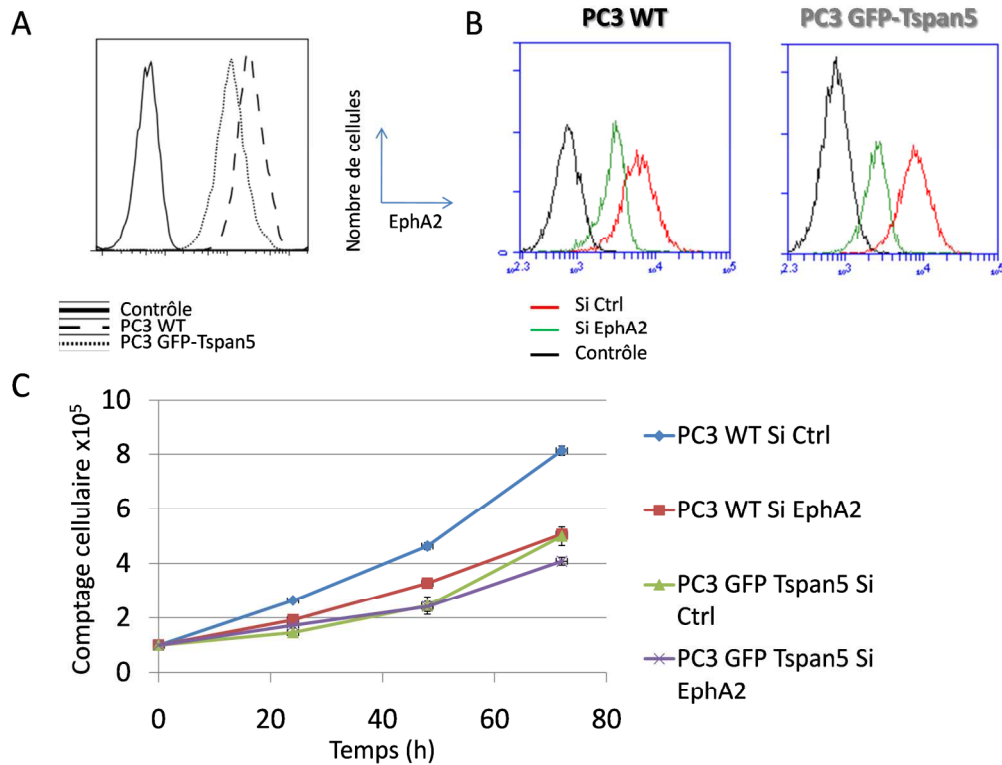
Les cellules PC3 WT et PC3 GFP-Tspan5 sont mises à adhérer en milieu complet pendant 24 heures puis privées de sérum pendant une nuit et traitées avec 25 µg/ml Cetuximab ou 5 µM AG1478 pendant 30 minutes avant une stimulation de 15 minutes par 50 ng/ml d'EGF. Les cellules sont lysées 30 minutes en PBS-Triton-X100 1%, EDTA 5 mM supplémenté en orthovanadate 100 µM et les protéines séparées par SDS-PAGE. Les protéines EGFR ainsi que la proportion phosphorylée de celles-ci est déterminée par Western-blots avec les anticorps adéquats et l'ensemble est normalisé à une détection de la tubuline. On représente ici la phosphorylation d'EGFR (Unités Arbitraires) en fonction des différentes cellules et conditions de stimulation.

Il apparaît donc clairement de par les expériences réalisées jusqu'à présent, que la surexpression de Tspan5 conduit à une inhibition au moins partielle de la prolifération cellulaire. Cette inhibition apparaît être la conséquence d'une signalisation EGFR altérée à un niveau postérieur à l'activation proprement dite de l'activité kinasique du récepteur. Semble aussi être altérée dans ces cellules, la sécrétion de facteurs impliqués dans la régulation auto/paracrine de la prolifération cellulaire. Cependant, à l'heure actuelle, nous ne pouvons fournir aucun lien univoque entre la diminution de l'expression d'ADAM10 et l'altération de la fonction proliférative.

## Rôle du système Eph-éphrine dans la croissance des cellules PC3

Reprenant notre raisonnement au niveau de l'observation de la baisse d'expression d'ADAM10 coïncidant avec une diminution de la croissance cellulaire dans les cellules PC3 GFP-Tspan5, nous avons cherché d'autres cibles d'ADAM10 susceptibles d'altérer la croissance. Parmi celles-ci, nous avons identifié le complexe Eph-éphrine comme étant particulièrement digne d'intérêt. En effet, il a été montré que les profils d'expression de différentes lignées saines et cancéreuses de prostate différaient au niveau de certains récepteurs Eph et ligands éphrines (Fox et al, 2006). Nous nous sommes particulièrement intéressés au récepteur EphA2 puisque c'est le récepteur de type Eph le plus abondamment exprimé dans les cellules PC3 (Fox et al., 2006). Nous savons qu'ADAM10 est la métalloprotéase responsable du clivage des ligands éphrines (dont ephrineA1) en trans après leur association à leur récepteur Eph (Janes et al., 2005). EphA2 est surexprimé dans la plupart des cancers et est responsable d'une résistance au Trastuzumab ciblant HER2 dans le cancer du sein (Zhuang et al., 2010).

Dans notre cas, le récepteur EphA2 est plus exprimé à la membrane plasmique des cellules PC3 WT que chez leurs homologues surexprimant Tspan5 (**Figure 71A**). Il est communément admis que l'expression d'EphA2 est fréquemment associée à un potentiel métastatique élevé ainsi qu'une survie réduite (Miyazaki et al., 2003; Thaker et al., 2004) bien qu'une étude récente dans le cas de cancer pulmonaire semble suggérer l'inverse (Ishikawa et al., 2012). Notre étude semble aller dans le sens des articles initiaux puisqu'une inhibition de la transcription du gène codant EphA2, par interférence ARN, entraîne une forte baisse de l'expression d'EphA2 à la surface des cellules (**Figure 71B**) associée à une diminution de la prolifération des cellules PC3 WT alors que ce même traitement n'affecte pas la croissance des cellules PC3-GFP-Tspan5 (**Figure 71C**).



**Figure 71 : L'inhibition de l'expression d'EphA2 induit une diminution de la prolifération des cellules PC3 WT**

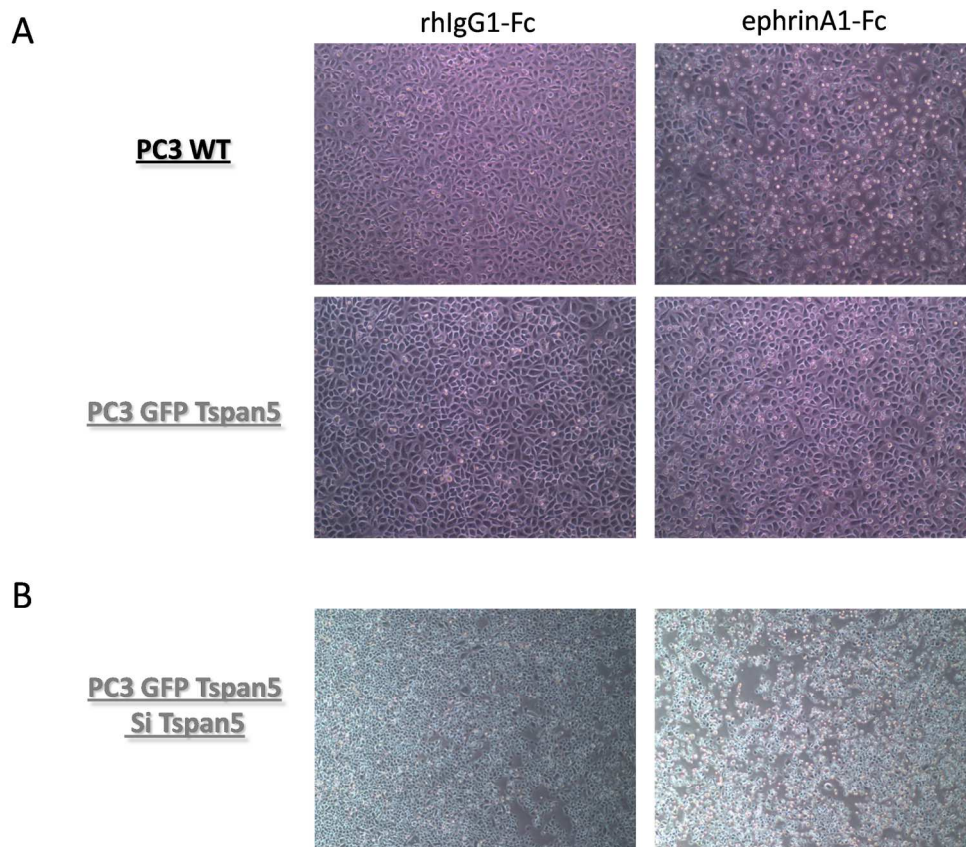
- A. Les cellules PC3 WT ou GFP-Tspan5 sont immunomarquées avec un anticorps dirigé contre EphA2 et l'expression de surface d'EphA2 est analysée par cytométrie en flux.
- B. Les cellules PC3 WT ou GFP-Tspan5 subissent une interférence ARN contrôle ou dirigée contre le récepteur EphA2 et l'expression de surface d'EphA2 est analysée par cytométrie en flux.
- C. Les cellules subissent l'interférence décrite en B puis sont mises à adhérer en milieu complet. La prolifération est contrôlée par comptage des cellules. Résultats de 3 expériences +/-SEM.

### Altération de la réponse du récepteur EphA2 à son ligand ephrineA1 dans les cellules PC3 GFP-Tspan5

L'expression optimale d'EphA2 semble donc nécessaire à une croissance maximale des cellules PC3 WT alors que sa perte d'expression ne semble pas influencer la croissance des PC3 surexprimant Tspan5. Il se peut donc que le dépassement d'un seuil d'expression d'EphA2 soit nécessaire à la prolifération optimale des cellules PC3. Une expression en-deçà de celui-ci lors de la surexpression de Tspan5 ou lors de l'interférence ARN sur les cellules

PC3 WT conduit alors à une diminution des capacités prolifératives de ces cellules. Afin de tenter de comprendre les raisons de cette croissance différentielle selon le type cellulaire et le niveau d'expression d'EphA2, nous nous sommes attachés à analyser les paramètres d'activation du récepteur EphA2 par un de ses ligands, l'éphrineA1.

Lorsque des cellules sont incubées en présence de ligands éphrineA1, la prolifération des cellules n'est pas affectée à l'échelle classique de trois jours de comptages (non montré). Cependant, en observant ces incubations plus précocement, nous nous sommes aperçus que les cellules PC3 WT formant initialement un tapis de cellules jointives s'arrondissaient rapidement après une stimulation par éphrineA1 au contraire de leurs homologues surexprimant Tspan5 (**Figure 72A**). Ces cellules arrondies ne se détachent jamais du fond de puits où nous les avons étalées auparavant. Elles se ré-étalent rapidement en quelques minutes et forment un tapis cellulaire indiscernable d'un tapis non traité ou de cellules PC3 surexprimant Tspan5. Ce phénomène de « rounding » a déjà été décrit dans la littérature (Miao et al., 2000) et correspond à une des réponses cellulaires les plus précoces lors de l'activation du récepteur EphA2 par la forme de ligand soluble d'éphrineA1 (ephrinA1-Fc). Ce phénomène récapitule assez bien le concept de « de-adhesion » soutenu par l'équipe de Janes où la fixation d'EphA3 à son ligand éphrineA5 induit une relaxation cytoplasmique de la partie kinasique du récepteur Eph associé à ADAM10 et cette conformation entraîne l'action d'ADAM10 sur l'éphrine en trans permettant *in fine* ainsi aux cellules de se décrocher les unes des autres (Janes et al., 2009) ou de repousser les axones (Hattori, 2000). A nouveau, nous avons pu vérifier que l'absence d'arrondissement des cellules PC3 GFP-Tspan5 était bien due à la surexpression de Tspan5 puisque l'interférence ARN de cette tétraspanine se traduit par un rétablissement de la réponse à l'ephrinA1-Fc (**Figure 72B**). Une interprétation possible de ces résultats est que la surexpression de Tspan5 conduit à une diminution de l'activité d'ADAM10 vis-à-vis de sa cible éphrineA1, activité nécessaire à l'expression de la réponse « rounding ». Cette diminution d'activité peut être la conséquence de la baisse d'expression d'ADAM10 mais aussi de l'interaction privilégiée entre Tspan5 et ADAM10 qui pourrait empêcher un recrutement de la protéase par le récepteur Eph.



**Figure 72 : La surexpression de Tspan5 inhibe l'arrondissement (« rounding ») des cellules PC3 après stimulation par éphrineA1**

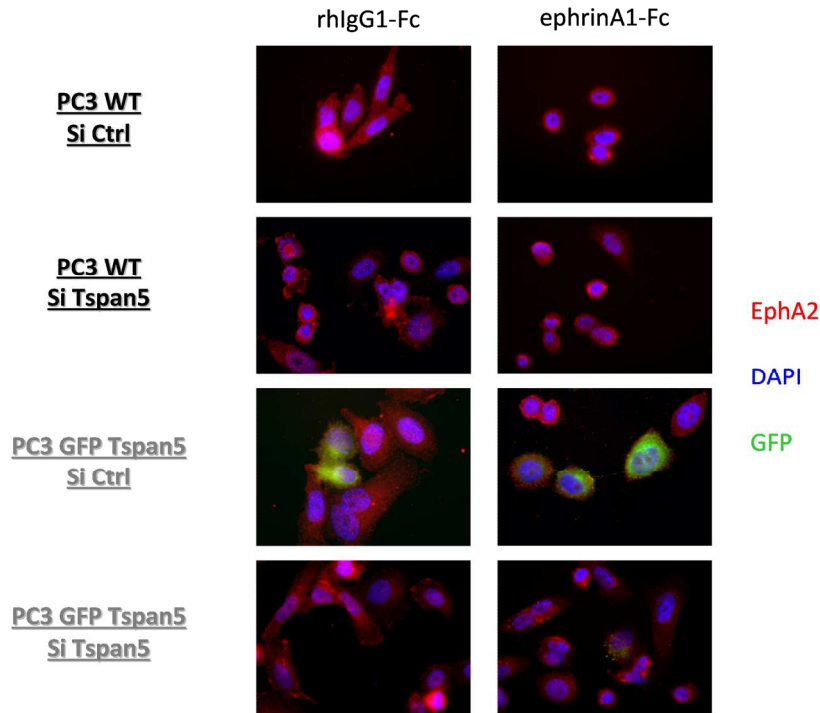
A. Les cellules PC3 WT et GFP Tspan5 sont privées de sérum pendant 20h puis stimulées pendant 15 minutes avec 0.5µg/mL d'ephrinA1-Fc ou de rhlgG1 en milieu DMEM supplémenté en BSA 1%. Les cellules sont alors immédiatement photographiées au niveau de 3 champs optiques (capturés par microscopie x20) indépendants et chaque condition expérimentale réalisée en triple. Une photo représentative de chaque condition est présentée.

B. Les cellules PC3 GFP Tspan5 subissent une interférence ARN contrôle ou dirigée contre Tspan5, sont privées de sérum pendant 20h puis stimulées pendant 15 minutes et analysées comme décrit en A.

Les cellules PC3 GFP-Tspan5 ne semblent pas répondre à une stimulation par le ligand éphrineA1 contrairement aux PC3 WT. Nous avons contrôlé auparavant que les PC3 WT et GFP-Tspan5 exprimaient EphA2 à leur surface. Il est donc possible que les PC3 GFP-Tspan5 lient l'éphrineA1 mais n'émettent pas de réponse ou une réponse insuffisante en termes de signalisation aval. Sachant que la fixation d'un ligand au récepteur entraîne un

regroupement fonctionnel des récepteurs Eph, nous avons voulu vérifier si une stimulation par le ligand éphrineA1 pouvait induire une localisation différentielle d'EphA2 selon la surexpression ou non de Tspan5. Pour cela, nous avons procédé à des expériences d'immunofluorescences sur lame en utilisant un anticorps dirigé contre EphA2. Comme on peut l'observer sur la **figure 73**, en absence de stimulation, le récepteur EphA2 est exprimé à la surface cellulaire de manière assez diffuse quel que soit le niveau d'expression de Tspan5. Lorsque les cellules sont stimulées par ephrinA1-Fc, les récepteurs EphA2 situés sur les cellules PC3 WT se regroupent et forment des « patchs », des regroupements discrets à la fluorescence renforcée. Ces observations concordent avec celles contenues dans l'élégant article d'une équipe de Berkeley, USA qui observe un tel phénomène sur un système de ligands éphrineA1 fluorescents à la mobilité variable sur lequel sont apposées des cellules MDA-MB-231 pendant 15 minutes (Salaita et al., 2010). Ce « patching » observé pourrait correspondre à la tétramérisation circulaire des systèmes Eph-éphrine décrite dans (Himanen et al., 2004). Il a été suggéré qu'une particularité de la signalisation Eph est l'assemblage d'oligomères Eph-éphrine associés à d'autres contacts moléculaires nécessaires à la formation de clusters de signalisation fonctionnels (Day et al., 2005).

Dans le cas de cellules PC3 GFP-Tspan5, un tel regroupement de protéines n'est pas observé. La localisation d'EphA2 reste membranaire et diffuse. L'effet de « patching » après stimulation par éphrineA1 absent avec ces cellules, est restauré à la suite d'une interférence ARN dirigée contre Tspan5. Il semble donc que les cellules surexprimant Tspan5 ont perdu la capacité à répondre classiquement à une stimulation par un ligand des récepteurs EphA2.



**Figure 73 : La surexpression de Tspan5 inhibe la formation d'agrégats membranaires locaux (patches) d'EphA2 en réponse à une stimulation par l'éphrineA1**

Les cellules PC3 WT et GFP Tspan5 subissent une interférence ARN contrôle ou dirigée contre Tspan5, sont privées de sérum pendant 20h puis stimulées pendant 15 minutes avec 0.5µg/mL d'ephrinA1-Fc ou rhlgG1-Fc en milieu DMEM supplémenté en BSA. Elles sont ensuite immédiatement fixées en paraformaldéhyde 4%, perméabilisées en Triton X-100 puis immunomarquées avec un anticorps dirigé contre le récepteur EphA2 et analysées en microscopie à épifluorescence (x630). Images représentatives de 3 expériences.

Il est possible que la surexpression de Tspan5 entraîne une modification de la fluidité membranaire qui empêche l'effet de « patching » malgré une liaison entre ligands et récepteurs effective. En effet, nous savons que le réseau de tétraspanines possède des caractéristiques lipidiques distinctes de celles de la membrane prise dans son ensemble. A titre d'exemple, l'équipe de Salaita a observé qu'en saturant une matrice contenant de l'éphrineA1 en 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholines (inhibant ainsi fortement sa fluidité), aucune diffusion ni « patching » de ces éphrines n'est visible après présentation de cellules porteuses de récepteurs EphA2 (Salaita et al., 2010).

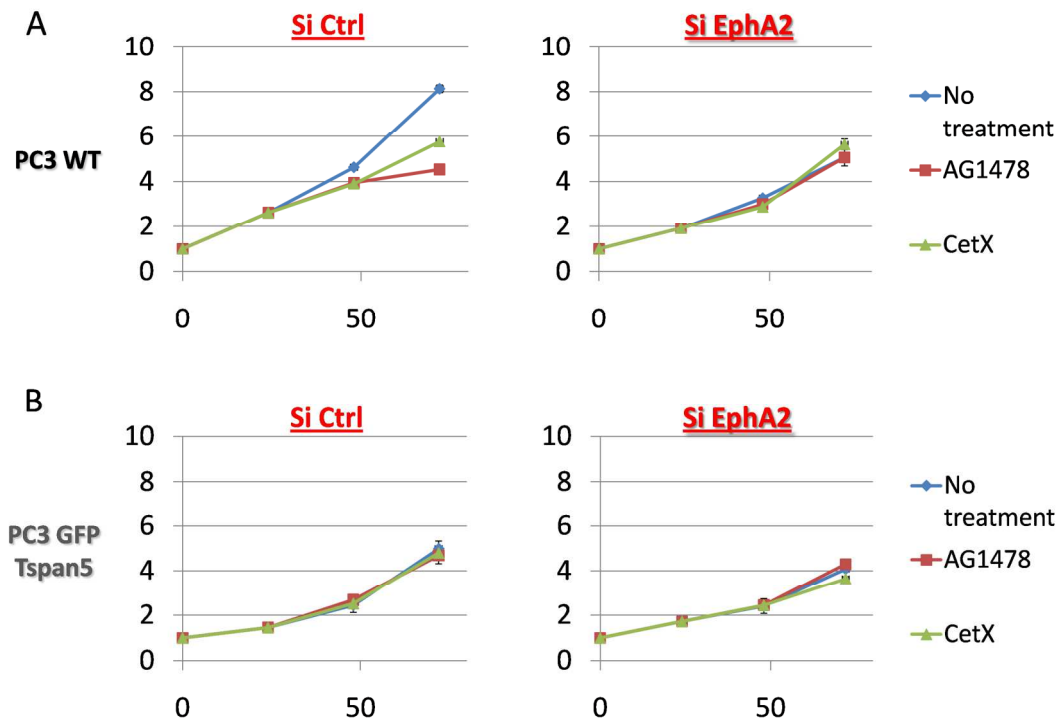
## Interactions entre les voies EGFR et Eph

Des données de la littérature indiquent que l'activation du récepteur EGFR entraîne l'expression d'EphA2. Ces deux récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) ont par ailleurs des voies de signalisation aval communes telles que PI3K et MAPK et co-immunoprécipitent lors d'une stimulation de l'EGFR (Larsen et al., 2007). Ces propriétés nous ont conduits à examiner l'hypothèse d'un possible lien entre ces deux voies dans notre contexte de prolifération résistante aux drogues ciblant l'EGFR. Il a récemment été proposé que lors de la mise en place de résistance cellulaire aux inhibiteurs de tyrosine-kinases (TKI), la signalisation EGFR est grandement altérée et que des communications entre divers récepteurs se mettent en place. Ces récepteurs incluent l'intégrine  $\beta$ 4, EphA2, CDCP1, Axl et Jak1, et il semble que lors de la mise en place de la résistance aux TKIs, l'EGFR soit capable de coimmunoprécipiter ces protéines en présence de Triton X-100 (Gusenbauer et al., 2012). La néo-communication entre ces acteurs serait facilitée par la mise en place d'interactions permettant donc des transactivations entre ces différents récepteurs à activité tyrosine kinase, permettant de passer outre le rôle d'un TKI particulier.

Puisque ce complexe protéique semble capable d'émettre une signalisation aval lors de l'établissement d'une résistance aux TKIs, que se passe-t-il alors dans le cas nous concernant où la composante dépendante de l'EGFR de la croissance est abolie et où le récepteur EphA2 ne semble plus activable dans les cellules PC3 GFP-Tspan5 ? Pour répondre à cette interrogation, nous avons réalisé des tests de croissance en combinant les inhibitions d'EphA2 et de l'EGFR par interférence ARN et traitement avec AG1478 respectivement. Il apparaît qu'une interférence ARN dirigée contre le récepteur EphA2 entraîne une baisse de la prolifération cellulaire et une indépendance des cellules sauvages vis-à-vis d'un traitement par AG1478 ou Cetuximab (**Figure 74A**) alors que cette même inhibition d'EphA2 n'a pas d'effet sur la croissance des cellules surexprimant Tspan5 que ce soit en absence ou en présence d'AG1478 ou de Cetuximab (**Figure 74B**). Il semble donc que lorsqu'EphA2 n'est plus exprimé, la croissance des cellules PC3 WT devienne indépendante de l'activité de



l'EGFR de manière tout à fait analogue à ce qui est observé dans le cas de la surexpression de Tspan5.



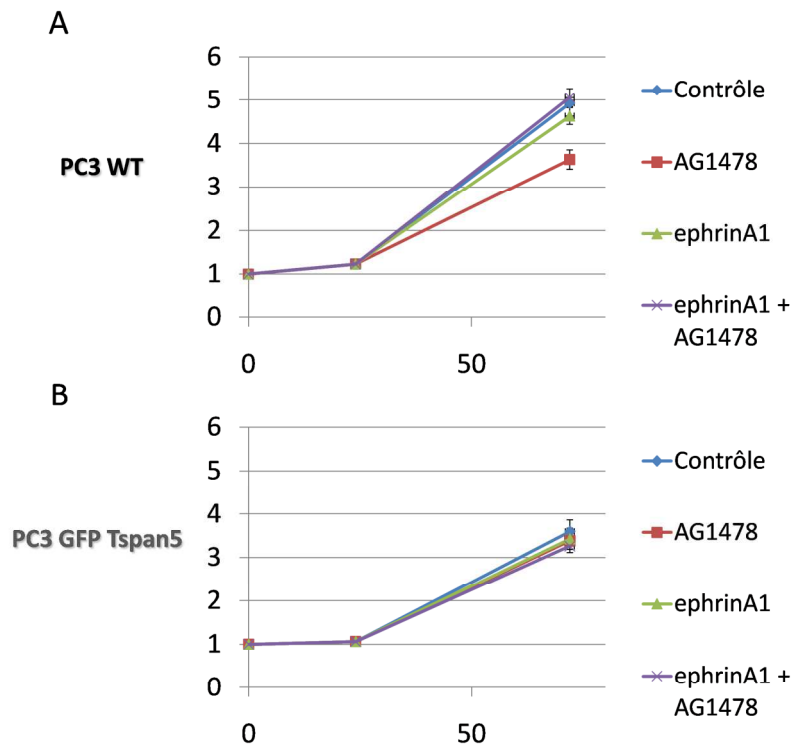
**Figure 74 : L'inhibition de l'expression d'EphA2 chez des PC3 WT induit une résistance aux inhibiteurs de l'EGFR**

Les cellules PC3 WT (A) ou GFP Tspan5 (B) subissent une interférence ARN contrôle ou dirigée contre le récepteur EphA2 puis sont cultivées en absence ou en présence de 5µM d'inhibiteur d'activité tyrosine kinase de l'EGFR (AG1478) ou de 25µg/mL d'anticorps monoclonal bloquant la fixation de ligands de l'EGFR (Cetuximab). La prolifération est contrôlée par comptage toutes les 24 heures. Résultats de 3 expériences +/-SEM.

Après avoir inhibé l'expression du récepteur EphA2, nous avons tenté de réaliser un test de croissance en conditions d'activation d'EphA2 et avec ou sans traitement inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR afin de mieux comprendre cette apparente perte de la composante dépendante de l'EGFR lors de la prolifération des cellules PC3 WT.

La stimulation des cellules PC3 WT par l'éphrineA1 n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire mais entraîne par contre une perte de l'effet inhibiteur de l'AG1478 (**Figure 75A**).

L'AG1478 est toujours sans effet sur la prolifération des cellules PC3 GFP-Tspan5 que ce soit en absence ou en présence d'éphrineA1 (**Figure 75B**). L'activation du récepteur EphA2 des cellules PC3-WT permet donc de passer outre l'effet inhibiteur de la prolifération de l'AG1478.



**Figure 75 : La stimulation des PC3 WT par ephrineA1 induit une résistance à l'AG1478**

Les cellules PC3 WT et PC3 GFP Tspan5 sont mises à adhérer pendant 24 heures en milieu DMEM complet puis incubées ou non pendant 48 heures avec 0.5µg/mL de ligand murin d'EphA2 (mouse ephrinA1) en absence ou en présence de 5µM d'inhibiteur d'activité tyrosine kinase de l'EGFR (AG1478) pendant 48 heures. La prolifération est contrôlée par comptage avant et après traitement. Résultats de 3 expériences +/-SEM.

L'ensemble de ces résultats tend donc à montrer que la présence d'une quantité suffisante de récepteurs EphA2 à la surface des PC3 WT est nécessaire et responsable de la dépendance de la croissance de ces cellules à une signalisation EGFR. La surexpression de Tspan5 comme l'interférence ARN d'EphA2 conduisent à une diminution d'expression d'EphA2 à la membrane plasmique corrélée à une baisse de la prolifération et à une indépendance vis-à-vis de la signalisation EGFR. Il semble donc que dans nos conditions de

culture, la présence d'EphA2 soit nécessaire à l'expression d'une régulation auto/paracrine de la signalisation EGFR. L'activation du récepteur EphA2 serait par contre suffisante pour soutenir la prolifération cellulaire indépendamment de la présence d'une signalisation EGFR active. Dans le cas des cellules surexprimant Tspan5, la diminution de la quantité de récepteurs exprimés à la surface ainsi que la perte de leur stimulation par un ligand pourrait dès lors fournir un début d'explication d'une indépendance « naturelle » des PC3 surexprimant Tspan5 vis-à-vis de la signalisation EGFR.

## Conclusion

Ce travail s'inscrit dans la continuité de celui réalisé dans le laboratoire par Cécile Arduise et dont une grande partie a été publiée dans le *Journal of Immunology* en 2008. Mon projet initial était d'établir un modèle permettant de décrypter le rôle des tétraspanines dans la régulation d'ADAM10. Dans un premier temps, nous avons pu confirmer et étendre les résultats de Cécile Arduise à un autre modèle cellulaire et vis-à-vis d'une nouvelle protéine membranaire. Nous avons montré en effet que dans le modèle des cellules PC3, l'engagement de différentes tétraspanines par des anticorps monoclonaux conduisait à une sécrétion accrue de l'ectodomaine de l'E-cadhérine par l'intermédiaire de la métalloprotéase ADAM10. Ce résultat était très encourageant car cette protéine est connue pour être clivée par ADAM10. Cependant, nos tentatives pour identifier une voie « physiologique » impliquant en particulier l'activation d'un récepteur GPCR comme le récepteur M3 muscarinique à l'acétylcholine, n'ont pas été couronnées de succès. En effet, et contrairement à notre attente, si l'activation de ces récepteurs conduit bien à une stimulation du clivage membranaire de l'ectodomaine de l'E-cadhérine, mais aussi à une transactivation du récepteur de l'EGF, celle-ci implique la métalloprotéase ADAM17 et non ADAM10. Ces résultats certes potentiellement importants en particulier dans le cadre de l'étude des mécanismes cellulaires impliquant une protéine d'adhérence telle que l'E-cadhérine, sont clairement défavorables pour l'étude de la contribution des tétraspanines dans le mécanisme de régulation de la métalloprotéase ADAM10.

L'ensemble des données présentées ensuite dans ce mémoire démontre dans un premier temps une interaction directe entre les tétraspanines de la sous-famille des TspanC8s et la métalloprotéase ADAM10. Une des conséquences de cette interaction est que certains des membres de cette sous-famille sont impliqués dans la régulation du trafic intracellulaire permettant le passage d'ADAM10 du réticulum à la membrane plasmique. A travers ce contrôle de l'expression d'ADAM10 à la membrane plasmique, les TspanC8s exercent un rôle important et conservé au cours de l'Evolution dans la régulation de la voie Notch. Puis, dans un second temps, nous avons vu que parmi ces interactions entre TspanC8s et ADAM10, une au moins était singulièrement intéressante puisqu'elle avait pour

particularité d'agir négativement sur l'expression totale ainsi que membranaire de son partenaire direct ADAM10. Cette interaction entre la tétraspanine Tspan5 et ADAM10 a des répercussions sur la prolifération des cellules PC3. En effet, il s'avère que la diminution d'expression d'ADAM10 causée par une surexpression de Tspan5 dans ce type cellulaire est corrélée à une inhibition partielle de la prolifération des cellules PC3. L'ensemble des données que nous avons recueillies indique que cette surexpression de Tspan5 a des conséquences multiples et concourant toutes à une altération des capacités prolifératives des cellules. Ces cellules surexprimant Tspan5 sont déficientes dans leur capacité à sécréter un facteur responsable de la régulation autocrine de la prolifération des cellules « sauvages ». Ces cellules, contrairement à leurs homologues « sauvages », semblent aussi déficientes dans leur capacité proliférative en réponse à la stimulation de l'EGFR. S'il n'est pas possible de l'exclure, l'implication d'ADAM10 dans ces dérégulations observées en conséquence de la surexpression de la tétraspanine Tspan5 n'est pas pour l'instant pas établie. Enfin, nous avons pu émettre et étayer l'hypothèse selon laquelle un autre récepteur à tyrosine kinase, EphA2 dont la régulation est très dépendante d'ADAM10 pourrait être un régulateur de la dépendance de la croissance à une signalisation EGFR.

Un certain nombre des résultats décrits dans ce manuscrit demandent donc à être étayés. Ainsi, qu'en est-il de la généralité de l'inhibition de l'expression d'ADAM10 lors de la « surexpression » de Tspan5. Cette propriété est-elle restreinte au modèle de cellules PC3 ou peut-elle être étendue à d'autres modèles cellulaires ? La cellule PC3 n'exprime pas Tspan14, est-ce une raison de l'effet de Tspan5 ? De manière plus générale, dans le contexte du modèle du « tetraspanin web », le profil d'expression des différentes tétraspanines de la sous-famille TspanC8 est-il un paramètre déterminant ? La corrélation entre quantité d'ARNm et quantité de protéine n'est pas absolue et jusqu'à présent, à notre connaissance, aucun anticorps dirigé contre les TspanC8 n'est disponible. La production de tels anticorps dirigés en particulier contre Tspan5 nous paraît indispensable (voir ci-dessous). Elle permettra en particulier d'étudier l'expression endogène de cette tétraspanine non seulement dans les lignées cellulaires modèles qui sont pour la plupart issues de tumeurs mais aussi dans des tissus « sains ».

Concernant la « régulation » de l'expression d'ADAM10, il nous semble indispensable de tester l'implication de miRNA dont l'expression pourrait être accrue en conséquence, directe ou indirecte de la surexpression de Tspan5.

Que la modulation de l'expression de la métalloprotéase ADAM10 soit impliquée ou non dans la dérégulation des capacités prolifératives des cellules PC3, la poursuite du travail pourrait aussi porter sur l'éclaircissement d'un certain nombre de points.

En ce qui concerne la possibilité que les cellules qui surexpriment Tspan5 aient une capacité sécrétoire altérée comparée aux cellules « sauvages », l'identification du ou des facteurs sécrétés de manière différentielle est absolument nécessaire. Il est possible selon notre hypothèse que celui ou ceux-ci soi(en)t substrat(s) d'ADAM10 puisque la surexpression de Tspan5 entraîne la diminution de son expression mais cela n'est pas obligatoire. Pour tenter d'y voir plus clair, nous avons réalisé des expériences, qui restent préliminaires, où nous avons testé les milieux conditionnés par les deux types cellulaires en utilisant un kit « Angiogenesis Antibody Array » de chez R&D. Celui-ci permet une mesure semi-quantitative de nombreuses protéines sécrétées et nous a permis de constater que la sécrétion d'un certain nombre de celles-ci était déficiente dans les cellules surexprimant Tspan5. Cependant, toutes ne sont pas des substrats d'ADAM10 ou même de métalloprotéases. Cette approche, si elle confirme notre interprétation ne permet que l'identification de protéines a priori. Afin d'apporter une réponse un peu plus définitive à cette question finalement assez fondamentale quant au degré d'implication non seulement d'ADAM10 mais aussi et surtout de Tspan5, dans la régulation de la croissance, il semble maintenant nécessaire et pertinent de procéder à une identification plus exhaustive des composés sécrétés. L'approche par spectrométrie de masse, déjà développée et utilisée dans le laboratoire pour l'identification des composants des complexes à tétraspanines nous paraît la plus appropriée. Une fois identifiées ces protéines, il pourrait être intéressant de déterminer les différents dosages de celles-ci aboutissant *in fine* à la prolifération ou non de cellules cancéreuses. Ceci pourrait peut-être apporter de nouvelles protéines d'intérêt en vue d'un hypothétique ciblage thérapeutique futur, au niveau d'un développement d'anticorps neutralisants par exemple.

Egalement, la diminution de l'activation d'EphA2 lorsque Tspan5 est surexprimé devrait être vérifiée par la quantification en Western-blot de la phosphorylation de cette protéine. Nos essais en ce sens ne se sont pas avérés très fructueux puisqu'une autre protéine très phosphorylée dans notre modèle, CDCP-1, migre au même niveau qu'EphA2 et que l'anticorps que nous avons alors utilisé était dirigé contre l'ensemble des résidus tyrosine phosphorylés et non spécifiquement contre une phosphorylation précise d'EphA2. Nous n'avons pas eu le temps de réaliser des expériences d'immunoprécipitation d'EphA2 qui aurait pu nous permettre de nous affranchir de ce souci. Cependant, nous avons réalisé là encore une analyse semi-quantitative du degré de phosphorylation d'un certain nombre de récepteurs à activité tyrosine-kinase (kit « Phospho-RTK Antibody Array » de chez R&D). Cette approche qui reste elle-aussi préliminaire nous a fourni un résultat extrêmement intéressant puisque, sur des cellules incubées dans des conditions strictement identiques à celles utilisées lors des mesures de prolifération, nous avons observé une hypophosphorylation de différents récepteurs (dont l'EGFR) dans les cellules PC3 surexprimant Tspan5. Cet effet global sur les taux de phosphorylation de divers récepteurs nous fait envisager l'intervention d'une tyrosine-phosphatase dont l'activation concourrait à une limitation de la « stimulabilité » des cellules. A ce sujet, une recherche bibliographique nous a permis d'identifier la phosphatase membranaire PTP1B comme protéine candidate pour ce rôle. En effet, il semble que cette phosphatase soit capable d'interagir avec l'EGFR (Haj et al, 2003) et qu'elle contribue à réguler négativement l'entrée dans le cycle cellulaire dans un modèle de cellules de la cornée (Ishino et al, 2008). Une analyse par Western blot utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre PTP1B et/ou une analyse plus globale par spectrométrie de masse des complexes à tétraspanines issus d'une immunoprécipitation de la tétraspanine Tspan5 (qui ne peut pour l'instant être réalisée qu'en condition de surexpression du transgène GFP-Tspan5) pourrait nous permettre d'identifier l'ensemble de « l'interactome » de Tspan5 et pourquoi pas une telle phosphatase. Une telle approche permettrait de déterminer si la surexpression de Tspan5 pourrait initier un rapprochement fonctionnel entre différents RTKs et établir ainsi une signalisation indépendante de l'EGFR.

De même, une autre orientation future des recherches concernant ce sujet pourrait être d'identifier la ou les zone(s) d'interaction entre Tspan5 et ADAM10 par une approche de

mutagénèse dirigée ou de création de chimères entre différentes TspanC8s et/ou d'autres tétraspanines ne se lient pas à ADAM10 (Tspan10 par exemple). Ainsi, nous pourrions établir un modèle où l'interaction entre Tspan5 mutée et ADAM10 est compromise et vérifier si l'expression d'ADAM10 dépend de l'interaction avec Tspan5 et si nos résultats concernant la croissance nécessitent l'interaction entre ces deux protéines ou si la simple surexpression de la tétraspanine exerce une action directe ou non sur un composant de la croissance cellulaire.

Nous avons mis en exergue à maintes reprises que l'étude de cette famille de tétraspanines TspanC8s était rendue extrêmement compliquée par l'absence d'anticorps dirigés contre celles-ci. En effet, le seul outil permettant d'examiner « l'expression » au sens le plus large du terme, des TspanC8s est la RT-qPCR. Or, il n'est pas possible de conclure quant au niveau d'expression (au sens « post-traductionnel » du terme) de ces protéines avec ce seul outil. Néanmoins, nous mentionnerons que parmi la quinzaine de lignées que nous avons pu examiner, les PC3 sont les cellules présentant le plus grand nombre de copies d'ARNm codant Tspan5. A ce titre, dans la perspective d'une poursuite des études sur cette protéine, il apparaît nécessaire de pouvoir faire appel à un anticorps fiable puisque les rares anticorps commerciaux sont soit inefficaces sur notre modèle, soit retirés de la vente... Vue la conservation de cette protéine au cours de l'Evolution, il paraît illusoire et trop onéreux de tenter d'immuniser des animaux avec des doses massives de Tspan5 purifiée. Il conviendrait plutôt de créer un anticorps dirigé contre un peptide de Tspan5 ; peut-être un peptide situé préférentiellement dans la boucle EC1 vu l'importance cruciale d'EC2, avec une probabilité non négligeable qu'un tel anticorps ne reconnaisse que les formes « dénaturés » de Tspan5 limitant ainsi son utilisation. Une autre approche serait liée à la production de souris KO pour cette tétraspanine. En dehors de la possibilité d'y étudier les conséquences physiologiques globales de l'absence d'expression de Tspan5, ces souris seraient un bon choix pour la production d'anticorps dirigés contre Tspan5.

Au sujet de la surexpression pour le moins « instable » du transgène GFP-Tspan5 et à la lumière de l'implication manifeste de cette protéine dans la régulation de la prolifération cellulaire, il n'est plus forcément si étonnant d'être témoin de la régulation fine de son expression. On constate en effet que toute surexpression se solde à moyen-terme par une



baisse de l'expression du transgène GFP-Tspan5 et par une ré-augmentation symétrique de l'expression d'ADAM10. Sans pour autant tomber dans le finalisme ou l'anthropomorphisme, on peut penser que puisque les PC3 requièrent l'activité d'ADAM10, une tentative d'inhibition de cette dernière par une surexpression de Tspan5 entraîne une réponse assez rapide de la cellule pour inhiber l'expression de cette tétraspanine. Il pourrait être intéressant d'un point de vue mécanistique de tenter d'identifier les moyens par lesquels la cellule inhibe la traduction de Tspan5 (hormis par l'acétylation des histones qui est un mécanisme très général). Comme je l'ai écrit précédemment concernant la régulation de l'expression d'ADAM10 par Tspan5, il est possible que la surexpression de Tspan5 entraîne la mobilisation de miRNA endogènes contrebalançant cette surexpression et, à long-terme l'annihilant.

Il serait également très intéressant par la suite de pouvoir avoir accès à des prélèvements de tissus sains et pathologiques afin de pouvoir établir (via cet anticorps hypothétique ou, le cas échéant, par RT-qPCR) un profil d'expression de cette tétraspanine. Ainsi, nous pourrions savoir si le phénotype d'une forte expression de Tspan5 corrélant avec une prolifération cellulaire moindre peut être généralisé ou pas et à plus long-terme si cette protéine peut, à la manière de la tétraspanine « canonique » CD9, être considérée comme un facteur pronostique de la prolifération de tumeurs.

## Références bibliographiques

- Adak, S., Yang, K. S., Macdonald-Obermann, J., & Pike, L. J. (2011). The membrane-proximal intracellular domain of the epidermal growth factor receptor underlies negative cooperativity in ligand binding. *The Journal of biological chemistry*, 286(52), 45146–55. doi:10.1074/jbc.M111.274175
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., & Zhang, Q. X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12766–71.
- Ahmad, T., Farnie, G., Bundred, N. J., & Anderson, N. G. (2004). The mitogenic action of insulin-like growth factor I in normal human mammary epithelial cells requires the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry*, 279(3), 1713–9. doi:10.1074/jbc.M306156200
- Alfa Cissé, M., Sunyach, C., Slack, B. E., Fisher, A., Vincent, B., & Checler, F. (2007). M1 and M3 muscarinic receptors control physiological processing of cellular prion by modulating ADAM17 phosphorylation and activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(15), 4083–92. doi:10.1523/JNEUROSCI.5293-06.2007
- Allegra, C. J., Jessup, J. M., Somerfield, M. R., Hamilton, S. R., Hammond, E. H., Hayes, D. F., McAllister, P. K., et al. (2009). American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(12), 2091–6. doi:10.1200/JCO.2009.21.9170
- Almeida, E. a, Huovila, a P., Sutherland, a E., Stephens, L. E., Calarco, P. G., Shaw, L. M., Mercurio, a M., et al. (1995). Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell*, 81(7), 1095–104.
- Amemiya, C. T., Alföldi, J., Lee, A. P., Fan, S., Philippe, H., Maccallum, I., Braasch, I., et al. (2013). The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature*, 496(7445), 311–6. doi:10.1038/nature12027
- Amour, a, Knight, C. G., Webster, a, Slocombe, P. M., Stephens, P. E., Knäuper, V., Docherty, a J., et al. (2000). The *in vitro* activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS letters*, 473(3), 275–9.
- Anders, L., Mertins, P., Lammich, S., Murgia, M., Hartmann, D., Saftig, P., Haass, C., et al. (2006). Furin-, ADAM 10-, and gamma -Secretase-Mediated Cleavage of a Receptor Tyrosine Phosphatase and Regulation of beta-Catenin ' s Transcriptional Activity. *Molecular and cellular biology*, 26(10), 3917–3934. doi:10.1128/MCB.26.10.3917
- André, M., Le Caer, J.-P., Greco, C., Planchon, S., El Nemer, W., Boucheix, C., Rubinstein, E., et al. (2006). Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS. *Proteomics*, 6(5), 1437–49. doi:10.1002/pmic.200500180
- Ang, J., Lijovic, M., Ashman, L. K., Kan, K., & Frauman, A. G. (2004). CD151 Protein Expression Predicts the Clinical Outcome of Low-Grade Primary Prostate Cancer Better than Histologic Grading : A New Prognostic Indicator ? CD151 Protein Expression Predicts the Clinical Outcome of Low-Grade Primary Prostate Cancer Better th. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13, 1717–1721.
- Arduise, C., Abache, T., Li, L., Billard, M., Chabanon, A., Ludwig, A., Mauduit, P., et al. (2008). Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(10), 7002–13.

- Arribas, J., & Massagué, J. (1995). Transforming Growth Factor- $\alpha$  and 13-Amyloid Precursor Protein Share a Secretory Mechanism. *The Journal of cell biology*, 128(3), 433–441.
- Artavanis-Tsakonas, S., & Muskavitch, M. a T. (2010). Notch: the past, the present, and the future. *Current topics in developmental biology*, 92(10), 1–29. doi:10.1016/S0070-2153(10)92001-2
- Asai, M., Hattori, C., Szabó, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., & Ishiura, S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP -secretase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(1), 231–235. doi:10.1016/S0006-291X(02)02999-6
- Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., et al. (2002). Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nature medicine*, 8(1), 35–40. doi:10.1038/nm0102-35
- Baleato, R. M., Guthrie, P. L., Gubler, M.-C., Ashman, L. K., & Roselli, S. (2008). Deletion of CD151 results in a strain-dependent glomerular disease due to severe alterations of the glomerular basement membrane. *The American journal of pathology*, 173(4), 927–37. doi:10.2353/ajpath.2008.071149
- Bandyopadhyay, S., Zhan, R., Chaudhuri, A., Watabe, M., Pai, S. K., Hirota, S., Hosobe, S., et al. (2006). Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nature medicine*, 12(8), 933–8. doi:10.1038/nm1444
- Banerjee, S. a, Hadjiargyrou, M., & Patterson, P. H. (1997). An antibody to the tetraspan membrane protein CD9 promotes neurite formation in a partially  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin-dependent manner. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(8), 2756–65.
- Bao, J., Alroy, I., Waterman, H., Schejter, E. D., Brodie, C., Gruenberg, J., & Yarden, Y. (2000). Threonine phosphorylation diverts internalized epidermal growth factor receptors from a degradative pathway to the recycling endosome. *The Journal of biological chemistry*, 275(34), 26178–86. doi:10.1074/jbc.M002367200
- Barber, T. D., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., & Velculescu, V. E. (2004). Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *The New England journal of medicine*, 351(27), 2883. doi:10.1056/NEJM200412303512724
- Barraud-Lange, V., Naud-Barriant, N., Bomsel, M., Wolf, J.-P., & Ziyat, A. (2007). Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(13), 3446–9. doi:10.1096/fj.06-8035hyp
- Barreiro, O., Yáñez-Mó, M., Sala-Valdés, M., Gutiérrez-López, M. D., Ovale, S., Higginbottom, A., Monk, P. N., et al. (2005). Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood*, 105(7), 2852–61. doi:10.1182/blood-2004-09-3606
- Barreiro, O., Zamai, M., Yáñez-Mó, M., Tejera, E., López-Romero, P., Monk, P. N., Gratton, E., et al. (2008). Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *The Journal of cell biology*, 183(3), 527–42. doi:10.1083/jcb.200805076
- Barth, H., Schafer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhardt, R. J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., et al. (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *The Journal of biological chemistry*, 278(42), 41003–12. doi:10.1074/jbc.M302267200
- Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J.-C., Granier, C., Engle, R. E., Blackwelder, W. C., Emerson, S. U., et al. (2003). *In vitro* assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization

- epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14199–204. doi:10.1073/pnas.2335981100
- Baselga, Jm, Y., Roman, L., Pedrini, J. L., Pienkowski, T., Knott, A., Ph, D., Clark, E., et al. (2012). Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine*, 109–119.
- Bass, R., Werner, F., Odintsova, E., Sugiura, T., Berditchevski, F., & Ellis, V. (2005). Regulation of urokinase receptor proteolytic function by the tetraspanin CD82. *The Journal of biological chemistry*, 280(15), 14811–8. doi:10.1074/jbc.M414189200
- Bean, J., Brennan, C., Shih, J.-Y., Riely, G., Viale, A., Wang, L., Chitale, D., et al. (2007). MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), 20932–7. doi:10.1073/pnas.0710370104
- Beeck, A. Op De, Voisset, C., Bartosch, B., Cocquerel, L., Keck, Z., Cosset, F., Dubuisson, J., et al. (2004). Characterization of Functional Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins Characterization of Functional Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *Journal of virology*, 78, 2994–2504. doi:10.1128/JVI.78.6.2994
- Bell, K. F. S., Zheng, L., Fahrenholz, F., & Cuello, a C. (2008). ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiology of aging*, 29(4), 554–65. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.004
- Berditchevski, F., & Odintsova, E. (1999). Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *The Journal of cell biology*, 146(2), 477–92.
- Berditchevski, Fedor, Odintsova, E., Sawada, S., & Gilbert, E. (2002). Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *The Journal of biological chemistry*, 277(40), 36991–7000. doi:10.1074/jbc.M205265200
- Bien, J., Jefferson, T., Causevic, M., Jumpertz, T., Muentner, L., Multhaup, G., Weggen, S., et al. (2012). The metalloprotease mepripin  $\beta$  generates amino terminal truncated A $\beta$ -peptide species. *The Journal of biological chemistry*. doi:10.1074/jbc.M112.395608
- Bienstock, R. J., & Barrett, J. C. (2001). KAI1 , A Prostate Metastasis Suppressor : Prediction of Solvated Structure and Interactions With Binding Partners ; Integrins , Cadherins , and Cell-Surface Receptor Proteins, 153. doi:10.1002/mc.1073
- Biscardi, J. S., Maa, M., Tice, D. A., Cox, M. E., Leu, T., & Parsons, S. J. (1999). c-Src-mediated Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor on Tyr 845 and Tyr 1101 Is Associated with Modulation of Receptor Function \*, 274(12), 8335–8343.
- Black, R. a, Rauch, C., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Paxton, R., March, C., & Ceretti, D. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385(6618), 729–33.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., & Rouillé, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology*, 80(14), 6964–72. doi:10.1128/JVI.00024-06
- Blanchot-Jossic, F., Jarry, A., Masson, D., Bach-Ngohou, K., Paineau, J., Denis, M. G., Laboisse, C. L., et al. (2005). Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *The Journal of pathology*, 207(2), 156–63. doi:10.1002/path.1814

- Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P., & Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*, *90*(2), 281–91.
- Blobel, C P, Myles, D. G., Primakoff, P., & White, J. M. (1990). Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. *The Journal of cell biology*, *111*(1), 69–78.
- Blobel, Carl P, Wolfsberg, T. G., Turg, C. W., Myles, D., Primakoff, P., & White, J. M. (1992). A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*, *356*(6366), 248–52.
- Blumenthal, A., Giebel, J., Ummanni, R., Schlüter, R., Endlich, K., & Endlich, N. (2012). Morphology and migration of podocytes are affected by CD151 levels. *American journal of physiology. Renal physiology*, *302*(10), F1265–77. doi:10.1152/ajprenal.00468.2011
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *12*(12), 1659–68. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x
- Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V., & Dumuis, A. (2011). 5-HT(4) receptors, a place in the sun: act two. *Current opinion in pharmacology*, *11*(1), 87–93. doi:10.1016/j.coph.2011.01.012
- Boesze-Battaglia, K., Song, H., Sokolov, M., Lillo, C., Pankoski-Walker, L., Gretzula, C., Gallagher, B., et al. (2007). The tetraspanin protein peripherin-2 forms a complex with melanoregulin, a putative membrane fusion regulator. *Biochemistry*, *46*(5), 1256–72. doi:10.1021/bi061466i
- Bossers, K., Wirz, K. T. S., Meerhoff, G. F., Essing, A. H. W., Van Dongen, J. W., Houba, P., Kruse, C. G., et al. (2010). Concerted changes in transcripts in the prefrontal cortex precede neuropathology in Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology*, *133*(Pt 12), 3699–723. doi:10.1093/brain/awq258
- Boucheix, C., Duc, G. H., Jasmin, C., & Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins and malignancy. *Expert reviews in molecular medicine*, *2001*(January), 1–17. doi:doi:10.1017/S1462399401002381
- Boucheixsfj, C., Benoits, P., Frachetli, P., Billards, M., Worthingtons, R. E., Gagnonil, J., & Uzanll, G. (1991). Molecular Cloning of the CD9 Antigen.
- Braak, H., Tredici, K. Del, Rüb, U., De Vos, R. a. ., Jansen Steur, E. N. ., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *24*(2), 197–211. doi:10.1016/S0197-4580(02)00065-9
- Bridges, L. C., Sheppard, D., & Bowditch, R. D. (2005). ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins  $\alpha 4\beta 1$  and  $\alpha 4\beta 7$ . *Biochem. Journal*, *387*, 101–108.
- Bronstein, J. M. (2000). Function of tetraspan proteins in the myelin sheath. *Current opinion in neurobiology*, *10*(5), 552–7.
- Bruns, C. J., Harbison, M. T., Davis, D. W., Portera, C. A., Tsan, R., Mcconkey, D. J., Evans, D. B., et al. (2000). Epidermal Growth Factor Receptor Blockade with C225 Plus Gemcitabine Results in Regression of Human Pancreatic Carcinoma Growing Orthotopically in Nude Mice by Antiangiogenic Mechanisms Epidermal Growth Factor Receptor Blockade with C225 Plus Gemcitabine .
- Bzowska, M., Jura, N., Lassak, A., Black, R. a, & Bereta, J. (2004). Tumour necrosis factor-alpha stimulates expression of TNF-alpha converting enzyme in endothelial cells. *European journal of biochemistry / FEBS*, *271*(13), 2808–20. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04215.x

- Cal, S., Freije, J. M., López, J. M., Takada, Y., & López-Otín, C. (2000). ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin through an RGD-independent mechanism. *Molecular biology of the cell*, 11(4), 1457–69.
- Canault, M., Leroyer, A. S., Peiretti, F., Lesèche, G., Tedgui, A., Bonardo, B., Alessi, M.-C., et al. (2007). Microparticles of human atherosclerotic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1. *The American journal of pathology*, 171(5), 1713–23. doi:10.2353/ajpath.2007.070021
- Cannon, K. S., & Cresswell, P. (2001). Quality control of transmembrane domain assembly in the tetraspanin CD82. *The EMBO journal*, 20(10), 2443–53. doi:10.1093/emboj/20.10.2443
- Carl-McGrath, S., Lendeckel, U., Ebert, M., Roessner, A., & Rocken, C. (2005). The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *International journal of oncology*, 26(1), 17–24.
- Cha, J. H., Brooke, J. S., Ivey, K. N., & Eidels, L. (2000). Cell surface monkey CD9 antigen is a coreceptor that increases diphtheria toxin sensitivity and diphtheria toxin receptor affinity. *The Journal of biological chemistry*, 275(10), 6901–7.
- Chang, K.-S., Jiang, J., Cai, Z., & Luo, G. (2007). Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *Journal of virology*, 81(24), 13783–93. doi:10.1128/JVI.01091-07
- Charrin, S, Le Naour, F., Oualid, M., Billard, M., Faure, G., Hanash, S. M., Boucheix, C., et al. (2001). The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *The Journal of biological chemistry*, 276(17), 14329–37. doi:10.1074/jbc.M011297200
- Charrin, Stéphanie, Latil, M., Soave, S., Poleskaya, A., Chrétien, F., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2013). Normal muscle regeneration requires tight control of muscle cell fusion by tetraspanins CD9 and CD81. *Nature Communications*, 4, 1674. doi:10.1038/ncomms2675
- Charrin, Stéphanie, Le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P.-E., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2009). Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *The Biochemical journal*, 420(2), 133–54. doi:10.1042/BJ20082422
- Charrin, Stéphanie, Manié, S., Thiele, C., Billard, M., Gerlier, D., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2003). A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *European journal of immunology*, 33(9), 2479–89. doi:10.1002/eji.200323884
- Chen, G., Bi, Y. R., & Li, N. (2005). EGY1 encodes a membrane-associated and ATP-independent metalloprotease that is required for chloroplast development. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 41(3), 364–75. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02308.x
- Chen, H., Dziuba, N., Friedrich, B., Von Lindern, J., Murray, J. L., Rojo, D. R., Hodge, T. W., et al. (2008). A critical role for CD63 in HIV replication and infection of macrophages and cell lines. *Virology*, 379(2), 191–6. doi:10.1016/j.virol.2008.06.029
- Chen, M. S., Tung, K. S., Coonrod, S. a, Takahashi, Y., Bigler, D., Chang, a, Yamashita, Y., et al. (1999). Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 1: implications for murine fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), 11830–5.

- Cheng, K., Zimniak, P., Raufman, J., Proliferation, A., Human, H., & Cancer, C. (2003). Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor Mediates Cholinergic Agonist-Induced Proliferation of H508 Human Colon Cancer Cells Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor Mediates Cholinergic. *Cancer research*, 6744–6750.
- Cherukuri, A., Carter, R. H., Brooks, S., Bornmann, W., Finn, R., Dowd, C. S., & Pierce, S. K. (2004). B cell signaling is regulated by induced palmitoylation of CD81. *The Journal of biological chemistry*, 279(30), 31973–82. doi:10.1074/jbc.M404410200
- Cho, S., & Hu, Y. (2007). Activation of 5-HT4 receptors inhibits secretion of beta-amyloid peptides and increases neuronal survival. *Experimental neurology*, 203(1), 274–8. doi:10.1016/j.expneurol.2006.07.021
- Chung, K. Y., Shia, J., Kemeny, N. E., Shah, M., Schwartz, G. K., Tse, A., Hamilton, A., et al. (2005). Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(9), 1803–10. doi:10.1200/JCO.2005.08.037
- Claas, C., Seiter, S., Claas, a, Savelyeva, L., Schwab, M., & Zöller, M. (1998). Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy. *The Journal of cell biology*, 141(1), 267–80.
- Claas, C., Stipp, C. S., & Hemler, M. E. (2001). Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *The Journal of biological chemistry*, 276(11), 7974–84. doi:10.1074/jbc.M008650200
- Clergeot, P. H., Gourgues, M., Cots, J., Laurans, F., Latorse, M. P., Pepin, R., Tharreau, D., et al. (2001). PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6963–8. doi:10.1073/pnas.111132998
- Cochet, M., Donneger, R., Cassier, E., Gaven, F., Lichtenthaler, S. F., Marin, P., Bockaert, J., et al. (2013). 5-HT4 receptors constitutively promote the non-amyloidogenic pathway of APP cleavage and interact with ADAM10. *ACS chemical neuroscience*, 4(1), 130–40. doi:10.1021/cn300095t
- Cole, S. L., & Vassar, R. (2007). The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Molecular neurodegeneration*, 2, 22. doi:10.1186/1750-1326-2-22
- Condon, T. P., Flournoy, S., Sawyer, G. J., Baker, B. F., Kishimoto, T. K., & Bennett, C. F. (2001). ADAM17 but not ADAM10 mediates tumor necrosis factor-alpha and L-selectin shedding from leukocyte membranes. *Antisense & nucleic acid drug development*, 11(2), 107–16. doi:10.1089/108729001750171353
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., et al. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 351(4), 337–45. doi:10.1056/NEJMoa033025
- Danglot, L., Chaineau, M., Dahan, M., Gendron, MC., Boggetto, N., Perez, F., Galli, T., (2010) Role of TI-VAMP and CD82 in EGFR cell-surface dynamics and signaling. *J Cell Sci*. 2010 Mar 1;123(Pt 5):723-35. doi: 10.1242/jcs.062497
- Daub, H., Ulrich Weiss, F., Wallasch, C., & Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein coupled receptors. *Nature*, 379(Feb), 557–561.

- Davis, C., Harris, H. J., Hu, K., Drummer, H. E., McKeating, J. a, Mullins, J. G. L., & Balfe, P. (2012). *In silico* directed mutagenesis identifies the CD81/claudin-1 hepatitis C virus receptor interface. *Cellular microbiology*, 1–12. doi:10.1111/cmi.12008
- Day, B., To, C., Himanen, J.-P., Smith, F. M., Nikolov, D. B., Boyd, A. W., & Lackmann, M. (2005). Three distinct molecular surfaces in ephrin-A5 are essential for a functional interaction with EphA3. *The Journal of biological chemistry*, 280(28), 26526–32. doi:10.1074/jbc.M504972200
- De Roock, W., Piessevaux, H., De Schutter, J., Janssens, M., De Hertogh, G., Personeni, N., Biesmans, B., et al. (2008). KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 19(3), 508–15. doi:10.1093/annonc/mdm496
- Del Conde, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P., & López, J. a. (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, 106(5), 1604–11. doi:10.1182/blood-2004-03-1095
- Desbois-Mouthon, C., Baron, A., Blivet-Van Eggelpoël, M.-J., Fartoux, L., Venot, C., Bladt, F., Housset, C., et al. (2009). Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition induces a resistance mechanism via the epidermal growth factor receptor/HER3/AKT signaling pathway: rational basis for cotargeting insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor . *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(17), 5445–56. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2980
- Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore-Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., De Dosso, S., et al. (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(35), 5705–12. doi:10.1200/JCO.2008.18.0786
- Diaz-Rodriguez, E., Montero, J. C., Esparis-Ogando, A., Yuste, L., & Pandiella, A. (2002). Extracellular Signal-regulated Kinase Phosphorylates Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -converting Enzyme at Threonine 735 : A Potential Role in Regulated Shedding. *Molecular biology of the cell*, 13(June), 2031–2044. doi:10.1091/mbc.01
- Dijkstra, S., Geisert EE, J. R., Gispen, W. H., Bär, P. R., & Joosten, E. a. (2000). Up-regulation of CD81 (target of the antiproliferative antibody; TAPA) by reactive microglia and astrocytes after spinal cord injury in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 428(2), 266–77.
- Ding, X., Yang, L.-Y., Huang, G.-W., Wang, W., & Lu, W.-Q. (2004). ADAM17 mRNA expression and pathological features of hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG*, 10(18), 2735–9.
- DiPersio, C. M., Hodivala-Dilke, K. M., Jaenisch, R., Kreidberg, J. a, & Hynes, R. O. (1997). alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *The Journal of cell biology*, 137(3), 729–42.
- Donners, M. M. P. C., Wolfs, I. M. J., Olieslagers, S., Mohammadi-motahhari, Z., Tchaikovski, V., Heeneman, S., Buul, J. D. Van, et al. (2010). A Disintegrin and Metalloprotease 10 Is a Novel Mediator of Vascular Endothelial Growth Factor – Induced Endothelial Cell Function in Angiogenesis and Is Associated With Atherosclerosis Mark J . Post and Johannes Waltenberger The online version of this ar. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 2188–2195. doi:10.1161/ATVBAHA.110.213124
- Dornier, E., Coumailleau, F., Ottavi, J.-F., Moretti, J., Boucheix, C., Mauduit, P., Schweisguth, F., et al. (2012). TspanC8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals. *The Journal of cell biology*. doi:10.1083/jcb.201201133



- Doyle, E. L., Ridger, V., Ferraro, F., Turmaine, M., Saftig, P., & Cutler, D. F. (2011). CD63 is an essential cofactor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin. *Blood*, *118*(15), 4265–73. doi:10.1182/blood-2010-11-321489
- Dunn, C. D., Sulis, M. L., Ferrando, A. a, & Greenwald, I. (2010). A conserved tetraspanin subfamily promotes Notch signaling in *Caenorhabditis elegans* and in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(13), 5907–12. doi:10.1073/pnas.1001647107
- Edwards, D. R., Handsley, M. M., & Pennington, C. J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine*, *29*(5), 258–89. doi:10.1016/j.mam.2008.08.001
- Ehebauer, M., Hayward, P., & Arias, A. M. (2006). Notch, a universal arbiter of cell fate decisions. *Science (New York, N.Y.)*, *314*(5804), 1414–5. doi:10.1126/science.1134042
- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., & Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of cell biology*, *160*(1), 113–23. doi:10.1083/jcb.200207113
- Ehrnsperger, A., Rehli, M., Thu-Hang, P., & Kreutz, M. (2005). Epigenetic regulation of the dendritic cell-marker gene ADAM19. *Biochemical and biophysical research communications*, *332*(2), 456–64. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.149
- Ellerman, DA., Ha, C., Primakoff, P., Myles, DG., Dveksler, GS., (2003) Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion. *Mol Biol Cell*. 2003 Dec; *14*(12):5098-103.
- Epis, R., Marcello, E., Gardoni, F., Vastagh, C., Malinverno, M., Balducci, C., Colombo, A., et al. (2010). Blocking ADAM10 synaptic trafficking generates a model of sporadic Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology*, *133*(11), 3323–35. doi:10.1093/brain/awq217
- Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., & Geuze, H. J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*, *273*(32), 20121–7.
- Eto, K., Huet, C., Tarui, T., Kupriyanov, S., Liu, H.-Z., Puzon-McLaughlin, W., Zhang, X.-P., et al. (2002). Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. *The Journal of biological chemistry*, *277*(20), 17804–10. doi:10.1074/jbc.M200086200
- Evans, M. J., Von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., et al. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, *446*(7137), 801–5. doi:10.1038/nature05654
- Fahrenholz, F., Gilbert, S., Kojro, E., Lammich, S., & Postina, R. (2000). Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *920*, 215–22.
- Fan, H., & Derynck, R. (1999). Ectodomain shedding of TGF-alpha and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. *The EMBO journal*, *18*(24), 6962–72. doi:10.1093/emboj/18.24.6962
- Feigelson, S. W., Grabovsky, V., Shamri, R., Levy, S., & Alon, R. (2003). The CD81 tetraspanin facilitates instantaneous leukocyte VLA-4 adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) under shear flow. *The Journal of biological chemistry*, *278*(51), 51203–12. doi:10.1074/jbc.M303601200

- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., & Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 18(3), 581–92. doi:10.1093/annonc/mdl498
- Fischer, O M, Hart, S., Gschwind, a, & Ullrich, a. (2003). EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochemical Society transactions*, 31(Pt 6), 1203–8. doi:10.1042/
- Fischer, Oliver M, Hart, S., Gschwind, A., Ullrich, A., & Prenzel, N. (2004). Oxidative and Osmotic Stress Signaling in Tumor Cells Is Mediated by ADAM Proteases and Heparin-Binding Epidermal Growth Factor Oxidative and Osmotic Stress Signaling in Tumor Cells Is Mediated by ADAM Proteases and Heparin-Binding Epidermal Growth Factor. doi:10.1128/MCB.24.12.5172
- Fitter, S., Sincock, P. M., Jolliffe, C. N., & Ashman, L. K. (1999). cell – cell adhesion, 70, 61–70.
- Flint, M., Maidens, C., Loomis-price, L. D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Levy, S., et al. (1999). Characterization of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Interaction with a Putative Cellular Receptor , CD81. *Journal of virology*, 73, 6235–6246.
- Fogel, M., Gutwein, P., Mechtersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Smirnov, A., Edler, L., et al. (2003). Mechanisms of disease L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet*, 362.
- Fourie, A. M., Coles, F., Moreno, V., & Karlsson, L. (2003). Catalytic activity of ADAM8, ADAM15, and MDC-L (ADAM28) on synthetic peptide substrates and in ectodomain cleavage of CD23. *The Journal of biological chemistry*, 278(33), 30469–77. doi:10.1074/jbc.M213157200
- Fox, B. P., & Kandpal, R. P. (2004). Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application. *Biochemical and biophysical research communications*, 318(4), 882–92. doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.102
- Fox, B. P., Tabone, C. J., & Kandpal, R. P. (2006). Potential clinical relevance of Eph receptors and ephrin ligands expressed in prostate carcinoma cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*, 342(4), 1263–72. doi:10.1016/j.bbrc.2006.02.099
- Gall, S. M. Le, Bobe, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X., Lundell, D., Gibb, D. R., et al. (2009). ADAMs 10 and 17 Represent Differentially Regulated Components of a General Shedding Machinery for Membrane Proteins Such as Transforming Growth Factor  $\alpha$ , L-Selectin , and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . *Molecular biology of the cell*, 20, 1785–1794. doi:10.1091/mbc.E08
- Gaultier, A., Cousin, H., Darribère, T., & Alfandari, D. (2002). ADAM13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. *The Journal of biological chemistry*, 277(26), 23336–44. doi:10.1074/jbc.M201792200
- Gavert, N., Conacci-Sorrell, M., Gast, D., Schneider, A., Altevogt, P., Brabletz, T., & Ben-Ze'ev, A. (2005). L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *The Journal of cell biology*, 168(4), 633–42. doi:10.1083/jcb.200408051
- Geisert, E. E., Williams, R. W., Geisert, G. R., Fan, L., Asbury, A. M., Maecker, H. T., Deng, J., et al. (2002). Increased brain size and glial cell number in CD81-null mice. *The Journal of comparative neurology*, 453(1), 22–32. doi:10.1002/cne.10364
- Gelling, R. W., Yan, W., Al-Noori, S., Pardini, A., Morton, G. J., Ogimoto, K., Schwartz, M. W., et al. (2008). Deficiency of TNF $\alpha$  converting enzyme (TACE/ADAM17) causes a lean, hypermetabolic phenotype in mice. *Endocrinology*, 149(12), 6053–64. doi:10.1210/en.2008-0775

- Gesierich, S., Berezovskiy, I., Ryschich, E., & Zöller, M. (2006). Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. *Cancer research*, 66(14), 7083–94. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0391
- Gill, G. N., Kawamotoli, T., Cochets, C., Ley, A., Satolt, J. D., Masuili, H., Mcleod, C., et al. (1984). Monoclonal Anti-epidermal Growth Factor Receptor Antibodies Which Are Inhibitors of Epidermal Growth Factor Binding and Antagonists of Epidermal Growth Factor-stimulated Tyrosine Protein Kinase Activity\*. *The Journal of biological chemistry*, (83).
- Goate, A., Chartier-Harlin, M., Mullan, M., N, I., & L, J. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *nature*, 349(6311), 704–6.
- Gómez-Gaviro, M., Domínguez-Luis, M., Canchado, J., Calafat, J., Janssen, H., Lara-Pezzi, E., Fourie, A., et al. (2007). Expression and regulation of the metalloproteinase ADAM-8 during human neutrophil pathophysiological activation and its catalytic activity on L-selectin shedding. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(12), 8053–63.
- Gooz, P., Dang, Y., Higashiyama, S., Twal, W. O., Haycraft, C. J., & Gooz, M. (2012). A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is regulated by  $\alpha 5\beta 1$  integrin in kidney mesangial cells. *PLoS one*, 7(3), e33350. doi:10.1371/journal.pone.0033350
- Goöz, P., Goöz, M., Baldys, A., & Hoffman, S. (2010). ADAM-17 Regulates Endothelial Cell Morphology, Proliferation, and *In Vitro* Angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 380(1), 33–38. doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.013.ADAM-17
- Gordón-Alonso, M., Yañez-Mó, M., Barreiro, O., Alvarez, S., Muñoz-Fernández, M. A., Valenzuela-Fernández, A., & Sánchez-Madrid, F. (2006). Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(8), 5129–37. R
- Gourgues, M., Clergeot, P. H., Veneault, C., Cots, J., Sibuet, S., Brunet-Simon, a, Levis, C., et al. (2002). A new class of tetraspanins in fungi. *Biochemical and biophysical research communications*, 297(5), 1197–204.
- Grabowska, M. M., Sandhu, B., & Day, M. L. (2011). EGF promotes the shedding of soluble E-cadherin in an ADAM10-dependent manner in prostate epithelial cells. *Cellular signalling*. doi:10.1016/j.cellsig.2011.10.004
- Greco, C., Bralet, M.-P., Ailane, N., Dubart-Kupperschmitt, A., Rubinstein, E., Le Naour, F., & Boucheix, C. (2010). E-cadherin/p120-catenin and tetraspanin Co-029 cooperate for cell motility control in human colon carcinoma. *Cancer research*, 70(19), 7674–83. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4482
- Groot, A. J., Cobzaru, C., Weber, S., Saftig, P., Blobel, C. P., Kopan, R., Vooijs, M., et al. (2013). Epidermal ADAM17 Is Dispensable for Notch Activation. *The Journal of investigative dermatology*, (May), 9–11. doi:10.1038/jid.2013.162
- Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O. M., & Ullrich, A. (2003). TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *The EMBO journal*, 22(10), 2411–21. doi:10.1093/emboj/cdg231
- Guaiquil, V. H., Swendeman, S., Zhou, W., Guaiquil, P., Weskamp, G., Bartsch, J. W., & Blobel, C. P. (2010). ADAM8 is a negative regulator of retinal neovascularization and of the growth of heterotopically injected tumor cells in mice. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 88(5), 497–505. doi:10.1007/s00109-010-0591-8

- Guaiquil, V., Swendeman, S., Yoshida, T., Chavala, S., Campochiaro, P. a, & Blobel, C. P. (2009). ADAM9 is involved in pathological retinal neovascularization. *Molecular and cellular biology*, 29(10), 2694–703. doi:10.1128/MCB.01460-08
- Guan, M., Xu, C., Zhang, F., & Ye, C. (2009). Aberrant methylation of EphA7 in human prostate cancer and its relation to clinicopathologic features. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 124(1), 88–94. doi:10.1002/ijc.23890
- Guix, M., Faber, A. C., Wang, S. E., Olivares, M. G., Song, Y., Qu, S., Rinehart, C., et al. (2008). Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *The Journal of clinical investigation*, 118(7), 23–26. doi:10.1172/JCI34588.
- Guo, Q., Xia, B., Zhang, F., Richardson, M. M., Li, M., Zhang, J. S., Chen, F., et al. (2012). Tetraspanin CO-029 inhibits colorectal cancer cell movement by deregulating cell-matrix and cell-cell adhesions. *PloS one*, 7(6), e38464. doi:10.1371/journal.pone.0038464
- Gusenbauer, S., Vlaicu, P., & Ullrich, a. (2012). HGF induces novel EGFR functions involved in resistance formation to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, (July), 1–11. doi:10.1038/onc.2012.396
- Gutiérrez-López, M. D., Gilsanz, A., Yáñez-Mó, M., Ovalle, S., Lafuente, E. M., Domínguez, C., Monk, P. N., et al. (2011). The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(19), 3275–92. doi:10.1007/s00018-011-0639-0
- Ha, CT., Waterhouse, R., Warren, J., Zimmerman, W., Dveksler, GS., (2008) N-glycosylation is required for binding of murine pregnancy-specific glycoproteins 17 and 19 to the receptor CD9. *Am J Reprod Immunol*. 2008 Mar;59(3):251-8. doi: 10.1111/j.1600-0897.2007.00573.x.
- Hagaman, J. R., Moyer, J. S., Bachman, E. S., Sibony, M., Magyar, P. L., Welch, J. E., Smithies, O., et al. (1998). Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2552–7.
- Haining, E. J., Yang, J., Bailey, R. L., Khan, K., Collier, R., Tsai, S., Watson, S. P., et al. (2012). The TspanC8 subgroup of tetraspanins interact with A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and regulate its maturation and cell surface expression. *The Journal of biological chemistry*, 287(47), 39753–39765. doi:10.1074/jbc.M112.416503
- Haj, F. G., Markova, B., Klamann, L. D., Bohmer, F. D., & Neel, B. G. (2003). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *The Journal of biological chemistry*, 278(2), 739–44. doi:10.1074/jbc.M210194200
- Hall, K. C., & Blobel, C. P. (2012). Interleukin-1 stimulates ADAM17 through a mechanism independent of its cytoplasmic domain or phosphorylation at threonine 735. *PloS one*, 7(2), e31600. doi:10.1371/journal.pone.0031600
- Hardy, J., & Higgins, G. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184–185. doi:10.1126/science.1566067
- Harris, B., Pereira, I., & Parkin, E. (2009). Targeting ADAM10 to lipid rafts in neuroblastoma SH-SY5Y cells impairs amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *Brain research*, 1296, 203–15. doi:10.1016/j.brainres.2009.07.105
- Harris, R., Chung, E., & Coffey, R. J. (2003). EGF receptor ligands. *Experimental Cell Research*, 284(1), 2–13. doi:10.1016/S0014-4827(02)00105-2

- Harris, T. J. R., & McCormick, F. (2010). The molecular pathology of cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*, 7(5), 251–65. doi:10.1038/nrclinonc.2010.41
- Hartmann, D., De Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., et al. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Human molecular genetics*, 11(21), 2615–24.
- Hashida, H., Takabayashi, a, Tokuhara, T., Hattori, N., Taki, T., Hasegawa, H., Satoh, S., et al. (2003). Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *British journal of cancer*, 89(1), 158–67. doi:10.1038/sj.bjc.6601015
- Hashimoto, A., Tarner, I. H., Bohle, R. M., Gaumann, A., Manetti, M., Distler, O., Steinmeyer, J., et al. (2007). Analysis of vascular gene expression in arthritic synovium by laser-mediated microdissection. *Arthritis and rheumatism*, 56(4), 1094–105. doi:10.1002/art.22450
- Hata, A., Katakami, N., Kaji, R., Fujita, S., & Imai, Y. (2013). Does T790M disappear? Successful gefitinib rechallenge after T790M disappearance in a patient with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 8(3), e27–9. doi:10.1097/JTO.0b013e318282e047
- Hattori, M. (2000). Regulated Cleavage of a Contact-Mediated Axon Repellent. *Science*, 289(5483), 1360–1365. doi:10.1126/science.289.5483.1360
- Helle, F., & Dubuisson, J. (2008). Hepatitis C virus entry into host cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(1), 100–12. doi:10.1007/s00018-007-7291-8
- Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annual review of cell and developmental biology*, 19, 397–422. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111301.153609
- Hemler, M. E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(10), 801–11. doi:10.1038/nrm1736
- Herath, N. I., Spanevello, M. D., Sabesan, S., Newton, T., Cummings, M., Duffy, S., Lincoln, D., et al. (2006). Over-expression of Eph and ephrin genes in advanced ovarian cancer: ephrin gene expression correlates with shortened survival. *BMC cancer*, 6, 144. doi:10.1186/1471-2407-6-144
- Higashiyama, S., Iwamoto, R., Goishi, K., Raab, G., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., & Mekada, E. (1995). The membrane protein CD9/DRAP 27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *The Journal of cell biology*, 128(5), 929–38.
- Higginbottom, a, Quinn, E. R., Kuo, C. C., Flint, M., Wilson, L. H., Bianchi, E., Nicosia, a, et al. (2000). Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Journal of virology*, 74(8), 3642–9.
- Himanen, J. P., Rajashankar, K. R., Lackmann, M., Cowan, C. a, Henkemeyer, M., & Nikolov, D. B. (2001). Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature*, 414(6866), 933–8. doi:10.1038/414933a
- Himanen, J.-P., Chumley, M. J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W. a, Jeffrey, P. D., Vearing, C., et al. (2004). Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nature neuroscience*, 7(5), 501–9. doi:10.1038/nn1237

- Hogue, I. B., Grover, J. R., Soheilian, F., Nagashima, K., & Ono, A. (2011). Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *Journal of virology*, *85*(19), 9749–66. doi:10.1128/JVI.00743-11
- Hong, I.-K., Jeoung, D.-I., Ha, K.-S., Kim, Y.-M., & Lee, H. (2012). Tetraspanin CD151 stimulates adhesion-dependent activation of Ras, Rac, and Cdc42 by facilitating molecular association between  $\beta$ 1 integrins and small GTPases. *The Journal of biological chemistry*, *287*(38), 32027–39. doi:10.1074/jbc.M111.314443
- Horiuchi, K., Gall, S. Le, Schulte, M., Yamaguchi, T., Reiss, K., Murphy, G., Toyama, Y., et al. (2007). Substrate Selectivity of Epidermal Growth Factor-Receptor Ligand Sheddases and their Regulation by Phorbol Esters and Calcium Influx  $\square$ . *Molecular biology of the cell*, *18*(January), 176–188. doi:10.1091/mbc.E06
- Horiuchi, K., Weskamp, G., Lum, L., Hammes, H., Cai, H., Brodie, T. A., Ludwig, T., et al. (2003). Potential Role for ADAM15 in Pathological Neovascularization in Mice. *Molecular and cellular biology*, *23*(16), 5614–5624. doi:10.1128/MCB.23.16.5614
- Hotta, H., Ross, A. H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M. V., Ricciardi, R. P., et al. (1988). Molecular Cloning and Characterization of an Antigen Associated with Early Stages of Melanoma Tumor Progression Molecular Cloning and Characterization of an Antigen Associated with Early Stages of Melanoma Tumor Progression1, 2955–2962.
- Howard, L. (1999). Interaction of the Metalloprotease Disintegrins MDC9 and MDC15 with Two SH3 Domain-containing Proteins, Endophilin I and SH3PX1. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(44), 31693–31699. doi:10.1074/jbc.274.44.31693
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M., & McKeating, J. a. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(12), 7271–6. doi:10.1073/pnas.0832180100
- Huang, S., Bock, J. M., & Harari, P. M. (1999). Epidermal Growth Factor Receptor Blockade with C225 Modulates Proliferation , Apoptosis , and Radiosensitivity in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck Epidermal Growth Factor Receptor Blockade with C225 Modulates Proliferation , Apoptosis , and R. *Cancer research*, 1935–1940.
- Huguenin, M., Müller, E. J., Trachsel-Rösmann, S., Oneda, B., Ambort, D., Sterchi, E. E., & Lottaz, D. (2008). The metalloprotease mepribeta processes E-cadherin and weakens intercellular adhesion. *PLoS one*, *3*(5), e2153. doi:10.1371/journal.pone.0002153
- Humphrey, P. a, Wong, a J., Vogelstein, B., Zalutsky, M. R., Fuller, G. N., Archer, G. E., Friedman, H. S., et al. (1990). Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(11), 4207–11.
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T. a, Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., et al. (2003). The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*, *102*(4), 1186–95. doi:10.1182/blood-2002-12-3775
- Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M., & Doms, R. W. (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *The Journal of biological chemistry*, *275*(43), 33729–37. doi:10.1074/jbc.M004175200

- Huxley-Jones, J., Clarke, T.-K., Beck, C., Toubaris, G., Robertson, D. L., & Boot-Handford, R. P. (2007). The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC evolutionary biology*, 7, 63. doi:10.1186/1471-2148-7-63
- Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B., Fröhlich, C., Loechel, F., Zolkiewska, a, Ishiguro, K., et al. (2000). The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *The Journal of cell biology*, 149(5), 1143–56.
- Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A. M., Okabe, M., Chang, M. C., & Austin, C. R. (2010). Fertilization : a sperm ' s journey to and interaction with the oocyte. *The Journal of clinical investigation*, 120(4). doi:10.1172/JCI41585.izumo
- Ikeyama, S., Koyama, M., Yamaoko, M., Sasada, R., & Miyake, M. (1993). Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *The Journal of experimental medicine*, 177(5), 1231–7.
- Imhof, I., Gasper, W. J., & Derynck, R. (2008). Association of tetraspanin CD9 with transmembrane TGF{alpha} confers alterations in cell-surface presentation of TGF{alpha} and cytoskeletal organization. *Journal of cell science*, 121(Pt 13), 2265–74. doi:10.1242/jcs.021717
- Inui, S., Higashiyama, S., Hashimoto, K., Higashiyama, M., Yoshikawa, K., & Taniguchi, N. (1997). Possible Role of Coexpression of CD9 With EGF-Like Growth Factor and Amphiregulin in Cultured Human Keratinocyte Growth. *Journal of cellular physiology*, 298(November 1996), 291–298.
- Ishikawa, M., Miyahara, R., Sonobe, M., Horiuchi, M., Mennju, T., Nakayama, E., Kobayashi, M., et al. (2012). Higher expression of EphA2 and ephrin-A1 is related to favorable clinicopathological features in pathological stage I non-small cell lung carcinoma. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 76(3), 431–8. doi:10.1016/j.lungcan.2011.12.004
- Ishino, Y., Zhu, C., Harris, D. L., & Joyce, N. C. (2008). Protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) helps regulate EGF-induced stimulation of S-phase entry in human corneal endothelial cells. *Molecular vision*, 14(December 2007), 61–70.
- Israels, S J, McMillan-Ward, E. M., Easton, J., Robertson, C., & McNicol, a. (2001). CD63 associates with the alphaIIb beta3 integrin-CD9 complex on the surface of activated platelets. *Thrombosis and haemostasis*, 85(1), 134–41.
- Israels, Sara J, & McMillan-Ward, E. M. (2010). Palmitoylation supports the association of tetraspanin CD63 with CD9 and integrin alphaIIbbeta3 in activated platelets. *Thrombosis research*, 125(2), 152–8. doi:10.1016/j.thromres.2009.07.005
- Ito, C., Yamatoya, K., Yoshida, K., Maekawa, M., Miyado, K., & Toshimori, K. (2010). Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell and tissue research*, 340(3), 583–94. doi:10.1007/s00441-010-0967-7
- Iwai, K., Ishii, M., Ohshima, S., Miyatake, K., & Saeki, Y. (2007). Expression and Function of Transmembrane-4 Superfamily ( Tetraspanin ) Proteins in Osteoclasts : Reciprocal Roles of Tspan-5 and NET-6 during Osteoclastogenesis. *Allergology International*, 56(February), 457–463.
- Iwamoto, R, & Mekada, E. (2000). Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine & growth factor reviews*, 11(4), 335–44.
- Iwamoto, Ryo, Higashiyama, S., Mitamura, T., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., & Mekada, E. (1994). the diphtheria toxin receptor , forms a complex with membrane protein DRAP27 / CD9 , which up-regulates functional

- receptors and diphtheria toxin sensitivity Heparin-binding EGF-like growth factor , which, 1(10), 2322–2330.
- Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., et al. (1998). A metalloprotease – disintegrin , MDC9 / meltrin- $\gamma$  / ADAM9 and PKC $\delta$  are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *The EMBO journal*, 17(24), 7260–7272.
- Jakobovits, A., Amado, R. G., Yang, X., Roskos, L., & Schwab, G. (2007). From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nature biotechnology*, 25(10), 1134–43. doi:10.1038/nbt1337
- Jane-Farrar, G., Kenna, P., Jordan, S., Kumar-Singh, R., & Humphries, P. (1991). A three-base-pair deletion in the peripherin-RDS gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature*, 354(Dec), 478–481.
- Janes, P. W., Saha, N., Barton, W. a, Kolev, M. V, Wimmer-Kleikamp, S. H., Nievergall, E., Blobel, C. P., et al. (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*, 123(2), 291–304. doi:10.1016/j.cell.2005.08.014
- Janes, P. W., Wimmer-kleikamp, S. H., Frangakis, A. S., Treble, K., Sabet, O., Grabenbauer, M., Ting, A. Y., et al. (2009). Cytoplasmic Relaxation of Active Eph Controls Ephrin Shedding by ADAM10. *October*, 7(10). doi:10.1371/journal.pbio.1000215
- Jefferson, T., Auf dem Keller, U., Bellac, C., Metz, V. V, Broder, C., Hedrich, J., Ohler, A., et al. (2012). The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin  $\beta$  and ADAM10. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. doi:10.1007/s00018-012-1106-2
- Jefferson, T., Auf dem Keller, U., Bellac, C., Metz, V. V, Broder, C., Hedrich, J., Ohler, A., et al. (2013). The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin  $\beta$  and ADAM10. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(2), 309–33. doi:10.1007/s00018-012-1106-2
- Jefferson, T., Mirsada, C., Schilling, O., Isbert, S., Geyer, R., Maier, W., Tschickardt, S., et al. (2011). Metalloprotease Meprin<sub>NL</sub> Generates Nontoxic N-terminal Amyloid Precursor Protein Fragments in Vivo \* □, 286(31), 27741–27750. doi:10.1074/jbc.M111.252718
- Jégou, A., Ziyat, A., Barraud-lange, V., Perez, E., & Philippe, J. (2011). CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *PNAS*, 108, 10946–10951. doi:10.1073/pnas.1017400108/
- Jeon, O.-H., Kim, D., Choi, Y.-J., Kim, S.-H., Choi, W.-S., & Kim, D.-S. (2007). Novel function of human ADAM15 disintegrin-like domain and its derivatives in platelet aggregation. *Thrombosis Research*, 119(5), 609–619. doi:10.1016/j.thromres.2006.04.010
- Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., Snellinx, A., et al. (2010). The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(14), 4833–44. doi:10.1523/JNEUROSCI.5221-09.2010
- Jung, K.-K., Liu, X.-W., Chirco, R., Fridman, R., & Kim, H.-R. C. (2006). Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *The EMBO journal*, 25(17), 3934–42. doi:10.1038/sj.emboj.7601281
- Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N., et al. (2000). The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature genetics*, 24(3), 279–82. doi:10.1038/73502



- Kapadia, S. B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J. a., & Chisari, F. V. (2007). Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *Journal of virology*, *81*(1), 374–83. doi:10.1128/JVI.01134-06
- Karamatic Crew, V., Burton, N., Kagan, A., Green, C. a, Levene, C., Flinter, F., Brady, R. L., et al. (2004). CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood*, *104*(8), 2217–23. doi:10.1182/blood-2004-04-1512
- Karan, D., Lin, F. C., Bryan, M., Ringel, J., Moniaux, N., Lin, M.-F., & Batra, S. K. (2003). Expression of ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) and TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) in human prostatic adenocarcinomas. *International journal of oncology*, *23*(5), 1365–71.
- Karapetis, C., O'callaghan, C., Tu, D., Tebbutt, N. C., Simes, R. J., Chalchal, H., Shapiro, J. D., et al. (2008). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, *359*, 1757–1765.
- Kasina, S., Scherle, P. a, Hall, C. L., & Macoska, J. a. (2009). ADAM-mediated amphiregulin shedding and EGFR transactivation. *Cell proliferation*, *42*(6), 799–812. doi:10.1111/j.1365-2184.2009.00645.x
- Kawamoto, T., Sato, J. D., Le, a, Polikoff, J., Sato, G. H., & Mendelsohn, J. (1983). Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(5), 1337–41.
- Kazarov, a. R. (2002). An extracellular site on tetraspanin CD151 determines alpha3 and alpha6 integrin-dependent cellular morphology. *The Journal of Cell Biology*, *158*(7), 1299–1309. doi:10.1083/jcb.200204056
- Kelić, S., Levy, S., Suarez, C., & Weinstein, D. E. (2001). CD81 regulates neuron-induced astrocyte cell-cycle exit. *Molecular and cellular neurosciences*, *17*(3), 551–60. doi:10.1006/mcne.2000.0955
- Kharait, S., Dhir, R., Lauffenburger, D., & Wells, A. (2006). Protein kinase Cdelta signaling downstream of the EGF receptor mediates migration and invasiveness of prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *343*(3), 848–56. doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.044
- Kim, E., Lee, J.-W., Baek, D. C., Lee, S.-R., Kim, M.-S., Kim, S.-H., Kim, C.-S., et al. (2010). Processing and subcellular localization of ADAM2 in the Macaca fascicularis testis and sperm. *Animal reproduction science*, *117*(1-2), 155–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.04.002
- Kitadokoro, K., Bordo, D., Galli, G., Petracca, R., Falugi, F., Abrignani, S., Grandi, G., et al. (2001). CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *The EMBO journal*, *20*(1-2), 12–8. doi:10.1093/emboj/20.1.12
- Kleino, I., Ortiz, R. M., & Huovila, A.-P. J. (2007). ADAM15 gene structure and differential alternative exon use in human tissues. *BMC molecular biology*, *8*, 90. doi:10.1186/1471-2199-8-90
- Klucky, B., Mueller, R., Vogt, I., Teurich, S., Hartenstein, B., Breuhahn, K., Flechtenmacher, C., et al. (2007). Kallikrein 6 induces E-cadherin shedding and promotes cell proliferation, migration, and invasion. *Cancer research*, *67*(17), 8198–206. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0607
- Ko, S.-Y., Lin, S.-C., Wong, Y.-K., Liu, C.-J., Chang, K.-W., & Liu, T.-Y. (2007). Increase of disintegrin metalloprotease 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer letters*, *245*(1-2), 33–43. doi:10.1016/j.canlet.2005.10.019

- Kojro, E, Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., & Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5815–20. doi:10.1073/pnas.081612998
- Kojro, Elzbieta, Füger, P., Prinzen, C., Kanarek, A. M., Rat, D., Endres, K., Fahrenholz, F., et al. (2010). Statins and the squalene synthase inhibitor zaragozic acid stimulate the non-amyloidogenic pathway of amyloid-beta protein precursor processing by suppression of cholesterol synthesis. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 20(4), 1215–31. doi:10.3233/JAD-2010-091621
- Komiya, K., Enomoto, H., Inoki, I., Okazaki, S., Fujita, Y., Ikeda, E., Ohuchi, E., et al. (2005). Expression of ADAM15 in rheumatoid synovium: up-regulation by vascular endothelial growth factor and possible implications for angiogenesis. *Arthritis research & therapy*, 7(6), R1158–73. doi:10.1186/ar1796
- Kopan, R., Schroeter, E. H., Weintraub, H., & Nye, J. S. (1996). Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(4), 1683–8.
- Kreidberg, J. a, Donovan, M. J., Goldstein, S. L., Rennke, H., Shepherd, K., Jones, R. C., & Jaenisch, R. (1996). Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 122(11), 3537–47.
- Kremontsov, D. N., Rassam, P., Margeat, E., Roy, N. H., Schneider-Schaulies, J., Milhiet, P.-E., & Thali, M. (2010). HIV-1 Assembly Differentially Alters Dynamics and Partitioning of Tetraspanins and Raft Components. *Traffic*, 11(11), 1401–1414. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01111.x
- Kullander, K., & Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(7), 475–86. doi:10.1038/nrm856
- Kurai, J., Chikumi, H., Hashimoto, K., Yamaguchi, K., Yamasaki, A., Sako, T., Touge, H., et al. (2007). Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(5), 1552–61. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1726
- Kuwada, S. K., & Li, X. (2000). Epithelial Cell Proliferation through Epidermal Growth Factor Receptor Activation. *Molecular biology of the cell*, 11(July), 2485–2496.
- Lafleur, M. A., Xu, D., & Hemler, M. E. (2009). Tetraspanin Proteins Regulate Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase-dependent Pericellular Proteolysis, 20, 2030–2040. doi:10.1091/mbc.E08
- Lagaudrière-Gesbert, C., Le Naour, F., Lebel-Binay, S., Billard, M., Lemichez, E., Boquet, P., Boucheix, C., et al. (1997). Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity. *Cellular immunology*, 182(2), 105–12.
- Lambou, K., Tharreau, D., Kohler, A., Sirven, C., Marguerettaz, M., Barbisan, C., Sexton, A. C., et al. (2008). Fungi have three tetraspanin families with distinct functions. *BMC genomics*, 9, 63. doi:10.1186/1471-2164-9-63
- Lammerding, J., Kazarov, A. R., Huang, H., Lee, R. T., & Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin CD151 regulates alpha6beta1 integrin adhesion strengthening. *PNAS*, 100(13).
- Lammich, S., Asionowski, M. A. J., Aass, C. H. H., & Ahrenholz, F. A. L. K. F. (1999). Constitutive and regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of Alzheimer ' s amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(March), 3922–3927.

- Larsen, A. B., Pedersen, M. W., Stockhausen, M.-T., Grandal, M. V., Van Deurs, B., & Poulsen, H. S. (2007). Activation of the EGFR gene target EphA2 inhibits epidermal growth factor-induced cancer cell motility. *Molecular cancer research : MCR*, 5(3), 283–93. doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0321
- Larsen, A. B., Stockhausen, M.-T., & Poulsen, H. S. (2010). Cell adhesion and EGFR activation regulate EphA2 expression in cancer. *Cellular signalling*, 22(4), 636–44. doi:10.1016/j.cellsig.2009.11.018
- Lau, L.-M., Wee, J. L., Wright, M. D., Moseley, G. W., Hogarth, P. M., Ashman, L. K., & Jackson, D. E. (2004). The tetraspanin superfamily member CD151 regulates outside-in integrin alphaIIb beta3 signaling and platelet function. *Blood*, 104(8), 2368–75. doi:10.1182/blood-2003-12-4430
- Laurent-Puig, P., Lievre, A., & Blons, H. (2009). Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(4), 1133–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0905
- Laurie, S. a, & Goss, G. D. (2013). Role of epidermal growth factor receptor inhibitors in epidermal growth factor receptor wild-type non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(8), 1061–9. doi:10.1200/JCO.2012.43.4522
- Lautrette, A., Li, S., Alili, R., Sunnarborg, S. W., Burtin, M., Lee, D. C., Friedlander, G., et al. (2005). Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nature Medicine*, 11(8), 867–874. doi:10.1038/nm1275
- Le Gall, S. M., Auger, R., Dreux, C., & Mauduit, P. (2003). Regulated cell surface pro-EGF ectodomain shedding is a zinc metalloprotease-dependent process. *The Journal of biological chemistry*, 278(46), 45255–68. doi:10.1074/jbc.M307745200
- Le Naour, F. (2000). Severely Reduced Female Fertility in CD9-Deficient Mice. *Science*, 287(5451), 319–321. doi:10.1126/science.287.5451.319
- Le Naour, François, André, M., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2006). Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics*, 6(24), 6447–54. doi:10.1002/pmic.200600282
- Le Naour, François, André, M., Greco, C., Billard, M., Sordat, B., Emile, J.-F., Lanza, F., et al. (2006). Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 5(5), 845–57. doi:10.1074/mcp.M500330-MCP200
- Lee, D., Sunnarborg, S., Paxton, R., Black, R. a, & Jackson, L. (2003). TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 995, 22–38.
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews. Cancer*, 11(1), 9–22. doi:10.1038/nrc2982
- Levy, S., & Shoham, T. (2005). Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 20, 218–24. doi:10.1152/physiol.00015.2005
- Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J. W., Kussie, P., & Ferguson, K. M. (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer cell*, 7(4), 301–11. doi:10.1016/j.ccr.2005.03.003
- Li, Y., Brazzell, J., Herrera, A., & Walcheck, B. (2006). ADAM17 deficiency by mature neutrophils has differential effects on L-selectin shedding. *Blood*, 108(7), 2275–9. doi:10.1182/blood-2006-02-005827

- Lindern, J. J. Von, Rojo, D., Grovit-ferbas, K., Yeramian, C., Deng, C., Herbein, G., Ferguson, M. R., et al. (2003). Potential Role for CD63 in CCR5-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Macrophages Potential Role for CD63 in CCR5-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Macrophages. *Journal of virology*, *77*, 3624–3633. doi:10.1128/JVI.77.6.3624
- Liu, B., Fang, M., Schmidt, M., Lu, Y., Mendelsohn, J., & Fan, Z. (2000). Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity. *British journal of cancer*, *82*(12), 1991–9. doi:10.1054/bjoc.2000.1201
- Liu, L., He, B., Liu, W. M., Zhou, D., Cox, J. V., & Zhang, X. a. (2007). Tetraspanin CD151 promotes cell migration by regulating integrin trafficking. *The Journal of biological chemistry*, *282*(43), 31631–42. doi:10.1074/jbc.M701165200
- Liu, P., Cleveland, T. E., Bouyain, S., Byrne, P. O., Longo, P. a, & Leahy, D. J. (2012). A single ligand is sufficient to activate EGFR dimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(27), 10861–6. doi:10.1073/pnas.1201114109
- Löffler, S., Lottspeich, F., Lanza, F., & Azorsa, D. O. (1997). CD9 , a Tetraspan Transmembrane Protein , Renders Cells Susceptible to Canine Distemper Virus. *Journal of virology*, *71*, 42–51.
- Lorenzen, I., Trad, A., & Grötzinger, J. (2011). Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain. *Biochemical and biophysical research communications*, *415*(2), 330–6. doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.056
- Loupakis, F., Ruzzo, a, Cremolini, C., Vincenzi, B., Salvatore, L., Santini, D., Masi, G., et al. (2009). KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer*, *101*(4), 715–21. doi:10.1038/sj.bjc.6605177
- Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. a, & Hutchins, G. M. (2009). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives of pathology & laboratory medicine*, *133*(9), 1463–7. doi:10.1043/1543-2165-133.9.1463
- Luthin, G. R., Wang, P., Zhou, H., Dhanasekaran, D., & Ruggieri, M. R. (1997). Role of m1 receptor-G protein coupling in cell proliferation in the prostate. *Life Science*, *60*, 963–968.
- Macdonald, J. L., & Pike, L. J. (2008). Heterogeneity in EGF-binding affinities arises from negative cooperativity in an aggregating system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(1), 112–7. doi:10.1073/pnas.0707080105
- Malden, L. T., Novak, U., Kaye, A. H., Maiden, L. T., & Burgess, A. W. (1988). Selective Amplification of the Cytoplasmic Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Glioblastoma Multiforme Selective Amplification of the Cytoplasmic Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Glioblastoma Multiforme. *Cancer research*, 2711–2714.
- Mangin, P. H., Kleitz, L., Boucheix, C., Gachet, C., & Lanza, F. (2009). CD9 negatively regulates integrin alphallbbeta3 activation and could thus prevent excessive platelet recruitment at sites of vascular injury. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, *7*(5), 900–2. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03322.x
- Maréchal, H., Jammes, H., Rossignol, B., & Mauduit, P. (2013). EGF precursor mRNA and membrane-associated EGF precursor protein in rat exorbital lacrimal gland EGF precursor mRNA and membrane-associated EGF precursor protein in rat exorbital lacrimal gland. *American journal of physiology. Cell physiology*.

- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., De Strooper, B., et al. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9182–7. doi:10.1073/pnas.0500918102
- Maretzky, T., Scholz, F., Köten, B., Proksch, E., Saftig, P., & Reiss, K. (2008). ADAM10-mediated E-cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*, 128(7), 1737–46. doi:10.1038/sj.jid.5701242
- Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., & Mendelsohn, J. (1984). Growth Inhibition of Human Tumor Cells in Athymic Mice by Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies Growth Inhibition of Human Tumor Cells in Athymic Mice by Anti- Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies1. *Cancer research*, 1002–1007.
- Mazurov, D., Heidecker, G., & Derse, D. (2007). The inner loop of tetraspanins CD82 and CD81 mediates interactions with human T cell lymphotropic virus type 1 Gag protein. *The Journal of biological chemistry*, 282(6), 3896–903. doi:10.1074/jbc.M607322200
- Mazzocca, A., Coppari, R., Franco, R. De, Pinzani, M., & Toker, A. (2005). A Secreted Form of ADAM9 Promotes Carcinoma Invasion through Tumor-Stromal Interactions Tumor-Stromal Interactions. *Cancer research*, 65, 4728–4738.
- Mcculloch, D. R., Akl, P., Samaratunga, H., Herington, A. C., & Odorico, D. M. (2004). Expression of the Disintegrin Metalloprotease , ADAM-10 , in Prostate Cancer and Its Regulation by Dihydrotestosterone , Insulin-Like Growth Factor I , and Epidermal Growth Factor in the Prostate Cancer Cell Model LNCaP Expression of the Disintegrin Metal. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10, 314–323.
- McGowan, P. M., McKiernan, E., Bolster, F., Ryan, B. M., Hill, a D. K., McDermott, E. W., Evoy, D., et al. (2008). ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 19(6), 1075–81. doi:10.1093/annonc/mdm609
- Mckeating, J. A., Zhang, L. Q., Logvinoff, C., Flint, M., Yu, J., Butera, D., Ho, D. D., et al. (2004). Diverse Hepatitis C Virus Glycoproteins Mediate Viral Infection in a CD81-Dependent Manner Diverse Hepatitis C Virus Glycoproteins Mediate Viral Infection in a CD81-Dependent Manner. *Journal of virology*, (Aug), 8496–8505. doi:10.1128/JVI.78.16.8496
- Meertens, L., Bertaux, C., & Dragic, T. (2006). Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *Journal of virology*, 80(23), 11571–8. doi:10.1128/JVI.01717-06
- Miao, H., Burnett, E., Kinch, M., Simon, E., Wang, B., (2000). Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and cause focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat Cell Biol*, 2(2):62-69
- Mifune, M., Ohtsu, H., Suzuki, H., Nakashima, H., Brailoiu, E., Dun, N. J., Frank, G. D., et al. (2005). G protein coupling and second messenger generation are indispensable for metalloprotease-dependent, heparin-binding epidermal growth factor shedding through angiotensin II type-1 receptor. *The Journal of biological chemistry*, 280(28), 26592–9. doi:10.1074/jbc.M502906200
- Mitamura, T., Iwamoto, R., Umata, T., Yomo, T., Urabe, I., Tsuneoka, M., & Mekada, E. (1992). The 27-kD diphtheria toxin receptor-associated protein (DRAP27) from vero cells is the monkey homologue of human CD9 antigen: expression of DRAP27 elevates the number of diphtheria toxin receptors on toxin-sensitive cells. *The Journal of cell biology*, 118(6), 1389–99.

- Mitamura, T., Umata, T., Nakano, F., Shishido, Y., Toyoda, T., Itai, a, Kimura, H., et al. (1997). Structure-function analysis of the diphtheria toxin receptor toxin binding site by site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry*, 272(43), 27084–90.
- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., et al. (2000). Requirement of CD9 on the Egg Plasma Membrane for Fertilization. *Science*, 287(5451), 321–324. doi:10.1126/science.287.5451.321
- Miyazaki, T., Kato, H., Fukuchi, M., Nakajima, M., & Kuwano, H. (2003). EphA2 overexpression correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 103(5), 657–63. doi:10.1002/ijc.10860
- Mochizuki, S., & Okada, Y. (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer science*, 98(5), 621–8. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00434.x
- Mohammed, F. F., Smookler, D. S., Taylor, S. E. M., Fingleton, B., Kassiri, Z., Sanchez, O. H., English, J. L., et al. (2004). Abnormal TNF activity in Timp3<sup>-/-</sup> mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nature genetics*, 36(9), 969–77. doi:10.1038/ng1413
- Montagut, C., Dalmases, A., Bellosillo, B., Crespo, M., Pairet, S., Iglesias, M., Salido, M., et al. (2012). Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nature medicine*, 18(2), 221–3. doi:10.1038/nm.2609
- Montpellier, C., Tews, B. A., Poitrimole, J., Rocha-Perugini, V., D'Arienzo, V., Potel, J., Zhang, X. a, et al. (2011). Interacting regions of CD81 and two of its partners, EWI-2 and EWI-2wint, and their effect on hepatitis C virus infection. *The Journal of biological chemistry*, 286(16), 13954–65. doi:10.1074/jbc.M111.220103
- Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L. G., Stolz, D. B., Papworth, G. D., Zahorchak, A. F., et al. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10), 3257–66. doi:10.1182/blood-2004-03-0824
- Moretti, J., Chastagner, P., Gastaldello, S., Heuss, S. F., Dirac, A. M., Bernards, R., Masucci, M. G., et al. (2010). The translation initiation factor 3f (eIF3f) exhibits a deubiquitinase activity regulating Notch activation. *PLoS biology*, 8(11), e1000545. doi:10.1371/journal.pbio.1000545
- Moribe, H., Yochem, J., Yamada, H., Tabuse, Y., Fujimoto, T., & Mekada, E. (2004). Tetraspanin protein (TSP-15) is required for epidermal integrity in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of cell science*, 117(Pt 22), 5209–20. doi:10.1242/jcs.01403
- Moroni, M., Sartore-Bianchi, a, Benvenuti, S., Artale, S., Bardelli, a, & Siena, S. (2005). Somatic mutation of EGFR catalytic domain and treatment with gefitinib in colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 16(11), 1848–9. doi:10.1093/annonc/mdi356
- Moss, M. L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P. M., Gillispie, P. a, et al. (2007). The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *The Journal of biological chemistry*, 282(49), 35712–21. doi:10.1074/jbc.M703231200
- Moss, M. L., Jin, S., Milla, M. E., & Becherer, J. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*, 385(6618), 733–36.

- Murai, T., Miyauchi, T., Yanagida, T., & Sako, Y. (2006). Epidermal growth factor-regulated activation of Rac GTPase enhances CD44 cleavage by metalloproteinase disintegrin ADAM10. *The Biochemical journal*, *395*(1), 65–71. doi:10.1042/BJ20050582
- Murphy, G. (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Cancer*, *8*(12), 929–41. doi:10.1038/nrc2459
- Nagano, O., Murakami, D., Hartmann, D., De Strooper, B., Saftig, P., Iwatsubo, T., Nakajima, M., et al. (2004). Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *The Journal of cell biology*, *165*(6), 893–902. doi:10.1083/jcb.200310024
- Nahta, R., Yuan, L. X. H., Zhang, B., Kobayashi, R., & 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 research*, *65*(23), 11118–28. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3841
- Nakamura, K., Mitamura, T., Takahashi, T., Kobayashi, T., & Mekada, E. (2000). Importance of the major extracellular domain of CD9 and the epidermal growth factor (EGF)-like domain of heparin-binding EGF-like growth factor for up-regulation of binding and activity. *The Journal of biological chemistry*, *275*(24), 18284–90. doi:10.1074/jbc.M907971199
- Nath, D., Slocombe, P. M., Webster, a, Stephens, P. E., Docherty, a J., & Murphy, G. (2000). Meltrin gamma(ADAM-9) mediates cellular adhesion through alpha(6)beta(1) integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. *Journal of cell science*, *113* ( Pt 1, 2319–28.
- Nazarenko, I., Rana, S., Baumann, A., McAlear, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M., Lochnit, G., et al. (2010). Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer research*, *70*(4), 1668–78. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2470
- Nishimura, H., Kim, E., Nakanishi, T., & Baba, T. (2004). Possible Function of the ADAM1a / ADAM2 Fertilin Complex in the Appearance of ADAM3 on the Sperm Surface \*. *The Journal of biological chemistry*, *279*(33), 34957–34962. doi:10.1074/jbc.M314249200
- Nishimura, Y., Yoshioka, K., Bereczky, B., & Itoh, K. (2008). Evidence for efficient phosphorylation of EGFR and rapid endocytosis of phosphorylated EGFR via the early/late endocytic pathway in a gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell line. *Molecular cancer*, *7*, 42. doi:10.1186/1476-4598-7-42
- Nydegger, S., Khurana, S., Kremmentsov, D. N., Foti, M., & Thali, M. (2006). Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *The Journal of cell biology*, *173*(5), 795–807. doi:10.1083/jcb.200508165
- Nye, J. S., Kopan, R., & Axel, R. (1994). An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development (Cambridge, England)*, *120*(9), 2421–30.
- O'Leary, D. D., & Wilkinson, D. G. (1999). Eph receptors and ephrins in neural development. *Current opinion in neurobiology*, *9*(1), 65–73.
- O-Charoenrat, P., Rhys-Evans, P., Modjtahedi, H., Court, W., Box, G., & Eccles, S. (2000). Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and *in vitro* invasion. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, *86*(3), 307–17.

- Odintsova, E, Sugiura, T., & Berditchevski, F. (2000). Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Current biology : CB*, *10*(16), 1009–12.
- Odintsova, Elena, Voortman, J., Gilbert, E., & Berditchevski, F. (2003). Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *Journal of cell science*, *116*(Pt 22), 4557–66. doi:10.1242/jcs.00793
- Ohtsu, H., Dempsey, P. J., & Eguchi, S. (2006). ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *American journal of physiology. Cell physiology*, *291*(1), C1–10. doi:10.1152/ajpcell.00620.2005
- Okamoto, I., Kawano, Y., Murakami, D., Sasayama, T., Araki, N., Miki, T., Wong, a J., et al. (2001). Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *The Journal of cell biology*, *155*(5), 755–62. doi:10.1083/jcb.200108159
- Oksvold, M. P., Skarpen, E., Lindeman, B., Roos, N., & Huitfeldt, H. S. (2000). Receptor in Early Endosomes After EGF Stimulation of HeLa Cells. *Journal of histochemistry and cytochemistry*, *48*, 21–33. doi:10.1177/002215540004800103
- Oren, R., Takahashi, S., Doss, C., Levy, R., & Levy, S. (1990). TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Molecular and cellular biology*, *10*(8), 4007–15.
- Paez, J. G., Jänne, P. a, Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., et al. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (New York, N.Y.)*, *304*(5676), 1497–500. doi:10.1126/science.1099314
- Pan, D., & Rubin, G. M. (1997). Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis. *Cell*, *90*(2), 271–80.
- Pao, W., Miller, V. a, Politi, K. a, Riely, G. J., Somwar, R., Zakowski, M. F., Kris, M. G., et al. (2005). Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS medicine*, *2*(3), e73. doi:10.1371/journal.pmed.0020073
- Park, JH., Park, S., Yang, SW., Kim, S., Jang, SK., (2013). Discovery of cellular proteins requires for the early steps of HCV infection using integrative genomics. *PLoS One*. 2013 Apr 12; *8*(4):e60333. doi: 10.1371/journal.pone.0060333.
- Parr-Sturgess, C. a, Rushton, D. J., & Parkin, E. T. (2010). Ectodomain shedding of the Notch ligand Jagged1 is mediated by ADAM17, but is not a lipid-raft-associated event. *The Biochemical journal*, *432*(2), 283–94. doi:10.1042/BJ20100321
- Peeters, M., Price, T. J., Cervantes, A., Sobrero, A. F., Ducreux, M., Hotko, Y., André, T., et al. (2010). Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *28*(31), 4706–13. doi:10.1200/JCO.2009.27.6055
- Perrotte, P., Matsumoto, T., Inoue, K., Kuniyasu, H., Eve, B. Y., Hicklin, D. J., Radinsky, R., et al. (1999). Anti-epidermal Growth Factor Receptor Antibody C225 Inhibits Angiogenesis in Human Transitional Cell Carcinoma Growing Orthotopically in Nude Mice Advances in Brief Anti-epidermal Growth Factor Receptor Antibody C225 Inhibits Angiogenesis in Human Transit, 257–264.



- Peschard, P., & Park, M. (2003). Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. *Cancer cell*, 3(6), 519–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842080>
- Peschon, J. J., Slack, J., Reddy, P., Rauch, C., Cerretti, D., Paxton, R., March, C., et al. (1998). An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development. *Science*, 282(5392), 1281–1284. doi:10.1126/science.282.5392.1281
- Peschon, Jacques J, Torrance, D. S., Stocking, K. L., Glaccum, M. B., Otten, C., Willis, C. R., Charrier, K., et al. (1998). TNF Receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160, 943–952.
- Pileri, P. (1998). Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science*, 282(5390), 938–941. doi:10.1126/science.282.5390.938
- Poola, I., DeWitty, R. L., Marshalleck, J. J., Bhatnagar, R., Abraham, J., & Leffall, L. D. (2005). Identification of MMP-1 as a putative breast cancer predictive marker by global gene expression analysis. *Nature medicine*, 11(5), 481–3. doi:10.1038/nm1243
- Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., et al. (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model, 113(10). doi:10.1172/JCI200420864.1456
- Potel, J., Rassam, P., Montpellier, C., Kaestner, L., Werkmeister, E., Tews, B. a, Couturier, C., et al. (2013). EWI-2wint promotes CD81 clustering that abrogates Hepatitis C Virus entry. *Cellular microbiology*. doi:10.1111/cmi.12112
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., & Ullrich, a. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, 402(6764), 884–8. doi:10.1038/47260
- Protsy, M. B., Watkins, N. a, Colombo, D., Thomas, S. G., Heath, V. L., Herbert, J. M. J., Bicknell, R., et al. (2009). Identification of Tspan9 as a novel platelet tetraspanin and the collagen receptor GPVI as a component of tetraspanin microdomains. *The Biochemical journal*, 417(1), 391–400. doi:10.1042/BJ20081126
- Prox, J., Willenbrock, M., Weber, S., Lehmann, T., Schmidt-Arras, D., Schwanbeck, R., Saftig, P., et al. (2012). Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 69(17), 2919–32. doi:10.1007/s00018-012-0960-2
- Puls, K. L., Ni, J., Liu, D., Morahan, G., & Wright, M. D. (1999). The molecular characterisation of a novel tetraspanin protein, TM4-B(1). *Biochimica et biophysica acta*, 1447(1), 93–9.
- Qiu, G.-H., Leung, C. H.-W., Yun, T., Xie, X., Laban, M., & Hooi, S. C. (2011). Recognition and suppression of transfected plasmids by protein ZNF511-PRAP1, a potential molecular barrier to transgene expression. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 19(8), 1478–86. doi:10.1038/mt.2011.80
- Rajesh, S., Sridhar, P., Tews, BA., Fénéant, L., Cocquerel, L., Ward, DG., Berditchevski, F., Overduin, M., (2012). Structural basis of ligand interaction of the ligand interactions of the large extracellular domain of tetraspanin CD81. *J\_Virol*. 2012 Sep;86(18):9606-16. doi: 10.1128/JVI.00559-12.
- Rana, S., Claas, C., Kretz, C. C., Nazarenko, I., & Zoeller, M. (2011). Activation-induced internalization differs for the tetraspanins CD9 and Tspan8: Impact on tumor cell motility. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(1), 106–19. doi:10.1016/j.biocel.2010.10.002

- Rana, S., Yue, S., Stadel, D., & Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(9), 1574–84. doi:10.1016/j.biocel.2012.06.018
- Rauci, A., Cugusi, S., Antonelli, A., Barabino, S. M., Monti, L., Bierhaus, A., Reiss, K., et al. (2008). A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(10), 3716–27. doi:10.1096/fj.08-109033
- Ray, B. K., Dhar, S., Henry, C. J., Rich, A., & Ray, A. (2012). Epigenetic Regulation by Z-DNA Silencer Function Controls Cancer-Associated ADAM-12 Expression in Breast Cancer: Cross Talk between MECP2 and NFI transcription factor family. *Cancer research*. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2601
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., De Strooper, B., Hartmann, D., & Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *The EMBO journal*, 24(4), 742–52. doi:10.1038/sj.emboj.7600548
- Reynolds, A. R., Tischer, C., Verveer, P. J., Rocks, O., & Bastiaens, P. I. H. (2003). EGFR activation coupled to inhibition of tyrosine phosphatases causes lateral signal propagation. *Nature cell biology*, 5(5), 447–53. doi:10.1038/ncb981
- Ringel, J., Jesnowski, R., Moniaux, N., Lüttges, J., Ringel, J., Choudhury, A., Batra, S. K., et al. (2006). Aberrant expression of a disintegrin and metalloproteinase 17/tumor necrosis factor-alpha converting enzyme increases the malignant potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer research*, 66(18), 9045–53. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3287
- Rocha-Perugini, V., Lavie, M., Delgrange, D., Canton, J., Pillez, A., Potel, J., Lecoeur, C., et al. (2009). The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C virus entry. *BMC microbiology*, 9, 111. doi:10.1186/1471-2180-9-111
- Rodland, K. D., Bollinger, N., Ippolito, D., Opresko, L. K., Coffey, R. J., Zangar, R., & Wiley, H. S. (2008). Multiple mechanisms are responsible for transactivation of the epidermal growth factor receptor in mammary epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 283(46), 31477–87. doi:10.1074/jbc.M800456200
- Rous, B. A., Reaves, B. J., Ihrke, G., Briggs, J. A. G., Gray, S. R., Stephens, D. J., Banting, G., et al. (2002). Role of Adaptor Complex AP-3 in Targeting Wild- Type and Mutated CD63 to Lysosomes, 13(March), 1071–1082. doi:10.1091/mbc.01
- Rozengurt, E. (2007). Mitogenic Signaling Pathways Induced by G Protein-Coupled Receptors. *Journal of cellular physiology*, (July), 589–602. doi:10.1002/JCP
- Rubinstein, E., Ziyat, A., Prenant, M., Wrobel, E., Wolf, J.-P., Levy, S., Le Naour, F., et al. (2006). Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Developmental biology*, 290(2), 351–8. doi:10.1016/j.ydbio.2005.11.031
- Ruggieri, M. R., Colton, M. D., Wang, P., Wang, J., Smyth, R. J., Michel, A., Luthin, G. R., et al. (2012). Human prostate muscarinic receptor subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 274(2), 976–982.
- Ryu, F., Takahashi, T., Nakamura, K., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Shida, S., Kameyama, T., et al. (2000). Domain analysis of the tetraspanins: studies of CD9/CD63 chimeric molecules on subcellular localization and upregulation activity for diphtheria toxin binding. *Cell structure and function*, 25(5), 317–27.

- Sachs, N., Claessen, N., Aten, J., Kreft, M., Teske, G. J. D., Koeman, A., Zuurbier, C. J., et al. (2012). Blood pressure influences end-stage renal disease of Cd151 knockout mice, *122*(1). doi:10.1172/JCI58878DS1
- Sachs, N., Kreft, M., Van den Bergh Weerman, M. a, Beynon, A. J., Peters, T. a, Weening, J. J., & Sonnenberg, A. (2006). Kidney failure in mice lacking the tetraspanin CD151. *The Journal of cell biology*, *175*(1), 33–9. doi:10.1083/jcb.200603073
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.-M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., et al. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of cell biology*, *164*(5), 769–79. doi:10.1083/jcb.200307137
- Salaita, K., Nair, P. M., Petit, R. S., Neve, R. M., Das, D., Gray, J. W., & Groves, J. T. (2010). Restriction of receptor movement alters cellular response: physical force sensing by EphA2. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5971), 1380–5. doi:10.1126/science.1181729
- Saltz, L. B., Meropol, N. J., Loehrer, P. J., Needle, M. N., Kopit, J., & Mayer, R. J. (2004). Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *22*(7), 1201–8. doi:10.1200/JCO.2004.10.182
- Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J. K., Mosher, D. F., Robinson, S. D., Hynes, R. O., et al. (1999). Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(6), 2805–10.
- Sartore-Bianchi, A., Moroni, M., Veronese, S., Carnaghi, C., Bajetta, E., Luppi, G., Sobrero, A., et al. (2007). Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *25*(22), 3238–45. doi:10.1200/JCO.2007.11.5956
- Scaltriti, M., Baselga, J., (2006), The epidermal growth factor pathway : a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res*, *12*(18): 5268-5272
- Scarborough, R. M., Rose, J. W., Naughton, M. a, Phillips, D. R., Nannizzi, L., Arfsten, a, Campbell, a M., et al. (1993). Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. *The Journal of biological chemistry*, *268*(2), 1058–65.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., et al. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO journal*, *21*(19), 5017–25.
- Schäfer, B., Marg, B., Gschwind, A., & Ullrich, A. (2004). Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *The Journal of biological chemistry*, *279*(46), 47929–38. doi:10.1074/jbc.M400129200
- Schaff, U., Mattila, P. E., Simon, S. I., & Walcheck, B. (2008). Neutrophil adhesion to E-selectin under shear promotes the redistribution and co-clustering of ADAM17 and its proteolytic substrate L-selectin. *Journal of leukocyte biology*, *83*(1), 99–105. doi:10.1189/jlb.0507304
- Scheffer, KD., Gawlitza, A., Spoden, GA., Zhang, XA., Lambert, C., Berditchevski, F., Florin, L., (2013). Tetraspanin 15 mediates papillomavirus type 16 endocytosis. *J. Virol.* 2013 Mar;*87*(6):3435-46. doi: 10.1128/JVI.02906-12.

- Schlöndorff, J., Becherer, J., & Blobel, C. P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase ( TACE ). *Biochem. Journal*, *347*, 131–138.
- Schmitt, U., Hiemke, C., Fahrenholz, F., & Schroeder, A. (2006). Over-expression of two different forms of the alpha-secretase ADAM10 affects learning and memory in mice. *Behavioural brain research*, *175*(2), 278–84. doi:10.1016/j.bbr.2006.08.030
- Schwanbeck, R., Martini, S., Bernoth, K., & Just, U. (2011). The Notch signaling pathway: molecular basis of cell context dependency. *European journal of cell biology*, *90*(6-7), 572–81. doi:10.1016/j.ejcb.2010.10.004
- Schwartz-Albiez, R., Dörken, B., Hofmann, W., & Moldenhauer, G. (1988). The B cell-associated CD37 antigen (gp40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *140*(3), 905–14.
- Seals, D. F., & Courtneidge, S. a. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & development*, *17*(1), 7–30. doi:10.1101/gad.1039703
- Seigneuret, M, Delaguillaumie, a, Lagaudrière-Gesbert, C., & Conjeaud, H. (2001). Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *The Journal of biological chemistry*, *276*(43), 40055–64. doi:10.1074/jbc.M105557200
- Seigneuret, Michel. (2006). Complete predicted three-dimensional structure of the facilitator transmembrane protein and hepatitis C virus receptor CD81: conserved and variable structural domains in the tetraspanin superfamily. *Biophysical journal*, *90*(1), 212–27. doi:10.1529/biophysj.105.069666
- Serru, V., Dessen, P., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2000). Sequence and expression of seven new tetraspans. *Biochimica et biophysica acta*, *1478*(1), 159–63.
- Shan, Y., Eastwood, M. P., Zhang, X., Kim, E. T., Arkhipov, A., Dror, R. O., Jumper, J., et al. (2012). Oncogenic mutations counteract intrinsic disorder in the EGFR kinase and promote receptor dimerization. *Cell*, *149*(4), 860–70. doi:10.1016/j.cell.2012.02.063
- Shi, W, Fan, H., Shum, L., & Derynck, R. (2000). The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF-alpha and regulates TGF-alpha-induced EGF receptor activation and cell proliferation. *The Journal of cell biology*, *148*(3), 591–602.
- Shi, Wei, Chen, H., Sun, J., Buckley, S., Zhao, J., Anderson, K. D., Williams, R. G., et al. (2003). TACE is required for fetal murine cardiac development and modeling. *Developmental Biology*, *261*(2), 371–380. doi:10.1016/S0012-1606(03)00315-4
- Shoham, T., Rajapaksa, R., Boucheix, C., Rubinstein, E., Poe, J. C., Tedder, T. F., & Levy, S. (2003). The tetraspanin CD81 regulates the expression of CD19 during B cell development in a postendoplasmic reticulum compartment. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *171*(8), 4062–72.
- Silvie, O., Charrin, S., Billard, M., Franetich, J.-F., Clark, K. L., Van Gemert, G.-J., Sauerwein, R. W., et al. (2006). Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites. *Journal of cell science*, *119*(Pt 10), 1992–2002. doi:10.1242/jcs.02911
- Silvie, O., Rubinstein, E., Franetich, J.-F., Prenant, M., Belnoue, E., Rénia, L., Hannoun, L., et al. (2003). Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. *Nature medicine*, *9*(1), 93–6. doi:10.1038/nm808

- Sincock, P. M., Fitter, S., Parton, R. G., Berndt, M. C., Gamble, J. R., & Ashman, L. K. (1999). PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function. *Journal of cell science*, *112* ( Pt 6, 833–44.
- Singh, R. J. R., Mason, J. C., Lidington, E. a, Edwards, D. R., Nuttall, R. K., Khokha, R., Knauper, V., et al. (2005). Cytokine stimulated vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ectodomain release is regulated by TIMP-3. *Cardiovascular research*, *67*(1), 39–49. doi:10.1016/j.cardiores.2005.02.020
- Six, E., Ndiaye, D., Laabi, Y., Brou, C., Gupta-Rossi, N., Israel, A., & Logeat, F. (2003). The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(13), 7638–43. doi:10.1073/pnas.1230693100
- Sizeland, a M., & Burgess, a W. (1992). Anti-sense transforming growth factor alpha oligonucleotides inhibit autocrine stimulated proliferation of a colon carcinoma cell line. *Molecular biology of the cell*, *3*(11), 1235–43.
- Skovronsky, D. M., Moore, D. B., Milla, M. E., Doms, R. W., & Lee, V. M. (2000). Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *The Journal of biological chemistry*, *275*(4), 2568–75.
- Soltoff, S. P. (2007). Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKCdelta. *Trends in pharmacological sciences*, *28*(9), 453–8. doi:10.1016/j.tips.2007.07.003
- Soond, S. M., Everson, B., Riches, D. W. H., & Murphy, G. (2005). ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *Journal of cell science*, *118*(Pt 11), 2371–80. doi:10.1242/jcs.02357
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C., & Florin, L. (2008). Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PloS one*, *3*(10), e3313. doi:10.1371/journal.pone.0003313
- Stein, G. S., Stein, J. L., Wijnen, A. J. Van, Lian, J. B., Montecino, M., Croce, M., Choi, J., et al. (2011). Transcription factor-mediated epigenetic regulation of cell growth and phenotype for biological control and cancer. *Advanced Enzyme Regulation*, *50*(1), 160–167. doi:10.1016/j.advenzreg.2009.10.026. Transcription
- Stein, K. K., Go, J. C., Primakoff, P., & Myles, D. G. (2005). Defects in secretory pathway trafficking during sperm development in Adam2 knockout mice. *Biology of reproduction*, *73*(5), 1032–8. doi:10.1095/biolreprod.105.040972
- Sterk, L. M., Geuijen, C. a, Oomen, L. C., Calafat, J., Janssen, H., & Sonnenberg, a. (2000). The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *The Journal of cell biology*, *149*(4), 969–82.
- Stipp, C. S., & Hemler, M. E. (2000). Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81 associate with alpha 3 beta 1 integrin, and selectively contribute to alpha 3 beta 1-dependent neurite outgrowth. *Journal of cell science*, *113* ( Pt 1, 1871–82.
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications, *403*(January), 41–45.
- Sunada, H., Magun, B. E., Mendelsohn, J., & MacLeod, C. L. (1986). Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(11), 3825–9.

- Swendeman, S., Mendelson, K., Weskamp, G., Horiuchi, K., Scherle, P., Hooper, A., Rafii, S., et al. (2008). VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Circ. res*, *103*(9), 916–918. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.184416.VEGF-A
- Szala, S., Kasai, Y., Steplewski, Z., Rodeck, U., Koprowski, H., & Linnenbach, a J. (1990). Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(17), 6833–7.
- Tachibana, I., & Hemler, M. E. (1999). in *Muscle Cell Fusion and Myotube Maintenance*, *146*(4), 893–904.
- Takaguri, A., Shirai, H., Kimura, K., Hinoki, A., Eguchi, K., Carlile-Klusacek, M., Yang, B., et al. (2011). Caveolin-1 negatively regulates a metalloprotease-dependent epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *50*(3), 545–51. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.12.009
- Takeda, S. (2009). Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Seminars in cell & developmental biology*, *20*(2), 146–52. doi:10.1016/j.semcd.2008.07.009
- Takeda, Y., Kazarov, A. R., Butterfield, C. E., Hopkins, B. D., Benjamin, L. E., Kaipainen, A., & Hemler, M. E. (2007). Deletion of tetraspanin Cd151 results in decreased pathologic angiogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Blood*, *109*(4), 1524–32. doi:10.1182/blood-2006-08-041970
- Takino, T., Miyamori, H., Kawaguchi, N., Uekita, T., Seiki, M., & Sato, H. (2003). Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *304*(1), 160–166. doi:10.1016/S0006-291X(03)00544-8
- Tang, J., Zarbock, A., Gomez, I., Wilson, C. L., Lefort, C. T., Stadtman, A., Bell, B., et al. (2011). Adam17-dependent shedding limits early neutrophil influx but does not alter early monocyte recruitment to inflammatory sites. *Blood*, *118*(3), 786–94. doi:10.1182/blood-2010-11-321406
- Taylor, C. J., Ireland, D. R., Ballagh, I., Bourne, K., Marechal, N. M., Turner, P. R., Bilkey, D. K., et al. (2008). Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiology of disease*, *31*(2), 250–60. doi:10.1016/j.nbd.2008.04.011
- Tejera, E., Rocha-Perugini, V., López-Martín, S., Pérez-Hernández, D., Bachir, A. I., Horwitz, A. R., Vázquez, J., et al. (2013). CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase. *Molecular biology of the cell*, *24*(3), 261–73. doi:10.1091/mbc.E12-09-0642
- Terada, N., Baracska, K., Kinter, M., Melrose, S., Brophy, P. J., Boucheix, C., Bjartmar, C., et al. (2002). The tetraspanin protein, CD9, is expressed by progenitor cells committed to oligodendrogenesis and is linked to beta1 integrin, CD81, and Tspan-2. *Glia*, *40*(3), 350–9. doi:10.1002/glia.10134
- Thaker, P. H., Deavers, M., Celestino, J., Thornton, A., Fletcher, M. S., Landen, C. N., Kinch, M. S., et al. (2004). EphA2 expression is associated with aggressive features in ovarian carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *10*(15), 5145–50. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0589
- Tham, TN., Guoin, E., Rubinstein, E., Boucheix, C., Cossart, P., Pizarro-Cerda, J., (2010). Tetraspanin CD81 is required for *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun*. 2010 Jan;*78*(1):204-9. doi: 10.1128/IAI.00661-09.

- Thathiah, A., & De Strooper, B. (2011). The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, *12*(2), 73–87. doi:10.1038/nrn2977
- Théry, C., Regnault, a, Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., et al. (1999). Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *The Journal of cell biology*, *147*(3), 599–610.
- Thumbikat, P., Berry, R. E., Zhou, G., Billips, B. K., Yaggie, R. E., Zaichuk, T., Sun, T.-T., et al. (2009). Bacteria-induced uroplakin signaling mediates bladder response to infection. *PLoS pathogens*, *5*(5), e1000415. doi:10.1371/journal.ppat.1000415
- Todd, C., & Maecker, T. (n.d.). The tetraspanin facilitators.
- Todd, S. C., Doctor, V. S., & Levy, S. (1998). Sequences and expression of six new members of the tetraspanin/TM4SF family. *Biochimica et biophysica acta*, *1399*(1), 101–4.
- Todres, E., Nardi, J. B., & Robertson, H. M. (2000). The tetraspanin superfamily in insects. *Insect molecular biology*, *9*(6), 581–90.
- Tokuhara, T., Hasegawa, H., & Hattori, N. (2001). Clinical Significance of CD151 Gene Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Clinical Significance of CD151 Gene Expression in Non-Small Cell. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *7*, 4109–4114.
- Tracy, S., Mukohara, T., Hansen, M., Meyerson, M., Johnson, B. E., & Jänne, P. a. (2004). Gefitinib induces apoptosis in the EGFR L858R non-small-cell lung cancer cell line H3255. *Cancer research*, *64*(20), 7241–4. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1905
- Ventura, S., Pennefather, J., & Mitchelson, F. (2002). Cholinergic innervation and function in the prostate gland. *Pharmacology & therapeutics*, *94*(1-2), 93–112.
- Wakabayashi, T., Craessaerts, K., Bammens, L., Bentahir, M., Borgions, F., Herdewijn, P., Staes, A., et al. (2009). Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains. *Nature cell biology*, *11*(11), 1340–6. doi:10.1038/ncb1978
- Wallasch, C., Weiss, F. U., Niederfellner, G., Jallal, B., Issing, W., & Ullrich, a. (1995). Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *The EMBO journal*, *14*(17), 4267–75.
- Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, a, Lammich, S., et al. (2001). Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *The Journal of biological chemistry*, *276*(18), 14634–41. doi:10.1074/jbc.M011116200
- Wang, F., Vandepoele, K., & Van Lijsebettens, M. (2012). Tetraspanin genes in plants. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, *190*, 9–15. doi:10.1016/j.plantsci.2012.03.005
- Wang, H., Min, G., Glockshuber, R., Sun, T., & Kong, X. (2009). Uropathogenic E . coli Adhesin-Induced Host Cell Receptor Conformational Changes : Implications in Transmembrane Signaling Transduction. *Journal of Molecular Biology*, *392*(2), 352–361. doi:10.1016/j.jmb.2009.06.077
- Wetzker, R., & Böhmer, F.-D. (2003). Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *4*(8), 651–7. doi:10.1038/nrm1173

- Wewer, U. M., Mörgelin, M., Holck, P., Jacobsen, J., Lydolph, M. C., Johnsen, A. H., Kveiborg, M., et al. (2006). ADAM12 is a four-leafed clover: the excised prodomain remains bound to the mature enzyme. *The Journal of biological chemistry*, *281*(14), 9418–22. doi:10.1074/jbc.M513580200
- White, a, Lamb, P. W., & Barrett, J. C. (1998). Frequent downregulation of the KAI1(CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines. *Oncogene*, *16*(24), 3143–9. doi:10.1038/sj.onc.1201852
- Willett, B., Hosie, M., Shaw, a, & Neil, J. (1997). Inhibition of feline immunodeficiency virus infection by CD9 antibody operates after virus entry and is independent of virus tropism. *The Journal of general virology*, *78* ( Pt 3), 611–8.
- Winterwood, N. E., Varzavand, A., Meland, M. N., Ashman, L. K., & Stipp, C. S. (2006). A Critical Role for Tetraspanin CD151 in  $\alpha 3 \beta 1$  and  $\alpha 6 \beta 4$  Integrin – dependent Tumor Cell Functions on Laminin-5 □, *17*(June), 2707–2721. doi:10.1091/mbc.E05
- Wolfsberg, T. G., & White, J. M. (1996). ADAMs in fertilization and development. *Developmental biology*, *180*(2), 389–401. doi:10.1006/dbio.1996.0313
- Wolfsbergt, T. G., Bazant, J. F., Blobelt, C. P., Mylesii, D. G., Primakoffii, P., & Whitett, J. M. (1993). The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain : Structural , functional , and evolutionary implications *Developmental biology*, *90*(November), 10783–10787.
- Wright, M. D., Geary, S. M., Fitter, S., Moseley, G. W., Lau, L., Sheng, K., Apostolopoulos, V., et al. (2004). Characterization of Mice Lacking the Tetraspanin Superfamily Member CD151. *Molecular and cellular biology*, *24*(13), 5978–5988. doi:10.1128/MCB.24.13.5978
- Wu, C., Cai, P., Chang, Q., Hao, L., Peng, S., Sun, X., Lu, H., et al. (2011). Mapping the binding between the tetraspanin molecule (Sjc23) of *Schistosoma japonicum* and human non-immune IgG. *PLoS one*, *6*(4), e19112. doi:10.1371/journal.pone.0019112
- Wu, X., Fan, Z., Masui, H., Rosen, N., & Mendelsohn, J. (1995). Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *The Journal of clinical investigation*, *95*(4), 1897–905. doi:10.1172/JCI117871
- Xie, B., Shen, J., Dong, A., Swaim, M., Hackett, S. F., Wyder, L., Worpenberg, S., et al. (2008). An Adam15 amplification loop promotes vascular endothelial growth factor-induced ocular neovascularization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *22*(8), 2775–83. doi:10.1096/fj.07-099283
- Xu, D., Sharma, C., & Hemler, M. E. (2009). Tetraspanin12 regulates ADAM10-dependent cleavage of amyloid precursor protein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *23*(11), 3674–81. doi:10.1096/fj.09-133462
- Xu, P., & Derynck, R. (2010). Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Molecular cell*, *37*(4), 551–66. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.034
- Yalaoui, S., Zougbedé, S., Charrin, S., Silvie, O., Arduise, C., Farhati, K., Boucheix, C., et al. (2008). Hepatocyte permissiveness to Plasmodium infection is conveyed by a short and structurally conserved region of the CD81 large extracellular domain. *PLoS pathogens*, *4*(2), e1000010. doi:10.1371/journal.ppat.1000010



- Yamada, M., Sumida, Y., Fujibayashi, A., Fukaguchi, K., Sanzen, N., Nishiuchi, R., & Sekiguchi, K. (2008). The tetraspanin CD151 regulates cell morphology and intracellular signaling on laminin-511. *The FEBS journal*, *275*(13), 3335–51. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06481.x
- Yamaguchi, R., Yamagata, K., Ikawa, M., Moss, S. B., & Okabe, M. (2006). Aberrant distribution of ADAM3 in sperm from both angiotensin-converting enzyme (Ace)- and calmeglin (Clgn)-deficient mice. *Biology of reproduction*, *75*(5), 760–6. doi:10.1095/biolreprod.106.052977
- Yamashita, Y., Kawashima, I., Yanai, Y., Nishibori, M., Richards, J. S., & Shimada, M. (2007). Hormone-induced expression of tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/A disintegrin and metalloprotease-17 impacts porcine cumulus cell oocyte complex expansion and meiotic maturation via ligand activation of the epidermal growth factor receptor. *Endocrinology*, *148*(12), 6164–75. doi:10.1210/en.2007-0195
- Yan, Y., Shirakabe, K., & Werb, Z. (2002). The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *The Journal of cell biology*, *158*(2), 221–6. doi:10.1083/jcb.200112026
- Yañez-Mó, M., Barreiro, O., Gonzalo, P., Batista, A., Megías, D., Genís, L., Sachs, N., et al. (2008). MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in primary endothelial cells. *Blood*, *112*(8), 3217–26. doi:10.1182/blood-2008-02-139394
- Yang, X. D., Jia, X. C., Corvalan, J. R., Wang, P., & Davis, C. G. (2001). Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Critical reviews in oncology/hematology*, *38*(1), 17–23.
- Yang, X. H., Richardson, A. L., Torres-Arzayus, M. I., Zhou, P., Sharma, C., Kazarov, A. R., Andzelm, M. M., et al. (2008). CD151 accelerates breast cancer by regulating alpha 6 integrin function, signaling, and molecular organization. *Cancer research*, *68*(9), 3204–13. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2949
- Yang, X., Wei, L. L., Tang, C., & Cells, B. C. (2001). Overexpression of KAI1 Suppresses *in Vitro* Invasiveness and *in Vivo* Metastasis in Breast Cancer Cells Overexpression of KAI1 Suppresses *in Vitro* Invasiveness and *in Vivo* Metastasis in. *Cancer research*, *61*, 5284–5288.
- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, *37 Suppl 4*, S3–8.
- Yavari, R., Adida, C., Bray-Ward, P., Brines, M., & Xu, T. (1998). Human metalloprotease-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia. *Human molecular genetics*, *7*(7), 1161–7.
- Yoshimura, T., Tomita, T., Dixon, M. F., Axon, A. T. R., Robinson, P. a, & Crabtree, J. E. (2002). ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) messenger RNA expression in Helicobacter pylori-infected, normal, and neoplastic gastric mucosa. *The Journal of infectious diseases*, *185*(3), 332–40. doi:10.1086/338191
- Yun, C.-H., Mengwasser, K. E., Toms, A. V., Woo, M. S., Greulich, H., Wong, K.-K., Meyerson, M., et al. (2008). The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(6), 2070–5. doi:10.1073/pnas.0709662105
- Zhang, G., Fang, B., Liu, R. Z., Lin, H., Kinose, F., Bai, Y., Remily-wood, E. R., et al. (2011). Mass spectrometry mapping of epidermal growth factor receptor phosphorylation related to oncogenic mutations and tyrosine kinase inhibitor sensitivity. *Journal of Proteome Research*, *10*(1), 305–319. doi:10.1021/pr1006203.Mass

- Zhang, Jie, Randall, G., Higginbottom, A., Rice, C. M., Mckeating, J. A., & Monk, P. (2004). CD81 Is Required for Hepatitis C Virus Glycoprotein-Mediated Viral Infection CD81 Is Required for Hepatitis C Virus Glycoprotein-Mediated Viral Infection. *Journal of virology*, 78(3), 1448–1455. doi:10.1128/JVI.78.3.1448
- Zhang, Jinqiu, Wong, H., Ramanan, S., & Lines, C. C. (2003). The Proline-Rich Acidic Protein Is Epigenetically Regulated and Inhibits Growth of Cancer Cell Lines The Proline-Rich Acidic Protein Is Epigenetically Regulated and Inhibits Growth of, 6658–6665.
- Zhang, X. a, Bontrager, a L., & Hemler, M. E. (2001). Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *The Journal of biological chemistry*, 276(27), 25005–13. doi:10.1074/jbc.M102156200
- Zhang, X. A., Kazarov, A. R., Yang, X., Bontrager, A. L., Stipp, C. S., & Hemler, M. E. (2002). Function of the Tetraspanin CD151 – alpha6beta1 Integrin Complex during Cellular Morphogenesis. *Molecular biology of the cell*, 13(January), 1–11. doi:10.1091/mbc.01-10-0481.
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. a, & Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 125(6), 1137–49. doi:10.1016/j.cell.2006.05.013
- Zhang, Z., Oliver, P., Lancaster, J. R., Schwarzenberger, P. O., Joshi, M. S., Cork, J., & Kolls, J. K. (2001). Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor alpha-converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(2), 303–5. doi:10.1096/fj.00-0371fje
- Zheng, X., Jiang, F., Katakowski, M., Kalkanis, S. N., Hong, X., Zhang, X., Zhang, Z. G., et al. (2007). Inhibition of ADAM17 reduces hypoxia-induced brain tumor cell invasiveness. *Cancer science*, 98(5), 674–84. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00440.x
- Zheng, Y., Schlondorff, J., & Blobel, C. P. (2002). Evidence for regulation of the tumor necrosis factor alpha-convertase (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1. *The Journal of biological chemistry*, 277(45), 42463–70. doi:10.1074/jbc.M207459200
- Zhu, G.-Z., Miller, B. J., Boucheix, C., Rubinstein, E., Liu, C. C., Hynes, R. O., Myles, D. G., et al. (2002). Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development (Cambridge, England)*, 129(8), 1995–2002.
- Zhu, X., & Evans, J. P. (2002). Analysis of the roles of RGD-binding integrins, alpha4/alpha9 integrins, alpha6 integrins, and CD9 in the Interaction of the Fertilin<sub>NL</sub> ( ADAM2 ) Disintegrin Domain with the Mouse Egg Membrane 1. *Biology of reproduction*, 1202, 1193–1202.
- Zhuang, G., Brantley-Sieders, D. M., Vaught, D., Yu, J., Xie, L., Wells, S., Jackson, D., et al. (2010). Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer research*, 70(1), 299–308. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1845
- Zijlstra, A., & Quigley, J. P. (2006). The DARC side of metastasis: shining a light on KAI1-mediated metastasis suppression in the vascular tunnel. *Cancer cell*, 10(3), 177–8. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.012
- Zimmer, M., Palmer, A., Köhler, J., & Klein, R. (2003). EphB – ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion, 5(10). doi:10.1038/ncb1045.NATURE
- Ziyyat, A., Rubinstein, E., Monier-Gavelle, F., Barraud, V., Kulski, O., Prenant, M., Boucheix, C., et al. (2006). CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *Journal of cell science*, 119(Pt 3), 416–24. doi:10.1242/jcs.02730

Zöller, M. (2009). Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nature reviews. Cancer*, 9(1), 40–55. doi:10.1038/nrc2543

## Summary

ADAMs are a sub-family of enzymes called “metalloproteases” which are implicated in a variety of physiological as well as pathological processes through their ability to cleave a number of substrates including growth factors, cytokines or adhesion proteins. Despite numerous studies on ADAM activity, very little is known about their regulation.

Tetraspanins form a super-family of membrane proteins with a common conserved structure. They are implicated in numerous biological processes including migration, intercellular interactions, immune response, gamete fusion... Tetraspanins are known to interact with one another and with a restricted number of protein partners at the cell surface, thus forming a multi-molecular network referred to as « the tetraspanin web ». Previous studies in our laboratory have shown that the metalloprotease ADAM10 is associated to the tetraspanin web. Nevertheless, the tetraspanin in direct interaction with ADAM10 enabling it to be part of the web was not identified at the time. To begin with, in order to establish a model providing a read-out for a modulation of ADAM10 activity by tetraspanins, we demonstrate that tetraspanin engagement by monoclonal antibodies enhances E-cadherin shedding by ADAM10. Furthermore, muscarinic receptor activation also augments E-cadherin shedding but this time in an ADAM17-dependent manner. This occurs without the intervention of EGFR transactivation whereas a direct EGFR activation is able to stimulate E-cadherin shedding.

Refocusing on the initial subject of the consequences of an interaction between ADAM10 and the tetraspanins, we conclusively show that the metalloprotease ADAM10 interacts with members of the conserved TspanC8 subfamily consisting of tetraspanins Tspan5, Tspan17, Tspan14, Tspan15, Tspan10 and Tspan33. These interactions and the relative expression of each of the TspanC8 members play a role in ADAM10 trafficking. ADAM10 and TspanC8 interactions are conserved throughout the Evolution and play a role in Notch signaling pathway regulation. When we examined in more details the particular interaction between the tetraspanin Tspan5 and ADAM10, we discovered that it had a negative effect on ADAM10 membrane as well as total expression.

Moreover, this interaction seems to have implications on prostate cancer PC3 cell proliferation as Tspan5 overexpression causes a diminished growth rate. This inhibition could be caused by one or more soluble factors which could be less secreted by cells overexpressing Tspan5 than wild-type counterparts. Furthermore, oddly enough, PC3 cells overexpressing Tspan5 were completely unaffected by drugs targeted against the tyrosine-kinase receptor EGFR whereas this type of treatment impaired PC3 WT cell growth which therefore seems at least partly dependent on EGFR

signalling. Finally, we reveal that another tyrosine-kinase receptor called EphA2 could play the prominent role of regulating EGFR signalling-dependence in PC3 cells.

## **Annexe: Tableaux**

**Tableau I : Paires de tétraspanines/partenaires de tétraspanines établies ou potentielles (Compilées par Eric Rubinstein)**

<b>Tétraspanines</b>	<b>Partenaires</b>	<b>Confirmé par cross-linking</b>	<b>Références</b>	<b>Commentaires</b>	<b>Autres tétraspanines associées à cette molécule en utilisant des détergents plus doux</b>
<b>UP1a/Tspan20</b>	UPII	Yes	For review (Sun, 2006)	The UP1b/UPIII pair served as a control	
<b>UP1b/Tspan21</b>	UPIII	Yes	For review (Sun, 2006)	The UP1a/UPII pair served as a control	
<b>CD9/Tspan29</b>	CD9P-1/EWI-F/FPRP/CD315	Yes	(S Charrin et al., 2001; Stipp, Orlicky, & Hemler, 2001)	Specific digitonin-resistant complex. Partially resistant to Triton X-100 disruption	CD82, CD151, CD63, Tspan8 (S Charrin et al., 2001; Christoph Claas et al., 2005)
	EWI-2/CD316	Yes	(Stéphanie Charrin, Manié, et al., 2003; Stipp, Orlicky, et al., 2001)	Specific digitonin-resistant complex	CD53, CD82, CD151 (Stéphanie Charrin, Manié, et al., 2003; X. A. Zhang, Lane, Charrin, Rubinstein, & Liu, 2003)
	EpCAM	Yes	(François Le Naour, André, Greco, et al., 2006)	Specific digitonin-resistant complex	Tspan-8 (Christoph Claas et al., 2005)
	Pro-HB-EGF	Yes	(Ryo Iwamoto et al., 1994)	Only CD9 among tetraspanins can upregulate its activity	CD63, CD81, CD82 (Nakamura, Mitamura, Takahashi, Kobayashi, & Mekada, 2000)
	ICAM-1	No	(Barreiro et al., 2005, 2008)	FRET analysis suggests a proximity of ICAM1 with CD9 but not CD151	CD151 (Barreiro et al., 2005)
	Claudin-1	Yes	(Kovalenko, Yang, & Hemler,	Claudin-1 identified in a Triton X-100 CD9 immunoprecipitation by mass	CD81 and CD151 (H. J. Harris et al., 2008; Kovalenko

			2007)	spectrometry	et al., 2007)
	Pro-TGF $\alpha$	No	(Shi, Fan, Shum, & Derynck, 2000)	Triton X-100 co-immunoprecipitation. No other tetraspanin tested	
	integrin $\alpha_2\beta_1$	No	(Cailleteau et al., 2010)	Detection identified using the split-ubiquitin assay; confirmation by co-immunoprecipitation in Brij58 buffer.	CD151 (Sincock et al., 1999)
<b>CD81/Tspan28</b>	CD19	No	(Bradbury, Kansas, Levy, Evans, & Tedder, 1992; Clay, Billard, Boucheix, & Rubinstein, 1998; Matsumoto et al., 1993; Shoham et al., 2003)	Specific digitonin-resistant complex; CD21 is supposed to interact with CD81 through CD19	CD9, CD81 (Clay et al., 1998)
	Integrin $\alpha_4\beta_1$	No	(Serru et al.1999)	Specific digitonin-resistant complex	CD9, CD53, CD63, and CD82 (Mannion et al.1996) (Rubinstein et al. 1996)
	CD9P-1/EWI-F/FPRP	Yes	(S Charrin et al., 2001; Stipp, Orlicky, et al., 2001)	Specific digitonin-resistant complex	CD82, CD151, CD63, Tspan8 (S Charrin et al., 2001; Christoph Claas et al., 2005)
	EWI-2/CD316	Yes	(Stéphanie Charrin, Le Naour, et al., 2003; Clark, Zeng, Langford, Bowen, & Todd, 2001; Stipp, Kolesnikova, & Hemler, 2001)	Specific digitonin-resistant complex	CD53, CD82, CD151 ((S Charrin et al., 2001; Christoph Claas et al., 2005)
	Claudin-1	No	(H. J. Harris et al., 2008; Kovalenko et al., 2007)	FRET indicates proximity	CD9 CD151 (Kovalenko et al., 2007)
<b>CD151/Tspan24</b>	Integrin $\alpha_3\beta_1$	Yes	(Sincock et al., 1999; Yauch, Berditchevski, Harler, Reichner, & Hemler, 1998; Yauch, Kazarov, Desai, Lee,	Specific digitonin, NP-40 and Triton X-100-resistant complex	CD9, CD81, CD82, CD63, Tspan4 (Berditchevski et al., 1995; Berditchevski et al., 1996; Tachibana et al., 1997)



			& Hemler, 2000 ; Serru et al.1999)		
	Integrin $\alpha_6\beta_1$	Yes	(Kazarov, 2002; Sincock et al., 1999 ; Serru et al. 1999)	Specific digitonin and NP-40 resistant complex	CD9, CD81, CD82, CD63, Tspan4 (Berditchevski et al., 1995; Berditchevski et al., 1996; Tachibana et al., 1997)
	Integrin $\alpha_6\beta_4$	No	(Chometon et al., 2006; Sterk et al., 2000)	A direct association is suggested by the targeting of CD151 to hemidesmosomes by this integrin and the absence of staining of hemidesmosomes by a CD151 mAb which detects the fraction of CD151 not associated with integrins.	CD9 (Baudoux et al., 2000)
	Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	+/-	(Lau et al., 2004)	Interaction observed in Triton X-100 but no other tetraspanin tested in parallel. Cross-linking experiments did not provide any information on the size of the complex; altered integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ functions of CD151 null platelets	CD9, CD63 (Indig, Diaz-gonzalez, & Ginsberg, 1997) (Israels et al., 2001; Slupsky et al., 1989)
	VCAM-1	No	(Barreiro et al., 2005, 2008)	FRET analysis suggests proximity of VCAM1 with CD151 but not CD9	CD9 (Barreiro et al., 2005)
	MT1-MMP	No	(Yañez-Mó et al., 2008)	FRET analysis suggests proximity of MT1-MMP with CD151 but not CD9. Specific effect of CD151 silencing on MT1-MMP function	CD9, CD81, CD63, Tspan12 (Lafleur, Xu, & Hemler, 2009; Yañez-Mó et al., 2008)
<b>CD53/Tspan25</b>	ADAM10	No		Specific digitonin-resistant complex (our unpublished data)	CD9, CD63, CD81, CD82, CD151, Tspan12 (Arduise et al., 2008; D. Xu, Sharma, & Hemler, 2009)

<b>CD63/Tspan30</b>	H <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase	No	(Duffield, Kamsteeg, Brown, Pagel, & Caplan, 2003)	Interaction observed in Triton X-100 but no other tetraspanin tested in parallel	
	CXCR4	No	(Yoshida et al., 2008)	CD63 modifies trafficking of CXCR4	
	Synaptotagmin VII		(Flannery, Czubener, & Andrews, 2010)		CD63 regulates subcellular localization of synaptotagmin VII
<b>Tspan12</b>	Frizzled 4	No	(Junge et al., 2009)	Tspan12 is a component of the norrin receptor complex, as determined by cross-linking, and modulates norrin-induced signalling. A number of other tetraspanins were shown not to stimulate norrin signalling.	ADAM10 in Brij 97 (Xu et al. 2009)
<b>Tspan8</b>	E-cadherin		(Greco et al., 2010)	Cross-linking reveals the existence of a complex the size of which is compatible with a proximal interaction; no detection of a CD9/E-cadherin interaction under the same conditions; E-cadherin association with tetraspanins is usually not observed in co-immunoprecipitation experiments	
<b>TspanC8 tetraspanins (Tspan5, 10, 14, 15, 17, 33)</b>	ADAM10	Yes	(Prox et al. 2012)(Dornier, Ottavi, Coumilleau et al., 2012; Haining et al., 2012)	Specific digitonin-resistant complex; All 6 TspanC8 tetraspanins were shown to promote exit ADAM10 from the Endoplasmic Reticulum, and 4 of them to increase ADAM10 cell surface expression	CD9, CD63, CD81, CD82, CD151, Tspan12 (Arduise et al., 2008; D. Xu et al., 2009)

**Tableau II: Protéines interagissant avec les tétraspanines mais n'ayant pas de tétraspanine partenaire primaire** (Compilées par Eric Rubinstein)

Molécule associée	Tétraspanines associées identifiées	Condition de detergent la plus stringentes où l'interaction a été observée. Commentaires
<b>Adhesion molecules</b>		
$\alpha 1\beta 1$ integrin	CD9	Brij97 (Lozahic et al., 2000)
$\alpha 5\beta 1$ integrin	CD9,CD151	CHAPS ; Brij58; interaction not observed in Brij97 (Rubinstein et al., 1994; Sincock et al., 1999)
$\alpha 7\beta 1$ integrin	CD151, CD9	CHAPS (Sterk et al., 2000)
$\alpha L\beta 2$ integrin	CD82	Brij96 (Shibagaki, Hanada, Yamashita, Shimada, & Hamada, 1999)
$\alpha M\beta 2$ integrin	CD63	Brij58 (Skubitz, Campbell, Amy, & Skubitz, 1996)
$\alpha v\beta 5$ integrin	CD81	Brij97 (Y. Chang & Finnemann, 2007)
CD42/gplb	CD9	CHAPS +crosslinking (Longhurst, White, Wilkinson, & Jennings, 1999; Slupsky et al., 1997)
CD44	CD9*, Tspan8, Tspan12*	Brij97 (André et al., 2006; D. Xu et al., 2009); Crosslinking with CD9 after depalmitoylation (Kovalenko et al., 2007)
GPVI	Tspan9, CD9, CD151	Brij97 (Protty et al., 2009)
Syndecan	CD9	CHAPS (Jones et al., 1996)
Lu/B-CAM/ CD239	CD9*	Brij97 (André et al., 2006)
CD36	CD9	Brij96 (Miao, 2001)

L1-CAM	CD9	An interaction had been observed in CHAPS (Schmidt et al., 1996). We could not observe it in Brij97 (our unpublished data)
<b>Ig domain proteins</b>		
MHC-I	CD82, CD81, CD53, CD9*	Brij 97 (CD9) (Lagaudrière-Gesbert, Lebel-binay, & Wiertz, 1997; Le Naour, André, Greco, et al., 2006) ; Crosslinking with CD9 after depalmitoylation (Kovalenko et al., 2007); the interaction with CD53 and CD81 is only supported by mAb FRET experiments (Szöllosi, Damjanovich, & Mátyus, 1998)
MHC-II	CD9*, CD53, CD81, CD82, CD37	CHAPS (Angelisova et al., 1994; Rubinstein et al., 1996); mAb FRET (Szollosi, Horejsi, Bene, Angelisova, & Damjanovich, 1996) ; Based on the pattern of biotin-labelled proteins, the interaction is probably conserved in Brij 97 (Horváth et al., 1998)
CD2	CD9, CD53	CHAPS (B. G. M. Bell, Seaman, Niemi, & Imboden, 1992); elsewhere, no interaction of CD2 with CD81 and CD82 could be observed in CHAPS and Brij97 (Imai, Kakizaki, & Nishimura, 1995)
CD3	CD9, CD81, CD82	CHAPS (Toyo-oka et al., 1999)
CD4	CD81,CD82	Brij96 (Imai and Yoshie, 1993)
CD5	CD9	CHAPS (Toyo-oka et al., 1999) ; elsewhere, the interaction with CD81 and CD82 observed in CHAPS was variable and not observed in Brij96 (Imai and Yoshie, 1993)
CD8	CD81, CD82	Brij96 (Imai and Yoshie, 1993)
<b>Other receptors</b>		
EGFR	CD82, CD9, Tspan12*	Brij98 (E Odintsova, Sugiura, & Berditchevski, 2000), CHAPS CD9 (Murayama et al., 2008), Brij 96/97 Tspan12(D. Xu et al., 2009)

GPR56	CD9, CD81*	Brij96 (Little, Hemler, & Stipp, 2004)
cKit/CD117	CD9, CD81, CD63	CHAPS (Anzai, 2002)
c-MET	CD82, CD151	Brij98 (Klosek et al., 2005; M. Takahashi, Sugiura, Abe, Ishii, & Shirasuna, 2007). No interaction of CD82 with c-Met could be observed elsewhere (Sridhar & Miranti, 2006)
CD71 (transferrin receptor)	CD81, Tspan12*	Brij 97 (D. Xu et al., 2009) (Abache et al. 2007)
AMPA receptor	Tspan7	(Bassani et al., 2012)
<b>Membrane-anchored enzymes</b>		
CD26/ dipeptidyl peptidase IV	CD9*	Brij97 (François Le Naour, André, Boucheix, et al., 2006); based on the pattern of proteins co-immunoprecipitated with CD26, Tspan8 probably also associates with CD26
CD13/aminopeptidase N	CD9, CD81*, Tspan12*	Mass-spectrometry (D. Xu et al., 2009). A mAb screened for its ability to co-immunoprecipitate tetraspanins recognized CD13 and was used to confirm the presence of CD13 in a CD9 IP (Rubinstein's lab, unpublished). Association with CD81 confirmed in (Xu et al., 2009)
CD38/cyclic ADP-ribose hydrolase	CD9	CHAPS (Zilber et al., 2005)
CD224/ $\gamma$ -glutamyltransferase 1	CD9*, CD37, CD81, CD53, CD82	Brij97 (François Le Naour, André, Greco, et al., 2006; Nichols et al., 1998)
$\gamma$ -secretase	CD9, CD81	CHAPS (Wakabayashi et al., 2009)
<b>Multipass membrane proteins</b>		

Choline Transporter Like Protein 1 (CTL1)/CDw92	CD9*	Brij97 (André et al., 2006; François Le Naour, André, Boucheix, et al., 2006)
CD20	CD53, CD81, CD82	mAb FRET (Szöllosi et al., 1998)
L6	CD81, CD63, CD151,	0.8% Brij 98/0.2% Triton X-100 (Lekishvili et al., 2008)
CD47	CD9	CHAPS (Longhurst et al., 1999)
<b>Others</b>		
CD46	CD9*, CD81, CD82, CD151	Brij97 (Lozahic et al., 2000); interaction with tetraspanins probably indirect interaction through integrins
Leu-13/IFITM1	CD81	CHAPS (S. Takahashi, Doss, Levy, & Levy, 1990)
Aggrus/podoplanin	CD9	Brij97. The expression of CD9 in a cancer cell line delayed platelet activation through podoplanin (Nakazawa et al., 2008)
SCIMP	CD37, CD53, CD81	CHAPS, Brij98 (Draber et al., 2011)

Les résultats d'analyses protéomiques sont inclus seulement si l'interaction a été confirmée pour au moins une tétraspanine.

La plupart des interactions observées avec les détergents les plus doux (CHAPS, Brij 58 or 98) n'ont pas été testées en Brij97.

\*: indique l'identification de la protéine associée lors d'une analyse protéomique (pas nécessairement l'identification initiale). Cette interaction peut avoir été observée dans d'autres expériences.

## Annexe: Publication

Dornier E\*, Coumailliau F\*, Ottavi JF\*, Moretti J, Boucheix C, Mauduit P, Schweisguth F, Rubinstein E. *J Cell Biol.* 2012 Oct 29;199(3):481-96.

\*Contributed equally to the work

**TspanC8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals.**

Je souhaite enfin remercier ici

Mes parents ainsi que l'ensemble de ma famille pour leur patience et leur soutien

Monsieur Philippe Mauduit pour son implication quotidienne et sa confiance en mon travail ainsi que pour son soutien indéfectible tant au niveau professionnel que personnel

L'ensemble des membres du laboratoire : Claude Boucheix et Eric Rubinstein pour m'avoir donné la chance de participer à cette aventure, Joëlle Chaker pour son soutien constant, Rosella Mollicone et Rafael Oriol pour leur bonne humeur journalière, Stéphanie Charrin et sa mauvaise foi de supportrice acharnée, Martine Billard, son Boubou et sa Zozo, François Le Naour et ses contrepets, Franck Gesbert et son humour noir, Jacqueline Bréard (qui ira probablement un jour chercher les sandwiches à midi), Jacqueline Drouin et son regard en coin, Clémentine Pébarthe et son fils, Sabrina Soave pour ces moments-cultes en salle de culture, Annie Talia, Denis Clay et sa salle climatisée durant les mois d'été, Isabelle Huesca, Philippe Matima et l'ensemble des étudiants, thésards et post-docs passés ou actuels de l'unité : Cécile, Céline, Emmanuel, Richard, Mònica, Roberta, Tania, Naouel, Aïda, Leslie, Stéphanie, Arnaud, Célia, Edouard, Lucie

L'ensemble du personnel des bâtiments Lavoisier et Lwoff pour les excellents moments passés avec eux : mes Uzettes chéries et les rares spécimens masculins de l'équipe, les AbCellettes, les Caro-istes, la joyeuse équipe de l'U1014 et leurs légendaires afterworks, les gestionnaires plus adorables les uns que les autres ainsi que le personnel de laverie et animalerie

Les amis connus tout au long de ma scolarité

CIV Crew : mes professeurs Norick Simonetti et Frédéric Boulé, Clément, Cyrille, Bruno, Julie, Veronica, Yorick

U-Psud Crew : Nadège et sa famille, Maximilien, Julien ainsi que Béatrix, Victoria et Mathieu, Bérénice, Gabriel, Marguerite, Eulalie, Lucile

ENS Crew : M. Gérard Peyroche et l'ensemble de la promotion Biochimie et génie biologique 2008 de l'ENS Cachan ainsi qu'Antoine

Je ne puis oublier ici Sara et Jessica pour leurs relectures et leur fol enthousiasme.

Vous comptez tant pour moi ; je vous serai éternellement reconnaissant et redevable.

Je sais gré également à mesdames Claeysen et Cocquerel ainsi que messieurs Bobé et Le Naour pour leur participation à ce jury ainsi que pour l'intérêt manifesté envers mon travail.



