



**HAL**  
open science

# Compartimentation membranaire d'ADAM10 par les tétraspanines : conséquences pour la voie de signalisation NOTCH

Stéphanie Jouannet

► **To cite this version:**

Stéphanie Jouannet. Compartimentation membranaire d'ADAM10 par les tétraspanines : conséquences pour la voie de signalisation NOTCH. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T066 . tel-01403463

**HAL Id: tel-01403463**

**<https://theses.hal.science/tel-01403463>**

Submitted on 26 Nov 2016

**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.



Comprendre le monde,  
construire l'avenir®



**Inserm**

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 419 :  
BIOSIGNE

Laboratoire : UMR S 1004 - Réponses cellulaires au microenvironnement et  
cancer

## THÈSE DE DOCTORAT

ASPECTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

par

**Stéphanie JOUANNET**

Compartimentation membranaire d'ADAM10 par les  
tétraspanines : conséquences pour la voie de signalisation  
NOTCH

**Date de soutenance : 25/11/2014**

**Composition du jury :**

Directeur de thèse : Dr. Eric RUBINSTEIN

Président du jury :

Rapporteurs :

Examineur :

Pr. Karim BENIHOUD  
Dr. Laurence COCQUEREL-DEPROY  
Dr. Guillaume VAN NIEL  
Dr. Christel BROU

Directeur de Recherche (IAL, Villejuif)

Professeur d'Université (IGR, Villejuif)  
Chargé de Recherche (Institut Pasteur, Lille)  
Chargé de Recherche (Institut Curie, Paris)  
Chef de Laboratoire (Institut Pasteur, Paris)



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 419 :  
BIOSIGNE

Laboratoire : UMR S 1004 - Réponses cellulaires au microenvironnement et  
cancer

## THÈSE DE DOCTORAT

ASPECTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

par

**Stéphanie JOUANNET**

Compartimentation membranaire d'ADAM10 par les  
tétraspanines : conséquences pour la voie de signalisation  
NOTCH

**Date de soutenance : 25/11/2014**

**Composition du jury :**

Directeur de thèse : Dr. Eric RUBINSTEIN

Directeur de Recherche (IAL, Villejuif)

Président du jury : Pr. Karim BENIHOUD  
Rapporteurs : Dr. Laurence COCQUEREL-DEPROY  
Dr. Guillaume VAN NIEL

Professeur d'Université (IGR, Villejuif)  
Chargé de Recherche (Institut Pasteur, Lille)  
Chargé de Recherche (Institut Curie, Paris)  
Chef de Laboratoire (Institut Pasteur, Paris)

Examineur : Dr. Christel BROU



## REMERCIEMENTS

Plutôt que de me lancer dans une longue liste de remerciements, qui serait certainement non exhaustive, je m'en tiendrai à d'agréables généralités pour que tout le monde se sente concerné (même ceux qui le sont moins).

Pour commencer, je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury, le président Karim BENIHOUD, les rapporteurs Laurence COCQUEREL-DEPROY et Guillaume VAN NIEL et également Christel BROU pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et pour l'intérêt qu'ils y ont porté.

Je remercie le directeur de l'unité U1004 et directeur de ma thèse, Eric RUBINSTEIN, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Christel BROU et Pierre-Emmanuel MILHIET, qui m'ont prodigué de précieux conseils.

Merci à l'association *Vaincre le cancer-NRB* pour le financement de cette thèse.

Merci à celles et ceux qui dès le début ont cru en moi et m'ont permis de démarrer et de mener à bien ce travail.

Merci beaucoup à celles et ceux qui m'ont aidé par leurs avis éclairés et leur soutien technique pendant ces trois ans.

Enfin, un grand Merci bien sûr à mon chéri, à ma famille et à mes proches de m'avoir accompagné et soutenu dans cette aventure.



## RESUME

Il est maintenant reconnu que la ségrégation latérale des composants de la membrane plasmique, ou compartimentation membranaire, joue un rôle important dans la régulation de la fonction de nombreuses protéines membranaires. Les tétraspanines constituent une famille de protéines intégrales à quatre régions transmembranaires possédant une capacité unique à s'associer entre elles et avec des nombreuses autres molécules de surface pour former un réseau d'interactions moléculaires, le « tetraspanins web ». Il a été proposé que via l'organisation de ce réseau, les tétraspanines joueraient un rôle dans la compartimentation membranaire des protéines auxquelles elles s'associent. Elles jouent également un rôle dans la compartimentation cellulaire en contrôlant le trafic de certaines des protéines associées.

Le laboratoire a précédemment démontré que six tétraspanines conservées (Tspan5, 10, 14, 15, 17 et 33) de la sous-famille des TspanC8 (caractérisées par la présence de huit cystéines dans le grand domaine extracellulaire) interagissent directement avec la métalloprotéase ADAM10 et régulent sa sortie du réticulum endoplasmique. Cette protéase ancrée à la membrane est responsable du clivage protéolytique de l'ectodomaine de diverses molécules de surface et est indispensable pour l'activation de la voie de signalisation NOTCH. Nous démontrons que Tspan5 et Tspan14 sont des régulateurs positifs de la voie de signalisation Notch et que Tspan15 est un régulateur négatif, agissant en amont de la  $\gamma$ -sécrétase. Cette régulation négative est associée à un changement d'environnement membranaire ainsi qu'à une dynamique différente d'ADAM10 comme le montre un suivi de la protéase à l'échelle de la molécule unique. Par ailleurs, l'analyse par spectrométrie de masse quantitative a montré que la capacité d'ADAM10 à s'associer à des composants connus du réseau de tétraspanines était influencée par son interaction avec ces tétraspanines. Enfin, nous avons identifié une région de la cellule enrichie en CD9 qui contenait également ADAM10 lorsque Tspan5 est exprimée, mais ce n'est pas le cas avec Tspan15.

Cette étude démontre que les différentes TspanC8 influencent différemment la capacité d'ADAM10 à cliver certains de ses substrats et illustre la capacité des tétraspanines à réguler l'activité de leurs protéines partenaires en contrôlant leur compartimentation membranaire.

Mots clés : tétraspanines, ADAM10, NOTCH, microdomaines membranaires

## ABSTRACT

It is now recognized that the lateral segregation of components of the plasma membrane or membrane compartmentalization, play an important role in the regulation of many membrane proteins functions. Tetraspanins are a family of integral membrane proteins with four transmembrane domains with a unique ability to associate with one another and with many other surface molecules to organize a molecular interactions network, the “tetraspanins web”. It was suggested that via the organization of this network, the tetraspanin play a role in membrane compartmentalization of proteins to which they associate. Tetraspanins also play a role in cellular compartmentalization by controlling the trafficking of some associated proteins.

In the lab, it has been shown that six conserved tetraspanin (Tspan5, 10, 14, 15, 17 et 33) of the TspanC8 subgroup (characterized by the presence of eight cysteines in the large extracellular domain) interact directly with the metalloproteinase ADAM10 et mediates its exit from the endoplasmic reticulum. This membrane-anchored metalloprotease mediated ectodomain shedding of various integral molecules and is essential for Notch signaling pathway activation. We demonstrate that both Tspan5 and Tspan14 are positive regulators of Notch signaling pathway, whereas Tspan15 appears as negative regulator, acting in upstream  $\gamma$ -secretase. This downregulation is associated with a modification of membrane environment as well as different dynamics of ADAM10, as shown by monitoring of protease using single molecule tracking. Furthermore, quantitative mass spectrometry analysis revealed that ADAM10 ability to associate with known components of “tetraspanin web” was influenced by its interaction with these tetraspanins. Finally, we have identified a CD9 enriched cell area which also contained ADAM10 when Tspan5 is expressed but not with Tspan15.

This study demonstrates that different TspanC8 influence differently the ADAM10 ability to cleave some of its substrates and illustrate the ability of tetraspanins to regulate the activity of their proteins partners by controlling their membrane compartmentalization.

Keywords : tetraspanins, ADAM10, NOTCH, membrane microdomains

# SOMMAIRE

|  |           |
|--|-----------|
| RESUME.....  | 7         |
| ABSTRACT.....  | 8         |
| INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....   | 12        |
| <b>INTRODUCTION.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>La membrane plasmique et la compartimentation membranaire.....</b>  | <b>19</b> |
| 1- Le modèle membranaire : la « mosaïque fluide ».....   | 19        |
| 2- L'organisation de la membrane plasmique.....  | 20        |
| 2.1- Les lipides membranaires.....   | 20        |
| 2.2- Les protéines membranaires.....   | 22        |
| 2.3- Les interactions lipide-lipide et lipide-protéine à la membrane plasmique....   | 24        |
| 2.4- Les interactions des protéines membranaires avec le cytosquelette.....  | 25        |
| 2.5- La dynamique moléculaire des membranes lipidiques : les membranes artificielles.....  | 26        |
| 3- Représentation actuelle de la membrane plasmique.....   | 28        |
| 4- La diffusion latérale et les restrictions de mouvement dans la membrane plasmique : les domaines membranaires.....                          | 29        |
| 5- Les microdomaines dans la membrane cellulaire.....  | 32        |
| 5.1- Les radeaux lipidiques ou « rafts » .....   | 33        |
| 5.2- Les domaines délimités par le cytosquelette .....   | 34        |
| 5.3- Les complexes de protéines ou « agrégats dynamiques » .....   | 35        |
| <b>Les tétraspanines.....</b>  | <b>37</b> |
| 1- Structure des tétraspanines.....  | 39        |
| 1.1- Les domaines transmembranaires.....   | 40        |
| 1.2- Les domaines extracellulaires.....  | 40        |
| 1.3- Les domaines cytoplasmiques.....  | 42        |
| 2- Distribution tissulaire et localisation subcellulaire des tétraspanines.....  | 42        |
| 3- Organisation des tétraspanines à la membrane plasmique.....   | 43        |
| 3.1- Le réseau de tétraspanines .....  | 43        |
| 3.2- La dynamique du réseau de tétraspanines .....   | 49        |
| 3.3- L'implication des domaines intracellulaires des tétraspanines dans la formation du réseau de tétraspanines.....                           | 50        |
| 4- Fonction des tétraspanines: de la physiologie à la régulation des protéines partenaires.....  | 51        |
| 4.1- Enseignement des maladies génétiques et des souris knock-out.....   | 51        |
| 4.2- La compartimentation membranaire.....   | 53        |
| 4.3- Les tétraspanines régulent le trafic de leurs protéines partenaires.....  | 54        |
| 4.4- Régulation fonctionnelle des complexes multimoléculaires à la membrane plasmique.....   | 54        |
| 4.5- La régulation de la fonction des intégrines par CD151 et d'autres tétraspanines est importante dans l'adhérence.....                      | 55        |
| 4.6- CD9 et CD81 dans la fusion cellule-cellule et d'autres processus: un exemple de coopération entre deux tétraspanines.....                 | 57        |
| 4.7- Les tétraspanines régulent la réponse immunitaire.....  | 57        |
| 4.8- Les tétraspanines dans les maladies infectieuses.....   | 58        |
| 4.9- Les tétraspanines régulent la progression du cancer: rôles des intégrines, des protéases et des récepteurs de facteurs de croissance..... | 59        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>La famille ADAM et la métalloprotéase ADAM10.....</b>  | <b>61</b>  |
| 1- La famille ADAM : origine.....   | 62         |
| 2- La famille ADAM : localisation.....  | 62         |
| 3- La famille ADAM : structures et fonctions des domaines.....  | 63         |
| 3.1- Le Prodomaine.....   | 64         |
| 3.2- Le domaine métalloprotéase.....  | 65         |
| 3.3- Le domaine désintégrine.....   | 67         |
| 3.4- Le domaine riche en cystéines.....   | 69         |
| 3.5- Le domaine EGF-LIKE.....   | 69         |
| 3.6- Le domaine cytoplasmique.....  | 69         |
| 4- La métalloprotéase ADAM10.....   | 71         |
| 4.1- Structure d'ADAM10.....  | 71         |
| 4.2- Rôles physiologiques et physiopathologiques d'ADAM10.....  | 73         |
| 4.2.1- Les souris Knock-out et Knock-out conditionnelles.....   | 73         |
| 4.2.2- Les substrats d'ADAM10.....  | 73         |
| 4.2.3- Les fonctions d'ADAM10.....  | 76         |
| 4.3- Régulation d'ADAM10.....   | 79         |
| 4.3.1- Régulation de son expression.....  | 79         |
| 4.3.2- Régulation du trafic d'ADAM10.....   | 81         |
| 4.3.3- Régulation de l'activité d'ADAM10.....   | 83         |
| <br>  |            |
| <b>La voie de signalisation NOTCH.....</b>  | <b>87</b>  |
| 1- Les récepteurs Notch et leurs ligands.....   | 90         |
| 1.1- La structure des récepteurs.....   | 90         |
| 1.2- Modification post-traductionnelle : la glycosylation.....  | 91         |
| 1.3- La maturation des récepteurs.....  | 93         |
| 1.4- Les ligands.....   | 95         |
| 1.4.1- Structure des ligands Notch canoniques.....  | 95         |
| 1.4.2- Structure des ligands Notch non-canoniques.....  | 96         |
| 2- La voie de signalisation NOTCH.....  | 97         |
| 2.1- Les cis- et trans-interactions.....  | 100        |
| 2.2- Le clivage S2 par ADAM10 ou ADAM17.....  | 102        |
| 2.3- Le clivage S3 par le complexe $\gamma$ -sécrétase.....   | 106        |
| 2.4- La transduction du signal Notch.....   | 107        |
| 3- Régulation de la voie de signalisation Notch par l'endocytose.....   | 109        |
| 3.1- L'endocytose du récepteur Notch.....   | 109        |
| 3.2- Le trafic du ligand DSL de Notch .....   | 113        |
| <br>  |            |
| <b>HYPOTHESES DE TRAVAIL.....</b>   | <b>115</b> |
| <br>  |            |
| <b>MATERIEL ET METHODES.....</b>  | <b>119</b> |
| <br>  |            |
| <b>RESULTATS.....</b>   | <b>129</b> |
| 1- L'association directe des TspanC8 avec ADAM10 : caractérisation dans les cellules U2OS.....                                | 131        |
| 1.1- L'expression des TspanC8, Tspan-5, -14 et -15 dans des cellules U2OSN1 augmente l'expression d'ADAM10 à la membrane..... | 131        |
| 1.2- Distribution intracellulaire des TspanC8, Tspan5, Tspan14 et Tspan15 dans les cellules U2OSN1.....                       | 134        |

|  |            |
|--|------------|
| 2- L'expression de Tspan15 dans les cellules U2OSN1 inhibe l'activité Notch induite par le ligand.....                                 | 139        |
| 2.1- L'inactivation de Tspan15 restaure l'activité Notch.....  | 140        |
| 2.2- La tétraspanine-15 inhibe la signalisation Notch à un niveau pré- $\gamma$ -sécrétase.....  | 140        |
| 3- Les TspanC8 régulent de façon différente la compartimentation membranaire d'ADAM10.....   | 142        |
| 3.1- Analyse de l'environnement membranaire d'ADAM10 par gradient de saccharose.....   | 142        |
| 3.2- Le comportement dynamique d'ADAM10 à la membrane plasmique est différent selon l'expression de Tspan5 ou Tspan15.....             | 145        |
| 3.3- Le répertoire des protéines-associées à Tspan5 et Tspan15 est très divergent.....   | 147        |
| 3.4- Tspan5 et Tspan15 influencent la capacité d'ADAM10 à interagir avec les composants du réseau de tétraspanines.....                | 153        |
| 3.5- La localisation d'ADAM10 à la membrane plasmique est différente selon l'expression de Tspan5 ou Tspan15.....                      | 156        |
| 4- Rôles des différents domaines structuraux des TspanC8 dans l'interaction avec ADAM10.....   | 161        |
| 4.1- Distribution membranaire des protéines chimères LEL et du mutant non palmitoylable.....   | 161        |
| 4.2- Les interactions Tspan5-ADAM10 et Tspan15-ADAM10 sont indépendantes de la palmitoylation et du grand domaine extracellulaire..... | 164        |
| 4.3- Le mutant Tspan5 <sup>PLM</sup> n'est pas un inhibiteur de la voie de signalisation Notch.....                                    | 165        |
| <b>DISCUSSION.....</b>   | <b>167</b> |
| <b>CONCLUSION GENERALE.....</b>  | <b>183</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>  | <b>187</b> |

## INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 1</b> - Modèle de la mosaïque fluide de la structure membranaire selon Singer–Nicolson (1972).....  | 20  |
| <b>Figure 2</b> - Représentation actuelle du modèle de la mosaïque fluide.....  | 29  |
| <b>Figure 3</b> - Schéma représentant les jonctions cellulaires et les différents domaines de la membrane plasmique dans les cellules épithéliales..... | 31  |
| <b>Figure 4</b> - Représentation schématique de l'architecture éventuelle en trois-dimensions de la membrane plasmique.....                             | 32  |
| <b>Figure 5</b> - Schéma représentant des radeaux lipidiques.....   | 34  |
| <b>Figure 6</b> - Représentation schématique du modèle « barrières et piquets » de la membrane plasmique.....   | 35  |
| <b>Figure 7</b> - Schéma des trois types de « complexes dynamiques de protéines ».....  | 36  |
| <b>Figure 8</b> - Arbre des distances entre les séquences des différentes tétraspanines de mammifères.....  | 37  |
| <b>Figure 9</b> - Schéma de la structure d'une tétraspanine.....  | 40  |
| <b>Figure 10</b> -Structure de la tétraspanine CD81.....  | 41  |
| <b>Figure 11</b> -Les interactions moléculaires du réseau de tétraspanines.....   | 44  |
| <b>Figure 12</b> -Représentation schématique du « tetraspanins web ».....   | 50  |
| <b>Figure 13</b> -Représentation schématique des domaines structuraux des Metzincines.....  | 61  |
| <b>Figure 14</b> -Représentation schématique de la disposition des domaines modulaires des ADAMs et de leur agencement potentiel.....                   | 63  |
| <b>Figure 15</b> -Structure du domaine métalloprotéase des ADAMs.....   | 66  |
| <b>Figure 16</b> -Représentation schématique de la protéine ADAM10.....   | 72  |
| <b>Figure 17</b> -Modification protéolytique du précurseur du peptide amyloïde, l'APP.....  | 76  |
| <b>Figure 18</b> -Représentation schématique des structures G-quadruplex s'associant sur les régions UTRs.....  | 80  |
| <b>Figure 19</b> -Identification de la mutation Notch chez <i>D.melanogaster</i> .....  | 87  |
| <b>Figure 20</b> -Organisation schématique des domaines des récepteurs Notch.....   | 90  |
| <b>Figure 21</b> -Structure du récepteur Notch et représentation schématique des glycosylations sur les répétitions EGF du domaine extracellulaire..... | 91  |
| <b>Figure 22</b> -Représentation schématique de la structure des répétitions EGF-like et des glycosylation du récepteur Notch.....                      | 93  |
| <b>Figure 23</b> -Représentation schématique des étapes de maturation du récepteur Notch et d'activation de la voie de signalisation.....               | 94  |
| <b>Figure 24</b> -Organisation schématique des domaines des ligands de Notch.....   | 96  |
| <b>Figure 25</b> -Vue d'ensemble de la voie de signalisation Notch canonique et la transduction du signal.....  | 99  |
| <b>Figure 26</b> -Représentation schématique de la trans-activation et de la cis-inhibition dans la voie de signalisation Notch.....                    | 101 |
| <b>Figure 27</b> -Organisation de la région extracellulaire NRR.....  | 102 |
| <b>Figure 28</b> -Modèle de la région NRR, dérivée de la structure cristallographique de la région NRR de Notch 2.....                                  | 103 |
| <b>Figure 29</b> -Interface entre les régions LNRs et les domaines HDs.....   | 104 |
| <b>Figure 30</b> -Représentation schématique du mécanisme d'assemblage du complexe transcriptionnel de Notch (NTC).....                                 | 108 |
| <b>Figure 31</b> -Représentation schématique de l'endocytose des récepteurs Notch.....  | 110 |
| <b>Figure 32</b> -L'endocytose du ligand DSL.....   | 113 |
| <b>Figure 33</b> -L'endocytose du ligand DSL par l'intervention de forces de tractions.....   | 114 |
| <b>Figure 34</b> -Etude de la dynamique membranaire d'une protéine par la technique du suivi de molécule isolée.....                                    | 126 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 35</b> -L'expression des TspanC8 Tspan-5, -14 et -15 dans la lignée cellulaire U2OSN1 augmente l'expression de surface d'ADAM10.....   | 132 |
| <b>Figure 36</b> -Les complexes TspanC8-ADAM10 sont présents à la surface cellulaire.....  | 133 |
| <b>Figure 37</b> -Analyse de l'expression du récepteur Notch dans les cellules U2OSN1.....   | 134 |
| <b>Figure 38</b> -Les TspanC8 ont une localisation subcellulaire différente.....   | 134 |
| <b>Figure 39</b> -La TspanC8, Tspan15 est exprimée dans les endosomes tardifs.....   | 136 |
| <b>Figure 40</b> -Les TspanC8, Tspan5 et Tspan14 sont exprimées dans le réticulum endoplasmique.....   | 137 |
| <b>Figure 41</b> -ADAM10 colocalise avec Tspan5 et Tspan14 dans le compartiment intracellulaire mais pas avec Tspan15.....   | 138 |
| <b>Figure 42</b> -L'expression de Tspan15 dans les cellules U2OSN1 diminue l'activation ligand dépendante de la voie Notch.....  | 139 |
| <b>Figure 43</b> -La déplétion de Tspan15 dans les cellules U2OSN1 augmente l'activation ligand dépendante de la voie Notch.....   | 140 |
| <b>Figure 44</b> -L'expression de Tspan15 dans les cellules U2OSN1 inhibe la voie de signalisation Notch à une étape pré- $\gamma$ -sécrétase.....   | 141 |
| <b>Figure 45</b> -L'environnement membranaire de la protéase ADAM10 est différent selon l'expression de Tspan5 ou Tspan15.....   | 144 |
| <b>Figure 46</b> -L'expression de Tspan5 et Tspan15 modifie le comportement dynamique d'ADAM10 à la membrane.....  | 146 |
| <b>Figure 47</b> -Comparaison des protéines immunoprécipitées par l'anticorps anti-CD9 versus celles immunoprécipitées dans les cellules CD9-GFP en utilisant des billes GFP-TRAP®.....                        | 148 |
| <b>Figure 48</b> -Immunoprécipitation avec le système GFP-TRAP® et purification des protéines partenaires.....   | 148 |
| <b>Figure 49</b> -Répartition des protéines membranaires associées à CD9, Tspan5 ou Tspan15, en fonction de leurs niveaux de co-immunoprécipitation avec Tspan5 ou Tspan15.....                                | 148 |
| <b>Figure 50</b> -Analyse par western-blot des protéines co-immunoprécipitées avec les tétraspanines CD9-GFP, Tspan5-GFP et Tspan15-GFP.....   | 152 |
| <b>Figure 51</b> -Les protéines partenaires associées à Tspan15 ne sont pas associées directement avec ADAM10.....   | 155 |
| <b>Figure 52</b> -Tspan15 est capable d'inhiber en partie l'interaction d'ADAM10 avec les constituants protéiques « classiques » présents dans le « tetraspanins web » au niveau de la membrane plasmique..... | 155 |
| <b>Figure 53</b> -Les tétraspanines Tspan5 et Tspan15 régulent différemment la distribution membranaire d'ADAM10.....  | 157 |
| <b>Figure 54</b> - Le marquage périphérique d'ADAM10 observé en présence de Tspan5 est renforcé par incubation à 37°C avec l'anticorps anti-ADAM10.....  | 158 |
| <b>Figure 55</b> -Analyse de la localisation de différents partenaires des tétraspanines dans les cellules U2OSN1 selon l'expression de Tspan5 ou Tspan15.....   | 160 |
| <b>Figure 56</b> -Représentation schématique des deux TspanC8, Tspan5 et Tspan15 et des deux protéines chimères dont les grands domaines extracellulaires de Tspan5 et Tspan15 ont été échangés.....           | 161 |
| <b>Figure 57</b> -Analyse de la localisation du mutant Tspan5 <sup>PLM</sup> et de la chimère Tspan15LEL5 à la membrane plasmique des cellules U2OSN1.....   | 162 |
| <b>Figure 58</b> -La palmitoylation et le grand domaine extracellulaire ne modifient pas la distribution à la périphérie membranaire d'ADAM10 ni de CD9.....   | 163 |
| <b>Figure 59</b> -L'association directe des tétraspanines avec ADAM10 est indépendante du grand domaine extracellulaire et de la palmitoylation.....   | 164 |
| <b>Figure 60</b> -La palmitoylation influence la capacité de solubilisation en Brij98.....   | 165 |
| <b>Figure 61</b> -Le mutant Tspan5 <sup>PLM</sup> n'est pas un inhibiteur de la voie de signalisation Notch.....   | 166 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 62</b> -Alignement de la séquence de hCD151 et des TspanC8 chez <i>H. sapiens</i> , <i>D. melanogaster</i> et <i>C.elegans</i> ..... | 175 |
|--|-----|

## INDEX DES TABLEAUX

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau 1</b> - Nomenclature de la famille des tétraspanines (d'après HGNC).....  | 38  |
| <b>Tableau 2</b> - Associations tétraspanines-protéine partenaire potentielles ou établies.....  | 46  |
| <b>Tableau 3</b> - Protéines interagissant avec les tétraspanines sans candidat pour la tétraspanine partenaire.....   | 47  |
| <b>Tableau 4</b> - Résumé des principaux défauts observés dans les souris KO pour les tétraspanines.....   | 53  |
| <b>Tableau 5</b> - Acides aminés présents dans la cavité catalytique responsable du clivage S2.....  | 67  |
| <b>Tableau 6</b> - Différents substrats de la métalloprotéase ADAM10.....  | 75  |
| <b>Tableau 7</b> - L'expression et la fonction d'ADAM10 ont été décrites dans plusieurs processus pathologiques et physiologiques.....                                   | 78  |
| <b>Tableau 8</b> - Pathologies humaines dues à des mutations des récepteurs NOTCH ou de leurs ligands.....   | 89  |
| <b>Tableau 9</b> - Gènes NOTCH impliqués dans les pathologies humaines acquises.....   | 89  |
| <b>Tableau 10</b> - Répertoires des protéines partenaires co-immunoprécipitées avec CD9, Tspan5 et Tspan15 ont été identifiées par spectrométrie de masse.....           | 150 |
| <b>Tableau 11</b> - Analyse par spectrométrie de masse du repertoire de protéines co-immunoprécipitées avec ADAM10 en fonction de l'expression de Tspan5 et Tspan15..... | 154 |

# INTRODUCTION



Mon travail de thèse s'est effectué dans l'Unité Mixte de Recherche 1004 INSERM/UPS– Réponses cellulaires au microenvironnement et cancer dirigée par le Dr. Eric Rubinstein. La thématique du laboratoire est de comprendre les mécanismes de la compartimentation membranaire et la régulation croisée au cours de la progression tumorale.

Mes travaux sont basés sur la compréhension des mécanismes d'action de protéines transmembranaires, les tétraspanines à huit cystéines. De leurs rôles potentiels dans la compartimentation membranaire de la métalloprotéase ADAM10 menant à la régulation de nombreuses voies de signalisation notamment la voie Notch.

Les informations nécessaires à la compréhension de l'implication des tétraspanines dans la régulation de la transduction du signal seront apportées dans une introduction bibliographique qui sera organisée comme suit :

- La membrane plasmique et son implication dans la compartimentation membranaire,
- les tétraspanines, leurs associations à des protéines partenaires et leurs rôles dans de nombreux processus biologiques,
- les métalloprotéases ADAMs et plus particulièrement la protéase ADAM10 responsable de la modulation de nombreuses voies de signalisations cellulaires,
- la voie de signalisation Notch et son rôle fondamental dans les mécanismes cellulaires.

L'introduction bibliographique sera suivie des hypothèses de travail, des méthodologies expérimentales utilisées, puis des résultats expérimentaux que nous avons obtenus ainsi que les conclusions de ce travail.



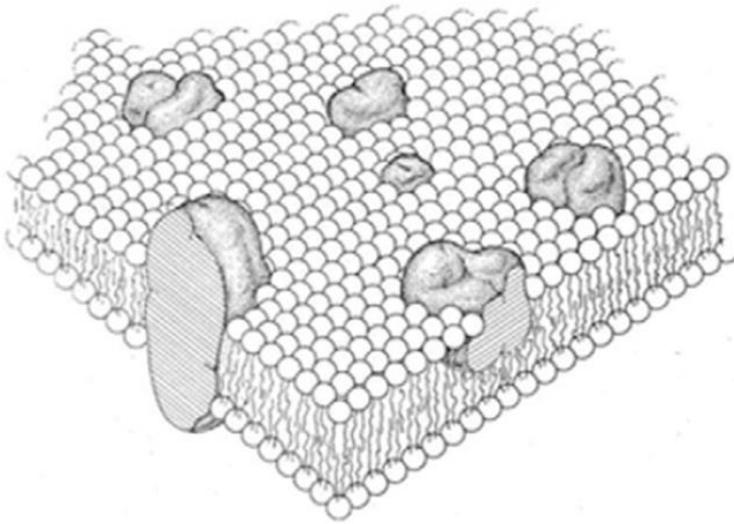
# La membrane plasmique et la compartimentation membranaire

---

L'organisation des cellules eucaryotes est déterminée en grande partie par leurs membranes biologiques. La membrane plasmique est une fine barrière essentielle qui entoure le cytoplasme d'une cellule séparant ainsi les milieux extracellulaires et intracellulaires. Elle est constituée d'une double couche lipidique dans lesquelles s'insèrent de manière asymétrique et hétérogène des protéines. Dans l'environnement immédiat de la membrane d'autres constituants sont susceptibles d'interagir avec les protéines mais également les lipides : du côté intracellulaire, le cytosquelette sous-membranaire est un réseau de filaments d'actine ponctuellement ancré à la membrane. Du côté extra-cellulaire, le glycocalix est formé par des chaînes saccharidiques ramifiées greffées sur des molécules membranaires. La membrane plasmique possède une organisation moléculaire dynamique ce qui lui permet d'ordonner et de compartimenter ses fonctions surtout au niveau de la transduction des signaux. Elle intervient également dans les échanges avec le milieu extérieur, l'adhérence, la mobilité cellulaire,...

## **1- Le modèle membranaire : la « mosaïque fluide »**

Dans les années 1970, Singer et Nicolson, élaborent le modèle de la « mosaïque fluide » qui suggère que la membrane plasmique est composée d'une bicouche lipidique fluide hébergeant différentes protéines membranaires diffusant librement (Singer et Nicolson, 1972). Dans ce modèle, les lipides et les protéines sont distribués plus ou moins aléatoirement. La bicouche de lipides est constituée en grande partie de phospholipides qui sont dans un état liquide à la température physiologique et constituent donc une matrice de base très fluide. Ainsi les bicouches lipidiques agissent en tant que solvant pour les protéines membranaires, de façon similaire à une solution visqueuse, dans laquelle ces protéines possèdent un certain degré de mobilité latérale qui permet leur libre diffusion dans la bicouche lipidique et leur distribution le long de la surface membranaire dans un arrangement aléatoire (« aperiodique »), (Singer et Nicolson, 1972). L'absence de liaisons covalentes entre l'ensemble des constituants membranaires, rend leurs interactions faibles et la membrane peut être considérée comme un fluide bidimensionnel, formant une structure très dynamique, (figure 1)



**Figure 1:** *Modèle de la mosaïque fluide de la structure membranaire selon Singer–Nicolson (1972).*

Ce modèle de la mosaïque fluide reste le modèle de référence, bien qu'il ait subi quelques «améliorations». En effet, l'hypothèse selon laquelle les molécules s'ordonnent aléatoirement dans la membrane a été rapidement remise en question. De nombreux travaux montrent que la membrane serait composée d'un certain nombre de domaines lipidiques ayant des compositions et des organisations différentes, en mouvement les uns par rapport aux autres (Kato *et al.*, 2009 ; Simons et Sampaio, 2011). Ainsi la plupart des protéines membranaires ne diffuseraient pas aussi librement que le suppose le modèle de Singer et Nicolson et pourraient être localisées dans des environnements différents. De telles différences d'organisation sont supposées provenir de conformations moléculaires différentes et de la spécificité de certaines interactions moléculaires. Ces observations ont donné lieu à l'émergence de plusieurs modèles d'organisation dynamique des membranes, proposant différentes origines au confinement. Ces phénomènes impliqueraient particulièrement le cytosquelette pour son éventuel rôle dans le confinement des protéines, ou sur les hétérogénéités de composition moléculaire dans la membrane, donnant lieu au modèle des radeaux lipidiques (Simons et Sampaio, 2011).

## **2- L'organisation de la membrane plasmique**

### **2.1- Les lipides membranaires**

Les lipides sont les composants majoritaires de la membrane plasmique et de l'ensemble des membranes biologiques. Pour chaque membrane d'organites, la proportion des différents types de lipides est variable, ce qui leur confère des propriétés fonctionnelles spécifiques. Les lipides membranaires sont caractérisés par leur caractère amphiphile.

Ils possèdent une tête polaire, qui présente un caractère hydrophile, reliée à des chaînes aliphatiques hydrophobes (Bagatolli *et al.*, 2010 ; Mouritsen, 2011). Chaque espèce lipidique est répartie sur les deux feuillets et participe à l'asymétrie lipidique si importante pour la physiologie cellulaire.

Les lipides de la membrane cellulaire dans les cellules animales se composent principalement de glycérophospholipides (les GPLs), de sphingolipides (SL) et de cholestérol (Bagatolli *et al.*, 2010 ; Mouritsen, 2011). Les lipides amphipathiques tels que les GPLs et SL sont les principaux lipides structuraux qui forment la matrice de base, de toutes les membranes cellulaires chez les eucaryotes. Cela est dû à leurs propriétés d'agrégation, c'est à dire, la tendance de leurs parties hydrophobes de s'associer ensemble et d'exclure les molécules d'eau et de la tendance de leurs parties hydrophiles d'interagir avec les environnements aqueux extra- et intra-cellulaires. Parmi les GPLs, la phosphatidylcholine (PC), représente généralement plus de 50% des phospholipides de la membrane cellulaire, et est le principal lipide formant la bicouche lipidique. Les SLs sont des composants mineurs des membranes cellulaires. Les complexes glycosphingolipides (GSLs), incluant des gangliosides (GSLs contenant de l'acide sialique), ne sont pas des lipides formant des bicouches; en solution aqueuse, ils ont tendance à former des agrégats micellaires en raison de la grande taille de leurs groupes de tête polaires. Cependant, les GSL peuvent être insérés dans la bicouche lipidique par leur partie céramide (hydrophobe). Bien que les SLs soient des composants mineurs des membranes cellulaires, leur concentration locale peut être élevée. Ils sont associés au feuillet externe de la membrane plasmique et sont particulièrement abondants dans certaines cellules et tissus tels que la gaine de myéline et les neurones (Shevchenko et Simons, 2010 ; Klose *et al.*, 2013).

Les lipides dans la bicouche diffusent, ils se déplacent continuellement de façon latérale et rotationnelle (rotation et courbure des chaînes acides gras), et dans des conditions particulières, de façon transversale (ils bougent d'un feuillet à l'autre de la membrane par un mouvement de « flip-flop »). Il y a peu d'échanges de lipides d'un feuillet à l'autre de la membrane, ce qui permet l'obtention de distributions asymétriques des différents lipides et confère ainsi des fonctions discriminatives aux feuillets membranaires selon qu'ils sont orientés vers l'extérieur ou vers le cytosol (Simons *et al.*, 2011).

La fluidité membranaire intervient dans différentes fonctions cellulaires : absorption, sécrétion, protection, adhérence, communication, interaction avec la matrice, etc. Différents facteurs peuvent influencer les propriétés membranaires, des facteurs externes comme la température (une augmentation de la température entraîne la fluidification de la membrane), et

aussi des facteurs internes (Klose *et al.*, 2013). En effet, le degré de saturation des chaînes acyl, mais aussi leur longueur et leur hydroxylation influencent les propriétés de la bicouche. La fluidité est favorisée par les lipides avec des acides gras courts et insaturés. Les doubles liaisons introduisent des courbures qui diminuent la densité des chaînes acyles. Les phospholipides saturés s'apparient typiquement avec un acide gras insaturé (Holthuis et Menon, 2014).

L'épaisseur est favorisée par la longueur des chaînes acyles et la présence de stérols qui étirent ces chaînes ainsi les acides gras longs et le cholestérol entraînent des membranes plus épaisses. Le cholestérol renforce la solidité et la rigidité membranaire et représente jusqu'à 50% des lipides totaux de la membrane (Roduit *et al.*, 2008).

La charge de surface est déterminée par les propriétés chimiques des groupements des têtes lipidiques, par exemple la présence de lipides anioniques comme la phosphatidylsérine et les phosphoinositides.

La courbure de la membrane est déterminée par la forme des lipides. La forme des lipides est déterminée par le rapport de la taille de la tête polaire et de la surface couverte par les chaînes hydrocarbonnées. Les lipides dont la surface de la tête est plus petite que celle de la chaîne acyle (en créant une forme de cône) induisent une courbure négative, les lipides avec une surface de la tête égale à la surface des chaînes (création d'une forme de cylindre), sont neutres. Les lipides avec une tête beaucoup plus grande par rapport à la surface de la chaîne acyle (en créant une forme de cône inversé) induisent une courbure positive (Holthuis et Menon, 2014).

## **2.2- Les protéines membranaires**

De nombreuses protéines sont insérées dans les bicouches membranaires. Elles y jouent un rôle physiologique majeur, et sont responsables pour l'essentiel des activités caractéristiques des membranes : transport, reconnaissance, communication, adhérence. Les protéines sont associées à la membrane de différentes manières. Les protéines peuvent être soit intégrées à la membrane (intrinsèques ou trans-membranaires) ou encore accolées à la membrane (extrinsèques ou périphériques) par des interactions électrostatiques ou des ancrages (lipidiques et glyco-lipidiques) et se déplacent constamment dans la membrane (Nicolson, 2014). Selon le modèle de la « mosaïque fluide », ces protéines membranaires diffusent librement dans une bicouche lipidique fluide sauf si elles sont compartimentées par des interactions protéine-protéine (Singer et Nicolson, 1972).

Les protéines membranaires intégrales ont leur importance dans la structure de base de la membrane cellulaire, certaines semblent traverser la membrane sous forme de tonneau en

feuillet- $\beta$  (Krogh *et al.*, 2001). Les protéines membranaires périphériques ont également un rôle important, mais pas nécessairement dans le maintien de la structure. Elles semblent être plus importantes pour les activités enzymatiques, comme sites de fixation des protéines, de protéines échafaudages, d'attachement ou des structures pour le support membranaire, comme composants de maintien de courbure membranaire et de points de fixation pour les enzymes solubles et les molécules de signalisation. La plupart des protéines extrinsèques sont associées à un segment hydrophobe permettant leur insertion dans la partie transmembranaire des bicouches. Il s'agit le plus souvent d'associations covalentes avec un acide gras. Selon la nature de la chaîne lipidique, on parle de myristoylation, d'isoprénnylation, de palmitoylation, et de glypiation (Staubach et Hanisch, 2011 ; Zhang *et al.*, 2010 ; Pike, 2009).

- *La N-myristoylation* : modification qui ajoute un acide myristique (acide gras saturé en C14, (activé sous forme de myristoyl-CoA) sur une glycine en position N-terminale par une liaison amide. Il s'agit d'un processus co-translationnel.

- *L'isoprénnylation* : ajoute un lipide isoprénoïde, farnesyl (C15) ou géranylgeranyl (C20), via une liaison thioether (C-S-C), sur une cystéine en position C-terminale ou proche de cette extrémité. La protéine est ensuite clivée juste après la cystéine modifiée et un groupement méthyl y est ajouté en position C-terminale. Il s'agit d'un processus co-translationnel.

- *La palmitoylation* : dans la grande majorité des cas, un acide palmitique (acide gras saturé en C16) est ajouté sur 1 à 4 cystéine(s) juxtamembranaire(s) d'une protéine membranaire, via une liaison thioester (R-C(=O)-S-R'), (la sérine et la thréonine peuvent aussi, mais plus rarement, être palmitoylées). Il s'agit d'un phénomène post-translationnel.

A l'inverse de la prénylation et de la myristoylation, la palmitoylation est en général réversible du fait de la nature chimique de la liaison thioester établie entre l'acide gras et l'acide aminé. Les protéines myristoylées, palmitoylées ou isoprénylées sont toujours en contact avec le milieu intracellulaire. La palmitoylation augmente l'hydrophobicité de la protéine et donc son aptitude à s'associer aux membranes. Les liaisons à la membrane par myristoylation ou palmitoylation sont réversibles. Dès lors, elles sont souvent impliquées dans des processus de signalisation cellulaire. Dans l'isoprénnylation, la protéine est attachée par une cystéine terminale qui est carboxyméthylée. Ceci confère aux protéines un caractère hydrophobique plus marqué que la myristoylation ou la palmitoylation. Les protéines formeront donc des complexes membranaires plus stables.

- La *glypiation* est la modification qui ajoute un groupement glycosyl-phosphatidylinositol (glycosylphosphatidyl-éthanolamine : GPI ou ancre GPI) sur un acide aminé en position C-terminale des protéines fixées à la membrane du réticulum endoplasmique. Avant glypiation, la protéine est fixée à la membrane via une partie hydrophobe. Cette partie est hydrolysée. Après glypiation, la protéine reste fixée ou ancrée à la membrane via une partie du GPI qui a remplacé la partie hydrophobe. Du fait qu'elles contiennent des phospholipides, les structures des ancres GPI confèrent une grande mobilité aux protéines membranaires ainsi ancrées. Les protéines à ancres GPI sont par contre localisées du côté extérieur ; elles vont donc jouer un rôle dans différents phénomènes de signalisation avec des éléments du milieu extérieur mais aussi lors de l'adhérence et dans la reconnaissance cellulaire (Caudron et Barral, 2009 ; Nicolson, 2014).

### **2.3- Les interactions lipide-lipide et lipide-protéine à la membrane plasmique**

L'existence de zones de différentes phases dans les bicouches lipidiques affecte également l'organisation latérale des protéines membranaires. Une phase est définie comme étant une région de l'espace tout au long de laquelle toutes les propriétés physiques d'un matériau sont uniformes. "Phase" est synonyme de "état de la matière". Par exemple l'eau peut exister dans les états solides, liquides ou sous forme de vapeur. Les phases sont des concepts thermodynamiques, c'est à dire des entités imaginaires à laquelle des objets réels ressemblent plus ou moins. La condition d'uniformité incluse dans la définition doit être comprise de façon macroscopique, au moins à l'échelle du micromètre, dans le contexte des lipides membranaires (Goñi, 2014). Des travaux utilisant les membranes artificielles suggèrent que les protéines comprenant une ou plusieurs chaînes aliphatiques saturées présentent une plus forte tendance à se séparer en phases lipidiques ordonnées (bicouches lipidiques composée de cholestérol). C'est notamment le cas pour les protéines à ancres-GPI, (Brown *et al.*, 1992; Schroeder *et al.*, 1994) et d'autres protéines acylés tels que les kinases Src (Shenoy-Scaria *et al.*, 1994).

Cependant, les membranes cellulaires sont saturées de protéines membranaires qui pourraient organiser spécifiquement la distribution des lipides (Lingwood et Simons, 2010 ; Hunte et Richers, 2008). Les lipides qui sont le mieux adaptés pour correspondre à la longueur des domaines transmembranaires ont une probabilité accrue d'être proche de l'interface de protéines-lipides. Un nombre croissant de protéines présenteraient des capacités spécifiques de liaison et/ou d'interaction avec les lipides, avec de possibles implications structurales et régulatrices. Plusieurs protéines interagissent avec le cholestérol par une liaison directe,

comme la cavéoline et les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques étant d'excellents exemples (Murata *et al.*, 1995 ; Hanson *et al.*, 2008). Bien que le nombre d'interactions protéines-lipides référencé augmente régulièrement, les mécanismes structurels sous-jacents précis de la régulation des protéines et des liaisons spécifiques dans les membranes restent indéterminés (Shevchenko et Simons, 2010).

## **2.4- Les interactions des protéines membranaires avec le cytosquelette**

De nombreux procédés fondamentaux (tels que la division cellulaire et la migration cellulaire), dépendent des changements de forme de la cellule. Ces changements de forme reposent sur la communication entre deux acteurs majeurs: le cytosquelette et la membrane cellulaire. De nombreuses études dans des cellules eucaryotes ont montré que des modifications de la forme de la cellule dépendent fortement des interactions entre le cytosquelette d'actine et la membrane cellulaire, souvent à l'aide de protéines motrices. Les filaments d'actine (et spectrine) sont liés à la surface de la membrane cellulaire interne et constituent le squelette de la membrane (Morone *et al.*, 2006). Cette organisation pourrait influencer la diffusion des lipides et des protéines dans la membrane (Sheetz *et al.*, 1980 ; Kusumi et Suzuki, 2005 ; Kusumi *et al.*, 2005 ; Saxton, 1989 ; Lenne *et al.*, 2006). Le maillage de l'actine pourrait empêcher la séparation de phase à l'échelle micrométrique, comme indiqué par des données expérimentales (Baumgart *et al.*, 2007 ; Heinemann *et al.*, 2013) et des données théoriques (Ehrig *et al.*, 2011).

Des études récentes sur les filaments d'actine, en interaction avec les bicouches ont dévoilé que la contribution du cytosquelette d'actine est complémentaire, mais non dominante et que le contenu de la membrane peut jouer un rôle majeur (Carvalho *et al.*, 2013 ; Vogel *et al.*, 2013). Il existe deux types d'assemblage des filaments d'actine :

- *Les fibres de stress* (les câbles de tension), sont des faisceaux parallèles serrés : orientés avec la même polarité, les filaments sont espacés régulièrement grâce à une liaison avec la fimbrine. Ces fibres traversent la cellule et la rigidifient.

- *Les réseaux d'actine sous-corticale, ou cytocortex*, animent la membrane plasmique. Ces réseaux forment des mailles : les filaments sont organisés en un arrangement lâche, avec beaucoup d'interconnexions orthogonales formées par la filamine. Au niveau du cytocortex, les filaments d'actine peuvent en outre former des protrusions en longs faisceaux, soit perpendiculaires à la membrane, les filopodes, soit en feuilletts membranaires, les lamelles. Ces deux formes d'organisation sont dynamiques et leur activité est contrôlée non seulement par la concentration en calcium, mais aussi par un grand nombre de protéines régulatrices.

Les filaments d'actine s'accumulent sous agrégés aux composants de la membrane plasmique. Des études suggèrent que l'agrégation des molécules de la membrane favorise la séparation de phase et la polymérisation de l'actine. La topographie de la membrane joue un rôle important dans la diffusion (Adler *et al.*, 2010) et est susceptible d'être altérée par des drogues modifiant la dynamique de l'actine. En revanche la façon dont la topographie de la membrane est liée à la signalisation cellulaire pourrait aider à expliquer certains résultats récents sur le comportement des molécules membranaires (Eggeling *et al.*, 2009 ; Goswami *et al.*, 2008).

Les mécanismes sous-jacents sont loin d'être compris et il est très souvent difficile de déterminer, à partir des approches *in vivo* comme les manipulations génétiques et biochimiques, la prépondérance de l'actine ou la myosine et ne sont souvent pas possible (Rivas *et al.*, 2014). Cependant, ce qui a changé par rapport aux propositions antérieures sur les éléments du cytosquelette associés aux membranes cellulaires et leur influence sur la structure et la dynamique de la membrane est que ces systèmes complexes sont soigneusement disséqués et leurs multiples composants sont identifiés. Par exemple, certains composants interagissant avec la membrane, comme les septines, les GTPases, et d'autres composants, sont impliqués dans la cytocinèse et peuvent former des faisceaux d'ordre supérieur, des filaments et des structures cycliques qui se lient à des filaments d'actine et aux microtubules (Hagiwara *et al.*, 2011 ; Mostowy et Cossart, 2012). Ces structures forment probablement des échafaudages à la surface interne de la membrane cellulaire qui interagissent avec des éléments du cytosquelette.

## **2.5- La dynamique moléculaire des membranes lipidiques : les membranes artificielles**

L'état physique des lipides dans les bicouches change de façon très importante selon leur état physicochimique et les conditions physiques extérieures. Des changements correspondant à des transitions de phase peuvent avoir lieu. La transition de phase correspond à un changement dans l'organisation (la forme et la surface) et la mobilité des chaînes d'acides gras à l'intérieur de la bicouche (Bagatolli *et al.*, 2010 ; Contreras *et al.*, 2011).

Quelques années après le concept de « la mosaïque fluide », des études concernant les effets thermiques sur le comportement des lipides membranaires ont suggérés que le comportement des lipides, dans les différentes phases, est responsable de l'organisation latérale dans les membranes biologiques. Ces observations suggèrent que les propriétés d'agrégation des lipides membranaires constituent une des forces motrices principales menant à la création de la distribution latérale et de niveaux d'organisation dans la membrane (Wunderlich *et al.*, 1978).

La plupart des informations concernant la séparation de phase des lipides a été obtenue à partir d'études des systèmes membranaires artificiels notamment à l'aide des diagrammes de phase (Goñi *et al.*, 2008). Cependant, de tels systèmes sont amenés à l'équilibre par des conditions expérimentales spécifiques utilisées pour l'extraction par des détergents. La séparation des phases en raison de la solubilité limitée des lipides dans des mélanges lipidiques a été observée dans tous les modèles membranaires qui reproduisent les autres propriétés de base des membranes cellulaires (Linder *et al.*, 2010 ; Elson *et al.*, 2010). Toutefois, un certain nombre d'autres phases se sont avérées présenter un intérêt physiologique.

On distingue généralement les phases suivantes : la phase ordonnée (ou phase gel), la phase désordonnée (ou phase fluide ou cristal liquide), la phase liquide-ordonnée (Bagatolli *et al.*, 2010 ; Contreras *et al.*, 2011).

- *La phase gel* : la bicouche se présente comme un gel compact (phase gel ou  $L\beta$ ) avec des chaînes d'acide gras, régulièrement ordonnées, et proches les unes des autres. Dans cet état les chaînes hydrocarbonées affichent une configuration anti (en position tout-trans) les chaînes sont alors parallèles entre elles et sont allongées au maximum, donnant naissance à un réseau de lipides extrêmement compact. Par conséquent, la diffusion latérale des lipides est fortement réduite ( $CD \sim 10^{-11} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). La surface occupée par un lipide est minimale et l'épaisseur de la bicouche est maximale.

- *La phase fluide* : la mobilité des chaînes des acides gras est intermédiaire. Dans cet état plus fluide, appelé phase liquide ou état de cristal liquide ( $L\alpha$ ) ou Liquide désordonné ( $Ld$ ), les liaisons C-C des chaînes lipidiques adoptent de préférence la configuration gauche donnant lieu à des chaînes de lipides beaucoup moins allongées. En conséquence, la diffusion latérale ( $CD \sim 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) et la diffusion rotationnelle des lipides sont favorisées dans ces bicouches lipidiques fluides. La surface occupée par un lipide s'en trouve accrue et l'épaisseur de la bicouche est réduite de 10 à 15%. Dans les conditions physiologiques la membrane plasmique existe généralement sous cette forme.

- *La phase liquide ordonnée* : en présence de cholestérol, des bicouches lipidiques peuvent adopter une phase supplémentaire lamellaire, appelée phase liquide-ordonnée ( $Lo$ ), qui partage les caractéristiques des phases de gel et de fluide. L'incorporation du cholestérol dans une phase lamellaire ordonnée solide perturbe le réseau latéral et réduit en conséquence l'organisation des chaînes lipidiques. A l'inverse, dans une phase lamellaire liquide-désordonnée, la portion hydrophobe rigide du cholestérol est intercalée entre les chaînes lipidiques et favorise une conformation des chaînes en trans. En conséquence, la phase

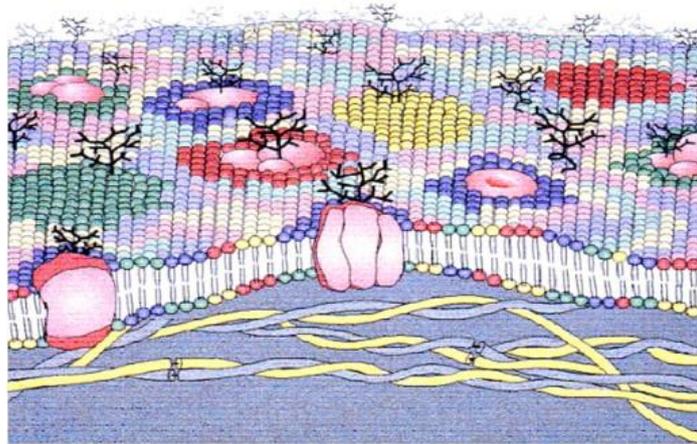
liquide-ordonnée affiche une diffusion des lipides latérale et rotationnelle qui sont proches de ceux de la phase liquide-désordonnée mais un ordre de conformation similaire à celle de la phase ordonnée (Eeman *et al.*, 2009).

L'idée que l'existence de plusieurs phases dans l'environnement lipidique des membranes entraîne une "organisation des composants lipidiques membranaires dans les domaines " a été clairement établis. En revanche l'utilisation des modèles de membranes artificielles est insuffisante pour approfondir un phénomène qui est basé sur le maintien des propriétés collectives et pour éclaircir le concept de compartimentation (Mouritsen, 2011). Ces dernières années, l'augmentation des techniques de microscopie à super-résolution, tels que le NSOM, le STED et la localisation microscopique, se sont avérées être capables de cartographier les molécules à la surface cellulaire à l'échelle nanométrique (Toomre et Bewersdorf 2010 ; Lidke et Lidke, 2012).

### **3- Représentation actuelle de la membrane plasmique**

Le modèle de « la mosaïque fluide » proposé par Singer et Nicholson il y a 40 ans a permis à une meilleure compréhension de la façon dont les constituants moléculaires peuvent être disposés dans la membrane cellulaire, considérée comme un fluide équilibré bidimensionnel. Fondamentalement, le modèle de « la mosaïque fluide » suggère que la membrane de la cellule à plusieurs composants dans une phase homogène et mixte. Depuis, de nombreuses études ont été réalisées sur l'architecture de la membrane plasmique et ont fourni une vision de l'organisation de la surface cellulaire plus complexe (figure 2), (Edidin, 2003; Simons et Vaz, 2004). La membrane semble être répartie en domaines spécifiques avec des compositions définies de protéines et de lipides selon des échelles spatiales et temporelles. Par exemple, la cellule construit des régions différenciées de sa membrane à des fins fonctionnelles spécifiques, par exemple, les adhésions focales (Patla *et al.*, 2010), les synapses immunologiques des lymphocytes-T (Grakoui *et al.*, 1999 ; Springer et Dustin, 2012), l'endocytose (Slepnev et Camilli, 2000 ; Howes *et al.*, 2010), et de nombreuses autres structures fonctionnelles telles que les cils et les microvillosités (Kusumi *et al.*, 2012a ; Kusumi *et al.*, 2012b ; Rao et Mayor, 2014).

**Figure 2 :** Représentation actuelle du modèle de la mosaïque fluide. Les différents lipides sont indiqués dans des couleurs différentes formant des domaines spécialisés autour de protéines membranaires intégrales en plus d'être distribués à travers la membrane asymétrique, (D'après Escribá et al., 2008).



Grâce aux travaux réalisés ces dernières années, de nombreuses fonctions de la membrane plasmique ont été mise en évidence pour dépendre essentiellement de sa structure dynamique (Campelo *et al.*, 2010 ; Dustin et Depoil, 2011; Engelman, 2005 ; Groves et Kuriyan, 2010, Lingwood et Simons, 2010 ; Platta et Stenmark, 2011 ; Sens *et al.*, 2008). Des études récentes ont montré que la transduction du signal, la migration cellulaire et l'endocytose et l'exocytose des protéines et des lipides dépendent tous de la dynamique moléculaire et de leurs arrêts temporaires dans la structure à deux dimensions de la membrane plasmique (Grecco *et al.*, 2011 ; Harding et Hancock, 2008 ; Kholodenko *et al.*, 2010 ; Prior et Hancock, 2012 ; Sengupta *et al.*, 2011, Simons et Gerl 2010). La façon dont la membrane plasmique exerce sa fonction, est non seulement dépendante des molécules impliquées dans une fonction particulière, mais aussi la façon dont ces molécules se déplacent, entrent et sortent de ces microdomaines dynamiques et transitoires de la membrane plasmique.

#### **4- La diffusion latérale et les restrictions de mouvement dans la membrane plasmique : les domaines membranaires**

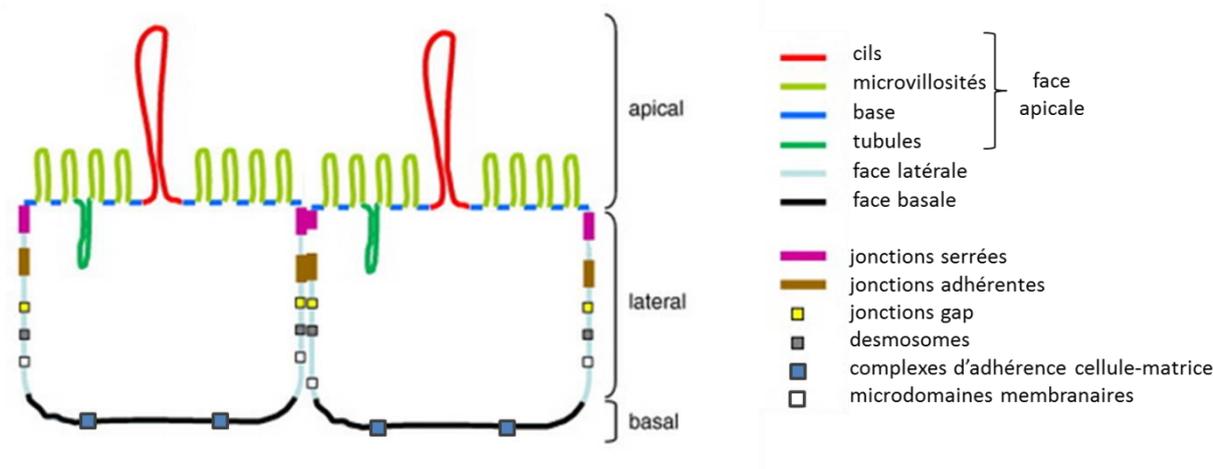
La propriété de fluidité des bicouches lipidiques permet une distribution latérale non homogène et rapide des lipides et des protéines nécessaires pour un mélange continu des composants de la membrane. Cela conduit à la création de « structures ordonnées qui diffèrent en composition lipidique et/ou protéique de la membrane environnante » ou « domaines membranaires » (Lindner et Naim, 2009). En 1972, le modèle de « la mosaïque fluide » décrit la membrane plasmique comme une matrice à deux dimensions (2D) de lipides assez simple dans un état fluide avec une mosaïque de protéines intégrées.

Le développement de la technique de suivi de particule unique, (Single Particle Tracking ou (SPT) ou Single Molecule Tracking (SMT)) permettant la détection et le suivi de molécules individuelles avec une résolution spatiale nanométrique, a permis de révéler une grande diversité des modes de diffusion non seulement entre molécules différentes, mais aussi au sein d'un échantillon de molécules identiques dans une même cellule (Kusumi *et al.*, 2014).

La capacité des cellules individuelles à différencier leur membrane plasmique pour former des domaines spécialisés avec des compositions lipidiques et protéiques distinctes est cruciale pour de nombreux processus biologiques cellulaires. Il s'agit notamment de l'adhérence cellulaire, la signalisation, la migration, la division cellulaire asymétrique et la détermination du destin cellulaire, le développement de réseaux de neurones, et le développement de l'épithélium fonctionnel et des barrières endothéliales (Nelson, 2003; Wodarz et Näthke, 2007). Des mécanismes distincts ont été impliqués pour contribuer à la différenciation de la membrane plasmique. Un certain nombre de travaux suggèrent que les interactions lipides-protéines et lipides-lipides dans la membrane plasmique contraignent le mouvement des protéines membranaires et facilitent leur localisation (Engelman *et al.*, 2005, Kusumi *et al.*, 2005 ; Kusumi et Suzuki, 2005). Ces mécanismes sont susceptibles d'agir ensemble et permettent aux cellules d'établir et de maintenir les domaines de la membrane plasmique rendu possible par l'existence d'interactions latérales qui stabilisent les différents domaines membranaires. Alors que la plupart des types cellulaires forme des domaines de surface cellulaire de façon transitoire, d'autres, comme les neurones polarisés (caractérisés par la présence de macrodomaines somato-dendritique, axonale et de membrane synaptique), (Arimura *et al.*, 2007), les oligodendrocytes (Maier *et al.*, 2008), les cellules polarisées épithéliales (Yeaman *et al.*, 1999) maintiennent une séparation des protéines et des lipides membranaires, de la membrane plasmique, plus stable. Les compositions lipidiques de ces domaines membranaires sont également différentes, démontrant que les cellules peuvent contrôler également la répartition.

Le phénomène de compartimentation membranaire est particulièrement bien illustré par les cellules épithéliales dans lesquelles on identifie un pôle apical, un pôle basal et des faces latérales (figure 3). Certaines protéines sont strictement localisées coté apical (les transporteurs de Na<sup>+</sup>/glucose), d'autres se trouvent coté latéral (les occludines des jonctions serrées) et d'autres enfin se trouvent au pôle basal (intégrines liant la lame basale). Au sein de ces domaines membranaires l'hétérogénéité latérale de la structure membranaire notamment le cloisonnement de protéines spécifiques s'effectue également à l'échelle sub-micrométrique

et nanométrique, et semble être un principal moyen pour compartimenter les différents processus cellulaires (Giepmans et Ijzendoorn, 2009).



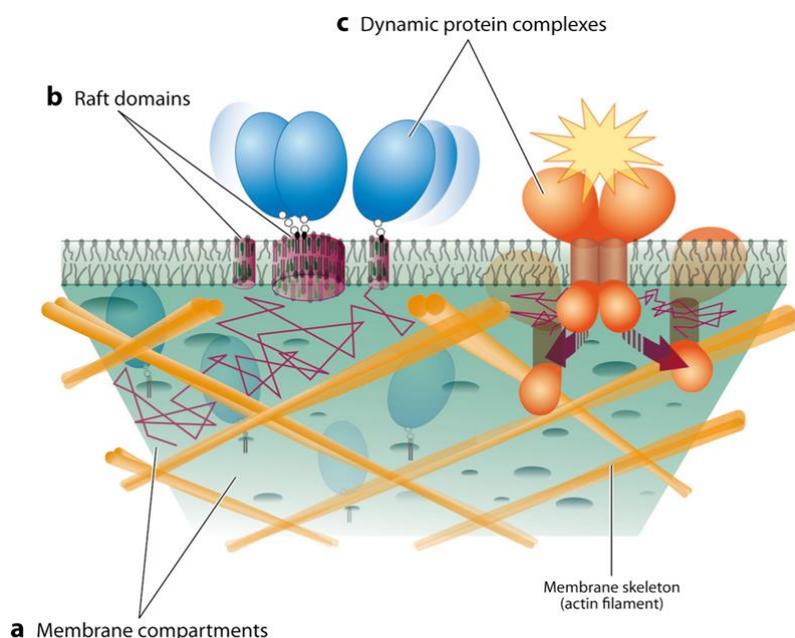
**Figure 3 :** Schéma représentant les jonctions cellulaires et les différents domaines de la membrane plasmique dans les cellules épithéliales.

La position des domaines des surfaces apicale et basale/latérale par rapport à l'autre n'est pas stricte. Dans la catégorie des microdomaines membranaires sont évoqués les radeaux lipidiques et les cavéoles, les puits recouverts de clathrine et les domaines à tétraspanines (D'après Giepmans et Ijzendoorn, 2009).

La récente accumulation rapide des connaissances sur la dynamique et la structure de la membrane plasmique a suscité d'importantes modifications du modèle de « la mosaïque fluide ». Les travaux de ces dernières années ont permis de fournir de nouveaux principes d'organisation fondamentale de cette structure qui est à la base de chaque mécanisme moléculaire. De nos jours, cette description de la membrane plasmique apparaît plus fine (Vereb *et al.*, 2003), elle est supposée inclure des nano-domaines lipidiques (rafts) (Simons et Gerl, 2010), des encombrements protéiques (Engelman, 2005), et des interactions de la membrane avec le cytosquelette (Sheetz *et al.*, 1980). Une conséquence possible de cette complexité, est la différence de diffusion : les coefficients de diffusion latérale dans les membranes cellulaires sont généralement de 5 à 50 fois réduits, par rapport à des coefficients de diffusion déterminés dans les membranes reconstituées (Kusumi *et al.*, 2005).

L'équipe de Kusumi (Kusumi *et al.*, 2011 ; Kusumi *et al.*, 2012a ; Kusumi *et al.*, 2012b ; Kusumi *et al.*, 2014) a suggéré une action coopérative de ces structures à trois niveaux hiérarchiques potentiellement établi sur une échelle de 2 à 300 nm : les domaines délimités par le cytosquelette d'actine (40-300 nm), (Edidin, 1992), les domaines lipidiques (rafts) (2-20 nm), et des complexes dynamiques de protéines (3-10 nm). Cette coopération serait essentielle pour la fonction de la membrane (figure 4).

Ce modèle n'inclut pas les domaines visibles en microscopie électronique tels les cavéoles et les vésicules recouvertes de clathrine, dont les structures et fonctions sont mieux comprises, et donc moins sujets à débat.



**Figure 4:** Représentation schématique de l'architecture éventuelle en trois-dimensions de la membrane plasmique.

a) des compartiments membranaires, générés par la séparation de la membrane par le squelette d'actine (barrière) et par des protéines transmembranaires (TM) ancrées à la membrane (piquets, non représentés sur cette figure).

b) les domaines lipidiques ou rafts sont enrichis en cholestérol, glycosphingolipides, et protéines à ancres-GPI avec des tailles limitées par les compartiments membranaires.

c) Les domaines protéiques complexes et dynamiques composés de dimères et d'oligomères de protéines transmembranaires, qui pourraient exister que de manière transitoire. D'après Kusumi et al., 2012)

## 5- Les microdomaines dans la membrane cellulaire

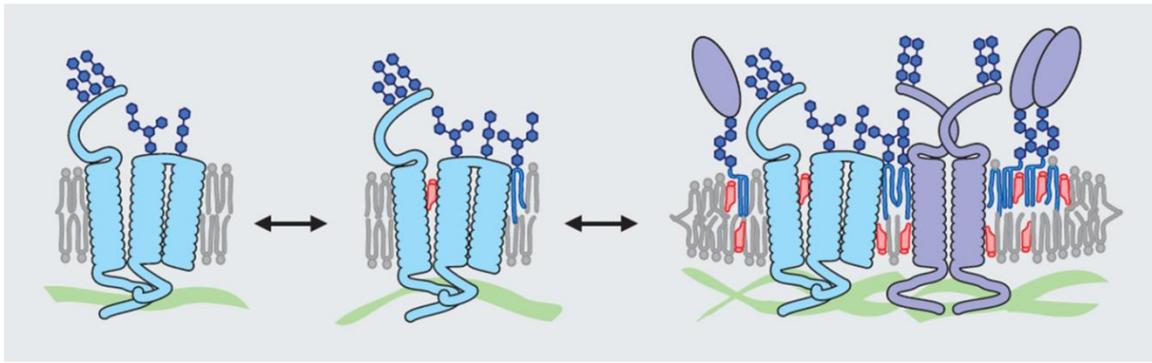
L'étude des domaines liquide-ordonnés dans des systèmes modèles permet de cerner leurs propriétés physico-chimiques. Toutefois, la pertinence de ces domaines comme modèle des domaines cellulaires est une question encore ouverte : si leur existence est pratiquement certaine, la composition, la taille et les origines ne sont pas parfaitement définies.

## 5.1- Les radeaux lipidiques ou « Rafts »

Les premières analyses de la composition des rafts ont été réalisées à la fin des années 80. Ce concept a été proposé en 1988 par deux biologistes, K. Simons et G. Van Meer, pour expliquer l'asymétrie du transport membranaire (Simons et van Meer, 1988).

Pour isoler les rafts, la membrane est partiellement solubilisée avec des détergents, tels que le Triton X-100. Il reste alors une fraction de la membrane qui est insoluble, les DRM pour Detergent Resistant Membrane. Les membranes ne seraient pas solubilisées à cause d'interactions internes et donc correspondraient à une phase liquide-ordonnée. Toutefois, l'utilisation de détergents différents donne des compositions différentes pour les DRM. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces résultats, soit les rafts n'ont pas une composition homogène, soit tous les rafts sont homogènes et identiques mais les différentes méthodes extraient spécifiquement certains lipides, soit il existe plusieurs types de rafts, homogènes mais de compositions différentes, tous n'étant pas extraits par les mêmes détergents. Il y aurait au moins deux types de domaines, les deux types principaux sont les radeaux lipidiques planaires riches en flotilline et les cavéoles (invaginations de la membrane) enrichies en cavéoline. Les protéines flotillines et cavéolines réguleraient la communication intercellulaire par la compartimentation et l'interaction avec des protéines de la transduction de signal au sein de leurs microdomaines lipidiques respectifs (Head et Insel, 2007 ; Diaz-Rohrer *et al.*, 2014a; Diaz-Rohrer *et al.*, 2014b).

Les radeaux lipidiques sont décrits comme étant riches en cholestérol, glycolipides, sphingolipides et en phospholipides présentant moins d'insaturations que celles des lipides dans la membrane environnante, ce qui permet un meilleur compactage des chaînes saturées de sphingolipides (figure 5). Dans cette description, la présence de cholestérol induirait une phase liquide ordonnée ayant une fluidité plus faible que le reste de la membrane. Ils sont également enrichis en protéines à ancrage-glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ces microdomaines de quelques dizaines de nanomètres généralement de l'échelle de 2 à 20 nm de diamètre, peuvent être aussi grand que la totalité de la membrane apicale des cellules épithéliales (Lingwood et Simons, 2010) et serviraient de plates-formes de tri et de signalisation, en recrutant des protéines ayant une grande affinité pour eux. Ces domaines sont importants pour la transduction du signal et le trafic moléculaire.



**Figure 5 :** Schéma représentant des radeaux lipidiques.

*Les protéines membranaires se lient à certains lipides par des spécificités physiques et chimiques. Dans ce schéma, une protéine transmembranaire (bleu clair) interagit spécifiquement avec des stéroïdes et avec des glycolipides, une interaction qui induit potentiellement son inclusion et son assemblage dans les radeaux (d'après Lingwood et Simons, 2010).*

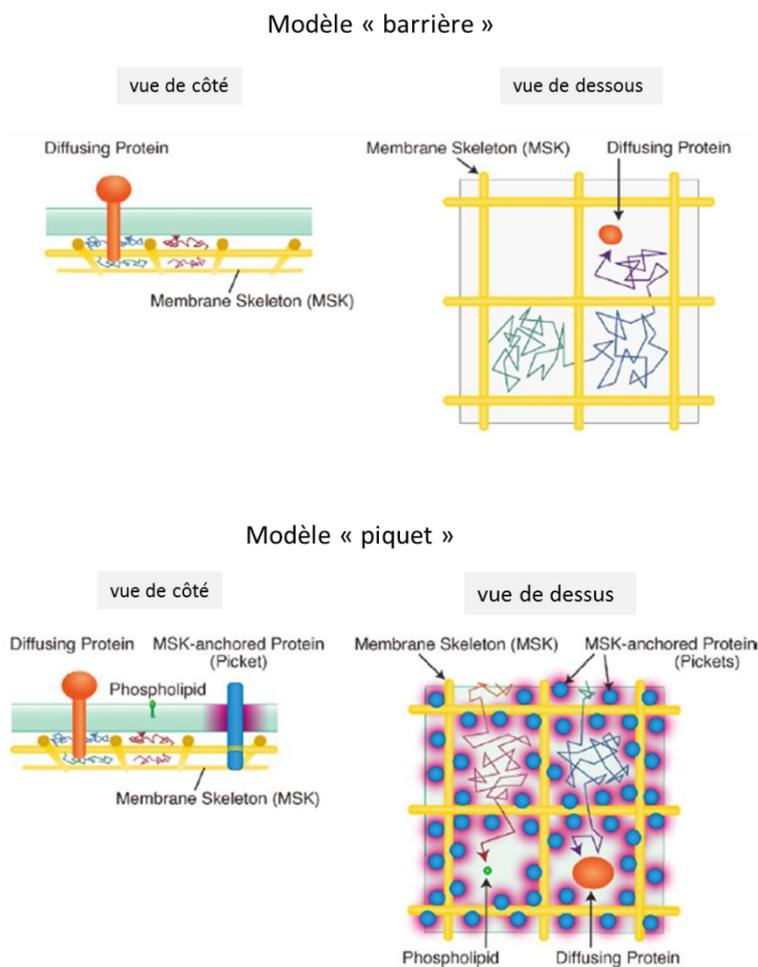
## 5.2- Les domaines délimités par le cytosquelette

Les compartiments membranaires délimités par le cytosquelette (diamètre de 40 à 300 nm) : inspiré du modèle établi pour expliquer les comportements diffusionnels à la surface des globules rouges. Ce modèle de « barrières et piquets » (Kusumi *et al.*, 2004, Kusumi *et al.*, 2005; Kusumi *et al.*, 2011 ; Kusumi *et al.*, 2012) propose que les protéines membranaires sont confinées par leur collision, soit avec les filaments d'actine du cytosquelette sous-membranaire « fence » (barrière), soit avec des protéines liées au cytosquelette ancrées à la membrane « pickets » (piquets). Dans le modèle de « piquets » la diffusion des molécules autour de protéines immobilisées (région rouge) est plus lente, en raison de l'effet de friction hydrodynamique, à la surface de la protéine immobilisée (Figure 6). Cet effet pourrait se propager sur des distances équivalentes à plusieurs diamètres de protéines.

La diffusion latérale de nombreux composants membranaires peut maintenant être directement reliée à ces compartiments de diffusion qui sont formés par des « barrières » créées par le cytosquelette sous-membranaires et des « piquets » correspondant à des protéines transmembranaires immobilisées par le cytosquelette (Kusumi *et al.*, 2011 ; Kusumi *et al.*, 2012)

Ce type de contrôle du cytosquelette peut être plus complexe qu'initialement envisagé, et il y a apparemment différents types de structures du cytosquelette associées aux membranes ce qui suppose que certaines des interactions membranaires, pourraient être moins sensibles aux drogues perturbatrices du cytosquelette. Ces contrôles pourraient être importants dans la régulation de la mobilité latérale dans les membranes cellulaires qui conduisent à la compartimentation des protéines membranaires à l'intérieur de domaines membranaires

(Nicolson, 2014). Ce modèle rend compte de la restriction de la diffusion observée pour les protéines ainsi que les lipides. Le concept de domaines délimités par le cytosquelette semble être le domaine le plus fondamental et essentiel car il se distingue du modèle de Singer-Nicolson, notamment des membranes des liposomes et d'autres membranes simples reconstituées artificiellement.



**Figure 6 :** Représentation schématique du modèle « barrières et piquets » de la membrane plasmique.

La colonne de gauche représente la vue de côté (en coupe longitudinale) de la membrane, la colonne de droite représente, en haut la vue de dessous (à partir du cytoplasme), et en bas la vue de dessus (à partir de l'extérieur de la cellule), d'après Kusumi *et al.*, 2012

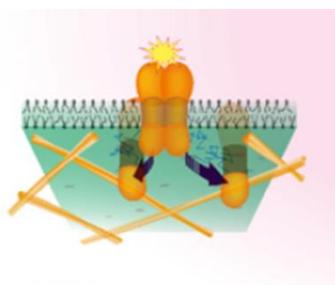
### 5.3- Les complexes de protéines ou « Agrégats dynamiques »

Ce modèle de « particules browniennes en interaction », proposé en 2003, fait appel à des interactions attractives entre protéines à suffisamment longue portée comme source de leur confinement sous forme d'assemblées dynamiques de quelques dizaines de protéines (pas nécessairement identiques), (Daumas *et al.*, 2003 ; Meilhac et Destainville, 2011).

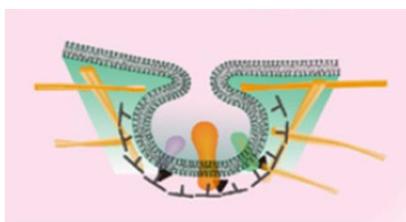
Il s'agit de clusters de protéines formés par des dimères/oligomères et des plus grands complexes de protéines associées à la membrane et aux protéines transmembranaires, ayant des dimensions généralement entre 3 nm et 10 nm de diamètre (ce qui peut s'étendre à quelques centaines de nanomètres, comme dans le cas des puits recouverts de clathrine). La différence entre le domaine lipidique « *rafts* » et les complexes dynamiques de protéines n'est pas dans la taille ou le nombre de molécules impliquées par domaine, mais plutôt dans les interactions de base qui forment le domaine: les interactions lipidiques jouent un rôle essentiel pour la formation des *rafts*. Les interactions protéine-protéine sont l'une des principales forces motrices de la formation de nombreux domaines, ces complexes protéiques dynamiques comprennent non seulement ceux dans la membrane plasmique (c'est à dire, ceux qui sont composés de protéines membranaires intégrales), mais aussi ceux induits par les protéines d'échafaudage cytoplasmiques et par les protéines d'enveloppe.

Grâce à l'accumulation d'une variété de travaux, l'équipe de Kuzumi (Kuzumi *et al.*, 2012) suggèrent trois types de « domaines protéiques complexes et dynamiques », comme le montre la figure 7:

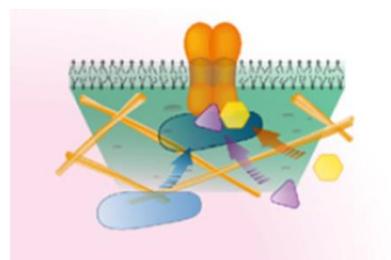
- des oligomères de protéines ancrées à la membrane et des complexes de protéines (a),
- des domaines de coat-protein (b),
- des complexes protéiques induits par des échafaudages protéiques (c),



(a) oligomères de protéines ancrées à la membrane



(b) domaines de coat-protein (endocytose et exocytose)

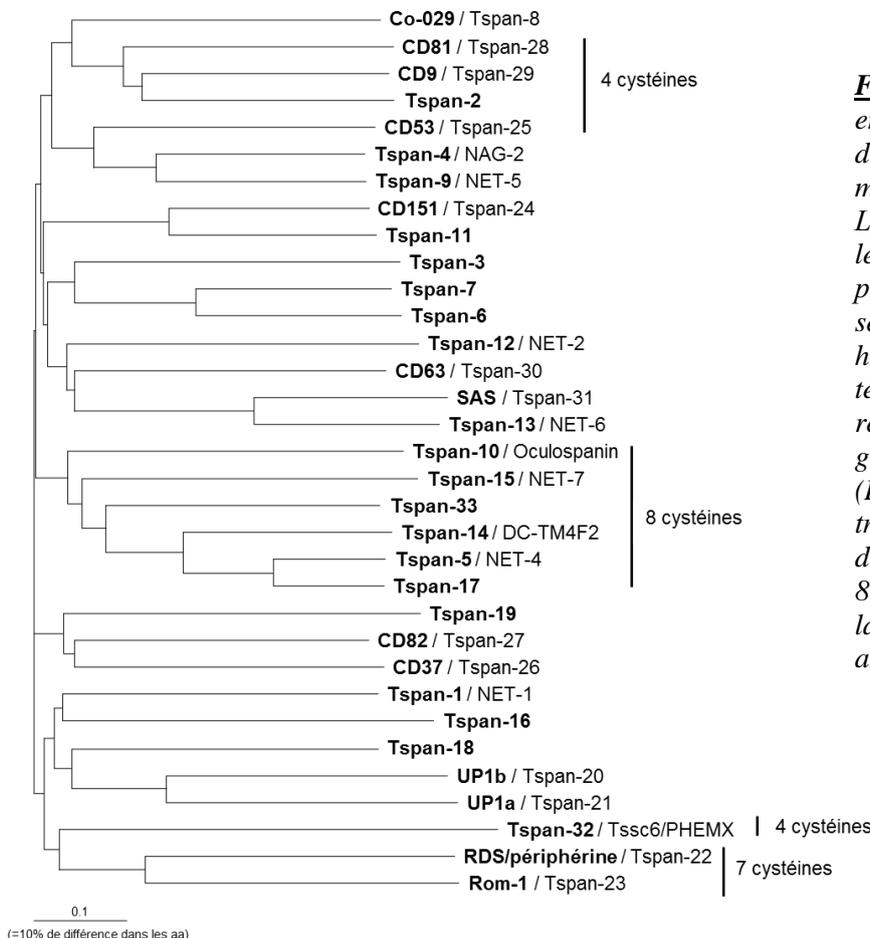


(c) complexes protéiques induits par des échafaudages protéiques, rassemblant plus de deux molécules

**Figure 7:** Schéma des trois types de « complexes dynamiques de protéines », (d'après Kuzumi *et al.*, 2012).

# Les tétraspanines

Dans les années 1990, les premiers clonages des antigènes de la membrane plasmique ont mis en évidence des protéines à 4 domaines transmembranaires de fonction inconnue, les tétraspanines, avec la découverte de CD63, Tspan8, CD53, CD37, CD81 et CD9 (Hotta *et al.*, 1988 ; Boucheix et Rubinstein, 2001; Charrin *et al.*, 2009a; Hemler, 2003; Maecker *et al.*, 1997; Yáñez-Mó *et al.*, 2009). Les tétraspanines sont exprimées chez tous les métazoaires et certains champignons pluricellulaires (Rubinstein, 2011 ; Charrin, *et al.*, 2009a ; Yáñez-Mó *et al.*, 2009 ; Hemler 2008, Huang *et al.*, 2005b ; Fradkin *et al.*, 2002). Il existe 33 tétraspanines chez les mammifères (figure 8), 37 chez la drosophile (dont la moitié est codée par un cluster spécifique de tétraspanines sur les chromosomes 2) et 20 chez le nématode, *Caenorhabditis elegans* (Garcia-España *et al.*, 2006 ; Garcia-España *et al.*, 2008 ; Hemler *et al.*, 2003 ; Todres *et al.*, 2000). Chez les plantes des protéines tetraspanine-like sont retrouvées (Cnops *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2012). En revanche, les champignons unicellulaires tels que *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe* ne possèdent pas de gène codant les tétraspanines.



**Figure 8 :** Arbre des distances entre les séquences des différentes tétraspanines de mammifères.

L'arbre est généré en utilisant le programme ClustalW à partir de l'alignement des séquences des 33 tétraspanines humaines. La plupart des tétraspanines possèdent six résidus cystéine dans leur grand domaine extracellulaire (LED). En revanche pour treize d'entre-elles le nombre de cystéine varie entre 4, 7 ou 8 comme indiqué à droite sur la figure. D'après Charrin *et al.*, 2009a

L'analyse phylogénétique indique que la famille des tétraspanines se compose de quatre grandes familles :

- 1) la famille CD, contenant de nombreuses tétraspanines communes aux vertébrés et aux invertébrés tels que CD9, CD81 et CD151,
- 2) la famille CD63, qui contient donc CD63 et plusieurs tétraspanines de drosophile,
- 3) la famille uroplakine et
- 4) la famille RDS qui contient RDS, ROM-1, TSPAN10, TSPAN5, TSPAN14 et TSPAN15 entre autres (Garcia-España *et al.*, 2008).

Plusieurs tétraspanines retrouvées chez les plantes (tetraspanines-like), les champignons, les amibes ne font pas partie des quatre grandes familles (Garcia-España *et al.*, 2008 ; Huang *et al.*, 2005b), mais proviendraient d'un gène ancestral par divergence dans la séquence.

Les tétraspanines sont codées dans le génome humain par autant de gènes sur des chromosomes différents, d'après la nomenclature établie par HGNC [HUGO (Human Genome Organization) Gene Nomenclature Committee] il existe 33 gènes répertoriés (tableau 1). La variabilité de séquences et la conservation de certains résidus entre les espèces ainsi que l'organisation des gènes des tétraspanines laissent penser que ces molécules dérivent d'un ancêtre commun par duplication (Wright *et al.*, 1993)

| Protéine | Gène       | Chromosome      | Nom                                       | Symbole | Ancien Symbole      | Synonymes                     |
|----------|------------|-----------------|---|---------|---------------------|-------------------------------|
| TSPAN1   | TSPAN1     | 1p33            | tetraspanin 1                             | TSPAN1  |                     | TSPAN-1, NET-1                |
| TSPAN2   | TSPAN2     | 1p13.1          | tetraspanin 2                             | TSPAN2  |                     | TSPAN-2, TSN2, FLJ12082       |
| TSPAN3   | TSPAN3     | 15q23           | tetraspanin 3                             | TSPAN3  | TM4SF8              | TM4-A, TSPAN-3                |
| TSPAN4   | TSPAN4     | 11p15.5         | tetraspanin 4                             | TSPAN4  | TM4SF7              | NAG-2, TSPAN-4, TETRASPAN     |
| TSPAN5   | TSPAN5     | 4q22.3          | tetraspanin 5                             | TSPAN5  | TM4SF9              | Tspan-5, NET-4                |
| TSPAN6   | TSPAN6     | Xq22            | tetraspanin 6                             | TSPAN6  | TM4SF6              | T245, TSPAN-6                 |
| TSPAN7   | TSPAN7     | Xp11.4          | tetraspanin 7                             | TSPAN7  | MXS1, TM4SF2, MRX58 | DXS1692E, TALLA-1, A15, CD231 |
| TSPAN8   | TSPAN8     | 12q14.1-q21.1   | tetraspanin 8                             | TSPAN8  | TM4SF3              | CO-029                        |
| TSPAN9   | TSPAN9     | 12p13.33-p13.32 | tetraspanin 9                             | TSPAN9  |                     | NET-5                         |
| TSPAN10  | TSPAN10    | 17q25.3         | tetraspanin 10                            | TSPAN10 |                     | OCSF                          |
| TSPAN11  | CD151-like | 12p11.21        | tetraspanin 11                            | TSPAN11 |                     |                               |
| TSPAN12  | TSPAN12    | 7q31.31         | tetraspanin 12                            | TSPAN12 | TM4SF12             | NET-2                         |
| TSPAN13  | TSPAN13    | 7p21.2          | tetraspanin 13                            | TSPAN13 | TM4SF13             | NET-6                         |
| TSPAN14  | TSPAN14    | 10q23.1         | tetraspanin 14                            | TSPAN14 | TM4SF14             | DC-TM4F2, MGC11352            |
| TSPAN15  | TSPAN15    | 10q22.1         | tetraspanin 15                            | TSPAN15 | TM4SF15             | NET-7                         |
| TSPAN16  | TSPAN16    | 19p13.2         | tetraspanin 16                            | TSPAN16 | TM4SF16             | TM4-B, TM-8                   |
| TSPAN17  | TSPAN17    | 5q35.3          | tetraspanin 17                            | TSPAN17 | FBXO23, TM4SF17     | FBX23                         |
| TSPAN18  | TSPAN18    | 11p11.2         | tetraspanin 18                            | TSPAN18 |                     | TSPAN                         |
| TSPAN19  | TSPAN19    | 12q21.31        | tetraspanin 19                            | TSPAN19 |                     |                               |
| TSPAN20  | UPK1B      | 3q13.32         | uroplakin 1B                              | UPK1B   | UPK1                | TSPAN20                       |
| TSPAN21  | UPK1A      | 19q13.1         | uroplakin 1A                              | UPK1A   |                     | TSPAN21                       |
| TSPAN22  | RDS        | 6p21.1          | peripherin 2 (retinal degeneration, slow) | PRPH2   | RP7, RDS            | TSPAN22, rd2, CACD2           |
| TSPAN23  | ROM1       | 11q13           | retinal outer segment membrane protein 1  | ROM1    |                     | TSPAN23, ROM                  |
| TSPAN24  | CD151      | 11p15.5         | CD151 molecule (Raph blood group)         | CD151   |                     | SFA-1, PETA-3, TSPAN24, RAPH  |
| TSPAN25  | CD53       | 1p13            | CD53 molecule                             | CD53    | MOX44               | TSPAN25                       |
| TSPAN26  | CD37       | 19p13-q13.4     | CD37 molecule                             | CD37    |                     | TSPAN26                       |
| TSPAN27  | CD82       | 11p11.2         | CD82 molecule                             | CD82    | ST6, KAI1           | R2, IA4, TSPAN27              |
| TSPAN28  | CD81       | 11p15.5         | CD81 molecule                             | CD81    | TAPA1               | TAPA-1, TSPAN28               |
| TSPAN29  | CD9        | 12p13           | CD9 molecule                              | CD9     | MIC3                | BA2, P24, TSPAN29, MRP-1      |
| TSPAN30  | CD63       | 12q12-q13       | CD63 molecule                             | CD63    | MLA1                | ME491, TSPAN30                |
| TSPAN31  | TSPAN31    | 12q13-q14       | tetraspanin 31                            | TSPAN31 | SAS                 |                               |
| TSPAN32  | TSPAN32    | 11p15           | tetraspanin 32                            | TSPAN32 | TSSC6, PHEMX        |                               |
| TSPAN33  | TSPAN33    | 7q32.3          | tetraspanin 33                            | TSPAN33 |                     | MGC50844, Penumbra            |

**Tableau 1** : Nomenclature de la famille des Tétraspanines (d'après HGNC)

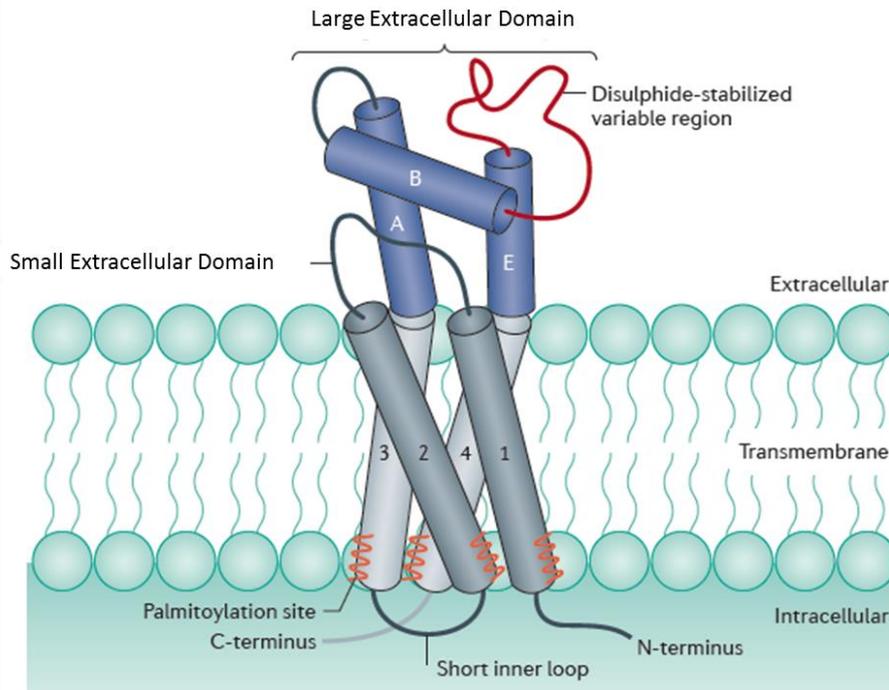
Un certain nombre de travaux ont mis en évidence les rôles physiologiques clés pour certaines de ces tétraspanines (par exemple CD9, CD63, CD81, CD82, CD151), en particulier le déclenchement des réponses immunitaires, la fusion cellulaire, le trafic, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'adhérence et la migration (Hemler, 2005 ; Charrin *et al.*, 2009a). Des travaux ont révélés le rôle des tétraspanines dans le cancer (Yáñez-Mó *et al.*, 2011a), notamment dans la progression tumorale (Richardson *et al.*, 2011 ; Romanska et Berditchevski, 2011) et le ciblage des tumeurs (Stipp, 2010, Sala-Valdés *et al.*, 2012 ; Hemler 2008 ; Haeuw *et al.*, 2011 ; Hemler, 2014). Les tétraspanines sont également impliquées dans le processus métastatique (par exemple CD151 et TSPAN8), (Stipp, 2010 ; Tsai et Weissman, 2011; Zoller, 2009). D'autres tétraspanines (par exemple CD81) sont impliquées dans les processus infectieux tel que l'infection des cellules hépatocytaires par deux pathogènes majeurs, le virus de l'hépatite C et le parasite du paludisme (Veenbergen et van Spriël, 2011 ; Jones *et al.*, 2011 ; Levy *et al.*, 2014).

Il est également nécessaire de mentionner que les tétraspanines sont capables de s'associer à d'autres protéines transmembranaires engendrant la formation de réseaux de tétraspanines et d'interaction moléculaires, le « tetraspanin web ». Certaines de ces protéines partenaires sont exprimées sur presque tous les types cellulaires alors que d'autres sont limitées (Hemler, 2008 ; Charrin *et al.*, 2009a).

## **1- Structure des tétraspanines**

Les tétraspanines sont des glycoprotéines transmembranaires dont la taille varie entre 204 (Tspan13) et 355 acides aminés (Tspan10) et le poids moléculaire entre 25 et 80KDa. Les structures secondaires et tertiaires sont conservées (Kovalenko *et al.*, 2005 ; Seigneuret *et al.*, 2006). Les tétraspanines sont composées de (figure 9):

- 1) quatre domaines transmembranaires (TM-1, -2, -3 et -4),
- 2) deux domaines extracellulaires : un petit SED (Small Extracellular Domain) ou nommé EC1 est un petit domaine qui se compose de moins de trente acides aminés, et un grand LED (Large Extracellular Domain), appelé aussi EC2 qui contient entre 76 et 131 acides aminés et dépasse de quelques nanomètres de la membrane (par exemple : 3,5 nm pour CD81 et 5 nm pour les uroplakines UPIa et UPIb), (Seigneuret *et al.*, 2006 ; Min *et al.*, 2006).
- 3) une courte séquence cytoplasmique entre les TM2 et TM3 ;
- 4) deux courts domaines cytoplasmiques N- et C-terminaux, contenant généralement moins de vingt résidus.



**Figure 9 :** Schéma de la structure d'une tétraspanine.

La protéine est repliée sous forme d'une tige serrée qui possède quatre hélices transmembranaires, TM, (numérotée 1 à 4). Le grand domaine extracellulaire, LED, reliant les domaines TM3 et TM4 contient une région hélicoïdale conservée (contenant trois hélices étiquetées A, B et E, en bleu) et une région variable (rouge foncé; entre les hélices B et E). Dans ce domaine les ponts disulfures conservés (entre deux à quatre) stabilisent généralement la région variable ne sont pas représentés. Le petit domaine extracellulaire, SED, rejoint les domaines TM1 et TM2. Les tétraspanines possèdent deux extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques ainsi que d'une petite boucle intracellulaire. Les lignes en zigzag orange indiquent les sites de palmitoylation. D'après Hemler, 2014

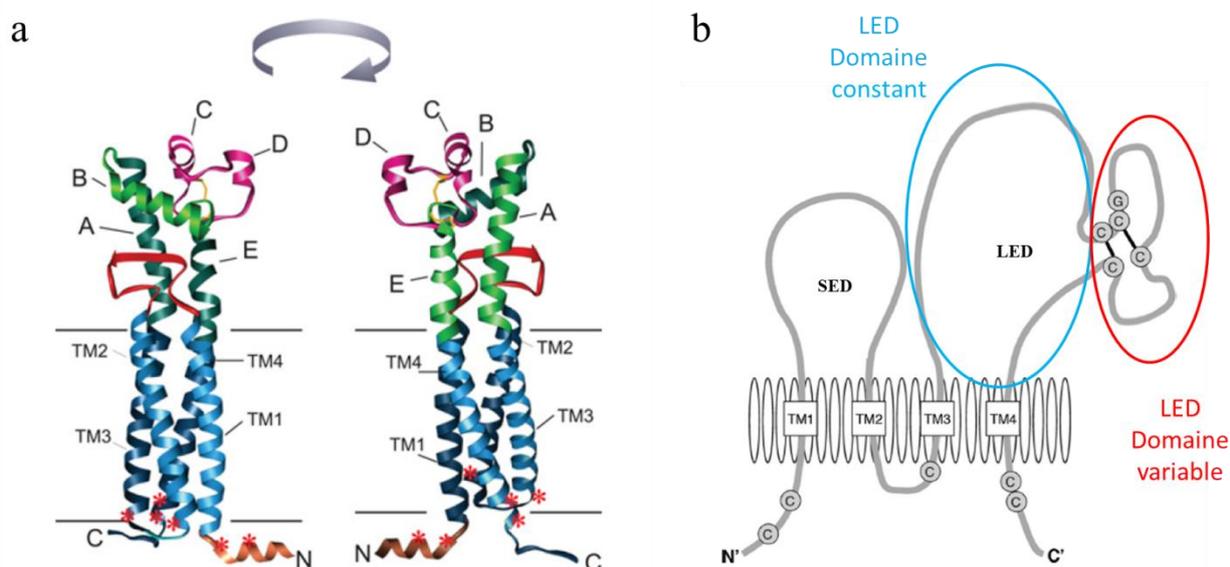
## 1.1- Les domaines transmembranaires

L'analyse des séquences d'acides aminés des quatre hélices transmembranaires des tétraspanines montrent une forte homologie de séquence soulignant l'importance fonctionnelle de ces régions. Les premier, troisième et quatrième domaines transmembranaires contiennent souvent des résidus polaires. Ces acides aminés conservés, asparagine (Asn), acide glutamique (Glu) et glutamine (Gln) seraient impliqués dans l'emballage (*packing*) des domaines transmembranaires (Stipp *et al.*, 2003) en stabilisant la structure tertiaire des tétraspanines par des liaisons hydrogènes (Seigneuret *et al.*, 2006).

## 1.2- Les domaines extracellulaires

La structure cristallographique du LED de CD81 et la modélisation de la structure du CD81 ont permis d'éclaircir les aspects structuraux des tétraspanines. (Kitadokoro *et al.*, 2001a ; Kitadokoro *et al.*, 2001b ; Seigneuret *et al.*, 2006 ; Rajesh *et al.*, 2012).

Ce domaine est composé de cinq hélices- $\alpha$  (A, B, C, D et E) formant la structure en champignon caractéristique, les hélices A et E représentent le pied et les hélices B, C, et D (repliées par deux ponts disulfures) le chapeau (figure 10).



**Figure 10 :** Structure de la tétraspanine CD81.

a) Deux vues différentes de la structure modélisée du CD81. Les régions transmembranaires sont en bleu, le SED est en rouge, le LED est coloré en vert, la région variable de ce domaine est en rose foncé. Les ponts disulfures du LED sont en jaune. Les résidus cystéines intracellulaires qui sont des sites probables de la palmitoylation sont indiqués par des astérisques rouges. Les différentes régions transmembranaires sont indiquées en bleu (TM1 à TM4), ainsi que les différents sous-domaines du LED (A-E). D'après Seigneuret, 2006

b) Représentation schématique du CD81 montrant les cystéines cytoplasmiques (C) qui sont des sites de palmitoylation, et ceux dans le domaine variable du domaine LED (en rouge) contenant le motif GCC responsables de la formation des ponts disulfures. D'après Levy, 2014.

Le LED contient une région constante et une région variable. Le domaine constant peut varier dans sa séquence mais pas dans sa structure, il est composé des hélices A, B et E. Plusieurs résidus cystéines conservées, (motif GCC) sont situés après l'hélice B et au début de l'hélice E, et contribuent à la spécificité de chaque tétraspanine et au maintien de la structure du LED. Alors que la plupart des tétraspanines ont six résidus cystéine dans leur LED d'autres en possèdent seulement quatre, sept ou huit (Fig.8) impliquant la formation de pont disulfures responsable du repliement de la tétraspanine. Pour CD81, par exemple, les hélices C et D constituent la région variable.

En revanche, le petit domaine extracellulaire (SED), est moins bien connu. D'après les travaux de Seigneuret (Seigneuret *et al.*, 2006) il semblerait que le SED possède un petit feuillet- $\beta$  riche en résidus hydrophobes, sa longueur prédite est variable allant de trois à sept résidus. Celui-ci pourrait interagir avec les hélices A, B et E du LED grâce à leurs résidus

hydrophobes permettant la stabilisation de la molécule par des liaisons hydrophobes. Des travaux réalisés chez les plantes révèlent la présence d'un résidu cystéine supplémentaire présent dans la petite boucle extracellulaire, suggérant que ce résidu cystéine pourrait être impliqué dans la liaison avec les résidus cystéine du LED (DeSalle *et al.*, 2010).

### **1.3- Les domaines cytoplasmiques**

Les domaines N- et C-terminaux sont deux autres régions variables en dehors de la région variable du LED. À l'exception de l'extrémité N-terminale de Tspan-10 et des extrémités C-terminales de Tspan-10, Tspan-12, Tspan-15, Tspan-32, Tspan-33, périphérine/RDS et Rom-1, les extrémités cytosoliques des tétraspanines font généralement moins de vingt résidus (Boucheix et Rubinstein, 2001).

Ces domaines cytoplasmiques sont modifiés de façon post-traductionnelle par la palmitoylation (addition de palmitate sur les cystéines cytoplasmiques juxtamembranaires), (CD9, CD63, CD81, CD151 et CD82, Berditchevski *et al.*, 2002; Charrin *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002), l'ubiquitination (CD82, Tsai *et al.*, 2007 ; CD81 et CD151, Lineberry *et al.*, 2008) ; et dans un cas exceptionnel, la phosphorylation (CD37, Lapalombella *et al.*, 2012).

## **2- Distribution tissulaire et localisation subcellulaire des tétraspanines**

Si on retrouve la plupart des tétraspanines à la surface des cellules, elles peuvent également être localisées dans des compartiments intracellulaires. Plusieurs tétraspanines tels que CD9, CD81 et CD151 ne sont pas ubiquitaires mais sont très largement répandues. D'autres tétraspanines, telles que les uroplakines UPIa et UPIb, ont une distribution plus restreintes elles sont retrouvées dans des structures spécialisées notamment comme constituant des membranes de l'urothélium (couche de cellules formant un épithélium tapissant les voies urinaires), (Sun *et al.*, 2006). C'est également le cas pour les tétraspanines périphérine/RDS et Rom-1 impliquées dans l'architecture des photorécepteurs (Goldberg, 2006). La tétraspanine CD37 s'exprime à la membrane plasmique des cellules lymphoïdes T et B et la tétraspanine CD53 est exprimée presque exclusivement à la surface les leucocytes (Tarrant *et al.*, 2003 ; van Spriel *et al.*, 2004 ; Tohami *et al.*, 2004 ; Wright *et al.*, 2004a). En ce qui concerne la localisation subcellulaire, la tétraspanine CD63 semble majoritairement exprimée dans les endosomes tardifs (Boucheix et Rubinstein, 2001). D'autres tétraspanines (CD9, CD81,...)

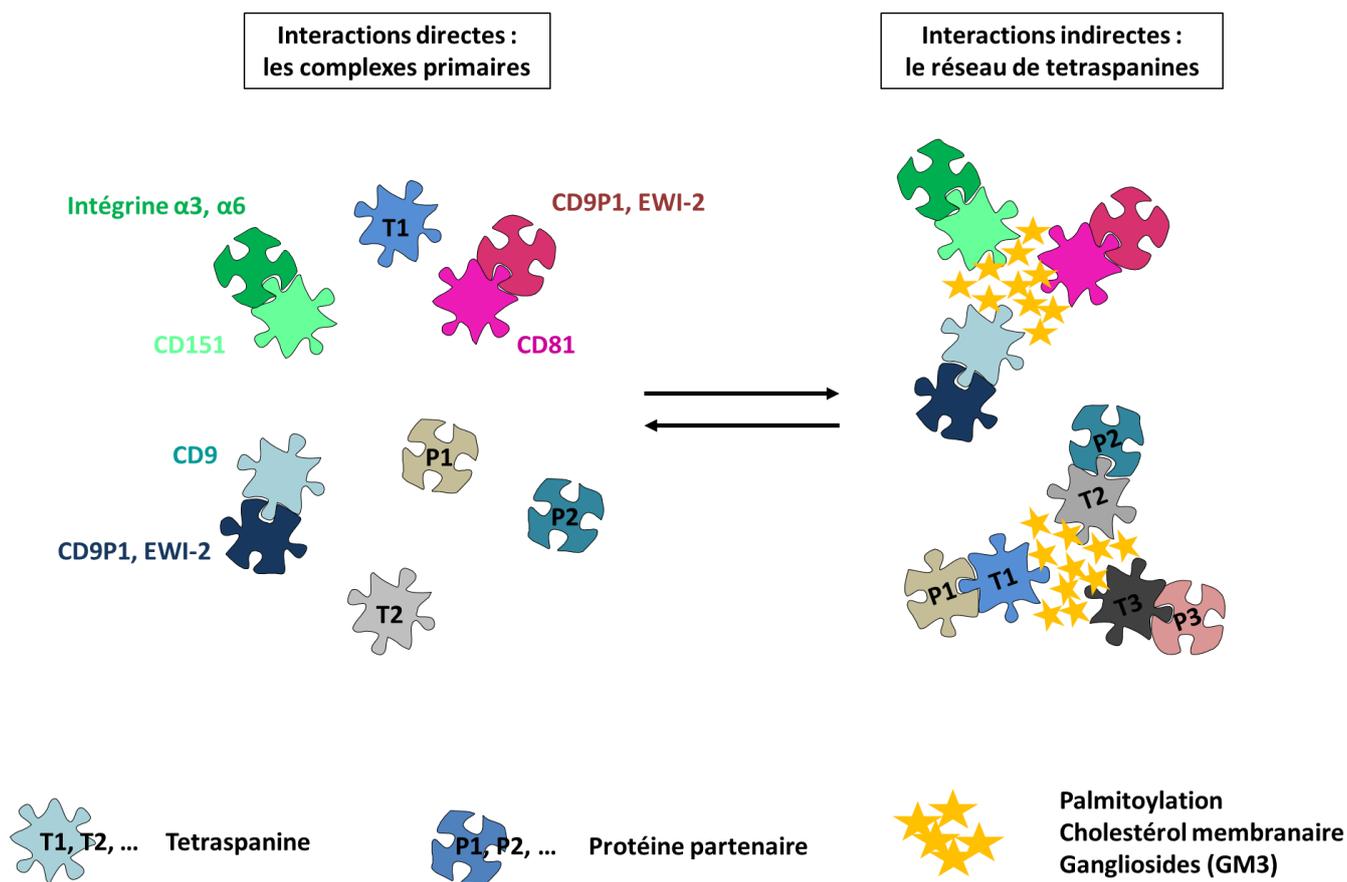
sont également retrouvées dans les exosomes (van Niel *et al.*, 2006 ; Berditchevski et Odintsova, 2007 ; Zoller, 2009).

### **3- Organisation des tétraspanines à la membrane plasmique**

#### **3.1- Le réseau de tétraspanines**

Les études biochimiques de la membrane cellulaire et des complexes à tétraspanines par l'utilisation d'une variété de détergent suivi d'une immunoprécipitation ont permis de mettre en évidence, suite aux analyses par western-blot et spectrométrie de masse, que les tétraspanines sont associées à différents types de molécules protéiques. Ainsi, il a été défini comme « protéines partenaires » les protéines qui restent associées à une tétraspanine donnée dans des conditions qui perturbent les interactions tétraspanine-tétraspanine. (Charrin *et al.*, 2009a). Les protéines les plus importantes sont : des intégrines (en particulier  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$ ) et d'autres molécules d'adhérences (EpCAM,...), des membres de la superfamille des immunoglobulines (CD9P1,...), les ectoenzymes (ectopeptidases et métalloprotéases), des précurseurs de facteurs de croissance (TGF $\alpha$ ,...) et des molécules de signalisation intracellulaires (tels que des protéines G hétérotrimériques), (Boucheix et Rubinstein, 2001 ; Levy et Shoham, 2005a ; Hemler, 2005 ; Charrin *et al.*, 2009a).

La plupart de ces interactions sont indirectes, elles ont été principalement identifiées par co-immunoprécipitation en utilisant des détergents doux (les Brij® ou le CHAPS), préservant les interactions tétraspanine-tétraspanine. Certains détergents (la digitonine et, dans certains cas, le Triton X-100) permettent l'identification de petits complexes directs tétraspanine-protéine partenaire (Serru *et al.*, 1999; Yauch *et al.*, 1998) suggérant un modèle dans lequel divers complexes primaires s'assemblent par des interactions tétraspanine-tétraspanine pour former un réseau dynamique d'interactions d'ordre supérieur appelé le réseau de tétraspanines ou « tetraspanin web » (Boucheix et Rubinstein, 2001), (figure 11).



**Figure 11:** Les interactions moléculaires du réseau de tétraspanines.

Les interactions directes : l'association se fait entre tétraspanine et une protéine partenaire et est appelé « complexe primaire ». L'interaction est robuste est conservée lors de la lyse cellulaire en condition stringente (digitonine et, dans certains cas le Triton X-100). Ces interactions pourraient impliquer le grand domaine extracellulaire (LED) ou les domaines transmembranaires des tétraspanines.

Les interactions indirectes : les associations se font entre les tétraspanines des « complexes primaires » pour former le réseau de tétraspanines. Elles sont identifiées en utilisant des détergents doux (les Brij® ou le CHAPS). Ces interactions sont stabilisées par la palmitoylation des cystéines juxtamembranaires des tétraspanines, par le cholestérol membranaire et par les gangliosides.

Les paires tétraspanine-partenaire bien établies sont : CD81-CD19, CD151-intégrine  $\alpha 3\beta 1$  et CD151- intégrine  $\alpha 6\beta 1$ . Les tétraspanines CD9 et CD81 possèdent 45% identité et partagent deux partenaires, EWI-2 et CD9P-1 (appelé aussi EWI-F ou FPRP), qui sont des molécules à domaines Ig de fonction inconnue (Boucheix et Rubinstein, 2001 ; Levy et Shoham, 2005b ; Hemler, 2005 ; Charrin *et al.*, 2009), (tableau 2 et 3). D'autre part des techniques microscopiques comme le FRET (transfert d'énergie par résonance de fluorescence), ont permis de mettre en évidence certaines interactions spécifiques dans le réseau de tétraspanines

comme CD9-ICAM1 (InterCellular Adhesion Molecule 1) ou CD151-VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), (Barreiro *et al.*, 2008 ; Charrin *et al.*, 2009).

| Tétraspanines | Partenaires                    | Confirmé par pontage chimique | Référence  | Commentaire  | Autre tétraspanine interagissant dans des conditions moins stringentes   |
|---------------|--------------------------------|-------------------------------|--|--|--|
| UP1a          | UPII                           | Oui                           | (Sun, 2006)  | Le couple UP1b/UIII sert de contrôle   |  |
| UP1b          | UIIII                          | Oui                           | (Sun, 2006)  | Le couple UP1a/UIII sert de contrôle   |  |
| CD9           | CD9P-1/EWI-F/FPRP/CD315        | Oui                           | (Charrin et al., 2001; Stipp et al., 2001b)  | Complexe spécifique qui résiste à la digitonine, est partiellement résistant au TritonX100   | CD82, CD151, CD63, Tspan8 (Charrin et al., 2001; Claas et al., 2005)   |
|               | EWI-2/CD316                    | Oui                           | (Charrin et al., 2003a; Stipp et al., 2001a)   | Complexe spécifique qui résiste à la digitonine  | CD53, CD82, CD151 (Charrin et al., 2003a; Zhang et al., 2003)  |
|               | EpCAM                          | Oui                           | (Le Naour et al., 2006)  | Complexe spécifique qui résiste à la digitonine  | Tspan-8 (Claas et al., 2005)   |
|               | Pro-HB-EGF                     | Oui                           | (Iwamoto et al., 1994)   | Seul CD9 parmi les tétraspanines peut augmenter son activité   | CD63, CD81, CD82 (Nakamura et al., 2000)   |
|               | ICAM-1                         | Non                           | (Barreiro et al., 2005; Barreiro et al., 2008)   | Des analyses de FRET suggèrent que CD9 est proche d'ICAM1 alors que CD151 ne l'est pas   | CD151 (Barreiro et al., 2005)  |
|               | Claudin-1                      | Oui                           | (Kovalenko et al., 2007)   | La Claudin-1 a été identifiée dans une immunoprécipitation CD9 après lyse en Triton X-100, par spectrométrie de masse  | CD81 and CD151 (Harris et al., 2008; Kovalenko et al., 2007)   |
|               | Pro-TGF $\alpha$               | Non                           | (Shi et al., 2000)   | Co-immunoprécipitation en Triton X-100. Pas d'autres tétraspanines testées   |  |
|               | intégrin $\alpha_2\beta_1$     | Non                           | (Cailleteau et al., 2010)  | Interaction identifiée par split-ubiquitine et confirmée par co-immunoprécipitation en Brij58  | CD151 (Sincock et al., 1999)   |
| CD81          | CD19                           | Non                           | (Bradbury et al., 1992; Horváth et al., 1998; Matsumoto et al., 1993; Shoham et al., 2003) | Complexe spécifique qui résiste à la digitonine; Le CD21 est supposé interagir avec le CD81 grâce à son association avec le CD19   | CD9, CD81 (Horváth et al., 1998)   |
|               | Intégrin $\alpha_4\beta_1$     | Non                           | (Serru et al., 1999)   | Complexe spécifique qui résiste à la digitonine  | CD9, CD53, CD63, and CD82 (Mannion et al., 1996; Rubinstein et al., 1996)                                      |
|               | CD9P-1/EWI-F/FPRP              | Oui                           | (Charrin et al., 2001; Stipp et al., 2001b)  | Complexe spécifique qui résiste à la digitonine  | CD82, CD151, CD63, Tspan8 (Charrin et al., 2001; Claas et al., 2005)   |
|               | EWI-2/CD316                    | Oui                           | (Charrin et al., 2003a; Clark et al., 2001; Stipp et al., 2001a)                           | Complexe spécifique qui résiste à la digitonine  | CD53, CD82, CD151 (Charrin et al., 2001; Claas et al., 2005)   |
|               | Claudin-1                      | Non                           | (Harris et al., 2008; Kovalenko et al., 2007)  | Des expériences de FRET indiquent une proximité  | CD9 CD151 (Kovalenko et al., 2007)   |
| CD151         | Intégrin $\alpha_3\beta_1$     | Oui                           | (Serru et al., 1999; Sincock et al., 1999; Yauch et al., 1998)                             | Complexe spécifique qui résiste à la digitonine, au NP-40 et au Triton X-100   | CD9, CD81, CD82, CD63, Tspan4 (Berditchevski et al., 1995; Berditchevski et al., 1996; Tachibana et al., 1997) |
|               | Intégrin $\alpha_6\beta_1$     | Oui                           | (Kazarov et al., 2002; Serru et al., 1999; Sincock et al., 1999)                           | Complexe spécifique qui résiste à la digitonine et au NP-40  | CD9, CD81, CD82, CD63, Tspan4 (Berditchevski et al., 1995; Berditchevski et al., 1996; Tachibana et al., 1997) |
|               | Intégrin $\alpha_6\beta_4$     | Non                           | (Chometon et al., 2006; Sterk et al., 2000; Sterk et al., 2002)                            | Une association directe est suggérée par l'adressage de CD151 aux hémidesmosomes par cette intégrine et par l'absence de marquage des hémidesmosomes avec un anticorps anti-CD151 qui détecte uniquement la fraction de CD151 non associée aux intégrines.   | CD9 (Baudoux et al., 2000)   |
|               | Intégrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ | +/-                           | (Lau et al., 2004)   | Interaction observée en Triton X-100 mais aucune autre tétraspanine n'a été testée en parallèle. Des expériences de pontage chimique n'apportent pas d'information sur la taille du complexe; les fonctions de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sont perturbées sur les plaquettes déficientes en CD151 | CD9, CD63 (Indig et al., 1997; Israels et al., 2001; Slupsky et al., 1989)                                     |
|               | VCAM-1                         | Non                           | (Barreiro et al., 2005; Barreiro et al., 2008)   | Des expériences de FRET indiquent une proximité de VCAM1 avec CD151 mais pas avec CD9  | CD9 (Barreiro et al., 2005)  |
|               | MT1-MMP                        | Non                           | (Yanez-Mo et al., 2008)  | Des expériences de FRET indiquent une proximité de MT1-MMP avec CD151 mais pas CD9. Effets spécifiques de la depletion du CD151 sur les fonctions de MT1-MMP   | CD9, CD81, CD63, Tspan12 (Lafleur et al., 2009; Yanez-Mo et al., 2008)   |

| Tétraspanines                        | Partenaires                          | Confirmé par pontage chimique | Référence   | Commentaire   | Autre tétraspanine interagissant dans des conditions moins stringentes        |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---|---|---|
| CD53                                 | ADAM10                               | Non                           |   | Complexe spécifique qui résiste à la digitonine (données non publiées du laboratoire)   | CD9, CD63, CD81, CD82, CD151, Tspan12 (Arduise et al., 2008; Xu et al., 2009) |
| CD63                                 | H <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase | Non                           | (Duffield et al., 2003)   | Interaction observée en Triton X-100 mais aucune autre tétraspanine testée en parallèle   |   |
|                                      | CXCR4                                | Non                           | (Yoshida et al., 2008)  | Le CD63 modifie le trafic de CXCR4  |   |
|                                      | Synaptotagmin VII                    |                               | (Flannery et al., 2010)   |   | Le CD63 régule la localisation sub-cellulaire de la synaptotagmine VII        |
| Tspan12                              | Frizzled 4                           | Non                           | (Junge et al., 2009)  | Des expériences de pontage chimique ont déterminé que Tspan12 fait partie du complexe composant le récepteur à la norrine et régule son activité. Un grand nombre de tétraspanines a été testé et n'a pas d'effet sur l'activité du récepteur à la norrine.   |   |
| Tspan8                               | E-cadherin                           |                               | (Greco et al., 2010)  | Des expériences de pontage chimique ont révélées l'existence d'un complexe dont la taille est compatible avec une interaction proximale ; pas de détection d'une interaction CD9/E-cadhérine dans les mêmes conditions ; l'association de la E-cadhérine n'est généralement pas observée dans les expériences de co-immunoprécipitation |   |
| TspanC8 (Tspan5, 10, 14, 15, 17, 33) | ADAM10                               | Oui                           | (Prox et al., 2012); (Dornier et al., 2012); (Haining et al., 2012) | Complexe spécifique qui résiste à la digitonine; Les 6 TspanC8 permettent la sortie d'ADAM10 du Réticulum Endoplasmique, et 4 permettent l'augmentation de la quantité d'ADAM10 à la surface cellulaire   | CD9, CD63, CD81, CD82, CD151, Tspan12 (Arduise et al., 2008; Xu et al., 2009) |

**Tableau 2:** Associations tétraspanine-protéine partenaire potentielles ou établies.

| Molécules associées                          | Tétraspanine associées identifiées | Détergent le plus stringent dans lequel l'interaction est conservée et commentaires   |
|--|------------------------------------|---|
| <b>Molécules d'adhérences</b>                |                                    |   |
| intégrine α1β1                               | CD9                                | Brij97 (Lozahic et al., 2000)   |
| intégrine α5β1                               | CD9,CD151                          | CHAPS ; Brij58; interaction pas observée en Brij97 (Rubinstein et al., 1994; Sincoc et al., 1999)   |
| intégrine α7β1                               | CD151, CD9                         | CHAPS (Sterk et al., 2000)  |
| intégrine αLβ2                               | CD82                               | Brij96 (Shibagaki et al., 1999)   |
| intégrine αMβ2                               | CD63                               | Brij58 (Skubitz et al., 1996)   |
| intégrine αvβ5                               | CD81                               | Brij97 (Chang and Finnemann, 2007)  |
| CD42/gpIb                                    | CD9                                | CHAPS + pontage chimique (Longhurst et al., 1999; Slupsky et al., 1997)   |
| CD44   | CD9*, Tspan8, Tspan12*             | Brij97 (Le Naour et al., 2006; Xu et al., 2009); Pontage chimique avec le CD9 après dépalmitoylation (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 (Andre et al., 2006)   |
| CD36   | CD9                                | Brij96 (Miao et al., 2001a; Miao et al., 2001b)   |
| LI-CAM                                       | CD9                                | une interaction a été observée en CHAPS (Schmidt et al., 1996) mais pas en Brij97 (données non publiées du laboratoire)   |
| <b>Protéines à domaines immunoglobulines</b> |                                    |   |
| MHC-I  | CD82, CD81, CD53, CD9*             | Brij 97 (CD9) (Lagaudriere-Gesbert et al., 1997b; Le Naour et al., 2006) ; Pontage chimique avec le CD9 après dépalmitoylation (Kovalenko et al., 2007); l'interaction avec CD53 et CD81 est seulement supposée par des expériences de FRET (Szöllösi et al., 1996) |
| MHC-II                                       | CD9*, CD53, CD81, CD82, CD37       | CHAPS (Angelisova et al., 1994; Rubinstein et al., 1996); mAb FRET (Szöllösi et al., 1996); Basé sur le profil de protéines précipitées en marquage biotine, l'interaction est probablement conservée en Brij 97 (Horváth et al., 1998)                             |
| CD2  | CD9, CD53                          | CHAPS (Bell et al., 1992; Toyo-Oka et al., 1999) ; dans une autre étude, pas d'interaction de CD2 avec CD81 ou CD82 n'a pu être observée en CHAPS ou Brij97 (Imai et al., 1995; Imai and Yoshie, 1993)  |
| CD3  | CD9, CD81, CD82                    | CHAPS (Toyo-Oka et al., 1999). Associations pas observées en Brij 96 (Imai and Yoshie, 1993)  |
| CD4  | CD81,CD82                          | Brij96 (Imai and Yoshie, 1993)  |
| CD5  | CD9                                | CHAPS (Toyo-Oka et al., 1999) ; dans une autre étude, l'interaction observée avec CD81 ou CD82 en CHAPS est variable et pas observée en Brij96 (Imai and Yoshie, 1993)  |
| CD8  | CD81, CD82                         | Brij96 (Imai and Yoshie, 1993)  |

| Molécules associées                             | Tétraspanine associées identifiées | Détergent le plus stringent dans lequel l'interaction est conservée et commentaires   |
|---|------------------------------------|---|
| <b>Autres recepteurs</b>                        |                                    |   |
| EGFR  | CD82, CD9, Tspan12*                | Brij98 (Odintsova et al., 2000), CHAPS CD9 (Murayama et al., 2008), Brij 96/97 Tspan12 (Xu et al., 2009)  |
| GPR56   | CD9, CD81*                         | Brij96 (Little et al., 2004)  |
| cKit/CD117                                      | CD9, CD81, CD63                    | CHAPS (Anzai et al., 2002)  |
| c-MET   | CD82, CD151                        | Brij98 (Klosek et al., 2005; Takahashi et al., 2007; Todeschini et al., 2007). Pas d'interaction de CD82 avec c-Met n'a pu être observée dans d'autres études (Sridhar and Miranti, 2006)   |
| CD71 (transferrin receptor)                     | CD81, Tspan12*                     | Brij 97 (Abache et al., 2007; Xu et al., 2009)  |
| AMPA receptor                                   | Tspan7                             | (Bassani et al., 2012)  |
| <b>Enzymes associés à la membrane</b>           |                                    |   |
| CD26/ dipeptidyl peptidase IV                   | CD9*                               | Brij97 (Le Naour et al., 2006); base sur le profil de protéines co-immunoprécipitées avec CD26, Tspan8 s'associe probablement également avec CD26   |
| CD13/aminopeptidase N                           | CD9, CD81*, Tspan12*               | Spectrométrie de masse (Xu et al., 2009). Un anticorps isolé pour sa capacité à co-immunoprécipiter les tétraspanines reconnaît CD13 et a été utilisé pour confirmer la présence de CD13 dans les IP CD9 (données non publiées du laboratoire). Association avec CD81 confirmée dans le (Xu et al., 2009) |
| CD38/cyclic ADP-ribose hydrolase                | CD9                                | CHAPS (Zilber et al., 2005)   |
| CD224/ g- glutamyltransferase 1                 | CD9*, CD37, CD81, CD53, CD82       | Brij97 (Le Naour et al., 2006; Nichols et al., 1998)  |
| g-secretase                                     | CD9, CD81                          | CHAPSO (Wakabayashi et al., 2009)   |
| <b>Protéines à passage transmembranaires</b>    |                                    |   |
| Choline Transporter Like Protein 1 (CTL1)/CDw92 | CD9*                               | Brij97 (Andre et al., 2006; Le Naour et al., 2006)  |
| CD20  | CD53, CD81, CD82                   | mAb FRET (Szöllösi et al., 1996)  |
| L6  | CD81, CD63, CD151,                 | 0.8% Brij98/0.2% Triton X-100 (Lekishvili et al., 2008)   |
| CD47  | CD9                                | CHAPS (Longhurst et al., 1999)  |
| <b>Autres</b>                                   |                                    |   |
| CD46  | CD9*, CD81, CD82, CD151            | Brij97 (Lozahic et al., 2000); interaction avec les tétraspanines probablement indirecte, via les intégrines  |
| Leu-13/IFITM1                                   | CD81                               | CHAPS (Takahashi et al., 1990)  |
| Aggrus/podoplanin                               | CD9                                | Brij97. L'expression du CD9 dans des lignées de carcinomes retardant l'activation plaquettaire grâce à la podoplanine (Nakazawa et al., 2008)   |
| SCIMP   | CD37, CD53, CD81                   | CHAPS, Brij98 (Draber et al., 2011)   |

**Tableau 3:** Protéines interagissant avec les tétraspanines sans candidat pour la tétraspanine partenaire.

L'astérisque (\*) indique l'identification de la protéine associée à une analyse protéomique (mais pas nécessairement la première identification). L'interaction a pu être observée dans d'autres expériences.

Les interactions tétraspanine-protéine partenaire semblent impliquer le grand domaine extracellulaire (LED) ou les domaines transmembranaires des tétraspanines (Charrin *et al.*, 2009a ; Hemler, 2003; Yáñez-Mó *et al.*, 2009). Les interactions entre tétraspanines pourraient ne pas impliquer une interaction entre les squelettes peptidiques, mais pourraient être régulées par des lipides, comme les groupements palmitates liés sur les tétraspanines, le cholestérol membranaire et les gangliosides, c'est le cas notamment de CD9 qui s'associe directement avec le GM3 (Berditchevski *et al.*, 2002; Charrin *et al.*, 2002; Charrin *et al.*, 2003 ; Odintsova *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2002). La palmitoylation de plusieurs résidus cystéines juxtamembranaires influe sur les interactions protéine-protéine et la liaison avec les domaines riches en cholestérol des membranes (Linder et Deschenes, 2003).

La palmitoylation s'effectue dans de nombreuses tétraspanines, dont CD9, CD63, CD81, CD151 et CD82 (Charrin *et al.*, 2003 ; Yang *et al.*, 2002 ; Zhou *et al.*, 2004 ; Levy *et al.*, 1991 ; Seehafer *et al.*, 1988 ; Delandre *et al.*, 2009). Grâce aux approches biochimiques il a été mis en évidence que les molécules palmitoylées ont une capacité d'interaction réduite. Par exemple, la mutagenèse des cystéines palmitoylées de CD9, diminue son interaction avec CD81 dans des conditions particulières (Charrin *et al.*, 2002). L'ensemble des travaux montre que la palmitoylation joue un rôle dans l'association entre tétraspanines et leurs partenaires dans le « tetraspanins web » (Charrin *et al.*, 2009).

De façon similaire aux composants des microdomaines lipidiques (les *rafts*) les tétraspanines partitionnent dans une certaine mesure dans des fractions de faible densité après lyse cellulaire et ultracentrifugation en gradient de saccharose (Berditchevski *et al.*, 2002; Charrin *et al.*, 2002; Claas *et al.*, 2001). Cela indique que les tétraspanines sont présentes dans un environnement membranaire lipidique particulier, résistant aux détergents (DRM). Ces résultats ont conduit à l'idée que les tétraspanines s'assemblent dans des microdomaines enrichis en tétraspanines, les TEMs (Berditchevski *et al.*, 2002; Hemler, 2003). De nombreuses données suggèrent que les tétraspanines et les radeaux lipidiques sont des entités différentes. Un certain nombre de propriétés les distinguent des *rafts* notamment leur résistance vis-à-vis des détergents. Effectivement les TEMs ne sont pas résistants au Triton X-100 à 4°C contrairement aux *rafts*. A l'opposé, les TEMs sont résistants au Brij97 à 37°C, une condition qui entraîne la dissociation des *rafts*. De plus, les *rafts* contiennent toujours des protéines à ancrage GPI et ces protéines ne sont jamais retrouvées dans les TEMs (Charrin *et al.*, 2009 ; Hemler, 2003; Yáñez-Mó *et al.*, 2009). Cela n'exclut pas la possibilité que ces deux types de « structures » membranaires peuvent coopérer dans des circonstances particulières (Hogue *et al.*, 2011 ; Kuzumi *et al.*, 2012).

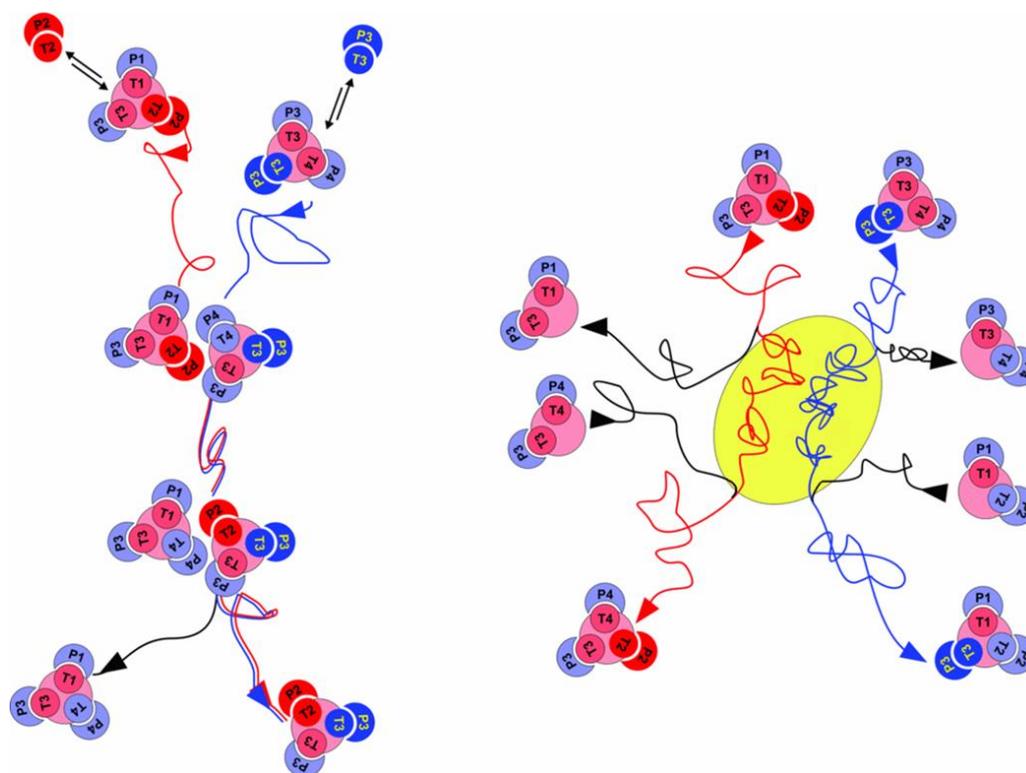
A partir du modèle tétraspanine-partenaire, il semble qu'une tétraspanine relie ses protéines partenaires à d'autres complexes tétraspanines-partenaires. C'est le cas des interactions entre CD151 et les intégrines, et entre CD9 et CD9P-1 (Berditchevski *et al.*, 2002; Charrin *et al.*, 2003b; Takeda *et al.*, 2007). Il semblerait que les tétraspanines pourraient avoir un rôle spécifique dans la régulation de leurs partenaires et un rôle non spécifique dans la contribution à la stœchiométrie de toutes les interactions moléculaires à l'intérieur du réseau de tétraspanines (Charrin *et al.*, 2014). Ces observations suggèrent un rôle des tétraspanines à la membrane plasmique comme organisateurs membranaires.

### 3.2- La dynamique du réseau de tétraspanines

Le comportement dynamique des tétraspanines a été abordé dans plusieurs études récentes. Par exemple, l'analyse de la tétraspanine CD9 au niveau de la molécule unique à l'aide de la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF, Total Internal Reflection Fluorescence microscopy), ou la microscopie à onde évanescente, a révélé que CD9, à la surface basale de la cellule, cycle entre des zones enrichies en tétraspanines (TEAs : Tetraspanin-Enriched Areas) et le reste de la membrane (Espenel *et al.*, 2008). Dans ces zones enrichies, CD9 a un mouvement limité (confiné) et une vitesse de diffusion plus faible, ce qui suggère que ces zones correspondent à des régions de la membrane dans lesquelles plusieurs molécules sont confinées en même temps. A l'extérieur des TEAs, les molécules CD9 ont un mouvement brownien. Les TEAs ne sont pas équivalents aux microdomaines enrichis en tétraspanines (TEMs : Tetraspanin-Enriched Microdomains) car les interactions tétraspanine-tétraspanine ont lieu à l'intérieur et à l'extérieur de ces structures (figure 12). Cette situation est similaire au modèle actuel des radeaux lipidiques, qui sont maintenant décrits comme « des assemblages à l'échelle nanométrique alternants des sphingolipides, du cholestérol et des protéines qui peuvent être stabilisés pour se regrouper » (Lingwood et Simons, 2010).

La fonction des TEAs, qui contiennent également plusieurs molécules associées aux tétraspanines, est inconnue, mais ils rappellent les plates-formes adhésives endothéliales (EAPs : Endothelial Adhesive Platforms) qui se forment par l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales dans lesquelles la molécule d'adhérence intercellulaire-1 (ICAM1) et la molécule d'adhérence de cellules vasculaires-1 (VCAM1) sont recrutées. Plusieurs tétraspanines telles que CD9 et CD151, sont également recrutées et possèdent un taux de diffusion plus faible dans ces plates-formes (Barreiro *et al.*, 2008). En effet la tétraspanine CD151 limite la diffusion de l'intégrine  $\alpha 6$  dans la membrane plasmique, ce qui rend les intégrines plus disponibles pour leur fonction dans l'adhérence et la migration (Hemler, 2008). Des travaux récents mettent en évidence que CD151 affecte le mode, plutôt que le taux de diffusion de l'intégrine  $\alpha 6$  (Yang *et al.*, 2012). Lors de l'engagement avec l'antigène, le récepteur des cellules lymphoïdes B (BCR) recrute des molécules de CD19 qui sont maintenues en place par leur interaction avec CD81 dans le réseau de tétraspanines. La compartimentation du BCR est un mécanisme permettant l'amplification du signal (Mattila *et al.*, 2013). Un autre exemple avec la protéine d'enveloppe GAG du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Cette protéine recrute plusieurs tétraspanines au site de bourgeonnement du virus, conduisant à un confinement des tétraspanines dans ces sites (Krementsov *et al.*, 2010 ; Potel *et al.*, 2013; Feneant *et al.*, 2014). En revanche bien que les

tétraspanines et leurs partenaires peuvent affecter mutuellement la diffusion de l'autre il reste à déterminer si les tétraspanines recrutent leurs protéines partenaires dans des TEAs.



**Figure 12 :** Représentation schématique du « tetraspanins web ».

Pour plus de clarté, les tétraspanines sont en rouge (T) et les partenaires sont en bleu (P), les différentes traces correspondent à leur mouvement.

Gauche: des petits groupes de tétraspanines (T1, T2, ...), associées spécifiquement à un partenaire moléculaire (P1, P2, ...), patrouillent dans la membrane plasmique, interagissent fréquemment avec d'autres groupes et échangent certains de leurs constituants, ce qui contribue à la diversité des interactions.

Droite: dans des conditions particulières, qui restent largement à définir, certaines tétraspanines restent confinées dans des zones de la membrane plasmique où des interactions plus stables ont lieu. Le modèle des TEAs présenté ici est basé sur le transfert d'une tétraspanine vers les domaines particuliers enrichis en tétraspanines (en jaune), tel que les EAPs (Endothelial Adhesive Platform), les plateformes d'adhérences endothéliales. D'après Charrin et al., 2009.

### 3.3- L'implication des domaines intracellulaires des tétraspanines dans la formation du réseau de tétraspanines

Il a été démontré que plusieurs protéines intracellulaires co-immunoprecipitent avec les tétraspanines. Dans de nombreux cas, par exemple pour la PI4-kinase, la protéine Kinase-C activée ou les protéines G hétérotrimériques (Berditchevski *et al.*, 1997; Le Naour *et al.*, 2006; Little *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2001), on ne sait pas si ces protéines s'associent directement avec une tétraspanine particulière.

Conformément au modèle des paires tétraspanine/protéine partenaire, la phosphorylation des résidus sérine de l'intégrine  $\beta 4$  par la PKC pourrait être régulées par CD151 (Deng *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2013).

En revanche, l'extrémité C-terminale de CD63 contient un motif d'internalisation de type tyrosine YXX $\phi$  (où  $\phi$  représente un acide aminé hydrophobe et X est un acide aminé), qui confère à CD63 un taux d'endocytose important. Ce motif est précédé d'un résidu glycine, présent uniquement chez CD63 et crucial pour l'agencement du CD63 dans les endosomes tardifs et les lysosomes grâce à une interaction avec les sous-unités du complexe protéique adaptateur (AP : *Adaptor Protein*) (Berditchevski et Odintsova, 2007; Pols et Klumperman, 2009). Ce motif interagit également avec le domaine de liaison PDZ de la protéine syntaxine suggérant une autre voie possible d'adressage. Certaines interactions au sein du réseau de tétraspanines à la membrane plasmique pourraient se produire par le biais du motif PDZ des protéines (Latysheva *et al.*, 2006). La présence du motif potentiel d'internalisation (YXX $\Phi$ ) est retrouvée chez douze autres tétraspanines, cependant leur rôle n'a pas été clairement établi chez celles-ci. En revanche il a été mis en évidence que des mutations de ce site dans la tétraspanine CD151 empêchent son accumulation dans les vésicules intracellulaires et réduit l'endocytose (Pols et Klumperman, 2009).

D'autres protéines, tels que l'eitrine et la GTPase Rac1, pourraient interagir avec le domaine C-terminal de CD81 (Sala-Valdés *et al.*, 2006 ; Tejera *et al.*, 2013), suggérant une potentielle relation entre les tétraspanines et le cytosquelette.

## **4- Fonction des tétraspanines: de la physiologie à la régulation des protéines partenaires**

### **4.1- Enseignement des maladies génétiques et des souris knock-out**

Le rôle fondamental des tétraspanines est soutenu par certains phénotypes marquants qui ont été observés lors de déficience des tétraspanines chez l'homme, la souris, la drosophile, le nématode, les champignons et les plantes. Chez l'homme, des mutations de la tétraspanine spécifique de la rétine, péripherine/RDS, entraînent la dégénérescence rétinienne menant à la cécité résultante de la désorganisation des segments extérieurs, qui sont les régions photosensibles des cellules de la rétine, les bâtonnets et les cônes (Goldberg, 2006). La mutation de la tétraspanine Tspan12 conduit également à la perte de la vision, une maladie appelée vitréorétinopathie exsudative familiale, due à un défaut de la vascularisation rétinienne (Nikopoulos *et al.*, 2010 ; Poulter *et al.*, 2010).

De plus, une mutation de la tétraspanine CD151 conduit à des problèmes cliniques graves, telle qu'une insuffisance rénale et une maladie de la peau formant des cloques, connue sous le nom d'épidermolyse bulleuse pré-tibiale, probablement due à un défaut d'adhérence des cellules épithéliales (Karamatic *et al.*, 2004). D'autre part, la mutation du CD81 provoque un syndrome de déficit immunitaire due à une altération de l'activation des récepteurs des cellules B (van Zelm *et al.*, 2010).

Plusieurs tétraspanines ont été délétées expérimentalement chez la souris. Il existe neuf souris Knock-out pour des tétraspanines : CD9, CD81, CD37, TSSC6, CD151, Tspan33, CD63, Tspan8 et Tspan12 (tableau 4). Les phénotypes des souris déficientes pour périphérine/RDS (Goldberg, 2006), Tspan12 (Junge *et al.*, 2009), CD151 (Baleato *et al.*, 2008 ; Sachs *et al.*, 2006) et CD81 (Levy et Shoham, 2005) sont compatibles avec ceux des maladies humaines, avec des phénotypes supplémentaires observées chez les souris déficientes en CD151 tels qu'un défaut dans l'angiogenèse pathologique (Takeda *et al.*, 2007). Les résultats des différents knock-outs des tétraspanines affichent des phénotypes communs représentant l'un des nombreux indices suggérant que certaines tétraspanines coopèrent dans certaines fonctions.

Malgré ces phénotypes intéressants, les travaux avec les souris knock-out pour les tétraspanines n'ont pas révélés leurs fonctions au niveau moléculaire. En effet, les mécanismes responsables de la plupart des phénotypes observés ne sont pas clairs. De plus, il existe de nombreux cas pour lesquels la suppression de la tétraspanine a donné des phénotypes qui sont soit très faibles ou non détectables. Par exemple dans la souris KO pour CD9, une tétraspanine qui est relativement exprimée dans un large éventail de types cellulaires. A l'exception d'un défaut dans la fusion spermatozoïde-ovocyte (Kaji *et al.*, 2000 ; Le Naour *et al.*, 2000 ; Miyado *et al.*, 2000), et des défauts des jonctions paranodales des fibres myélinisées (site d'ancrage et lieu d'interactions) et également une fusion accrue des monocytes (Ishibashi *et al.*, 2004 ; Takeda *et al.*, 2003), et des myoblastes (Charrin *et al.*, 2013) les souris déficientes pour CD9 apparaissent normales.

| Nom             | Systèmes affectés                                 | Phénotype   | Référence   |
|-----------------|---|---|---|
| CD151           | immunitaire, rénal                                | augmentation de la prolifération des cellules-T, défaut dans l'angiogenèse pathologique, morphologie et fonction rénale anormales   | (Takeda et al., 2007b; Wright et al., 2004b; Sachs et al., 2006)                              |
| CD37            | immunitaire                                       | perturbation de la réponse immunitaire  | (Knobeloch et al., 2000)  |
| CD63            | rénal, métabolisme                                | défaut dans le métabolisme de l'eau (polydipsie et polyurie), homéostasie urinaire anormale   | (Schröder et al., 2009)   |
| CD81            | hématopoïétique, immunitaire, nerveux, musculaire | défauts dans la réponse immunitaire et la fusion des gamètes, anomalies dans l'organisation de structures cérébrales, augmentation de la fusion des monocytes, augmentation de la fusion des myoblastes | (Miyazaki et al., 1997; Maecker and Levy, 1997; Tsitsikov et al., 1997; Charrin et al., 2013) |
| CD9             | reproduction, hématopoïétique, musculaire         | défauts dans la fusion des gamètes, augmentation de la fusion des monocytes, augmentation de la fusion des myoblastes   | (Le Naour et al., 2000; Kaji et al., 2000; Miyado et al., 2000; Charrin et al., 2013)         |
| périphérine/RDS | vision  | dégénérescence de la rétine (anomalies et diminution du nombre de photorécepteurs et de batonnets)  | (McNally et al., 2002)  |
| Rom1            | vision  | lente dégénérescence de la rétine avec morphologie anormale des batonnets   | (Clarke et al., 2000)   |
| Tspan12         | cardiovasculaire, vision                          | vascularisation anormale de la rétine avec des hémorragies et des microanévrismes de la rétine  | (Junge et al., 2009)  |
| Tspan32         | immunitaire                                       | augmentation de la prolifération des cellules T   | (Tarrant et al., 2002)  |
| Tspan33         | hématopoïétique, immunitaire                      | anémie, splénomégalie, réticulocytose   | (Heikens et al., 2007)  |

**Tableau 4:** Résumé des principaux défauts observés dans les souris KO pour les tétraspanines

## 4.2- La compartimentation membranaire

Il est important de noter que les tétraspanines ne possèdent pas de ligand ou de capacité interne à transduire un signal, en revanche, elles interagissent avec un certain nombre de molécules partenaires à l'intérieur du réseau de tétraspanines. La dissection biochimique de ce réseau à défaut d'autres résultats a conduit à l'hypothèse de l'implication des tétraspanines dans la compartimentation membranaire. Par exemple, le rôle des tétraspanines CD9/CD81 consiste à inciter la fusion des gamètes (Rubinstein *et al.*, 2006). Les tétraspanines sont impliquées dans une variété de fonctions cellulaires mises en évidence par des études qui ont utilisées les souris Knock-Out, l'ARN interférence, la surexpression, des anticorps anti-tétraspanine et/ou la mutation des régions extracellulaires, mais peu d'études ont identifiées les mécanismes fonctionnels des tétraspanines. Cependant, des mécanismes fonctionnels spécifiques émergent, dans certains cas il est possible de relier le rôle physiologique des tétraspanines avec le rôle de leurs protéines partenaires. Pour d'autres il n'y a pas encore d'explications moléculaires c'est le cas notamment du rôle de CD81/CD9 dans la fusion des gamètes ou du rôle de CD81/CD37 dans l'immunité. Les données les plus récentes restent

cohérentes avec l'hypothèse selon laquelle elles fonctionnent comme des organisateurs de complexes protéiques à la membrane cellulaire par la formation d'un réseau de tétraspanines.

### **4.3- Les tétraspanines régulent le trafic de leurs protéines partenaires**

Il y existe quelques exemples où la fonction principale d'une tétraspanine est de contrôler le trafic de sa protéine partenaire. Par exemple, une fonction clé de la tétraspanine CD63 pourrait être de faciliter l'internalisation des protéines partenaires et/ou leur adressage vers les endosomes tardifs/lysosomes, ce qui est compatible avec la présence du motif d'internalisation de type tyrosine chez CD63 (Pols et Klumperman, 2009). Les protéines dont le trafic semble être régulé par CD63 comprennent la protéine partenaire synaptotagmine VII, une protéine qui régule l'exocytose des lysosomes et la réparation de la membrane (Flannery *et al.*, 2010), également le CXCR4 co-récepteurs de CXCL12 (SDF-1, *stromal cell-derived factor 1*) et du VIH (Yoshida *et al.*, 2008) ; la sous-unité  $\beta$  de la pompe à protons  $H^+K^+$ -ATPase (Codina *et al.*, 2005; Duffield *et al.*, 2003) et PMEL17 (également connu sous le nom PMEL), qui est impliqué dans la mélanogénèse, (van Niel *et al.*, 2011). La tétraspanine CD63 induit également la relocalisation de la pompe à protons  $H^+K^+$ -ATPase gastrique dans un compartiment intracellulaire CD63 positif (Duffield *et al.*, 2003).

La tétraspanine de drosophile Sunglasses (Tsp42Ej) est un autre exemple de tétraspanine régulant le trafic d'une protéine partenaire de la membrane plasmique. Principalement exprimée dans les yeux, et enrichie dans les lysosomes, elle s'associe avec la rhodopsine (un récepteur couplé aux protéines-G), et régule son trafic vers les lysosomes pour sa dégradation. L'altération de ce processus dans les mouches déficientes en tétraspanine Sunglasses mène à une dégénérescence rétinienne liée à l'âge (Xu *et al.*, 2004).

### **4.4- Régulation fonctionnelle des complexes multimoléculaires à la membrane plasmique**

Les tétraspanines régulent la fonction d'un large éventail de protéines membranaires. Deux études récentes combinant des analyses biochimiques et génétiques ont mis en évidence la capacité des tétraspanines à réguler la fonction de complexes oligomériques sans influence apparente sur le trafic de leur partenaire.

La première étude a montré que la tétraspanine TSP-15 chez *C. elegans* joue un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'épiderme et dans la formation de la cuticule, l'exosquelette du nématode (Moribe *et al.*, 2004).

Après une sélection de mutants avec des phénotypes similaires à TSP-15, les mêmes auteurs ont démontré que cette tétraspanine régule la voie DUOX (dual oxidase) qui joue un rôle clé dans le processus de réticulation du collagène à travers les résidus tyrosyl et donc dans l'intégrité de la cuticule (Moribe *et al.*, 2012). Dans cette voie, la protéine intégrale BLI-3, une NADPH oxydase (membre de la famille NOX/DUOX, orthologue de DUOX1 chez les mammifères) génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) requis pour la réticulation de la tyrosine, qui nécessite une interaction avec DOXA-1. La tétraspanine TSP-15 associée à la fois avec BLI-3 et DOXA-1, est essentielle pour la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> régulée par BLI-3, mais elle ne régule pas l'expression de surface de BLI-3 ni l'association de BLI-3 avec DOXA-1.

Dans le deuxième exemple, l'absence de Tspan12 a été mise en évidence dans un crible génétique chez la souris pour causer des malformations vasculaires rétiniennes (Junge *et al.*, 2009). Ce phénotype est similaire à ceux rapportés après la perturbation des gènes NORRIN, FZD4 et LRP5 (Ye *et al.*, 2010). Chez l'homme, des mutations dans ces trois gènes et des mutations dans Tspan12 provoquent la vitréorétinopathie exsudative familiale (FEVR), une maladie héréditaire caractérisée par un arrêt prématuré de la vascularisation de la rétine (Nikopoulos *et al.*, 2010; Poulter *et al.*, 2010). Norrin est un activateur atypique de la voie de signalisation  $\beta$ -caténine à travers sa liaison spécifique au récepteur Frizzled-4 et au corécepteur LRP5 (*Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5*). Ainsi Tspan12, (mais pas d'autres tétraspanines) augmente la voie de signalisation  $\beta$ -caténine en réponse à Norrin en favorisant la multimérisation de son complexe de récepteurs, FZD4 et LRP5 (Junge *et al.*, 2009.)

#### **4.5- La régulation de la fonction des intégrines par CD151 et d'autres tétraspanines est importante dans l'adhérence**

Les tétraspanines sont connues depuis longtemps pour s'associer à une variété d'intégrines (récepteurs de la matrice extracellulaire). Parmi celles-ci, les intégrines liant la laminine (dimères contenant les sous-unités  $\alpha 3$  et/ou  $\alpha 6$ )  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$  s'associent directement avec la tétraspanine CD151 (Serru *et al.*, 1999; Yauch *et al.*, 1998). De façon générale, CD151 n'affecte que très peu l'adhérence ou la distribution des protéines de la matrice auxquelles ces intégrines se lient. Il a été démontré que CD151 régule l'activation de plusieurs molécules de signalisation en aval de ces intégrines dont Akt, Src, la kinase de l'adhérence focale (FAK), p130CAS (également connu sous le nom BCAR1), la paxilline et les GTPases de la famille Rho (Hong *et al.*, 2012; Takeda *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2008; Yang *et al.*,

2008). Fait important, aucune de ces molécules ne voit son activation modifiée de façon systématique en absence de CD151 dans toutes les études publiées à ce jour. Cela indique que l'effet de CD151 en aval de la signalisation des intégrines dépend du contexte cellulaire, et que CD151 ne fonctionne pas comme une molécule adaptatrice pour une voie de signalisation particulière. Il n'existe aucune indication que la tétraspanine CD151 pourrait réguler la liaison des laminines solubles aux intégrines. En revanche, plusieurs études suggèrent un rôle de CD151 dans le phénomène de renforcement de l'adhérence (Lammerding *et al.*, 2003; Nishiuchi *et al.*, 2005; Sachs *et al.*, 2012), un processus dynamique qui accompagne l'adhérence initiale (régulée par les intégrines) et dépend des regroupements des récepteurs, des interactions avec le cytosquelette et de l'activation des molécules de signalisation (Puklin-Faucher et Sheetz, 2009).

La perte de CD151 a un effet important *in vivo*, à la fois chez la souris et l'homme, et présente des phénotypes rappelant ceux dus aux déficiences en intégrines liant la laminine. En effet, des mutations dans le gène de CD151 ont été décrites chez trois patients présentant un syndrome néphrotique évoluant vers l'insuffisance rénale (Karamatic *et al.*, 2004). Deux d'entre eux présentent plusieurs autres symptômes, y compris des lésions bulleuses pré-tibiales de la peau. L'insuffisance rénale a également été observée dans les souris knock-out CD151 (au patrimoine génétique particulier), et a été associée à une glomérulosclérose, et à des défauts ultra-structuraux des podocytes et de la membrane basale glomérulaire (Baleato *et al.*, 2008; Sachs *et al.*, 2006). La délétion de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans les podocytes (cellules épithéliales différenciées et ramifiées composant le feuillet viscéral de la capsule de Bowman, au niveau du glomérule rénal) provoque un phénotype similaire (Sachs *et al.*, 2012). Les anomalies que l'on observe en l'absence de CD151 s'aggravent avec l'âge et sont influencées par la pression sanguine, ce qui est compatible avec un défaut dans le renforcement de l'adhérence dans les podocytes (Sachs *et al.*, 2012).

La tétraspanine CD151 peut également réguler le renforcement de l'adhérence accompagnant l'engagement du récepteur du fibrinogène des plaquettes, de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  (Lau *et al.*, 2004). Les tétraspanines CD81 et CD37 régulent l'adhérence des cellules lymphoïdes B aux ligands de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  (Feigelson *et al.*, 2003 ; van Spriel *et al.*, 2012). Dans le cas de CD37, il a été démontré que ce phénomène est associé à un changement dans la répartition membranaire de l'intégrine.

#### **4.6- CD9 et CD81 dans la fusion cellule-cellule et d'autres processus: un exemple de coopération entre deux tétraspanines**

Les tétraspanines CD9 et CD81 sont étroitement associées, elles partageant 45% d'identité et deux protéines partenaires communes : les deux molécules à domaine Immunoglobuline EWI-F/CD9P-1 et EWI-2 (également connu sous le nom IGSF8) (Charrin *et al.*, 2003a; Charrin *et al.*, 2001; Stipp *et al.*, 2001a; Stipp *et al.*, 2001b). Ces deux tétraspanines pourraient réguler plusieurs processus de fusion membranaire. Des expériences montrent que les ovocytes de souris qui n'ont pas de CD9 sont hautement déficients dans leur capacité à fusionner avec les spermatozoïdes (Kaji *et al.*, 2000; Le Naour *et al.*, 2000; Miyado *et al.*, 2000), ce défaut est atténué par l'expression de CD81 (Kaji *et al.*, 2002; Rubinstein *et al.*, 2006). La forme des microvillosités des ovocytes est également modifiée en l'absence de CD9 (Runge *et al.*, 2007). En outre, CD9 et CD81 coopèrent dans la fusion des macrophages et dans la fusion des cellules musculaires, mais en tant que régulateurs négatifs de ces procédés (Takeda *et al.*, 2003 ; Charrin *et al.*, 2013). L'augmentation de la fusion des cellules musculaires observée en leur absence peut être reproduit par des expériences d'extinction de CD9P1 par interférence par ARN (ARNi), montrant à nouveau l'importance des molécules associées aux tétraspanines (Charrin *et al.*, 2013). Enfin, les souris inactivées à la fois pour CD9 et CD81 présentent également un certain nombre de pathologies qui ne sont pas, ou seulement très peu, observées chez les souris mutées pour une seule de ces tétraspanines, telles qu'un emphysème pulmonaire (une composante pathologique majeure de la maladie pulmonaire obstructive chronique) (Takeda *et al.*, 2008), une ostéopénie (Takeda *et al.*, 2008) ou des défauts de vaisseaux sanguins et lymphatiques (Iwasaki *et al.*, 2013).

#### **4.7- Les tétraspanines régulent la réponse immunitaire**

Il a récemment été démontré qu'une mutation de la tétraspanine CD81 serait la cause de l'immunodéficience d'un enfant présentant une réponse humorale défectueuse (van Zelm *et al.*, 2010). Cette mutation entraîne une forte diminution des niveaux de CD19 à la surface cellulaire, une molécule de co-stimulation indispensable aux cellules lymphoïdes B et un partenaire de CD81 bien caractérisé. L'absence de CD81 chez la souris a un effet plus faible sur l'expression de CD19, et en conséquence pas de forte altération de l'activation des lymphocytes B (Levy, 2014). Néanmoins, des études utilisant des souris knock-out CD81 ont montré un rôle crucial de CD81 dans les interactions des cellules B avec des cellules T conduisant à une réponse « Th2 » (orientée vers une réponse humorale), (Levy, 2014). CD81 s'accumule à la synapse immunologique au cours des interactions des cellules B avec les

lymphocytes T, et régule la maturation de la synapse, engendrant une signalisation défectueuse dans les cellules T (Rocha-Perugini *et al.*, 2013).

La tétraspanine CD81 est connue depuis longtemps pour induire, comme d'autres tétraspanines, un signal de co-stimulation lorsqu'elle est ciblée par des anticorps monoclonaux (Boucheix et Rubinstein, 2001; Levy, 2014) ou par la glycoprotéine E2 de l'enveloppe du virus de l'hépatite C (Wack *et al.*, 2001). De plus, les lymphocytes T des souris knock-out CD81 sont hyper-prolifératifs *in vitro*, de façon similaire aux cellules T dépourvues de tétraspanines CD37, CD151 ou TSSC6 (Jones *et al.*, 2011). L'explication la plus simple de l'effet de co-stimulation commun est que les anticorps induisent une activation semblable d'une ou plusieurs molécules du réseau de tétraspanines ayant une activité de co-stimulation pour les lymphocytes T. L'hyper-prolifération des cellules T en l'absence de tétraspanines pourrait souligner l'importance de la stoechiométrie des différents tétraspanines et/ou des complexes primaires au sein du réseau de tétraspanines.

Contrairement à la tétraspanine CD81 qui est largement exprimée, l'expression de CD37 est limitée aux cellules du système immunitaire, et est plus abondante dans les lymphocytes B. La tétraspanine CD37 joue un rôle dans de nombreux aspects de la réponse immunitaire (Jones *et al.*, 2011; van Spriël, 2011). Il a été démontré que les souris knock-out CD37 ont une production d'anticorps IgG1 altérée en réponse aux antigènes dépendants des lymphocytes T. Cette altération a été attribuée à un rôle essentiel de CD37. La tétraspanine CD37 à la membrane des cellules B (secrétant des anticorps à longue durée de vie) contrôle étroitement la voie de signalisation de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ /AKT responsable de la survie cellulaire. En absence de CD37 le regroupement au sein de la membrane plasmique de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  est altéré entraînant un défaut de la voie signalisation *AKT* et donc un défaut fonctionnel des cellules (van Spriël *et al.*, 2012).

#### **4.8- Les tétraspanines dans les maladies infectieuses**

La tétraspanine CD81 joue un rôle spécifique dans deux maladies humaines majeures. Elle est essentielle pour l'entrée du parasite du paludisme dans les hépatocytes, la première étape du cycle de vie du *Plasmodium* chez les mammifères et est un récepteur essentiel pour la protéine d'enveloppe E2 du virus de l'hépatite C (Dubuisson *et al.*, 2008; Silvie *et al.*, 2003). L'interaction de CD81 avec la protéine claudine, un autre facteur d'entrée, peut jouer un rôle clé dans l'infection par le VHC (Harris *et al.*, 2008). De façon intéressante, la capacité de la tétraspanine CD81 à contribuer à ces processus infectieux est régulée négativement par

CD9P-1 (*Plasmodium*), ou par un fragment de clivage d'EWI-2 (VHC), (Charrin *et al.*, 2009b; Rocha-Perugini *et al.*, 2008).

La tétraspanine CD81 et d'autres tétraspanines participeraient à d'autres processus viraux (virus de l'immunodéficience humaine (VIH), virus de la maladie de Carré (CDV), virus de l'immunodéficience féline (FIV) ...) et à des infections bactériennes (*Listeria*, *N.Meningitidis*, ...), (Monk et Partridge, 2012). Les tétraspanines sont recrutées sur le site de bourgeonnement du VIH (Krementsov *et al.*, 2010) qui intègre plusieurs tétraspanines (Monk et Partridge, 2012), et la présence de tétraspanines sur les sites de sortie et dans les particules virales inhibe dans une certaine mesure la fusion membranaire induite par le virus (Gordón-Alonso *et al.*, 2006; Krementsov *et al.*, 2009). Récemment les tétraspanines CD81 et Tspan9 ont été identifiées dans un criblage fonctionnel par ARN interférence à l'échelle du génome, comme des facteurs de l'hôte régulant respectivement les étapes précoces de virus de la grippe et des infections par les alphavirus (Karlak *et al.*, 2010; König *et al.*, 2010; Ooi *et al.*, 2013). Elles pourraient réguler la fusion virale dans les endosomes (He *et al.*, 2013; Ooi *et al.*, 2013). La tétraspanine CD151 pourrait contribuer à l'endocytose du papillomavirus HPV16, responsable de cancers du col utérin (Scheffer *et al.*, 2013). Cette fonction de CD151 nécessite l'interaction avec les intégrines (l'intégrine  $\alpha 6$  a été identifiée auparavant comme un récepteur pour le papillomavirus humain (HPV) et la palmitoylation de ses cystéines juxtamembranaires et donc probablement des interactions avec d'autres tétraspanines. Il faut noter que l'entrée de HPV16 dans les cellules est indépendante de la clathrine, de la cavéoline, de la dynamine et des radeaux lipidiques.

#### **4.9- Les tétraspanines régulent la progression du cancer: rôles des intégrines, des protéases et des récepteurs de facteurs de croissance**

La faible expression des tétraspanines CD9 et CD82 a été régulièrement associée à un mauvais pronostic et/ou à la présence des métastases dans divers cancers, dont ceux du poumon, du sein et de la prostate (Hemler, 2014; Romanska et Berditchevski, 2011; Zoller, 2009). En revanche, un haut niveau d'expression des tétraspanines CD151 ou Tspan8 dans les tumeurs est corrélé avec un mauvais pronostic. Ces résultats sont cohérents avec plusieurs études qui suggèrent que CD9 et CD82 sont des suppresseurs de métastases, alors que CD151 et/ou Tspan8 favorisent leur développement (Hemler, 2014; Romanska et Berditchevski, 2011; Zoller, 2009). Cela a récemment été validé par l'utilisation des modèles génétiques de cancer du sein (CD151) et de cancer la prostate (CD9 et CD151) (Copelet *et al.*, 2013a; Copelet *et al.*, 2013b; Deng *et al.*, 2012).

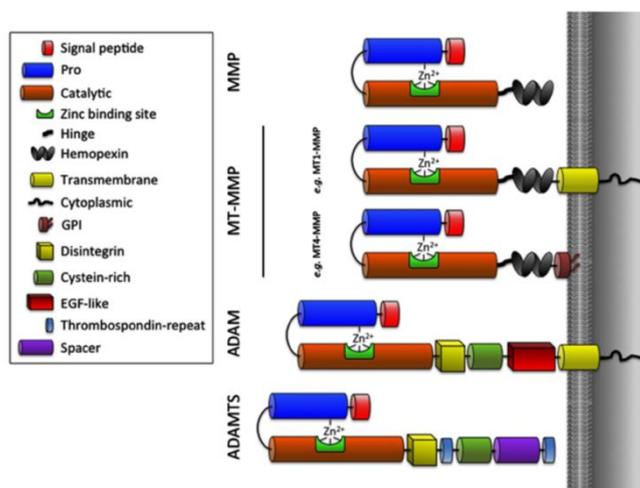
Dans plusieurs études, les changements des niveaux d'expression de plusieurs tétraspanines n'ont pas modifiés la croissance des xénogreffes (Hemler, 2014; Romanska et Berditchevski, 2011; Zoller, 2009), au contraire l'absence de CD151 a réduit la croissance des xénogreffes de lignées cellulaires de cancer du sein (Sadej *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008). Cependant, la suppression de CD151 chez la souris, dans le modèle MMTV-ERB2 de cancer du sein, retarde l'apparition de tumeurs mais la croissance des tumeurs est très peu affectée (Deng *et al.*, 2012). La phosphorylation de FAK est réduite dans ces tumeurs, suggérant un défaut potentiel dans la voie de signalisation en aval des intégrines. De plus, la suppression de CD151 dans des souris, induit une sensibilité réduite à la carcinogenèse de la peau, et cela pourrait être lié à sa capacité à réguler les intégrines  $\alpha6\beta4$  ou  $\alpha3\beta1$  (Li *et al.*, 2013; Sachs *et al.*, 2014).

Il existe plusieurs mécanismes potentiels à travers lesquels les tétraspanines peuvent réguler la progression du cancer. Au départ, cela était lié à l'interaction des tétraspanines avec les intégrines, et leurs capacités à réguler la migration cellulaire et/ou l'invasion *in vitro* (Boucheix et Rubinstein, 2001; Hemler, 2014; Zoller, 2009). Une autre explication réside dans leur capacité à s'associer avec et/ou réguler les précurseurs de facteurs de croissance tels que TGF $\alpha$  ou HB-EGF (Higashiyama *et al.*, 1995 ; Imhof *et al.*, 2008) ou aux protéases membranaires (ADAM10, ADAM17, MT-MMP1, l'activateur du plasminogène de type urokinase, (Arduise *et al.*, 2008 ; Bass *et al.*, 2005 ; Danglot *et al.*, 2010; Gutiérrez-López *et al.*, 2011; Lafleur *et al.*, 2009; Shiomi *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2009; Yañez-Mó *et al.*, 2008). Plusieurs tétraspanines, en particulier CD9, CD82 et CD151 sont associées avec et/ou modulent en aval la voie de signalisation des récepteurs tyrosine-kinase tels que les récepteurs EGFR, ErbB2 et/ou c-MET (Franco *et al.*, 2010; Murayama *et al.*, 2008; Novitskaya *et al.*, 2014; Odintsova *et al.*, 2003; Sridhar et Miranti, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). A ce jour, il n'y a aucune preuve qu'une tétraspanine particulière s'associe directement avec ces récepteurs. En revanche plusieurs données expérimentales indiquent que les mécanismes sous-jacents, au moins pour CD82, pourraient être indirects (Odintsova *et al.*, 2006). L'effet de CD151 sur ces récepteurs pourrait être la conséquence d'un couplage fonctionnel ou physique avec les intégrines liant la laminine (Franco *et al.*, 2010; Novitskaya *et al.*, 2014).

# La famille ADAM et la métalloprotéase ADAM10

Les métalloprotéases de la famille ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease domain), sont des protéines transmembranaires (type 1) qui clivent les parties extracellulaires des protéines transmembranaires ciblées et qui provoquent donc la libération de leurs ectodomains. Elles sont qualifiées sous le terme anglophone de « sheddases » et le mécanisme est communément appelé le « shedding ». Les ADAMs sont impliquées dans la libération protéolytique des protéines liées à la surface des cellules (RIP : Regulated Intramembrane Proteolysis), processus par lequel elles régulent le clivage de l'ectodomaine de divers substrats ce qui affecte la fonctionnalité de nombreuses protéines telles que des récepteurs, des molécules d'adhérences, des facteurs de croissance et des cytokines comme le TNF-alpha (Rosendahl *et al.*, 1997; Lunn *et al.*, 1997 ; Hikita *et al.*, 2009; Mezyk-Kopeć *et al.*, 2009).

Les métalloprotéases constituent une grande famille de protéases dont l'activité catalytique est dépendante d'un ion métallique (notamment l'ion zinc, ou l'ion cuivre, manganèse, etc). Elles possèdent également dans le site actif une méthionine caractéristique, strictement conservée formant le « Met-turn » d'où le nom de metzincine. Ces zinc-métalloprotéases ou super-famille des Metzincines, sont exprimées de façon ubiquitaire (Bodé *et al.*, 1993, Tallant *et al.*, 2010). Cette famille regroupe : les métalloprotéases matricielles (MMPs), les métalloprotéases à domaine désintégrine et métalloprotéase (ADAMs), les ADAMs protéases avec des motifs de thrombospondine (ADAMTSs), la serralysine bactérienne et des protéases comme l'astacine (y compris les meprines). Je développerais ici uniquement les métalloprotéases avec un domaine de type désintégrine, les protéines ADAMs représentées sur la figure 13.



**Figure 13:** Représentation schématique des domaines structuraux des Metzincines. D'après Noël *et al.*, 2012.

## 1- La famille ADAM : origine

Ce sont des glycoprotéines transmembranaires multifonctionnelles d'environ 750-800 acides aminés. Elles ont été découvertes dans les années 1990 lors de travaux portant sur la fécondation. Le fertiline (appartenant à la famille des protéines ADAMs) est synthétisée dans les testicules sous forme de précurseur mais nécessite un clivage protéolytique de son domaine métalloprotéase (dans l'épidyme) libérant ainsi le site désintégrine qui devient fonctionnel. Cette protéine serait impliquée dans la liaison à la membrane plasmique via les intégrines de l'ovocyte (Blobel *et al.*, 1992). Quelques années plus tard, des études concernant les venins de certains serpents, mettent en évidence des protéines possédant un domaine protéolytique et un domaine de liaison aux intégrines, les SVMPs (Snake Venom MetalloProtease), (Wolfsberg *et al.*, 1995). Ces travaux sont à l'origine de leur appellation : protéines à domaine Désintégrine et domaine Métalloprotéase, (ADAMs).

Plus de trente-cinq ADAMs différentes ont été identifiées dans une variété d'espèces allant des champignons filamenteux, en passant par la levure (*S. pombe*), le nématode (*C.elegans*), la drosophile (*D.melanogaster*), aux vertébrés (Huxley-Jones *et al.*, 2007 ; Edwards *et al.*, 2008 ; Reiss et Saftig, 2009). En revanche, elles sont absentes chez la levure *S. cerevisiae* et chez les plantes. Dans le génome humain, vingt-et-une ADAMs ont été décrites, chez les souris trente-sept protéases ont été identifiées, beaucoup d'entre-elles sont exprimées spécifiquement dans les testicules. La moitié d'entre elles, ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30 et 33 ont une activité protéolytique (c'est-à-dire un domaine métalloprotéase actif). Parmi ces ADAMs protéolytiques ADAM10 et ADAM17 sont les plus étudiées. Leur rôle est essentiel pour activer ou inhiber une grande variété de voies de signalisation (Bode *et al.*, 1993).

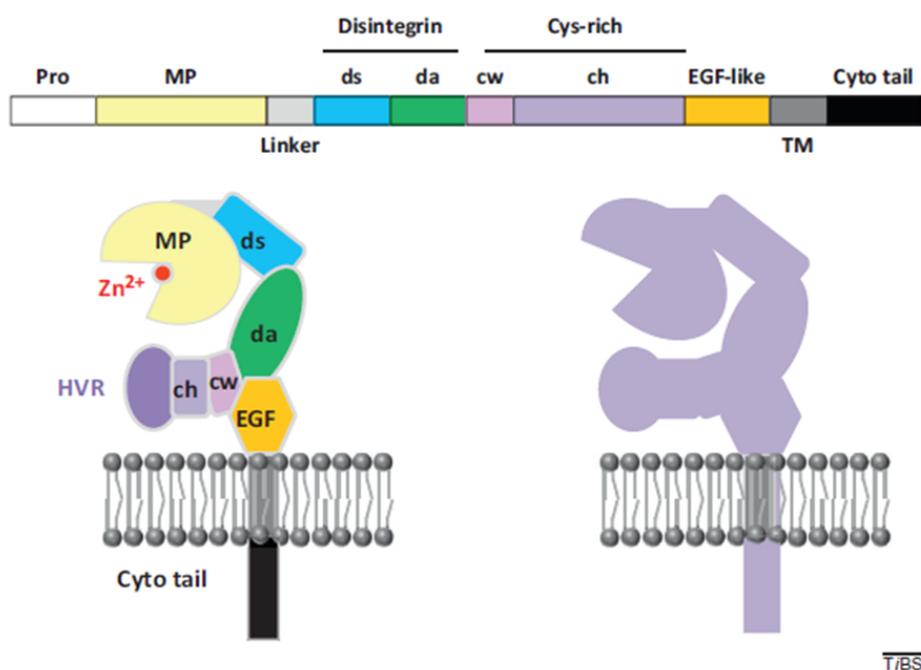
## 2- La famille ADAM : localisation

Les ADAMs sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux et la forme mature est obtenue après leur passage dans l'appareil de Golgi (Lum *et al.*, 1998; Roghani *et al.*, 1999; Hougaard *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2002). La majeure partie des protéines ADAMs réside dans une région périnucléaire, certaines co-localisant avec des marqueurs du Golgi (Lum *et al.*, 1998 ; Lammich *et al.*, 1999 ; Hougaard *et al.*, 2000 ; Kang *et al.*, 2002 ; Edwards *et al.*, 2008). Dans de nombreux cas (par exemple : ADAMs 9, 10, 15, 17 et 28), la forme protéique à la surface cellulaire est catalytiquement active (Black *et al.*, 1997; Lum *et al.*, 1998; Lammich *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2000; Schlondorff *et al.*, 2000). Toutefois, certains membres de la famille ADAMs peuvent être actifs dans le compartiment

intracellulaire. Par exemple, la plupart des protéines matures ADAM15 résiste au traitement de la trypsine, indiquant une prédominance intracellulaire de la protéine (Lum *et al.*, 1998 ; Howard *et al.*, 2000). Pour d'autres (ADAMs 10, 17 et 19), l'activité de la métalloprotéase peut intervenir dans les compartiments intracellulaires (Skovronsky *et al.*, 2000 ; Shirakabe *et al.*, 2001). Les différentes localisations subcellulaires des ADAMs et la variabilité de leur activité et dépendante du type de cellule, du types d'ADAMs et du type de substrat impliqué.

### 3- La famille ADAM : structures et fonctions des domaines

Les protéines ADAMs possèdent plusieurs domaines protéiques fonctionnels. Un pro-domaine permettant de maintenir le précurseur sous forme inactive. Un domaine métalloprotéase (maturation de récepteurs et de facteurs de signalisation et dégradation de la matrice extracellulaire. Un domaine désintégrine (adhérences cellulaires). Un domaine riche en cystéines. Chez certaines ADAM, un domaine EGF-like. Un domaine transmembranaire. Enfin, un domaine cytoplasmique (Seals et Courtneige, 2003). Afin d'éclaircir les différentes fonctions relatives des ADAMs je vais reprendre en détail chaque domaine protéique (figure 14)



**Figure 14:** Représentation schématique de la disposition des domaines modulaires des ADAMs et de leur agencement potentiel.

Le pro-domaine (PRO), le domaine métalloprotéase (MP), Le domaine désintégrine (DISINTEGRIN) est subdivisé en deux sous-domaines, le domaine « shoulder » (Ds) et le domaine « arm » (Da). Le domaine riche en cystéines (CYS-RICH) est aussi subdivisé en deux sous-domaines, le domaine « wrist » (Cw) et le domaine « hand » (Ch). Les domaines Ds, Da et Cw façonnent la molécule dans son ensemble et prend la forme d'un « C » avec une partie du domaine riche en cystéine en contact étroit avec le site catalytique du domaine de métalloprotéase. Le domaine EGF (EGF-LIKE). Le domaine cytoplasmique (CYTO TAIL) D'après Takeda *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2013.

### 3.1- Le Prodomaine

L'extrémité N-terminale des ADAMs contient une séquence signal qui dirige les protéines dans la voie de sécrétion. Après la synthèse protéique et la translocation dans le réticulum endoplasmique les ADAMs sont sous forme de précurseur protéique latent (non actif). Il a été montré pour certaines des protéases ADAMs que le pro-domaine joue un rôle dans leur maturation en maintenant le site métalloprotéase inactif, via une cystéine conservée (Loechel *et al.*, 1999 ; Milla *et al.*, 1999). Ce résidu cystéine chélate l'ion zinc présent dans le site actif du domaine métalloprotéase, qui est ainsi séquestré dans une conformation qui le maintient à l'état inactif. Ainsi, la dissociation de la cystéine de l'atome de zinc est considérée comme le « switch » qui conduit à l'activation du domaine métalloprotéase. Le mécanisme de « cystéine-switch » est commun à la famille MMPs (Sahin, 2004 ; Edwards, 2008), et n'est pas le seul impliqué dans l'inhibition des ADAMs.

Pour la majorité des ADAMs, l'étape essentielle pour la suppression du pro-domaine, et donc l'activation du zymogène, est le traitement protéolytique par des pro-protéines convertases (PCs) tels que la furine ou la PC7 dans le réseau trans-Golgien. Les ADAMs passent ensuite dans la voie sécrétoire : le réseau trans-Golgien, les endosomes et la surface cellulaire (Endres *et al.*, 2003 ; Seals et Courtneidge, 2003). L'exécution du clivage du pro-domaine par la furine dépend de la reconnaissance du motif de quatre acides aminés: Rx (K/R) R, (Nakayama, 1997 ; Tian *et al.*, 2012).

Le passage des ADAMs dans l'appareil de Golgi révèle donc une protéine mature. Une fois les protéines ADAMs glycosylées, le pro-domaine est clivé du précurseur le libérant efficacement, l'ion zinc est accessible rendant le domaine métalloprotéase disponible pour l'activité catalytique.

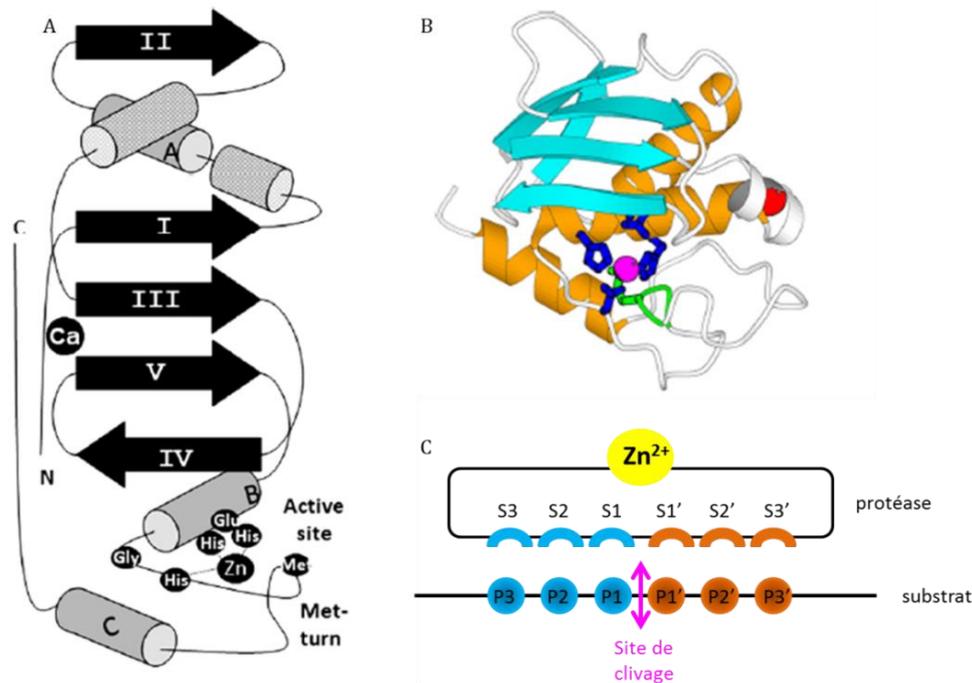
Le pro-domaine de certaines ADAMs peut agir comme un chaperon intramoléculaire facilitant le repliement correct des protéines et particulièrement du domaine métalloprotéase et maintenir ainsi la protéine dans un état latent. Les pro-domaines isolés de certaines ADAMs peuvent être des inhibiteurs sélectifs de la forme mature (et donc active) des enzymes (Moss *et al.*, 2007; Gonzales *et al.*, 2004). L'importance de la fonction du pro-domaine comme chaperon est soulignée par des études montrant que la délétion du pro-domaine chez ADAM10 entraîne une enzyme protéolytiquement inactive. Alors que la co-expression en trans du pro-domaine avec une protéine ADAM10 déletée de son pro-domaine restaure l'activité enzymatique (Milla *et al.*, 1999 ; Eters *et al.*, 2001). De plus, une autre étude sur ADAM12 met en évidence qu'une protéine ADAM12 tronquée de son pro-domaine (ADAM12-S) à la différence des protéines de type sauvage, n'est pas sécrétée à la membrane, mais est retenue dans le système endomembranaire (Loechel *et al.*, 1999).

C'est également le cas pour les ADAMs 9, 17 et 19 (Roghani *et al.*, 1999 ; Kang *et al.*, 2002 ; Milla *et al.*, 2006). Il apparaît donc que le pro-domaine est nécessaire pour le maintien à l'état inactif de ces enzymes, il participe au repliement adéquat des ADAMs et à l'activité du site protéolytique permettant un trafic correct des ADAMs tout au long de la voie de sécrétion.

### **3.2- Le domaine métalloprotéase**

Le domaine métalloprotéase est très conservé parmi les membres de la famille ADAMs. Le mécanisme de l'activité protéolytique est certainement le mieux étudié des fonctions des protéines ADAMs, et est hautement homologue à celui des métalloprotéases matricielles (MMP), (Turk *et al.*, 2001). L'analyse cristallographique des domaines métalloprotéases et des domaines catalytiques des ADAM 8, ADAM17 et ADAM33 a révélée un motif conservé de liaison au zinc avec trois résidus histidine et une méthionine formant le « Met-turn » : un coude serré bêta-1,4 formant une niche hydrophobe pour l'installation du zinc dans le site actif de l'hélice, (figure 15), (Maskos *et al.*, 1998; Orth *et al.*, 2004 ; Janes *et al.*, 2005 ; Hall *et al.*, 2012). La partie catalytique des ADAMs est caractérisée par une structure globulaire divisée en deux sous-domaines, avec la cavité du site actif entre les deux (Gomis-Ruth, 2003). Cette cavité contient l'atome de zinc catalytique responsable de la spécificité de clivage. Le sous-domaine N-terminal supérieur se compose de cinq feuillets  $\beta$ , qui sont disposés parallèlement les uns aux autres dans lesquels le substrat vient se loger (figure 15A). Plusieurs hélices- $\alpha$  créent également des caractéristiques structurales, notamment l'hélice- $\alpha$  B qui contient le motif consensus HExxHxxGxxH lequel combiné à l'ion zinc constitue le site catalytique. Les deux histidines de cette séquence constituent les deux premiers ligands de l'atome de zinc, alors que le glutamate polarise la molécule d'eau impliquée dans l'hydrolyse de la liaison peptidique (Bode *et al.*, 1993). Toutes les ADAMs humaines ne possèdent pas la séquence consensus HExxHxxGxxH associée à un ion zinc au site catalytique du domaine métalloprotéase. Parmi les vingt-deux ADAMs connues seules douze (ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30 et 33) sont équipées pour exercer l'activité endopeptidase (Edwards *et al.*, 2008).

L'autre activité définissant les metzincines est le résidu méthionine strictement conservé créant un coude  $\beta$ -1,4 appelé aussi le « Met- turn » (Bode *et al.*, 1993) permettant alors le positionnement correct du sous-domaine inférieur pour créer la cavité catalytique (figure 15B). Ce sous-domaine inférieur a relativement peu de fonctionnalités, il se compose d'une hélice- $\alpha$  et de l'extrémité C-terminale.



**Figure 15:** Structure du domaine métalloprotéase des ADAMs.

A) le schéma représente les caractéristiques structurales des ADAMs déterminées par analyse cristallographique (d'après Gomis-Ruth, 2003).

B) représentation du domaine catalytique, les hélices  $\alpha$  sont indiquées en orange, les feuillets  $\beta$  en turquoise et le Met-turn est coloré en vert, en bleu les motifs de la séquence consensus HExxHxxGxxH associés à un ion zinc en rose. (d'après Tallant et al., 2010)

C) le schéma représente les séquences d'acides aminés dans le site de clivage du substrat (P) et ceux du site actif de la protéase (S), le clivage se produit entre les résidus de P1 et P1' (d'après Edwards et al., 2008).

Le fond de la cavité contenant l'ion zinc, contient également les séquences d'acides aminés responsables de la spécificité de clivage, à ce jour il n'y a pas de motifs précis, mais il existe des acides aminés privilégiés. Comme schématisé dans la figure 15C, les séquences particulières d'acides aminés (S3S2S1S1'S2'S3') dans la cavité déterminent spécifiquement la séquences (P3P2P1P1'P2'P3') dans le substrat, le clivage se produit entre les résidus P1 et P1'. Des travaux effectués par Caescu (Caescu et al, 2009) illustre cette spécificité de clivage entre ADAM10 ET ADAM17 (Tableau 5).

|          |     | Residue (TACE numbering) |     |     |     |     |     |     |
|----------|-----|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|          |     | 348                      | 401 | 402 | 405 | 434 | 439 | 440 |
| Protease |     |                          |     |     |     |     |     |     |
| TACE     | Leu | Leu                      | Val | His | Val | Ala | Val |     |
| ADAM10   | Leu | Ile                      | Thr | His | Ile | Ala | Thr |     |

|        |                    | Cleavage position             |  |  |         |  |  |                               |
|--------|--------------------|-------------------------------|--|--|---------|--|--|-------------------------------|
|        |                    | P5                            | P4                                       | P3                                       | P2      | P1                                       | P1'                                      | P2'                           |
| TACE   | P (1.7)            | R (1.9)<br>H (1.6)<br>T (1.4) | A (1.6)<br>V (1.5)<br>T (1.5)<br>M (1.4) | A (1.7)<br>S (1.5)<br>R (1.5)<br>E (1.4) | A (1.5) | V (3.1)<br>L (2.9)<br>I (1.8)            | K (1.6)<br>V (1.5)<br>I (1.4)            | G (1.6)<br>S (1.6)<br>K (1.5) |
| ADAM10 | P (2.1)<br>A (1.5) | T (2.2)<br>R (1.6)<br>H (1.5) | T (1.6)<br>A (1.5)<br>H (1.4)            | S (1.6)<br>E (1.6)<br>A (1.6)            | A (1.6) | L (3.6)<br>Y (2.5)<br>F (2.0)<br>Q (1.9) | K (1.8)<br>R (1.6)<br>V (1.5)<br>T (1.4) | G (2.1)<br>A (1.6)            |

**Tableau 5 :** Acides aminés présents dans la cavité catalytique responsable du clivage S2.

A) résidus spécifiques retrouvés dans le site actif (S) des protéases ADAM10 et ADAM17. Le numéro correspond à la position de l'acide aminé dans la séquence d'ADAM17.

B) résidus spécifiques retrouvés dans la séquence P des substrats d'ADAM10 et d'ADAM17. Dans ce tableau sont donnés les résidus avec des valeurs de sélectivités hautes : plus la valeur de sélectivité est grande plus le substrat contenant ce résidus à cet emplacement sera clivé préférentiellement. Les valeurs de sélectivités entre parenthèses déterminent les préférences du site de clivage pour les deux protéases. Ces données ont été normalisées de telle sorte que pour une valeur de 1 corresponde à la quantité moyenne par acide aminé donné dans un cycle de séquençage et indique aucune sélectivité, alors que les résidus ayant une valeur supérieure à 1 sont positivement sélectionnés par la protéase (Caescu et al., 2009).

### 3.3- Le domaine désintégrine

Le domaine désintégrine qui suit le domaine métalloprotéase est subdivisé en 2 sous-domaines, le domaine « shoulder » (l'épaule, Ds, résidus 396–440) et le domaine « arm » (le bras, Da, résidus 441–487). La région N-terminale du domaine riche en cystéines qui suit est appelé domaine « wrist » (poignet, CW, résidus 488–505), et l'ensemble des domaines Ds, Da et Cw façonne la molécule dans son ensemble et prend la forme d'un « C » avec une partie du domaine riche en cystéine en contact étroit avec le site catalytique du domaine métalloprotéase. Cette région semble être importante pour la spécificité de substrat et pour la régulation de l'activité de la protéase (Takeda *et al.*, 2006), (Fig.14). Cette structure secondaire est stabilisée par des ponts disulfures et deux sites de liaison au calcium (Ca<sup>2+</sup>). Plus important encore, dans cette structure, la boucle désintégrine est largement considérée comme responsable des interactions entre les ADAMs et les intégrines. La modélisation structurelle du domaine désintégrine-métalloprotéase des SVMP a démontré que ce motif est protégé par le domaine riche en cystéine et peut être inaccessible pour la liaison à l'intégrine

(Takeda *et al.*, 2006). Cela pourrait réguler l'activité catalytique, et peut-être également la reconnaissance du substrat (Milla *et al.*, 1999 ; Smith *et al.*, 2002 ; Janes *et al.*, 2009).

Le domaine désintégrine tire son nom de sa très grande similarité de séquence avec des désintégrines de venin de serpent (Niewiarowski *et al.*, 1994). Ces protéines courtes, solubles, dont la plupart contiennent un motif de liaison aux intégrines consensus : Arg–Gly–Asp (RGD), se lient à l'intégrine plaquettaire et, par conséquent fonctionnent comme de puissants inhibiteurs compétitifs de l'agrégation plaquettaire (Blobel *et al.*, 1992 ; Niewiarowski *et al.*, 1994). La taille du domaine désintégrine des protéines ADAMs est d'environ 90 acides aminés. Structurellement, il est peu connu, bien que l'on ait pu recueillir des informations grâce à des travaux de cristallographie des protéines SVMP et d'autres ligands des intégrines (Gomis-Ruth *et al.*, 1994). Les désintégrines de venin de serpent grâce à leur domaine désintégrine inhibent de manière compétitive, via les intégrines en imitant le site ligand, l'adhérence des plaquettes aux séquences RGD du fibrinogène, ce qui induit des hémorragies. Comme la fibronectine, beaucoup de protéines ont une séquence consensus RGD sur une région de treize acides aminés (à la fin de la boucle désintégrine), qui s'expose à la surface et confère la liaison aux intégrines ( $\alpha 2\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 3$ ), (Blobel *et al.*, 1992). A l'exception de l'ADAM15 humaine, les ADAMs ne possèdent pas de séquence RGD dans leur boucles désintégrine, en revanche, elles possèdent des résidus cystéines supplémentaires absents des désintégrines de venin (Evans, 2001).

Le travail sur l'ADAM-15 humaine a fourni des indications intéressantes concernant le motif unique RGD dans la boucle désintégrine. Ce travail a permis de comprendre les différences entre la liaison dépendante de la séquence RGD pour l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  par rapport à la liaison indépendante de la séquence RGD pour l'intégrine  $\alpha 9\beta 1$ . Le site d'interaction  $\alpha 9\beta 1$  se fait au motif R(x)<sub>6</sub>DLPEF (résidus 481-492 dans l'ADAM-15 humaine, le motif RGD se situe au niveau des résidus 484-486) qui est conservée dans toutes les ADAMs sauf ADAM-10 et -17. Il a été démontré que les domaines désintégrines de plusieurs ADAMs sont associés à l'intégrine  $\alpha 9\beta 1$ , mais pas ceux de ADAM-10 et -17 (Eto *et al.*, 2002 ; Seals et Courtneige, 2003). La présence d'un domaine désintégrine dans les ADAMs est unique parmi les protéines de surface cellulaire, il permet d'induire les interactions cellule-cellule et cellule-matrice en liant les intégrines. D'autres ADAMs (ADAM-9 et -23) sont capables de se lier aux intégrines grâce à l'interaction avec la séquence Glu-Cys-Asp (ECD) dans le domaine désintégrine, une observation qui corrobore l'importance cruciale du résidu acide aspartique dans le site d'interaction désintégrine-intégrine (Lu *et al.*, 2007).

### **3.4- Le domaine riche en cystéines**

Les protéines ADAMs sont capables de lier plusieurs constituants de la matrice extracellulaire (ECM-extracellular matrix) indépendamment de l'interaction désintégrine-intégrine. Le domaine riche en cystéine peut avoir un rôle important dans la liaison des protéoglycanes comme décrit pour ADAM12 (Iba *et al.*, 2000). Les études portant sur ADAM13 chez le Xenope ont révélées un rôle important du domaine riche en cystéine et ses interactions avec la fibronectine (Gaultier *et al.*, 2002). D'autres travaux ont révélé la présence d'un tronçon hydrophobe dans le domaine riche en cystéine de plusieurs ADAMs, qui affiche une similarité importante des séquences avec des peptides de la fusion virale (Blobel, 1992) ce qui suggère un rôle du domaine riche en cystéine dans la fusion membranaire mais aucune donnée expérimentale confirme cette hypothèse (Klein et Bischoff, 2011).

### **3.5- Le domaine EGF-LIKE**

Les domaines riches en cystéine et EGF-like dans l'étude des protéases ADAMs ne sont pas très bien caractérisés. Il a été mis en évidence que la plupart des ADAMs ont un domaine « EGF-like », et qu'il est absent dans ADAM-10 et -17 (Janes *et al.*, 2005). Le domaine de l'EGF-like contribue à la régulation du substrat lié au domaine riche en cystéine et à la liaison des protéoglycanes à la surface cellulaire (Zolkiewska, 1999 ; Iba *et al.*, 2000 ; Janes *et al.*, 2005). Les domaines membranaires correspondants d'ADAM17 sont impliqués dans l'assemblage multimérique des protéases et dans la reconnaissance de certains substrats (Lorenzen *et al.*, 2011 ; Lorenzen *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2011). Cette région C-terminale courte et assez souple, est suivie de la région hydrophobe transmembranaire permettant l'ancrage des ADAMs à la membrane plasmique et est suivie d'un domaine cytoplasmique.

### **3.6- Le domaine cytoplasmique**

Les protéases ADAMs possèdent des domaines cytoplasmiques qui varient en longueur, en séquence, compris entre 11 résidus (ADAM11) et 231 résidus (ADAM19), ainsi que dans leur capacité à lier des protéines cytoplasmiques (Seals et Courtneidge, 2003). De nombreuses ADAMs possèdent un ou plusieurs motifs riches en proline (PxxP) et des résidus sérine, thréonine et tyrosine qui sont des sites potentiels de phosphorylation par diverses kinases et qui peuvent servir de site de reconnaissance de certaines protéines par l'intermédiaire de leurs domaines SH3 et SH2. Ainsi, les domaines cytoplasmiques pourraient jouer un rôle important dans la régulation de la fonction des protéases en réponse à des événements de signalisation intracellulaires.

Il existe un grand nombre de protéines capables d'interagir via le domaine cytoplasmique des ADAMs (Edwards *et al.*, 2008, Marcello *et al.*, 2010). C'est le cas de certaines protéines de signalisation intracellulaires, par exemple l'activation d'ADAM9 par les esters de phorbol via l'interaction avec la PKC $\delta$  (Izumi *et al.*, 1998).

Le domaine cytoplasmique joue éventuellement un rôle dans la fonction des ADAMs, soit en régulant l'activité catalytique, en couplant l'activité des ADAMs à la signalisation soit en transportant la protéine vers un emplacement cellulaire correct. La translocation régulée d'ADAM12 à la membrane plasmique nécessite le domaine cytoplasmique et dépend de la PKC $\epsilon$  (Sundberg, 2004). PACSIN3 est un exemple d'une protéine contenant un domaine SH3 qui est capable d'interagir avec les domaines cytoplasmiques de plusieurs ADAMs y compris ADAM-9, -10, -12, -15 et -19 (Mori *et al.*, 2003). Cette interaction peut réguler l'endocytose des protéases ADAMs. Des travaux récents mettent en évidence chez ADAM10, la présence de deux régions riches en prolines (PRRs) comprises entre les résidus 708-717 (PKLPPPKPLP) et 722-728 (RRRPPQP). Ces sites PRRs intracellulaires sont potentiellement capables de se lier aux domaines SH3 des molécules de signalisation. Cela suggère que les interactions protéine-protéine induite par les PRRs pourraient exercer des fonctions caractéristiques pour moduler le transport, la localisation et/ou la régulation de l'activité des différents membres de la famille ADAM (Ebsen *et al.*, 2014).

Le domaine cytoplasmique des ADAMs peut réguler l'activité protéolytique en contrôlant la localisation subcellulaire et/ou l'activation du domaine protéase. La protéase ADAM10 subit un clivage protéolytique par le processus de protéolyse intramembranaire régulée (RIP). Il s'agit d'un processus par lequel certaines protéines sont clivées à l'intérieur de leurs domaines transmembranaires pour libérer un domaine cytoplasmique actif. Ce processus se produit à travers les actions séquentielles d'ADAM15 (qui clive le domaine extracellulaire d'ADAM10) et de la  $\gamma$ -sécrétase qui libère le domaine intracellulaire de 6kDa (ICD) (Tousseyn *et al.*, 2009). L'ICD d'ADAM10 possède également un signal de localisation nucléaire (NLS) classique : KRRR, situé entre les deux régions riches en proline, qui est potentiellement impliqué dans le transport du VIH-1 vers le noyau (Endsley *et al.*, 2014).

La phosphorylation ou d'autres modifications du domaine cytoplasmique peuvent influencer les interactions des ADAMs avec des protéines adaptatrices ou des protéines de trafic qui interagissent directement avec le substrat ou influencent la localisation des sous-domaines membranaires ou d'autres localisations cellulaires spécifiques.

## 4- La métalloprotéase ADAM10

La métalloprotéase ADAM10 a été isolée et caractérisée en 1989 à partir de préparations de membranes cérébrales myéliniques de cerveaux bovins, dans lesquelles les chercheurs détectent une enzyme avec une activité métalloprotéase qui dégrade la protéine basique de la myéline (MBP : Myelin-Associated Metalloproteinase) (Chantry *et al.*, 1989). La séquence peptidique de cette métalloprotéase purifiée a servi par la suite à synthétiser une sonde oligonucléotidique et à cribler une banque d'ADNc de cerveaux bovins, permettant ainsi le clonage de la première désintégrine-métalloprotéase dérivée d'un mammifère ayant une similitude avec les protéines précurseurs de venin de serpent (hémorragique). La protéine mature possède 534 acides aminés et est disposée ainsi : un domaine métalloprotéase et un domaine désintégrine extracellulaire, une hélice transmembranaire et un domaine cytoplasmique riche en proline C-terminal (Howard *et al.*, 1996). La protéine bovine a été nommée MADM (MAMmalian Disintegrin-Metalloprotease), ou ADAM10.

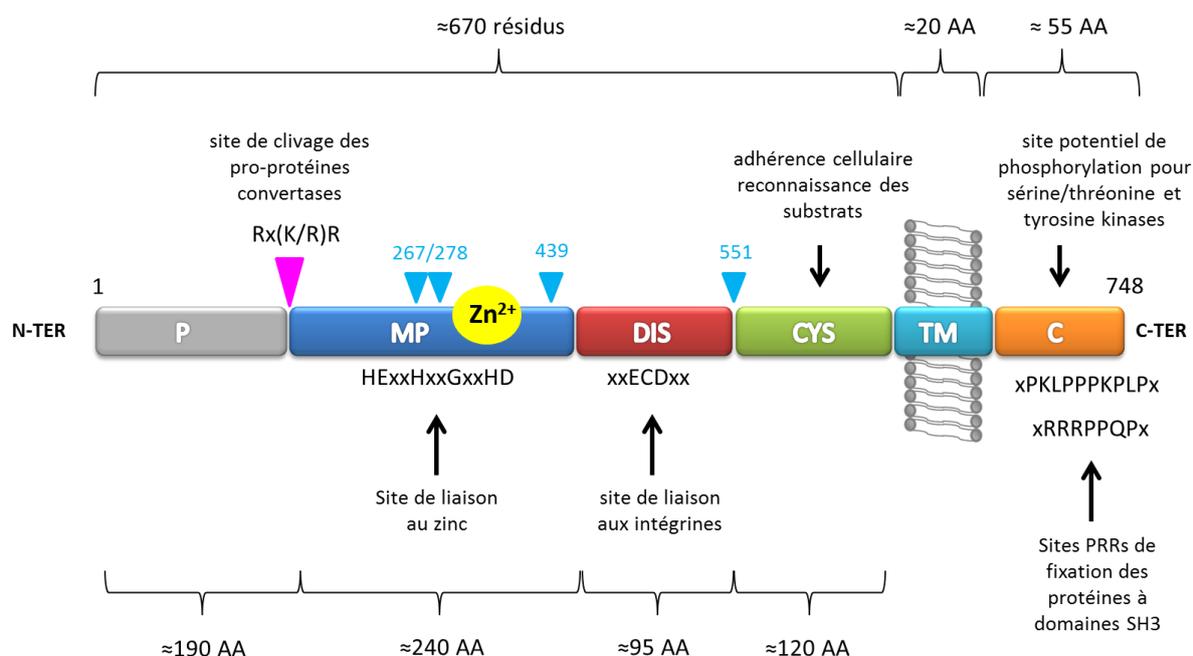
D'un point de vue évolutif, les protéases ADAMs les mieux étudiées chez les mammifères sont ADAM10 et ADAM17, qui sont légèrement éloignées des autres ADAMs (Edwards *et al.*, 2008). Chez l'ascidie *C.intestinalis*, l'invertébré le plus proche de l'homme, deux sous-groupes de protéases ADAMs ont été identifiés, un sous-groupe (ADAMa, ADAMb) représentant les orthologues d'ADAM17 et d'ADAM10 et l'autre sous-groupe (ADAMc1, ADAMc2) apparaît correspondre aux ADAMs humaines 2, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 17, 19, 22, 23, 28, 32 et 33. Les ADAMs non citées pourraient être apparues plus tard au cours de l'évolution des vertébrés (Huxley-Jones *et al.*, 2007). Chez le nématode *C.elegans*, des expériences génétiques ont permis de mettre en évidence la protéine SUP-17/ADAM (Tax *et al.*, 1997 ; Wen *et al.*, 1997). Chez la drosophile, les gènes codant kuzbanian et kuzbanian-like (Kuz et Kul) correspondent à la protéase ADAM10, il y a un gène orthologue (Tace) pour ADAM17 et deux (Neu3, mmd) pour les autres membres ADAMs (Meyer *et al.*, 2011).

### 4.1- Structure d'ADAM10

Chez l'Homme la protéine ADAM10 est codée par un gène situé sur le bras long du chromosome 15 en position q21.3-q23 et sur le chromosome 9 chez la souris (Yamazaki *et al.*, 1997a ; Yamazaki *et al.*, 1997b). Le gène ADAM10 chez l'homme, la souris et le rat, mesure environ 160 kb. La partie codante est divisée en 16 exons séparés par 15 introns, un seul transcrit mature est observé, les 2247 nucléotides codent une protéine de 748 acides aminés qui s'exprime de façon ubiquitaire sous forme de glycoprotéine membranaire de type I (Wolfsberg, *et al.*, 1995 ; Howard *et al.*, 1996 ; Endres et Fahrenholz, 2012).

La forme mature d'ADAM10 est N-glycosylée et sa taille est de 56-58 kDa (Dallas, *et al.*, 1999 ; Eters *et al.*, 2001). La structure typique de la protéine est la suivante : un peptide signal (environ 30 résidus), un prodomaine (avec un seul résidu cystéine et une séquence de reconnaissance de la proprotéine convertase, Rx(K/R)R)), un domaine catalytique contenant le domaine métalloprotéase (avec le motif de liaison au zinc de la famille reprotolysines, HExxGxxGxxHD), un domaine désintégrine (dépourvu de la séquence RGD mais possédant la séquence ECD), un domaine riche en cystéine, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (possédant des sites potentiels de phosphorylation), (Seals et Courtneidge, 2003 ; Edwards *et al.*, 2008), (voir figure 16).

ADAM10 possède quatre sites de N-glycosylation potentiels : N267, N278 et N439 dans le domaine métalloprotéase et N551 dans le domaine désintégrine (Escrevente *et al.*, 2008) (fig.16). D'après les travaux d'Escrevente les quatre sites de N-glycosylation de la protéine ADAM10 (bovine) sont occupés avec un oligosaccharide riche en mannose ou un oligosaccharide dit complexe. Des expériences effectuées avec des mutants dont les sites de glycosylation ont été modifiés, mettent en évidence une baisse d'activité catalytique. Ces données suggèrent un rôle régulateur de l'attachement des résidus mannose et glycanes de type complexe dans le trafic et la maturation d'ADAM10. La métalloprotéase est retrouvée dans les vésicules exosomales (Gutwein *et al.*, 2003), cela semblerait également dépendre de N-glycosylation (Escrevente *et al.*, 2008).



**Figure 16:** Représentation schématique de la protéine ADAM10.

P : prodomaine, MP : domaine métalloprotéase (catalytique), Dis : domaine désintégrine, Cys : domaine riche en cystéine, TM: domaine transmembranaire, C: queue cytoplasmique. Les positions des sites de glycosylation sont indiquées par des flèches bleues.

## 4.2- Rôles physiologiques et physiopathologiques d'ADAM10

### 4.2.1- Les souris Knock-out et Knock-out conditionnelles

L'invalidation du gène ADAM10 chez la souris conduit à une mortalité embryonnaire précoce à 9,5 jours de l'embryogenèse (Hartmann *et al.*, 2002). Les conséquences de l'inactivation de gène ADAM10 mènent à des anomalies du développement (systèmes nerveux et cardiovasculaire) très sévères et sont extrêmement similaires à celles obtenues avec des souris dont le gène Notch a été déléte. De nombreuses équipes ont alors générées des souris Knock-out conditionnelles dans lesquelles le gène ADAM10 est invalidé spécifiquement dans un tissu ou à partir d'un stade du développement. L'étude des phénotypes de ces souris ont permis de mettre en évidence un rôle d'ADAM10 dans la plupart des tissus et systèmes listés ci-dessous : le système nerveux central (Jorissen *et al.*, 2010), le système cardiovasculaire et le développement des somites (Hartmann *et al.*, 2002), le système immunitaire (Bender *et al.*, 2010; Gibb *et al.*, 2010; Gibb *et al.*, 2011a; Gibb *et al.*, 2011b; Yoda *et al.*, 2011), les intestins (Solanas *et al.*, 2011), l'endothélium vasculaire (Glomski *et al.*, 2011), l'épiderme/la croissance des follicules pileux embryonnaires (Weber *et al.*, 2011), l'épithélium des voies respiratoires (Inoshima *et al.*, 2011).

### 4.2.2- Les substrats d'ADAM10

L'activité de la protéase ADAM10 a été très étudiée et une quarantaine de protéines transmembranaires de natures très diverses ont été décrites comme étant ses substrats, reflétant son implication dans de nombreux processus physiologiques : le développement, la modification de l'adhérence cellulaire, la migration des cellules, et la signalisation intracellulaire.

La fonction d'ADAM10 est donc étroitement liée avec la fonction de ses substrats ce qui explique leur appartenance à des catégories différentes : des facteurs de croissance et les cytokines, des récepteurs et molécules d'adhérences : le CD44 (Nagano *et al.*, 2004), et L1-CAM (Maretzky *et al.*, 2005b), les récepteur des produits terminaux de glycation (RAGE : Receptor Advanced Glycation Endproducts), (Raucci *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Le clivage des N et E-cadhérines, conduit à la rupture de l'adhérence cellulaire et une redistribution des  $\beta$ -caténines de la surface de la cellule au noyau pour activer des gènes cibles, menant à une transition épithélio-mésenchymateuse dans le cas de la E-cadhérine (Maretzky *et al.*, 2005a; Maretzky *et al.*, 2005b; Reiss *et al.*, 2005). Le récepteur Notch est également un substrat important d'ADAM10, j'y reviendrais dans la partie suivante.

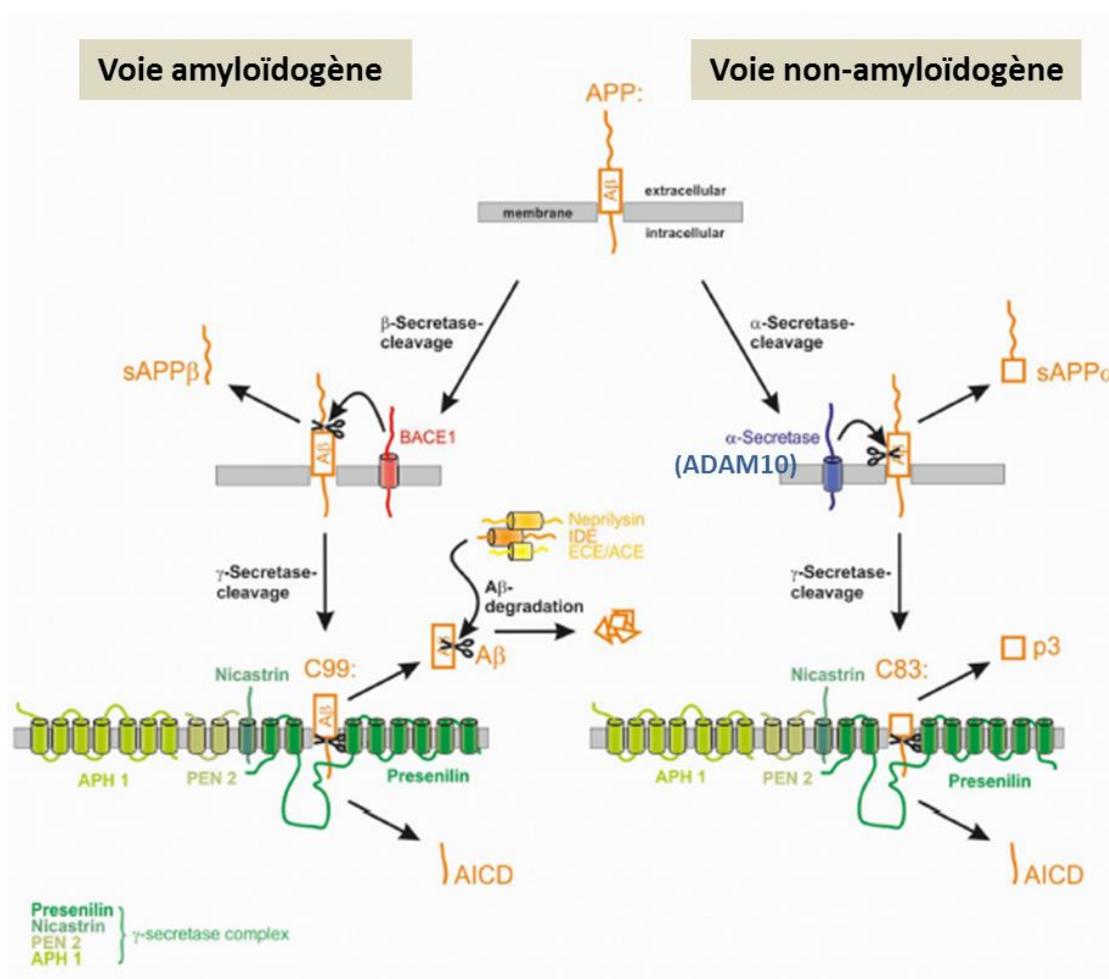
Il existe d'autres molécules dont la fonction de protéases d'ADAM10 est essentiel pour la fonction de ces molécules : APP (Lammich *et al.*, 1999), la protéine APP-like 2 (Endres *et al.*, 2005). Le ligand de Fas, induisant le signal de mort cellulaire (Kirkin *et al.*, 2007 ; Schulte *et al.*, 2007) ou Bri2, protéine régulant la dégradation de la protéine  $\beta$ -amyloïde (Martin *et al.*, 2008) sont également clivés par ADAM10. Au moins trois protéines à ancre-GPI sont des substrats candidats pour ADAM10 : la protéine associée aux métastases C4.4A, impliquée dans l'invasion, a été caractérisée comme substrat d'ADAM10 et d'ADAM17 (Esselens *et al.*, 2008). La protéine à ancre GPI de guidance neuronale l'éphrine A5 est clivée par ADAM10 lors de la liaison à son récepteur EphA3, stoppant ainsi l'interaction ligand/récepteur (Janes *et al.*, 2005). Des expériences *in vitro* identifient également la protéine prion PrPc comme substrat d'ADAM10 (Cisse *et al.*, 2005 ; Vincent *et al.*, 2001). D'autres substrats sont listés dans le tableau suivant (Tab.6):

|   | <b>Substrats spécifiques d'ADAM10</b>  | <b>Références</b>   |
|---|--|---|
| <b>Cytokines/<br/>facteurs de<br/>croissances</b>   | CX3CL1, CXCL16                         | Hundhausen et al., 2003; Abel et al., 2004 ;<br>Hundhausen et al., 2007   |
|   | Pro-betacelluline                      | Sahin et al., 2004  |
|   | Pro-EGF                                | Sahin et al., 2004  |
|   | TNF-alpha                              | Rosendahl et al., 1997 ; Lunn et al, 1997 ;<br>Hikita et al., 2009 ; Mezyk-Kopec et al.,<br>2009; Arduise et al. 2008                 |
| <b>Récepteurs et<br/>molécules<br/>d'adhérences</b> | Axl                                    | Budagian et al., 2005   |
|   | CD154 (CD40 ligand)                    | Yacoub et al., 2013   |
|   | CD30                                   | Eichenauer., 2007; Velasquez et al., 2013   |
|   | CD44                                   | Nagano et al., 2004; Anderegge et al., 2009   |
|   | Desmoglein-2                           | Bech-Serra et al., 2006   |
|   | E-cadhérine                            | Maretzky et al., 2005   |
|   | N-cadhérine                            | Reiss et al., 2005  |
|   | NCAM                                   | Hinkle et al., 2006 ; Brennaman et al., 2013;<br>Hildebrandt and Dityatev, 2014   |
|   | Nectin-1                               | Kim et al., 2010  |
|   | Notch                                  | Pan et Rubin 1997; Brou et al., 2000 ;<br>Hartmann et al., 2002 ; Dyczynska et al.,<br>2007; Gibb et al., 2010 ; Dornier et al., 2012 |
|   | Protocadhérine γ C3 et B4              | Reiss et al., 2006  |
|   | Protocadhérine-12                      | Bouillot et al., 2011   |
|   | RAGE                                   | Raucci et al., 2008   |
|   | Récepteur à l'interleukine-6           | Garbers et al., 2011  |
|   | Récepteur aux IgE, CD23                | Weskamp et al., 2006 ; Dhaliwal et al., 2013  |
| Récepteur de la tyrosine phosphatase                | Anders et al., 2006                    |   |
| Glycoprotéines plaquettaires VI et Ib-IX-V          | Gardiner et al., 2007                  |   |
| Neurologin-1  | Suzuki et al., 2012                    |   |
| <b>Autres</b>                                       | Collagène XVII                         | Franzke et al.,2009   |
|   | enzyme de conversion de l'angiotensine | Allinson et al., 2004   |
|   | éphrine                                | Janes et al., 2005; Janes et al., 2009; Atapattu<br>et al., 2012  |
|   | Klotho                                 | Bloch et al., 2009  |
|   | ligand de FAS                          | Kirkin et al., 2007   |
|   | osteoactivine                          | Rose et al., 2010   |
|   | protéine prion                         | Cisse et al., 2005; Altmeppen et al., 2011;<br>Altmeppen et al., 2012; McDonald et al.,<br>2014                                       |
|   | proteine précurseur de l'amyloïde      | Slack et al., 2001; Allinson et al., 2003;<br>Postina et al., 2004  |
|   | TIM-1, -2 et -4                        | Schweigert et al., 2014; Dewitz et al., 2014  |

**Tableau 6:** Différents substrats de la métalloprotéase ADAM10

### 4.2.3- Les fonctions d'ADAM10

Depuis ces dernières années de nombreuses fonctions biologiques sembleraient attribuées à la protéase ADAM10 et la liste des substrats de celle-ci d'augmenter. La métalloprotéase est également impliquée dans des processus physiopathologiques, par exemple en clivant la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) dans la maladie d'Alzheimer. Dans cette maladie l'accumulation du peptide  $\beta$ -amyloïde issu de l'APP provoque la formation de plaques amyloïdes responsables de lésions au cerveau irréversibles. APP est une protéine transmembranaire d'environ 750-800 acides aminés. La dégradation de l'APP est sous la dépendance de plusieurs systèmes protéolytiques (figure 17).



**Figure 17 :** Modification protéolytique du précurseur du peptide amyloïde, l'APP.

Dans la voie amyloïdogène, APP est clivé par la  $\beta$ -sécrétase BACE1 générant C99, qui est ensuite clivé pour former le peptide  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ). La voie non amyloïdogène est initiée par le clivage de l'APP par l' $\alpha$ -sécrétase (ADAM10) au sein du domaine A $\beta$ , empêchant ainsi la production du peptide A $\beta$ . Les clivages  $\alpha$ - et  $\beta$ -sécrétases libèrent les formes solubles de l'APP, sAPP $\alpha$  et sAPP $\beta$ , respectivement, dans l'espace extracellulaire. Les fragments C-terminaux liés à la membrane restant C83 et C99 sont ensuite clivés par le complexe  $\gamma$ -sécrétase générant le peptide non-toxique P3 pour C83 ou le peptide amyloïdogène A $\beta$  pour C99. Le peptide A $\beta$  est rapidement dégradé par plusieurs enzymes. Dans les deux voies le domaine intracellulaire de l'APP (AICD) est libéré dans le cytosol. D'après Grimm et al., 2013.

Dans la voie amyloïdogène, APP est clivé par la  $\beta$ -sécrétase, BACE-1, générant le fragment C-terminal C99, libérant ainsi la fraction soluble sAPP $\beta$  dans le milieu extracellulaire et le peptide  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ).

Dans la voie non-amyloïdogène le clivage d'APP est initié par l' $\alpha$ -sécrétase, dans le domaine de l'A $\beta$ , empêchant ainsi la production d'A $\beta$ , générant le fragment C-terminal C83 et libérant un fragment soluble sAPP $\alpha$  dans l'espace extracellulaire (Lammich *et al.*, 1999; Hooper et Turner, 2002). Les fragments membranaires C83 et C99 sont clivés successivement par le complexe  $\gamma$ -sécrétase conduisant à la formation du peptide non-toxique P3 pour C83 (Parvathy *et al.*, 1999; Eehalt *et al.*, 2003) ou du peptide amyloïdogène A $\beta$  pour C99 (Grbovic *et al.*, 2003; Carey *et al.*, 2005; Rajendran *et al.*, 2006). Le peptide A $\beta$  est le composant néfaste pour le système nerveux. La présence d'agrégat de peptide A $\beta$  est un signe caractéristique et irréversible de la maladie d'Alzheimer (Hardy et Selkoe, 2002). Le peptide A $\beta$  peut être dégradé par plusieurs enzymes, par exemple la néprilysine (NEP), l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE : Insulin-Degrading Enzyme), l'enzyme de conversion de endothéline (ECE : Endothelin-Converting Enzyme) et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE : Angiotensin Converting Enzyme).

Dans les deux voies le domaine intracellulaire d'APP (AICD, APP IntraCellular Domaine) est libéré dans le cytoplasme pour réguler l'expression de plusieurs gènes (figure 17), (Haass *et al.*, 1992 ; Passer *et al.*, 2000 ; Cao et Südhof, 2004).

De nombreux travaux ont permis d'identifier ADAM10 comme étant l' $\alpha$ -sécrétase (Endres et Fahrenholz, 2012 ; Grimm *et al.*, 2013). Des travaux récents montrent que la métallothionéine-III (MT-III) augmente l'expression de la PC7, de la furine, de PKC $\alpha$  et de la phosphorylation de PKC $\alpha$ , ce qui a pour conséquence d'augmenter l'activité d'ADAM10 et donc d'augmenter le clivage d'APP dans le domaine de l'A $\beta$  (Park *et al.*, 2014).

La dérégulation de la protéase et/ou de ses nombreux substrats contribuent également aux processus physiopathologiques, tel que le cancer, l'asthme, les infections et les inflammations, les troubles cardiovasculaires et neurologiques. Le tableau suivant (Tab.7) liste certains de ces processus dans lesquels ADAM10 jouerait un rôle.

|                   | Potentiels maladies et/ou mécanismes associés                                | Références  |
|-------------------|--|---|
| <b>CANCERS</b>    | Carcinome colorectal   | Gavert et al., 2005   |
|                   | Adénocarcinome gastrique   | Yoshimura et al., 2002; Hong et al., 2014   |
|                   | Hémopathies malignes (leucémie, érythroleucémie, lymphomes et myélome)       | Wu et al., 1997   |
|                   | Adénocarcinome de la prostate  | McCulloch et al., 2004  |
|                   | Carcinome endométrial  | Fogel et al., 2003  |
|                   | Carcinome ovarien  | Fogel et al., 2003  |
|                   | Glioblastome   | Wolpert et al., 2014  |
|                   | Carcinome épidermoïde (cavité buccale)                                       | Ko et al., 2007; Jones et al., 2013   |
|                   | Melanome (tumeur primaire et métastases)                                     | Anderegg et al., 2009; Lee et al., 2010; Lee et al., 2011                                   |
|                   | Carcinome hépatocellulaire   | Yuan et al., 2013; Yue et al., 2013   |
| <b>INFECTIONS</b> | VIH  | Brass et al., 2008; Friedrich et al., 2011 ; Swaminathan et al., 2012; Endsley et al., 2014 |
|                   | ADAM10 récepteur cellulaire de <i>S.aureus</i>                               | Berube and Wardenburg, 2013   |
| <b>IMMUNITE</b>   | Réponse par les IgE et CD23  | Morales et al. 2014; Dhaliwal et al., 2013  |
|                   | Régulation de l'hématopoïèse   | Weber et al., 2013  |
|                   | Processus Inflammation   | Li et al., 2014b  |
|                   | Effets pro-inflammatoires de la meprin- $\beta$ via A10                      | Li et al., 2014b  |
|                   | Architecture des tissus lymphoïdes   | Folgoza et al., 2013  |
|                   | Dermatite atopique   | Maretzky et al., 2008   |
|                   | Athérosclérose   | Schulz et al., 2008; Pelisek et al., 2012   |
| <b>ALZHEIMER</b>  | Régulation du fer  | Huang et al., 2014  |
|                   | Développement et progression maladie   | Reinhardt et al., 2014  |
|                   | Biomarqueurs sanguins  | Manzine et al., 2014  |
|                   | Trafic   | Musardo et al., 2014  |
|                   | Localisation synaptique  | Marcello et al., 2013   |
|                   | Régulation transport axonal  | Steuble et al., 2012  |
| <b>NOTCH</b>      | Croissance et migration cellules muscles lisses humaines vasculaires         | Yang et al., 2013   |
| <b>AUTRES</b>     | Développement post-natal   | Prox et al., 2013   |
|                   | Lésions artères carotides  | Pelisek et al., 2012  |
|                   | Cardiomyopathies   | Lim, 2013   |
|                   | EMT (ADAM10 and ADAM19, ensemble avec la $\gamma$ -secretase, clivent Cad6B) | Schiffmacher et al., 2014   |
|                   | Statines (prévenir l'apparition de la pathogenèse induite par RAGE)          | Quade-Lyssy et al., 2013  |
|                   | Développement des neurones dopaminergiques                                   | Yoon and Baik, 2013   |
|                   | Diabète type 2 (RAGE)  | Huang et al., 2013  |
|                   | Retinopathie (ADAM8, 9 ET 10)  | Guaiquil et al., 2013   |
|                   | Diabète Non-insulino-dépendent (type 2)/EGFR                                 | Sugimoto et al., 2013   |
|                   | Mécanismes compartimentation membranaire                                     | Dornier et al., 2012; Haining et al., 2012  |

**Tableau 7:** L'expression et la fonction d'ADAM10 ont été décrites dans plusieurs processus pathologiques et physiologiques.

Selon le contexte de la maladie, la modulation de la fonction des ADAMs est considérée comme une option thérapeutique intéressante. Ces dernières années ont été propices aux travaux portant sur des stratégies thérapeutiques. Des études récentes suggèrent l'utilisation d'anticorps dirigés contre la poche de reconnaissance du substrat d'ADAM10 comme agents thérapeutiques qui agissent en inhibant le clivage des éphrines et potentiellement d'autres substrats d'ADAM10 (Atapattu *et al.*, 2012). Récemment il a été proposé que l'association des biomarqueurs sanguins, tels qu'ADAM10 et des tests cognitifs peut-être être utile pour un diagnostic plus fiable pour les patients atteint ou non de la maladie d'Alzheimer (Manzine *et al.*, 2014).

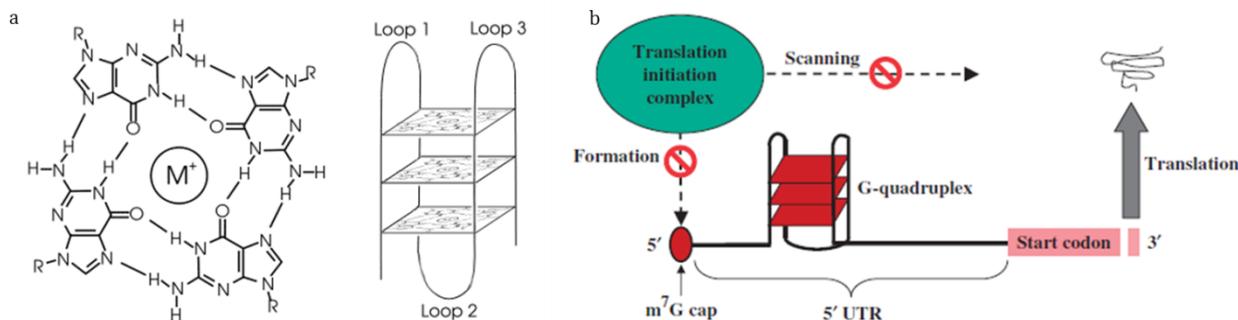
### **4.3- Régulation d'ADAM10**

La régulation de l'activité de la protéase ADAM10 peut se faire le long de la voie sécrétoire et à la membrane plasmique (Lammich *et al.*, 1999; Gutwein *et al.*, 2003). La régulation se fait à différents niveaux : l'expression génique (5'UTR, 3'UTR), la transcription (RA,...), de façon post-transcriptionnelle (Tspan,...), traductionnelle. De nombreuses études ont indiquées que l'activité protéolytique d'ADAM10 est renforcée par la signalisation du récepteur de l'acide rétinoïque, l'expression de la nardilysine, l'appauvrissement en cholestérol, la N-glycosylation et l'influx calcique (Escrevente *et al.*, 2008, Hiraoka *et al.*, 2007, Kojro *et al.*, 2001, Seterson *et al.*, 2005, Skovronsky *et al.*, 2000 ; Tippmann *et al.*, 2009).

#### **4.3.1- Régulation de son expression**

- *La région 5'UTR* : Le gène Adam10 possède une région 5'UTR très riche en GC et a été identifiée comme un répresseur traductionnel fort (Lammich *et al.*, 2010). À l'aide de l'algorithme de prédiction secondaire G-quadruplexe Quadfinder, l'équipe de Lammich a identifiée un motif entre les nucléotides 66 et 94. Cette région est une séquence spécifique capable de former des structures secondaires complexes et qui est impliquée dans la régulation traductionnelle d'ADAM10 (Lammich *et al.*, 2011). Cette région riche en G entre les nucléotides 66 et 94 forme une structure secondaire de G-quadruplexes (G4) extrêmement stable. Les structures ARN G-quadruplexe de la région 5'-UTR sont des répresseurs traductionnels puissants qui bloquent la formation ou le balayage du complexe de pré-initiation sur la séquence de son ARN messager. Les G-quadruplexes sont des structures secondaires à quatre brins que peuvent adopter les acides nucléiques (ADN ou ARN) riches en guanines. Cette structure repose sur des appariements de base de type Hoogsteen par des liaisons faibles, formant un plateau de quatre guanines (G), aussi appelé « quartet ».

L'empilement parallèle et ininterrompu d'au moins deux quartets, intercalés par un cation monovalent (sodium ou potassium) stabilisant la structure, constitue le G4 (figure 18).



**Figure 18:** Représentation schématique des structures G-quadruplex s'associant sur les régions UTRs.

a) Structure d'un G-quadruplexe. Gauche: G-quartet ; droite: G-quadruplexe intramoléculaire.

b) La structure secondaire en G-quadruplex se fixe sur la séquence 5'UTR et bloque la traduction des protéines. D'après Lammich et al., 2011

- *Les micro-ARNs* : quelques miRNA ont expérimentalement identifiés pour réguler ADAM10 par l'intermédiaire de sa séquence 3'UTR. Des cellules de carcinome hépatocellulaire primaire, dans lesquelles la quantité de miR-122 est diminuée, ont montrées une augmentation significative de l'ARN messager et de la protéine ADAM10 (Bai *et al.*, 2009). Des travaux portant sur l'expression des miRNA dans la maladie d'Alzheimer ont mis en évidence un nouvel miRNA régulant ADAM10. Les expériences montrent que la surexpression de miR-144 induit au moins partiellement la répression de la protéine ADAM10 en présence de peptide bêta-amyloïde. Il a également été constaté que miR-451, (miR-451 est transcrit conjointement avec miR-144 à partir d'un seul locus et est censé se lier au 3'-UTR d'ADAM10), est également impliqué dans la régulation de l'expression d'ADAM10. Ces données suggèrent que le miR-144/451 pourrait être un régulateur négatif de la protéine ADAM10 et serait impliqué dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (Cheng *et al.*, 2013). D'autres travaux suggèrent que miR-140-5p, qui serait impliqué dans la tumorigénèse, pourrait cibler directement ADAM10 dans l'oncogénèse (Kai *et al.*, 2014).

- *L'acide rétinoïque* : Le gène ADAM10 humain, de souris et de rat contient deux sites accepteurs des récepteurs rétinoïdes X (RXR) dans leurs régions 5'UTR (Prinzen *et al.*, 2005). Des travaux mettent en évidence que l'acide rétinoïque améliore la transcription d'ADAM10 grâce à la formation d'un dimère RAR $\alpha$ / $\beta$ -RXR. Ce qui pour conséquence d'augmenter la production, *in vitro*, des peptides alpha-APPs par rapport aux beta-APPs.

Les récepteurs de l'acide rétinoïque pourraient agir comme des régulateurs transcriptionnels d'ADAM10. D'autres expériences effectuées avec des isotypes de l'acide rétinoïque spécifiques pour RAR vont dans ce sens (Endres *et al.*, 2005 ; Tippmann *et al.*, 2009).

*-Les sirtuines :* Les sirtuines sont des enzymes qui forment une famille conservée d'histones désacétylases nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)-dépendantes qui affectent le métabolisme cellulaire en régulant l'expression de certains gènes (Mai *et al.*, 2005). Une d'elles, SIRT1, atténuerait l'action amyloïdogène du précurseur protéique  $\beta$ -amyloïde (APP) *in vitro* et dans des modèles de souris transgéniques de la maladie d'Alzheimer (Donmez *et al.*, 2010). En effet, SIRT1 augmente la production d' $\alpha$ -sécrétase (et de son activité) grâce à l'activation du gène de l' $\alpha$ -sécrétase, ADAM10. SIRT1 interagit de façon directe avec une région spécifique du promoteur d'ADAM10 en position -467 à -30 (site de liaison du RAR et d'activation de la transcription (Prinzen *et al.*, 2005), elle pourrait être un activateur positif de la transcription d'ADAM10. D'autres travaux mettent en évidence que l'Histone désacétylase SIRT1 améliore l'expression du gène ADAM10 par désacétylation du récepteur RAR-bêta (Donmez *et al.*, 2010) ce qui pourrait constituer un outil thérapeutique supplémentaire pour augmenter la quantité d'ADAM10 et donc augmenter l'activité alpha-sécrétase (Endres *et al.*, 2012).

#### **4.3.2- Régulation du trafic d'ADAM10**

*-La région C-terminale :* L'extrémité C-terminale d'ADAM10 contient un motif riche en arginine qui agit comme un signal de rétention au réticulum (RE) et inhiberait le trafic de la protéine à la surface cellulaire. En effet, la mutation d'arginine en alanine permet la sortie d'ADAM10 du RE (Marcello *et al.*, 2010). Dans les neurones, la protéine SAP97 (Synapse-Associated Protein97) via ses domaines de liaison SH3 se lie directement aux régions riches en proline du domaine cytoplasmique d'ADAM10 permettant son adressage au compartiment post-synaptique après une stimulation avec le NMDA, l'acide N-Méthyl-D-Aspartique, (Marcello *et al.*, 2007).

Une étude récente suggère que l'endocytose d'ADAM10 est dépendante de la clathrine. La protéine AP2, (adaptor protein-2, adaptateur de clathrine de type 2), a été identifiée comme un partenaire interagissant avec un motif de liaison, non définis auparavant, dans le domaine C-terminal d'ADAM10 (Marcello *et al.*, 2012). Chez les patients Alzheimer, le complexe ADAM10/AP2 aurait un rôle physiologique sur la plasticité synaptique dû à un défaut de liaison d'ADAM10 à SAP97. De plus, il y aurait simultanément dans l'hippocampe des patients une augmentation de l'association ADAM10/AP2.

Dans les stades précoces de la maladie, la réduction de l'activité  $\alpha$ -sécrétase pourrait être dû à un défaut dans le processus d'exocytose/endocytose d'ADAM10 (Marcello *et al.*, 2013). Les signaux d'adressage basolatéraux nécessitant le domaine d'homologie Src-3 de la partie C-terminale des protéases peuvent également affecter la distribution cellulaire d'ADAM10 dans les jonctions cellulaires (Wild-Bode *et al.*, 2006).

-*Les tétraspanines* : Par un mécanisme actuellement inconnu, la tétraspanine-12 améliore la maturation d'ADAM10 conduisant à une augmentation du clivage  $\alpha$ -sécrétase de l'APP (Xu *et al.*, 2009). D'autres travaux mettent en évidence que l'association d'ADAM10 et de CD81 (tétraspanine-28) régulerait le clivage du TNF- $\alpha$  et de l'EGF (Arduise *et al.*, 2008). Il a également été mis en évidence que la sous-famille des tétraspanines à huit cystéines (huit cystéines dans le grand domaine extracellulaire), les TspanC8 (Boucheix et Rubinstein, 2001 ; Huang *et al.*, 2005) interagit directement avec ADAM10. Cette famille est composée de six tétraspanines : Tspan5 (NET-4), Tspan10 (oculospanin), Tspan14 (DC-TM4F2), Tspan15 (NET-7), Tspan17 et Tspan33 (penumbra).

Des travaux effectués dans les cellules HeLa, mettent en évidence que l'extinction de l'expression de Tspan5 et Tspan33, diminue l'activité Notch lors de l'étape de clivage S3 par le complexe gamma-sécrétase (Dunn *et al.*, 2010).

Il a été mis en évidence au laboratoire que les TspanC8 interagissent directement avec la métalloprotéase ADAM10, pour réguler sa sortie du réticulum endoplasmique. Quatre d'entre elles, Tspan5, Tspan14, Tspan15 et Tspan33, peuvent réguler l'expression d'ADAM10 à la membrane plasmique. Chez la drosophile trois gènes TspanC8 (Tsp3A, Tsp86D, et Tsp26D) ont été identifiés comme régulateurs de la voie de signalisation Notch. Leur analyse fonctionnelle a indiqué que ces gènes agissent de manière redondante pour activer la voie de signalisation Notch (Mummery-Widmer *et al.*, 2009). Au cours de l'ovogenèse, les gènes TspanC8 sont régulés positivement dans les cellules de la bordure et régulent la distribution de Kuzbanian (l'homologue d'ADAM10), l'activité de Notch, et la migration cellulaire. En comparaison les TspanC8 humaines Tspan5 et Tspan14 régulent positivement la signalisation Notch1 de façon dépendante d'ADAM10. Les tétraspanines TspanC8 ont une fonction conservée dans la régulation du trafic et de l'activité ADAM10, et elles pourraient réguler l'activation du récepteur Notch (Dornier *et al.*, 2012). Des travaux d'une autre équipe, ont permis de mettre en évidence que l'expression de Tspan15 augmente le clivage d'APP et de la N-cadhérine par ADAM10 (Prox *et al.*, 2012).

D'autres travaux ont confirmé que les TspanC8 interagissent et régulent ADAM10. Ces études effectuées sur différents types de cellules mettent en évidence un répertoire distinct de tétraspanines TspanC8. Ainsi, les cellules endothéliales, issues de la veine ombilicales humaines, expriment des niveaux relativement élevés de Tspan14. Les érythrocytes de souris expriment principalement la Tspan33, et l'expression d'ADAM10 a été sensiblement réduite en l'absence de cette tétraspanine. En revanche, l'expression d'ADAM10 était normale sur les plaquettes de souris déficientes en Tspan33 dans lesquelles la Tspan14 est la principale TspanC8 exprimée (Haining *et al.*, 2012). L'ensemble de ces travaux confirment le rôle des TspanC8 comme régulateurs essentiels de la maturation d'ADAM10 et de son trafic à la surface de la cellule.

Des travaux récents chez la souris montrent que deux membres de la sous-famille des TspanC8, Tspan5 et Tspan10, sont régulés au cours de la différenciation des ostéoclastes. L'extinction de leur expression, par utilisation de shRNAs, inhibe très fortement l'ostéoclastogenèse *in vitro*. La perte d'expression de Tspan5 et Tspan10 dans des cellules de lignée d'ostéoclastes est associée à la diminution d'ADAM10 mature et à la diminution de l'activation de la voie de signalisation Notch. Par conséquent, ces deux tétraspanines semblent jouer un rôle essentiel dans la formation des ostéoclastes en modulant ADAM10 et la voie de signalisation Notch (Zhou *et al.*, 2014).

#### **4.3.3- Régulation de l'activité d'ADAM10**

- *Le pro-domaine* : La protéase ADAM10 est synthétisée sous forme d'un zymogène inactif (environ 100KDa) qui est activé par les pro-protéines convertases la furine et/ou la proprotéine convertase subtilisine/kexin type 7 (PCSK7) (Rzymiski *et al.*, 2012), dans le réseau trans-Golgien. Contrairement à la plupart des autres metzincines, le mécanisme de cystéine switch, semble être non fonctionnel chez ADAM10. Le pro-domaine agit donc comme un inhibiteur de l'activité de la protéase ADAM10 (Moss *et al.*, 2007). Après le retrait du Pro-domaine, la régulation du clivage par ADAM10 dépend de la conformation structurale du substrat. Si le site de clivage est exposé, le clivage est censé se produire de façon constitutive (Gibb *et al.*, 2011).

- *L'influx de calcium* : L'activité d'ADAM10 s'est avérée être inductible par le calcium. Des études mettent en évidence que le calcium est un régulateur clé du clivage par ADAM10 de nombreux substrats, par exemple les ligands des récepteurs de l'EGF (Horiuchi *et al.*, 2007), les chimiokines (Hundhausen *et al.*, 2007) et des molécules d'adhérences (Schulz *et al.*, 2008 ; Le Gall *et al.*, 2009). L'extrémité C-terminale d'ADAM10 semblerait nécessaire pour l'induction de son l'activité par le calcium (Horiuchi *et al.*, 2007).

- *L'expression de la nardilysine* : Il a récemment été suggéré que la nardilysine (N-arginine dibasic convertase ou NRDC) empêcherait la formation de plaques amyloïdes en améliorant l'activité  $\alpha$ -sécrétase dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Ohno *et al.*, 2014). Les travaux mettent en évidence la formation d'un complexe entre la NRDC et ADAM10 par co-précipitation après lyse de cellules HEK293-APP. La NRDC renforcerait également le clivage par ADAM10 de l'ectodomaine de l'HB-EGF, mais aussi du TNF- $\alpha$  et NRG1 (Hiraoka *et al.*, 2007, Hiraoka *et al.*, 2008, Nishi *et al.*, 2006, Ohno *et al.*, 2009). La NRDC pourrait agir comme un activateur d'ADAM10.

-*Les GPCRs : Les récepteurs couplés aux protéines G* : Les GPCRs forment la plus grande famille de récepteurs membranaires (environ 1500 récepteurs différents). Ils sont composés de sept segments transmembranaires (récepteurs serpentine ou 7TM) et participent tous à l'élaboration de signaux intracellulaires par l'intermédiaire d'une GTPase hétérotrimérique. Les ligands de ces récepteurs sont très variés. Certains récepteurs couplés aux protéines G modulent soit l' $\alpha$ -, la  $\beta$ - ou la  $\gamma$ -sécrétase impliquées dans la modification de l'APP (Thathiah et De Strooper, 2011). Dans la plupart des cas, l'activation de l' $\alpha$ -sécrétase par les GPCRs provoque une augmentation de l'APP (Postina, 2012). Dans certains cas rares, (utilisation d'un inhibiteur sélectif et analyse de l'expression), les effets observés ont été attribués à ADAM10 (Kojro *et al.*, 2006) ou ADAM17 (Caccamo *et al.*, 2006). Cependant les mécanismes d'activation des GPCRs sur l'activité d'ADAM10 et/ou d'ADAM17 ne sont pas connus.

- *Le domaine riche en cystéine* : Des travaux ont mis en évidence le rôle du domaine riche en cystéine d'ADAM10 dans la signalisation éphrine-EPH (Janes *et al.*, 2005 ; Mancina et Shapiro, 2005). Les Éphrines sont des ligands associés aux cellules soit avec des ancrés-GPI dans le cas des ligands éphrine-A soit transmembranaires pour la classe des éphrine-B. La liaison des éphrines aux récepteurs Eph tyrosine-kinase génère une signalisation bidirectionnelle dans les cellules adjacentes (Pasquale, 2008). Suite à l'engagement, l'activation de la signalisation ephrin-Eph implique une répulsion cellulaire. Ce phénomène est important pour l'orientation neuronale ainsi que pour la mise en place des réseaux vasculaires artériels et veineux. La répulsion implique le clivage du ligand de l'éphrine après liaison à son récepteur EPH (Hattori *et al.*, 2000). Il a été mis en évidence qu'ADAM10 est constitutivement associée au domaine de liaison de l'EphA3 et que la formation du complexe l'EphA3/ephrin-A5 crée un site de liaison de haute affinité pour le domaine riche en cystéine d'ADAM10, qui se lie à aucun composant seul (Janes *et al.*, 2005). Cela se traduit par un « switch » conformationnel : le domaine métalloprotéase d'ADAM10 est positionné pour être

capable de cliver l'éphrine-A5 en trans. Le domaine riche en cystéine pourrait avoir un rôle régulateur de l'activité d'ADAM10.

- *La compartimentation membranaire* : Des travaux effectués sur le clivage d'APP suggèrent que la plupart des molécules d'ADAM10 semble être exclue des radeaux lipidiques (Harris *et al.*, 2009), en effet ADAM10 semble située dans les régions pauvres en cholestérol (Kojro *et al.*, 2010). L'appauvrissement en cholestérol de la membrane plasmique conduit à l'augmentation de l'activité d'ADAM10 tandis que son adressage par sa fusion avec une ancre-GPI artificielle dans les radeaux lipidiques (riches en cholestérol) inhibe son activité. La présence de cholestérol augmenterait la voie amyloïdogène et diminuerait la voie non amyloïdogène. En conséquence, la production et l'agrégation de peptide A $\beta$  seraient accrues (Grimm *et al.*, 2013). Le mécanisme d'action de la diminution du cholestérol sur l'augmentation du clivage par ADAM10 d'autres de ses substrats, tel que le récepteur pour l'IL-6, la chimiokine CX3CL1 et le CD44 reste encore à être éclaircir (Hundhausen *et al.*, 2007, Matthews *et al.*, 2003 ; Murai *et al.*, 2011).

- *Les inhibiteurs* : la famille des inhibiteurs tissulaires endogènes des métalloprotéinases, les TIMPs (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases), se compose de quatre membres : TIMP-1, -2, -3 et -4. Ce sont des molécules à deux domaines, un grand domaine N-terminal, responsable de l'inhibition et un petit domaine C-terminal, responsable de la spécificité pour les interactions protéines/protéines. Ce sont des molécules sécrétées par une variété de types cellulaires. Les ADAMs sont sélectivement inhibées par les TIMPs, ainsi ADAM10 peut être inhibée par TIMP-1 et-3, mais pas par TIMP-2 et -4 (Edwards et coll., 2008, Murphy, 2011, Postina 2012).

La protéine RECK (Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kasal motifs) est également un inhibiteur endogène d'ADAM10. Les RECKs n'ont aucune homologie de structure avec les TIMPs. La protéine RECK est une glycoprotéine membranaire à ancre-GPI d'environ 110 kDa. Des travaux ont permis de mettre en évidence la présence de RECK dans le cerveau de souris. La présence de RECK permet l'inhibition d'ADAM10 et donc la régulation de la voie de signalisation Notch au cours de la neurogenèse (Muraguchi *et al.*, 2007). Une étude récente a été effectuée sur l'association entre l'expression de RECK et l'activation du récepteur NOTCH dans des lignées cellulaires de cancer gastrique. Il en résulte que les protéases ADAM10 et ADAM17 sont co-inhibées par RECK ce qui inhibe l'activation de Notch et réprime la propriété souches des CCS ce qui atténue leur tumorigénicité *in vivo*. D'autres travaux suggèrent que l'interaction physique entre RECK et les deux protéases ADAMs s'effectue à la membrane plasmique (Hong *et al.*, 2014).

- *Les ions métalliques* : La forme cellulaire de la protéine prion (PrP<sup>c</sup>) est clivée de son ancrage membranaire GPI par l'action d'ADAM10 (Altmeyden *et al.*, 2011). Chez l'homme, une fois libre elle se trouve dans le milieu cellulaire et dans le liquide céphalorachidien. Le modèle dominant du clivage de la protéine PrP<sup>c</sup> suppose que le clivage- $\alpha$  et l'événement de « shedding » se font par voie enzymatique et constituent le processus normal. Cependant, le clivage- $\beta$  résulte d'une oxydo-réduction aberrante du cuivre et est associé au développement de maladies à prions. Des travaux récents ont permis d'identifier une structure tertiaire axée sur l'ion métallique entre les domaines N- et C-terminaux de la protéine PrP<sup>c</sup>, suggérant ainsi une évolution des rôles des protéases ADAMs, du cuivre et du zinc dans la protéolyse. Cette structure restreint la liberté conformationnelle du motif (résidus 91-125), qui englobe le site de clivage (Spevacek *et al.*, 2013).

Une étude récente portant sur le clivage alpha et beta de la protéine prion a été faite afin d'examiner les activités des protéases ADAM8, ADAM10 et ADAM17 dans les souris recombinantes avec la protéine prion PrP<sup>c</sup> (MoPrP<sup>c</sup>) en absence et en présence d'ions zinc et cuivre. (Une distribution anormale de cations métalliques essentiels (Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>,...) dans le cerveau serait responsable du stress oxydatif. Ce déséquilibre traduit un dérèglement de l'homéostasie des ions métalliques et peut entraîner une augmentation de la production de radicaux libres également connus sous le nom d'espèces réactives oxygénées ou ROS (Reactive Oxygen Species)). Ces travaux démontrent qu'en présence des ROS générées par les ions cuivre, ADAM8, ADAM10 et ADAM17 sont toutes capables de cliver la protéine MoPrP<sup>c</sup>, mais à des emplacements distincts. Ils ont également observé qu'en l'absence de ROS, ADAM8 clive la protéine MoPrP<sup>c</sup> aux deux sites de clivage alpha et beta d'une manière dépendante de l'ion cuivre et de l'ion zinc. En outre, le clivage- $\alpha$  a eu lieu à plusieurs endroits proches selon l'enzyme et son état. Ce qui suggère un nouveau modèle selon lequel les ions métalliques physiologiques réguleraient les enzymes agissant sur le « processing » de la protéine PrP<sup>c</sup>, en contrôlant également les clivages alpha et beta effectués par les protéases ADAMs (McDonald *et al.*, 2014).

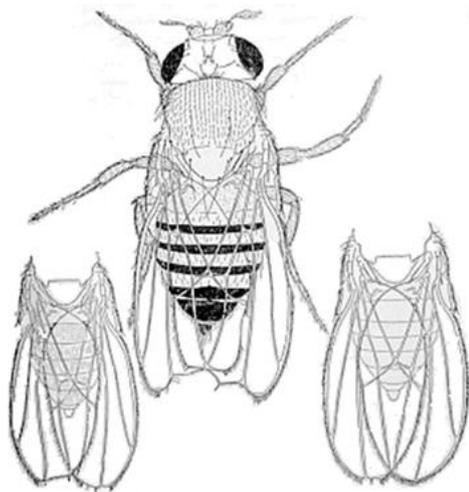
L'implication des ADAMs dans divers processus pathologiques mène au développement d'inhibiteurs synthétiques comme agent thérapeutique. La topologie de la cavité catalytique du domaine métalloprotéase, et en particulier sa profondeur et son hydrophobicité, sont essentielles pour la conception d'inhibiteurs synthétiques (Caescu *et al.*, 2009). Plusieurs inhibiteurs bloquant le clivage ont été identifiés, par exemple la 10-phénanthroline (agent chélateur), le GM6001 (galardine ou ilomastat, inhibiteurs réversibles des sites actifs à zinc des métallopeptidases), le GI254023X (inhibiteur ADAM10) et GW280264X (inhibiteur ADAM17), (Ludwig *et al.*, 2005 ; Edwards *et al.*, 2008 ; Willems *et al.*, 2010).

# La voie de signalisation NOTCH

---

Aucune cellule ne vit de manière isolée, les cellules adjacentes communiquent par des interactions cellule-cellule définissant un aspect essentiel du développement multicellulaire. La morphogénèse des métazoaires dépend d'un nombre limité de mécanismes d'interaction cellulaires fondamentaux conservés dont l'un est défini par la voie de signalisation Notch. Dans le cas de la voie de signalisation Notch, la protéine réceptrice (le récepteur Notch) est insérée dans la membrane plasmique, et la protéine qui interagit avec le récepteur (son ligand) se trouve sur une autre cellule. Dans de nombreuses voies de signalisation, la fixation du ligand à son récepteur mène à l'activation des facteurs de transcription et donc au contrôle de l'activité génique. Cette fonction normale de la voie de signalisation Notch est au cœur de la plupart des décisions du développement chez les animaux, et le dysfonctionnement de cette voie est impliqué dans de nombreuses maladies, y compris le cancer.

La voie de signalisation Notch a été mise en évidence lors d'études génétique portant sur la morphogénèse embryonnaire et la mutation Notch a ainsi été identifiée chez la drosophile dans le laboratoire de Thomas Hunt Morgan dans les années 1930. Les femelles hétérozygotes présentent des déchirures caractéristiques à l'extrémité des ailes, à l'origine du nom donné à cette mutation, notch signifie « encoche » en anglais (figure 19). La mutation est létale au stade embryonnaire chez les femelles homozygotes et les mâles hémizygotés (le gène est porté par le chromosome X). La létalité embryonnaire s'explique par des perturbations sévères du développement, entraînant notamment la formation incomplète du tube digestif, l'absence de différenciation du mésoderme et de l'hypoderme, et l'hypertrophie et la désorganisation du système nerveux. Ce fut l'une des premières mutations à mettre en évidence l'importance de certains gènes dans le développement embryonnaire (Artavanis-Tsakonas et Muskavitch 2010).



**Figure 19:** *Identification de la mutation Notch chez D.melanogaster. Sur les ailes des femelles hétérozygotes le phénotype peut-être, de gauche à droite, moyen, extrême et presque normal. D'après T.H.Morgan, The physical basis of heredity, 1919.*

Les signaux transmis par l'intermédiaire du récepteur Notch ont un rôle unique dans le développement: la signalisation Notch relie le destin d'une cellule à celle d'un voisin cellulaire par des interactions physiques entre le récepteur Notch et les ligands liés à la membrane qui sont exprimés dans une cellule voisine générant des événements de spécification latérale (Greenwald, 1998). La spécification latérale décrit le mécanisme par lequel une cellule, qui est en train d'adopter un destin cellulaire particulier, influence le destin cellulaire de la cellule voisine. En effet, ces différentes fonctions de la signalisation Notch peuvent être regroupées en deux types de processus en fonction de l'effet restrictif ou inductif de l'activation de Notch sur les destins cellulaires : le premier correspond à la restriction d'un destin cellulaire dans un groupe de cellules équipotentes au cours de l'inhibition latérale. Le second correspond à l'induction d'un nouveau destin cellulaire à la frontière entre deux populations de cellules.

Parmi les processus développementaux régulés par la signalisation Notch nous pouvons citer chez la drosophile : l'inhibition de la neurogenèse, la régulation de la gliogenèse et des lignages neuraux, l'inhibition de la myogenèse, l'induction de la polarité dorso-ventral de l'œil, ou encore de la régulation de l'hématopoïèse... Et en ce qui concerne les vertébrés : l'inhibition de la neurogenèse, la régulation des destins cellulaires dans l'oreille interne, l'inhibition de la myogenèse, l'induction de l'asymétrie droite/gauche, la régulation du développement des membres, de la somitogenèse, de la lymphopoïèse, du développement vasculaire, du développement des reins, etc... (Hori *et al.*, 2013).

Les conséquences sur le développement des signaux Notch sont strictement dépendant du contexte cellulaire, et peuvent soit influencer la différenciation (Liu *et al.*, 2010 ; Fre *et al.*, 2011 ; Colombo *et al.*, 2013), soit la prolifération, soit l'apoptose (Pallavi *et al.*, 2012). La voie Notch est conservée à travers les espèces (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Bray, 2006; Kopan et Ilagan, 2009).

Chez l'homme le mauvais fonctionnement du récepteur Notch, tels que des activations ou des inactivations aberrantes, a été associé à un large éventail de pathologies et plusieurs maladies héréditaires liées à des changements dans le destin des cellules et la prolifération cellulaire, y compris le cancer (tableaux 8 et 9), (Louvi et Artavanis-Tsakonas, 2012 ; Hori *et al.*, 2013 ; Penton *et al.*, 2012).

| MALADIE  | GENE   | PHENOTYPE   | REFERENCES   |
|--|--|---|--|
| le syndrome Alagille                               | <i>JAG1, NOTCH2</i>                                    | caractérisé par des anomalies du développement du cœur, du foie, des yeux et du squelette. Un ictère néonatal et une cholestase sont les symptômes précoces de la maladie   | Li, Krantz <i>et al.</i> , 1997;<br>Oda <i>et al.</i> , 1997 |
| le syndrome CADASIL                                | <i>NOTCH3</i>  | (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarct and Leukoencephalopathy), caractérisé par des troubles vasculaires autosomaux lié à des accidents vasculaires cérébraux, par des formes de démences, par des migraines et par une mort prématurée. | Joutel, <i>et al.</i> , 1996                                 |
| les leucémies lymphoblastiques aiguës à cellules T | <i>NOTCH1</i><br>(mutation dans le domaine HD ou PEST) | tumeur dérivée des progéniteurs des cellules T. Les symptômes sont l'anémie et le grossissement des ganglions lymphatiques dans le foie et/ou la rate.  | Weng and Aster 2004;<br>Ellisen <i>et al.</i> , 1991         |
| certaines formes de dysostoses spondylo-costales   | <i>DLL3</i> , Lunatic fringe                           | caractérisé par des anomalies de la segmentation vertébrale et costale parfois accompagnées de malformations costales   | Bulman <i>et al.</i> , 2000                                  |

**Tableau 8:** Pathologies humaines dues à des mutations des récepteurs NOTCH ou de leur ligand, d'après Hori *et al.*, 2013.

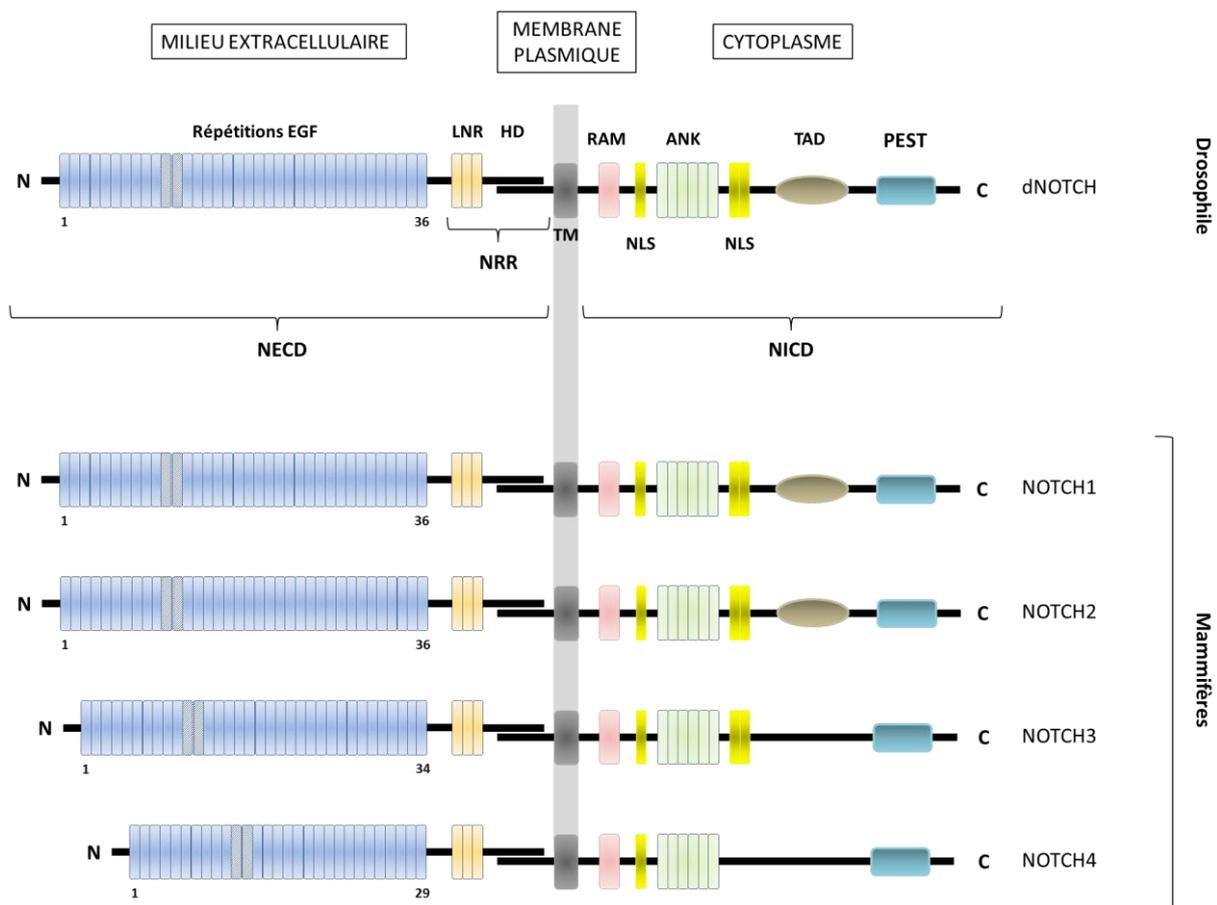
| GENE SUPPOSE  | ROLE DE NOTCH          | MALADIES  |
|---------------|------------------------|---|
| <i>NOTCH1</i> | oncogène               | adénocarcinome ductal pancréatique                    |
| <i>NOTCH2</i> | suppresseur de tumeurs |   |
| <i>NCSTN</i>  | suppresseur de tumeurs | leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)            |
| <i>MAML1</i>  |                        |   |
| <i>APHA1</i>  |                        |   |
| <i>NOTCH2</i> |                        |   |
| <i>NOTCH1</i> | oncogène               | leucémie lymphoïde chronique (LLC)                    |
| NOTCH activé  | suppresseur de tumeurs | carcinome hépatocellulaire (CHC)                      |
| <i>NOTCH1</i> | suppresseur de tumeurs | Carcinome de la tête et du cou à cellules squameuses. |
| <i>NOTCH2</i> |                        |   |
| <i>NOTCH3</i> |                        |   |
| <i>NOTCH</i>  | suppresseur de tumeurs | leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de type B     |
| <i>NOTCH1</i> | oncogène               | cancer du poumon non à petites cellules               |
| <i>NOTCH1</i> | oncogène               | leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de type T     |

**Tableau 9:** Gènes NOTCH impliqués dans les pathologies humaines acquises, d'après Hori *et al.*, 2013.

# 1- Les récepteurs Notch et leurs ligands

## 1.1- La structure des récepteurs

Les récepteurs Notch sont des protéines transmembranaires, d'environ 2500 acides aminés, qui communiquent les signaux lors de la liaison aux ligands transmembranaires exprimés sur les cellules adjacentes. *D. melanogaster* possède un seul gène Notch, *C.elegans*, deux (GLP-1 et LIN-12) et *H.sapiens* en possèdent quatre (Notch -1 à -4). Le récepteur Notch est composé de domaines distincts qui sont essentiellement conservés dans l'ensemble des espèces (figure 20). L'ectodomaine du récepteur Notch est composé d'une série de répétitions EGF-like N-terminal qui sont responsables de la liaison au ligand. Le nombre de répétitions EGF-like varie selon les espèces et le sous-type du récepteur.



**Figure 20 :** Organisation schématique des domaines des récepteurs Notch.

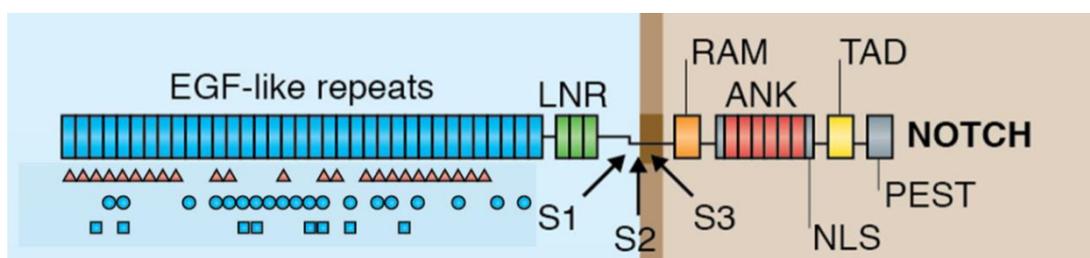
Les domaines de N- vers C-terminal : EGF (Epidermal Growth Factor), LNR= Lin-12/Notch Repeats, HD=Domaine d'Hétérodimérisation, TM= passage TransMembranaire, RAM= RBP-J Associated Molecule, ANK= domaine ANKyrine, NLS= Signal de Localisation Nucléaire, TAD= Domaine de TransActivation, PEST= domaine riche en Proline, Glutamate, Sérine et Thréonine, NRR= Région de Régulation Négative. Les répétitions, EGF-like 11 et 12, responsables de la fixation du ligand sont représentées en bleu clair. D'après Kovall et Blacklow, 2010.

Le domaine extracellulaire de Notch (NECD) contient entre 29 et 36 répétitions EGF-like (Epidermal Growth Factor-like repeats), parmi elles les répétitions EGFr11 et EGFr12 de la drosophile (d) et de l'homme (h) sont nécessaires et suffisantes pour l'interaction ligand-récepteur (Fehon *et al.*, 1990 ; Rebay *et al.*, 1991). Chez la drosophile les répétitions EGFr 24, 25, 27 ou 29 (mutation Abruptex) régulent négativement ces interactions.

## 1.2- Modification post-traductionnelle : la glycosylation

Les répétitions EGF du récepteur Notch sont soumises à des modifications post-traductionnelles de type : O-glycosylation, O-fucosylation et O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAc), (figure 21), (Rana et Haltiwanger, 2011 ; Andersson *et al.*, 2011). Sur les 23 sites consensus potentiels pour la O-fucosylation de Notch1 humain, 13 ont été conservés au cours de l'évolution, y compris la thréonine 466 dans la répétition EGF-12 de la région centrale de la liaison au ligand. Plusieurs études ont mis l'accent sur la structure des répétitions EGF-11 et EGF-12, la région de liaison au ligand. Notamment sur le site O-fucose dans le domaine de liaison au ligand (EGF 12) et les sites O-fucose ou O-glucose individuels dans la région de Abruptex (EGF 26, 27 et 28). Ces travaux indiquent que l'O-glycosylation de ces sites joue un rôle indispensable dans la fonction du récepteur Notch1 (Rana et Haltiwanger, 2011).

Chez les mammifères, l'interaction de Notch avec ses ligands de la famille DSL (Delta/Serrate/LAG-2) est dépendante de leur entité glucidique, notamment de leurs O-fucosylglycanes et O-glucosylglycanes greffés sur des domaines EGF-like. Ces modifications post-traductionnelles sont cruciales pour le repliement adéquat des récepteurs Notch ce qui permet la modulation de l'activité des récepteurs Notch en réponse aux différents ligands chez la drosophile et chez les mammifères (Kopan et Ilagan, 2009).

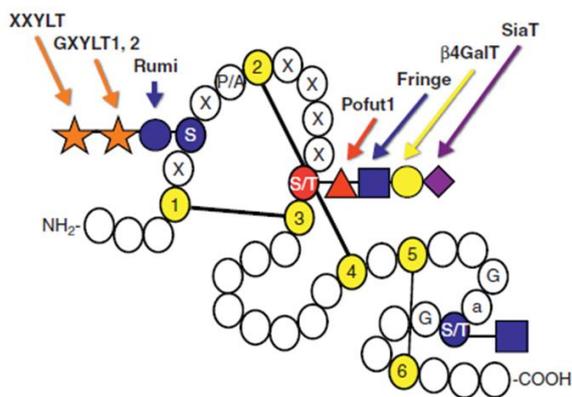


**Figure 21 :** Structure du récepteur Notch et représentation schématique des glycosylations sur les répétitions EGF du domaine extracellulaire.

Les triangles rouges représentent les O-fucosylations, Les ronds bleus représentent les O-glycosylations, et les carrés bleus représentent les O-N-acétylglucosaminylation. D'après Hori *et al.*, 2013.

Après sa traduction, Notch est d'abord fucosylé sur des répétitions EGF par une O-fucosyltransférase, qui est codée par le gène O-fut1 (POFUT1 dans les mammifères), dans le réticulum endoplasmique. La O-fucosyltransférase initie l'O-fucosylglycane par le greffage d'un O-fucose sur plusieurs répétitions EGF-like de Notch qui hébergent le motif consensus C2-x-x-x-x-(S/T)-C3 (Okajima et Irvine, 2002). C2 et C3 sont les deuxièmes et troisièmes cystéines du domaine EGF et S/T est l'acide aminé modifié (Wang *et al.*, 2001 ; Luo et Haltiwanger, 2005), (Figure 22). Il a également été démontré que l'enzyme O-FUT1 chez la Drosophile fonctionne comme un chaperon pour promouvoir le repliement et/ou le transit de Notch à la membrane plasmique (Okajima *et al.*, 2005 ; Sasamura *et al.*, 2007).

L'étape de O-fucosylation est indispensable pour l'addition successive de glucose sur le fucose par la  $\beta$ 1,3-N-acétylglucosaminyltransférase, Fringe. La glycosylation de Notch par Fringe, dans son domaine d'interaction avec les ligands, sur les répétitions EGF module son affinité pour tel ou tel ligand et donc l'activité du récepteur (Moloney *et al.*, 2000 ; Bruckner *et al.*, 2000). Ainsi, l'addition par Fringe d'un résidu N-acétyl-glucosamine (GluNAc) sur l'EGFR12 de Notch chez la drosophile est suffisante pour augmenter son affinité pour Delta et diminuer son affinité pour Serrate (Xu *et al.*, 2007). Les trois paralogues de la protéine Fringe chez les mammifères sont connus comme Lunatic Fringe (Lfng), Manic Fringe (Mfng) et Radical Fringe (Rfng). Ils catalysent l'addition de N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur le O-fucose (Rana et Haltiwanger, 2011). Ces modifications par Fringe altèrent la sensibilité des récepteurs Notch aux ligands DSL. L'extension de ce disaccharide chez les mammifères est catalysée par l'action séquentielle d'une  $\beta$ 1,4-galactosyl transférase et une  $\alpha$ -2, 3 ou - 2,6 sialyltransférase. Cet allongement supplémentaire de la modification de sucre avec un galactose et l'acide sialique a été observé pour Notch chez les mammifères, mais pas chez la drosophile (Rana et Haltiwanger, 2011). Une protéine de réticulum endoplasmique, une O-glycosyltransférase appelé Rumi, identifiée chez la drosophile (Acar *et al.*, 2008) ajoute un O-glucose sur un résidu sérine de la séquence consensus C1-x-S-x-P-C2 dans les répétitions de l'EGF de Notch. Le O-glucose peut être allongé par l'addition du xylose, figure 22 (Acar *et al.*, 2008 ; Rana et Haltiwanger, 2011). De plus, la perte d'activité de Rumi (dans des conditions restrictives dans des mutants thermosensibles) entraîne une accumulation intracellulaire des récepteurs Notch. L'O-glycosylation de Notch par Rumi semble permettre le repliement et/ou le trafic du récepteur à la membrane cellulaire et donc sa signalisation.



**Figure 22 :** Représentation schématique de la structure des répétitions EGF-like et des glycosylation du récepteur Notch.

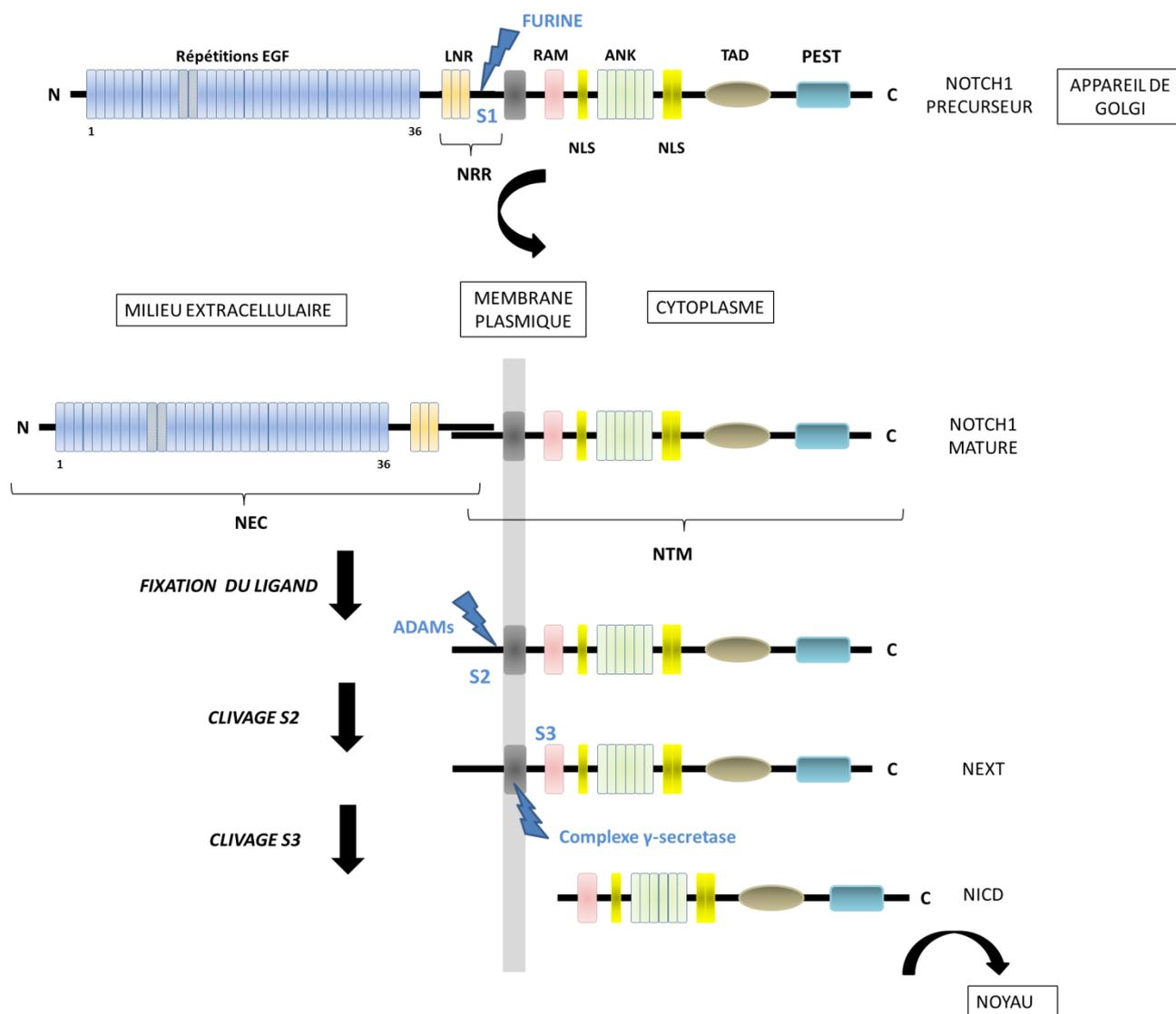
Les répétitions EGF sont des séquences de 40 acides aminés définies par la présence de six résidus cystéines conservés (jaune) qui forment les trois ponts disulfures. Les sites potentiels d'O-glycosylation (C1-x-S-x-P/A-C2), d'O-fucosylation (C2-x-x-x-x-S/T-C3) et la modification O-GlcNAc (aucune séquence consensus définie, mais elle est observée dans la région entre les cystéine-5 et cystéine-6 sur une Serine ou Thréonine suivant une Glycine et un résidu aromatique (a) et qui précède une autre Glycine) sont indiqués en rouge ou en bleu. Les glycosyltransférases responsables de l'ajout de chaque sucre sont indiqués par des flèches. D'après Kovall et Blacklow, 2010.

### 1.3 - La maturation des récepteurs

Le récepteur fonctionnel Notch est exprimé à la surface cellulaire comme un hétérodimère avec un grand domaine extracellulaire (NECD) qui est attaché de façon non covalente au fragment C-terminal transmembranaire/intracellulaire. L'hétérodimère est généré dans la voie sécrétoire (pendant son trafic dans l'appareil de Golgi). Au cours de la maturation, le précurseur Notch subit un clivage protéolytique (Kopan *et al.*, 1996) par une furine convertase, le clivage S1 (Logeat *et al.*, 1998), ce qui donne deux sous-unités associées de façon non covalente (figure 23). Les deux sous-unités associées, appelées Notch ExtraCellulaire (NEC) et Notch TransMembranaire (NTM), constituent la forme hétérodimérique mature de la protéine présente à la surface cellulaire (Blaumueller *et al.*, 1997).

Le domaine NEC est suivi par la région régulatrice négative, NRR (Negative Regulatory Region), qui est composée de trois répétitions riches en cystéine LNR (Lin12-Notch Repeat), et d'un domaine d'hétérodimérisation. Les motifs LNR sont uniques aux récepteurs Notch et empêchent l'activation prématurée des récepteurs (Greenwald et Seydoux, 1990 ; Rand *et al.*, 2000 ; Sanchez-Irizarry *et al.*, 2004). Le domaine d'hétérodimérisation (HD) de Notch est divisé lors de son adressage à la membrane plasmique (par le clivage S1), ainsi sa partie N-terminale (HD-N) met fin au domaine NEC et sa partie C-terminale (HD-C) constitue le début du domaine NTM. Cette région de régulation négative empêche l'accès des métalloprotéases, (ADAM10/ADAM17) sur le site de clivage S2 de Notch en l'absence du ligand (Bray, 2006 ; Kopan et Ilagan, 2009) et empêche donc l'activation de Notch. Après la région extracellulaire HD-C, le domaine NEC possède un segment transmembranaire (NTM) et une région intracellulaire (ICN), qui se compose d'un domaine RAM (RBPjk association module,

domaine initialement appelé « RAM23 ») qui constitue un module d'interaction protéique, (Tamura *et al.*, 1995). Ce domaine est suivi par sept répétitions ankyrine (ANK) flanquées de signaux de localisation nucléaire (NLS), un domaine de transactivation (TAD, Transcriptional Activation Domain peu conservé absent de hNOTCH 3 et 4) et une région PEST (proline/glutamic acid/serin/threonine-rich) qui participe à la dégradation des protéines et régule la stabilité de NICD (Fryer *et al.*, 2004 ; Rechsteiner et Rogers, 1996). Les domaines RAM et ANK sont essentiels pour l'interaction avec le complexe transcriptionnel.



**Figure 23 :** Représentation schématique des étapes de maturation du récepteur Notch et d'activation de la voie de signalisation.

Au cours de sa maturation dans la voie sécrétoire, le récepteur Notch est clivé au site S1 par une furine convertase, générant une molécule hétérodimérique associée de façon non covalente. Lors de l'activation de la voie de signalisation par la liaison d'un ligand DSL au récepteur Notch, à la surface cellulaire, le site de clivage S2 est accessible et l'hétérodimère est clivé par des protéases de la famille ADAM. Le fragment de Notch restant incorporé à la membrane, NEXT (Notch EXtracellular Truncation) est ensuite clivé au site S3 par le complexe  $\gamma$ -sécrétase, générant le fragment intracellulaire de Notch (NICD), qui transloque vers le noyau, où il participe directement à la régulation de la transcription de gènes cibles.

## 1.4- Les ligands

### 1.4.1- Structure des ligands Notch canoniques

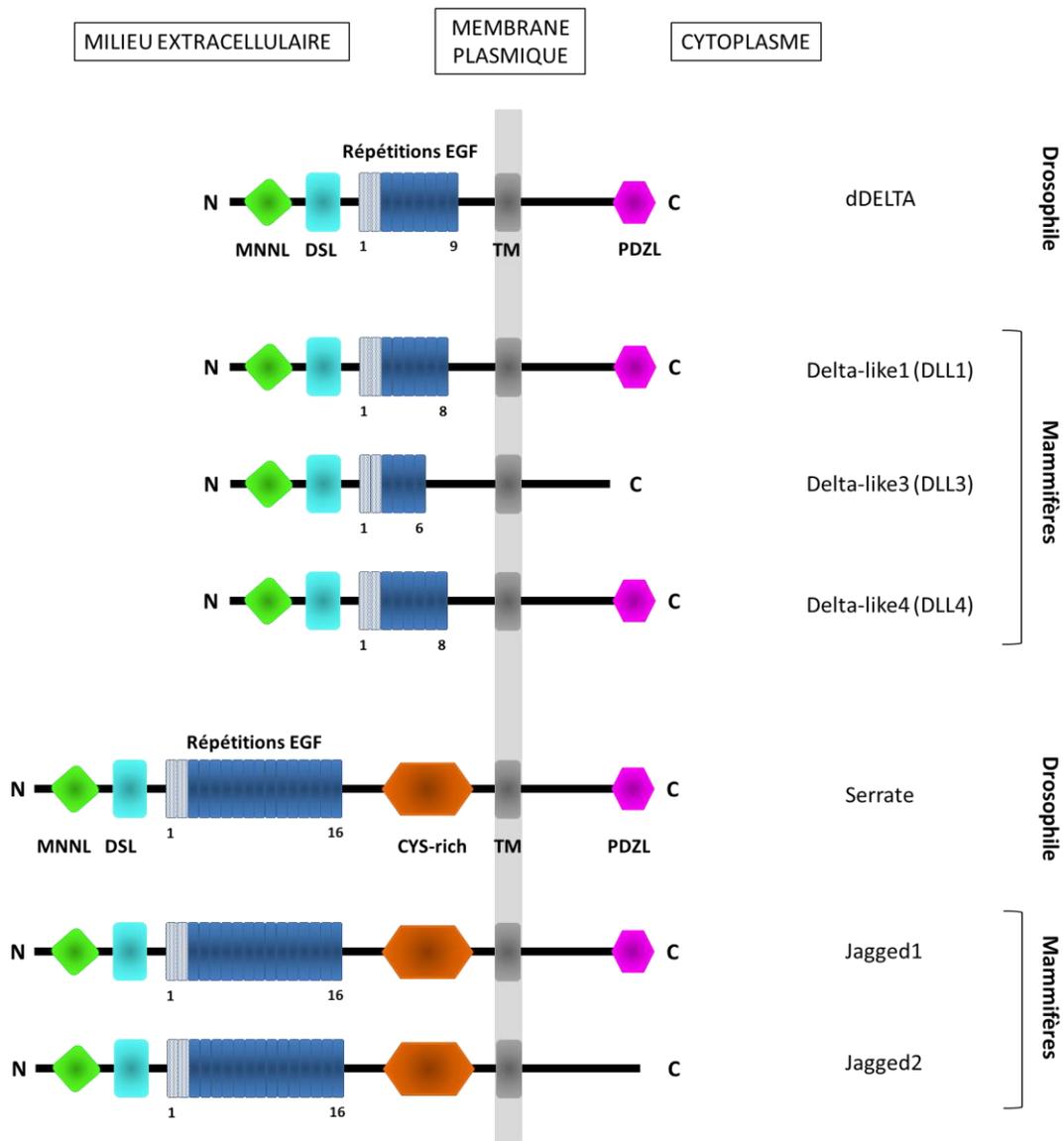
Les ligands des récepteurs Notch ont été conservés au cours de l'évolution (D'Souza *et al.*, 2008). La majorité de la signalisation Notch est induite par une famille de ligands qui sont des protéines transmembranaires et se caractérisent par la présence d'un domaine DSL (Delta, Serrate et Lag2), (Kopan et Ilagan, 2009 ; Rana et Haltiwanger, 2011).

Les mammifères possèdent trois ligands de type Delta, appelés Delta-like 1 (DLL1), Delta-like 3 (DLL3), et Delta-like 4 (DLL4) et deux homologues de Serrate, nommée Jagged-1 et Jagged-2 (JAG1 et JAG2, respectivement). *D. melanogaster* possède deux ligands (Delta et Serrate). Les différentes catégories de ligands de Notch sont caractérisées par trois domaines structuraux (figure 24) : un domaine DSL (Delta/Serrate/LAG-2), un domaine DOS (Delta et OSM-11 like protein), (Komatsu *et al.*, 2008) qui correspond à des répétitions EGF en tandem spécialisées, et des répétitions EGF-like (liaison du calcium et liaison non-calcique).

Les motifs du domaine DSL sont conservés et sont requis pour l'interaction avec le récepteur Notch. Les ligands DSL peuvent aussi être classés sur la base de la présence (pour Jagged/Serrate) ou l'absence (pour Delta) d'un domaine riche en cystéine dont la fonction n'est pas connue ; et par la présence ou l'absence d'un domaine DOS également impliqué dans l'interaction avec le récepteur. Les ligands Delta et Serrate présentent également un arrangement de domaine modulaire, avec un domaine N-terminal MNL (Module at the N-terminus of Notch Ligands), suivi du domaine Serrate-Delta-LAG2 (DSL).

Les domaines intracellulaires de certains ligands canoniques contiennent un motif PSD-95/Dlg/ZO-1-ligand (PDZL) qui lie les protéines à domaines PDZ (D'Souza *et al.*, 2010).

Tous les ligands possèdent un nombre variable de répétitions supplémentaires EGF-like avant le segment transmembranaire et la queue cytoplasmique C-terminale. La famille des ligands Serrate se distingue des ligands Delta par un plus grand nombre de répétitions EGF et par la présence d'un domaine riche en cystéine supplémentaire qui précède immédiatement la région transmembranaire.



**Figure 24 :** Organisation schématique des domaines des ligands de Notch.

Les domaines de N- vers C-terminal :Domaine N-terminal MNNL (Module at the N-terminus of Notch ligands), domaine Serrate-Delta-LAG2 (DSL), deux variants de répétitions EGF-like également dénommées le domaine DOS (OSM-11-like proteins, important pour la signalisation), en bleu clair, EGF( Epidermal Growth Factor-like), CYS-rich=domaine riche en cystéines, TM= passage TransMembranaire, PDZL= PSD-95/Dlg/ZO-1-ligand. D'après Kovall et Blacklow, 2010

#### 1.4.2- Structure des ligands Notch non-canoniques

En plus de la modification de la voie de signalisation Notch canonique par diverses protéines, de nombreux travaux indiquent que les voies non-canoniques existent et sont capables d'activer les gènes cibles, mais pas par l'activation traditionnel du récepteur Notch (et le clivage du NICD), (Martinez Arias *et al.*, 2002). Ces voies non-canoniques peuvent faciliter le dialogue avec d'autres voies de signalisation intracellulaire.

Par exemple dans le développement, avec hedgehog et Wnt pour intégrer des signaux environnementaux dans les réponses cellulaires organisées (D'Souza *et al.*, 2010).

Par contraste avec les ligands canoniques, les ligands non canoniques n'ont pas le domaine DSL et regroupent des protéines de structures diverses, par exemple des protéines membranaires à ancre-GPI qui sont supposées moduler l'activité des récepteurs Notch ainsi que des protéines sécrétées. La fonction et la structure des ligands non-canoniques sont moins bien caractérisées. Ils sont retrouvés dans le système nerveux central et dans les cellules cultivées (par exemple, F3/Contactin1, NB-3/Contactin6, DNER, MAGP1 et MAGP2), (D'Souza *et al.*, 2010). Toutefois, ces activités ont été en grande partie inexplorées, et les fonctions physiologiques de ces protéines dans la voie Notch restent à élucider.

## **2- La voie de signalisation Notch**

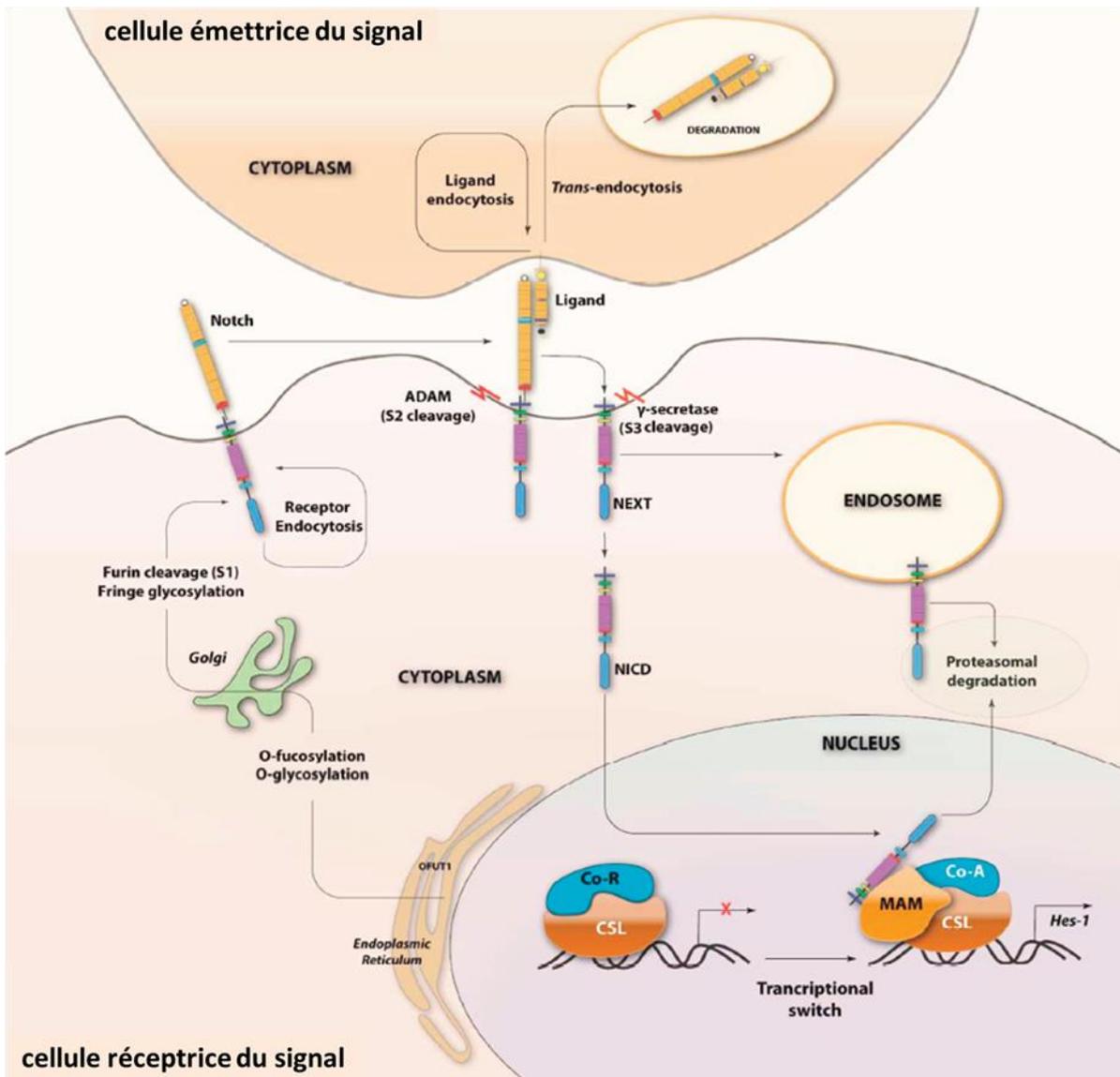
La signalisation NOTCH est une voie ancestrale hautement conservée qui est essentielle dans le développement (Hartmann *et al.*, 2002). Le récepteur Notch est synthétisé sous la forme d'un précurseur (300-350 KDa) dans le réticulum endoplasmique (figure 25). Le récepteur est ensuite glycosylé et subit un clivage protéolytique au niveau du site 1 (S1) dans l'appareil de Golgi, ce qui donne un hétérodimère formé de deux parties qui sont maintenues ensemble par une interaction non covalente et est exprimé sur la membrane cellulaire d'une cellule « réceptrice du signal ». Le récepteur fonctionnel Notch est alors formé d'un grand domaine extracellulaire, le NECD (Notch ExtraCellular Domain) qui est attaché de façon non covalente au fragment C-terminal intracellulaire, le NICD (Notch IntraCellular Domain).

La signalisation est initiée quand un ligand présenté par la cellule « émettrice du signal » interagit avec les répétitions EGF-like du récepteur (Bray, 2006 ; Kopan et Ilagan, 2009). L'activation du récepteur Notch par la liaison du ligand induit des changements de conformation et expose le site 2 (S2) du récepteur Notch pour le clivage par des métalloprotéases ADAM (ADAM10/ADAM17), générant le fragment NEXT (Notch EXtracellular Truncation), qui reste attaché à la membrane jusqu'à l'action du complexe gamma-sécrétase. La  $\gamma$ -sécrétase clive ensuite NEXT au site 3 (S3) pour libérer un fragment intracellulaire soluble de Notch le NICD (Mumm *et al.*, 2000 ; Brou *et al.*, 2000). Le fragment NECD est trans-endocyté dans la cellule émettrice du signal avec son ligand (Gordon *et al.*, 2008).

Le fragment NICD soluble est transloqué dans le noyau où il s'associe avec la protéine se liant à l'ADN, le complexe CSL (appelé aussi RBPJ), (Hori *et al.*, 2013).

Le co-activateur transcriptionnel MAM reconnaît CSL/NICD et ce complexe protéique recrute des co-activateurs supplémentaires pour activer la transcription des gènes cibles. En l'absence de NICD, CSL peut s'associer à des co-répresseurs et des histone-désacétylases pour réprimer la transcription des gènes cibles (Kopan et Ilagan, 2009).

Des modifications telles que l'ubiquitination ou l'adressage vers les endosomes jouent un rôle important en régulant l'activité des récepteurs Notch et en régulant l'activation indépendante du ligand (Hori *et al.*, 2013 ; Vaccari *et al.*, 2009). Plusieurs études ont démontré l'existence d'autres voies alternatives d'activation des récepteurs Notch, en particulier lorsque le récepteur est trié dans des compartiments d'endocytose (Fortini *et al.*, 2009 ; Yamamoto *et al.*, 2010 ; Wilkin *et al.*, 2008). Dans certaines circonstances un récepteur engagé dans la voie lysosomale peut être détourné dans une voie d'activation d'une manière indépendante du ligand (Hori *et al.*, 2011).



**Figure 25:** Vue d'ensemble de la voie de signalisation Notch canonique et la transduction du signal.

La signalisation Notch avec les ligands DSL (Jagged et Delta dans les cellules de mammifères) nécessite deux cellules adjacentes. La cellule réceptrice du signal (en bas) exprime Notch sous forme d'un hétérodimère maintenu ensemble par des interactions non covalentes. L'activation par des ligands DSL dans la cellule émettrice du signal (en haut) se traduit par un clivage de Notch par des ADAMs (S2), qui permet un clivage intramembranaire par le complexe gamma-sécrétase de Notch (S3) et de la migration de son domaine intracellulaire (NICD) dans le noyau, où NICD module la transcription des gènes avec le complexe CSL/Mastermind (Mam). La signalisation nécessite l'endocytose dans la cellule émettrice du signal. Les forces générées par la trans-endocytose peuvent provoquer un changement de conformation de Notch qui conduit à l'activation. NECD: domaine extracellulaire de Notch ; NICD : domaine intracellulaire de Notch ; NEXT : domaine extracellulaire tronqué de Notch; CSL : CBF1/Suppressor of Hairless/LAG-1; MAM: Mastermind; Co-A: Co-activateurs ; Co-R: Co-répresseurs (D'après Kopan et Ilagan, 2009 et Yavropoulou et Yovos, 2013).

## 2.1- Les cis- et trans-interactions

La voie de signalisation Notch canonique est activée quand un ligand DSL se lie à un récepteur Notch sur une cellule voisine en trans, ce qui déclenche le clivage protéolytique du récepteur Notch et l'endocytose de son NECD dans la cellule émettrice du signal (Fortini, 2009). Ce mécanisme libère le NICD, qui est transloqué vers le noyau où interagit avec le complexe CSL (également connu sous le RBP-Jk) pour initier la transcription de gènes cibles (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999 ; Fortini, 2009). En revanche, l'interaction des ligands et des récepteurs Notch au sein de la même cellule en cis conduit à l'inhibition de la signalisation (del Álamo *et al.*, 2011). En effet, lorsque le ligand et le récepteur sont exprimés sur des cellules différentes, on parle de trans-interactions et ils définissent des événements d'activation, c'est-à-dire un rôle activateur en *trans*, sur l'activité de Notch dans la cellule adjacente. D'autre part lorsque le ligand et le récepteur sont exprimés sur une même cellule on parle de cis-interactions et celles-ci sont inhibitrices (figure 26), (Sprinzak *et al.*, 2010 ; del Álamo *et al.*, 2011).

Il a été mis en évidence que les ligands DSL peuvent cis-inhiber la capacité d'une cellule à recevoir un signal Notch, et que cet effet dépend de l'interaction des domaines extracellulaires des récepteurs et des ligands d'une même cellule (Jacobsen *et al.*, 1998 ; D'Souza *et al.*, 2008).

Les récepteurs Notch peuvent réciproquement bloquer les ligands DSL dans une même cellule émettrice du signal (Becam *et al.*, 2010 ; Del Álamo et Schweisguth, 2009). Un modèle a été suggéré, à partir d'études *in vitro*, dans lequel le ligand cis-inhibiteur du récepteur et le récepteur cis-inhibiteur du ligand représentent un seul et même processus, avec des ligands et des récepteurs dans la même cellule formant un complexe inactif qui les empêche tous les deux d'interagir en trans avec la cellule voisine.

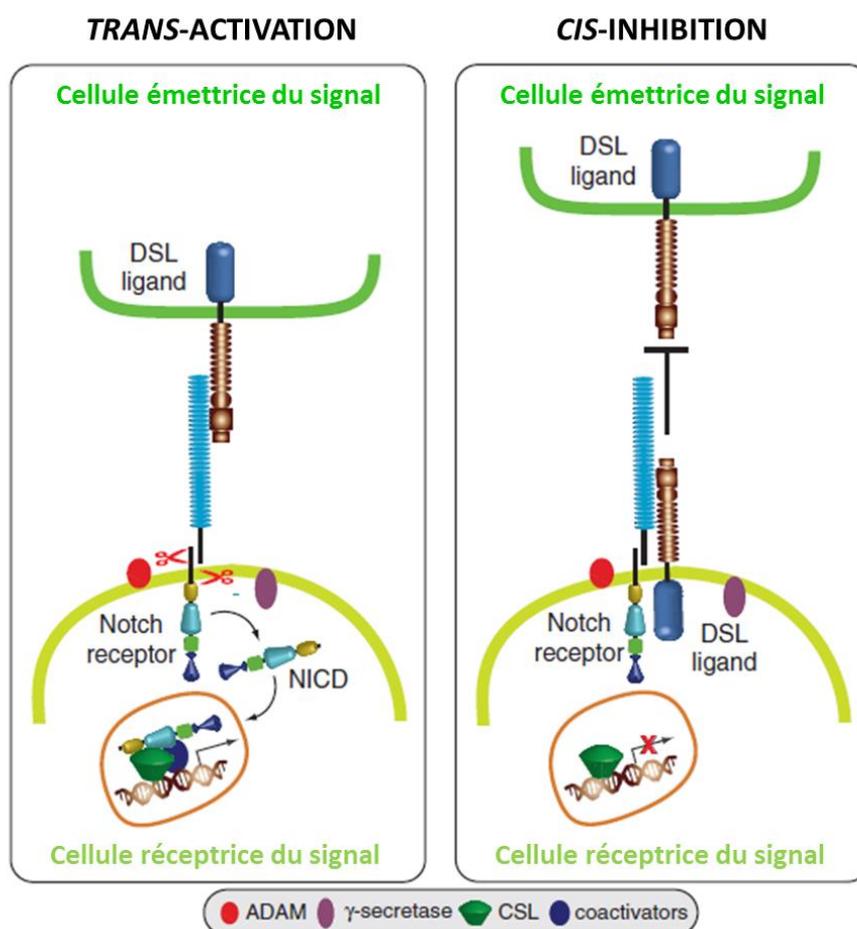
Le mécanisme sous-jacent de la *cis*-inhibition n'est pas connu, mais l'interaction ligand/récepteur en *cis* pourrait entrer en compétition avec l'interaction en *trans*. Il a été suggéré que ces interactions réciproques cis-inhibitrices entre les récepteurs et les ligands dans la voie de signalisation Notch et d'autres voies de signalisation (telle que l'Ephrine), lors du développement du système nerveux, pourraient jouer un rôle important dans la signalisation cellulaire notamment dans la détermination de destin cellulaire (Yaron et Sprinzak, 2012).

Une étude récente a été réalisée afin de déterminer comment les ligands et les récepteurs pourraient contrôler la spécificité et l'orientation de la voie de signalisation dans le développement. Au sein d'une même cellule (en *cis*), les auteurs ont analysés les interactions

récepteurs-ligand pour Notch1, Dll1 et Jag1 selon l'expression de la protéine Fringe dans les cellules de mammifères.

Il en ressort que les ligands Dll1 et Jag1 pourraient cis-inhiber Notch1 et que Fringe régulerait ces interactions d'une façon semblable aux trans-interactions. De plus, Fringe régulerait de façon similaire les cis-interactions récepteur-ligand lors du développement de *D.melanogaster* (LeBon *et al.*, 2014).

Ces interactions sont un facteur crucial qui distingue la cellule receveuse du signal, du signal envoyé par une cellule émettrice, et prend une part importante dans le développement et dans le rôle de la signalisation Notch dans les diverses pathologies.



**Figure 26:** Représentation schématique de la trans-activation et de la cis-inhibition dans la voie de signalisation Notch.

**La trans-activation :** le ligand (exprimé à la surface de la cellule émettrice du signal) se lie au récepteur Notch (exprimé à la surface de la cellule réceptrice du signal) et induit des clivages séquentiels par les protéases ADAMs puis par le complexe  $\gamma$ -sécrétase dans le domaine TM du récepteur Notch, libérant le domaine intracellulaire (NICD) de la membrane. NICD transloque vers le noyau où il interagit avec le facteur de transcription CSL et recrute des co-activateurs pour induire l'expression des gènes cibles.

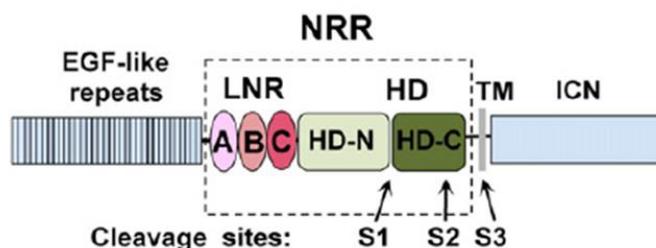
**La cis-inhibition:** le ligand de Notch est exprimé dans la même cellule que le récepteur lui-même, ce qui empêche l'activation de Notch par compétition avec le trans-ligand. (D'Souza *et al.*, 2010)

## 2.2- Le clivage S2 par ADAM10 ou ADAM17

L'activation du récepteur Notch par la liaison du ligand déclenche un deuxième clivage de NECD, « clivage S2 », qui permet le « shedding » du NECD. Ce clivage S2 est effectué par des membres de la famille des métalloprotéases ADAM, ADAM10 ou ADAM17. La région régulatrice de Notch, NRR (Negative Regulatory Region) contient la région LNR qui est composée de trois répétitions riches en cystéine Lin12-Notch Repeat (LNR) et un domaine d'hétérodimérisation (HD), (figure 27) :

**Figure 27:** Organisation de la région extracellulaire NRR (pointillés).

Elle se compose de trois motifs LNRs (LNR-A, LNR-B et LNR-C), représentés en nuances de rose et un domaine HD (N- et C-terminal), en nuances de vert. Le domaine transmembranaire de Notch (TM), la région intracellulaire (ICN), et les trois sites de clivages protéolytiques principaux (S1, S2, S3) sont indiqués. D'après Gordon *et al.*, 2007

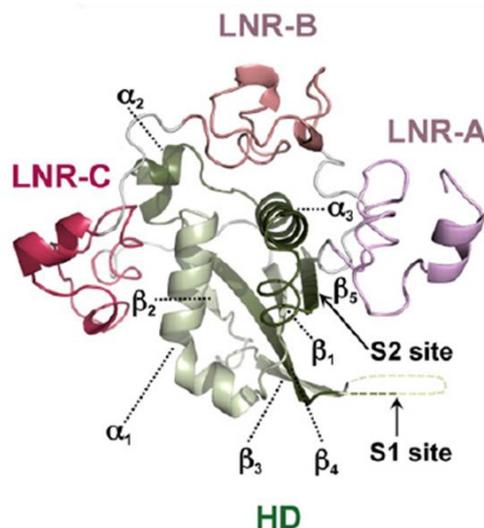


Les premières études génétiques et moléculaires ont soulignées l'importance de la région juxtamembranaire des récepteurs Notch comme une importante région de régulation négative (NRR : Negative Regulatory Region), qui contrôle la signalisation (Kopan *et al.*, 1996 ; Lieber *et al.*, 1993 ; Rebay *et al.*, 1993). Lorsque la structure de la NRR est perturbée par des mutations ponctuelles (Weng *et al.*, 2004), une intégration virale (Girard *et al.*, 1996), un anticorps agoniste (Li *et al.*, 2008 ; Tiyantont *et al.*, 2013), Notch est constitutivement activé. En revanche, lorsque la structure de la NRR est perturbée par des anticorps inhibiteurs (Tiyantont *et al.*, 2013), la NRR est stabilisée dans un état « off ». L'analyse par cristallographie de la structure de la NRR a révélée que le site S2 est profondément enfoui à l'état d'auto-inhibition, dans une poche qui le rend inaccessible aux métalloprotéases. La liaison du ligand au NECD induit un changement conformationnel dans la NRR qui expose le site S2 et permet l'accès de la métalloprotéase (Gordon *et al.*, 2007 ; Gordon *et al.*, 2009).

Selon le modèle de la région LNR de NOTCH1 (Vardar *et al.*, 2003), les modules de cette région se replient régulièrement et forment une petite structure secondaire. Chacun contient trois ponts disulfures avec une connectivité caractéristique et une liaison à l'ion calcium coordonné par des résidus acides et polaires. Les deux premières LNRs (A et B) sont reliées par un lien très conservé, bien ordonné de dix résidus et partagent une interface hydrophobe formée par l'empilement des résidus aromatiques. En revanche, LNR-C n'a aucun contact

direct avec soit A ou B et le lien à six résidus raccordant LNR-B à C est mal conservé (figure 28) :

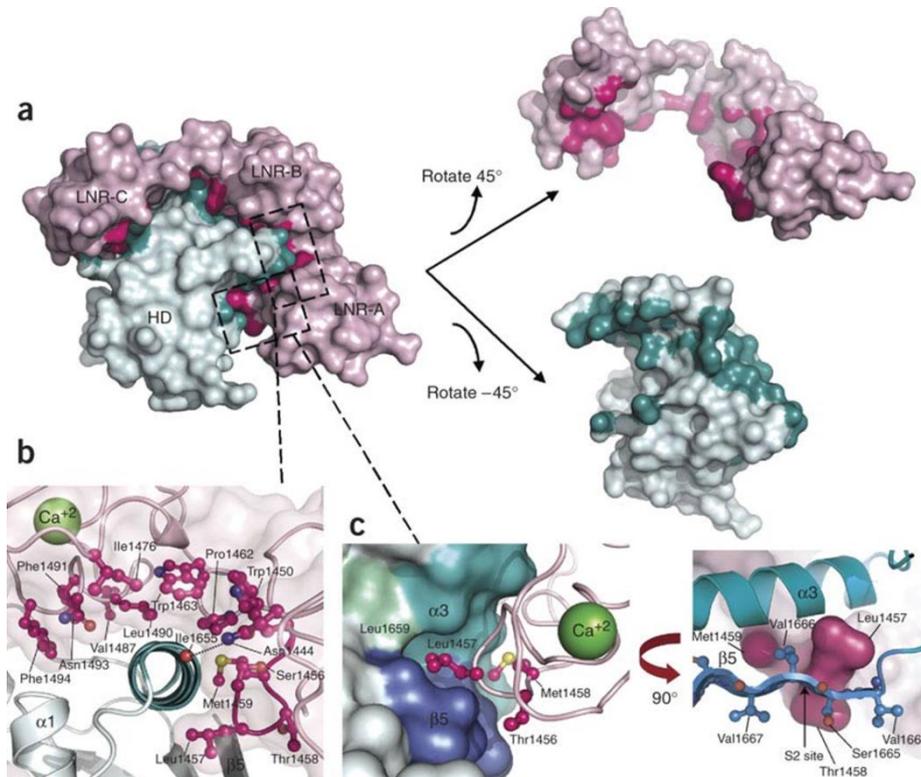
**Figure 28:** Modèle de la région NRR, dérivé de la structure cristallographique de la région NRR de Notch 2 (logiciel Phyre). Les trois LNRs (LNR-A, LNR-B et LNR-C), représentées en nuances de rose et un domaine HD (N- et C-terminal), en nuances de vert. Les sites de clivages protéolytiques principaux (S1, S2) sont indiqués. D'après Gordon *et al.*, 2007



Les deux moitiés du domaine HD (divisé par la furine au site S1) forment un domaine protéique unique qui consiste en un « sandwich » intimement entrelacé de structure alpha/bêta : cinq brins-β (beta1 à beta5) et deux hélices-α (alpha1 et alpha3) reliés par plusieurs boucles conservées et une hélice courte (alpha2) (fig.28). Les structures secondaires du domaine HD sont pliées autour d'un noyau hydrophobe conservé avec des chaînes latérales qui projettent les résidus à la surface (concave) formée par des feuillet-bêta et Des faces internes des deux hélices alpha1 et alpha3.

Le site S2 est niché à l'embouchure d'une petite poche hydrophobe délimitée par le brin-β5, la face interne de l'hélice-α3 et un résidu leucine hautement conservé (Leu1659) dans le lien qui relie ces éléments (Chen *et al.*, 2011). Le « bouchon » qui remplit la poche et qui bloque la liaison est la chaîne latérale de la Leucine1457, qui se trouve dans le lien reliant LNR-A et B. Le résidu Leu1457 est fixé dans la poche par une liaison hydrogène entre l'oxygène de son groupement carbonyle et le groupement amide de la Valine1666 et est empaqueté contre les résidus de cette poche (Leu1650, Ala1651, Ala1654, Leu1663 et Val1666), qui représentent 10 % de l'interface du domaine HD-LNR total. Ensemble, les chaînes latérales de la Leu1457, de la Thr1458 et de la Met1459 chevauchent le site de S2 et empêchent l'accès de chaque côté (figure 29). L'ancrage précis de l'hélice-α3 du domaine HD au-dessus du site S2 maintient également la poche. Cette hélice est maintenue en position par des résidus hydrophobes provenant du lien entre LNR-A et LNR-B (Met1459, Pro1462 et Trp1463) et du LNR-B (Ile1476, Val1487, Leu1490, Asn1493 et Phe1494). De plus, une liaison hydrogène entre la chaîne latérale de l'Asn1444 du domaine LNR-A et le groupement carbonyle de l'Ile1655 permet l'ancrage de l'hélice-α3 à son extrémité C-terminale. L'accessibilité au site S2 nécessite un changement de conformation permettant le clivage de la métalloprotéase en

réponse à la liaison du ligand (Gordon *et al.*, 2007 ; Gordon *et al.*, 2009). D'autres travaux suggèrent que les interactions du brin  $\beta 5$  avec le brin  $\beta 1$  et l'hélice  $\alpha 3$  jouent un rôle important dans le camouflage du site de S2, empêchant le clivage protéolytique constitutif des protéases ADAMs (Tiyanont *et al.*, 2011).



**Figure 29:** Interface entre les régions LNRs et les domaines HDs.

a) Interface de contact entre les régions LNRs et HDs.

Les domaines LNR de surface sont colorés en rose fuschia quand un atome s'approche très près (à 4 Å), le reste des domaines sont de couleur rose clair. Les domaines HD sont de couleur turquoise quand un atome s'approche à 4 Å du domaine LNR et cyan clair ailleurs.

b) Agrandissement de l'hélice- $\alpha 3$ . L'hélice est maintenue au-dessus du site S2 par une interface hydrophobe avec les résidus du domaine LNR-B et le lien LNR-AB et une liaison hydrogène conservée provenant de LNR-A.

c) Le lien LNR-AB bloque de façon stérique l'accès au site de clivage de la métalloprotéase. A Gauche: la poche hydrophobe dans le domaine HD qui abrite le site S2 (de surface) et les résidus provenant du lien LNR-AB (boule-et-bâton). A droite: vue tournée d'environ 90° à partir de la vue de gauche. Les résidus dans le brin- $\beta$  contenant le site de clivage S2 sont représentés en bleu (boule-et-bâton), et les trois «résidus de garde» du lien LNR-AB sont colorés en rose. D'après Gordon *et al.*, 2007.

Deux caractéristiques de la voie de signalisation Notch sont que le récepteur et le ligand sont localisés sur deux cellules différentes et que l'interaction ligand-récepteur est suivie par l'endocytose du ligand dans la cellule exprimant le ligand (trans-endocytose). Ce qui suppose la nécessité de forces mécaniques, des « forces de traction » qui seraient induites par les changements conformationnels dans le récepteur. Des travaux effectués avec un modèle de

mécano-transduction d'activation de Notch supposent que la force mécanique exercée par l'endocytose du ligand contribue à exposer ainsi le site S2 pour le clivage (Gordon *et al.*, 2007). D'autres travaux sont conformes à un modèle dans lequel le domaine d'hétérodimérisation (HD) possède des caractéristiques *mécano-senseur* (qui reçoit les signaux mécaniques) intrinsèques qui pourraient être utilisées lors de l'activation de Notch (Chen et Zolkiewska, 2011). Des travaux plus récents soutiennent l'hypothèse que la force induite par l'activation de Notch requiert la liaison du ligand pour exercer une force mécanique pas au hasard mais en plusieurs fois et sur une longue période de temps (Ploscariu *et al.*, 2014).

Un événement clé dans l'activation de la signalisation Notch est le clivage par les protéases ADAM du récepteur, sur le site S2, lorsque la liaison du ligand induit l'exposition du site pour le clivage protéolytique. Les métalloprotéases impliquées dans ce clivage sont deux membres de la famille ADAM : ADAM10 et/ou ADAM17 (Brou *et al.*, 2000 ; Mumm *et al.*, 2000).

Le premier homologue d'ADAM10 mis en évidence dans le clivage de Notch est le produit du gène *kuzbanian* de drosophile (*kuz*). Les mutants contenant peu à aucune protéine *kuz* présentaient une variété de défauts, notamment dans l'organisation de la neurogénèse et des ommatidies (structures responsable des yeux composés de drosophile), semblables aux phénotypes des mutants Notch (Rooke *et al.*, 1996).

La protéase ADAM17 ou TACE (TNF $\alpha$ -Converting Enzyme), a été mis en évidence pour la première fois comme clivant Notch *in vitro*, dans des cellules de moelle osseuse dérivées de précurseurs monocytaires (Brou *et al.*, 2000).

Les premières études génétiques et biochimiques d'ADAM10 et d'ADAM17 n'ont pas clairement identifiées quelle protéase ADAM est la principale responsable du clivage S2. (Pan et Rubin, 1997 ; Jarriault et Greenwald, 2005 ; Mumm *et al.*, 2000).

La protéase ADAM10 est capable de cliver le TNF $\alpha$ , un des substrats principal d'ADAM17, en l'absence d'ADAM17, indiquant que ces enzymes sont capables de cliver certaine fois des substrats commun *in vitro* (Mężyk-Kopeć *et al.*, 2009). Grâce aux travaux effectués avec des souris déficientes pour le gène ADAM10, il a été mis en évidence que les phénotypes obtenus sont similaires à ceux obtenus dans les drosophiles et les souris déficientes pour le gène Notch1. Les drosophiles et les souris déficientes pour le gène ADAM17 présentent un phénotype différent, indiquant que ces protéines peuvent avoir des rôles différents *in vivo* (Lieber *et al.*, 2002; Peschon *et al.*, 1998 ; Hartmann *et al.*, 2002).

De nombreux travaux fournissent des exemples clairs de la fonction spécifique des métalloprotéases ADAMs dans des voies de signalisation Notch *in vivo*. Cependant, la

manière dont ADAM10 ou 17 sont sélectionnées pour l'activité Notch *in vivo* est en grande partie inconnue. Une explication possible provient de travaux effectués *in vitro* montrant que le clivage du récepteur Notch par ADAM10 est dépendant de sa liaison avec un ligand tandis qu'ADAM17 activerait la signalisation Notch d'une manière indépendante du ligand (Bozkulak et Weinmaster, 2009 ; van Tetering *et al.*, 2009 ; Pabois *et al.*, 2014). Les auteurs citent également des travaux antérieurs montrant l'implication d'ADAM17 et excluant ADAM10 du clivage S2 chez les mammifères. Ces travaux se basent sur les données obtenues grâce à des mutants Notch avec une région NRR déstabilisée, imitant le clivage Notch-indépendant du ligand, et les études utilisant des inhibiteurs à large spectre de métalloprotéases. Ils émettent ainsi l'hypothèse que la protéase ADAM17 est capable de cliver Notch quand la NRR est déstabilisée d'une manière indépendante du ligand.

Une autre explication proposée peut être que le niveau d'expression de différentes protéases ADAMs est spécifique d'un tissu. Par exemple, chez la drosophile, au troisième stade larvaire, l'ARN messager d'ADAM17 est enrichie dans le cerveau par rapport aux larves entières ou dans le disque imaginal de l'aile (Delwig et Rand, 2008).

Une autre explication potentielle pour le clivage différentiel de Notch est la présence d'autres protéines à la membrane cellulaire qui améliorent le clivage de Notch par une ADAM spécifique. En effet, ADAM17 interagit avec la tétraspanine CD9 sur les leucocytes et les membranes endothéliales pour réguler le clivage du TNF $\alpha$  et d'ICAM-1 par ADAM17 (Gutiérrez-López *et al.*, 2011). D'autres travaux montrent que la stimulation par des anticorps anti-tétraspanines (CD9, CD81, CD82) induit une augmentation de la sécrétion de l'EGF et du TNF $\alpha$  par ADAM10 (Arduise *et al.*, 2008). Il a également été mis en évidence que les TspanC8 chez la drosophile interagissent directement avec kuzbanian en augmentant son expression à la surface membranaire et régulent ainsi l'activation de la voie Notch (Dornier *et al.*, 2012).

On ignore encore comment le clivage est réalisé *in vivo* préférentiellement par ADAM10 ou par ADAM17, mais il est clair que le clivage du récepteur Notch par ces protéases doit être étroitement contrôlé pendant le développement et l'homéostasie chez les drosophiles et chez les mammifères.

### **2.3- Le clivage S3 par le complexe $\gamma$ -sécrétase**

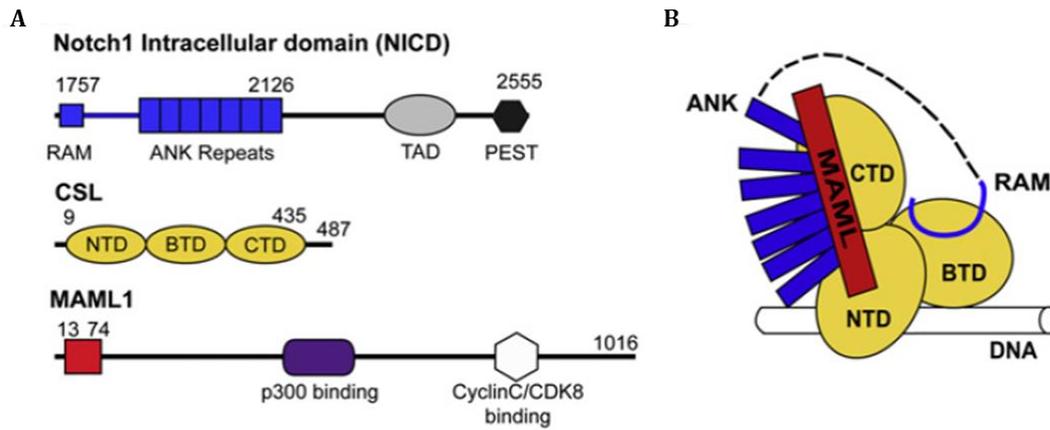
Le clivage S2 est immédiatement suivi par le clivage S3 par le complexe  $\gamma$ -sécrétase pour libérer un fragment intracellulaire soluble de Notch (NICD). Le récepteur Notch subit un troisième clivage (clivage S3) intramembranaire qui est effectué par le complexe préséniline  $\gamma$ -sécrétase, qui se compose de la préséniline-1 et -2 (PSEN1, PSEN2), de nicastrine

(NCSTN), de presenilin enhancer 2 (PEN2) et anterior pharynx-defective 1 (APH1), (Fortini, 2002 ; Li *et al.*, 2008 ; Sato *et al.*, 2007 ; Ranganathan *et al.*, 2010). C'est la présiniline qui possède l'activité catalytique. Les mammifères possèdent plusieurs isoformes de ces protéines, ce qui permet de former différents complexes  $\gamma$ -sécrétase dont la fonction n'a pas été explorée.

Le clivage S3 permet la libération du domaine NICD actif de la membrane plasmique et sa translocation dans le noyau (Kopan et Ilagan, 2009).

## **2.4- La transduction du signal Notch**

Lors de l'activation de la voie Notch, le NICD transloque dans le noyau où il se lie directement au complexe nucléaire et forment un complexe transcriptionnel. Les principaux composants du complexe transcriptionnel de Notch comprennent le NICD, la protéine de liaison à l'ADN, CSL (CBF1-Su(H)-LAG1), et MAM (Bray, 2006 ; Kovall et Blacklow, 2010). MAM est un co-activateur transcriptionnel, appartenant à famille Mastermind (MAML : Mastermind-like-1). La taille des protéines MAM est généralement d'environ 1000 résidus, dans lesquelles seulement le court domaine NTD (N-Terminal Domain), d'une soixantaine d'acides aminés est nécessaire pour lier CSL-NICD (Petcherski et Kimble, 2000; Wu *et al.*, 2000). En l'absence de NICD, le complexe CSL est associé à des co-répresseurs, (comme CtBP, Hairless, Groucho, SMRT, SHRP (également connu sous le nom de Sav), MINT (également connu comme X11L) et SPEN (Schweisguth et Posakony, 1994 ; Zhou et Hayward, 2001 ; Barolo *et al.*, 2002 ; Oswald *et al.*, 2005). Ces co-répresseurs recrutent des histones déacétylases (HDAC) et d'autres cofacteurs, réprimant ainsi l'activation de gènes cibles de Notch, jusqu'à ce que le NICD soit transporté dans le noyau (Hsieh *et al.*, 1999 ; Zhou *et al.*, 2000 ; Nagel *et al.*, 2005). Lors de l'activation des récepteurs Notch, le NICD libéré migre du cytoplasme au noyau. Une fois dans le noyau, le domaine RAM de NICD interagit avec le CSL, qui favorise la fixation du co-activateur transcriptionnel MAM, à l'interface entre le domaine ANK de NICD et CSL (Choi *et al.*, 2012), (figure 30). Ce complexe nouvellement formé recrute des co-activateurs, tels que les histones acétyltransférases (CBP/p300) et des complexes remodelant la chromatine, qui régulent la transcription des gènes cibles de Notch (Wallberg *et al.*, 2002 ; Kadam et Emerson, 2003 ; Gause *et al.*, 2006).



**Figure 30:** Représentation schématique du mécanisme d'assemblage du complexe transcriptionnel de Notch (NTC).

A) organisation des domaines du NICD: en haut, la région RAM, les répétitions ANKyrine, un domaine d'activation transcriptionnelle (TAD), et la séquence PEST impliquée dans la dégradation du récepteur. Au milieu, l'organisation des domaines de CSL, le NTD (N-Terminal Domain), BTD (Beta-Trefoil Domain, liaison à l'ADN) et CTD (C-Terminal Domain). En bas, l'organisation de MAML1, le polypeptide N-terminal requis pour l'assemblage de NTCs (rouges), une région impliquée dans la liaison p300 (violet) et la portion C-terminale impliquée dans le recrutement du complexe cycline C/cdk8 (blanc). Les domaines représentés de couleur bleu : Notch1, jaune : CSL et rouge : MAML1.

B) schéma des composants essentiels du NTC humain. Les régions de Notch, ANK et RAM (bleues), l'hélice de MAML1 (rouge) et les trois domaines de CSL (jaune) sur l'ADN (cylindre). D'après Choi *et al.*, 2012.

La signalisation Notch exerce ses effets pléiotropiques en initiant une cascade transcriptionnelle qui consiste à l'activation et la répression des gènes cibles, y compris la régulation transcriptionnelle de mécanismes épigénétiques (par exemple l'inhibition par la méthylation des histones (Moshkin *et al.*, 2009). Bien que les détails d'une transcription dite en « cascade » ne soient pas complètement connus, plusieurs gènes cibles bien caractérisés ont été décrits. Parmi ces gènes il y a la famille des répresseurs transcriptionnels HES (Hairy Enhancer of Split), les bHLH (basic Helix–Loop–Helix), la famille des facteurs de transcription HRT (the Hairy-Related Transcription factor connu aussi sous le nom de HEY), des protéines régulant Notch (Notch-regulated ankyrin repeat protein), (Kao *et al.*, 1998), les cyclines D1 et D3 (Ronchini et Capobianco, 2001 ; Sicinska *et al.*, 2003), et c-MYC (Weng *et al.*, 2006). Le complexe transcriptionnel active également la famille de NF- $\kappa$ B (Cheng *et al.*, 2001) et la famille PPAR (Nickoloff *et al.*, 2002) et l'ubiquitine ligase SKP2, qui favorise la dégradation p27KIP1 (Sarmiento *et al.*, 2005 ; Bray et Bernard, 2010).

L'activité transcriptionnelle de Notch se termine par la phosphorylation de la protéine Notch sur le domaine C-terminal du domaine PEST, qui est ciblée pour l'ubiquitination, par des

ubiquitines ligases, telles que FBXW7 (également appelé SEL10) et subit la dégradation par le protéasome (Fortini et Bilder, 2009).

### **3- Régulation de la voie de signalisation Notch par l'endocytose**

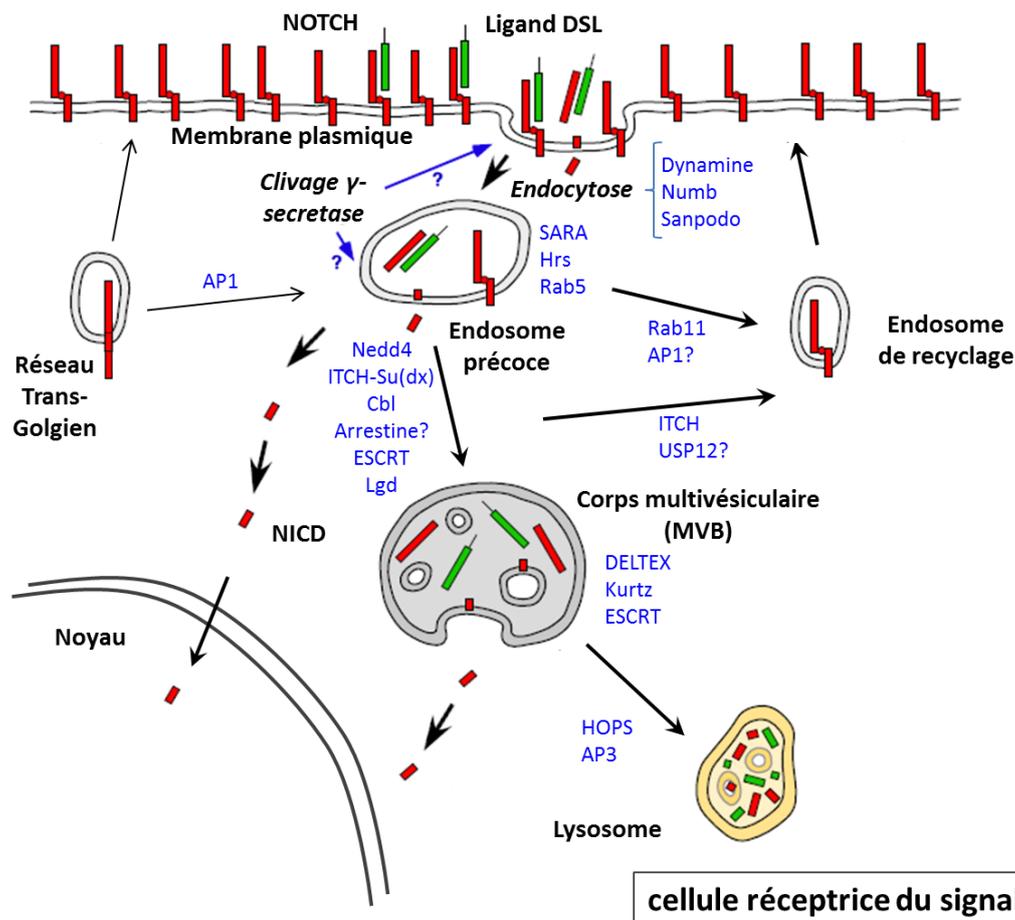
À travers le processus d'endocytose, la cellule peut contrôler la quantité de récepteurs activables à sa surface en les internalisant et les stockant de façon transitoire dans les endosomes. Ils peuvent ensuite être recyclés à la membrane plasmique ou dégradés dans les lysosomes. L'adressage aux lysosomes atténuera la capacité de la cellule à répondre au signal, alors que le recyclage à la membrane après dissociation du ligand restaurera sa capacité à répondre au signal. L'endocytose permet aussi de concentrer spécifiquement différents régulateurs de la signalisation cellulaire au niveau de la membrane des endosomes. Ces associations membranaires d'acteurs de la signalisation cellulaire constituent alors ce qu'on appelle des plateformes signalisatrices et permettent par exemple de moduler l'intensité et la durée du signal. Si l'endocytose contrôle les processus de signalisation cellulaire, la réciproque est aussi possible. La machinerie d'endocytose peut être régulée par des événements de signalisation, ce qui donne une idée du nombre d'interconnexions fonctionnelles qui existe entre les mécanismes de signalisation et l'endocytose.

#### **3.1- L'endocytose du récepteur Notch**

Le trafic membranaire s'est avéré avoir une fonction importante et complexe dans l'activation et la régulation de la signalisation Notch (Yamamoto *et al.*, 2010 ; Baron, 2012). Une des premières indications du rôle de l'endocytose dans la signalisation Notch provient de l'analyse d'études génétiques d'une mutation thermosensible de la protéine shibire de drosophile, qui a ensuite été identifiée comme étant une dynamine-GTPase, un régulateur clé de l'endocytose impliqué dans le resserrement et le détachement des vésicules d'endocytose (Seugnet *et al.*, 1997). L'importance de l'endocytose du récepteur Notch et de ses ligands transmembranaires, dans la régulation de la signalisation Notch, a depuis été largement confirmée. En effet, ces événements de trafic membranaire n'ont pas seulement été associés à l'activation ligand-dépendante de la protéine Notch mais aussi à son activation indépendante du ligand, un phénomène qui n'est pas encore bien compris. Dans les deux cas, l'activation dépend du clivage S3 par le complexe  $\gamma$ -sécrétase (Struhl et Greenwald, 1999 ; Wilkin *et al.*, 2008 ; Coumailleau *et al.*, 2009).

Plusieurs protéines sont impliquées dans les étapes précoces de l'endocytose : la dynamine, Numb, une protéine cytoplasmique et Sanpodo, une protéine transmembranaire. Elles sont

requis dans la cellule réceptrice du signal pour l'activation de Notch (Fortini, 2009), (figure 31).



**Figure 31 :** Représentation schématique de l'endocytose des récepteurs Notch.

A la surface de la cellule, les récepteurs Notch (rouge) interagissent avec des ligands DSL (vert) présentés par des cellules voisines, provoquant la dissociation de l'hétérodimère et l'exposition du site de clivage S2. Dans la cellule réceptrice du signal, le processus d'endocytose de Notch est dépendant de la clathrine pour faciliter la dissociation de l'hétérodimère et l'exposition du site de clivage extracellulaire. Les protéines impliquées dans le trafic du récepteur sont indiquées en bleu. Le récepteur Notch activé (avec son ligands DSL) et non-activé sont internalisés et acheminés dans les endosomes précoces (au centre). Certains récepteurs intacts non activés sont triés pour les endosomes de recyclages pour le retour à la surface cellulaire, tandis que Notch activé entre dans le compartiment des endosomes tardifs. Les données actuelles suggèrent que le clivage par le complexe  $\gamma$ -sécrétase (RIP) peut se produire à plusieurs étapes le long du trafic endosomal (flèches bleues). La diminution de la signalisation Notch est lié au trafic du récepteur Notch activé dans les compartiments des endosomes tardifs, tels que les corps multivésiculaires et les lysosomes (D'après Fortini et al., 2009).

Chez la drosophile, lors des divisions cellulaires asymétriques, qui sont cruciales pour la différenciation des précurseurs des organes sensoriels (SOP), l'interaction entre Numb et Sanpodo guide le trafic endocyttaire asymétrique du récepteur Notch, qui détermine le destin cellulaire (Berdnik et al., 2002 ; Hutterer et Knoblich, 2005 ; Babaoglan et al., 2009). Dans ce processus, des travaux ont montrés que le récepteur est activé dans une sous-population

d'endosomes précoces exprimant Rab5, qui sont marqués par SARA (Smad Anchor for Receptor Activation), une protéine adaptatrice (Coumailleau *et al.*, 2009).

La localisation subcellulaire du clivage de Notch par la  $\gamma$ -sécrétase n'a pas été clairement établie, et une partie au moins du clivage de NEXT par la  $\gamma$ -sécrétase pourrait se faire dans un compartiment intracellulaire. D'autres données suggèrent que l'accumulation de Notch dans les endosomes tardifs entraîne son activation potentiellement à cause d'un changement de conformation dû à la diminution du pH (Vaccari *et al.*, 2008 ; Childress *et al.*, 2006 ; Gallagher et Knoblich, 2006 ; Jaekel et Klein, 2006).

Après endocytose, le récepteur Notch internalisé peut être recyclé vers la membrane plasmique ou peut être dirigé dans les corps multivésiculaires (MultiVesicular Bodies, MVBs) ou dans les endosomes tardifs (Yamamoto *et al.*, 2010 ; Baron, 2012). Le ciblage de Notch dans les MVBs ou les endosomes tardifs est régulé par le complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) un complexe de tri endosomal requis pour le transport, qui se compose des protéines ESCRT-0 (STAM1/2 et Hrs), ESCRT-I, - II, - III et Vps4 (Henne *et al.*, 2011). La perte de fonction d'ESCRT peut entraîner l'activation anormale de la signalisation Notch d'une manière indépendante du ligand (Vaccari *et al.*, 2008 ; Vaccari *et al.*, 2009). Afin de préciser les modalités de cette activation des travaux ont été effectués. Il en ressort que la protéine LgD est présente dans le cytoplasme, et qu'elle est impliquée dans la régulation de Notch. Le gène *lgd*, ou *lethal (2) giant discs*, est un gène suppresseur de tumeurs et code une protéine mal caractérisée, la protéine LgD. Cette protéine interagit avec le complexe ESCRT-III et régule l'activation de Notch de façon indépendante du ligand (Childress *et al.*, 2006 ; Gallagher et Knoblich, 2006 ; Jaekel et Klein, 2006 ; Troost *et al.*, 2012).

L'ubiquitination de Notch a aussi une fonction importante dans la régulation du trafic du récepteur. La cascade enzymatique est initiée par la liaison de la molécule d'ubiquitine à une enzyme E1-ubiquitine activase, suivi du transfert de l'ubiquitine activée au niveau du groupement thiol de la cystéine du site actif de l'enzyme E2-ubiquitine conjugase. Finalement, cette E2-ubiquitine conjugase va s'associer à une E3-ubiquitine ligase qui recrute spécifiquement le substrat et permet le transfert de la molécule d'ubiquitine sur ce substrat. Le mécanisme par lequel s'effectue le transfert de l'ubiquitine sur la protéine substrat diffère selon le type d'E3-ubiquitine ligase mis en jeu. Les E3 sont à la base de la spécificité du processus d'ubiquitination en sélectionnant le substrat à ubiquitiner.

Un certain nombre de E3-ubiquitine ligases, tel que le suppresseur de deltex, Su(dx), (connu sous le nom de ITCH chez les mammifères), Nedd4 et Cbl ciblent Notch pour la dégradation

(Sakata *et al.*, 2004 ; Wilkin *et al.*, 2004 ; Jehn *et al.*, 2002). Deltex (Dx) est une E3-ubiquitine-ligase de type RING (RING-finger E3-ubiquitine-ligase) qui régule l'activation de Notch dans les endosomes tardif d'une manière indépendante du ligand (Hori *et al.*, 2004 ; Hori *et al.*, 2005). Toutefois, lorsque Dx forme un complexe avec la protéine adaptateur Kurtz (Krz), l'unique arrestine non-visuelle de la Drosophile (un régulateur essentiel de la voie de signalisation Notch), il favorise la dégradation de la protéine Notch (Mukherjee *et al.*, 2005). Cette dégradation de la protéine Notch par Dx et Krz est supprimée dans la forme mutante de Vps32, un composant du complexe ESCRT-III (Hori *et al.*, 2011). Ainsi, Dx peut réguler la signalisation Notch de façon positive ou négative, en fonction de ses interactions avec d'autres facteurs de régulation.

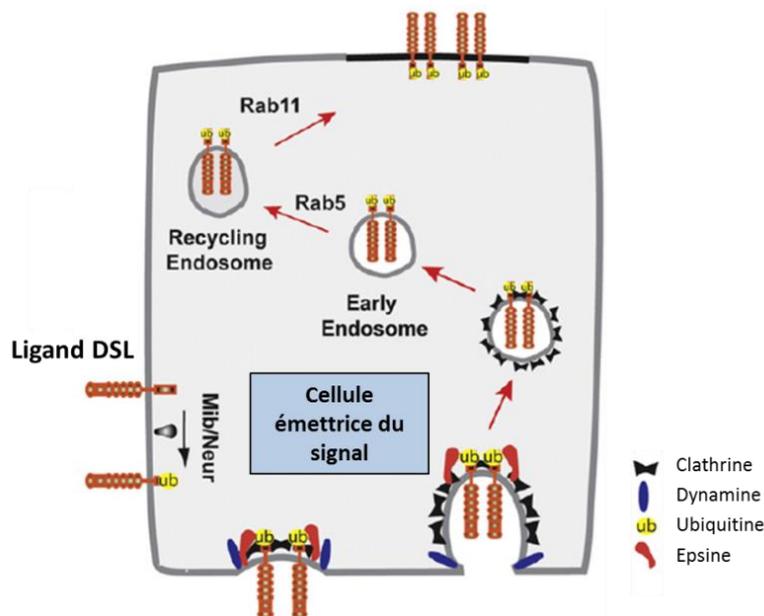
L'E3-ubiquitine ligase ITCH peut également recruter le complexe de dé-ubiquitination USP12/UAF1 afin de déubiquitiner le récepteur Notch non-activé probablement avant son entrée dans les MVBs et permettrait ainsi de réguler son trafic intra-cellulaire. USP12 appartient à la famille des protéases spécifiques de l'ubiquitine (USP : Ubiquitin-Specific Protease (USP) et UAF1 (USP1-associated factor 1), est un co-activateur. Par conséquent USP12 régulerait probablement la quantité de récepteur Notch à la surface cellulaire et se comporterait donc comme un régulateur négatif de la voie de signalisation Notch (Moretti *et al.*, 2012 ; Moretti et Brou, 2013).

Chez les mammifères, il semblerait que des arrestines  $\alpha$  et  $\beta$  sont recrutées par le récepteur Notch non-activé et permettent son ubiquitination régulée par l'E3-ubiquitine ligase, ITCH. La famille des arrestines est composée de deux sous-familles:  $\beta$ -arrestines et  $\alpha$ -arrestines, se sont des protéines importantes pour la régulation de la transduction du signal. En effet, une hétérodimérisation entre une  $\beta$ -arrestine et l' $\alpha$ -arrestine ARRDC1 est nécessaire pour inciter l'ubiquitination de Notch et la dégradation du récepteur Notch non activé dans les lysosomes, leur conférant ainsi le rôle de régulateurs négatifs de la voie de signalisation Notch (Puca *et al.*, 2013 ; Puca et Brou., 2014).

D'autres facteurs sont impliqués dans le trafic ou la fusion entre les endosomes tardifs et les lysosomes, tels que les complexes HOPS (homotypic fusion et vacuole protein sorting) et AP3 (responsable du trafic des protéines aux lysosomes et des autres organites associés), qui sont également requis pour l'activation Dx-dépendante de Notch (Wilkin *et al.*, 2008). D'autres travaux ont montré que le complexe adaptateur pour la clathrine AP1, est localisé dans le réseau trans-Golgien et dans les endosomes de recyclage, et régule le trafic de Notch pendant le développement chez la drosophile des SOP (Benhra *et al.*, 2011) et des yeux (Kametaka *et al.*, 2012).

### 3.2- Le trafic du ligand DSL de Notch

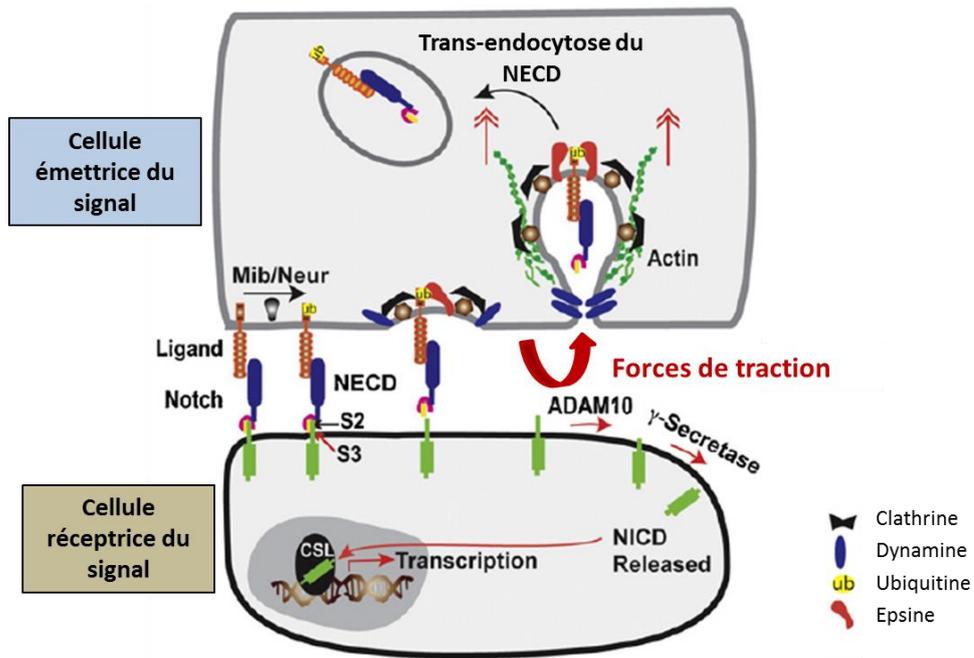
L'endocytose et le trafic endosomal des ligands de Notch dans la cellule émettrice du signal est aussi paradoxalement indispensable pour l'activation du récepteur Notch dans la cellule réceptrice (Yamamoto *et al.*, 2010 ; Baron, 2012). Deux E3-ubiquitine ligases de type RING, Neuralized (Neur) et Mindbomb (Mib), sont responsables de l'ubiquitination du ligand et engendrent son endocytose (Le Borgne *et al.*, 2005b ; Wang et Struhl, 2005), (figure 32). Une autre protéine, l'Epsine, une protéine liant l'ubiquitine qui interagit avec des phosphoinositols et des protéines intervenant dans l'endocytose, comme la clathrine et AP-2, a été observé comme régulant l'endocytose du ligand (Wang et Struhl, 2004). Les endosomes de recyclage (Rab11 positifs) sont requis pour l'activité Delta au cours du développement des SOP chez la drosophile (Emery *et al.*, 2005). Des études récentes montrent que le recyclage du ligand ne change pas la force de la liaison ligand-récepteur, mais semble réguler l'accumulation des ligands à la surface cellulaire (Shergill *et al.*, 2012).



**Figure 32:** L'endocytose du ligand DSL.

Le ligand est ubiquitinilé (Ub) par l'E3-ubiquitine ligases Mindbomb (Mib) ou Neuralized (Neur). L'epsine est ensuite recrutée pour l'endocytose du ligand (clathrine/dynamine) qui va migrer via les endosomes précoces puis de recyclage jusqu'à la surface cellulaire (D'après Musse *et al.*, 2012).

Un second événement d'endocytose a été proposé, suite à l'interaction de Notch avec le ligand sur la surface des cellules adjacentes (figure 33). Cette interaction génère une « force de traction » capable d'induire la protéolyse de Notch, déclenchant ensuite la trans-endocytose du domaine NECD dans la cellule émettrice du signal, libérant ainsi le NICD dans la cellule réceptrice du signal (Tien *et al.*, 2009 ; Musse *et al.*, 2012).



**Figure 33 :** L'endocytose du ligand DSL par l'intervention de forces de tractions. L'interaction entre le ligand d'une cellule émettrice du signal et le récepteur d'une cellule réceptrice du signal induisent l'ubiquitination du ligand et la formation des structures intervenant dans l'endocytose dépendante de l'Epsine générant une force mécanique (doubles pointes de flèche rouges) séparant le NECD de l'hétérodimère Notch. Le NECD est trans-endocyté (D'après Musse et al., 2012).

# HYPOTHESES DE TRAVAIL



Les travaux précédents de l'équipe avaient montrés que les TspanC8 interagissent directement avec ADAM10. Ces tétraspanines sont des régulateurs clés du trafic d'ADAM10, en contrôlant la sortie de la protéase du réticulum endoplasmique. Deux d'entre elles, Tspan10 et Tspan17, ciblent ADAM10 dans un compartiment endosomal tardif, tandis que les quatre autres (Tspan5, Tspan14, Tspan15 et Tspan33) augmentent son niveau d'expression à la surface cellulaire. Il a également été mis en évidence que la régulation de l'expression d'ADAM10 par certaines TspanC8 affecte fortement l'activité du récepteur Notch dans les lignées cellulaires de mammifères et de *D. melanogaster*.

Le but de mon travail a été d'apporter des éléments à la compréhension du mécanisme d'action des TspanC8 sur la régulation de la protéine ADAM10.

Deux aspects ont été abordés. Le premier concerne la régulation de la disponibilité biologique d'ADAM10 à travers son association, sa régulation et sa localisation membranaire par les TspanC8. Le second, concerne directement les étapes de l'activation de la signalisation NOTCH par ADAM10 et les TspanC8.

L'objectif de mon travail de thèse a été d'explorer :

- Pourquoi ADAM10 s'associe directement à tant de tétraspanines ?
- Par quels mécanismes les différentes TspanC8 régulent-elles différemment la compartimentation d'ADAM10 à la membrane plasmique ?
- Quelles sont les conséquences pour la voie de signalisation NOTCH?

Pour cela, nous avons combiné les approches de biologie moléculaire, de biologie cellulaire et de biochimie couplée à des analyses par spectrométrie de masse. Le tout illustré par de l'immunofluorescence.



# MATERIEL ET METHODES



# Matériel et méthodes

---

## Culture cellulaire

Les lignées murines OP9 et OP9-Delta1 exprimant le ligand de Notch humain delta-1 (OP9-DLL-1) et la lignée cellulaire d'ostéosarcome humain U2OS exprimant Notch1 humain (U2OS-N1) ont été décrits précédemment (Moretti *et al.*, 2010) et (Six *et al.*, 2004).

Les cellules humaines U2OSN1 ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium High glucose 4,5g/l, GE Healthcare) supplémenté avec un mélange d'antibiotiques, la pénicilline, la streptomycine et la néomycine (PSN-100X chez Gibco) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF, EUROBIO). Les cellules OP9 et OP9-DLL1 sont cultivées en alphaMEM ( $\alpha$ DMEM High glucose 4,5g/l, GE Healthcare) additionné de 10% SVF, de glutamine, 2mM et de PSN.

Les cellules ont été cultivées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Les cellules ont été transfectées avec soit le FuGENE® 6 Transfection Reagent (Promega) ou le FuGENE® HD Transfection Reagent, (Promega) selon les instructions du fabricant.

## Plasmides

Les plasmides utilisés lors de ce travail codent tous des tétraspanines humaines. Les plasmides codant les tétraspanines Tspan5 (NET-4) et Tspan15 (NET-7) ont été construit au laboratoire, par PCR à partir des régions codantes des plasmides Tspan1, Tspan5, Tspan9, Tspan12, Tspan15 (Serru *et al.*, 2000). Celui codant Tspan14 a été obtenu par transcription inverse à partir de la séquence ARN de cellules HCT116 au laboratoire. Le plasmide codant le mutant Tspan5 non palmitoylable (Tspan5<sup>PLM</sup>) a été synthétisé par Eurogentec. Tous les produits PCR ont été sous-clonés dans les plasmides pEGFP-N1 ou pEGFP-N3, afin d'apporter la protéine de fusion fluorescente GFP.

## Anticorps

L'anticorps monoclonal de souris anti-ADAM10 humain (mAb 11G2) ADAM10 a été décrit dans Arduise *et al.*, 2008. Les anticorps dirigés contre les tétraspanines, leurs partenaires et d'autres protéines utilisés sont le TS9 (CD9), TS81 (CD81), TS151 (CD151), TS63 (CD63), 1F11 (CD9P-1), 8A12 (EWI-2), 5H5 (CD9b), BCAM (BCAM), CD55(CD55) ont été produit au laboratoire (Charrin *et al.*, 2003a). Les anticorps monoclonaux de souris anti-Notch1 humain, anti-IgSF3 humain proviennent de R&D systems. L'anticorps monoclonal de souris

anti-PDI humain de chez Abcam. Les anticorps anti-tag utilisées dans cette étude étaient des anticorps anti-GFP monoclonaux de souris de chez Roche (pour les immunoprécipitations) et polyclonaux de lapin de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (pour les western-blot), l'anticorps monoclonal de souris anti-HA, HA11 provient de Covance. Les anticorps monoclonaux anti-CD97 proviennent de chez Millipore. Les anticorps monoclonaux de souris anti-CD71 de chez Invitrogen et les anticorps monoclonaux de souris anti-N-Cadherine de chez Sigma-Aldrich. Les anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence sur lame sont couplés à un fluorophore. Nous avons utilisés l'Alexa Fluor-488, l'Alexa Fluor-568, l'Alexa Fluor-594, l'Alexa Fluor-647 et sont commercialisés par molecular probe.

## **Marquage biotine des protéines de surface, lyse des cellules et immunoprécipitations.**

Le marquage biotine des protéines de surface et les immunoprécipitations ont été réalisées comme décrit précédemment (Arduise *et al.*, 2008; Charrin *et al.*, 2001). Les cellules adhérentes marquées ou non à la biotine ont été lysées directement dans la fiole de culture (2ml pour un flacon de 75cm<sup>2</sup>) à la concentration de 2x10<sup>7</sup>/ml, dans un tampon de lyse contenant 1% de détergent Brij97 ou Brij98 (Sigma-Aldrich®), Tris 10mM, pH 7,4, NaCl 150mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, 0,02% de NaN<sub>3</sub>, et un cocktail complet d'inhibiteurs de protéases. Après 30 min d'incubation à 4°C, le matériel insoluble a été éliminé par centrifugation à 10000g et le lysat cellulaire a été clarifié par addition de sérum de chèvre inactivé à la chaleur et des billes de protéines G-sépharose (GE Healthcare) pendant 2h à 4°C et une centrifugation supplémentaire à 12000g pendant 15 min. Les protéines ont ensuite été immunoprécipitées par addition de 1µg d'anticorps et 10 µl de billes protéine G-Sépharose pour 200 à 400 µl de lysat. Pour immunoprécipiter les protéines étiquetées GFP nous avons utilisé le système GFP-Trap® (Chromotek) : des petits fragments d'anticorps recombinant à domaine unique (V<sub>H</sub>Hs, dérivés d'alpaga) anti-GFP sont couplés à des billes d'agarose. Après 2 h d'incubation à 4°C sous agitation constante, les billes ont été lavées cinq fois dans du tampon de lyse. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées dans un gel gradient 5 à 15% par électrophorèse SDS-PAGE dans des conditions non réductrices et transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinyl DiFluoride, Amersham). Les protéines immunoprecipitées sont analysées par Western-blot en utilisant soit des anticorps primaires directement couplés Alexa-Fluor 680 ou une combinaison d'anticorps primaires révélés par des anticorps secondaire couplés Alexa-fluor 680 ou IRDYE800. La révélation des protéines marquées par la biotine est réalisée avec la streptavidine couplée Alexa-fluor 680 ou IRDYE800. Les

acquisitions ont été effectuées en utilisant le système d'imagerie infrarouge Odyssey (LI-COR Biosciences).

## **Cytométrie en flux**

Les cellules ont été détachées avec une solution enzymatique (trypsine, PAA), lavées deux fois dans du DMEM complet et incubées pendant 30 min à 4°C avec 10µg/ml d'anticorps primaire. Après 3 lavages, les cellules ont été incubées pendant 30 min à 4°C avec un anticorps de chèvre anti-souris conjugué à un fluorochrome l'IsoThioCyanate de Fluorescéine (FITC) ou la PhycoErythrine (PE) pour le marquage des cellules non transfectées; l'AlloPhycoCyanine (APC) pour la coloration de cellules transfectées avec des constructions GFP). Les cellules ont été analysées en utilisant le cytomètre en flux BD Accuri® C6 FlowCytometer, (BD Biosciences), en utilisant les compensations appropriées et les analyses sont réalisées avec le logiciel BD CFlow® Plus.

## **Immunomarquages et microscopie**

Les cellules ont été cultivées dans un milieu complet pendant 24 heures sur des lamelles. Puis elles ont été rincées dans du PBS et fixées pendant 15 min dans 4% de PFA (ParaFormaldéhyde) à température ambiante, et incubées pendant 15 min avec 50mM de chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl) dans du PBS pour bloquer les aldéhydes libres du PFA, et perméabilisées ou non avec 0,1% de saponine pendant 2 minutes à 4°C. Les cellules ont ensuite été incubées avec 10 µg/ml de chaque anticorps primaire pendant 1h à température ambiante. Pour un double marquage les cellules ont été co-incubées avec des anticorps primaire de sous classe différents (IgG2a-IgG2b). Les cellules sont ensuite lavées en milieu complet et les anticorps primaires ont été révélés avec des anticorps secondaire de chèvre couplés Alexa-Fluor 568, Alexa-Fluor 594 ou Alexa-Fluor 647 (Molecular Probes) pendant 1h à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées en milieu complet et les lamelles sont montées en PVA-DABCO® (Polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO®, antifading-10981-Sigma-Aldrich®) supplémenté en DAPI. Les lamelles sont examinées, soit au microscope à fluorescence DMR (Leica) équipé d'une camera CoolSnap HQ2 (Photometrics), soit avec un microscope confocal SP5 (Leica) avec l'objectif à immersion x63. Les images sont ensuite traitées avec le logiciel ImageJ (National Institute of Health) pour les images issues du microscope à fluorescence ou le logiciel LAS AF Lite (Leica Microsystems) pour celles issues du microscope confocal.

## **Tests de bioluminescence et analyse de l'activité du récepteur Notch**

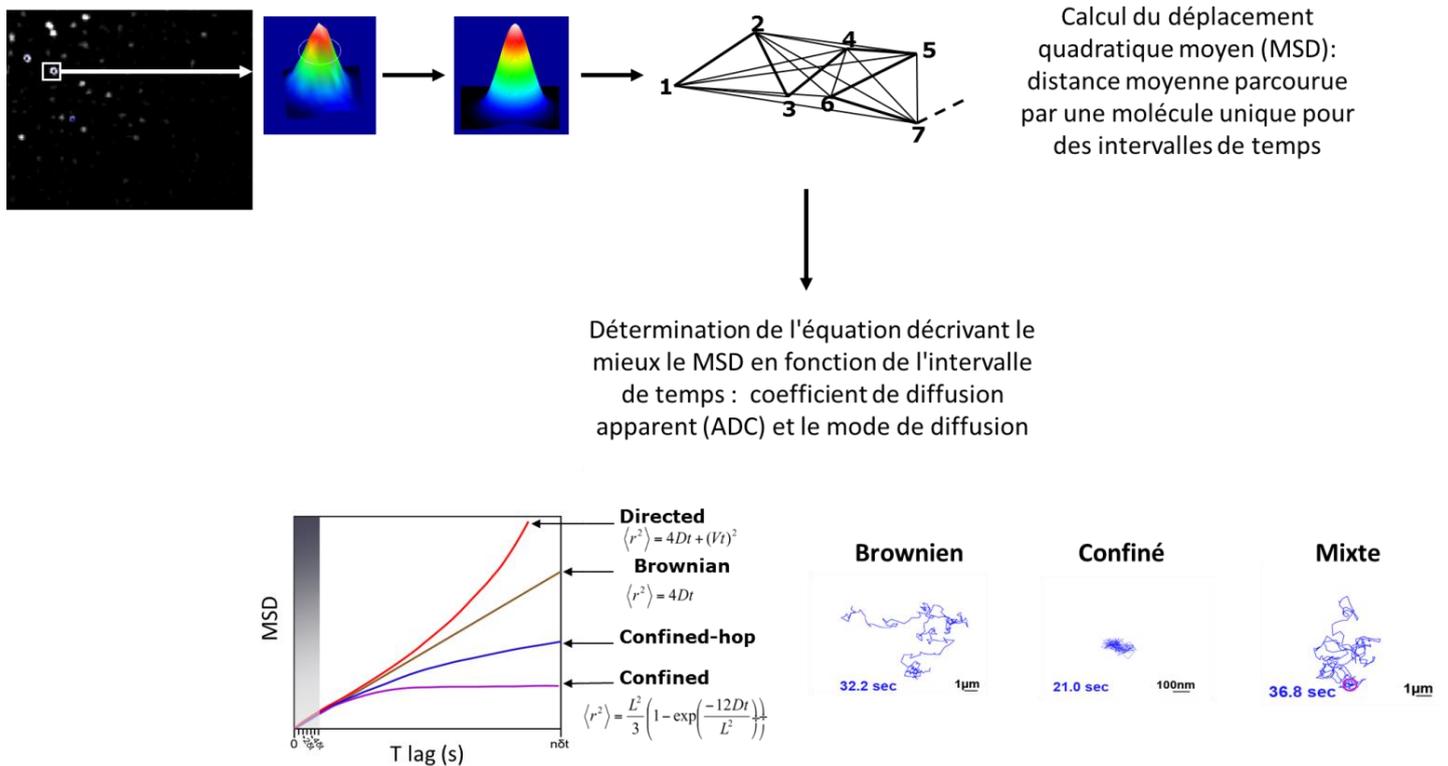
Cette analyse a été effectuée comme décrit précédemment (Moretti *et al.*, 2010). Les Cellules U2OS-N1 ont étéensemencées à la concentration de 25000 cellules /cm<sup>2</sup>. La déplétion par ARN interférence a été réalisée à cette étape en utilisant l'INTERFERin (PolyPlus-transfection) et 3 nM de siRNA selon le protocole inverse du fabricant. Les cellules U2OSN1 ont été co-transfectées 24 heures plus tard avec le gène rapporteur CSL firefly (facteur de transcription de notch1 activé) et le plasmide contrôle renilla en utilisant le fugene6 (Promega). Après 24 heures d'incubation, les cellules OP9 +/-DLL1 (ligand Delta-like 1 de NOTCH) sont ajoutées à 35000 cellules/cm<sup>2</sup> sur les cellules U2OSN1 précédemment co-transfectées. La détection de l'activité de la firefly et de la renilla luciférase est réalisée *in vitro*, après extraction protéique et ajout des substrats du système Dual-Luciferase®Reporter Assay System (Promega) selon le protocole du fournisseur, puis mesurée au luminomètre. La normalisation se fait en divisant l'activité de la firefly luciférase par l'activité de la Renilla luciférase.

### **Centrifugation à l'équilibre en gradient de densité**

Cette analyse a été effectuée comme décrit précédemment (Charrin *et al.*, 2003). Les cellules ont été décollées à l'aide d'un grattoir puis lysées dans 500µL de tampon de lyse glacé contenant 10 mM de Tris-HCl, pH7,5 ; NaCl 150 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, 0,02% de NaN<sub>3</sub>, les inhibiteurs de protéase, et 1% Brij98. Le rapport du volume de tampon de lyse pour le nombre de cellules a été maintenu constant tout au long des expériences. Après une incubation de 30 min sur de la glace, la préparation cellulaire a été centrifugée. Le surnageant a été supplémenté à 800µL par un mélange saccharose 60% dans le tampon de lyse sans détergent. Ensuite, les 0,8 ml du mélange de saccharose-lysate ont été successivement superposés avec 2 ml de saccharose à 30% et 1 ml de saccharose à 4% préparé dans le même tampon sans détergent, et le mélange a été centrifugé à 200,000g pendant 16 h dans un rotor SW50.1 (Beekman). Le gradient a été partagé en fractions de 0,5 ml à partir du sommet du tube. Ces fractions sont ensuite analysées par Western Blot.

## Suivi de molécule isolée

Cette analyse a été effectuée en collaboration avec Pierre-Emmanuel Milhiet, comme décrit précédemment (Espenel *et al.*, 2008 ; Potel *et al.*, 2013). Les cellules ont été incubées dans du DMEM à 37°C pendant 10 min avec des fragments Fab, marqués Atto647N, de l'anticorps monoclonal anti-ADAM10. Les images ont été acquises en utilisant un objectif « maison » de type TIRF équipée d'un objectif plan Fluor100x/1,45 NA (Zeiss, Le Peck, France), avec un temps d'intégration de 100 ms. Tous les films ont été analysés à l'aide d'un logiciel maison (nommé « PaTrack») exécuté dans Visual C++. Les Trajectoires ont été construites en utilisant le signal limité de diffraction individuel de chaque molécule. Le centre de chaque pic de fluorescence a été déterminé avec une super-résolution (sub-pixel) en ajustant une fonction gaussienne elliptique bidimensionnelle. Les trajectoires bidimensionnelles des molécules uniques ont été construites trame par trame. Seules les trajectoires contenant au moins 40 points ont été retenues. Les valeurs des coefficients de diffusion ont été déterminées à partir d'un ajustement linéaire MSD-t (*mean square displacement* : moyenne quadratique) entre le premier et le quatrième point (D1-4) selon l'équation  $MSD(t) = 4Dt$ . (Le déplacement quadratique moyen est proportionnel au temps). La détermination des modes dynamiques a été effectuée en utilisant un algorithme maison basé sur un réseau qui a été formé en utilisant des trajectoires synthétiques pour détecter les mouvements browniens, confinés et dirigés. La trajectoire est analysée et les différents modes détectés à l'intérieur de sections de plus de 10 trames. Une fois le mode de mouvement identifié, les différents segments sont analysés en traçant la MSD contre le laps de temps (figure 34). La courbe MSD est linéaire (brownien) ou ajustée à une courbe quadratique ( $4Dt + v^2t^2$ ) (diffusion dirigée) ou une courbe exponentielle  $L^2/3[1 - \exp(-12Dt/L^2)]$  (diffusion confinée), où L est le côté d'un domaine carré, le diamètre de confinement étant lié à L par  $d_{conf} = (2/\sqrt{L})$ . L'algorithme a été testé avec des trajectoires simulées présentant un comportement brownien, confiné ou dirigé ou une combinaison de ces trois modes et appliqué avec succès à une série d'expériences de molécule unique préalablement enregistrées pour des tétraspanines diffusant dans la membrane plasmique (Espenel *et al.*, 2008; Krementsov *et al.*, 2010).



**Figure 34 :** Etude de la dynamique membranaire d'une protéine par la technique du suivi de molécule isolée.

## Spectrométrie de masse quantitative « label-free »

Les cellules exprimant CD9, Tspan5 ou Tspan15 étiquetées GFP ont été lysées dans un tampon contenant du Tris 30 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,02% de NaN<sub>3</sub>, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1% de Brij97 et des inhibiteurs de protéase. La substance insoluble a été éliminée par centrifugation à 12000 g pendant 15 min, et les tétraspanines ont été immunoprécipité en utilisant des billes GFP-trap®. Afin d'identifier les protéines qui ne sont pas spécifiquement co-immunoprécipitées avec les tétraspanines, des cellules transfectées ou non avec la GFP ont été traitées de manière similaire. La tétraspanine CD9 endogène a été immunoprécipité en utilisant des billes Sepharose®4B couplés à des anticorps monoclonaux anti-CD9 (mAb TS9).

Les protéines ont été séparées par électrophorèse dans un gel gradient 4-12% de Tris-bis polyacrylamide (NuPAGE, Invitrogen) dans des conditions réductrices et colorées avec du bleu de Coomassie colloïdal (imperial stain, Pierce). Les portions de gel contenant des protéines ont été découpées et décolorées dans 200 µl de 0,1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/acétonitrile (v/v) pendant 20 minutes, centrifugé et gonflé dans de l'eau jusqu'à ce que la décoloration soit

complète. Les morceaux de gel ont ensuite été incubés dans 150 µl d'acétonitrile 100% pendant 10 min puis séchés. La réhydratation des pièces de gel se fait dans du NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M contenant 30 mg/ml de TCEP pendant 10 min à température ambiante. La solution de TCEP a été remplacée par 55 mM d'iodoacétamide dans du NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité.

Les morceaux de gel ont été lavés dans 150 µl de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M pendant 10 minutes, avant l'addition de 150 µl d'acétonitrile pendant 15 min, puis déshydratés dans 100% d'acétonitrile et séchés. Pour la digestion des pièces de gel par la trypsine, la trypsine profil IGD Kit-PP0100 (Sigma) a été utilisée selon les instructions du fabricant pendant une nuit à 37°C. Suite à la digestion enzymatique, les surnageants sont récupérés, l'extraction des protéines des fragments de gels a été effectuée deux fois par addition de 20 µl d'une solution d'acétonitrile/acide formique 5%, 70/30 (v/v) et incubés pendant 20 min à 37°C. Les surnageants ont été rassemblés, séchés et réhydratés dans un mélange acétonitrile/acide formique H<sub>2</sub>O dans un rapport 3/0,5/96 (v/v).

### **Mesure des masses des peptides et fragmentation**

L'analyse par LC-MS est effectuée avec un système nano LC (Ultimate 3000; Dionex) couplé à un spectromètre de masse hybride Ion trap/Orbitrap MS (LTQ Orbitrap Velos ; Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). 1µl de protéine digérée est injecté dans le système nano LC à l'aide d'une colonne de pré-concentration (C18 trap column - PepMap C18, 300 µmID×5 mm, 5µm particle size et 100 Å pore size; Dionex) et la colonne d'analyse est une colonne à phase inverse de longueur 15 cm (Acclaim pepmap RSLC 75µm x 15 cm, nanoViper C18, 2µm, 100 Å). Les peptides sont séparés avec le gradient suivant : 96 % solvant A pendant 3 min, 4–55% solvant B pendant 25 min, 50–90% solvant B pendant 1 min et 90% solvant B pendant 5 min (solvant A = H<sub>2</sub>O + 0.1% FA; solvant B = 80% ACN +20 % H<sub>2</sub>O + 0.1% FA). Un scan MS complet à haute résolution est effectué sur l'Orbitrap (résolution 30000; AGC (nombre d'ion maximum) 1 000 000). Les spectres MS/MS sont obtenus par collision-fragmentation (CID), avec une fenêtre d'isolement de 3 Da. *Data dependent top 5* (1 full MS suivi par 5 MS/MS) est réalisé, avec l'option *dynamic exclusion*. Le voltage appliqué au capillaire pour le nanospray est de 1.6 V, la température est de 275°C.

### **Analyse de données (Identification des protéines et de l'analyse quantitative)**

Les données sont analysées par le logiciel Proteome Discoverer 1.4. La base de donnée interrogée est une base humaine (Swiss-Prot), l'erreur de masse fixée pour les ions précurseurs (full MS) est inférieure à 10 ppm (erreur<sub>ppm</sub> =  $(m/z_{\text{experimental}} - m/z_{\text{théorique}}) \times$

$10^6/m/z_{\text{théorique}}$ . L'erreur de masse pour les ions issus des spectres MS/MS est déclarée inférieure à 0.6 Da. La masse des peptides est cherchée entre 350 Da et 5000 Da avec un temps de rétention est de 10 min à 50 min. Une erreur de site de clivage est tolérée. Les modifications dynamiques pour les peptides sont l'acétylation  $N_{\text{ter}}$ , l'oxydation de la méthionine et la carbamidométhylation pour les acides aminés histidine, acide aspartique et acide glutamique. La modification carbamidométhyle est systématique pour la cystéine. Les identifications de peptides sont validées par la détermination des faux positifs par la stratégie Target Decoy (Cible-Leurre). La probabilité d'identification du peptide repose sur la qualité du spectre MS/MS expérimental comparé au spectre théorique (PSM ou Peptide Spectral Match). Elle est élevée (high) si le taux de faux positifs (FDR ou False Discovery Rate) est inférieur à 1%, faible (low) si le FDR est supérieur à 5% et moyenne (medium entre les 1 et 5%). Elle est exprimée par la valeur Xcorr qui est une corrélation entre le spectre expérimental et le spectre théorique.

# RESULTATS



## **1- L'association directe des TspanC8 avec ADAM10 : caractérisation dans les cellules U2OS**

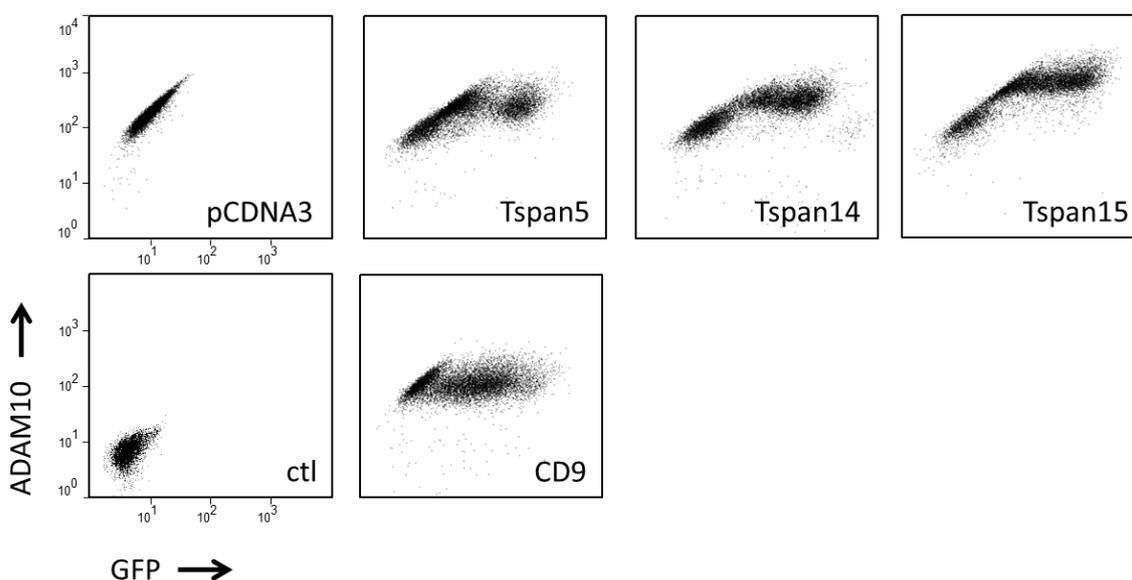
Des expériences précédentes avaient démontré que la métalloprotéase ADAM10 est la protéine partenaire des tétraspanines qui ont huit résidus cystéine dans leur LED (TSPAN5, TSPAN10, TSPAN14, TSPAN15, TSPAN17 et TSPAN33), désignées collectivement comme le sous-groupe TspanC8. Les TspanC8 régulent la sortie d'ADAM10 du réticulum endoplasmique (RE). Quatre d'entre elles, Tspan5, Tspan14, Tspan15 et Tspan33, peuvent réguler l'expression d'ADAM10 à la membrane plasmique tandis que les autres TspanC8, Tspan10 et Tspan17 induisent une accumulation d'ADAM10 dans les endosomes tardifs (Dornier *et al.*, 2012 ; Haining *et al.*, 2012 ; Prox *et al.*, 2012). Ce niveau de régulation apparaît important pour la voie de signalisation Notch puisque l'extinction, par ARN interférence, des tétraspanines Tspan5 et Tspan14 réduit l'activité Notch dans une lignée cellulaire humaine. De plus, l'extinction de l'activité de trois tétraspanines TspanC8 chez *D. Melanogaster* (Tsp3A, Tsp86D, et Tsp26D) altère plusieurs processus du développement dépendant de Notch, ainsi que son activité et la localisation subcellulaire d'ADAM10 *in vivo*. L'association directe d'ADAM10 avec plusieurs tétraspanines partenaires suggère que certaines de ses propriétés peuvent être régulées différemment par les diverses TspanC8. En effet, les TspanC8 ont une fonction conservée dans la régulation du trafic et de l'activité ADAM10, et elles pourraient réguler l'activation du récepteur Notch (Dornier *et al.*, 2012).

Afin de déterminer la façon dont les TspanC8 régulent ADAM10, et les conséquences sur la voie de signalisation Notch nous avons utilisé une lignée cellulaire d'ostéosarcome, les cellules U2OS, exprimant de façon endogène et majoritaire les TSPAN8 Tspan5 et Tspan14. Les tétraspanines Tspan-17 et -33 sont faiblement exprimées et les tétraspanines Tspan10 et Tspan15, ne le sont pas. Les cellules U2OS ont été transduites et expriment de façon stable le récepteur Notch-1 humain, et dénommées U2OSN1 (Moretti *et al.*, 2010).

### **1.1- L'expression des TspanC8, Tspan-5, -14 et -15 dans des cellules U2OSN1 augmente l'expression d'ADAM10 à la membrane**

Des expériences effectuées précédemment au laboratoire ont déjà démontré que l'inhibition de Tspan5 et Tspan14 réduit l'activité Notch dans les cellules U2OSN1. Ceci a été associé à une diminution des niveaux d'expression d'ADAM10. Le rôle de Tspan15 sur la métalloprotéase ADAM10 et le récepteur Notch n'a pas été déterminé dans ces cellules car elles n'expriment pas Tspan15. Nous avons comparé directement l'effet de Tspan5, Tspan14 et Tspan15 sur

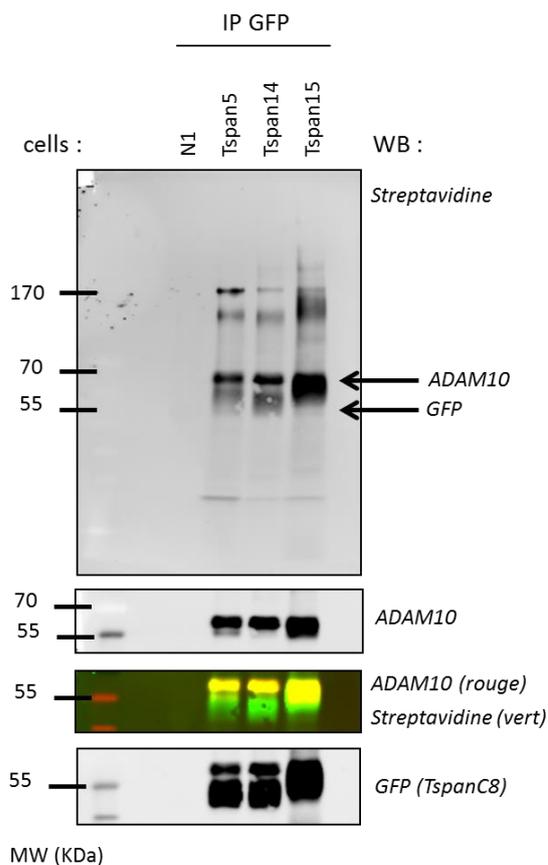
l'expression d'ADAM10. Les cellules U2OSN1 ont été transfectées de façon stable avec les plasmides codant les protéines de fusion : Tspan5-GFP, Tspan14-GFP et Tspan15-GFP. Le niveau d'expression de surface d'ADAM10 a été suivi simultanément avec celui des tétraspanines par des analyses de cytométrie en flux bi-paramétriques (GFP : tétraspanine ; PE : ADAM10). La transfection des tétraspanines-5, -14 et -15 induit une augmentation du niveau d'expression d'ADAM10 à la surface des cellules alors que l'expression de la tétraspanine CD9 (contrôle) n'a pas d'impact. L'expression d'ADAM10 dans les cellules exprimant Tspan15 est 2 fois supérieure à celle observée dans les cellules exprimant Tspan5 ou Tspan14 (figure 35).



**Figure 35:** L'expression des TspanC8 Tspan-5, -14 et -15 dans la lignée cellulaire U2OSN1 augmente l'expression de surface d'ADAM10. Analyse par cytométrie en flux du niveau d'expression de la protéine ADAM10 à la surface cellulaire selon la TspanC8 exprimée.

La présence du complexe TspanC8-ADAM10 à la surface des cellules U2OSN1 a été confirmée grâce à des analyses biochimiques. Les protéines de surface des cellules U2OSN1 exprimant de façon stable Tspan5, Tspan14 et Tspan15 ont été marquées par la biotine. Après la lyse des cellules dans des conditions non stringentes (BRIJ97), nous effectuons une co-immunoprécipitation (Co-IP) avec des anticorps dirigés contre la GFP, il n'existe pas d'anticorps fiables dirigés contre ces tétraspanines, nous utilisons donc la protéine de fusion GFP comme étiquette. Les immunoprécipitats ont été analysés par western-blot (figure 36). Nous confirmons la présence des complexes TspanC8-ADAM10 à la surface des cellules transfectées stables. La fraction d'ADAM10 associée aux tétraspanines est marquée par la

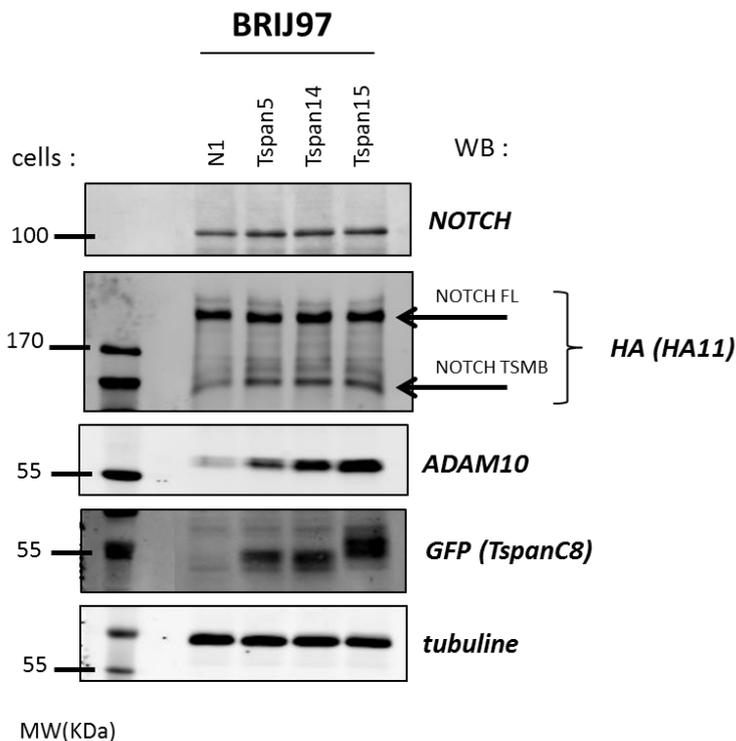
biotine comme le démontre l'immunoblot avec la streptavidine. Ces données indiquent qu'ADAM10 s'associe avec les trois TspanC8, Tspan5, -14 et -15, et que les couples TspanC8-ADAM10 sont présents à la surface cellulaire.



**Figure 36:** Les complexes TspanC8-ADAM10 sont présents à la surface cellulaire.

L'association entre les TspanC8 et la protéase ADAM10 est analysée par western-blot après marquage des protéines de surface par la biotine et co-immunoprécipitation, dans les cellules U2OSN1 exprimant de façon stable ou non les Tspan5, -14 ou -15, lysées en BRIJ97.

L'expression du récepteur Notch dans les cellules U2OSN1 a ensuite été analysée. Les cellules U2OSN1 expriment de façon stable le récepteur Notch-1 humain dans lequel une étiquette hémagglutinine (HA) est insérée entre les répétitions EGF 22 et 23 (Moretti *et al.*, 2012). Les cellules U2OSN1, exprimant ou non de façon stable les tétraspanines-5, -14 et -15 étiquetées GFP, ont été lysées en condition non-stringente (Brij97) puis analysées par western-blot. L'augmentation de l'expression d'ADAM10 par les TspanC8 et la présence des complexes Tspan-ADAM10 à la surface des cellules ne sont pas corrélées avec une modification notable de l'expression du récepteur Notch (figure 37).

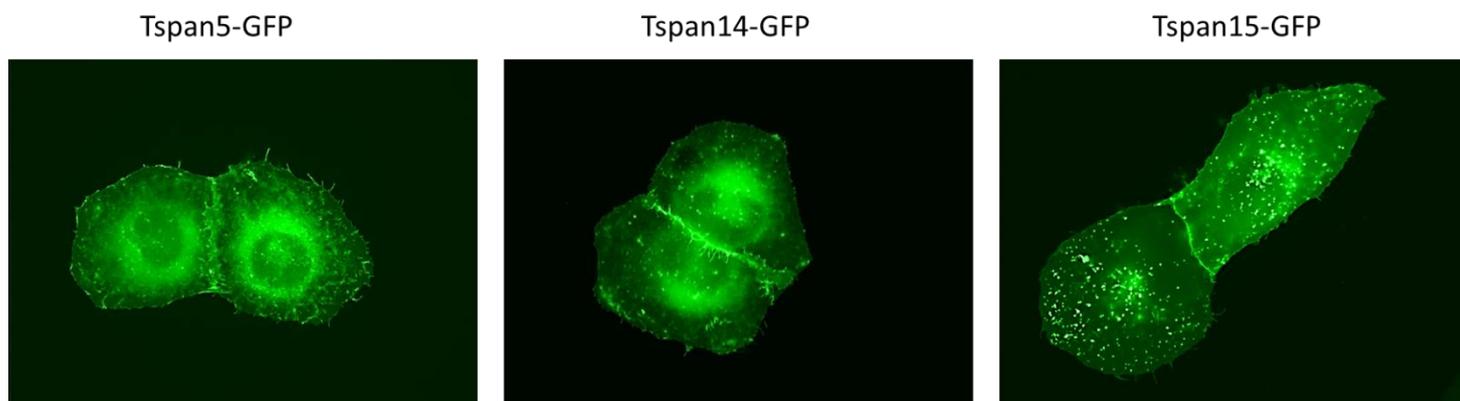


**Figure 37:** Analyse de l'expression du récepteur Notch dans les cellules U2OSN1.

Des cellules U2OSN1 ont été transfectées de façon stable avec Tspan5-GFP, Tspan14-GFP et Tspan15-GFP et analysées par western-blot avec les anticorps cités sur la droite, après lyse en Brij97.

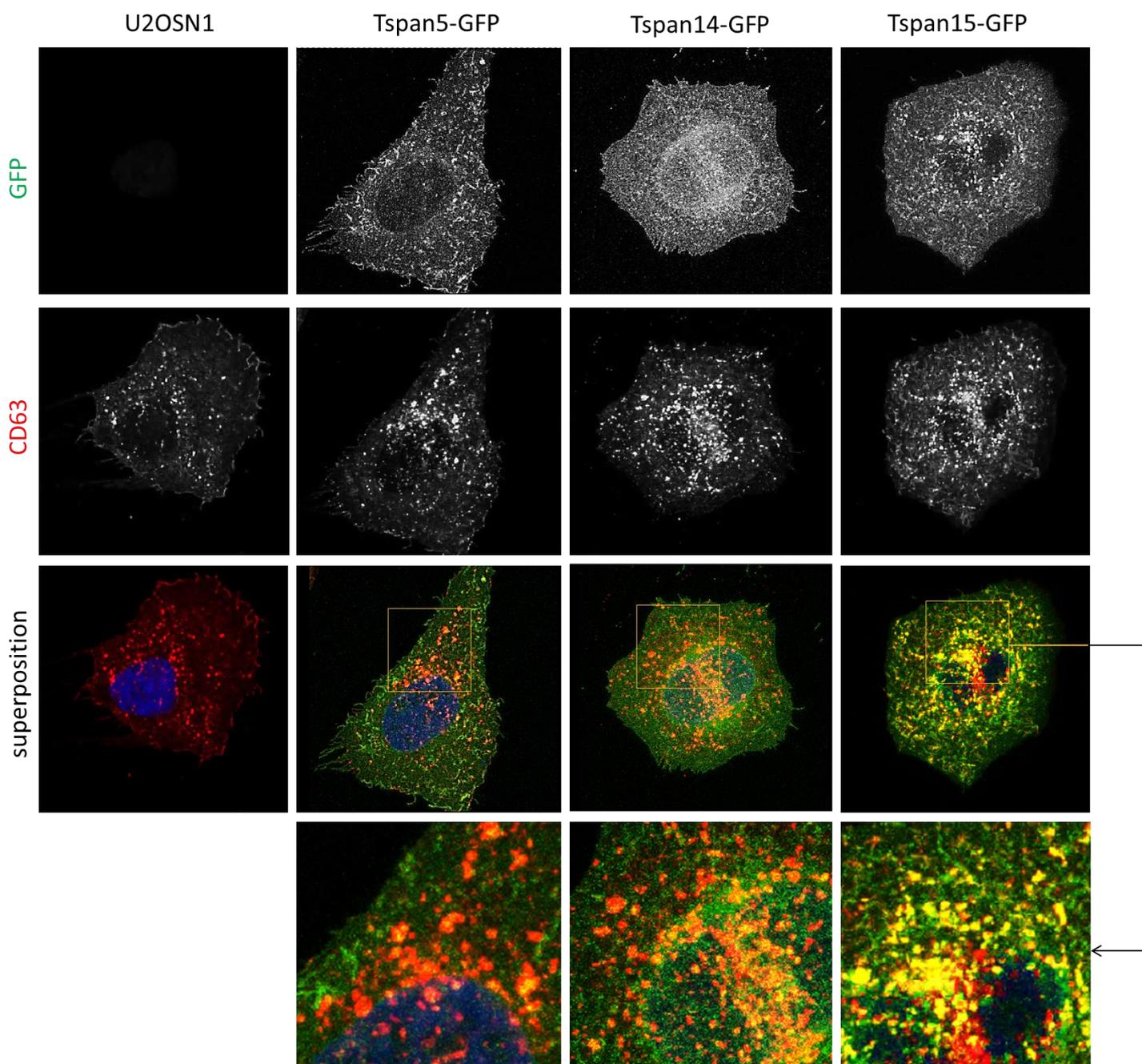
## 1.2- Distribution intracellulaire des TspanC8, Tspan5, Tspan14 et Tspan15 dans les cellules U2OSN1

Nous avons étudié la localisation subcellulaire des tétraspanines dans les cellules U2OSN1 transfectées ou non de façon stable avec Tspan5-GFP, Tspan14-GFP et Tspan15-GFP par épifluorescence (figure 38). Les tétraspanines Tspan5, Tspan14 et Tspan15 sont exprimées à la membrane cellulaire et elles ont également une localisation intracellulaire. Les Tspan5 et Tspan14 semblent être exprimées dans un compartiment péri-nucléaire alors que Tspan15 apparait dans un compartiment vésiculaire.



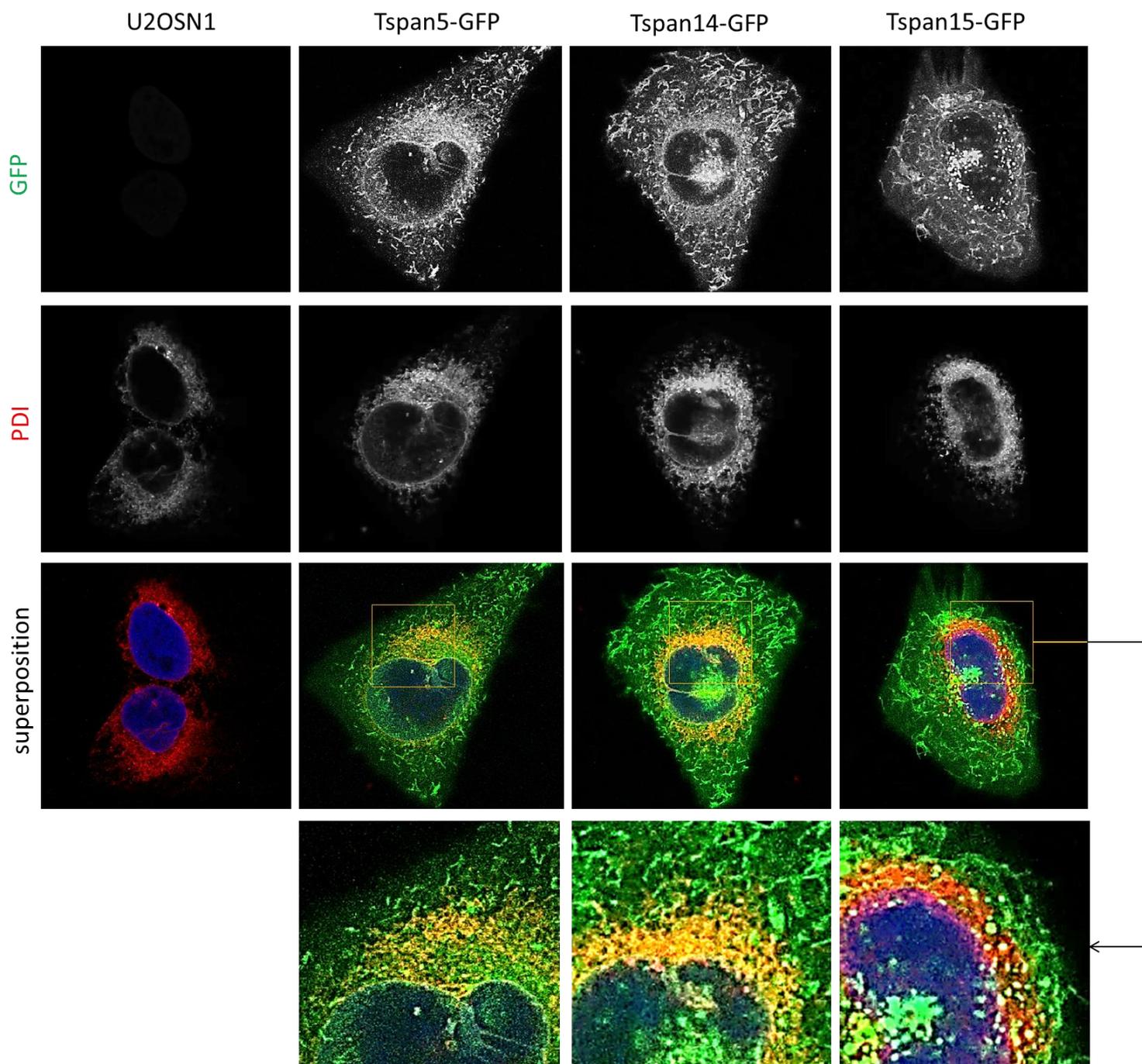
**Figure 38:** Les TspanC8 ont une localisation subcellulaire différente. Analyse par immunofluorescence de la localisation des TspanC8 sur les cellules U2OSN1 transfectées de façon stable avec Tspan5-GFP, Tspan14-GFP et Tspan15-GFP. Les cellules ne sont pas perméabilisées. Les réglages d'acquisition sont identiques pour toutes les images. Objectif à immersion x63.

Afin de déterminer l'identité des compartiments intracellulaires nous avons effectué des analyses par microscopie confocale. Les cellules U2OSN1 transfectées ou non de façon stable avec Tspan5-GFP, Tspan14-GFP et Tspan15-GFP ont été perméabilisées, puis marquées avec des anticorps dirigés contre des marqueurs de compartiment intracellulaire. Un fort marquage vésiculaire est toujours observé dans les cellules exprimant Tspan15. Ces vésicules intracellulaires positives pour Tspan15 sont co-marquées avec le CD63, un marqueur des endosomes tardifs (figure 39). De façon intéressante il n'y a pas de co-marquage intracellulaire de ces vésicules avec ADAM10 (figure 41). Les Tspan5 et Tspan14 sont exprimées dans un compartiment péri-nucléaire et co-localisent avec le marqueur du réticulum endoplasmique, PDI (figure 40). Elles sont également présentes dans des structures fines de type vésiculaires qui expriment ADAM10 (figure 41). Ces données démontrent que les tétraspanines 5 et 14 sont exprimées dans le réticulum endoplasmique, il est possible qu'une fraction plus importante de ces tétraspanines ne soit pas sortie du RE par rapport à Tspan15 (en ce qui concerne le compartiment intracellulaire) qui est exprimé principalement dans les endosomes tardifs. La protéase ADAM10 n'est pas localisée dans les endosomes tardifs et est localisée différemment selon l'expression de Tspan5/Tspan14 par rapport à Tspan15 (figure 41).



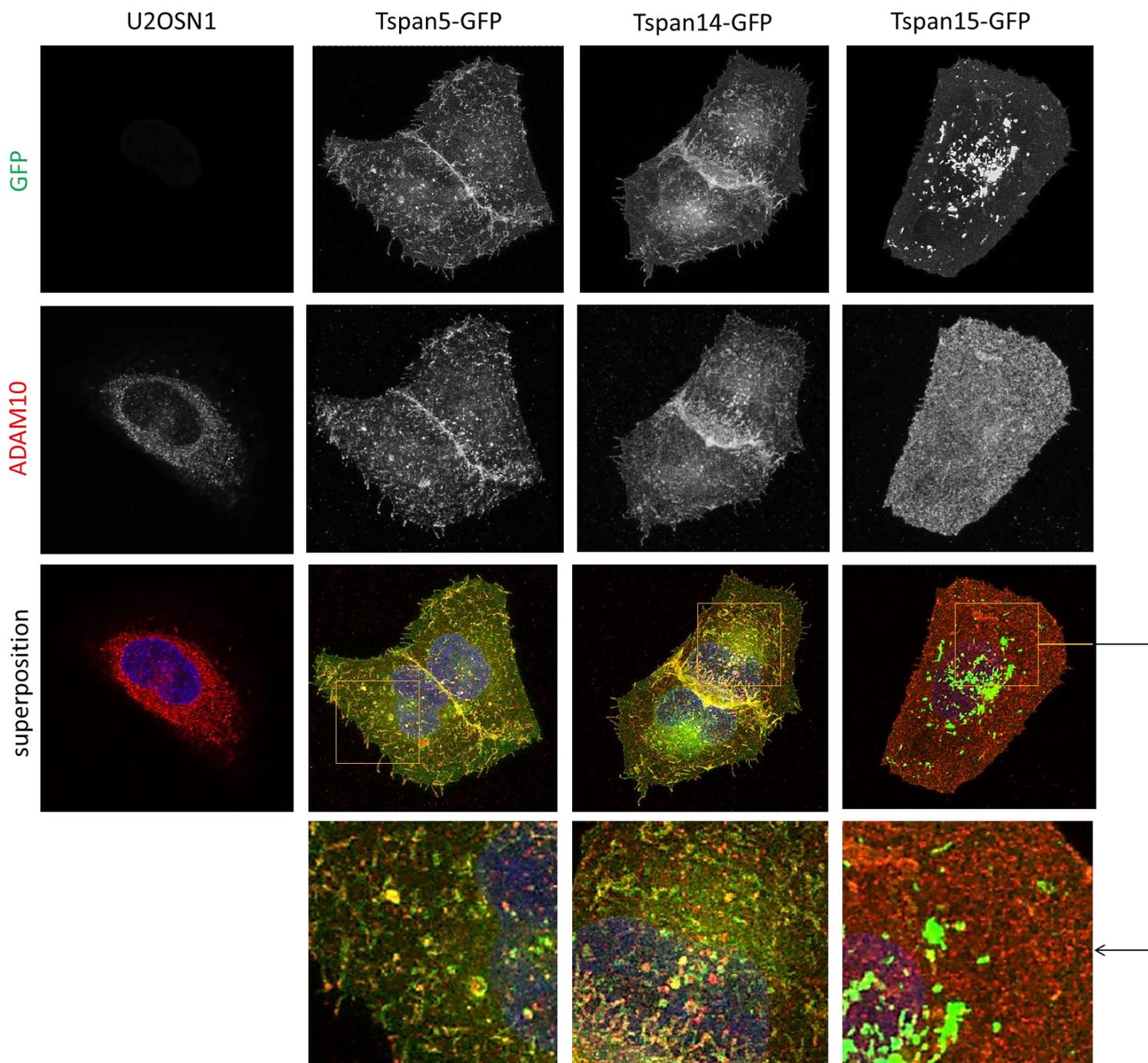
**Figure 39:** La TspanC8, Tspan15 est exprimée dans les endosomes tardifs.

Analyse par microscopie confocale de la distribution subcellulaire des TspanC8 dans les cellules U2OSN1 transfectées de façon stable avec Tspan5-GFP, Tspan14-GFP et Tspan15-GFP. Les cellules sont perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-CD63 (endosomes tardifs). Les réglages d'acquisition sont identiques pour toutes les images. Objectif à immersion x63.



**Figure 40:** Les TspanC8, Tspan5 et Tspan14 sont partiellement retenues dans le réticulum endoplasmique.

Analyse par microscopie confocale de la distribution subcellulaire des TspanC8 dans les cellules U2OSN1 transfectées de façon stable avec Tspan5-GFP, Tspan14-GFP et Tspan15-GFP. Les cellules sont perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-PDI (RE). Les réglages d'acquisition sont identiques pour toutes les images. Objectif à immersion x63.

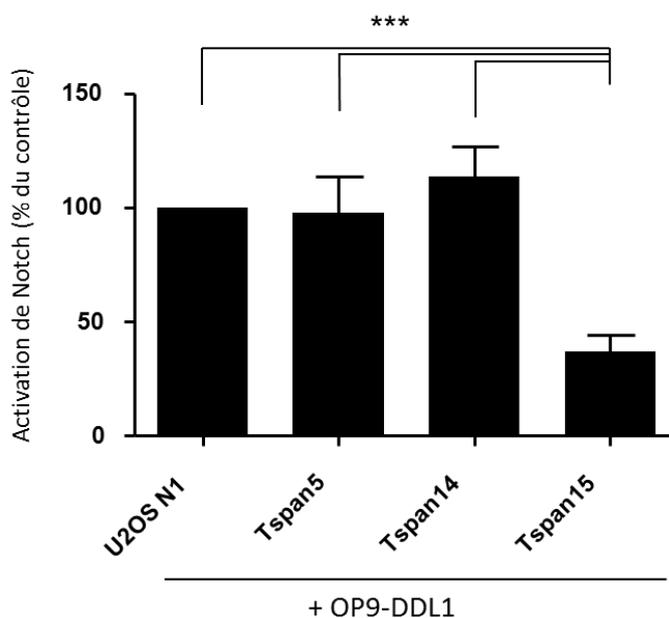


**Figure 41:** ADAM10 colocalise avec Tspan5 et Tspan14 dans le compartiment intracellulaire mais pas avec Tspan15.

Analyse par microscopie confocale de la distribution subcellulaire d'ADAM10 dans les cellules U2OSN1 transfectées de façon stable avec Tspan5-GFP, Tspan14-GFP et Tspan15-GFP. Les cellules sont perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-ADAM10. Les réglages d'acquisition sont identiques pour toutes les images. Objectif à immersion x63.

## 2- L'expression de Tspan15 dans les cellules U2OSN1 inhibe l'activité Notch induite par le ligand

Les TspanC8 régulent la sortie d'ADAM10 du réticulum endoplasmique (RE) et contrôlent différemment son adressage à la membrane plasmique. Afin d'examiner l'impact de l'expression de ces TspanC8 sur la régulation de la voie de signalisation Notch induite par le ligand, nous utilisons les cellules U2OSN1. Les différentes lignées cellulaires exprimant ou non stablement les Tspan-5, -14 ou -15 ont été transfectées transitoirement avec une construction reportrice de l'activité Notch (luciférase firefly). La voie de signalisation est activée grâce à l'apport d'un de ses ligands, Delta-1 (DLL1) par co-culture avec des cellules OP9 l'exprimant ou non. L'expression de Tspan5 ou Tspan14 n'a eu aucun effet significatif sur l'activité de Notch. En revanche, les cellules U2OSN1 exprimant Tspan15, ont montré une diminution d'environ 50% de l'activité Notch induite par les cellules OP9-DLL1 par comparaison à des cellules U2OSN1 (figure 42). Des résultats similaires ont été obtenus à l'aide de deux populations de cellules transfectées de manière stable et de façon indépendante.

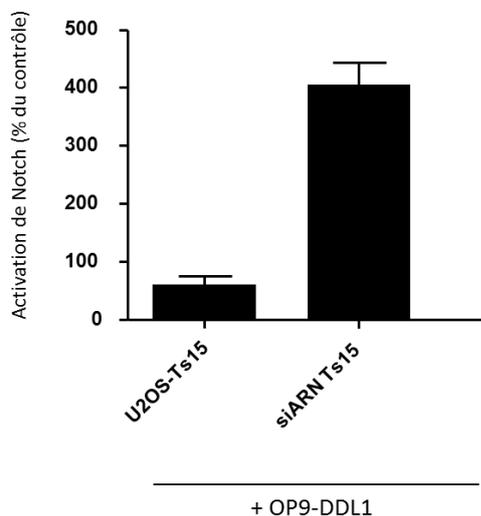


**Figure 42:** L'expression de Tspan 15 dans les cellules U2OSN1 diminue l'activation ligand dépendante de la voie Notch.

Les cellules U2OSN1 exprimant ou non stablement Tspan5, 14 ou 15 sont transfectées avec la construction reportrice de Notch, CSL-luciférase, pour mesurer son activité après mise en contact en co-culture de cellules OP9 exprimant ou non le ligand de Notch, DLL1. Sur la figure est représentée l'erreur standard (SEM : Standard Error of the Mean) des expériences indépendantes faites en duplicat.

## 2.1- L'inactivation de Tspan15 restaure l'activité Notch

L'expression de Tspan15 a été (fortement) diminuée par ARN interférence dans les cellules U2OSN1. Les conséquences sur l'activation de la voie de signalisation Notch ont été suivies par mesure de l'activité luciférase. L'effet de Tspan15 est spécifique car sa déplétion induit une large augmentation de l'activité Notch (figure 43).

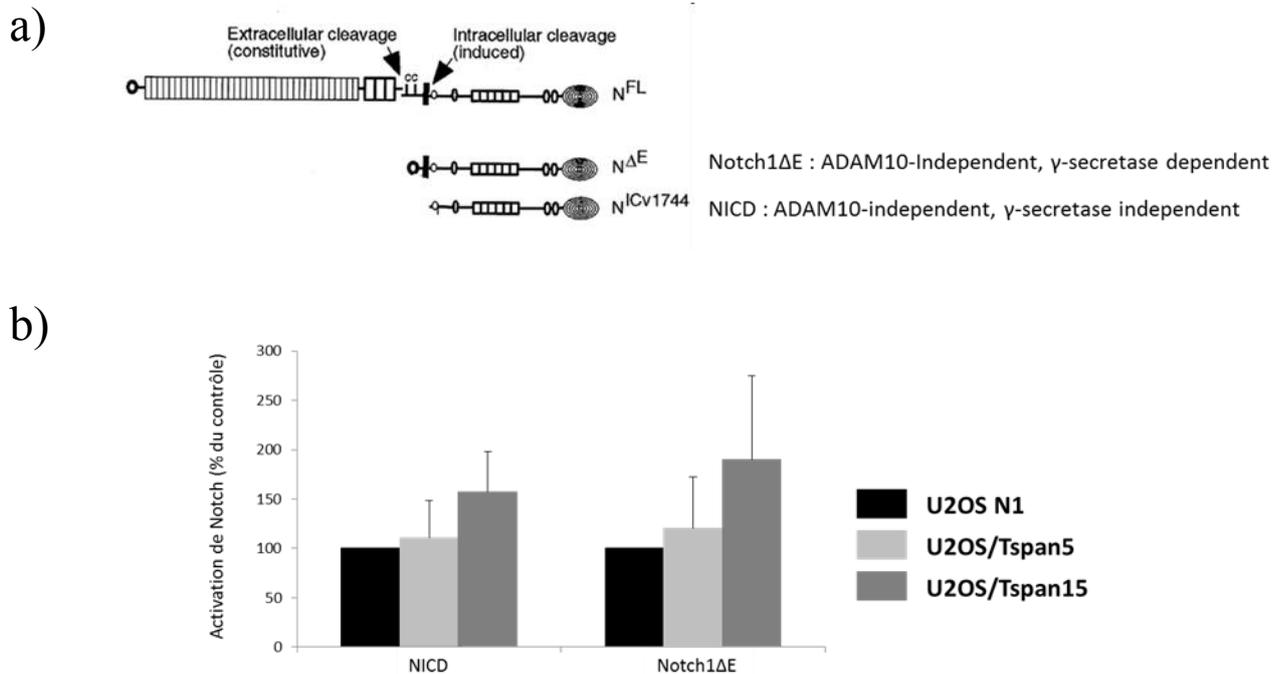


**Figure 43:** La déplétion de Tspan15 dans les cellules U2OSN1 augmente l'activation ligand dépendante de la voie Notch. L'expression de Tspan15 dans les cellules U2OSN1-Tspan15GFP a été diminuée par ARN interférence. Puis elles ont été transfectées avec la construction reportrice de Notch, CSL-luciférase, pour mesurer son activité après mise en contact en co-culture de cellules OP9 exprimant ou non le ligand de Notch, DLL1. Sur la figure est représentée l'erreur standard (SEM : Standard Error of the Mean) des expériences indépendantes faites en duplicat.

## 2.2- La tétraspanine-15 inhibe la signalisation Notch à un niveau pré- $\gamma$ -sécrétase

Lorsque la signalisation Notch canonique est activée, la production du fragment intracellulaire NICD se fait grâce à deux clivages successifs du récepteur notch suite à la fixation du ligand, le premier est effectué par ADAM10 et le second par le complexe  $\gamma$ -sécrétase (Mumm *et al.*, 2000 ; Fryer *et al.*, 2002 ; Fryer *et al.*, 2004). Ces clivages permettent donc la libération du NICD qui à son tour migre vers le noyau et active la transcription des gènes cibles de Notch. Afin de préciser l'étape d'activation de la voie de signalisation qui est régulée par Tspan5 et Tspan15 nous avons testé si ces TspanC8 sont capables d'agir sur le complexe  $\gamma$ -sécrétase. Afin de répondre à ces questions nous avons exprimé dans les cellules U2OSN1 exprimant ou non de façon stable les tétraspanines -5 et -15, les différentes constructions du récepteur Notch indépendantes de la fixation du ligand : NICD, qui correspond au domaine intracellulaire de Notch1, et Notch1- $\Delta$ E, qui contient une partie du domaine extracellulaire, le domaine transmembranaire et le NICD. Les deux constructions ne contiennent pas le domaine PEST qui participe à la dégradation et à l'arrêt de la signalisation (figure 44a), (Fryer *et al.*, 2002 ; Fryer *et al.*, 2004).

L'expression des constructions reportrices, NICD et Notch1- $\Delta E$  (constitutivement actives) induisent une augmentation de l'activité Notch dans les cellules U2OSN1 exprimant les TspanC8, de façon intéressante elle n'est pas réduite dans les cellules exprimant Tspan15 (figure 44b). L'ensemble de ces données indiquent que Tspan15 est un régulateur négatif de la signalisation Notch à une étape pré- $\gamma$ -sécrétase, en agissant très probablement sur ADAM10.



**Figure 44:** L'expression de Tspan15 dans les cellules U2OSN1 inhibe la voie de signalisation Notch à une étape pré- $\gamma$ -sécrétase.

a) Représentation schématique des constructions utilisées. Le fragment Notch1 $\Delta E$  est dépendant du clivage par le complexe  $\gamma$ -sécrétase alors que le fragment NICD est indépendant des clivages protéolytiques et peut migrer au noyau pour activer la construction reportrice (Mumm et al., 2000 ; Fryer et al., 2002 ; Fryer et al., 2004)

b) Quantification de l'activation de la voie de signalisation Notch indépendante de la fixation du ligand. Les cellules U2OSN1 exprimant ou non stablement Tspan5 ou Tspan15 sont transfectées avec différentes constructions du récepteur Notch indépendante de la fixation du ligand: Notch1 $\Delta E$  et NICD. Sur la figure est représentée l'erreur standard (SEM : Standard Error of the Mean) des expériences indépendantes faites en duplicat.

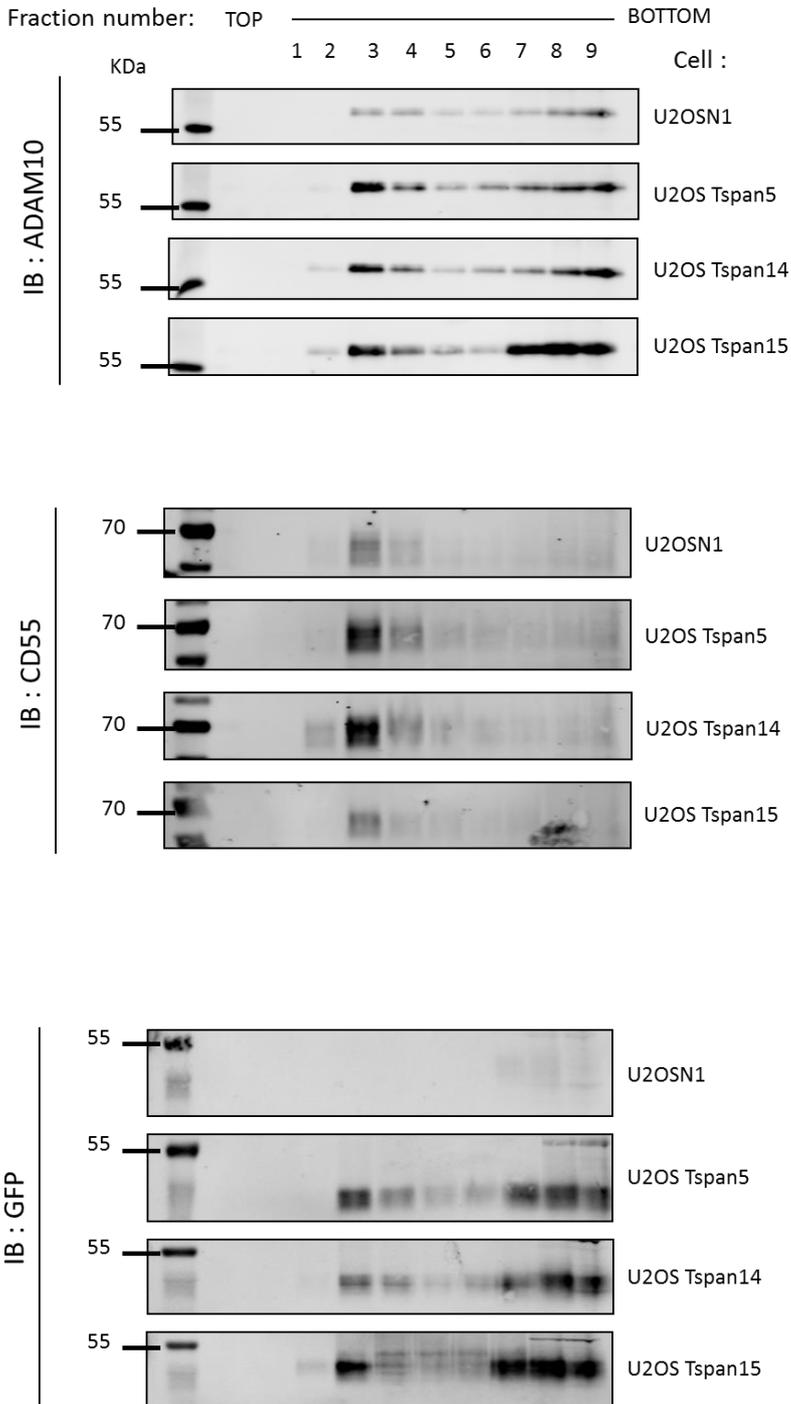
### **3- Les TspanC8 régulent de façon différente la compartimentation membranaire d'ADAM10**

#### **3.1- Analyse de l'environnement membranaire d'ADAM10 par gradient de saccharose**

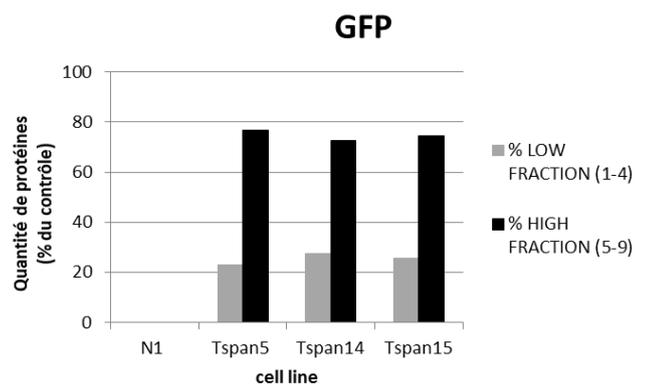
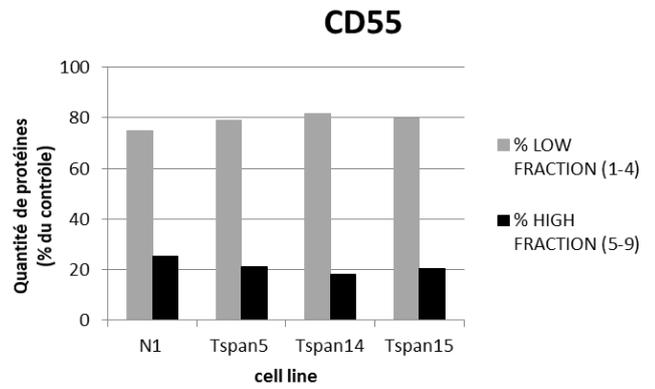
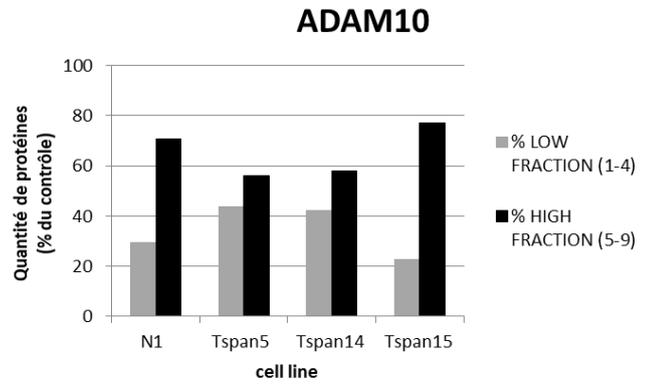
Nous avons supposé que l'activité différentielle des TspanC8 sur l'activité Notch pourrait être due à une compartimentation membranaire d'ADAM10 différente. Pour déterminer si Tspan5, Tspan14 et Tspan15 pouvaient influencer l'environnement membranaire d'ADAM10 à la membrane, nous avons effectué une centrifugation en gradient de saccharose. Les cellules U2OSN1 transfectées ou non de façon stable avec Tspan5-GFP, Tspan14-GFP et Tspan15-GFP ont été lysées en conditions non-stringente (Brij98). Nous avons ensuite analysé la densité apparente des molécules d'ADAM10 par immunoblot après séparation sur un gradient discontinu de saccharose. La densité des tétraspanines a été étudiée et comparée aux contrôles (figure 45). Comme attendu, le CD55 une protéine à ancre-GPI, résident des radeaux lipidiques (Charrin *et al.*, 2002), a été principalement retrouvée dans les fractions de faible densité (1-4). La séparation entre les différentes fractions (1-9) de CD9P-1, un partenaire moléculaire CD9 et CD81, et de la tétraspanine CD9 a été similaire dans les différentes lignées cellulaires. Comme observé sur la figure 36, une fraction d'ADAM10 est présente dans les fractions légères de gradients de saccharose, indiquant une association de la molécule avec les membranes résistantes aux détergents (DRM : Detergent-Resistant Membranes). De plus, la fraction d'ADAM10 présente dans les fractions de haute densité est plus élevée dans les cellules U2OSN1 transfectées avec Tspan15 que dans les cellules U2OSN1 transfectées avec Tspan5 ou Tspan14. Ces données suggèrent que l'environnement membranaire de la protéase ADAM10 est différent selon l'expression de Tspan5 ou Tspan15.

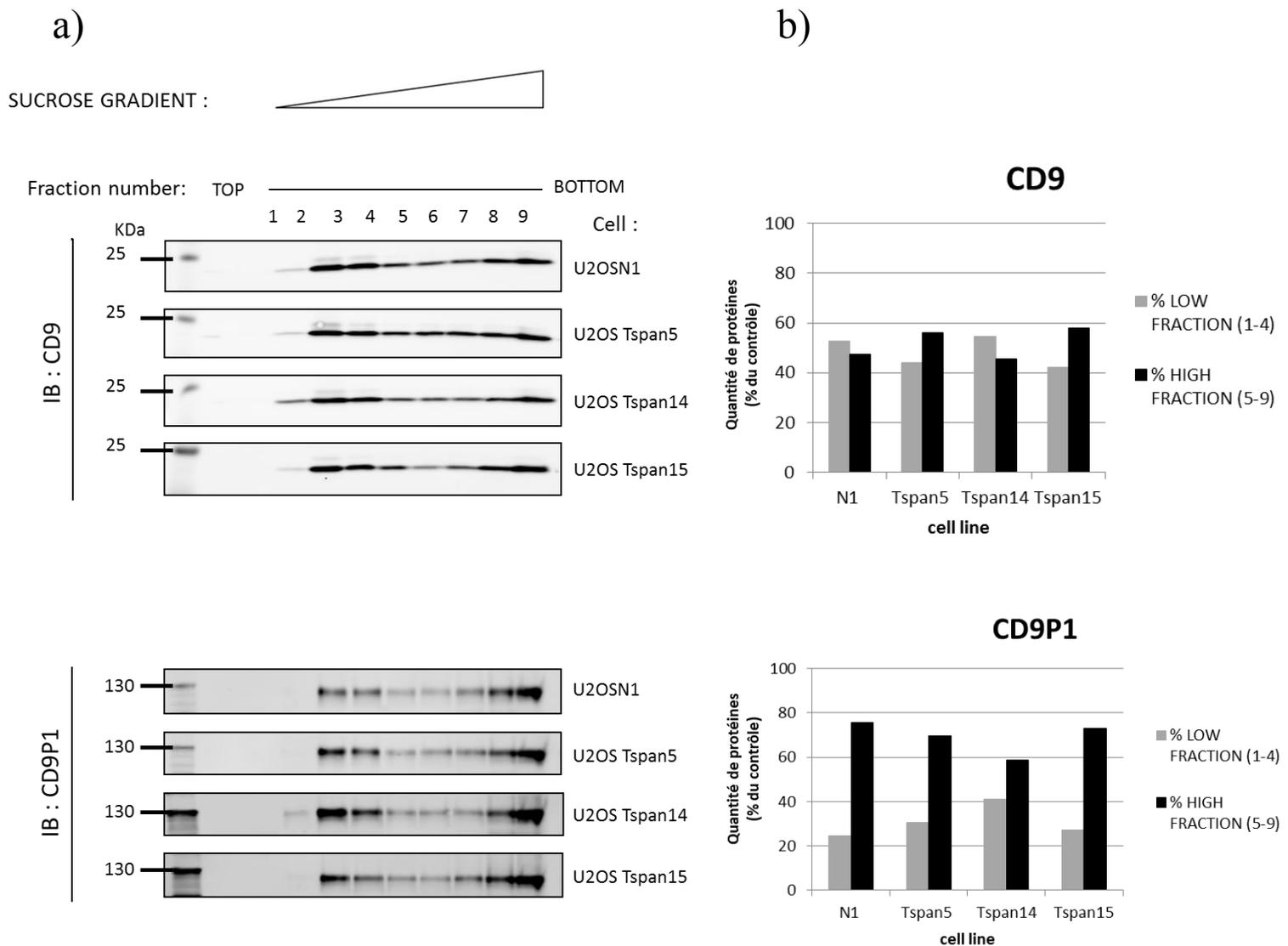
a)

SUCROSE GRADIENT :



b)





**Figure 45:** L'environnement membranaire de la protéase ADAM10 est différent selon l'expression de Tspan5 ou Tspan15.

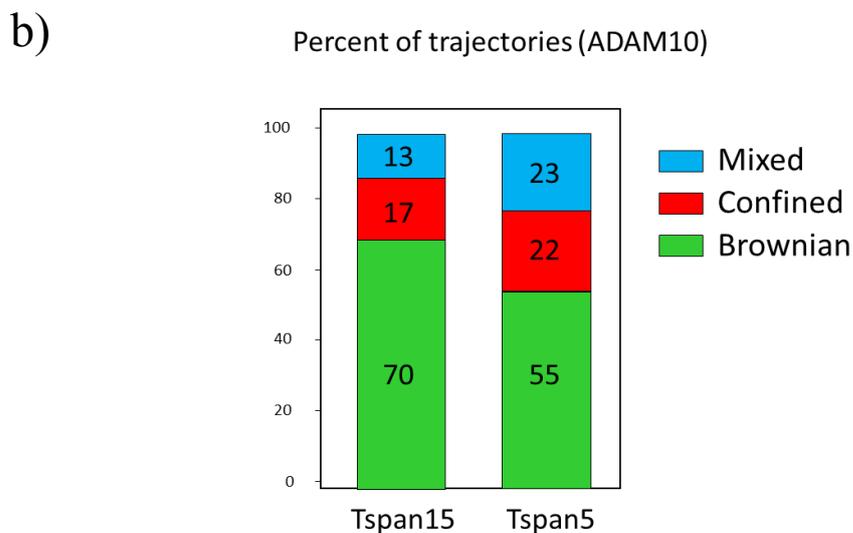
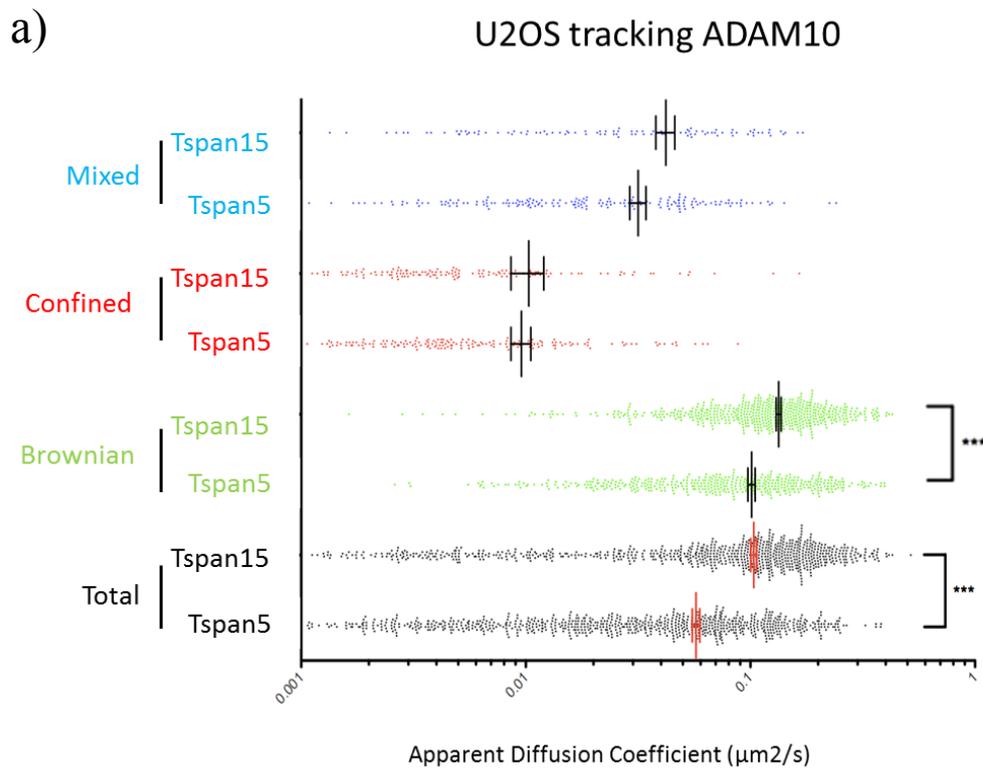
a) Analyse par western-blot après ultracentrifugation en gradient de saccharose (4%-60%), des cellules U2OSN1 transfectées stablement ou non avec Tspan5-GFP, Tspan14-GFP et Tspan15-GFP, lysées en Brij98. Les fractions récoltées, numérotées de 1 à 9, sont ensuite analysées par SDS-PAGE, et la détection est effectuée avec des anticorps dirigés contre ADAM10, CD9 (tétraspanine témoin) CD9P-1 (protéine partenaire de CD9, témoin), GFP (contrôle TspanC8), CD55 (protéine à ancre-GPI, contrôle compartimentation).

b) Représentation graphique des quantifications obtenues après SDS-PAGE des fractions de l'ultracentrifugation en gradient de saccharose. Les analyses ont été effectuées grâce au système d'imagerie infrarouge Odyssey®.

### **3.2- Le comportement dynamique d'ADAM10 à la membrane plasmique est différent selon l'expression de Tspan5 ou Tspan15**

Afin d'analyser le comportement dynamique d'ADAM10 dans le cadre de la compartimentation par les tétraspanines nous avons utilisé la méthode du suivi de molécule isolée ou single-molecule tracking (SMT) en collaboration avec Pierre-Emmanuel Milhiet. Les cellules U2OSN1 exprimant de façon stable Tspan5 et Tspan15 ont été étalées sur des lamelles de verre. Pour marquer les molécules ADAM10, des fragments Fab de l'anticorps monoclonal 11G2 ont été préparés et étiquetés avec une sonde fluorescente unique Atto647N. Dans cette technique, l'étiquetage d'un faible nombre de protéines permet aux molécules individuelles d'être optiquement isolées et leur position déterminée avec précision. Le type de diffusion est établi par l'analyse du coefficient de diffusion apparent (ADC) qui a été calculé selon le déplacement quadratique moyen (MSD) par rapport aux courbes temporelles des trajectoires de molécules individuelles (pour plus de détails, voir la section dans le matériel et méthode).

De façon similaire à d'autres protéines membranaires, dont la tétraspanine CD9, la distribution de l'ADC d'ADAM10 est hétérogène. Trois modes de diffusion ont été observés: (1) une diffusion brownienne, (2) une diffusion confinée ou restreinte, et (3) une diffusion alternant des périodes de diffusion brownienne et confinée appelée «trajectoires mixtes » (figure 37). Une différence majeure entre les deux lignées cellulaires, U2OSN1-Tspan5 et U2OSN1-Tspan15, est une fraction plus élevée de molécules d'ADAM10 présentant un mouvement brownien dans les cellules transfectées avec Tspan15 (70%) que celles transfectées avec Tspan5 (55%), (figure 46). L'ADC moyen d'ADAM10 était significativement plus élevé dans les cellules exprimant Tspan15 que dans les cellules exprimant Tspan5 ( $0,1035 \pm 0,0022 \mu\text{m}^2/\text{s}$  contre  $0,05733 \pm 0,003073$  (moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 800$ ,  $p < 0,0001$ ). Cela est dû à un ADC un peu plus élevé de molécules possédant un mouvement brownien ( $0,1337 \pm 0,0038 \mu\text{m}^2/\text{s}$  contre  $0,1012 \pm 0,0034 \mu\text{m}^2/\text{s}$  ( $n = 560$  et  $440$ ,  $p < 0,0001$ ) ainsi qu'à une fraction plus faible de molécules confinées et de molécules mixtes (17% et 13% contre 22 et 23%), dont le taux de diffusion est plus faible. Ces analyses confirment que les tétraspanines Tspan5 et Tspan15 régulent de façon différente le comportement dynamique d'ADAM10 par compartimentation membranaire.



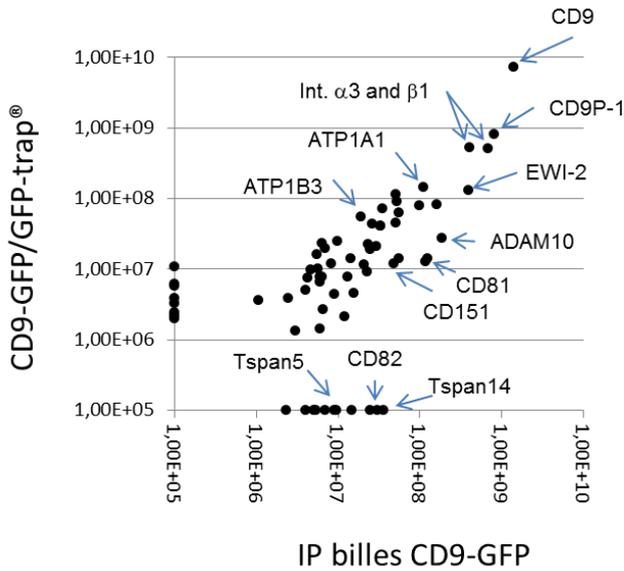
**Figure 46:** L'expression de Tspan5 et Tspan15 modifie le comportement dynamique d'ADAM10 à la membrane.

a) Distribution des ADC d'ADAM10 en fonction de l'expression de Tspan5 et Tspan15 et du type de trajectoires dans des cellules U2OSN1 transfectées de façon stable pour Tspan5-GFP ou Tspan15-GFP.

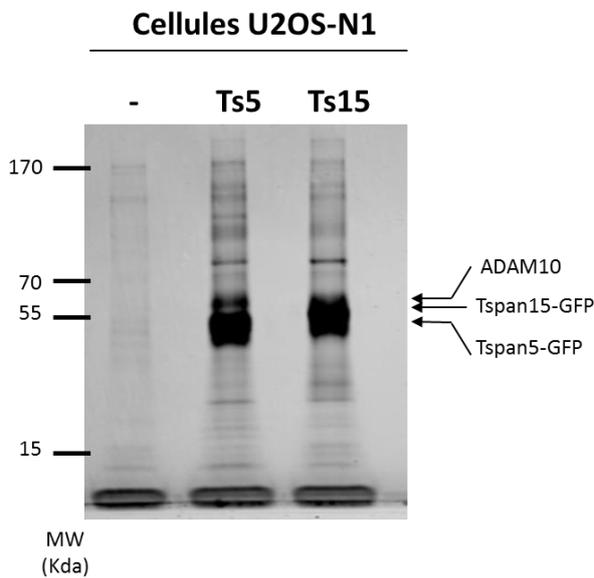
b) Histogramme représentant la répartition des différents modes de trajectoires d'ADAM10 en fonction de l'expression de Tspan5 et Tspan15 dans des cellules U2OSN1 transfectées de façon stable pour Tspan5-GFP ou Tspan15-GFP.

### **3.3- Le répertoire des protéines-associées à Tspan5 et Tspan15 est très divergent**

Les données précédentes suggèrent que Tspan5 et Tspan15 ciblent ADAM10 dans différents compartiments membranaires. Afin de caractériser l'environnement protéique membranaire d'ADAM10, nous avons analysé le répertoire des molécules associées aux Tspan5 et Tspan15. Nous avons comparé par spectrométrie de masse quantitative « label-free », les protéines intégrales de la membrane plasmique co-immunoprécipitées avec Tspan5, Tspan15 ou CD9 (une tétraspanine classique) après lyse en condition non-stringente (Brij97), qui permet de conserver les interactions tétraspanine-tétraspanine. La plupart des analyses précédentes de protéines associées aux tétraspanines ont été réalisées après immunoprécipitation en utilisant des anticorps anti-tétraspanines. En l'absence d'anticorps fiables pour Tspan5 ou Tspan15, nous utilisons une approche alternative. Afin d'évaluer la pertinence du pull-down par GFP-trap® des tétraspanines étiquetées GFP, nous avons comparé le répertoire des protéines de la membrane cellulaire co-immunoprécipitées avec CD9 (à partir de cellules U2OSN1) en utilisant un anticorps monoclonal anti-CD9, ou avec CD9-GFP (cellules U2OSN1 exprimant de façon stable CD9-GFP) en utilisant des billes GFP-trap®. Nous observons que Tspan5 et Tspan14 sont présentes dans l'immunoprécipitation avec des anticorps anti-CD9. Une différence notable est que plusieurs tétraspanines qui ont été co-immunoprécipitées par l'anticorps anti-CD9 n'ont pas été détectées après l'immunoprécipitation de CD9-GFP en utilisant des billes GFP-TRAP® (figure 47). Nous avons constaté qu'il y avait une bonne corrélation entre les billes CD9-GFP et les billes GFP-TRAP®, dans cette approche les tétraspanines pourraient-êtré sous estimées. Les données de spectrométrie de masse ont été analysées et nous nous sommes focalisés sur les protéines intégrales connues pour être exprimées à la membrane plasmique, une centaine a été dénombrée. Parmi elles, quelques-unes ont été co-immunoprécipité uniquement avec la tétraspanine CD9, d'autres protéines précipitent mieux avec Tspan5 que Tspan15 et inversement. Il ressort de cette analyse que le répertoire des protéines membranaires interagissant avec Tspan5 est fortement similaire à celui de CD9. En revanche le profil des protéines membranaires interagissant avec Tspan15 est très largement différent (figures 48-49). Le tableau 10 répertorie les protéines présentes à la membrane plasmique les plus abondantes co-immunoprécipitées avec les tétraspanines CD9, Tspan5 ou Tspan15.

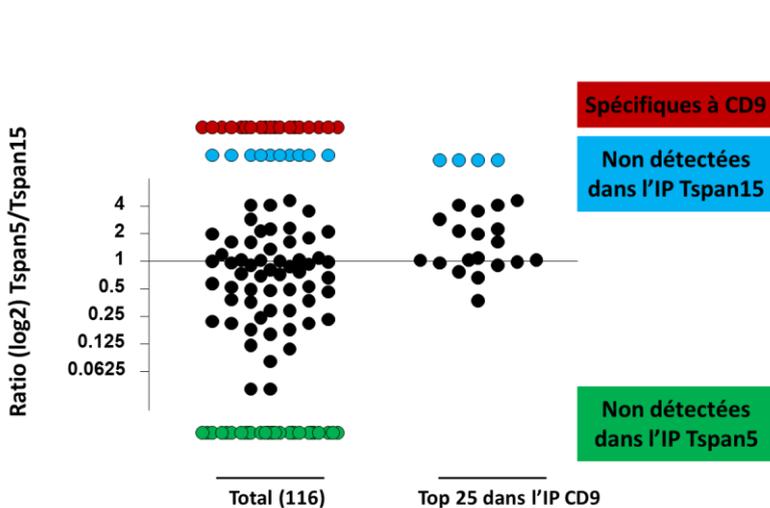


**Figure 47 :** Comparaison des protéines immunoprécipitées par l'anticorps anti-CD9 versus celles immunoprécipitées dans les cellules CD9-GFP en utilisant des billes GFP-TRAP®. Il y a une bonne corrélation entre les deux approches.



**Figure 48:** Immunoprécipitation avec le système GFP-TRAP® et purification des protéines partenaires.

Les complexes (protéines partenaires) à tétraspanines sont isolés après lyse des cellules U2OSN1 transfectées stablement avec CD9-GFP, Tspan5-GFP et Tspan15-GFP en Brij97, puis immunoprécipités. Après l'IP ils sont déposés sur gel SDS-PAGE, coloré au bleu de comassie, puis préparé en vue d'identifier les protéines par MS/MS. Les tétraspanines 5 et 15 et la protéase ADAM10 sont indiquées à gauche.



**Figure 49 :** Répartition des protéines membranaires associées à CD9, Tspan5 ou Tspan15, en fonction de leurs niveaux de co-immunoprécipitation avec Tspan5 ou Tspan15.

Plus de 100 protéines ont été précipitées. Certaines ont co-immunoprécipitées seulement avec CD9 (en rouge), d'autres l'étaient mieux avec Tspan5 que Tspan15 (en bleu), à l'inverse d'autres l'étaient avec Tspan15 mais pas Tspan5 (en vert). Les protéines les plus abondantes co-immunoprécipitées avec CD9, sont aussi mieux co-immunoprécipitées avec Tspan5 qu'avec Tspan15. Les protéines sont distribuées ici selon le rapport entre Tspan5 et Tspan15.

| Protéine  | Gène          | Quantité de protéines<br>(Nombre de peptides uniques) |                             |                             |
|---|---------------|---|-----------------------------|-----------------------------|
|   |               | CD9   | Tspan5                      | Tspan15                     |
| <b>Spécifique à CD9</b>                                       |               |   |                             |                             |
| Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1           | ATP1B1        | 71.37 (3)   | ND                          | ND                          |
| Monocarboxylate transporter 8 (MCT 8)                         | SLC16A2       | 40.67 (2)   | ND                          | ND                          |
| <b>Tsp5 ≈ Tsp15</b>   |               |   |                             |                             |
| Disintegrin et metalloproteinase domain-containing protein 10 | ADAM10        | 27.69 (5)   | 3795.00 (18)                | 4232.00 (31)                |
| Transferrin receptor protein 1                                | TFRC          | 81.55 (23)  | 50.40 (16)                  | 49.01 (19)                  |
| CD9 antigen   | CD9           | 7170.00 (5)   | 49.59 <sup>a</sup> (1)      | 48.51 <sup>a</sup> (1)      |
| 4F2 cell-surface antigen heavy chain                          |               |   |                             |                             |
| <b>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1</b>   | <b>ATP1A1</b> | <b>145.10 (25)</b>                                    | <b>26.19 (15)</b>           | <b>27.30 (13)</b>           |
| Disintegrin et metalloproteinase domain-containing protein 17 | ADAM17        | 45.01 (8)   | 24.14 (5)                   | 24.56 (4)                   |
| HLA class I histocompatibility antigen, B alpha chain         | HLA-B         | 14.22 (2)   | 23.77 (1)                   | 34.52 (2)                   |
| Integrin alpha-2  | ITGA2         | 7.76 (2)  | 21.53 (15)                  | 15.90 (6)                   |
| Basal cell adhesion molecule                                  | BCAM          | 22.46 (12)  | 18.76 (6)                   | 18.25 (3)                   |
| <b>Teneurin-3</b>   | <b>TENM3</b>  | <b>61.92 (31)</b>                                     | <b>18.54 (6)</b>            | <b>24.03 (9)</b>            |
| Tetraspanin-14  | TSPAN14       | ND  | 4.42 (1)                    | 5.09 (2)                    |
| <b>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3</b>    | <b>ATP1B3</b> | <b>55.54 (3)</b>                                      | <b>3.54<sup>a</sup> (1)</b> | <b>5.33<sup>a</sup> (1)</b> |
| <b>Tsp5 &gt; Tsp15</b>  |               |   |                             |                             |
| Tetraspanin-5   | TSPAN5        | 3.89 (1)  | 3270.00 (6)                 | 7.80 <sup>a</sup> (1)       |
| Integrin beta-1   | ITGB1         | 514.40 (16)   | 423.40 (17)                 | 103.50 (9)                  |
| Integrin alpha-3  | ITGA3         | 515.30 (23)   | 288.00 (17)                 | 99.67 (14)                  |
| CD44 antigen  | CD44          | 89.57 (5)   | 28.47 (2)                   | 14.25 (3)                   |
| <b>Erythrocyte bet 7 integral membrane protein</b>            | <b>STOM</b>   | <b>9.02 (3)</b>                                       | <b>28.43 (9)</b>            | <b>2.90 (3)</b>             |
| Tetraspanin-9   | TSPAN9        | 21.06 (2)   | 28.09 (2)                   | 6.07 (2)                    |
| Prostaglandin F2 receptor negative regulator (CD9P-1/EWI-F)   | PTGFRN        | 808.80 (28)   | 26.32 (8)                   | 7.42 <sup>a</sup> (1)       |
| CD151 antigen   | CD151         | 12.10 (1)   | 26.09 (1)                   | ND                          |
| Syntaxin-4  | STX4          | 79.67 (6)   | 21.36 (6)                   | 9.50 <sup>a</sup> (1)       |
| CD166 antigen   | ALCAM         | 10.17 (4)   | 21.33 (1)                   | 10.09 (2)                   |
| Low-density lipoprotein receptor                              | LDLR          | ND  | 21.02 (1)                   | 9.15 <sup>a</sup> (3)       |
| <b>Cell surface glycoprotein MUC18</b>                        | <b>MCAM</b>   | <b>4.52 (1)</b>                                       | <b>20.11 (8)</b>            | <b>ND</b>                   |
| <b>Latrophilin-2</b>  | <b>LPHN2</b>  | <b>24.63 (12)</b>                                     | <b>18.62 (2)</b>            | <b>ND</b>                   |
| Integrin alpha-6  | ITGA6         | 114.70 (27)   | 17.17 (9)                   | 15.82 <sup>a</sup> (6)      |
| Immunoglobulin superfamily member 8 (EWI-2)                   | IGSF8         | 218.00 (4)  | 14.66 (5)                   | 6.87 <sup>a</sup> (2)       |

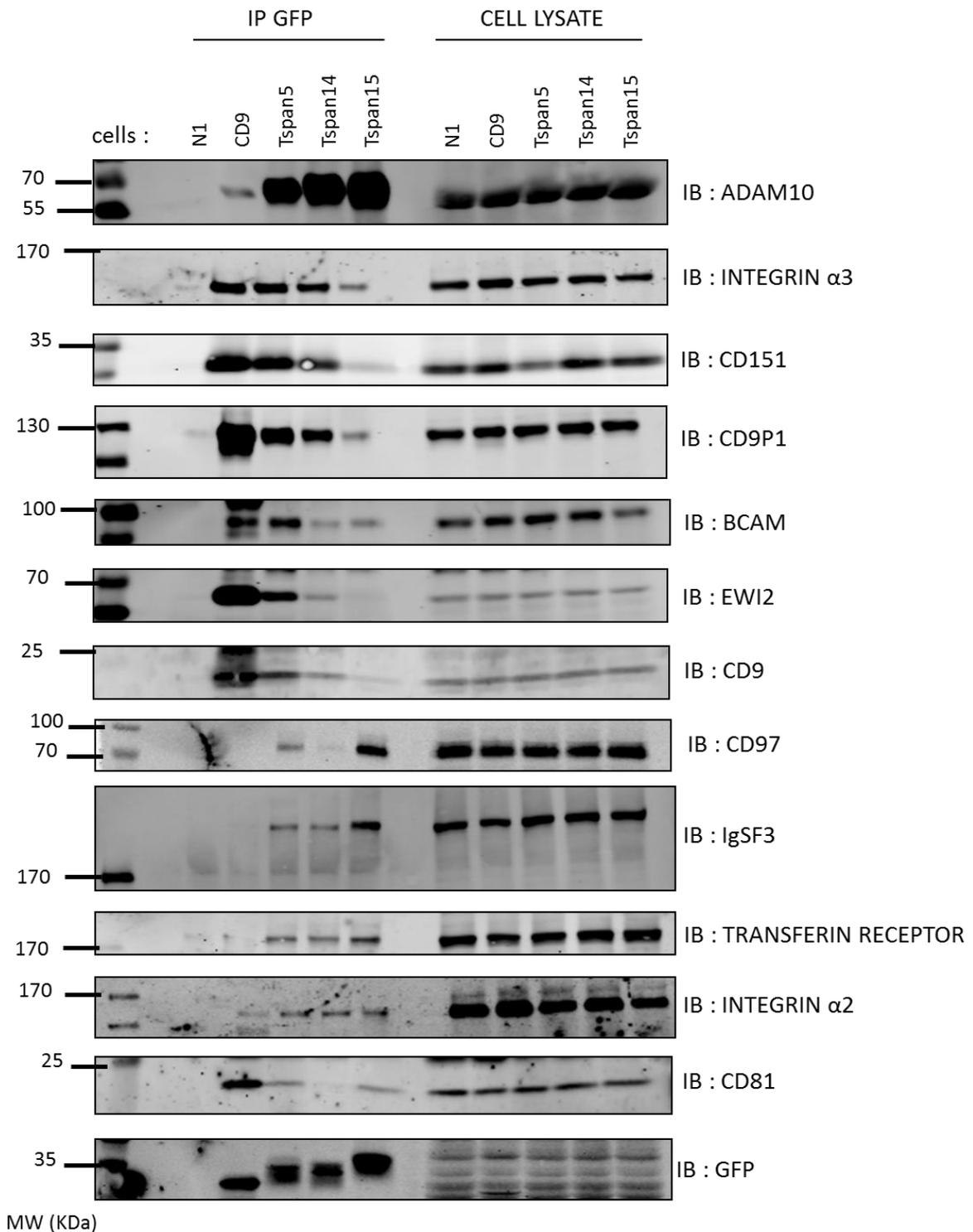
| <b>Tsp15 &gt; Tsp5</b>   |               |                   |                       |                              |
|--|---------------|-------------------|-----------------------|------------------------------|
| <b>Platelet-derived growth factor receptor beta</b>              | <b>PDGFRB</b> | <b>1.98</b> (3)   | <b>6.70</b> (1)       | <b>87.70</b> (12)            |
| <b>CD97 antigen</b>  | <b>CD97</b>   | <b>4.35</b> (2)   | <b>22.24</b> (5)      | <b>76.17</b> (9)             |
| Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)                            | MMP14         | 16.05 (4)         | 7.51 <sup>a</sup> (1) | 65.51 (3)                    |
| Syntaxin-3   | STX3          | 40.02 (4)         | 19.91 (6)             | 54.13 (3)                    |
| <b>Teneurin-2</b>  | <b>TENM2</b>  | <b>19.51</b> (17) | <b>1.96</b> (1)       | <b>52.10</b> (2)             |
| Sn1-specific diacylglycerol lipase beta                          | DAGLB         | 3.19 (2)          | 7.59 (1)              | 47.95 (6)                    |
| Zinc transporter ZIP14   | SLC39A14      | 14.56 (2)         | 6.39 (1)              | 27.73 (2)                    |
| <b>Immunoglobulin superfamily member 3</b>                       | <b>IGSF3</b>  | <b>1.74</b> (1)   | <b>5.27</b> (3)       | <b>24.10</b> (15)            |
| Chondroitin sulfate proteoglycan 4                               | CSPG4         | ND                | 5.07 (6)              | 43.96 (26)                   |
| <b>Protein sidekick-2</b>  | <b>SDK2</b>   | <b>ND</b>         | <b>13.11</b> (4)      | <b>36.49</b> (5)             |
| <b>C-type mannose receptor 2</b>                                 | <b>MRC2</b>   | <b>ND</b>         | <b>12.50</b> (6)      | <b>33.23</b> (8)             |
| <b>Integral membrane protein 2C (Transmembrane protein BRI3)</b> | <b>ITM2C</b>  | <b>ND</b>         | <b>10.37</b> (2)      | <b>21.05</b> (1)             |
| Cytoskeleton-associated protein 4                                | CKAP4         | ND                | 36.13 (11)            | 20.22 (4)                    |
| Tetraspanin-15   | TSPAN15       | ND                | ND                    | 6946.00 (8)                  |
| <b>Adipocyte plasma membrane-associated protein</b>              | <b>APMAP</b>  | <b>ND</b>         | <b>ND<sup>b</sup></b> | <b>274.40</b> (10)           |
| Scavenger receptor class B member 1                              | SCARB1        | ND                | ND <sup>b</sup>       | 67.82 <sup>a</sup> (2)       |
| <b>Discoidin, CUB et LCCL domain-containing protein 2</b>        | <b>DCBLD2</b> | <b>ND</b>         | <b>ND</b>             | <b>38.92</b> (3)             |
| <b>Ephrin type-B receptor 2</b>                                  | <b>EPHB2</b>  | <b>ND</b>         | <b>ND</b>             | <b>24.30</b> (8)             |
| <b>Latrophilin-1</b>   | <b>LPHN1</b>  | <b>ND</b>         | <b>ND</b>             | <b>21.46</b> (10)            |
| <b>CD276 antigen</b>   | <b>CD276</b>  | <b>29.80</b> (2)  | <b>ND<sup>b</sup></b> | <b>22.90</b> (3)             |
| <b>Dystroglycan</b>  | <b>DAG1</b>   | <b>23.08</b> (6)  | <b>ND</b>             | <b>11.27<sup>a</sup></b> (2) |
| CD81 antigen   | CD81          | 14.00 (1)         | ND <sup>b</sup>       | 5.77 (1)                     |
|  |               |                   |                       |                              |

**Tableau 10:** Répertoire des protéines partenaires, co-Immuno-précipitées avec CD9, Tspan5 et Tspan15 et identifiées par spectrométrie de masse.

Analyse par spectrométrie de masse quantitative des protéines associées aux tétraspanines obtenues après co-immunoprécipitation avec le système GFP-trap®. Le tableau montre les protéines transmembranaires les plus abondantes connues pour être présentes à la membrane plasmique et co-immunoprécipitées avec l'étiquette-GFP de CD9, Tspan5 ou Tspan15 en utilisant des billes « GFP-trap ». Les protéines partenaires nouvellement identifiées sont indiquées en gras. Seules les protéines identifiées dans deux expériences avec une aire  $\geq 2 \times 10^7$  et avec 2 peptides uniques dans au moins une des co-IP sont indiquées, à l'exception des tétraspanines qui sont toutes représentées. Les valeurs indiquées dans ce tableau sont celles obtenues dans l'expérience réalisée en utilisant le plus grand nombre de cellules.

a: n'est pas détectée dans la seconde expérience dans laquelle on utilise moins de cellules  
b: détectée dans la seconde expérience.

La protéase ADAM10 est plus fortement co-immunoprécipitées avec Tspan5 et Tspan15 qu'avec la tétraspanine CD9, ce qui est cohérent avec le fait qu'ADAM10 est un partenaire direct de ces deux TspanC8. De plus, un certain nombre de protéines déjà démontré pour s'associer (directement ou indirectement) avec CD9 étaient mieux co-immunoprécipité avec Tspan5 qu'avec Tspan15. Ces protéines comprennent les partenaires de CD9 et CD81, CD9P-1/EWI-F et EWI-2, ainsi que les deux sous-unités de l'intégrine  $\alpha3\beta1$ , un partenaire de CD151 (figure 50). L'analyse par western-blot, des protéines immunoprécipitées, a confirmé que ces molécules sont mieux immunoprécipitées avec Tspan5 qu'avec Tspan15. Cela est cohérent avec la meilleure immunoprécipitation de CD9 et de CD151 avec Tspan5 qu'avec Tspan15. La Tspan14 co-immunoprécipite ces protéines à un niveau intermédiaire. Parmi les protéines les mieux co-immunoprécipitées avec Tspan15, nous avons validé l'interaction avec CD97 et IgSF3 (western-blot). L'interaction avec d'autres protéines identifiées, comme APMAP, ne peut pas être validée car nous n'avons pas d'anticorps appropriés pour l'analyse western-blot. Enfin, nous avons également validé que Tspan5 et Tspan15 co-immunoprécipitent à un niveau similaire le récepteur de la transferrine et l'intégrine- $\alpha2$ . La proportion de ces récepteurs co-immunoprécipités avec les tétraspanines a été cependant inférieure à celle des autres protéines testées (figure 50).



**Figure 50:** Analyse par western-blot des protéines co-immunoprécipitées avec les tétraspanines CD9-GFP, Tspan5-GFP et Tspan15-GFP.

Après immunoprécipitation (IP) avec le système GFP-TRAP® des cellules U2OSN1 transfectées stablement ou non avec CD9-GFP, Tspan5-GFP, Tspan14-GFP et Tspan15-GFP, lysées préalablement en Brij97. La composition des complexes est ensuite analysée par western-blot, avec les anticorps cités sur la droite (IB).

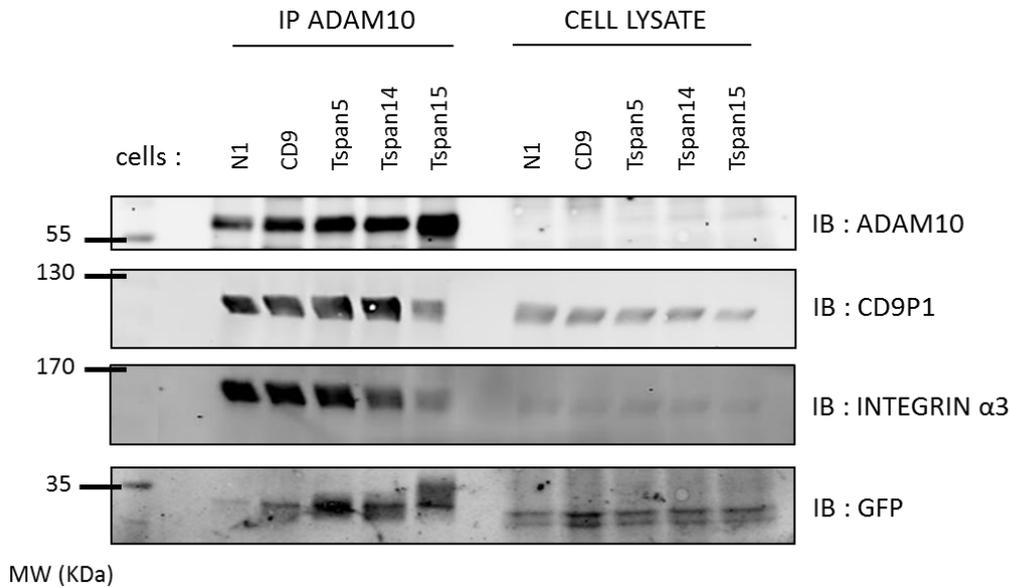
### **3.4- Tspan5 et Tspan15 influencent la capacité d'ADAM10 à interagir avec les composants du réseau de tétraspanines**

Nous avons ensuite analysé par spectrométrie de masse quantitative « label-free » le répertoire de protéines membranaires exprimées et co-immunoprécipitées avec ADAM10 en fonction de l'expression de Tspan5 ou Tspan15. Les cellules U2OSN1, exprimant ou non de façon stable les tétraspanines-5, -14 et -15 étiquetées GFP sont lysées en condition non-stringente (Brij97). Nous avons réalisé une co-immunoprécipitation en utilisant des anticorps anti-ADAM10. De manière surprenante, à l'exception de la chondroïtine sulfate protéoglycane-4 (CSPG4 : Chondroitin Sulphate ProteoGlycan 4) et le récepteur bêta du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR $\beta$  : Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta), ADAM10 ne co-immunoprécipite pas les protéines mieux co-immunoprécipitées avec Tspan15 que par les deux autres tétraspanines (tableau 11). En revanche, ADAM10 co-précipite un certain nombre de protéines s'associant à CD9 et Tspan5, y compris l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ , CD9P-1 et EWI-2. Ces protéines ont été co-immunoprécipitées moins efficacement avec ADAM10 dans les cellules exprimant Tspan15 que celle exprimant Tspan5. Ceci a été confirmé par western blot (figure 51). La diminution de l'immunoprécipitation des molécules associées à ADAM10 avec Tspan15 n'est pas due à un problème de reconnaissance des anticorps car réciproquement les anticorps anti-intégrine  $\alpha 3$ , CD9P-1, CD9 et CD151, co-immunoprécipitent une moins grande fraction d'ADAM10 quand Tspan15 est exprimée. En effet, dans ces expériences les anticorps anti-CD9P-1, CD9 et intégrine  $\alpha 3$  ne précipitent pas de façon détectable Tspan15 (figure 52). Les résultats démontrent que Tspan5 et Tspan15 influencent la capacité d'ADAM10 d'interagir avec d'autres protéines de surface. Tspan15 inhibe dans une certaine mesure l'interaction d'ADAM10 avec les constituants classiques du réseau de tétraspanines.

| Protéine  | Gène     | Quantité de protéines<br>(Nombre de peptides uniques) |          |
|---|----------|---|----------|
|   |          | Tspan5  | Tspan15  |
| Disintegrin et metalloproteinase domain-containing protein 10 | ADAM10   | 372 (2)   | 662 (6)  |
| Tetraspanin-5   | TSPAN5   | 1370 (1)  | ND       |
| CD9 antigen   | CD9      | 346 (1)   | 178 (1)  |
| Tetraspanin-14  | TSPAN14  | 183 (1)   | 203 (2)  |
| CD81 antigen  | CD81     | 51.2 (1)  | 25.9 (1) |
| Tetraspanin-9   | TSPAN9   | 30.8 (1)  | 45.7 (1) |
| CD82 antigen  | CD82     | 3.87 (1)  | ND       |
| CD63 antigen  | CD63     | ND  | 5.96 (5) |
| Tetraspanin-15  | TSPAN15  | ND  | 3070 (5) |
| Integrin beta-1   | ITGB1    | 684 (8)   | 256 (5)  |
| Integrin alpha-3  | ITGA3    | 984 (12)  | 262 (5)  |
| Integrin alpha-6  | ITGA6    | 132 (13)  | 33 (8)   |
| Prostaglandin F2 receptor negative regulator (CD9P-1)         | PTGFRN   | 943 (17)  | 383 (11) |
| Immunoglobulin superfamily member 8 (IgSF8) (EWI-2)           | IGSF8    | 175 (7)   | 115 (5)  |
| Choline transporter-like protein 1 (CTL-1)                    | SLC44A1  | 44.6 (2)  | 31.8 (3) |
| Lactadherin short form  | MFGE8    | 34.7 (2)  | 14.1 (3) |
| Teneurin-3  | TENM3    | 33.0 (3)  | 22.4 (1) |
| Adipocyte plasma membrane-associated protein                  | APMAP    | 30.9 (1)  | ND       |
| Transferrin receptor protein 1                                | TFRC     | 23.6 (6)  | 38.4 (9) |
| Syntaxin-4  | STX4     | 22.1 (2)  | ND       |
| Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1          | ATP1A1   | 18.1 (5)  | 80.6 (5) |
| Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)                         | MMP14    | 8.64 (1)  | 54.0 (6) |
| Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F                  | PTPRF    | 8.22 (1)  | ND       |
| 4F2 cell-surface antigen heavy chain                          | SLC3A2   | 7.66 (2)  | 8.44 (2) |
| Basal cell adhesion molecule (BCAM)                           | BCAM     | 6.95 (2)  | ND       |
| Zinc transporter ZIP14  | SLC39A14 | 3.37 (1)  | ND       |
| Chondroitin sulphate proteoglycan 4                           | CSPG4    | ND  | 212 (28) |
| Platelet-derived growth factor receptor beta                  | PDGFRB   | ND  | 4.69 (1) |

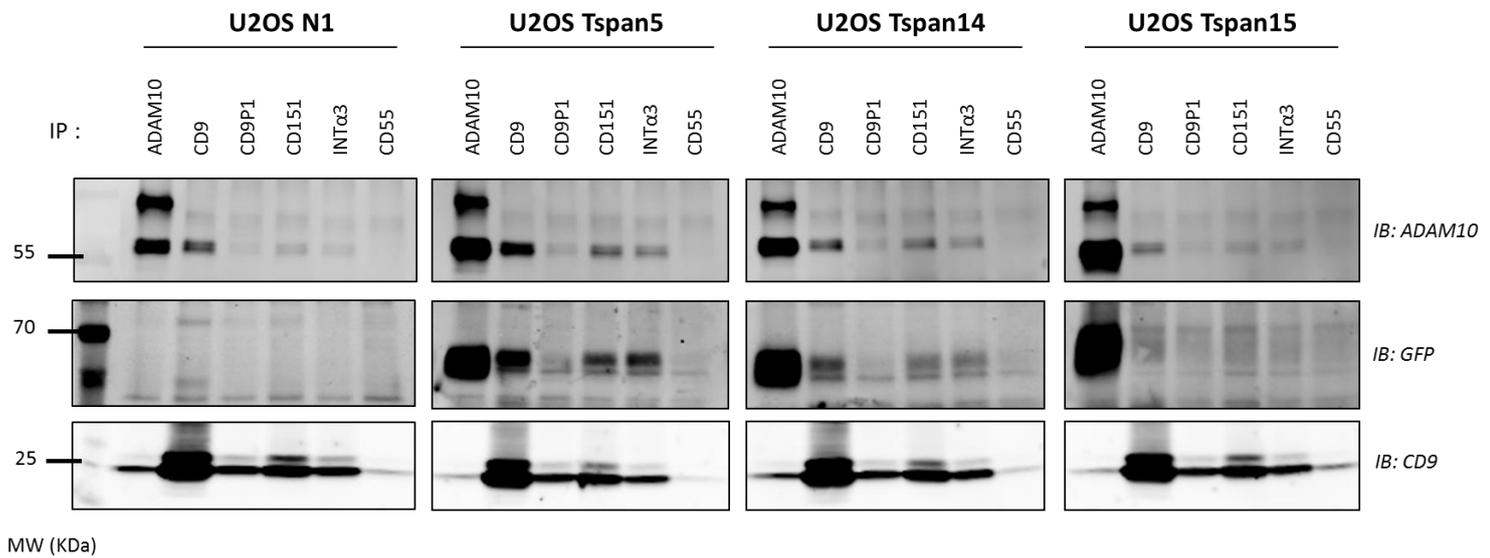
**Tableau 11:** Analyse par spectrométrie de masse du répertoire de protéines co-immunoprécipitées avec ADAM10 en fonction de l'expression de Tspan5 ou Tspan15.

Analyse par spectrométrie de masse quantitative des protéines associées à la protéine ADAM10 obtenues après co-immunoprécipitation avec des anticorps anti-ADAM10. Le tableau montre les protéines co-immunoprécipitées avec ADAM10. 12 des protéines identifiées dans la co-immunoprécipitation par Tspan5 et Tspan15 et présentes dans l'immunoprécipitation ADAM10 le sont avec une aire  $1 \times 10^7$  et avec 1 peptide unique sont indiquées, les tétraspanines sont aussi toutes représentées. Les valeurs indiquées dans ce tableau sont celles obtenues dans l'expérience réalisée en utilisant le plus grand nombre de cellules.



**Figure 51:** Les protéines partenaires associées à Tspan15 ne sont pas associées directement avec ADAM10.

Analyse par western-blot après immunoprécipitation (IP) avec l'anticorps anti-ADAM10 des cellules U2OSN1 transfectées stablement ou non avec CD9-GFP, Tspan5-GFP, Tspan14-GFP et Tspan15-GFP, lysées en Brij97. La composition des complexes est ensuite analysée par western-blot, avec les anticorps cités sur la droite (IB).

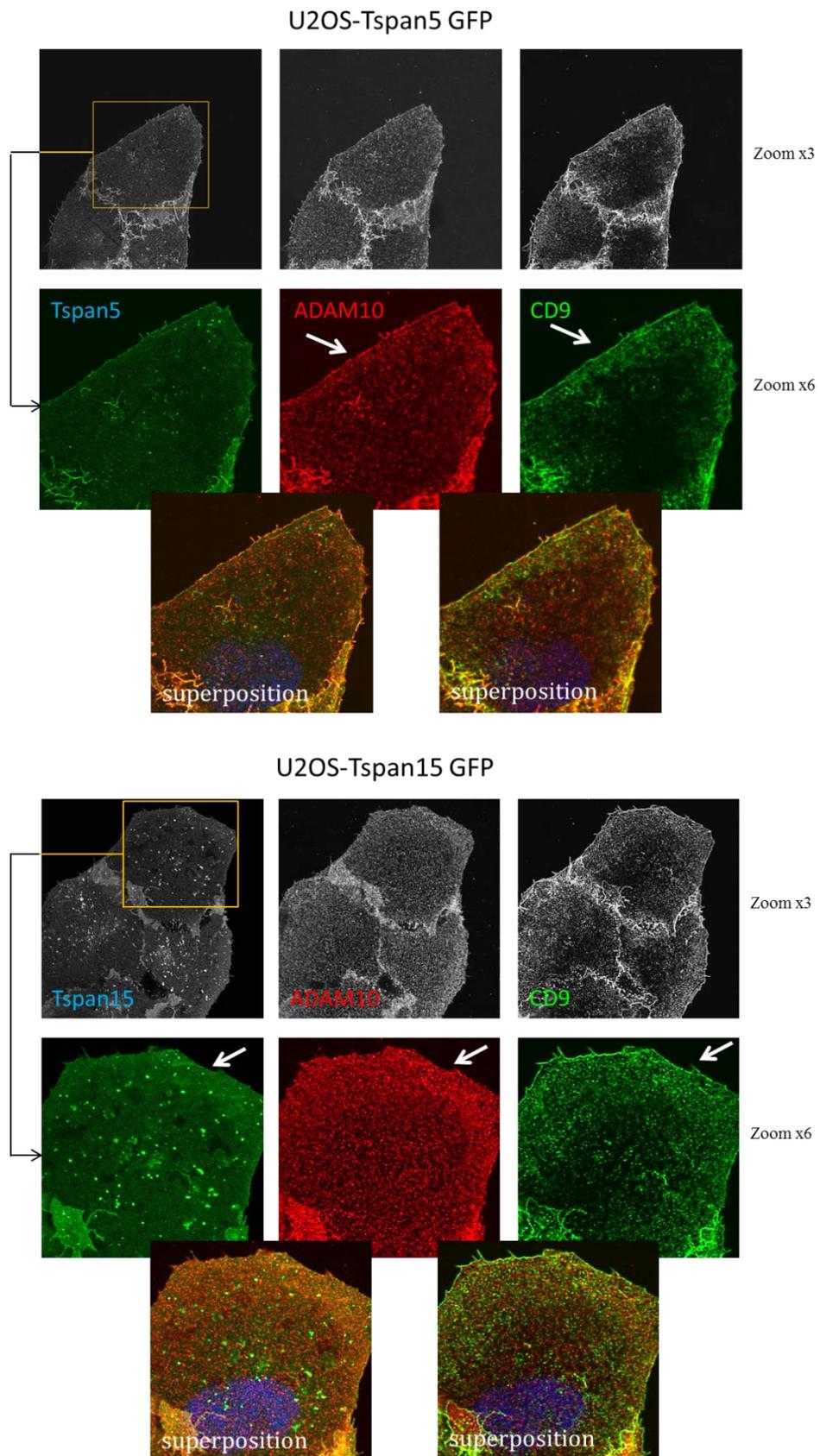


**Figure 52:** Tspan15 est capable d'inhiber en partie l'interaction d'ADAM10 avec les constituants protéiques « classiques » présents dans le « tetraspanins web » au niveau de la membrane plasmique.

Des cellules U2OSN1 transfectées ou non de façon stable pour Tspan5-GFP ou Tspan15-GFP ont été lysées en Brij97 avant de réaliser une immunoprécipitation (IP) comme indiqué en haut de chaque piste. La composition des complexes est analysée par western-blot avec les anticorps cités sur la droite (IB). Les acquisitions ont été effectuées grâce au système d'imagerie infrarouge Odyssey®.

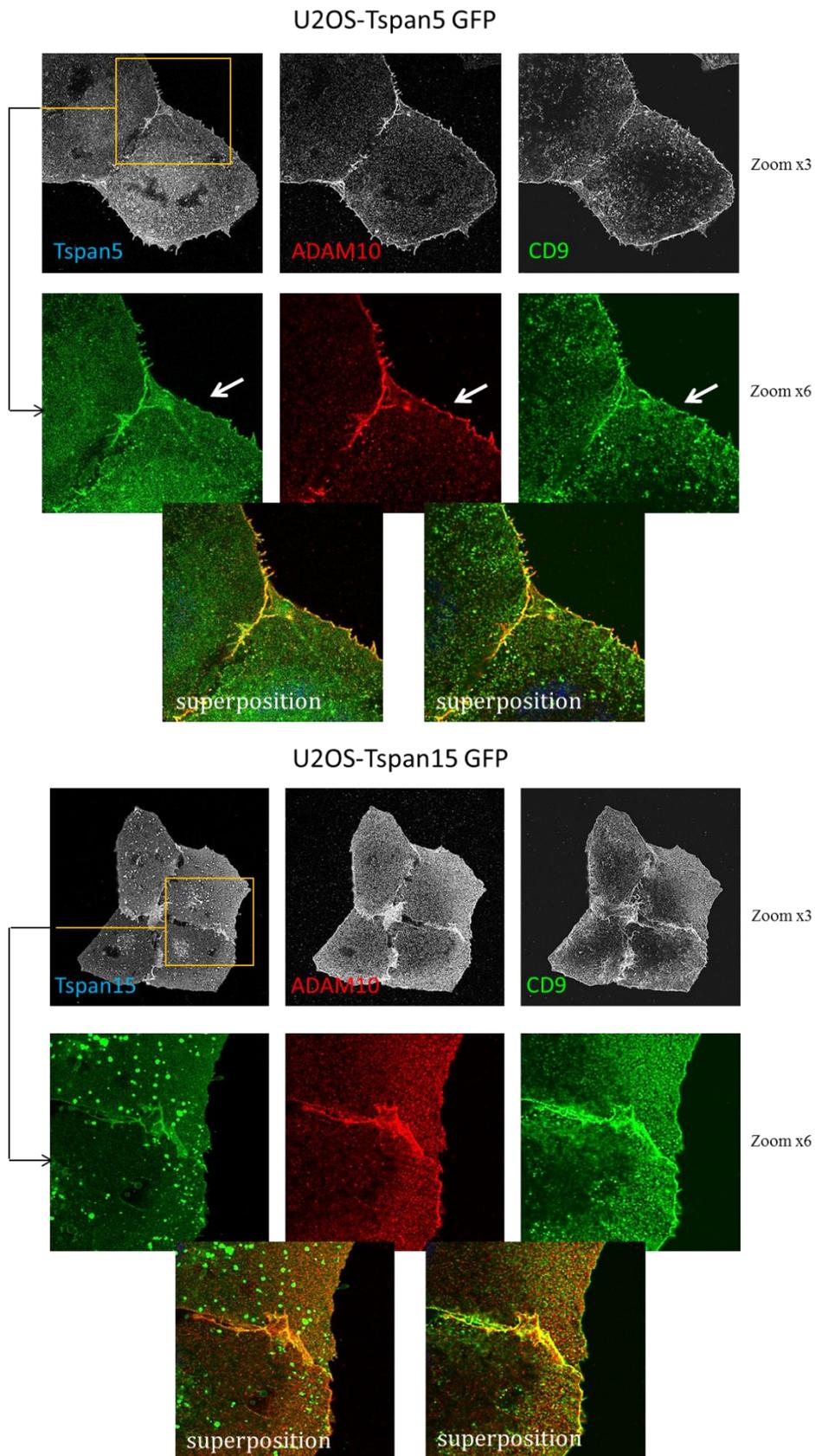
### **3.5- La localisation d'ADAM10 à la membrane plasmique est différente selon l'expression de Tspan5 ou Tspan15**

Nous avons voulu visualiser si la différence de compartimentation d'ADAM10 se reflétait à la membrane plasmique, pour cela les cellules U2OSN1 transfectées de façon stable avec Tspan5-GFP ou Tspan15-GFP ont été incubées ou non avec un anticorps monoclonal spécifique d'ADAM10 puis analysées par imagerie confocale. Dans les cellules non stimulées, Tspan15 et ADAM10 sont distribuées régulièrement à la surface des cellules U2OSN1-Tspan15 (figure 53). A l'inverse Tspan5 et ADAM10 sont principalement enrichis à la périphérie des cellules U2OSN1-Tspan5. La tétraspanine CD9 est utilisée comme témoin membranaire et est exprimée à la membrane dans un liseré fin et semble colocaliser avec ADAM10 dans les cellules U2OSN1-Tspan5 contrairement aux cellules U2OSN1-Tspan15. Après incubation avec un anticorps monoclonal dirigé contre ADAM10 (pendant 30 minutes à 37°C), les molécules d'ADAM10 ne sont pas redistribuées dans les cellules U2OSN1 exprimant Tspan15 (figure 54). En revanche les molécules d'ADAM10 sont fortement enrichies dans un liseré fin à la périphérie des cellules U2OSN1 exprimant Tspan5, dans lequel CD9 est en grande partie co-distribué. Ces données montrent que les tétraspanines Tspan5 et Tspan15 régulent différemment la distribution membranaire d'ADAM10.



**Figure 53:** Les tétraspanines Tspan5 et Tspan15 régulent différemment la distribution membranaire d'ADAM10.

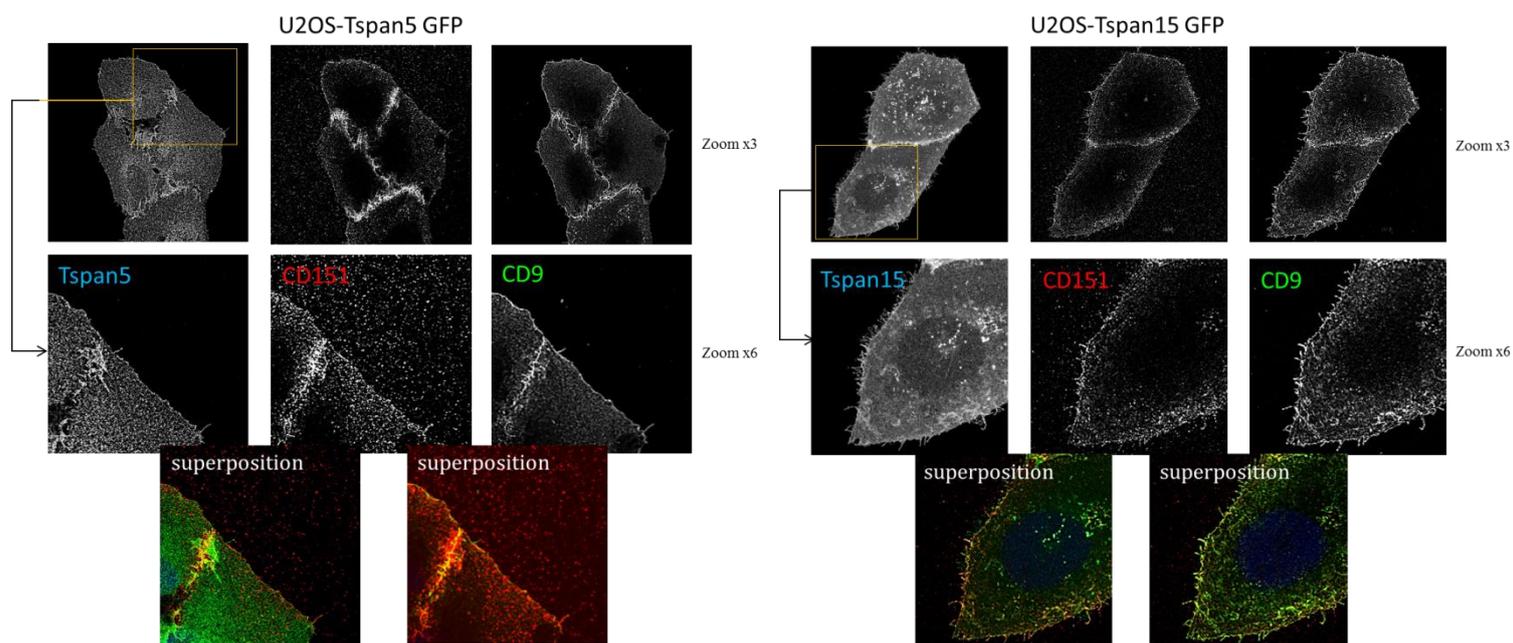
Analyse par microscopie confocale de la localisation d'ADAM10 (en rouge) dans des cellules U2OSN1 transfectées de façon stable avec Tspan5-GFP et Tspan15-GFP (à gauche, en vert). Le marquage CD9 (à droite, en vert) est le témoin de marquage membranaire. Les cellules ne sont pas perméabilisées. Objectif à immersion x63.

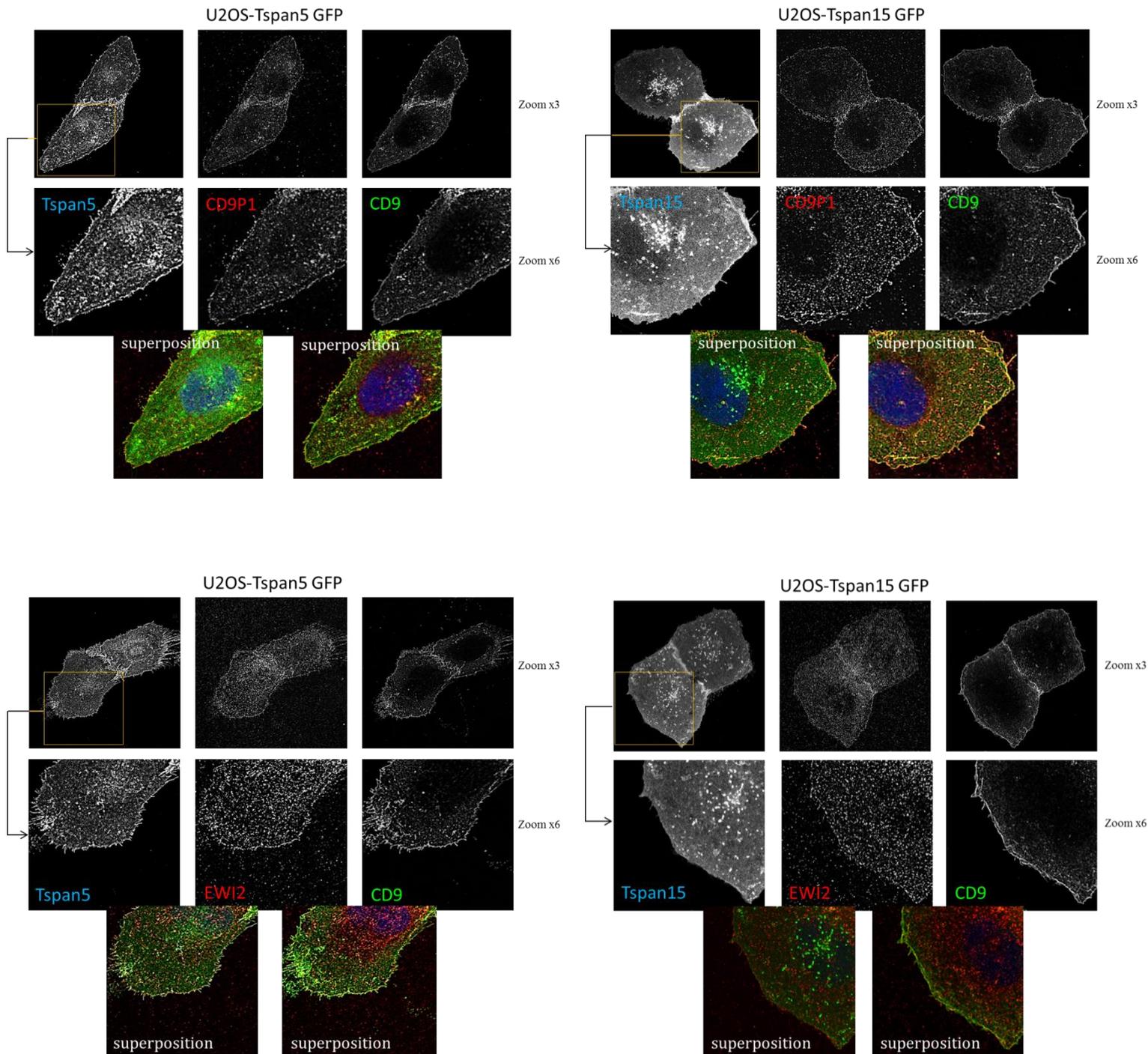


**Figure 54:** Le marquage périphérique d'ADAM10 observé en présence de Tspan5 est renforcé par incubation à 37°C avec l'anticorps anti-ADAM10.

Les cellules U2OSN1-Tspan5GFP et U2OSN1-Tspan15GFP ont été incubées avec un anticorps monoclonal (mAb) anti-ADAM10 pendant 30 minutes à 37°C. Elles sont ensuite fixées puis incubées avec un mAb dirigé contre CD9. ADAM10 est révélée avec un Alexa Fluor 568 (en rouge) et CD9 un Alexa Fluor 647 (en vert). La distribution membranaire des molécules différentes a été analysée par microscopie confocale. Les cellules ne sont pas perméabilisées. Objectif à immersion x63.

Les analyses de spectrométrie de masse ont mis en évidence une différence d'interaction vis-à-vis de CD9 et des protéines membranaires partenaires de Tspan5 ou Tspan15. D'autres équipes ont précédemment démontré que plusieurs tétraspanines sont enrichies à la périphérie des cellules de cancer du sein (Berditchevski et Odintsova, 1999). Nous avons analysé quelles molécules étaient présentes à la périphérie de la cellule au même niveau que CD9 par microscopie confocale. Les cellules U2OSN1 transfectées ou non de façon stables avec Tspan5-GFP et Tspan15-GFP ont été incubées avec des anticorps dirigés contre la tétraspanine CD9 et contre des protéines partenaires du réseau de tétraspanines déjà identifiées lors de précédents travaux. De façon similaire aux résultats référencés, il y a un enrichissement de CD9 et d'autres molécules du réseau de tétraspanines (CD9P-1, EWI-2, CD151) à la périphérie des cellules U2OSN1, que ces cellules aient été transfectées avec Tspan5 ou Tspan15 (figure 55). De façon importante il n'y a pas de modification de l'expression des molécules partenaires à la membrane plasmique selon que l'on exprime Tspan5 ou Tspan15.



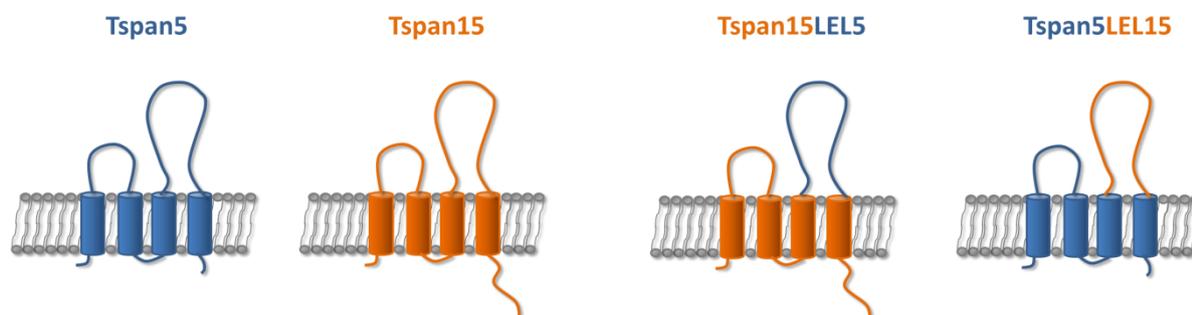


**Figure 55:** Analyse de la localisation de différents partenaires des tétraspanines dans les cellules U2OSNI selon l'expression de Tspan5 ou Tspan15.

Analyse par microscopie confocale des zones membranaires exprimant CD9, CD9P-1, EWI-2, et CD151 dans les cellules U2OSNI exprimant Tspan5-GFP ou Tspan15-GFP. Les cellules ne sont pas perméabilisées. Les réglages d'acquisition sont identiques pour toutes les images. Objectif à immersion x63.

## 4- Rôles des différents domaines structuraux des TspanC8 dans l'interaction avec ADAM10

Nos résultats démontrent que la compartimentation membranaire d'ADAM10 diffère en fonction de l'expression de Tspan5 ou Tspan15, ce qui pourrait être l'origine de la différence d'effet sur l'activité NOTCH. L'alignement de séquence des tétraspanines de la sous famille des TspanC8 met en évidence des zones très conservées ce qui suggère donc un rôle très important de ces résidus dans les fonctions des TspanC8, notamment pour l'interaction avec ADAM10. Nous voulons comprendre les bases moléculaires de la compartimentation différentielle entre Tspan5 et Tspan15. Les grands domaines extracellulaires des tétraspanines jouent un rôle dans les interactions directes (Charrin *et al.*, 2009 ; Hemler, 2003 ; Yañez-Mó *et al.*, 2009). Dans un premier temps nous avons construit des « protéines chimères » afin d'échanger les grands domaines extracellulaires de Tspan5 et Tspan15 (Tspan5LEL15 et Tspan15LEL5), (figure 56). D'autres part la palmitoylation des cystéines juxtamembranaires contribue à l'association entre tétraspanines et leurs partenaires (Charrin *et al.*, 2002 ; Delandre *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2002 et Berditchevski *et al.*, 2002). Nous utilisons un mutant de Tspan5 pour lequel les 4 sites potentiels de palmitoylation sont mutés, Tspan5<sup>PLM</sup> (Dornier *et al.*, 2012).

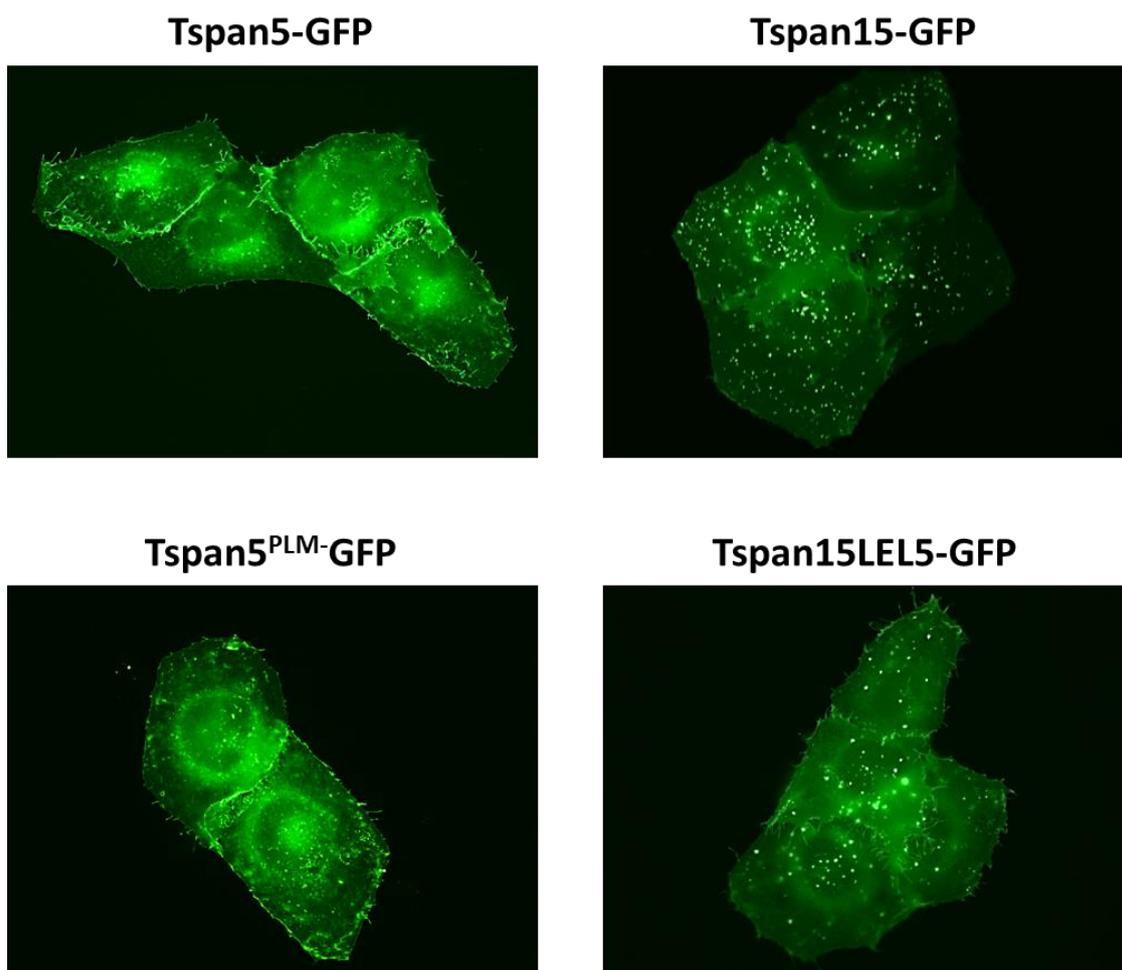


**Figure 56 :** Représentation schématique des deux TspanC8, Tspan5 et Tspan15 et des deux protéines chimères dont les grands domaines extracellulaires de Tspan5 et Tspan15 ont été échangés.

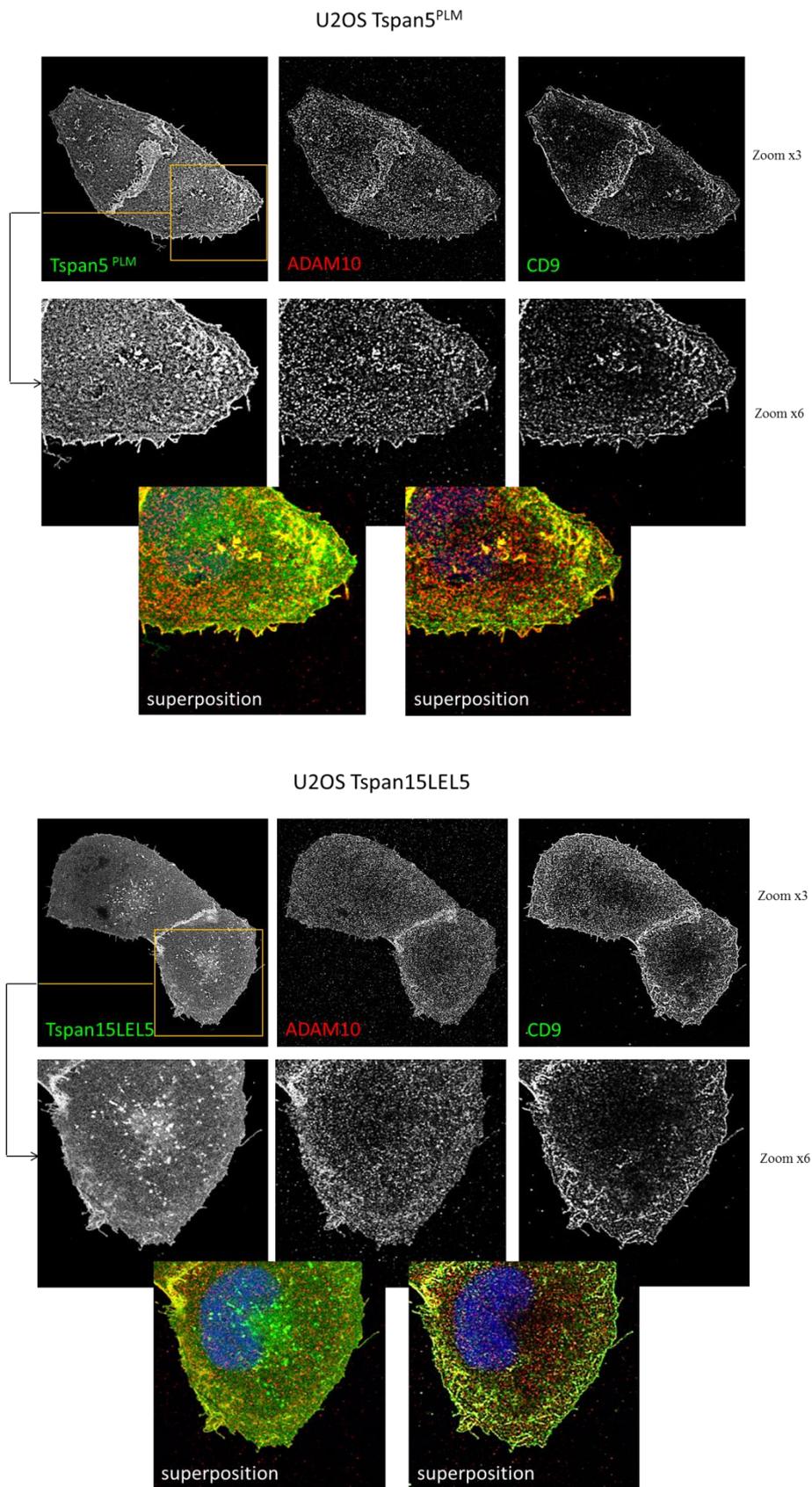
### 4.1- Distribution membranaire des protéines chimères LEL et du mutant non palmitoylable

Nous avons tout d'abord regardé la localisation des chimères LEL et du mutant Tspan5<sup>PLM</sup> à la membrane plasmique. Nous n'avons pas obtenus de clones stables pour la chimère réciproque Tspan5LEL15.

Les cellules U2OSN1 transfectées ou non de façon stable avec Tspan5<sup>PLM</sup>-GFP et Tspan15LEL5-GFP ont été analysées par épifluorescence. Le mutant et la chimère sont exprimés à la membrane cellulaire, le mutant Tspan5<sup>PLM</sup> est localisé à la périphérie comme le sauvage, Tspan5 et la chimère Tspan15LEL5 se comporte de façon similaire à Tspan15 (figure 57). En ce qui concerne la localisation à périphérie de la cellule U2OSN1 (microscopie confocale), et en particulier la colocalisation avec CD9 et ADAM10, Tspan5<sup>PLM</sup> se comporte comme le sauvage et la chimère Tspan15LEL5 comme Tspan15 (figure 58).



**Figure 57:** Analyse de la localisation du mutant Tspan5<sup>PLM</sup> et de la chimère Tspan15LEL5 à la membrane plasmique des cellules U2OSN1. Les cellules U2OSN1 ont été transfectées de façon stable avec Tspan5<sup>PLM</sup>-GFP et Tspan15LEL5-GFP puis analysées par immunofluorescence. Les cellules ne sont pas perméabilisées. Objectif à immersion x63.

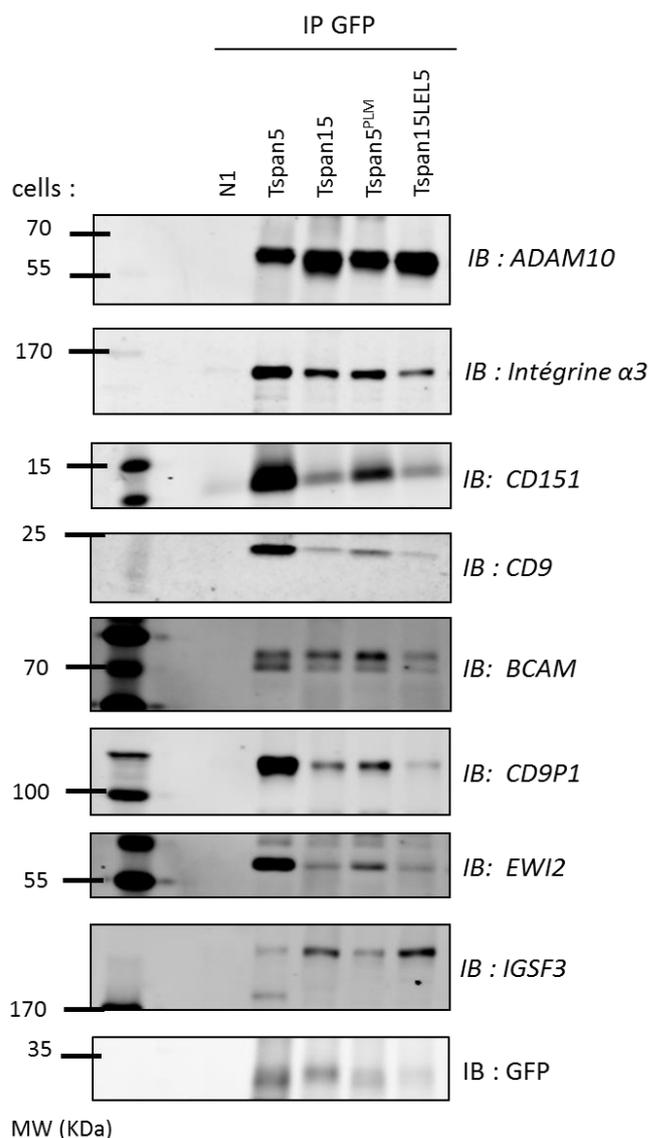


**Figure 58:** La palmitoylation et le grand domaine extracellulaire ne modifient pas la distribution à la périphérie membranaire d'ADAM10 ni de CD9.

Analyse par microscopie confocale de la localisation d'ADAM10 (en rouge) dans des cellules U2OSNI transfectées de façon stable avec Tspan5<sup>PLM</sup>-GFP et Tspan15LEL5-GFP (en vert à gauche). CD9 est le témoin de marquage de la périphérie de la membrane plasmique (en vert à droite). Les cellules ne sont pas perméabilisées. Objectif à immersion x63.

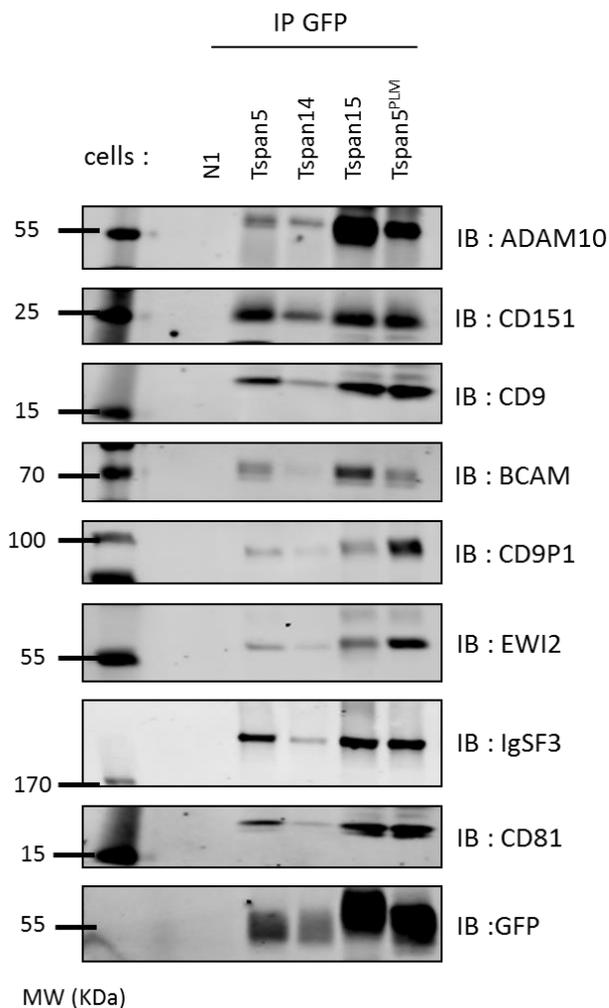
## 4.2- Les interactions Tspan5-ADAM10 et Tspan15-ADAM10 sont indépendantes de la palmitoylation et du grand domaine extracellulaire

Dans un second temps nous avons analysé la capacité du mutant et de la chimère à s'associer avec ADAM10. Pour cela nous avons réalisé une immunoprécipitation suivi d'analyses par western-blot. Des cellules U2OSN1 exprimant ou non de façon stable les Tspan5 et -15, la chimère Tspan15LEL5 et le mutant Tspan5<sup>PLM</sup> étiquetés GFP sont lysées en Brij97. Les protéines ont été co-immunoprécipitées avec des billes GFP-trap®. La chimère Tspan15LEL5 se comporte comme Tspan15 mais le mutant Tspan5<sup>PLM</sup> co-immunoprécipite mieux ADAM10 que le sauvage (figure 59). En revanche Tspan5<sup>PLM</sup> précipite moins bien les molécules testées (intégrine  $\alpha$ 3, CD9P-1, CD9, CD151 et EWI-2) comme attendu avec des partenaires directs. De façon similaire au sauvage, le mutant Tspan5<sup>PLM</sup> ne possède pas la capacité à s'associer avec IgSF3. Ces résultats suggèrent que la palmitoylation de Tspan5 et le grand domaine extracellulaire ne sont pas impliqués dans l'association avec ADAM10.



**Figure 59:** L'association directe des tétraspanines avec ADAM10 est indépendante du grand domaine extracellulaire et de la palmitoylation. Analyse par western-blot après immunoprécipitation (IP) avec le système GFP-TRAP® des cellules U2OSN1 transfectées stablement ou non avec Tspan5-GFP, Tspan15-GFP, Tspan5<sup>PLM</sup>-GFP et Tspan15LEL5-GFP, lysées en Brij97. La composition des complexes est ensuite analysée par western-blot, avec les anticorps cités sur la droite (IB).

Nous avons analysé la capacité du mutant Tspan5<sup>PLM</sup> à s'associer à d'autres partenaires en Brij98. Des cellules U2OSN1 exprimant ou non de façon stable Tspan-5, -14 et -15 et le mutants Tspan5<sup>PLM</sup> étiquetées GFP sont lysées en Brij98. Les protéines ont ensuite été co-immunoprécipitées avec des billes GFP-TRAP®, puis analysées par western-blot. De façon surprenante le mutant Tspan5<sup>PLM</sup> précipite plus de molécules que le sauvage Tspan5 notamment ADAM10, cependant cela pourrait être lié au fait que le mutant est largement mieux précipité que Tspan5 (figure 60). Tspan15 est également mieux solubilisé que Tspan5.



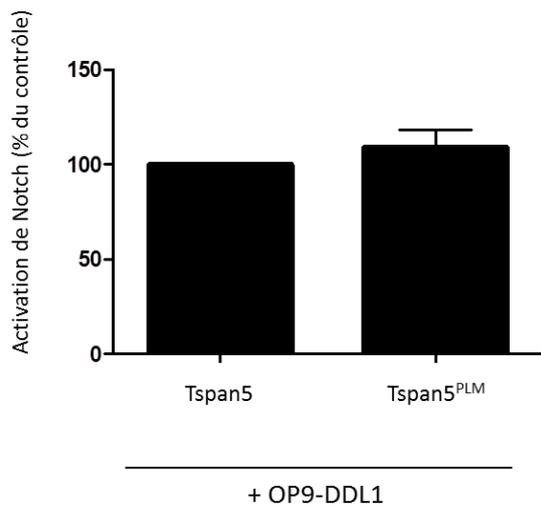
**Figure 60:** La palmitoylation influence la capacité de solubilisation en Brij98.

Analyse par western-blot après immunoprécipitation (IP) avec le système GFP-TRAP® des cellules U2OSN1 transfectées stablement ou non avec Tspan5-GFP, Tspan14-GFP, Tspan15-GFP et Tspan5<sup>PLM</sup>-GFP, lysées en Brij98. La composition des complexes est ensuite analysée par western-blot, avec les anticorps cités sur la droite (IB).

### 4.3- Le mutant Tspan5<sup>PLM</sup> n'est pas un inhibiteur de la voie de signalisation Notch

Nous nous attendions à ce que le mutant Tspan5<sup>PLM</sup> soit un inhibiteur de la voie de signalisation Notch, alors afin d'examiner l'impact de l'expression du mutant sur l'activité Notch induite par le ligand, nous utilisons les cellules U2OSN1. Les conséquences sur l'activation de la voie de signalisation Notch ont été suivies par mesure de l'activité

luciférase. Bien que la capacité d'interaction de Tspan5<sup>PLM</sup> avec les composants du réseau de tétraspanines soit biochimiquement différente de Tspan5, ce n'est pas un inhibiteur de la voie de signalisation Notch (figure 61).



**Figure 61:** Le mutant Tspan5<sup>PLM</sup> n'est pas un inhibiteur de la voie de signalisation Notch. Les cellules U2OSN1-Tspan5-GFP et U2OSN1-Tspan5<sup>PLM</sup>-GFP ont été transfectées avec la construction reportrice de Notch, CSL-luciférase, pour mesurer son activité après mise en contact en co-culture de cellules OP9 exprimant ou non le ligand de Notch, DLL1. Sur la figure est représentée l'erreur standard (SEM : Standard Error of the Mean) des expériences indépendantes faites en duplicat.

# DISCUSSION



Comme d'autres molécules de surface s'associant au réseau de tétraspanines, la métalloprotéase ADAM10 interagit avec des tétraspanines particulières pour former des complexes primaires. De façon surprenante ADAM10 s'associe directement avec six tétraspanines, toutes membres d'un sous-groupe particulier, caractérisées par les 8 cystéines dans leur grand domaine extracellulaire et dénommées les TspanC8. Lors de précédents travaux le laboratoire a montré que les TspanC8 de drosophile, ainsi que deux TspanC8 de mammifères, Tspan5 et Tspan14, sont des régulateurs positifs de la voie de signalisation Notch. Nos résultats démontrent maintenant que Tspan15 est un régulateur négatif de cette voie de signalisation, agissant en amont de l'étape du clivage S3 par le complexe gamma-sécrétase, probablement grâce à une régulation négative de la capacité d'ADAM10 à activer Notch. Cet effet de Tspan15 sur la voie de signalisation Notch est associé à une modification de la compartimentation membranaire d'ADAM10.

## **Tspan15 est un inhibiteur de la signalisation Notch**

Le nombre élevé de tétraspanines qui s'associent directement à ADAM10 suggère que chacune de ces TspanC8 pourrait doter ADAM10 de propriétés différentes. Deux de ces TspanC8 se sont révélées cibler ADAM10 dans un compartiment intracellulaire, les endosomes tardifs, tandis que quatre d'entre elles Tspan5, Tspan14, Tspan15 et Tspan33 augmentent son niveau d'expression à la surface cellulaire (Dornier *et al.*, 2012). Parmi ces quatre TspanC8, nous avons concentré la majorité de notre travail sur Tspan5 et Tspan15. Tspan5 est particulièrement intéressante parce que c'est la TspanC8 de mammifère qui affiche le plus haut degré d'identité non seulement entre les différents mammifères (100% d'identité entre l'homme et la souris), mais aussi avec les TspanC8 d'invertébrés (44% d'identité avec la protéine de drosophile Tsp26A). En revanche, Tspan15 est la plus éloignée de ces quatre TspanC8.

Le laboratoire avait précédemment démontré que la déplétion de Tspan5 et Tspan14, par ARN interférence, dans les cellules U2OS exprimant de façon stable le récepteur Notch1 humain (U2OSN1), entraînait d'une part une diminution du niveau d'expression d'ADAM10 à la surface cellulaire, et d'autre part une diminution de la signalisation Notch, (déterminée par l'expression d'un gène rapporteur). Ces résultats ne permettaient pas de déterminer si l'effet sur la voie de signalisation Notch était simplement la conséquence de la baisse d'expression d'ADAM10, ou si ces deux tétraspanines avaient également un rôle régulateur de l'activité de la métalloprotéase. Les TspanC8 Tspan15 et Tspan33 sont faiblement exprimées dans les cellules U2OS (niveau d'ARN) et n'ont donc pas pu être testées dans ce système.

Lors de ce travail nous montrons que la transfection des cellules U2OSN1 avec Tspan15 entraîne une diminution de la voie de signalisation induite par le ligand Notch. De façon étonnante, la transfection de Tspan5 ou de Tspan14 n'a pas eu pour effet d'augmenter cette activité. Cela est probablement dû au fait que l'activité Notch est optimale dans les cellules U2OSN1. L'expression de Tspan15 n'a pas réduit l'activité de deux constructions actives en absence de ligand. L'une de ces constructions nécessite le clivage par la  $\gamma$ -sécrétase, ce qui indique que Tspan15 agit en amont de cette enzyme, cela est compatible avec une modulation du clivage ADAM10. Idéalement, pour vérifier cette hypothèse, il faudrait pouvoir démontrer biochimiquement une moindre production du fragment généré suite au clivage par ADAM10. Cependant ce fragment est difficilement visualisable avec les constructions activées par le ligand, ce qui a empêché, par cette approche, la validation de l'hypothèse que Tspan15 agit au niveau d'ADAM10. Cependant la très forte association de Tspan15 à ADAM10 suggère que cette hypothèse est la plus probable.

Enfin, il convient de noter que Tspan15 n'inhibe pas l'action d'ADAM10 vis-à-vis de tous ses substrats. En effet, il a été démontré que son expression dans des lignées cellulaires induisait une augmentation du clivage de deux substrats d'ADAM10, la N-cadhérine et l'APP. Ces résultats suggèrent que Tspan15 rend ADAM10 non actif (ou moins actif) vis-à-vis de Notch, tout en conservant sa capacité à cliver d'autres substrats. Il sera intéressant de déterminer si Tspan5 et Tspan14, qui ont un rôle positif sur l'activité d'ADAM10 vis-à-vis de la signalisation Notch, inhibent la capacité d'ADAM10 à cliver d'autres substrats.

## **La compartimentation membranaire d'ADAM10 diffère selon l'expression de Tspan5 ou de Tspan15**

Comment les TspanC8 affectent différemment l'activité de la métalloprotéase ADAM10 ? Nous fournissons plusieurs éléments de preuve qui indiquent que Tspan5 et Tspan15 confèrent à ADAM10 une compartimentation membranaire différente :

- 1) la distribution de la protéine ADAM10 dans des gradients de saccharose après la lyse des cellules dans un détergent doux varie en fonction de l'expression de Tspan5 ou Tspan15,
- 2) la capacité d'ADAM10 à interagir avec plusieurs composants bien caractérisés du réseau de tétraspanines est plus faible dans les cellules après l'expression de Tspan15,
- 3) ADAM10 ne co-localise pas avec la tétraspanine CD9 et d'autres composants du réseau de tétraspanines à la périphérie des cellules exprimant Tspan15,
- 4) la diffusion d'ADAM10, analysée au moyen du suivi de particule isolée diffère selon l'expression de Tspan5 ou Tspan15 dans la cellule,

La diffusion moyenne des molécules d'ADAM10 est plus rapide en présence de Tspan15 qu'en présence de Tspan5. Ceci est dû d'une part au fait que la diffusion des molécules ADAM10 ayant une trajectoire de type brownien est légèrement plus rapide. Une explication potentielle est qu'ADAM10, associée à Tspan15, diffuse dans des complexes de plus petites tailles. En effet, plusieurs études suggèrent que la vitesse de diffusion des protéines transmembranaires dans les membranes lipidiques diminue avec la taille du diffusant (Gambin *et al.*, 2006; Guigas et Weiss, 2006). Cependant, nous ne pouvons pas exclure à ce stade une interaction différente avec le cytosquelette. Le rôle du cytosquelette pourrait être testé en analysant le comportement d'ADAM10 après sa dépolymérisation avec des agents tels que la latrunculine. Il convient cependant de noter que le domaine cytosolique C-terminal de Tspan5 est très court (10 acides aminés, versus 38 pour Tspan15), il est peu probable que ce domaine soit responsable d'une plus forte compartimentation de type « fence-picket » telle que l'a proposée le groupe de Kusumi (Kusumi *et al.*, 2005).

La plus faible diffusion moyenne d'ADAM10 en présence de Tspan5 est surtout due à un nombre plus élevé de trajectoires de type confiné ou mixte, dont la vitesse de diffusion apparente est largement inférieure à la vitesse de diffusion des trajectoires browniennes. Ceci indique qu'en présence de Tspan5, ADAM10 interagit plus fréquemment avec d'autres composants membranaires qui restreignent sa libre diffusion. Comme nous le verrons plus tard, ces composants membranaires sont les molécules du réseau de tétraspanines classiques.

Plusieurs études avaient précédemment suggérées que les tétraspanines pouvaient influencer l'environnement membranaire de leur partenaire, d'autres molécules de surface, ou leur dynamique. Le laboratoire avait par exemple démontré que l'expression de CD151 dans les cellules lymphoïdes B (Daudi) entraînait une augmentation de la fraction de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  présente dans les fractions légères des gradients de saccharose (Charrin *et al.*, 2003a). Ces résultats montraient que le CD151 rendait l'intégrine  $\alpha3\beta1$  partiellement résistante à la solubilisation par le Brij97, et suggéraient un environnement lipidique différent de l'intégrine en fonction de la présence ou non de sa tétraspanine partenaire. Il a également été démontré que la présence du CD82 modifiait le comportement du récepteur à l'EGF dans des gradients de saccharose, entraînant la partition d'une plus grande proportion dans les fractions légères (Odintsova *et al.*, 2003). Cependant, il n'y a aucune preuve d'une interaction directe entre les deux molécules (Charrin *et al.*, 2009a). Au contraire, ce changement de comportement membranaire pourrait être dû à une augmentation de la quantité de gangliosides dans les cellules (Odintsova *et al.*, 2003). Il est à noter que l'effet différentiel de Tspan5 ou Tspan15 sur la partition d'ADAM10 dans les gradients de saccharose est spécifique puisqu'il n'y a pas de modification du comportement du CD9 ou de CD9P-1.

Deux études ont examinées l'influence d'une tétraspanine sur la dynamique de leur partenaire. Dans une première étude, le groupe de M. Hemler a démontré que le CD151 avait peu d'impact sur la vitesse de diffusion de l'intégrine  $\alpha\beta1$ , mais influençait son mode de diffusion, la déplétion de la tétraspanine entraînant une augmentation importante du nombre de trajectoires dirigées aux dépens du nombre de trajectoire confinées (Yang *et al.*, 2012). Dans le deuxième exemple, le groupe de P. Mattila a démontré que la vitesse de diffusion du CD19 n'était pas influencée par des modifications du cytosquelette d'actine, mais par la présence ou non de CD81, sa tétraspanine partenaire (Mattila *et al.*, 2013). L'absence de la tétraspanine conduit à une plus forte proportion de molécules CD19 ayant une vitesse de diffusion rapide. Ces exemples suggèrent que les tétraspanines induisent un confinement et/ou un ralentissement de la diffusion de leur protéine partenaire. Nos résultats avec Tspan5 sont cohérents avec cette hypothèse. Tspan15 est la première tétraspanine qui au contraire empêcherait le confinement de sa protéine partenaire. Il est à noter qu'il n'est pas possible de tester le comportement dynamique d'ADAM10 non associée aux tétraspanines dans la mesure où sa sortie du réticulum endoplasmique est contrôlée par ces molécules. Un mutant d'ADAM10 muté au niveau de la séquence cytosolique, riche en arginine et impliquée dans sa rétention dans le réticulum (Marcello *et al.*, 2010), pourrait permettre d'étudier le comportement d'ADAM10 non associées aux tétraspanines, à condition de pouvoir abolir l'expression de l'ensemble des TspanC8 ciblées à la membrane plasmique, ou de muter ADAM10 de façon à ce qu'elle n'interagisse plus avec ces molécules.

## **Tspan15 prévient l'interaction d'ADAM10 avec le réseau de tétraspanines classiques**

Deux types de données suggèrent que l'interaction d'ADAM10 avec le réseau de tétraspanines classiques, c'est-à-dire définies dans les études antérieures suite à l'analyse des tétraspanines CD9, CD81, CD82 ou CD151, et de leur partenaires, est différentiellement régulée par son interaction à Tspan5 ou Tspan15. D'une part, en présence de Tspan15, la capacité d'interaction d'ADAM10 avec ces tétraspanines classiques ou leurs partenaires est diminuée. D'autre part, nous avons démontré que dans les cellules U2OSN1, ainsi que celle qui sont transfectées avec Tspan5, mais pas celles qui sont transfectées avec Tspan15, ADAM10 se concentre dans un fin liseré à la périphérie de la cellule, dans la région en contact avec le support, où elle colocalise avec la tétraspanine CD9. Plusieurs composants du réseau de tétraspanines s'y concentrent également, par exemple les tétraspanines CD81 et CD151, ou encore CD9P-1 et EWI-2.

De plus, l'incubation des cellules avec un anticorps monoclonal dirigé contre ADAM10 renforce la localisation d'ADAM10 à la membrane des cellules U2OSN1 ou celles qui sont transfectées avec Tspan5, mais pas dans les cellules transfectées avec Tspan15. Ces données rappellent les zones enrichies en CD9 observées à la surface basale des cellules PC3 ou des cellules HeLa (Espenel *et al.*, 2008). L'analyse en suivi de molécule unique du CD9, en utilisant des fragments Fab d'anticorps, a montré que ces régions correspondaient à des zones de la membrane où les molécules de CD9 sont soumises à un confinement qui peut être permanent (au moins durant le temps de l'analyse), ou le plus souvent transitoire, indiquant que certaines de ces régions sont en échange permanent avec le reste de la membrane. De façon intéressante, lorsque le suivi de molécules a été réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux intacts (donc bivalents), au lieu des fragments Fab, les molécules CD9 entrant dans ces régions d'enrichissement y sont piégées et ne ressortent plus, probablement du fait d'un pontage de plusieurs molécules CD9. Par analogie, nous suggérons que la zone périphérique enrichie en CD9, en contact avec le support, est une zone de confinement préférentielle du CD9 et d'autres molécules du réseau de tétraspanines, ainsi que de la métalloprotéase ADAM10 lorsqu'elle est associée à Tspan5 ou Tspan14.

## **Comment Tspan5 et Tspan15 régulent-elles différemment la compartimentation d'ADAM10 ?**

Une analyse des différences structurelles existant entre Tspan5 et Tspan15 devrait apporter des pistes pour tenter de comprendre comment ces deux tétraspanines ont un impact différent sur la compartimentation d'ADAM10. De façon générale, les tétraspanines présentent le plus fort degré d'identité dans les régions transmembranaires, et les régions extracellulaires et cytosoliques sont les plus divergentes, à l'exception de plusieurs résidus impliqués dans la structure du grand domaine extracellulaire. De façon remarquable, les régions extracellulaires des TspanC8 possèdent des séquences d'acides aminés conservés (Dornier *et al.*, 2012) spécifiques de la sous-famille. Dans la mesure où le grand domaine extracellulaire des tétraspanines est souvent impliqué dans les interactions avec leur partenaire, il est probable que ces régions conservées constituent le site d'interaction. Malheureusement, le laboratoire a montré que la mutation de ces résidus entraînait une rétention de Tspan5 dans le réticulum endoplasmique, empêchant de tester cette hypothèse (résultats non publiés). Nous avons pu obtenir une lignée de cellules U2OSN1 exprimant une molécule chimérique dans laquelle le grand domaine extracellulaire de Tspan15 a été remplacé par celui de Tspan5. Cette chimère s'est comportée comme Tspan15, indiquant que ce ne sont pas les différences du grand domaine extracellulaire qui sont à l'origine de la compartimentation membranaire

d'ADAM10. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à exprimer de façon stable la chimère réciproque.

L'analyse des régions transmembranaires des tétraspanines met en évidence une particularité de la quatrième région transmembranaire de Tspan15, la présence d'une proline. Les prolines ne sont pas rares dans les hélices transmembranaires (Sansom et Weinstein, 2000), mais parmi les tétraspanines, seules Tspan15 et Tspan33 en possèdent dans leur quatrième région transmembranaire, et Tspan10 dans la première (figure 62). Grace à leur structure, les prolines présentes dans les régions transmembranaires induisent des coudes dans ces hélices et représentent une charnière qui peut être à l'origine d'une plus grande flexibilité de l'hélice (Cordes *et al.*, 2002). Ces propriétés de la proline peuvent être à l'origine de changements conformationnels importants pour l'activité de certains récepteurs couplés aux protéines G, ou de certains canaux ioniques (Sansom et Weinstein, 2000).



Il est intéressant de noter que la proline est précédée en position -4 et -8 (c'est-à-dire exactement au-dessus) par deux glycines, qui par sa taille et sa capacité de torsion, peut apporter de la flexibilité aux hélices. Une hypothèse est donc que le motif GxxxGxxxP de la quatrième région transmembranaire de Tspan15 l'empêche d'interagir avec les autres tétraspanines (que ce soit une interaction directe ou via des lipides tels que le cholestérol), l'excluant ainsi du réseau qu'elles forment. Si cette hypothèse est vraie, Tspan33 devrait également déconnecter ADAM10 du réseau de tétraspanines. De façon intéressante, une chimère dans lequel un échange entre Tspan5 et Tspan15 a été réalisé juste au début du grand domaine extracellulaire (Tspan5x15) est retenue dans le réticulum endoplasmique dans des expériences de transfection transitoire, ce qui n'est pas le cas d'une chimère dans laquelle la grande boucle de Tspan5 a été remplacée par celle de Tspan15 (Tspan5LEL15). Ce résultat était étonnant car de nombreuses molécules chimériques entre tétraspanines avaient été précédemment réalisées, notamment entre le CD9 et le CD82 dont le niveau d'identité global est inférieur à celui existant entre Tspan5 et Tspan15 (22% d'identité contre 28%) et aucune n'avait posé de problème de conformation (Charrin *et al.*, 2003a). Une explication possible est que la structure de la quatrième région transmembranaire de Tspan15, du fait de cette proline entraînant une conformation différente, ne lui permet pas de s'apparier correctement avec les trois premières régions transmembranaires de Tspan5. Il est également possible, que ce soit le grand domaine C-terminal de Tspan15 qui pose un problème de conformation et soit responsable de la différence de compartimentation membranaire. De façon intéressante, ni la TspanC8 de *C. Elegans*, ni aucune des trois TspanC8 de *D. melanogaster*, qui ont toutes un rôle positif dans la voie de signalisation Notch, ne possèdent de proline dans la quatrième région transmembranaire.

## **Le rôle de la palmitoylation de Tspan5**

Les interactions entre tétraspanines sont régulées par les lipides, tels que le cholestérol membranaire (Charrin *et al.*, 2003b) et la palmitoylation de ces molécules (Charrin *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 2004 ; Berditchevski *et al.*, 2002). Nous avons donc analysé l'impact de la palmitoylation de Tspan5 sur la capacité d'ADAM10 à interagir avec le réseau de tétraspanines classiques et la voie de signalisation Notch.

L'importance de la palmitoylation était par ailleurs suggérée par le fait que Tspan5 possède quatre cystéines en position juxta-membranaire (côté feuillet interne), qui sont autant de sites potentiels de palmitoylation, mais que les cystéines cytosoliques ou intra-membranaires de Tspan15 semblaient des sites moins probables de palmitoylation.

En effet les trois cystéines du grand domaine C-terminal sont localisées à la fin de ce domaine, et la cystéine du troisième domaine transmembranaire est au milieu de ce domaine. Enfin, l'absence de palmitoylation augmente la vitesse de diffusion des trajectoires de type brownien (Espenel *et al.*, 2008), ce qui est cohérent avec la grande vitesse de diffusion d'ADAM10 observée en présence de Tspan15.

Nous avons démontré qu'après lyse en Brij97 le mutant non palmitoylable de Tspan5 (Tspan5<sup>plm</sup>) avait une plus faible capacité à immunoprécipiter les molécules du réseau de tétraspanines classiques. Par ailleurs les cellules exprimant le mutant Tspan5<sup>PLM</sup> ont exactement la même réponse en termes de signalisation Notch que les cellules exprimant Tspan5. Hors, si l'interaction avec les autres tétraspanines et leurs molécules partenaires était importante, l'expression de Tspan5 non palmitoylable devrait empêcher cette interaction et conduire au même phénotype obtenu lors de l'expression de Tspan15.

A première vue ces résultats semblent invalider l'hypothèse que l'interaction avec le réseau de tétraspanines classiques est important pour la voie de signalisation Notch, et que l'effet négatif de Tspan15 sur cette voie est lié à une déconnection de ce réseau. Mais sommes-nous sûr que l'absence de palmitoylation d'une tétraspanine conduit à empêcher son interaction avec le « tetraspanins web » ?

L'essentiel des données analysant le rôle des tétraspanines sur les interactions entre tétraspanines a été obtenu par des études de co-immunoprécipitation. Cependant, le choix du détergent influence le niveau de co-immunoprécipitation des tétraspanines (et plus généralement des protéines membranaires), et peut également influencer l'interaction de mutants non-palmitoylables d'une tétraspanine avec les autres tétraspanines. Ceci a initialement été mis en évidence par le laboratoire, qui avait démontré que l'interaction d'un mutant non palmitoylable du CD9 avec d'autres tétraspanines était perdue après lyse dans un détergent supplémenté en EDTA, mais conservée si des ions divalents étaient ajoutés. C'était donc la capacité de la molécule à résister à la dissociation par les détergents qui était modifiée, et pas sa capacité intrinsèque à interagir. Dans notre étude, nous avons analysé la capacité d'interaction du mutant non-palmitoylable de Tspan5 avec les autres molécules du réseau de tétraspanines après lyse avec un détergent plus « doux », le Brij98. De façon surprenante, dans ces conditions le mutant Tspan5<sup>plm</sup> a co-immunoprécipité plus de molécules testées que la molécule Tspan5 sauvage. Ceci est en fait dû à une plus faible immunoprécipitation de la molécule Tspan5 sauvage dans ces conditions, probablement parce que celle-ci est en grande partie dans la fraction sédimentée par la première centrifugation réalisée au cours de la préparation des échantillons.

Il est à noter que dans ce contexte le mutant Tspan5<sup>plm</sup> a une plus grande capacité à immunoprécipiter les différentes molécules testées que Tspan15, suggérant que sa capacité à interagir avec ces molécules est dans une large mesure conservée.

Peu d'études ont analysé l'interaction de mutants de tétraspanines non palmitoylables avec le réseau de tétraspanines. Des analyses du comportement de CD9 et du mutant non-palmitoylable, CD9<sup>plm</sup>, ont été effectuées au niveau de la molécule unique, dans une cellule où le mutant représentait au moins les trois quarts des molécules CD9 présentes en surface (Espenel *et al.*, 2008). En dehors d'une vitesse de diffusion plus rapide des trajectoires browniennes, les différences avec les molécules sauvages sont : une diminution d'environ 15% des trajectoires confinées ou mixtes dont le confinement se fait dans des régions enrichies en CD9, et une diminution d'environ 60% du nombre d'interactions transitoires observées entre deux molécules CD9 et durant plus de 700ms. Ces résultats ne confirment donc pas l'hypothèse selon laquelle la palmitoylation est essentielle aux interactions entre tétraspanines *in situ*. Il est à noter que dans nos expériences, Tspan5<sup>plm</sup> et ADAM10, lorsque cette tétraspanine est exprimée, se colocalisent au moins partiellement avec le CD9 à la périphérie cellulaire. L'expression du mutant non-palmitoylé de Tspan5 a donc un effet moins drastique sur la compartimentation membranaire d'ADAM10 que lorsque Tspan15 est exprimée.

## **Analyse du répertoire des molécules associées à Tspan5, Tspan15 et ADAM10 par spectrométrie de masse quantitative sans marquage**

Nous avons entrepris de caractériser le compartiment membranaire de Tspan5 et Tspan15 via l'analyse du répertoire des molécules auxquelles elles s'associent. L'utilisation d'un appareil récent de type Orbitrap Velos, dont la résolution et la sensibilité est supérieure aux appareils des générations précédentes a permis de quantifier les protéines identifiées par des approches quantitatives sans marquage, basée sur la quantification de l'intensité du pic correspondant à chaque peptide en sortie de colonne chromatographique. C'est la première étude de ce type pour l'analyse du répertoire de molécules associées aux tétraspanines. Pour certaines des molécules identifiées (CDP-1 ou l'intégrine  $\alpha3\beta1$  par exemple), nous avons validé par western-blot les différences observées.

Le but de cette étude étant de caractériser le compartiment membranaire de nos protéines d'intérêts, nous nous sommes concentrés sur le répertoire de protéines membranaires reconnues pour être exprimées à la membrane plasmique.

Nous avons confirmé de nombreuses interactions précédemment décrites, en particulier au cours d'analyses en spectrométrie de masse (André *et al.*, 2006 ; le Naour *et al.*, 2006 ; Xu *et al.*, 2009). Logiquement, ces molécules sont globalement celles qui sont les plus abondantes dans les immunoprécipitations. Nous avons également identifié de nouvelles protéines co-immunoprécipitées par les trois tétraspanines étudiées. Le fait qu'elles n'aient pas été identifiées lors des analyses précédentes peut être dû soit à leur absence d'expression dans les cellules analysées précédemment, soit à la plus grande sensibilité de l'appareil utilisé, en particulier pour les protéines les moins abondantes.

Les profils des protéines membranaires (présentes à la membrane plasmique) co-immunoprécipitées avec Tspan5 et Tspan15 sont assez proches, ce qui est cohérent avec leur présence dans un même compartiment membranaire. Si nous nous concentrons sur les protéines dont la quantification donne une valeur  $\geq 2 \times 10^7$ , seules trois molécules sont détectées dans l'immunoprécipitation CD9 mais pas l'immunoprécipitation Tspan5.

Nous avons distingué trois groupes parmi les molécules immunoprécipitées par Tspan5 et/ou Tspan15, en fonction de leurs abondances relatives dans les deux immunoprécipitations. Il est frappant de constater que le groupe de protéines mieux immunoprécipitées par Tspan5 que Tspan15 comprend les protéines les mieux caractérisées quant à leur association avec les tétraspanines, et dont la tétraspanine partenaire a été identifiée : les intégrines  $\alpha 3 \beta 1$  et  $\alpha 6 \beta 1$  ainsi que les molécules CD9P-1 et EWI-2. De façon surprenante, alors que les analyses par western-blot ont montré une meilleure co-immunoprécipitation de CD9 et CD81 par Tspan5 que par Tspan15, ces différences ne sont pas observées par les analyses en spectrométrie de masse quantitative. Il convient cependant de noter que dans les deux cas, CD9 et CD81 ne sont détectées que par un seul peptide unique (c'est-à-dire dont le spectre MS/MS correspond à une seule protéine). Les résultats obtenus peuvent être moins fiables que pour des protéines identifiées avec de nombreux peptides.

Le groupe des protéines présentes à des niveaux similaires dans les immunoprécipitations Tspan5 et Tspan15 comprend des molécules déjà décrites comme étant associées aux tétraspanines, mais qui n'ont pas de partenaire tétraspanine identifié (à l'exception bien sûr d'ADAM10), comme le récepteur de la transferrine, la métalloprotéase ADAM17, les antigènes du CMH de classe I ou encore la sous-unité  $\alpha 2$  des intégrines  $\beta 1$ . (Abache *et al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2009 ; Bass *et al.*, 2005 ; Le Naour *et al.*, 2006 ; Kovalenko *et al.*, 2007 ; Cailleateau *et al.*, 2010). Par comparaison avec le groupe précédent, il semble évident que l'interaction de Tspan5 et Tspan15 avec ces molécules ne se fait pas par l'intermédiaire du CD9, du CD81 ou du CD151.

Une possibilité est que l'interaction se fasse via une autre tétraspanine qui a une capacité d'interaction identique avec Tspan5 et Tspan15. Une autre possibilité est que l'interaction se fasse indépendamment d'interactions entre tétraspanines. Il se pourrait alors que la présence de ces molécules dans les immunoprécipitations ne corresponde pas à une vraie interaction, mais soit un artéfact expérimental. Peut-être en faveur de cette hypothèse, nos résultats d'analyses en western-blot ont montrés que comparativement aux protéines du premier groupe, une fraction plus faible (par rapport au niveau d'expression déterminé par western-blot) d'intégrine  $\alpha 2$  et de récepteur à la transferrine était présente dans les immunoprécipitations CD9, Tspan5 et Tspan15.

Le troisième groupe correspond aux protéines mieux co-immunoprécipitées par Tspan15 que Tspan5. De façon surprenante, la plupart de ces protéines ne sont pas co-immunoprécipitées avec ADAM10, au contraire des molécules du premier groupe. Ceci suggère que ces molécules sont associées à une fraction de Tspan15 qui n'interagit pas avec ADAM10. A cet égard, nous avons noté qu'une large fraction de Tspan15 était présente dans les endosomes tardifs, ce qui n'était pas le cas d'ADAM10. Par ailleurs plusieurs protéines des endosomes tardifs ou des lysosomes sont présentes dans l'immunoprécipitation Tspan15, mais pas celle de Tspan5 ; il s'agit par exemple des protéines « Transmembrane protein 192 » et « Transmembrane protein 55A », ainsi que la phosphatase acide. Nous proposons donc qu'une large part de ces molécules mieux co-immunoprécipitées par Tspan15 corresponde en fait à une fraction de ces molécules présentes dans le compartiment endosomal tardif. Il faudra déterminer ici encore si ces molécules correspondent à de vraies interactions, ou sont le reflet d'une solubilisation imparfaite des protéines de ce compartiment.

## Conclusions et perspectives

Les arguments en faveur d'un rôle des tétraspanines dans la compartimentation membranaire restent indirects. Cette idée est basée :

- 1) sur le fait qu'il n'y a pas de fonction démontrée de façon convaincante, comme par exemple celle de récepteur ou d'adaptateur,
- 2) sur la capacité des tétraspanines à organiser un réseau d'interaction moléculaire hiérarchisé, leur interaction particulière avec certains lipides comme le cholestérol ou les gangliosides, et leur capacité de flottaison sous certaines conditions dans les gradients de saccharose.

Les études les plus récentes, comme par exemple dans le cas de Tsp-15 et Tspan12 (Moribe *et al.*, 2012 ; Nikopoulos *et al.*, 2010; Poulter *et al.*, 2010), combinant génétique, biochimie et biologie cellulaire, ont montré la régulation de complexes membranaires par des

tétraspanines. L'analyse des mécanismes a conduit les auteurs à proposer que cette régulation fonctionnelle était le résultat de phénomènes de compartimentation membranaire.

Les résultats de notre étude représentent un argument important en faveur du rôle des tétraspanines dans les phénomènes de compartimentation membranaire. Par rapport aux études précédentes, elle comporte plusieurs éléments originaux qui permettent de renforcer cette conclusion. Tout d'abord, la possibilité de comparer l'effet de deux tétraspanines partenaires, qui ont un effet différent à la fois sur le comportement d'ADAM10 et sur son activité dans la voie de signalisation Notch. D'autre part, nos études concernent l'effet des tétraspanines sur une molécule dont l'interaction a bien été caractérisée, et dont le caractère direct est indiscutable. Enfin, elle combine une série d'approches complémentaires, et permet de relier un comportement biochimique et dynamique à un répertoire de molécules associées et un enrichissement dans une région particulière de la cellule.

Des études complémentaires devront d'une part viser à renforcer la démonstration du rôle inhibiteur de Tspan15 sur la signalisation Notch, et d'autre part à renforcer le lien entre l'effet des TspanC8 sur la compartimentation membranaire et leur action sur le récepteur Notch. En ce qui concerne le premier point, il faudra trouver un système cellulaire qui permette de tester le rôle de Tspan15 endogène, par ARN interférence. Un deuxième aspect pourra être d'étudier l'impact de la voie de signalisation Notch chez des souris dont le gène aura été invalidé. Comme nous l'avons vu plus haut, si l'étude des TspanC8 chez les invertébrés a permis de montrer la conservation évolutive de la fonction de TspanC8 sur la fonction d'ADAM10 et la signalisation Notch, elle ne permet pas d'adresser spécifiquement la fonction de Tspan15.

Le lien entre l'effet sur la compartimentation membranaire d'ADAM10 et la voie de signalisation Notch est corrélatif. Une possibilité de démontrer la relation de cause à effet entre ces deux actions des TspanC8 serait de pouvoir identifier un mutant de Tspan5 qui se comporte comme Tspan15 (pour les deux actions), le mutant de Tspan5 non palmitoylable n'ayant pas rempli ce rôle. Des pistes intéressantes concernent le domaine C-terminal et la quatrième région transmembranaire. Dans ce contexte, il serait intéressant à long terme de pouvoir comparer la structure de Tspan5 et Tspan15. Une autre possibilité serait d'utiliser les approches de microscopie super-résolutive pour comparer les localisations respectives d'ADAM10 et de Notch, en fonction de l'expression des différentes TspanC8.



# CONCLUSION GENERALE



Notre travail a permis de mieux comprendre l'implication des tétraspanines au cours du processus de compartimentation membranaire grâce à leur participation à la régulation de la métalloprotéase ADAM10. Cette amélioration de la connaissance du fonctionnement des tétraspanine est primordiale car elle a pour objectif ultime une meilleure compréhension des mécanismes de la compartimentation membranaire et la régulation croisée au cours de la progression tumorale.

Nous avons d'abord abordé la régulation de la disponibilité biologique d'ADAM10 à travers son association, sa régulation et sa localisation membranaire par les TspanC8. Nous fournissons plusieurs éléments de preuve qui indiquent que Tspan5 et Tspan15 confèrent à ADAM10 une compartimentation membranaire différente.

Une autre étape concerne directement les étapes de l'activation de la signalisation NOTCH. Lors de ce travail nous montrons que la transfection des cellules U2OSN1 avec Tspan15 entraîne une diminution de la voie de signalisation Notch induite par le ligand. L'expression de Tspan15 n'a pas réduit l'activité de deux constructions « ligand-indépendant » qui contournent l'exigence du clivage par ADAM10. De ce fait, Tspan15 régule négativement la capacité d'ADAM10 à cliver le récepteur Notch.

Nos premiers résultats concernant l'implication des tétraspanines dans les mécanismes de la compartimentation membranaire et dans la régulation de la protéine ADAM10 ouvrent des perspectives sur :

- Le rôle potentiel de chaque tétraspanines selon la protéine partenaire et l'environnement cellulaire.
- Le rôle des différentes tétraspanines dans la régulation de la signalisation cellulaire, dans la pathogénèse ou dans les processus metastatiques.
- La mise en évidence d'une éventuelle implication des couples TspanC8/ADAM10 et leurs rôles sur les autres substrats de la protéase comme APP, la protéine prion ou les cadhérines.
- L'identification des partenaires du réseau de tétraspanines et/ou des zones enrichies en tétraspanines (les TEAs), à la membrane plasmique et des interactions directes ou indirectes avec ces partenaires.
- La ou les raison(s) pour la(les)quelle(s) une protéine partenaire peut s'associer directement aux tétraspanines.

Il est ainsi possible de conclure que :

1) des mécanismes complexes régulent la compartimentation membranaire dans les cellules de mammifères,

2) différents facteurs environnementaux modulent l'ampleur de ces divers mécanismes,

et 3) les deux tétraspanines étudiées lors de ces travaux appartenant au même sous-groupe ont modifiées le processus de compartimentation membranaire de façon différente.

Puisque l'activité de la métalloprotéase ADAM10 et de la voie de signalisation Notch ont été affectées par la présence des deux tétraspanines Tspan5 et Tspan15 et que la présence d'ADAM10 à la membrane a été modifiée, on peut supposer que la composition lipidique et/ou protéique des microdomaines membranaires pourrait aussi être affectée. Il est toutefois possible qu'une agglomération du « tetraspanins web » et des TEAs membranaires, due à une plus grande fluidité de la membrane, pourrait se traduire par une amélioration des fonctions cellulaires, comme par exemple la défense contre des organismes pathogènes ou la résistance aux microenvironnements tumoraux.

La recherche dans le domaine des tétraspanines et des microdomaines membranaires reste encore à éclaircir. Le sujet est très complexe et difficile à étudier en conditions physiologiques. L'étude des tétraspanines s'avère encore plus complexe en conditions *in vivo* dans lesquelles plusieurs phénomènes encore mal compris interagissent sur le réseau de tétraspanines. Toutefois, les résultats obtenus, dans le cadre de cette étude, sont prometteurs et seront certainement générateurs d'hypothèses pour de futures recherches.

# BIBLIOGRAPHIE



- Abache, T., Le Naour, F., Planchon, S., Harper, F., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2007). The transferrin receptor and the tetraspanin web molecules CD9, CD81, and CD9P-1 are differentially sorted into exosomes after TPA treatment of K562 cells. *J. Cell. Biochem.* *102*, 650–664.
- Abel, S., Hundhausen, C., Mentlein, R., Schulte, A., Berkhout, T.A., Broadway, N., Hartmann, D., Sedlacek, R., Dietrich, S., Muetze, B., et al. (2004). The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J. Immunol.* *172*, 6362–6372.
- Acar, M., Jafar-Nejad, H., Takeuchi, H., Rajan, A., Ibrani, D., Rana, N.A., Pan, H., Haltiwanger, R.S., and Bellen, H.J. (2008). Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell* *132*, 247–258.
- Adler, J., Shevchuk, A.I., Novak, P., Korchev, Y.E., and Parmryd, I. (2010). Plasma membrane topography and interpretation of single-particle tracks. *Nat. Methods* *7*, 170–171.
- Del Alamo, D., and Schweisguth, F. (2009). Notch signalling: receptor cis-inhibition to achieve directionality. *Curr. Biol.* *19*, R683–R684.
- Del Álamo, D., Rouault, H., and Schweisguth, F. (2011). Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling. *Curr. Biol.* *21*, R40–R47.
- Alfandari, D., McCusker, C., and Cousin, H. (2009). ADAM function in embryogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *20*, 153–163.
- Allinson, T.M.J., Parkin, E.T., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J. Neurosci. Res.* *74*, 342–352.
- Allinson, T.M.J., Parkin, E.T., Condon, T.P., Schwager, S.L.U., Sturrock, E.D., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2004). The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein. *Eur. J. Biochem.* *271*, 2539–2547.
- Altmepfen, H.C., Prox, J., Puig, B., Kluth, M.A., Bernreuther, C., Thurm, D., Jorissen, E., Petrowitz, B., Bartsch, U., De Strooper, B., et al. (2011). Lack of a-disintegrin-and-metalloproteinase ADAM10 leads to intracellular accumulation and loss of shedding of the cellular prion protein in vivo. *Mol Neurodegener* *6*, 36.
- Altmepfen, H.C., Puig, B., Dohler, F., Thurm, D.K., Falker, C., Krasemann, S., and Glatzel, M. (2012). Proteolytic processing of the prion protein in health and disease. *Am J Neurodegener Dis* *1*, 15–31.
- Andereg, U., Eichenberg, T., Parthaune, T., Haiduk, C., Saalbach, A., Milkova, L., Ludwig, A., Grosche, J., Averbek, M., Gebhardt, C., et al. (2009). ADAM10 is the constitutive functional sheddase of CD44 in human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* *129*, 1471–1482.
- Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R., and Fahrenholz, F. (2001). Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* *15*, 1837–1839.
- Anders, L., Mertins, P., Lammich, S., Murgia, M., Hartmann, D., Saftig, P., Haass, C., and Ullrich, A. (2006). Furin-, ADAM 10-, and gamma-secretase-mediated cleavage of a receptor tyrosine phosphatase and regulation of beta-catenin's transcriptional activity. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 3917–3934.
- Andersson, E.R., Sandberg, R., and Lendahl, U. (2011). Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* *138*, 3593–3612.
- André, M., Le Caer, J.-P., Greco, C., Planchon, S., El Nemer, W., Boucheix, C., Rubinstein, E., Chamot-Rooke, J., and Le Naour, F. (2006). Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS. *Proteomics* *6*, 1437–1449.

- Angelisová, P., Hilgert, I., and Horejsí, V. (1994). Association of four antigens of the tetraspanin family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics* *39*, 249–256.
- Anzai, N., Lee, Y., Youn, B.-S., Fukuda, S., Kim, Y.-J., Mantel, C., Akashi, M., and Broxmeyer, H.E. (2002). C-kit associated with the transmembrane 4 superfamily proteins constitutes a functionally distinct subunit in human hematopoietic progenitors. *Blood* *99*, 4413–4421.
- Arduise, C., Abache, T., Li, L., Billard, M., Chabanon, A., Ludwig, A., Mauduit, P., Boucheix, C., Rubinstein, E., and Le Naour, F. (2008). Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF- $\alpha$  and epidermal growth factor. *J. Immunol.* *181*, 7002–7013.
- Arimura, K., Arimura, Y., Ng, A.R., Sakoda, S.-I., and Higuchi, I. (2007). Muscle membrane excitability after exercise in thyrotoxic periodic paralysis and thyrotoxicosis without periodic paralysis. *Muscle Nerve* *36*, 784–788.
- Armanious, H., Gelebart, P., Anand, M., Belch, A., and Lai, R. (2011). Constitutive activation of metalloproteinase ADAM10 in mantle cell lymphoma promotes cell growth and activates the TNF $\alpha$ /NF $\kappa$ B pathway. *Blood* *117*, 6237–6246.
- Artavanis-Tsakonas, S., and Muskavitch, M.A.T. (2010). Notch: the past, the present, and the future. *Curr. Top. Dev. Biol.* *92*, 1–29.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* *284*, 770–776.
- Atapattu, L., Saha, N., Llerena, C., Vail, M.E., Scott, A.M., Nikolov, D.B., Lackmann, M., and Janes, P.W. (2012). Antibodies binding the ADAM10 substrate recognition domain inhibit Eph function. *J. Cell. Sci.* *125*, 6084–6093.
- Babaoglan, A.B., O'Connor-Giles, K.M., Mistry, H., Schickedanz, A., Wilson, B.A., and Skeath, J.B. (2009). Sanpodo: a context-dependent activator and inhibitor of Notch signaling during asymmetric divisions. *Development* *136*, 4089–4098.
- Bagatolli, L.A., Ipsen, J.H., Simonsen, A.C., and Mouritsen, O.G. (2010). An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Prog. Lipid Res.* *49*, 378–389.
- Bai, S., Nasser, M.W., Wang, B., Hsu, S.-H., Datta, J., Kutay, H., Yadav, A., Nuovo, G., Kumar, P., and Ghoshal, K. (2009). MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J. Biol. Chem.* *284*, 32015–32027.
- Bailey, R.L., Herbert, J.M., Khan, K., Heath, V.L., Bicknell, R., and Tomlinson, M.G. (2011). The emerging role of tetraspanin microdomains on endothelial cells. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 1667–1673.
- Baleato, R.M., Guthrie, P.L., Gubler, M.-C., Ashman, L.K., and Roselli, S. (2008). Deletion of CD151 results in a strain-dependent glomerular disease due to severe alterations of the glomerular basement membrane. *Am. J. Pathol.* *173*, 927–937.
- Barolo, S., Stone, T., Bang, A.G., and Posakony, J.W. (2002). Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. *Genes Dev.* *16*, 1964–1976.
- Baron, M. (2012). Endocytic routes to Notch activation. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 437–442.
- Barreiro, O., Yáñez-Mó, M., Sala-Valdés, M., Gutiérrez-López, M.D., Ovalle, S., Higginbottom, A., Monk, P.N., Cabañas, C., and Sánchez-Madrid, F. (2005). Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood* *105*, 2852–2861.

- Barreiro, O., Zamai, M., Yáñez-Mó, M., Tejera, E., López-Romero, P., Monk, P.N., Gratton, E., Caiolfa, V.R., and Sánchez-Madrid, F. (2008). Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *J. Cell Biol.* *183*, 527–542.
- Bass, R., and Edwards, D.R. (2010). ADAMs and protein disulfide isomerase: the key to regulated cell-surface protein ectodomain shedding? *Biochem. J.* *428*, e3–e5.
- Bass, R., Werner, F., Odintsova, E., Sugiura, T., Berditchevski, F., and Ellis, V. (2005). Regulation of urokinase receptor proteolytic function by the tetraspanin CD82. *J. Biol. Chem.* *280*, 14811–14818.
- Bassani, S., Cingolani, L.A., Valnegri, P., Folci, A., Zapata, J., Gianfelice, A., Sala, C., Goda, Y., and Passafaro, M. (2012). The X-linked intellectual disability protein TSPAN7 regulates excitatory synapse development and AMPAR trafficking. *Neuron* *73*, 1143–1158.
- Baudoux, B., Castanares-Zapatero, D., Leclercq-Smekens, M., Berna, N., and Poumay, Y. (2000). The tetraspanin CD9 associates with the integrin alpha6beta4 in cultured human epidermal keratinocytes and is involved in cell motility. *Eur. J. Cell Biol.* *79*, 41–51.
- Baumgart, T., Hunt, G., Farkas, E.R., Webb, W.W., and Feigenson, G.W. (2007). Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* *1768*, 2182–2194.
- Becam, I., Fiuza, U.-M., Arias, A.M., and Milán, M. (2010). A role of receptor Notch in ligand cis-inhibition in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *20*, 554–560.
- Bech-Serra, J.J., Santiago-Josefat, B., Esselens, C., Saftig, P., Baselga, J., Arribas, J., and Canals, F. (2006). Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of ADAM17 and ADAM10 by difference gel electrophoresis. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 5086–5095.
- Bekris, L.M., Galloway, N.M., Millard, S., Lockhart, D., Li, G., Galasko, D.R., Farlow, M.R., Clark, C.M., Quinn, J.F., Kaye, J.A., et al. (2011). Amyloid precursor protein (APP) processing genes and cerebrospinal fluid APP cleavage product levels in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging* *32*, 556.e13–e23.
- Bell, G.M., Seaman, W.E., Niemi, E.C., and Imboden, J.B. (1992). The OX-44 molecule couples to signaling pathways and is associated with CD2 on rat T lymphocytes and a natural killer cell line. *J. Exp. Med.* *175*, 527–536.
- Bender, M., Hofmann, S., Stegner, D., Chalaris, A., Bösl, M., Braun, A., Scheller, J., Rose-John, S., and Nieswandt, B. (2010). Differentially regulated GPVI ectodomain shedding by multiple platelet-expressed proteinases. *Blood* *116*, 3347–3355.
- Benhra, N., Lallet, S., Cotton, M., Le Bras, S., Dussert, A., and Le Borgne, R. (2011). AP-1 controls the trafficking of Notch and Sanpodo toward E-cadherin junctions in sensory organ precursors. *Curr. Biol.* *21*, 87–95.
- Berditchevski, F., and Odintsova, E. (1999). Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J. Cell Biol.* *146*, 477–492.
- Berditchevski, F., and Odintsova, E. (2007a). Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic* *8*, 89–96.
- Berditchevski, F., and Odintsova, E. (2007b). Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic* *8*, 89–96.
- Berditchevski, F., Bazzoni, G., and Hemler, M.E. (1995). Specific association of CD63 with the VLA-3 and VLA-6 integrins. *J. Biol. Chem.* *270*, 17784–17790.
- Berditchevski, F., Zutter, M.M., and Hemler, M.E. (1996). Characterization of novel complexes on the

- cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Mol. Biol. Cell* 7, 193–207.
- Berditchevski, F., Tolias, K.F., Wong, K., Carpenter, C.L., and Hemler, M.E. (1997). A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 2595–2598.
- Berditchevski, F., Odintsova, E., Sawada, S., and 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. *J. Biol. Chem.* 277, 36991–37000.
- Berdnik, D., Török, T., González-Gaitán, M., and Knoblich, J.A. (2002). The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev. Cell* 3, 221–231.
- Berube, B.J., and Bubeck Wardenburg, J. (2013). *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel)* 5, 1140–1166.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., et al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729–733.
- Blaumueller, C.M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90, 281–291.
- Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P., and White, J.M. (1992). A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356, 248–252.
- Bloch, L., Sineshchekova, O., Reichenbach, D., Reiss, K., Saftig, P., Kuro-o, M., and Kaether, C. (2009). Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase. *FEBS Lett.* 583, 3221–3224.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F.X., and Stöckler, W. (1993). Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins.” *FEBS Lett.* 331, 134–140.
- Le Borgne, R., Bardin, A., and Schweisguth, F. (2005a). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132, 1751–1762.
- Le Borgne, R., Remaud, S., Hamel, S., and Schweisguth, F. (2005b). Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 3, e96.
- Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1189–1205.
- Bouillot, S., Tillet, E., Carmona, G., Prandini, M.-H., Gauchez, A.-S., Hoffmann, P., Alfaidy, N., Cand, F., and Huber, P. (2011). Protocadherin-12 cleavage is a regulated process mediated by ADAM10 protein: evidence of shedding up-regulation in pre-eclampsia. *J. Biol. Chem.* 286, 15195–15204.
- Bozkulak, E.C., and Weinmaster, G. (2009). Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5679–5695.
- Bradbury, L.E., Kansas, G.S., Levy, S., Evans, R.L., and Tedder, T.F. (1992). The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J. Immunol.* 149, 2841–2850.
- Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J., and Elledge, S.J. (2008). Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319, 921–926.

- Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 678–689.
- Bray, S., and Bernard, F. (2010). Notch targets and their regulation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92, 253–275.
- Brenneman, L.H., Zhang, X., Guan, H., Triplett, J.W., Brown, A., Demyanenko, G.P., Manis, P.B., Landmesser, L., and Maness, P.F. (2013). Polysialylated NCAM and ephrinA/EphA regulate synaptic development of GABAergic interneurons in prefrontal cortex. *Cereb. Cortex* 23, 162–177.
- Brenneman, L.H., Moss, M.L., and Maness, P.F. (2014). EphrinA/EphA-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule regulates growth cone repulsion through ADAM10 metalloprotease. *J. Neurochem.* 128, 267–279.
- Brou, C. (2009). Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands. *Exp. Cell Res.* 315, 1549–1555.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israël, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell* 5, 207–216.
- Brown, D.A. (1992). Interactions between GPI-anchored proteins and membrane lipids. *Trends Cell Biol.* 2, 338–343.
- Brückner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S. (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406, 411–415.
- Budagian, V., Bulanova, E., Orinska, Z., Duitman, E., Brandt, K., Ludwig, A., Hartmann, D., Lemke, G., Saftig, P., and Bulfone-Paus, S. (2005). Soluble Axl is generated by ADAM10-dependent cleavage and associates with Gas6 in mouse serum. *Mol. Cell Biol.* 25, 9324–9339.
- Bulman, M.P., Kusumi, K., Frayling, T.M., McKeown, C., Garrett, C., Lander, E.S., Krumlauf, R., Hattersley, A.T., Ellard, S., and Turnpenny, P.D. (2000). Mutations in the human delta homologue, *DLL3*, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nat. Genet.* 24, 438–441.
- Caccamo, A., Oddo, S., Billings, L.M., Green, K.N., Martinez-Coria, H., Fisher, A., and LaFerla, F.M. (2006). M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron* 49, 671–682.
- Caescu, C.I., Jeschke, G.R., and Turk, B.E. (2009). Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem. J.* 424, 79–88.
- Cailleteau, L., Estrach, S., Thyss, R., Boyer, L., Doye, A., Domange, B., Johnsson, N., Rubinstein, E., Boucheix, C., Ebrahimian, T., et al. (2010).  $\alpha 2\beta 1$  integrin controls association of Rac with the membrane and triggers quiescence of endothelial cells. *J. Cell. Sci.* 123, 2491–2501.
- Caliceti, C., Nigro, P., Rizzo, P., and Ferrari, R. (2014). ROS, Notch, and Wnt signaling pathways: crosstalk between three major regulators of cardiovascular biology. *Biomed Res Int* 2014, 318714.
- Campelo, F., Fabrikant, G., McMahon, H.T., and Kozlov, M.M. (2010). Modeling membrane shaping by proteins: focus on EHD2 and N-BAR domains. *FEBS Lett.* 584, 1830–1839.
- Cao, X., and Südhof, T.C. (2004). Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J. Biol. Chem.* 279, 24601–24611.
- Carey, R.M., Balcz, B.A., Lopez-Coviella, I., and Slack, B.E. (2005). Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biol.* 6, 30.

- Carvalho, K., Lemière, J., Faqir, F., Manzi, J., Blanchoin, L., Plastino, J., Betz, T., and Sykes, C. (2013). Actin polymerization or myosin contraction: two ways to build up cortical tension for symmetry breaking. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* *368*, 20130005.
- Caudron, F., and Barral, Y. (2009). Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. *Dev. Cell* *16*, 493–506.
- De Celis, J.F., and Bray, S. (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development* *124*, 3241–3251.
- Chaimowitz, N.S., Martin, R.K., Cichy, J., Gibb, D.R., Patil, P., Kang, D.-J., Farnsworth, J., Butcher, E.C., McCright, B., and Conrad, D.H. (2011). A disintegrin and metalloproteinase 10 regulates antibody production and maintenance of lymphoid architecture. *J. Immunol.* *187*, 5114–5122.
- Chang, Y., and Finnemann, S.C. (2007). Tetraspanin CD81 is required for the alpha v beta5-integrin-dependent particle-binding step of RPE phagocytosis. *J. Cell. Sci.* *120*, 3053–3063.
- Chantry, A., Gregson, N.A., and Glynn, P. (1989). A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* *264*, 21603–21607.
- Charrin, S., Le Naour, F., Oualid, M., Billard, M., Faure, G., Hanash, S.M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2001). The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J. Biol. Chem.* *276*, 14329–14337.
- Charrin, S., Manié, S., Oualid, M., Billard, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2002). Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett.* *516*, 139–144.
- Charrin, S., Manié, S., Billard, M., Ashman, L., Gerlier, D., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2003a). Multiple levels of interactions within the tetraspanin web. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *304*, 107–112.
- Charrin, S., Manié, S., Thiele, C., Billard, M., Gerlier, D., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2003b). A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *Eur. J. Immunol.* *33*, 2479–2489.
- Charrin, S., le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P.-E., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2009a). Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem. J.* *420*, 133–154.
- Charrin, S., Yalaoui, S., Bartosch, B., Cocquerel, L., Franetich, J.-F., Boucheix, C., Mazier, D., Rubinstein, E., and Silvie, O. (2009b). The Ig domain protein CD9P-1 down-regulates CD81 ability to support *Plasmodium yoelii* infection. *J. Biol. Chem.* *284*, 31572–31578.
- Charrin, S., Latil, M., Soave, S., Polesskaya, A., Chrétien, F., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2013). Normal muscle regeneration requires tight control of muscle cell fusion by tetraspanins CD9 and CD81. *Nat Commun* *4*, 1674.
- Charrin, S., Jouannet, S., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2014). Tetraspanins at a glance. *J. Cell. Sci.* *127*, 3641–3648.
- Chen, J., and Zolkiewska, A. (2011). Force-induced unfolding simulations of the human Notch1 negative regulatory region: possible roles of the heterodimerization domain in mechanosensing. *PLoS ONE* *6*, e22837.
- Cheng, C., Li, W., Zhang, Z., Yoshimura, S., Hao, Q., Zhang, C., and Wang, Z. (2013). MicroRNA-144 is regulated by activator protein-1 (AP-1) and decreases expression of Alzheimer disease-related a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *J. Biol. Chem.* *288*, 13748–13761.
- Cheng, P., Zlobin, A., Volgina, V., Gottipati, S., Osborne, B., Simel, E.J., Miele, L., and Gabrilovich, D.I. (2001). Notch-1 regulates NF-kappaB activity in hemopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* *167*, 4458–4467.

- Childress, J.L., Acar, M., Tao, C., and Halder, G. (2006). Lethal giant discs, a novel C2-domain protein, restricts notch activation during endocytosis. *Curr. Biol.* *16*, 2228–2233.
- Chillakuri, C.R., Sheppard, D., Lea, S.M., and Handford, P.A. (2012). Notch receptor-ligand binding and activation: insights from molecular studies. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 421–428.
- Choi, S.H., Wales, T.E., Nam, Y., O'Donovan, D.J., Sliz, P., Engen, J.R., and Blacklow, S.C. (2012). Conformational locking upon cooperative assembly of notch transcription complexes. *Structure* *20*, 340–349.
- Chometon, G., Zhang, Z.-G., Rubinstein, E., Boucheix, C., Mauch, C., and Aumailley, M. (2006). Dissociation of the complex between CD151 and laminin-binding integrins permits migration of epithelial cells. *Exp. Cell Res.* *312*, 983–995.
- Cissé, M.A., Sunyach, C., Lefranc-Jullien, S., Postina, R., Vincent, B., and Checler, F. (2005). The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. *J. Biol. Chem.* *280*, 40624–40631.
- Claas, C., Stipp, C.S., and Hemler, M.E. (2001). Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J. Biol. Chem.* *276*, 7974–7984.
- Claas, C., Wahl, J., Orlicky, D.J., Karaduman, H., Schnölzer, M., Kempf, T., and Zöller, M. (2005). The tetraspanin D6.1A and its molecular partners on rat carcinoma cells. *Biochem. J.* *389*, 99–110.
- Clark, K.L., Zeng, Z., Langford, A.L., Bowen, S.M., and Todd, S.C. (2001). PGRL is a major CD81-associated protein on lymphocytes and distinguishes a new family of cell surface proteins. *J. Immunol.* *167*, 5115–5121.
- Clarke, G., Goldberg, A.F., Vidgen, D., Collins, L., Ploder, L., Schwarz, L., Molday, L.L., Rossant, J., Szél, A., Molday, R.S., et al. (2000). Rom-1 is required for rod photoreceptor viability and the regulation of disk morphogenesis. *Nat. Genet.* *25*, 67–73.
- Cnops, G., Neyt, P., Raes, J., Petrarulo, M., Nelissen, H., Malenica, N., Luschnig, C., Tietz, O., Ditengou, F., Palme, K., et al. (2006). The TORNADO1 and TORNADO2 genes function in several patterning processes during early leaf development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* *18*, 852–866.
- Codina, J., Li, J., and Dubose, T.D. (2005). CD63 interacts with the carboxy terminus of the colonic H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase to decrease [corrected] plasma membrane localization and 86Rb<sup>+</sup> uptake. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *288*, C1279–C1286.
- Colombo, M., Mirandola, L., Platonova, N., Apicella, L., Basile, A., Figueroa, A.J., Cobos, E., Chiriva-Internati, M., and Chiaramonte, R. (2013). Notch-directed microenvironment reprogramming in myeloma: a single path to multiple outcomes. *Leukemia* *27*, 1009–1018.
- Conley, S.M., Stuck, M.W., and Naash, M.I. (2012). Structural and functional relationships between photoreceptor tetraspanins and other superfamily members. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 1035–1047.
- Contreras, F.-X., Ernst, A.M., Wieland, F., and Brügger, B. (2011). Specificity of intramembrane protein-lipid interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*.
- Copeland, B.T., Bowman, M.J., and Ashman, L.K. (2013a). Genetic ablation of the tetraspanin CD151 reduces spontaneous metastatic spread of prostate cancer in the TRAMP model. *Mol. Cancer Res.* *11*, 95–105.
- Copeland, B.T., Bowman, M.J., Boucheix, C., and Ashman, L.K. (2013b). Knockout of the tetraspanin Cd9 in the TRAMP model of de novo prostate cancer increases spontaneous metastases in an organ-specific manner. *Int. J. Cancer* *133*, 1803–1812.
- Cordes, F.S., Bright, J.N., and Sansom, M.S.P. (2002). Proline-induced distortions of transmembrane

helices. *J. Mol. Biol.* 323, 951–960.

Coskun, U., and Simons, K. (2011). Cell membranes: the lipid perspective. *Structure* 19, 1543–1548.

Coumailleau, F., Fürthauer, M., Knoblich, J.A., and González-Gaitán, M. (2009). Directional Delta and Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division. *Nature* 458, 1051–1055.

Cousin, H., and Alfandari, D. (2011). [ADAM and cell migration: the unexpected role of the cytoplasmic domain]. *Med Sci (Paris)* 27, 1069–1071.

Dahmane, S., Rubinstein, E., and Milhiet, P.-E. (2014). Viruses and tetraspanins: lessons from single molecule approaches. *Viruses* 6, 1992–2011.

Dallas, D.J., Genever, P.G., Patton, A.J., Millichip, M.I., McKie, N., and Skerry, T.M. (1999). Localization of ADAM10 and Notch receptors in bone. *Bone* 25, 9–15.

Danglot, L., Chaineau, M., Dahan, M., Gendron, M.-C., Boggetto, N., Perez, F., and Galli, T. (2010). Role of TI-VAMP and CD82 in EGFR cell-surface dynamics and signaling. *J. Cell. Sci.* 123, 723–735.

Daumas, F., Destainville, N., Millot, C., Lopez, A., Dean, D., and Salomé, L. (2003). Interprotein interactions are responsible for the confined diffusion of a G-protein-coupled receptor at the cell surface. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1001–1005.

Delandre, C., Penabaz, T.R., Passarelli, A.L., Chapes, S.K., and Clem, R.J. (2009). Mutation of juxtamembrane cysteines in the tetraspanin CD81 affects palmitoylation and alters interaction with other proteins at the cell surface. *Exp. Cell Res.* 315, 1953–1963.

Delwig, A., and Rand, M.D. (2008). Kuz and TACE can activate Notch independent of ligand. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2232–2243.

Deng, X., Li, Q., Hoff, J., Novak, M., Yang, H., Jin, H., Erfani, S.F., Sharma, C., Zhou, P., Rabinovitz, I., et al. (2012). Integrin-associated CD151 drives ErbB2-evoked mammary tumor onset and metastasis. *Neoplasia* 14, 678–689.

DeSalle, R., Mares, R., and Garcia-España, A. (2010). Evolution of cysteine patterns in the large extracellular loop of tetraspanins from animals, fungi, plants and single-celled eukaryotes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56, 486–491.

Dewitz, C., Möller-Hackbarth, K., Schweigert, O., Reiss, K., Chalaris, A., Scheller, J., and Rose-John, S. (2014). T-cell immunoglobulin and mucin domain 2 (TIM-2) is a target of ADAM10-mediated ectodomain shedding. *FEBS J.* 281, 157–174.

Dhaliwal, B., Pang, M.O.Y., Yuan, D., Yahya, N., Fabiane, S.M., McDonnell, J.M., Gould, H.J., Beavil, A.J., and Sutton, B.J. (2013). Conformational plasticity at the I gE-binding site of the B-cell receptor CD23. *Mol. Immunol.* 56, 693–697.

Diaz-Rohrer, B., Levental, K.R., and Levental, I. (2014a). Rafting through traffic: Membrane domains in cellular logistics. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 3003–3013.

Diaz-Rohrer, B.B., Levental, K.R., Simons, K., and Levental, I. (2014b). Membrane raft association is a determinant of plasma membrane localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 8500–8505.

Donmez, G., Wang, D., Cohen, D.E., and Guarente, L. (2010). SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10. *Cell* 142, 320–332.

Dornier, E., Coumailleau, F., Ottavi, J.-F., Moretti, J., Boucheix, C., Mauduit, P., Schweisguth, F., and Rubinstein, E. (2012). TspanC8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals. *J. Cell Biol.* 199, 481–496.

- Draber, P., Vonkova, I., Stepanek, O., Hrdinka, M., Kucova, M., Skopcova, T., Otahal, P., Angelisova, P., Horejsi, V., Yeung, M., et al. (2011). SCIMP, a transmembrane adaptor protein involved in major histocompatibility complex class II signaling. *Mol. Cell Biol.* *31*, 4550–4562.
- Dreymueller, D., Pruessmeyer, J., Groth, E., and Ludwig, A. (2012). The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. *Eur. J. Cell Biol.* *91*, 472–485.
- D'Souza, B., Miyamoto, A., and Weinmaster, G. (2008). The many facets of Notch ligands. *Oncogene* *27*, 5148–5167.
- D'Souza, B., Meloty-Kapella, L., and Weinmaster, G. (2010). Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr. Top. Dev. Biol.* *92*, 73–129.
- Dubuisson, J., Helle, F., and Cocquerel, L. (2008). Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell. Microbiol.* *10*, 821–827.
- Duffield, A., Kamsteeg, E.-J., Brown, A.N., Pagel, P., and Caplan, M.J. (2003). The tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H,K-ATPase beta-subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 15560–15565.
- Dunn, C.D., Sulis, M.L., Ferrando, A.A., and Greenwald, I. (2010). A conserved tetraspanin subfamily promotes Notch signaling in *Caenorhabditis elegans* and in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 5907–5912.
- Dustin, M.L., and Depoil, D. (2011). New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 672–684.
- Dyczynska, E., Sun, D., Yi, H., Sehara-Fujisawa, A., Blobel, C.P., and Zolkiewska, A. (2007). Proteolytic processing of delta-like 1 by ADAM proteases. *J. Biol. Chem.* *282*, 436–444.
- Ebsen, H., Lettau, M., Kabelitz, D., and Janssen, O. (2014). Identification of SH3 domain proteins interacting with the cytoplasmic tail of the  $\alpha$  disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *PLoS ONE* *9*, e102899.
- Edidin, M. (1992). Patches, posts and fences: proteins and plasma membrane domains. *Trends Cell Biol.* *2*, 376–380.
- Edidin, M. (2003). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *32*, 257–283.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M., and Pennington, C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* *29*, 258–289.
- Eeman, M., Francius, G., Dufrêne, Y.F., Nott, K., Paquot, M., and Deleu, M. (2009). Effect of cholesterol and fatty acids on the molecular interactions of fengycin with Stratum corneum mimicking lipid monolayers. *Langmuir* *25*, 3029–3039.
- Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V.N., Hein, B., von Middendorff, C., Schönle, A., et al. (2009). Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* *457*, 1159–1162.
- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., and Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* *160*, 113–123.
- Ehrig, J., Petrov, E.P., and Schwille, P. (2011). Near-critical fluctuations and cytoskeleton-assisted phase separation lead to subdiffusion in cell membranes. *Biophys. J.* *100*, 80–89.
- Eichenauer, D.A., Simhadri, V.L., von Strandmann, E.P., Ludwig, A., Matthews, V., Reiners, K.S., von Tresckow, B., Saftig, P., Rose-John, S., Engert, A., et al. (2007). ADAM10 inhibition of human

CD30 shedding increases specificity of targeted immunotherapy in vitro. *Cancer Res.* 67, 332–338.

Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., and Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66, 649–661.

Elson, E.L., Fried, E., Dolbow, J.E., and Genin, G.M. (2010). Phase separation in biological membranes: integration of theory and experiment. *Annu Rev Biophys* 39, 207–226.

Emery, G., Hutterer, A., Berdnik, D., Mayer, B., Wirtz-Peitz, F., Gaitan, M.G., and Knoblich, J.A. (2005). Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the *Drosophila* nervous system. *Cell* 122, 763–773.

Endres, K., and Fahrenholz, F. (2010). Upregulation of the alpha-secretase ADAM10--risk or reason for hope? *FEBS J.* 277, 1585–1596.

Endres, K., and Fahrenholz, F. (2012). Regulation of  $\alpha$ -secretase ADAM10 expression and activity. *Exp Brain Res* 217, 343–352.

Endres, K., Anders, A., Kojro, E., Gilbert, S., Fahrenholz, F., and Postina, R. (2003). Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur. J. Biochem.* 270, 2386–2393.

Endres, K., Postina, R., Schroeder, A., Mueller, U., and Fahrenholz, F. (2005). Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *FEBS J.* 272, 5808–5820.

Endsley, M.A., Somasunderam, A.D., Li, G., Oezguen, N., Thiviyanathan, V., Murray, J.L., Rubin, D.H., Hodge, T.W., O'Brien, W.A., Lewis, B., et al. (2014). Nuclear trafficking of the HIV-1 pre-integration complex depends on the ADAM10 intracellular domain. *Virology* 454-455, 60–66.

Engelman, D.M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438, 578–580.

Escrevente, C., Morais, V.A., Keller, S., Soares, C.M., Altevogt, P., and Costa, J. (2008). Functional role of N-glycosylation from ADAM10 in processing, localization and activity of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 905–913.

Escribá, P.V., González-Ros, J.M., Goñi, F.M., Kinnunen, P.K.J., Vigh, L., Sánchez-Magraner, L., Fernández, A.M., Busquets, X., Horváth, I., and Barceló-Coblijn, G. (2008). Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 829–875.

Espenel, C., Margeat, E., Dosset, P., Arduise, C., Le Grimellec, C., Royer, C.A., Boucheix, C., Rubinstein, E., and Milhiet, P.-E. (2008). Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *J. Cell Biol.* 182, 765–776.

Espinoza, I., and Miele, L. (2013). Deadly crosstalk: Notch signaling at the intersection of EMT and cancer stem cells. *Cancer Lett.* 341, 41–45.

Esselens, C.W., Malapeira, J., Colomé, N., Moss, M., Canals, F., and Arribas, J. (2008). Metastasis-associated C4.4A, a GPI-anchored protein cleaved by ADAM10 and ADAM17. *Biol. Chem.* 389, 1075–1084.

Eto, K., Huet, C., Tarui, T., Kupriyanov, S., Liu, H.-Z., Puzon-McLaughlin, W., Zhang, X.-P., Sheppard, D., Engvall, E., and Takada, Y. (2002). Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin  $\alpha 9\beta 1$ : implications for sperm-egg binding and other cell interactions. *J. Biol. Chem.* 277, 17804–17810.

Evans, J.P. (2001). Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *Bioessays* 23, 628–639.

- Fehon, R.G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, T., Muskavitch, M.A., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* *61*, 523–534.
- Feigelson, S.W., Grabovsky, V., Shamri, R., Levy, S., and Alon, R. (2003). The CD81 tetraspanin facilitates instantaneous leukocyte VLA-4 adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) under shear flow. *J. Biol. Chem.* *278*, 51203–51212.
- Fénéant, L., Levy, S., and Cocquerel, L. (2014). CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses* *6*, 535–572.
- Flannery, A.R., Czibener, C., and Andrews, N.W. (2010). Palmitoylation-dependent association with CD63 targets the Ca<sup>2+</sup> sensor synaptotagmin VII to lysosomes. *J. Cell Biol.* *191*, 599–613.
- Fogel, M., Gutwein, P., Mechttersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Smirnov, A., Edler, L., Ben-Arie, A., Huszar, M., and Altevogt, P. (2003). L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* *362*, 869–875.
- Folgosa, L., Zellner, H.B., El Shikh, M.E., and Conrad, D.H. (2013). Disturbed follicular architecture in B cell A disintegrin and metalloproteinase (ADAM)10 knockouts is mediated by compensatory increases in ADAM17 and TNF- $\alpha$  shedding. *J. Immunol.* *191*, 5951–5958.
- Fortini, M.E. (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 673–684.
- Fortini, M.E. (2009). Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev. Cell* *16*, 633–647.
- Fortini, M.E., and Bilder, D. (2009). Endocytic regulation of Notch signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *19*, 323–328.
- Fradkin, L.G., Kamphorst, J.T., DiAntonio, A., Goodman, C.S., and Noordermeer, J.N. (2002). Genomewide analysis of the *Drosophila* tetraspanins reveals a subset with similar function in the formation of the embryonic synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 13663–13668.
- Franco, M., Muratori, C., Corso, S., Tenaglia, E., Bertotti, A., Capparuccia, L., Trusolino, L., Comoglio, P.M., and Tamagnone, L. (2010). The tetraspanin CD15 1 is required for Met-dependent signaling and tumor cell growth. *J. Biol. Chem.* *285*, 38756–38764.
- Franzke, C.-W., Bruckner-Tuderman, L., and Blobel, C.P. (2009). Shedding of collagen XVII/BP180 in skin depends on both ADAM10 and ADAM9. *J. Biol. Chem.* *284*, 23386–23396.
- Fre, S., Bardin, A., Robine, S., and Louvard, D. (2011). Notch signaling in intestinal homeostasis across species: the cases of *Drosophila*, Zebrafish and the mouse. *Exp. Cell Res.* *317*, 2740–2747.
- Friedrich, B.M., Murray, J.L., Li, G., Sheng, J., Hodge, T.W., Rubin, D.H., O'Brien, W.A., and Ferguson, M.R. (2011). A functional role for ADAM10 in human immunodeficiency virus type-1 replication. *Retrovirology* *8*, 32.
- Fryer, C.J., Lamar, E., Turbachova, I., Kintner, C., and Jones, K.A. (2002). Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev.* *16*, 1397–1411.
- Fryer, C.J., White, J.B., and Jones, K.A. (2004). Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol. Cell* *16*, 509–520.
- Gallagher, C.M., and Knoblich, J.A. (2006). The conserved c2 domain protein lethal (2) giant discs regulates protein trafficking in *Drosophila*. *Dev. Cell* *11*, 641–653.

- Le Gall, S.M., Bobé, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X.-D., Lundell, D., Gibb, D.R., Conrad, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (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. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1785–1794.
- Gambin, Y., Lopez-Esparza, R., Reffay, M., Sierecki, E., Gov, N.S., Genest, M., Hodges, R.S., and Urbach, W. (2006). Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 2098–2102.
- Garbers, C., Jänner, N., Chalaris, A., Moss, M.L., Floss, D.M., Meyer, D., Koch-Nolte, F., Rose-John, S., and Scheller, J. (2011). Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *J. Biol. Chem.* *286*, 14804–14811.
- Garcia-España, A., Chung, P.-J., Zhao, X., Lee, A., Pellicer, A., Yu, J., Sun, T.-T., and Desalle, R. (2006). Origin of the tetraspanin uroplakins and their co-evolution with associated proteins: implications for uroplakin structure and function. *Mol. Phylogenet. Evol.* *41*, 355–367.
- Garcia-España, A., Chung, P.-J., Sarkar, I.N., Stiner, E., Sun, T.-T., and Desalle, R. (2008). Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution. *Genomics* *91*, 326–334.
- Gardiner, E.E., Karunakaran, D., Shen, Y., Arthur, J.F., Andrews, R.K., and Berndt, M.C. (2007). Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. *J. Thromb. Haemost.* *5*, 1530–1537.
- Gaultier, A., Cousin, H., Darribère, T., and Alfandari, D. (2002). ADAM13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. *J. Biol. Chem.* *277*, 23336–23344.
- Gause, M., Eissenberg, J.C., Macrae, A.F., Dorsett, M., Misulovin, Z., and Dorsett, D. (2006). Nipped-A, the Tra1/TRRAP subunit of the Drosophila SAGA and Tip60 complexes, has multiple roles in Notch signaling during wing development. *Mol. Cell Biol.* *26*, 2347–2359.
- Gavert, N., Conacci-Sorrell, M., Gast, D., Schneider, A., Altevogt, P., Bra bletz, T., and 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. *J. Cell Biol.* *168*, 633–642.
- Georgiadis, D., and Yiotakis, A. (2008). Specific targeting of metzincin family members with small-molecule inhibitors: progress toward a multifarious challenge. *Bioorg. Med. Chem.* *16*, 8781–8794.
- Gibb, D.R., El Shikh, M., Kang, D.-J., Rowe, W.J., El Sayed, R., Cichy, J., Yagita, H., Tew, J.G., Dempsey, P.J., Crawford, H.C., et al. (2010). ADAM10 is essential for Notch2-dependent marginal zone B cell development and CD23 cleavage in vivo. *J. Exp. Med.* *207*, 623–635.
- Gibb, D.R., Saleem, S.J., Chaimowitz, N.S., Mathews, J., and Conrad, D.H. (2011a). The emergence of ADAM10 as a regulator of lymphocyte development and autoimmunity. *Mol. Immunol.* *48*, 1319–1327.
- Gibb, D.R., Saleem, S.J., Kang, D.-J., Subler, M.A., and Conrad, D.H. (2011b). ADAM10 overexpression shifts lympho- and myelopoiesis by dysregulating site 2/site 3 cleavage products of Notch. *J. Immunol.* *186*, 4244–4252.
- Giepmans, B.N.G., and van Ijzendoorn, S.C.D. (2009). Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 820–831.
- Girard, L., Hanna, Z., Beaulieu, N., Hoemann, C.D., Simard, C., Kozak, C.A., and Jolicoeur, P. (1996). Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis. *Genes Dev.* *10*, 1930–1944.

- Glomski, K., Monette, S., Manova, K., De Strooper, B., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2011). Deletion of Adam10 in endothelial cells leads to defects in organ-specific vascular structures. *Blood* *118*, 1163–1174.
- Goldberg, A.F.X. (2006). Role of peripherin/rds in vertebrate photoreceptor architecture and inherited retinal degenerations. *Int. Rev. Cytol.* *253*, 131–175.
- Gomis-Rüth, F.X. (2003). Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol. Biotechnol.* *24*, 157–202.
- Gomis-Rüth, F.X., Grams, F., Yiallourous, I., Nar, H., Küsthardt, U., Zwilling, R., Bode, W., and Stöcker, W. (1994). Crystal structures, spectroscopic features, and catalytic properties of cobalt(II), copper(II), nickel(II), and mercury(II) derivatives of the zinc endopeptidase astacin. A correlation of structure and proteolytic activity. *J. Biol. Chem.* *269*, 17111–17117.
- Goñi, F.M. (2014). The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model. *Biochim. Biophys. Acta* *1838*, 1467–1476.
- Goñi, F.M., Alonso, A., Bagatolli, L.A., Brown, R.E., Marsh, D., Prieto, M., and Thewalt, J.L. (2008). Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta* *1781*, 665–684.
- Gonzales, P.E., Solomon, A., Miller, A.B., Leesnitzer, M.A., Sagi, I., and Milla, M.E. (2004). Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain. *J. Biol. Chem.* *279*, 31638–31645.
- Gordon, W.R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2007). Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 295–300.
- Gordon, W.R., Vardar-Ulu, D., L'Heureux, S., Ashworth, T., Malecki, M.J., Sanchez-Irizarry, C., McArthur, D.G., Histen, G., Mitchell, J.L., Aster, J.C., et al. (2009). Effects of S1 cleavage on the structure, surface export, and signaling activity of human Notch1 and Notch2. *PLoS ONE* *4*, e6613.
- Gordón-Alonso, M., Yañez-Mó, M., Barreiro, O., Alvarez, S., Muñoz-Fernández, M.A., Valenzuela-Fernández, A., and Sánchez-Madrid, F. (2006). Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *J. Immunol.* *177*, 5129–5137.
- Goswami, D., Gowrishankar, K., Bilgrami, S., Ghosh, S., Raghupathy, R., Chadda, R., Vishwakarma, R., Rao, M., and Mayor, S. (2008). Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell* *135*, 1085–1097.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* *285*, 221–227.
- Grbovic, O.M., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Dinakar, R., Summers-Terio, N.B., Ceresa, B.P., Nixon, R.A., and Cataldo, A.M. (2003). Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production. *J. Biol. Chem.* *278*, 31261–31268.
- Grecco, H.E., Schmick, M., and Bastiaens, P.I.H. (2011). Signaling from the living plasma membrane. *Cell* *144*, 897–909.
- Greco, C., Bralet, M.-P., Ailane, N., Dubart-Kupperschmitt, A., Rubinstein, E., Le Naour, F., and Boucheix, C. (2010). E-cadherin/p120-catenin and tetraspanin Co-029 cooperate for cell motility control in human colon carcinoma. *Cancer Res.* *70*, 7674–7683.
- Greenwald, I. (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* *12*, 1751–1762.

- Greenwald, I., and Seydoux, G. (1990). Analysis of gain-of-function mutations of the *lin-12* gene of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 346, 197–199.
- Grimm, M.O.W., Mett, J., Stahlmann, C.P., Hauptenthal, V.J., Zimmer, V.C., and Hartmann, T. (2013). Neprilysin and A $\beta$  Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 5, 98.
- Groot, A.J., Habets, R., Yahyanejad, S., Hodin, C.M., Reiss, K., Saftig, P., Theys, J., and Vooijs, M. (2014). Regulated proteolysis of NOTCH2 and NOTCH3 receptors by A-Disintegrin-And-Metalloproteinase (ADAM) 10 and Presenilins. *Mol. Cell. Biol.*
- Groves, J.T., and Kuriyan, J. (2010). Molecular mechanisms in signal transduction at the membrane. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 659–665.
- Guaiquil, V.H., Hewing, N.J., Chiang, M.F., Rosenblatt, M.I., Chan, R.V.P., and Blobel, C.P. (2013). A murine model for retinopathy of prematurity identifies endothelial cell proliferation as a potential mechanism for plus disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 5294–5302.
- Guigas, G., and Weiss, M. (2006). Size-dependent diffusion of membrane inclusions. *Biophys. J.* 91, 2393–2398.
- Guruharsha, K.G., Kankel, M.W., and Artavanis-Tsakonas, S. (2012). The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat. Rev. Genet.* 13, 654–666.
- Gutiérrez-López, M.D., Gilsanz, A., Yáñez-Mó, M., Ovalle, S., Lafuente, E.M., Domínguez, C., Monk, P.N., González-Alvaro, I., Sánchez-Madrid, F., and Cabañas, C. (2011). The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3275–3292.
- Gutwein, P., Mechttersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Gast, D., Joumaa, S., Zentgraf, H., Fogel, M., and Altevogt, D.P. (2003). ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J.* 17, 292–294.
- Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., and Teplow, D.B. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322–325.
- Haeuw, J.-F., Goetsch, L., Bailly, C., and Corvaia, N. (2011). Tetraspanin CD151 as a target for antibody-based cancer immunotherapy. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 553–558.
- Hagiwara, A., Tanaka, Y., Hikawa, R., Morone, N., Kusumi, A., Kimura, H., and Kinoshita, M. (2011). Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. *Cytoskeleton (Hoboken)* 68, 512–525.
- Haining, E.J., Yang, J., Bailey, R.L., Khan, K., Collier, R., Tsai, S., Watson, S.P., Frampton, J., Garcia, P., and Tomlinson, M.G. (2012). The TspanC8 subgroup of tetraspanins interacts with A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and regulates its maturation and cell surface expression. *J. Biol. Chem.* 287, 39753–39765.
- Hall, T., Shieh, H.S., Day, J.E., Caspers, N., Chrencik, J.E., Williams, J.M., Pegg, L.E., Pauley, A.M., Moon, A.F., Krahn, J.M., et al. (2012). Structure of human ADAM-8 catalytic domain complexed with batimastat. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 68, 616–621.
- Hanson, M.A., Cherezov, V., Griffith, M.T., Roth, C.B., Jaakola, V.-P., Chien, E.Y.T., Velasquez, J., Kuhn, P., and Stevens, R.C. (2008). A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Structure* 16, 897–905.
- Harding, A.S., and Hancock, J.F. (2008). Using plasma membrane nanoclusters to build better signaling circuits. *Trends Cell Biol.* 18, 364–371.

- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
- Harris, B., Pereira, I., and Parkin, E. (2009). Targeting ADAM10 to lipid rafts in neuroblastoma SH-SY5Y cells impairs amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *Brain Res.* 1296, 203–215.
- Harris, H.J., Farquhar, M.J., Mee, C.J., Davis, C., Reynolds, G.M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S.G., et al. (2008). CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J. Virol.* 82, 5007–5020.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Lena Illert, A., von Figura, K., et al. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2615–2624.
- Hartmann, M., Herrlich, A., and Herrlich, P. (2013). Who decides when to cleave an ectodomain? *Trends Biochem. Sci.* 38, 111–120.
- Hattori, M., Osterfield, M., and Flanagan, J.G. (2000). Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289, 1360–1365.
- He, B., Zhang, Y.H., Richardson, M.M., Zhang, J.S., Rubinstein, E., and Zhang, X.A. (2011). Differential functions of phospholipid binding and palmitoylation of tumour suppressor EW12/PGRL. *Biochem. J.* 437, 399–411.
- He, P., Kuhara, H., Tachibana, I., Jin, Y., Takeda, Y., Tetsumoto, S., Minami, T., Kohmo, S., Hirata, H., Takahashi, R., et al. (2013). Calretinin mediates apoptosis in small cell lung cancer cells expressing tetraspanin CD9. *FEBS Open Bio* 3, 225–230.
- Head, B.P., and Insel, P.A. (2007). Do caveolins regulate cells by actions outside of caveolae? *Trends Cell Biol.* 17, 51–57.
- Head, B.P., Patel, H.H., and Insel, P.A. (2014). Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 532–545.
- Heikens, M.J., Cao, T.M., Morita, C., Dehart, S.L., and Tsai, S. (2007). Penumbra encodes a novel tetraspanin that is highly expressed in erythroid progenitors and promotes effective erythropoiesis. *Blood* 109, 3244–3252.
- Heinemann, F., Vogel, S.K., and Schwille, P. (2013). Lateral membrane diffusion modulated by a minimal actin cortex. *Biophys. J.* 104, 1465–1475.
- Heitzler, P. (2010). Biodiversity and noncanonical Notch signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92, 457–481.
- Hemler, M.E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 397–422.
- Hemler, M.E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 801–811.
- Hemler, M.E. (2008). Targeting of tetraspanin proteins--potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discov* 7, 747–758.
- Hemler, M.E. (2014). Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nat. Rev. Cancer* 14, 49–60.

- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., and Emr, S.D. (2011). The ESCRT pathway. *Dev. Cell* *21*, 77–91.
- Higashiyama, S., Iwamoto, R., Goishi, K., Raab, G., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., and 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. *J. Cell Biol.* *128*, 929–938.
- Hikita, A., Tanaka, N., Yamane, S., Ikeda, Y., Furukawa, H., Tohma, S., Suzuki, R., Tanaka, S., Mitomi, H., and Fukui, N. (2009). Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Biochem. Cell Biol.* *87*, 581–593.
- Hildebrandt, H., and Dityatev, A. (2014). With a little help from EphA3 and polysialic acid: ectodomain shedding of NCAM is gaining momentum. *J. Neurochem.* *128*, 206–209.
- Hinkle, C.L., Diestel, S., Lieberman, J., and Maness, P.F. (2006). Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM). *J. Neurobiol.* *66*, 1378–1395.
- Hiraoka, Y., Ohno, M., Yoshida, K., Okawa, K., Tomimoto, H., Kita, T., and Nishi, E. (2007). Enhancement of alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein by a metalloendopeptidase nardilysin. *J. Neurochem.* *102*, 1595–1605.
- Hiraoka, Y., Yoshida, K., Ohno, M., Matsuoka, T., Kita, T., and Nishi, E. (2008). Ectodomain shedding of TNF- $\alpha$  is enhanced by nardilysin via activation of ADAM proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *370*, 154–158.
- Hogue, I.B., Grover, J.R., Soheilian, F., Nagashima, K., and Ono, A. (2011). Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *J. Virol.* *85*, 9749–9766.
- Holthuis, J.C.M., and Menon, A.K. (2014). Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* *510*, 48–57.
- Hong, I.-K., Jeoung, D.-I., Ha, K.-S., Kim, Y.-M., and 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. *J. Biol. Chem.* *287*, 32027–32039.
- Hong, K.-J., Wu, D.-C., Cheng, K.-H., Chen, L.-T., and Hung, W.-C. (2014). RECK inhibits stemness gene expression and tumorigenicity of gastric cancer cells by suppressing ADAM-mediated Notch1 activation. *J. Cell. Physiol.* *229*, 191–201.
- Hooper, N.M., and Turner, A.J. (2002). The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* *9*, 1107–1119.
- Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, T.J., Go, M.J., Okano, H., Baron, M., and Matsuno, K. (2004). *Drosophila* *deltex* mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development* *131*, 5527–5537.
- Hori, K., Fuwa, T.J., Seki, T., and Matsuno, K. (2005). Genetic regions that interact with loss- and gain-of-function phenotypes of *deltex* implicate novel genes in *Drosophila* Notch signaling. *Mol. Genet. Genomics* *272*, 627–638.
- Hori, K., Sen, A., Kirchhausen, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (2011). Synergy between the ESCRT-III complex and *Deltex* defines a ligand-independent Notch signal. *J. Cell Biol.* *195*, 1005–1015.
- Hori, K., Sen, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2013). Notch signaling at a glance. *J. Cell. Sci.* *126*, 2135–2140.
- Hori, K., Sen, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2014). Genetic circuitry modulating notch signals through endosomal trafficking. *Meth. Enzymol.* *534*, 283–299.

- Horiuchi, K., Le Gall, S., Schulte, M., Yamaguchi, T., Reiss, K., Murphy, G., Toyama, Y., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2007). Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Mol. Biol. Cell* *18*, 176–188.
- Horváth, G., Serru, V., Clay, D., Billard, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (1998). CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J. Biol. Chem.* *273*, 30537–30543.
- Hotoda, N., Koike, H., Sasagawa, N., and Ishiura, S. (2002). A secreted form of human ADAM9 has an alpha-secretase activity for APP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *293*, 800–805.
- Hotta, H., Ross, A.H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M.V., Ricciardi, R.P., Tsujimoto, Y., Croce, C.M., and Koprowski, H. (1988). Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res.* *48*, 2955–2962.
- Hougaard, S., Loechel, F., Xu, X., Tajima, R., Albrechtsen, R., and Wewer, U.M. (2000). Trafficking of human ADAM 12-L: retention in the trans-Golgi network. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *275*, 261–267.
- Howard, L., Lu, X., Mitchell, S., Griffiths, S., and Glynn, P. (1996). Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem. J.* *317 ( Pt 1)*, 45–50.
- Howard, L., Maciewicz, R.A., and Blobel, C.P. (2000). Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. *Biochem. J.* *348 Pt 1*, 21–27.
- Howes, M.T., Mayor, S., and Parton, R.G. (2010). Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 519–527.
- Hsieh, J.J., Zhou, S., Chen, L., Young, D.B., and Hayward, S.D. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 23–28.
- Huang, J., Bridges, L.C., and White, J.M. (2005a). Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members. *Mol. Biol. Cell* *16*, 4982–4991.
- Huang, S., Yuan, S., Dong, M., Su, J., Yu, C., Shen, Y., Xie, X., Yu, Y., Yu, X., Chen, S., et al. (2005b). The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics* *86*, 674–684.
- Huang, S., Tian, H., Chen, Z., Yu, T., and Xu, A. (2010). The evolution of vertebrate tetraspanins: gene loss, retention, and massive positive selection after whole genome duplications. *BMC Evol. Biol.* *10*, 306.
- Huang, S.-M., Chang, Y.-H., Chao, Y.-C., Lin, J.-A., Wu, C.-H., Lai, C.-Y., Chan, K.-C., Tseng, S.-T., and Yen, G.-C. (2013). EGCG-rich green tea extract stimulates sRAGE secretion to inhibit S100A12-RAGE axis through ADAM10-mediated ectodomain shedding of extracellular RAGE in type 2 diabetes. *Mol Nutr Food Res* *57*, 2264–2268.
- Huang, X.-T., Qian, Z.-M., He, X., Gong, Q., Wu, K.-C., Jiang, L.-R., Lu, L.-N., Zhu, Z.-J., Zhang, H.-Y., Yung, W.-H., et al. (2014). Reducing iron in the brain: a novel pharmacologic mechanism of huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *35*, 1045–1054.
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T.A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., 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*, 1186–1195.
- Hundhausen, C., Schulte, A., Schulz, B., Andrzejewski, M.G., Schwarz, N., von Hundelshausen, P.,

- Winter, U., Paliga, K., Reiss, K., Saftig, P., et al. (2007). Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *J. Immunol.* *178*, 8064–8072.
- Hunte, C., and Richers, S. (2008). Lipids and membrane protein structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *18*, 406–411.
- Huovila, A.-P.J., Turner, A.J., Peltö-Huikko, M., Kärkkäinen, I., and Ortiz, R.M. (2005). Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 413–422.
- Hutterer, A., and Knoblich, J.A. (2005). Numb and alpha-Adaptin regulate Sanpodo endocytosis to specify cell fate in *Drosophila* external sensory organs. *EMBO Rep.* *6*, 836–842.
- Huxley-Jones, J., Clarke, T.-K., Beck, C., Toubaris, G., Robertson, D.L., and Boot-Handford, R.P. (2007). The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evol. Biol.* *7*, 63.
- Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B., Fröhlich, C., Loechel, F., Zolkiewska, A., Ishiguro, K., Kojima, T., Liu, W., Langford, J.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. *J. Cell Biol.* *149*, 1143–1156.
- Imai, T., and Yoshie, O. (1993). C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type 1 are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 or CD8 in T cells. *J. Immunol.* *151*, 6470–6481.
- Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., and Yoshie, O. (1995). Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. *J. Immunol.* *155*, 1229–1239.
- Imayoshi, I., Shimojo, H., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2013). Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 2045–2057.
- Imhof, I., Gasper, W.J., and Derynck, R. (2008). Association of tetraspanin CD9 with transmembrane TGF{alpha} confers alterations in cell-surface presentation of TGF{alpha} and cytoskeletal organization. *J. Cell. Sci.* *121*, 2265–2274.
- Indig, F.E., Diaz-Gonzalez, F., and Ginsberg, M.H. (1997). Analysis of the tetraspanin CD9-integrin alphaIIb beta3 (GPIIb-IIIa) complex in platelet membranes and transfected cells. *Biochem. J.* *327* ( Pt 1), 291–298.
- Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G.A., Powers, M.E., Frank, K.M., Wang, Y., and Bubeck-Wardenburg, J. (2011). A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat. Med.* *17*, 1310–1314.
- Ishibashi, T., Ding, L., Ikenaka, K., Inoue, Y., Miyado, K., Mekada, E., and Baba, H. (2004). Tetraspanin protein CD9 is a novel paranodal component regulating paranodal junctional formation. *J. Neurosci.* *24*, 96–102.
- Israels, S.J., McMillan-Ward, E.M., Easton, J., Robertson, C., and McNicol, A. (2001). CD63 associates with the alphaIIb beta3 integrin-CD9 complex on the surface of activated platelets. *Thromb. Haemost.* *85*, 134–141.
- Iwamoto, R., Higashiyama, S., Mitamura, T., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., and Mekada, E. (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *EMBO J.* *13*, 2322–2330.

- Iwasaki, T., Takeda, Y., Maruyama, K., Yokosaki, Y., Tsujino, K., Tetsumoto, S., Kuhara, H., Nakanishi, K., Otani, Y., Jin, Y., et al. (2013). Deletion of tetraspanin CD9 diminishes lymphangiogenesis in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 288, 2118–2131.
- Jacobsen, T.L., Brennan, K., Arias, A.M., and Muskavitch, M.A. (1998). Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*. *Development* 125, 4531–4540.
- Jaekel, R., and Klein, T. (2006). The *Drosophila* Notch inhibitor and tumor suppressor gene lethal (2) giant discs encodes a conserved regulator of endosomal trafficking. *Dev. Cell* 11, 655–669.
- Janes, P.W., Saha, N., Barton, W.A., Kolev, M.V., Wimmer-Kleikamp, S.H., Nievergall, E., Blobel, C.P., Himanen, J.-P., Lackmann, M., and Nikolov, D.B. (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 123, 291–304.
- Janes, P.W., Wimmer-Kleikamp, S.H., Frangakis, A.S., Treble, K., Griesshaber, B., Sabet, O., Grabenbauer, M., Ting, A.Y., Saftig, P., Bastiaens, P.I., et al. (2009). Cytoplasmic relaxation of active Eph controls ephrin shedding by ADAM10. *PLoS Biol.* 7, e1000215.
- Jarriault, S., and Greenwald, I. (2005). Evidence for functional redundancy between *C. elegans* ADAM proteins SUP-17/Kuzbanian and ADM-4/TACE. *Dev. Biol.* 287, 1–10.
- Jehn, B.M., Dittert, I., Beyer, S., von der Mark, K., and Bielke, W. (2002). c-Cbl binding and ubiquitin-dependent lysosomal degradation of membrane-associated Notch1. *J. Biol. Chem.* 277, 8033–8040.
- Jones, A.V., Lambert, D.W., Speight, P.M., and Whawell, S.A. (2013). ADAM 10 is over expressed in oral squamous cell carcinoma and contributes to invasive behaviour through a functional association with  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  integrin. *FEBS Lett.* 587, 3529–3534.
- Jones, E.L., Demaria, M.C., and Wright, M.D. (2011). Tetraspanins in cellular immunity. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 506–511.
- Jones, P.H., Bishop, L.A., and Watt, F.M. (1996). Functional significance of CD9 association with beta 1 integrins in human epidermal keratinocytes. *Cell Adhes. Commun.* 4, 297–305.
- Jorissen, E., and De Strooper, B. (2010). Gamma-secretase and the intramembrane proteolysis of Notch. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92, 201–230.
- Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., Snellinx, A., Craessaerts, K., Thathiah, A., Tesseur, I., et al. (2010). The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J. Neurosci.* 30, 4833–4844.
- Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cécillion, M., Marechal, E., et al. (1996). Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383, 707–710.
- Junge, H.J., Yang, S., Burton, J.B., Paes, K., Shu, X., French, D.M., Costa, M., Rice, D.S., and Ye, W. (2009). TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin- but not Wnt-induced FZD4/beta-catenin signaling. *Cell* 139, 299–311.
- Kadam, S., and Emerson, B.M. (2003). Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell* 11, 377–389.
- Kai, Y., Peng, W., Ling, W., Jiebing, H., and Zhuan, B. (2014). Reciprocal effects between microRNA-140-5p and ADAM10 suppress migration and invasion of human tongue cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 448, 308–314.
- Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N., Miyazaki, S., and

- Kudo, A. (2000). The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat. Genet.* *24*, 279–282.
- Kaji, K., Oda, S., Miyazaki, S., and Kudo, A. (2002). Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Dev. Biol.* *247*, 327–334.
- Kametaka, S., Kametaka, A., Yonekura, S., Haruta, M., Takenoshita, S., Goto, S., and Waguri, S. (2012). AP-1 clathrin adaptor and CG8538/Aftiphilin are involved in Notch signaling during eye development in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Sci.* *125*, 634–648.
- Kang, T., Park, H.I., Suh, Y., Zhao, Y.-G., Tschesche, H., and Sang, Q.-X.A. (2002). Autolytic processing at Glu586-Ser587 within the cysteine-rich domain of human adamalysin 19/disintegrin-metalloproteinase 19 is necessary for its proteolytic activity. *J. Biol. Chem.* *277*, 48514–48522.
- Kao, H.Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C.R., Evans, R.M., and Kadesch, T. (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev.* *12*, 2269–2277.
- Karamatic Crew, V., Burton, N., Kagan, A., Green, C.A., Levene, C., Flinter, F., Brady, R.L., Daniels, G., and Anstee, D.J. (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*, 2217–2223.
- Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K.-P., Artarini, A., Heuer, D., Becker, D., Khalil, H., Ogilvie, L.A., Hess, S., et al. (2010). Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* *463*, 818–822.
- Katoh, S.-Y., Kamimoto, T., Yamakawa, D., and Takakura, N. (2009). Lipid rafts serve as signaling platforms for Tie2 receptor tyrosine kinase in vascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* *315*, 2818–2823.
- Kazarov, A.R., Yang, X., Stipp, C.S., Sehgal, B., and Hemler, M.E. (2002). An extracellular site on tetraspanin CD151 determines alpha 3 and alpha 6 integrin-dependent cellular morphology. *J. Cell Biol.* *158*, 1299–1309.
- Kholodenko, B.N., Hancock, J.F., and Kolch, W. (2010). Signalling ballet in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 414–426.
- Kim, J., Lilliehook, C., Dudak, A., Prox, J., Saftig, P., Federoff, H.J., and Lim, S.T. (2010). Activity-dependent alpha-cleavage of nectin-1 is mediated by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *J. Biol. Chem.* *285*, 22919–22926.
- Kirkin, V., Cahuzac, N., Guardiola-Serrano, F., Huault, S., Lückcrath, K., Friedmann, E., Novac, N., Wels, W.S., Martoglio, B., Hueber, A.-O., et al. (2007). The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death Differ.* *14*, 1678–1687.
- Kitadokoro, K., Bordo, D., Galli, G., Petracca, R., Falugi, F., Abrignani, S., Grandi, G., and Bolognesi, M. (2001a). CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J.* *20*, 12–18.
- Kitadokoro, K., Galli, G., Petracca, R., Falugi, F., Grandi, G., and Bolognesi, M. (2001b). Crystallization and preliminary crystallographic studies on the large extracellular domain of human CD81, a tetraspanin receptor for hepatitis C virus. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *57*, 156–158.
- Klein, T., and Bischoff, R. (2011). Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure. *J. Proteome Res.* *10*, 17–33.
- Klein, T., Brennan, K., and Arias, A.M. (1997). An intrinsic dominant negative activity of serrate that

is modulated during wing development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 189, 123–134.

Klose, C., Surma, M.A., and Simons, K. (2013). Organellar lipidomics--background and perspectives. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 406–413.

Klosek, S.K., Nakashiro, K.-I., Hara, S., Shintani, S., Hasegawa, H., and Hamakawa, H. (2005). CD151 forms a functional complex with c-Met in human salivary gland cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 408–416.

Knobeloch, K.P., Wright, M.D., Ochsenbein, A.F., Liesenfeld, O., Löhler, J., Zinkernagel, R.M., Horak, I., and Orinska, Z. (2000). Targeted inactivation of the tetraspanin CD37 impairs T-cell-dependent B-cell response under suboptimal costimulatory conditions. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5363–5369.

Ko, S.-Y., Lin, S.-C., Wong, Y.-K., Liu, C.-J., Chang, K.-W., and Liu, T.-Y. (2007). Increase of disintegrin metalloprotease 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 245, 33–43.

Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., and Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5815–5820.

Kojro, E., Füger, P., Prinzen, C., Kanarek, A.M., Rat, D., Endres, K., Fahrenholz, F., and Postina, R. (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. *J. Alzheimers Dis.* 20, 1215–1231.

Komatsu, H., Chao, M.Y., Larkins-Ford, J., Corkins, M.E., Somers, G.A., Tucey, T., Dionne, H.M., White, J.Q., Wani, K., Boxem, M., et al. (2008). OSM-11 facilitates LIN-12 Notch signaling during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *PLoS Biol.* 6, e196.

König, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H.-H., Bhattacharyya, S., Alamares, J.G., Tscherne, D.M., Ortigoza, M.B., Liang, Y., et al. (2010). Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463, 813–817.

Kopan, R., and Ilagan, M.X.G. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216–233.

Kopan, R., Schroeter, E.H., Weintraub, H., and Nye, J.S. (1996). Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1683–1688.

Kovalenko, O.V., Metcalf, D.G., DeGrado, W.F., and Hemler, M.E. (2005). Structural organization and interactions of transmembrane domains in tetraspanin proteins. *BMC Struct. Biol.* 5, 11.

Kovalenko, O.V., Yang, X.H., and Hemler, M.E. (2007). A novel cysteine cross-linking method reveals a direct association between claudin-1 and tetraspanin CD9. *Mol. Cell Proteomics* 6, 1855–1867.

Kovall, R.A., and Blacklow, S.C. (2010). Mechanistic insights into Notch receptor signaling from structural and biochemical studies. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92, 31–71.

Krementsov, D.N., Weng, J., Lambel , M., Roy, N.H., and Thali, M. (2009). Tetraspanins regulate cell-to-cell transmission of HIV-1. *Retrovirology* 6, 64.

Krementsov, D.N., Rassam, P., Margeat, E., Roy, N.H., Schneider-Schaulies, J., Milhiet, P.-E., and Thali, M. (2010). HIV-1 assembly differentially alters dynamics and partitioning of tetraspanins and raft components. *Traffic* 11, 1401–1414.

- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* *305*, 567–580.
- Kusumi, A., and Suzuki, K. (2005). Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim. Biophys. Acta* *1746*, 234–251.
- Kusumi, A., Koyama-Honda, I., and Suzuki, K. (2004). Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic* *5*, 213–230.
- Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Kasai, R.S., Kondo, J., and Fujiwara, T. (2005). Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *34*, 351–378.
- Kusumi, A., Suzuki, K.G.N., Kasai, R.S., Ritchie, K., and Fujiwara, T.K. (2011). Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 604–615.
- Kusumi, A., Fujiwara, T.K., Chadda, R., Xie, M., Tsunoyama, T.A., Kalay, Z., Kasai, R.S., and Suzuki, K.G.N. (2012a). Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic model. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *28*, 215–250.
- Kusumi, A., Fujiwara, T.K., Morone, N., Yoshida, K.J., Chadda, R., Xie, M., Kasai, R.S., and Suzuki, K.G.N. (2012b). Membrane mechanisms for signal transduction: the coupling of the meso-scale raft domains to membrane-skeleton-induced compartments and dynamic protein complexes. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 126–144.
- Kusumi, A., Tsunoyama, T.A., Hirosawa, K.M., Kasai, R.S., and Fujiwara, T.K. (2014). Tracking single molecules at work in living cells. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 524–532.
- Ladi, E., Nichols, J.T., Ge, W., Miyamoto, A., Yao, C., Yang, L.-T., Boulter, J., Sun, Y.E., Kintner, C., and Weinmaster, G. (2005). The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J. Cell Biol.* *170*, 983–992.
- Lafleur, M.A., Xu, D., and Hemler, M.E. (2009). Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. *Mol. Biol. Cell* *20*, 2030–2040.
- Lagaudrière-Gesbert, C., Lebel-Binay, S., Wiertz, E., Ploegh, H.L., Fradelizi, D., and Conjeaud, H. (1997a). The tetraspanin protein CD82 associates with both free HLA class I heavy chain and heterodimeric beta 2-microglobulin complexes. *J. Immunol.* *158*, 2790–2797.
- Lagaudrière-Gesbert, C., Le Naour, F., Lebel-Binay, S., Billard, M., Lemichez, E., Boquet, P., Boucheix, C., Conjeaud, H., and Rubinstein, E. (1997b). 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. *Cell. Immunol.* *182*, 105–112.
- Lammerding, J., Kazarov, A.R., Huang, H., Lee, R.T., and Hemler, M.E. (2003). Tetraspanin CD151 regulates alpha6beta1 integrin adhesion strengthening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 7616–7621.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 3922–3927.
- Lammich, S., Buell, D., Zilow, S., Ludwig, A.-K., Nuscher, B., Lichtenthaler, S.F., Prinzen, C., Fahrenholz, F., and Haass, C. (2010). Expression of the anti-amyloidogenic secretase ADAM10 is suppressed by its 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* *285*, 15753–15760.

- Lammich, S., Kamp, F., Wagner, J., Nuscher, B., Zilow, S., Ludwig, A.-K., Willem, M., and Haass, C. (2011). Translational repression of the disintegrin and metalloprotease ADAM10 by a stable G-quadruplex secondary structure in its 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* *286*, 45063–45072.
- Lapalombella, R., Yeh, Y.-Y., Wang, L., Ramanunni, A., Rafiq, S., Jha, S., Staubli, J., Lucas, D.M., Mani, R., Herman, S.E.M., et al. (2012). Tetraspanin CD37 directly mediates transduction of survival and apoptotic signals. *Cancer Cell* *21*, 694–708.
- Latsysheva, N., Muratov, G., Rajesh, S., Padgett, M., Hotchin, N.A., Overduin, M., and Berditchevski, F. (2006). Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 7707–7718.
- Lau, L.-M., Wee, J.L., Wright, M.D., Moseley, G.W., Hogarth, P.M., Ashman, L.K., and Jackson, D.E. (2004). The tetraspanin superfamily member CD151 regulates outside-in integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 signaling and platelet function. *Blood* *104*, 2368–2375.
- LeBon, L., Lee, T.V., Jafar-Nejad, H., Sprinzak, D., and Elowitz, M. B. (2014). Fringe proteins modulate Notch-ligand cis and trans interactions to specify signaling states. *Elife* *3*.
- Lee, S.B., Schramme, A., Doberstein, K., Dummer, R., Abdel-Bakky, M.S., Keller, S., Altevogt, P., Oh, S.T., Reichrath, J., Oxmann, D., et al. (2010). ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 763–773.
- Lee, S.B., Doberstein, K., Baumgarten, P., Wieland, A., Ungerer, C., Bürger, C., Hardt, K., Boehncke, W.-H., Pfeilschifter, J., Mihic-Probst, D., et al. (2011). PAX2 regulates ADAM10 expression and mediates anchorage-independent cell growth of melanoma cells. *PLoS ONE* *6*, e22312.
- Lekishvili, T., Fromm, E., Mujoomdar, M., and Berditchevski, F. (2008). The tumour-associated antigen L6 (L6-Ag) is recruited to the tetraspanin-enriched microdomains: implication for tumour cell motility. *J. Cell. Sci.* *121*, 685–694.
- Lenne, P.-F., Wawrezynieck, L., Conchonaud, F., Wurtz, O., Boned, A., Guo, X.-J., Rigneault, H., He, H.-T., and Marguet, D. (2006). Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *EMBO J.* *25*, 3245–3256.
- Levy, S. (2014). Function of the tetraspanin molecule CD81 in B and T cells. *Immunol. Res.* *58*, 179–185.
- Levy, S., and Shoham, T. (2005a). The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 136–148.
- Levy, S., and Shoham, T. (2005b). Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)* *20*, 218–224.
- Levy, S., Nguyen, V.Q., Andria, M.L., and Takahashi, S. (1991). Structure and membrane topology of TAPA-1. *J. Biol. Chem.* *266*, 14597–14602.
- Li, G., Endsley, M.A., Somasunderam, A., Gbota, S.L., Mbaka, M.I., Murray, J.L., and Ferguson, M.R. (2014a). The dual role of tetraspanin CD63 in HIV-1 replication. *Virology* *11*, 23.
- Li, K., Li, Y., Wu, W., Gordon, W.R., Chang, D.W., Lu, M., Scoggin, S., Fu, T., Vien, L., Histen, G., et al. (2008). Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3. *J. Biol. Chem.* *283*, 8046–8054.
- Li, L., Krantz, I.D., Deng, Y., Genin, A., Banta, A.B., Collins, C.C., Qi, M., Trask, B.J., Kuo, W.L., Cochran, J., et al. (1997). Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat. Genet.* *16*, 243–251.
- Li, Q., Yang, X.H., Xu, F., Sharma, C., Wang, H.-X., Knoblich, K., Rabinovitz, I., Granter, S.R., and

- Hemler, M.E. (2013). Tetraspanin CD151 plays a key role in skin squamous cell carcinoma. *Oncogene* 32, 1772–1783.
- Li, Y.-J., Fan, Y.-H., Tang, J., Li, J.-B., and Yu, C.-H. (2014b). Meprin- $\beta$  regulates production of pro-inflammatory factors via a disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) dependent pathway in macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 18, 77–84.
- Lichtenthaler, S.F. (2011).  $\alpha$ -secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J. Neurochem.* 116, 10–21.
- Lichtenthaler, S.F., Haass, C., and Steiner, H. (2011). Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. *J. Neurochem.* 117, 779–796.
- Lidke, D.S., and Lidke, K.A. (2012). Advances in high-resolution imaging--techniques for three-dimensional imaging of cellular structures. *J. Cell. Sci.* 125, 2571–2580.
- Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., and Young, M.W. (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev.* 7, 1949–1965.
- Lieber, T., Kidd, S., and Young, M.W. (2002). kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch. *Genes Dev.* 16, 209–221.
- Lim, S.C. (2013). Interrelation between Expression of ADAM 10 and MMP 9 and Synthesis of Peroxynitrite in Doxorubicin Induced Cardiomyopathy. *Biomol Ther (Seoul)* 21, 371–380.
- Linder, M.E., and Deschenes, R.J. (2003). New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. *Biochemistry* 42, 4311–4320.
- Linder, P., Trzewik, J., Ruffer, M., Artmann, G.M., Digel, I., Kurz, R., Rothermel, A., Robitzki, A., and Temiz Artmann, A. (2010). Contractile tension and beating rates of self-exciting monolayers and 3D-tissue constructs of neonatal rat cardiomyocytes. *Med Biol Eng Comput* 48, 59–65.
- Lindner, R., and Naim, H.Y. (2009). Domains in biological membranes. *Exp. Cell Res.* 315, 2871–2878.
- Lineberry, N., Su, L., Soares, L., and Fathman, C.G. (2008). The single subunit transmembrane E3 ligase gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) captures and then ubiquitinates transmembrane proteins across the cell membrane. *J. Biol. Chem.* 283, 28497–28505.
- Lingwood, D., and Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327, 46–50.
- Little, K.D., Hemler, M.E., and Stipp, C.S. (2004). Dynamic regulation of a GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: central role of CD81 in facilitating GPR56-Galpha q/11 association. *Mol. Biol. Cell* 15, 2375–2387.
- Liu, J., Sato, C., Cerletti, M., and Wagers, A. (2010). Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92, 367–409.
- Loechel, F., Overgaard, M.T., Oxvig, C., Albrechtsen, R., and Wewer, U.M. (1999). Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. *J. Biol. Chem.* 274, 13427–13433.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., and Israël, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8108–8112.
- Longhurst, C.M., White, M.M., Wilkinson, D.A., and Jennings, L.K. (1999). A CD9, alphaIIbeta3,

integrin-associated protein, and GPIb/V/IX complex on the surface of human platelets is influenced by alphaIIb beta3 conformational states. *Eur. J. Biochem.* 263, 104–111.

Lorenzen, I., Trad, A., and Grötzinger, J. (2011). Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415, 330–336.

Lorenzen, I., Lokau, J., Düsterhöft, S., Trad, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., and Grötzinger, J. (2012). The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett.* 586, 1093–1100.

Louvi, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2012). Notch and disease: a growing field. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 473–480.

Lozahic, S., Christiansen, D., Manié, S., Gerlier, D., Billard, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2000). CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur. J. Immunol.* 30, 900–907.

Lu, X., Lu, D., Scully, M.F., and Kakkar, V.V. (2007). Structure-activity relationship studies on ADAM protein-integrin interactions. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 5, 29–42.

Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M.H., Broadway, N., Andrews, R.C., Bickett, D.M., Leesnitzer, M.A., and Becherer, J.D. (2005). Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8, 161–171.

Lum, L., Reid, M.S., and Blobel, C.P. (1998). Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* 273, 26236–26247.

Lunn, C.A., Fan, X., Dalie, B., Miller, K., Zavodny, P.J., Narula, S.K., and Lundell, D. (1997). Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase. *FEBS Lett.* 400, 333–335.

Luo, Y., and Haltiwanger, R.S. (2005). O-fucosylation of notch occurs in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 280, 11289–11294.

Maecker, H.T., Todd, S.C., and Levy, S. (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.* 11, 428–442.

Mai, A., Massa, S., Lavu, S., Pezzi, R., Simeoni, S., Ragno, R., Mariotti, F.R., Chiani, F., Camilloni, G., and Sinclair, D.A. (2005). Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (Sirtuin) inhibitors. *J. Med. Chem.* 48, 7789–7795.

Maier, O., Hoekstra, D., and Baron, W. (2008). Polarity development in oligodendrocytes: sorting and trafficking of myelin components. *J. Mol. Neurosci.* 35, 35–53.

Mancia, F., and Shapiro, L. (2005). ADAM and Eph: how Ephrin-signaling cells become detached. *Cell* 123, 185–187.

Mannion, B.A., Berditchevski, F., Kraeft, S.K., Chen, L.B., and Hemler, M.E. (1996). Transmembrane-4 superfamily proteins CD81 (TAPA-1), CD82, CD63, and CD53 specifically associated with integrin alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29). *J. Immunol.* 157, 2039–2047.

Manzine, P.R., Barham, E.J., Vale, F.A.C., Selistre-de-Araújo, H.S., Pavarini, S.C.I., and Cominetti, M.R. (2014). Platelet a disintegrin and metalloproteinase 10 expression correlates with clock drawing test scores in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 29, 414–420.

Marcello, E., Gardoni, F., Mauceri, D., Romorini, S., Jeromin, A., Epis, R., Borroni, B., Cattabeni, F., Sala, C., Padovani, A., et al. (2007). Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase

ADAM10 trafficking and promotes its activity. *J. Neurosci.* 27, 1682–1691.

Marcello, E., Gardoni, F., Di Luca, M., and Pérez-Otaño, I. (2010). An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 285, 10376–10384.

Marcello, E., Epis, R., Saraceno, C., Gardoni, F., Borroni, B., Cattabeni, F., Padovani, A., and Di Luca, M. (2012). SAP97-mediated local trafficking is altered in Alzheimer disease patients' hippocampus. *Neurobiol. Aging* 33, 422.e1–e10.

Marcello, E., Saraceno, C., Musardo, S., Vara, H., de la Fuente, A.G., Pelucchi, S., Di Marino, D., Borroni, B., Tramontano, A., Pérez-Otaño, I., et al. (2013). Endocytosis of synaptic ADAM10 in neuronal plasticity and Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* 123, 2523–2538.

Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005a). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 9182–9187.

Maretzky, T., Schulte, M., Ludwig, A., Rose-John, S., Blobel, C., Hartmann, D., Altevogt, P., Saftig, P., and Reiss, K. (2005b). L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9040–9053.

Maretzky, T., Scholz, F., Köten, B., Proksch, E., Saftig, P., and Reiss, K. (2008). ADAM10-mediated E-cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1737–1746.

Martin, L., Fluhrer, R., Reiss, K., Kremmer, E., Saftig, P., and Haass, C. (2008). Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *J. Biol. Chem.* 283, 1644–1652.

Martinez Arias, A., Zecchini, V., and Brennan, K. (2002). CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 524–533.

Maskos, K., Fernandez-Catalan, C., Huber, R., Bourenkov, G.P., Bartunik, H., Ellestad, G.A., Reddy, P., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Castner, B.J., et al. (1998). Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3408–3412.

Mathews, J.A., Gibb, D.R., Chen, B.-H., Scherle, P., and Conrad, D.H. (2010). CD23 Sheddase A disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) is also required for CD23 sorting into B cell-derived exosomes. *J. Biol. Chem.* 285, 37531–37541.

Mathews, J.A., Ford, J., Norton, S., Kang, D., Dellinger, A., Gibb, D.R., Ford, A.Q., Massay, H., Kepley, C.L., Scherle, P., et al. (2011). A potential new target for asthma therapy: a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) involvement in murine experimental asthma. *Allergy* 66, 1193–1200.

Matsumoto, A.K., Martin, D.R., Carter, R.H., Klickstein, L.B., Ahearn, J.M., and Fearon, D.T. (1993). Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 178, 1407–1417.

Matthews, V., Schuster, B., Schütze, S., Bussmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K.-J., et al. (2003). Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J. Biol. Chem.* 278, 38829–38839.

Mattila, P.K., Feest, C., Depoil, D., Treanor, B., Montaner, B., Otipoby, K.L., Carter, R., Justement, L.B., Bruckbauer, A., and Batista, F.D. (2013). The actin and tetraspanin networks organize receptor nanoclusters to regulate B cell receptor-mediated signaling. *Immunity* 38, 461–474.

McCulloch, D.R., Akl, P., Samarantunga, H., Herington, A.C., and 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. *Clin. Cancer Res.* *10*, 314–323.
- McDonald, A.J., and Millhauser, G.L. (2014). PrP overdrive: does inhibition of  $\alpha$ -cleavage contribute to PrP(C) toxicity and prion disease? *Prion* *8*.
- McDonald, A.J., Dibble, J.P., Evans, E.G.B., and Millhauser, G.L. (2014). A new paradigm for enzymatic control of  $\alpha$ -cleavage and  $\beta$ -cleavage of the prion protein. *J. Biol. Chem.* *289*, 803–813.
- McNally, N., Kenna, P.F., Rancourt, D., Ahmed, T., Stitt, A., Colledge, W.H., Lloyd, D.G., Palfi, A., O'Neill, B., Humphries, M.M., et al. (2002). Murine model of autosomal dominant retinitis pigmentosa generated by targeted deletion at codon 307 of the rds-peripherin gene. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1005–1016.
- Meilhac, N., and Destainville, N. (2011). Clusters of proteins in biomembranes: insights into the roles of interaction potential shapes and of protein diversity. *J Phys Chem B* *115*, 7190–7199.
- Meyer, H., Panz, M., Albrecht, S., Drechsler, M., Wang, S., Hüsken, M., Lehmacher, C., and Paululat, A. (2011). Drosophila metalloproteases in development and differentiation: the role of ADAM proteins and their relatives. *Eur. J. Cell Biol.* *90*, 770–778.
- Mezyk-Kopeć, R., Bzowska, M., Stalińska, K., Chełmicki, T., Podkalicki, M., Jucha, J., Kowalczyk, K., Mak, P., and Bereta, J. (2009). Identification of ADAM10 as a major TNF sheddase in ADAM17-deficient fibroblasts. *Cytokine* *46*, 309–315.
- Miao, W.M., Seng, W.L., Duquette, M., Lawler, P., Laus, C., and Lawler, J. (2001a). Thrombospondin-1 type 1 repeat recombinant proteins inhibit tumor growth through transforming growth factor-beta-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res.* *61*, 7830–7839.
- Miao, W.M., Vasile, E., Lane, W.S., and Lawler, J. (2001b). CD36 associates with CD9 and integrins on human blood platelets. *Blood* *97*, 1689–1696.
- Micchelli, C.A., Rulifson, E.J., and Blair, S.S. (1997). The function and regulation of cut expression on the wing margin of Drosophila: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* *124*, 1485–1495.
- Milla, M.E., Leesnitzer, M.A., Moss, M.L., Clay, W.C., Carter, H.L., Miller, A.B., Su, J.L., Lambert, M.H., Willard, D.H., Sheeley, D.M., et al. (1999). Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *J. Biol. Chem.* *274*, 30563–30570.
- Milla, M.E., Gonzales, P.E., and Leonard, J.D. (2006). The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch. *Cell Biochem. Biophys.* *44*, 342–348.
- Min, G., Wang, H., Sun, T.-T., and Kong, X.-P. (2006). Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-Å resolution. *J. Cell Biol.* *173*, 975–983.
- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., et al. (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* *287*, 321–324.
- Miyazaki, T., Müller, U., and Campbell, K.S. (1997). Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81. *EMBO J.* *16*, 4217–4225.
- Moloney, D.J., Panin, V.M., Johnston, S.H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K.D., Haltiwanger, R.S., et al. (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* *406*, 369–375.

- Monk, P.N., and Partridge, L.J. (2012). Tetraspanins: gateways for infection. *Infect Disord Drug Targets* 12, 4–17.
- Morales, J.K., Saleem, S.J., Martin, R.K., Saunders, B.L., Barnstein, B.O., Faber, T.W., Pullen, N.A., Kolawole, E.M., Brooks, K.B., Norton, S.K., et al. (2014). Myeloid-derived suppressor cells enhance IgE-mediated mast cell responses. *J. Leukoc. Biol.* 95, 643–650.
- Moretti, J., and Brou, C. (2013). Ubiquitinations in the notch signaling pathway. *Int J Mol Sci* 14, 6359–6381.
- Moretti, J., Chastagner, P., Gastaldello, S., Heuss, S.F., Dirac, A.M., Bernards, R., Masucci, M.G., Israël, A., and Brou, C. (2010). The translation initiation factor 3f (eIF3f) exhibits a deubiquitinase activity regulating Notch activation. *PLoS Biol.* 8, e1000545.
- Moretti, J., Chastagner, P., Liang, C.-C., Cohn, M.A., Israël, A., and Brou, C. (2012). The ubiquitin-specific protease 12 (USP12) is a negative regulator of notch signaling acting on notch receptor trafficking toward degradation. *J. Biol. Chem.* 287, 29429–29441.
- Mori, S., Tanaka, M., Nanba, D., Nishiwaki, E., Ishiguro, H., Higashiyama, S., and Matsuura, N. (2003). PACSIN3 binds ADAM12/meltrin alpha and up-regulates ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *J. Biol. Chem.* 278, 46029–46034.
- Moribe, H., Yochem, J., Yamada, H., Tabuse, Y., Fujimoto, T., and Mekada, E. (2004). Tetraspanin protein (TSP-15) is required for epidermal integrity in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell. Sci.* 117, 5209–5220.
- Moribe, H., Konakawa, R., Koga, D., Ushiki, T., Nakamura, K., and Mekada, E. (2012). Tetraspanin is required for generation of reactive oxygen species by the dual oxidase system in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 8, e1002957.
- Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J., and Kusumi, A. (2006). Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J. Cell Biol.* 174, 851–862.
- Moshkin, Y.M., Kan, T.W., Goodfellow, H., Bezstarosti, K., Maeda, R.K., Pilyugin, M., Karch, F., Bray, S.J., Demmers, J.A.A., and Verrijzer, C.P. (2009). Histone chaperones ASF1 and NAP1 differentially modulate removal of active histone marks by LID-RPD3 complexes during NOTCH silencing. *Mol. Cell* 35, 782–793.
- Moss, M.L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P.M., Gillispie, P.A., Stoeck, A., Wildeboer, D., Bartsch, J.W., et al. (2007). The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J. Biol. Chem.* 282, 35712–35721.
- Mostowy, S., and Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 183–194.
- Mouritsen, O.G. (2011). Lipidology and lipidomics--quo vadis? A new era for the physical chemistry of lipids. *Phys Chem Chem Phys* 13, 19195–19205.
- Mukherjee, A., Veraksa, A., Bauer, A., Rosse, C., Camonis, J., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Regulation of Notch signalling by non-visual beta-arrestin. *Nat. Cell Biol.* 7, 1191–1201.
- Mumm, J.S., and Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* 228, 151–165.
- Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J., and Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol. Cell* 5, 197–206.
- Mummery-Widmer, J.L., Yamazaki, M., Stoeger, T., Novatchkova, M., Bhalerao, S., Chen, D., Dietzl,

- G., Dickson, B.J., and Knoblich, J.A. (2009). Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature* 458, 987–992.
- Muraguchi, T., Takegami, Y., Ohtsuka, T., Kitajima, S., Chandana, E.P.S., Omura, A., Miki, T., Takahashi, R., Matsumoto, N., Lu dwig, A., et al. (2007). RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nat. Neurosci.* 10, 838–845.
- Murai, T., Maruyama, Y., Mio, K., Nishiyama, H., Suga, M., and Sato, C. (2011). Low cholesterol triggers membrane microdomain-dependent CD44 shedding and suppresses tumor cell migration. *J. Biol. Chem.* 286, 1999–2007.
- Murata, M., Peränen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V., and Simons, K. (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 10339–10343.
- Murayama, Y., Shinomura, Y., Oritani, K., Miyagawa, J.-I., Yoshida, H., Nishida, M., Katsube, F., Shiraga, M., Miyazaki, T., Nakamoto, T., et al. (2008). The tetraspanin CD9 modulates epidermal growth factor receptor signaling in cancer cells. *J. Cell. Physiol.* 216, 135–143.
- Murphy, G. (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* 8, 929–941.
- Murphy, G. (2011). Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* 12, 233.
- Musardo, S., Marcello, E., Gardoni, F., and Di Luca, M. (2014). ADAM10 in synaptic physiology and pathology. *Neurodegener Dis* 13, 72–74.
- Musse, A.A., Meloty-Kapella, L., and Weinmaster, G. (2012). Notch ligand endocytosis: mechanistic basis of signaling activity. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 429–436.
- Nagano, O., Murakami, D., Hartmann, D., De Strooper, B., Saftig, P., Iwatsubo, T., Nakajima, M., Shinohara, M., and Saya, H. (2004). Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J. Cell Biol.* 165, 893–902.
- Nagel, A.C., Krejci, A., Tenin, G., Bravo-Patiño, A., Bray, S., Maier, D., and Preiss, A. (2005). Hairless-mediated repression of notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10433–10441.
- Nakamura, K., Mitamura, T., Takahashi, T., Kobayashi, T., and 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. *J. Biol. Chem.* 275, 18284–18290.
- Nakayama, K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* 327 ( Pt 3), 625–635.
- Nakazawa, Y., Sato, S., Naito, M., Kato, Y., Mishima, K., Arai, H., Tsuruo, T., and Fujita, N. (2008). Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis. *Blood* 112, 1730–1739.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M., and Boucheix, C. (2000). Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 287, 319–321.
- Le Naour, F., Charrin, S., Labas, V., Le Caer, J.-P., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2004). Tetraspanins connect several types of Ig proteins: IgM is a novel component of the tetraspanin web on B-lymphoid cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 148–152.
- Le Naour, F., André, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2006). Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics* 6,

6447–6454.

Nelson, W.J. (2003). Epithelial cell polarity from the outside looking in. *News Physiol. Sci.* *18*, 143–146.

Nichols, T.C., Guthridge, J.M., Karp, D.R., Molina, H., Fletcher, D.R., and Holers, V.M. (1998). Gamma-glutamyl transpeptidase, an ecto-enzyme regulator of intracellular redox potential, is a component of TM4 signal transduction complexes. *Eur. J. Immunol.* *28*, 4123–4129.

Nickoloff, B.J., Qin, J.-Z., Chaturvedi, V., Denning, M.F., Bonish, B., and Miele, L. (2002). Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma. *Cell Death Differ.* *9*, 842–855.

Nicolson, G.L. (2014). The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta* *1838*, 1451–1466.

Van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., and Raposo, G. (2006). Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J. Biochem.* *140*, 13–21.

Van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., and Raposo, G. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev. Cell* *21*, 708–721.

Niewiarowski, S., McLane, M.A., Kloczewiak, M., and Stewart, G.J. (1994). Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin. Hematol.* *31*, 289–300.

Nikopoulos, K., Gilissen, C., Hoischen, A., van Nouhuys, C.E., Boonstra, F.N., Blokland, E.A.W., Arts, P., Wieskamp, N., Strom, T.M., Ayuso, C., et al. (2010). Next-generation sequencing of a 40 Mb linkage interval reveals TSPAN12 mutations in patients with familial exudative vitreoretinopathy. *Am. J. Hum. Genet.* *86*, 240–247.

Nishi, E., Hiraoka, Y., Yoshida, K., Okawa, K., and Kita, T. (2006). Nardilysin enhances ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor through activation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* *281*, 31164–31172.

Nishiuchi, R., Sanzen, N., Nada, S., Sumida, Y., Wada, Y., Okada, M., Takagi, J., Hasegawa, H., and Sekiguchi, K. (2005). Potentiation of the ligand-binding activity of integrin alpha3beta1 via association with tetraspanin CD151. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 1939–1944.

Noël, A., Gutiérrez-Fernández, A., Sounni, N.E., Behrendt, N., Maquoi, E., Lund, I.K., Cal, S., Hoyer-Hansen, G., and López-Otín, C. (2012). New and paradoxical roles of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. *Front Pharmacol* *3*, 140.

Novitskaya, V., Romanska, H., Kordek, R., Potemski, P., Kusińska, R., Parsons, M., Odintsova, E., and Berditchevski, F. (2014). Integrin  $\alpha 3 \beta 1$ -CD151 complex regulates dimerization of ErbB2 via RhoA. *Oncogene* *33*, 2779–2789.

Oda, T., Elkahloun, A.G., Meltzer, P.S., and Chandrasekharappa, S.C. (1997a). Identification and cloning of the human homolog (JAG1) of the rat Jagged1 gene from the Alagille syndrome critical region at 20p12. *Genomics* *43*, 376–379.

Oda, T., Elkahloun, A.G., Pike, B.L., Okajima, K., Krantz, I.D., Genin, A., Piccoli, D.A., Meltzer, P.S., Spinner, N.B., Collins, F.S., et al. (1997b). Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat. Genet.* *16*, 235–242.

Odintsova, E., Sugiura, T., and Berditchevski, F. (2000). Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr. Biol.* *10*, 1009–1012.

- Odintsova, E., Voortman, J., Gilbert, E., and Berditchevski, F. (2003). Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *J. Cell. Sci.* *116*, 4557–4566.
- Odintsova, E., Butters, T.D., Monti, E., Sprong, H., van Meer, G., and Berditchevski, F. (2006). Gangliosides play an important role in the organization of CD82-enriched microdomains. *Biochem. J.* *400*, 315–325.
- Odintsova, E., van Niel, G., Conjeaud, H., Raposo, G., Iwamoto, R., Mekada, E., and Berditchevski, F. (2013). Metastasis suppressor tetraspanin CD82/KAI1 regulates ubiquitylation of epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* *288*, 26323–26334.
- Ohno, M., Hiraoka, Y., Matsuoka, T., Tomimoto, H., Takao, K., Miyakawa, T., Oshima, N., Kiyonari, H., Kimura, T., Kita, T., et al. (2009). Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat. Neurosci.* *12*, 1506–1513.
- Ohno, M., Hiraoka, Y., Lichtenthaler, S.F., Nishi, K., Saijo, S., Matsuoka, T., Tomimoto, H., Araki, W., Takahashi, R., Kita, T., et al. (2014). Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing  $\alpha$ -secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol. Aging* *35*, 213–222.
- Okajima, T., and Irvine, K.D. (2002). Regulation of notch signaling by o-linked fucose. *Cell* *111*, 893–904.
- Okajima, T., Xu, A., Lei, L., and Irvine, K.D. (2005). Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding. *Science* *307*, 1599–1603.
- Ooi, Y.S., Stiles, K.M., Liu, C.Y., Taylor, G.M., and Kielian, M. (2013). Genome-wide RNAi screen identifies novel host proteins required for alphavirus entry. *PLoS Pathog.* *9*, e1003835.
- Orth, P., Reichert, P., Wang, W., Prosise, W.W., Yarosh-Tomaine, T., Hammond, G., Ingram, R.N., Xiao, L., Mirza, U.A., Zou, J., et al. (2004). Crystal structure of the catalytic domain of human ADAM33. *J. Mol. Biol.* *335*, 129–137.
- Oswald, F., Winkler, M., Cao, Y., Astrahantseff, K., Bourteele, S., Knöchel, W., and Borggreffe, T. (2005). RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 10379–10390.
- Pabois, A., Devallière, J., Quillard, T., Coulon, F., Gérard, N., Labois, C., Toquet, C., and Charreau, B. (2014). The disintegrin and metalloproteinase ADAM10 mediates a canonical Notch-dependent regulation of IL-6 through Dll4 in human endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* *91*, 510–521.
- Pallavi, S.K., Ho, D.M., Hicks, C., Miele, L., and Artavanis-Tsakonas, S. (2012). Notch and Mef2 synergize to promote proliferation and metastasis through JNK signal activation in *Drosophila*. *EMBO J.* *31*, 2895–2907.
- Pan, D., and Rubin, G.M. (1997). Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* *90*, 271–280.
- Park, B.H., Kim, H.G., Jin, S.W., Song, S.-G., and Jeong, H.G. (2014). Metallothionein-III increases ADAM10 activity in association with furin, PC7, and PKC $\alpha$  during non-amyloidogenic processing. *FEBS Lett.* *588*, 2294–2300.
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (1999). Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry* *38*, 9728–9734.
- Pasquale, E.B. (2008). Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* *133*, 38–52.
- Passer, B., Pellegrini, L., Russo, C., Siegel, R.M., Lenardo, M.J., Schettini, G., Bachmann, M., Tabaton, M., and D'Adamio, L. (2000). Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-

secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor. *J. Alzheimers Dis.* 2, 289–301.

Patla, I., Volberg, T., Elad, N., Hirschfeld-Warneken, V., Grashoff, C., Fässler, R., Spatz, J.P., Geiger, B., and Medalia, O. (2010). Dissecting the molecular architecture of integrin adhesion sites by cryo-electron tomography. *Nat. Cell Biol.* 12, 909–915.

Pelisek, J., Pongratz, J., Deutsch, L., Reeps, C., Stadlbauer, T., and Eckstein, H.-H. (2012). Expression and cellular localization of metalloproteases ADAMs in high graded carotid artery lesions. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 72, 648–656.

Penton, A.L., Leonard, L.D., and Spinner, N.B. (2012). Notch signaling in human development and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 450–457.

Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., et al. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282, 1281–1284.

Petcherski, A.G., and Kimble, J. (2000). Mastermind is a putative activator for Notch. *Curr. Biol.* 10, R471–R473.

Pike, L.J. (2009). The challenge of lipid rafts. *J. Lipid Res.* 50 *Suppl*, S323–S328.

Platta, H.W., and Stenmark, H. (2011). Endocytosis and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 393–403.

Ploscariu, N., Kuczera, K., Malek, K.E., Wawrzyniuk, M., Dey, A., and Szoszkiewicz, R. (2014). Single molecule studies of force-induced S2 site exposure in the mammalian Notch negative regulatory domain. *J Phys Chem B* 118, 4761–4770.

Pols, M.S., and Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* 315, 1584–1592.

Postina, R. (2012). Activation of  $\alpha$ -secretase cleavage. *J. Neurochem.* 120 *Suppl 1*, 46–54.

Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., et al. (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* 113, 1456–1464.

Potel, J., Rassam, P., Montpellier, C., Kaestner, L., Werkmeister, E., Tews, B.A., Couturier, C., Popescu, C.-I., Baumert, T.F., Rubinstein, E., et al. (2013). EWI-2wint promotes CD81 clustering that abrogates Hepatitis C Virus entry. *Cell. Microbiol.* 15, 1234–1252.

Poulter, J.A., Ali, M., Gilmour, D.F., Rice, A., Kondo, H., Hayashi, K., Mackey, D.A., Kearns, L.S., Ruddle, J.B., Craig, J.E., et al. (2010). Mutations in TSPAN12 cause autosomal-dominant familial exudative vitreoretinopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 248–253.

Prinzen, C., Müller, U., Endres, K., Fahrenholz, F., and Postina, R. (2005). Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *FASEB J.* 19, 1522–1524.

Prior, I.A., and Hancock, J.F. (2012). Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 145–153.

Protsy, M.B., Watkins, N.A., Colombo, D., Thomas, S.G., Heath, V.L., Herbert, J.M.J., Bicknell, R., Senis, Y.A., Ashman, L.K., Berditchevski, F., et al. (2009). Identification of Tspan9 as a novel platelet tetraspanin and the collagen receptor GPVI as a component of tetraspanin microdomains. *Biochem. J.* 417, 391–400.

Prox, J., Rittger, A., and Saftig, P. (2012a). Physiological functions of the amyloid precursor protein secretases ADAM10, BACE1, and presenilin. *Exp Brain Res* 217, 331–341.

- Prox, J., Willenbrock, M., Weber, S., Lehmann, T., Schmidt-Arras, D., Schwanbeck, R., Saftig, P., and Schwake, M. (2012b). Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 2919–2932.
- Prox, J., Bernreuther, C., Altmeppen, H., Grendel, J., Glatzel, M., D’Hooge, R., Stroobants, S., Ahmed, T., Balschun, D., Willem, M., et al. (2013). Postnatal disruption of the disintegrin/metalloproteinase ADAM10 in brain causes epileptic seizures, learning deficits, altered spine morphology, and defective synaptic functions. *J. Neurosci.* *33*, 12915–12928, 12928a.
- Pruessmeyer, J., and Ludwig, A. (2009). The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* *20*, 164–174.
- Puca, L., and Brou, C. (2014). A-arrestins - new players in Notch and GPCR signaling pathways in mammals. *J. Cell. Sci.* *127*, 1359–1367.
- Puca, L., Chastagner, P., Meas-Yedid, V., Israël, A., and Brou, C. (2013). A-arrestin 1 (ARRDC1) and  $\beta$ -arrestins cooperate to mediate Notch degradation in mammals. *J. Cell. Sci.* *126*, 4457–4468.
- Puklin-Faucher, E., and Sheetz, M.P. (2009). The mechanical integrin cycle. *J. Cell. Sci.* *122*, 179–186.
- Quade-Lyssy, P., Kanarek, A.M., Baiersdörfer, M., Postina, R., and Kojro, E. (2013). Statins stimulate the production of a soluble form of the receptor for advanced glycation end products. *J. Lipid Res.* *54*, 3052–3061.
- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P., and Simons, K. (2006). Alzheimer’s disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 11172–11177.
- Rajesh, S., Sridhar, P., Tews, B.A., Fénéant, L., Cocquerel, L., Ward, D.G., Berditchevski, F., and Overduin, M. (2012). Structural basis of ligand interactions of the large extracellular domain of tetraspanin CD81. *J. Virol.* *86*, 9606–9616.
- Rana, N.A., and Haltiwanger, R.S. (2011). Fringe benefits: functional and structural impacts of O-glycosylation on the extracellular domain of Notch receptors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *21*, 583–589.
- Rand, M.D., Grimm, L.M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S.C., Sklar, J., and Aster, J.C. (2000). Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1825–1835.
- Ranganathan, P., Vasquez-Del Carpio, R., Kaplan, F.M., Wang, H., Gupta, A., VanWye, J.D., and Capobianco, A.J. (2011a). Hierarchical phosphorylation within the ankyrin repeat domain defines a phosphoregulatory loop that regulates Notch transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* *286*, 28844–28857.
- Ranganathan, P., Weaver, K.L., and Capobianco, A.J. (2011b). Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 338–351.
- Ranjan, A., Bane, S.M., and Kalraiya, R.D. (2014). Glycosylation of the laminin receptor ( $\alpha 3\beta 1$ ) regulates its association with tetraspanin CD151: Impact on cell spreading, motility, degradation and invasion of basement membrane by tumor cells. *Exp. Cell Res.* *322*, 249–264.
- Rao, M., and Mayor, S. (2014). Active organization of membrane constituents in living cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *29*, 126–132.
- Rapti, M., Atkinson, S.J., Lee, M.-H., Trim, A., Moss, M., and Murphy, G. (2008). The isolated N-terminal domains of TIMP-1 and TIMP-3 are insufficient for ADAM10 inhibition. *Biochem. J.* *411*, 433–439.

- Rauci, A., Cugusi, S., Antonelli, A., Barabino, S.M., Monti, L., Bierhaus, A., Reiss, K., Saftig, P., and Bianchi, M.E. (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 J.* 22, 3716–3727.
- Rebay, I., Fleming, R.J., Fehon, R.G., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67, 687–699.
- Rebay, I., Fehon, R.G., and Artavanis-Tsakonas, S. (1993a). Specific truncations of *Drosophila* Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* 74, 319–329.
- Rebay, I., Fortini, M.E., and Artavanis-Tsakonas, S. (1993b). Analysis of phenotypic abnormalities and cell fate changes caused by dominant activated and dominant negative forms of the Notch receptor in *Drosophila* development. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie* 316, 1097–1123.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21, 267–271.
- Reinhardt, S., Schuck, F., Grösgen, S., Riemenschneider, M., Hartmann, T., Postina, R., Grimm, M., and Endres, K. (2014). Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 28, 978–997.
- Reiss, K., and Saftig, P. (2009). The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 126–137.
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J.* 24, 742–752.
- Reiss, K., Maretzky, T., Haas, I.G., Schulte, M., Ludwig, A., Frank, M., and Saftig, P. (2006). Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 281, 21735–21744.
- Richardson, M.M., Jennings, L.K., and Zhang, X.A. (2011). Tetraspanins and tumor progression. *Clin. Exp. Metastasis* 28, 261–270.
- Risco-Castillo, V., Topçu, S., Son, O., Briquet, S., Manzoni, G., and Silvie, O. (2014). CD81 is required for rhoptry discharge during host cell invasion by *Plasmodium yoelii* sporozoites. *Cell. Microbiol.*
- Rivas, G., Vogel, S.K., and Schwille, P. (2014). Reconstitution of cytoskeletal protein assemblies for large-scale membrane transformation. *Curr Opin Chem Biol* 22C, 18–26.
- Rivera, S., Khrestchatisky, M., Kaczmarek, L., Rosenberg, G.A., and Jaworski, D.M. (2010). Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? *J. Neurosci.* 30, 15337–15357.
- Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D., Wychowski, C., Helle, F., Pillez, A., Drobecq, H., Le Naour, F., Charrin, S., Levy, S., et al. (2008). The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* 3, e1866.
- Rocha-Perugini, V., Zamai, M., González-Granado, J.M., Barreiro, O., Tejera, E., Yañez-Mó, M., Caiolfa, V.R., and Sanchez-Madrid, F. (2013). CD81 controls sustained T cell activation signaling and defines the maturation stages of cognate immunological synapses. *Mol. Cell. Biol.* 33, 3644–3658.
- Rocks, N., Paulissen, G., El Hour, M., Quesada, F., Crahay, C., Gueders, M., Foidart, J.M., Noel, A., and Cataldo, D. (2008). Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. *Biochimie* 90, 369–379.

- Roduit, C., van der Goot, F.G., De Los Rios, P., Yersin, A., Steiner, P., Dietler, G., Catsicas, S., Lafont, F., and Kasas, S. (2008). Elastic membrane heterogeneity of living cells revealed by stiff nanoscale membrane domains. *Biophys. J.* *94*, 1521–1532.
- Roghani, M., Becherer, J.D., Moss, M.L., Atherton, R.E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R.K., Weskamp, G., Tempst, P., and Blobel, C.P. (1999). Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* *274*, 3531–3540.
- Romanska, H.M., and Berditchevski, F. (2011). Tetraspanins in human epithelial malignancies. *J. Pathol.* *223*, 4–14.
- Ronchini, C., and Capobianco, A.J. (2001). Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol. Cell. Biol.* *21*, 5925–5934.
- Rooke, J., Pan, D., Xu, T., and Rubin, G.M. (1996). KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science* *273*, 1227–1231.
- Rose, A.A.N., Annis, M.G., Dong, Z., Pepin, F., Hallett, M., Park, M., and Siegel, P.M. (2010). ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/Osteoactivin extracellular domain with angiogenic properties. *PLoS ONE* *5*, e12093.
- Rose-John, S. (2013). ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets. *Pharmacol. Res.* *71*, 19–22.
- Rosendahl, M.S., Ko, S.C., Long, D.L., Brewer, M.T., Rosenzweig, B., Hedl, E., Anderson, L., Pyle, S.M., Moreland, J., Meyers, M.A., et al. (1997). Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor- $\alpha$ -processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J. Biol. Chem.* *272*, 24588–24593.
- Rubinstein, E. (2011). The complexity of tetraspanins. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 501–505.
- Rubinstein, E., Le Naour, F., Billard, M., Prenant, M., and Boucheix, C. (1994). CD9 antigen is an accessory subunit of the VLA integrin complexes. *Eur. J. Immunol.* *24*, 3005–3013.
- Rubinstein, E., Le Naour, F., Lagaudrière-Gesbert, C., Billard, M., Conjeaud, H., and Boucheix, C. (1996). CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur. J. Immunol.* *26*, 2657–2665.
- Rubinstein, E., Ziyat, A., Prenant, M., Wrobel, E., Wolf, J.-P., Levy, S., Le Naour, F., and Boucheix, C. (2006a). Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Dev. Biol.* *290*, 351–358.
- Rubinstein, E., Ziyat, A., Wolf, J.-P., Le Naour, F., and Boucheix, C. (2006b). The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Semin. Cell Dev. Biol.* *17*, 254–263.
- Runge, K.E., Evans, J.E., He, Z.-Y., Gupta, S., McDonald, K.L., Stahlberg, H., Primakoff, P., and Myles, D.G. (2007). Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev. Biol.* *304*, 317–325.
- Rzymiski, T., Petry, A., Kračun, D., Rieß, F., Pike, L., Harris, A.L., and Görlach, A. (2012). The unfolded protein response controls induction and activation of ADAM17/TACE by severe hypoxia and ER stress. *Oncogene* *31*, 3621–3634.
- Sachs, N., Kreft, M., van den Bergh Weerman, M.A., Beynon, A.J., Peters, T.A., Weening, J.J., and Sonnenberg, A. (2006). Kidney failure in mice lacking the tetraspanin CD151. *J. Cell Biol.* *175*, 33–39.
- Sachs, N., Claessen, N., Aten, J., Kreft, M., Teske, G.J.D., Koeman, A., Zuurbier, C.J., Janssen, H., and Sonnenberg, A. (2012). Blood pressure influences end-stage renal disease of Cd151 knockout mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 348–358.

- Sachs, N., Secades, P., van Hulst, L., Song, J.-Y., and Sonnenberg, A. (2014). Reduced susceptibility to two-stage skin carcinogenesis in mice with epidermis-specific deletion of CD151. *J. Invest. Dermatol.* *134*, 221–228.
- Sadej, R., Romanska, H., Baldwin, G., Gkirtzimanaki, K., Novitskaya, V., Filer, A.D., Krcova, Z., Kusinska, R., Ehrmann, J., Buckley, C.D., et al. (2009). CD151 regulates tumorigenesis by modulating the communication between tumor cells and endothelium. *Mol. Cancer Res.* *7*, 787–798.
- Saftig, P., and Reiss, K. (2011). The “A Disintegrin And Metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur. J. Cell Biol.* *90*, 527–535.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.-M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* *164*, 769–779.
- Sakata, T., Sakaguchi, H., Tsuda, L., Higashitani, A., Aigaki, T., Matsuno, K., and Hayashi, S. (2004). *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation. *Curr. Biol.* *14*, 2228–2236.
- Sala-Valdés, M., Ursa, A., Charrin, S., Rubinstein, E., Hemler, M.E., Sánchez-Madrid, F., and Yáñez-Mó, M. (2006). EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J. Biol. Chem.* *281*, 19665–19675.
- Sala-Valdés, M., Ailane, N., Greco, C., Rubinstein, E., and Boucheix, C. (2012). Targeting tetraspanins in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* *16*, 985–997.
- Sanchez-Irizarry, C., Carpenter, A.C., Weng, A.P., Pear, W.S., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2004). Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Mol. Cell Biol.* *24*, 9265–9273.
- Sanderson, M.P., Erickson, S.N., Gough, P.J., Garton, K.J., Wille, P.T., Raines, E.W., Dunbar, A.J., and Dempsey, P.J. (2005). ADAM10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *J. Biol. Chem.* *280*, 1826–1837.
- Sansom, M.S., and Weinstein, H. (2000). Hinges, swivels and switches: the role of prolines in signalling via transmembrane alpha-helices. *Trends Pharmacol. Sci.* *21*, 445–451.
- Sarmiento, L.M., Huang, H., Limon, A., Gordon, W., Fernandes, J., Tavares, M.J., Miele, L., Cardoso, A.A., Classon, M., and Carlesso, N. (2005). Notch1 modulates timing of G1-S progression by inducing SKP2 transcription and p27 Kip1 degradation. *J. Exp. Med.* *202*, 157–168.
- Sasamura, T., Ishikawa, H.O., Sasaki, N., Higashi, S., Kanai, M., Nakao, S., Ayukawa, T., Aigaki, T., Noda, K., Miyoshi, E., et al. (2007). The O-fucosyltransferase O-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in *Drosophila*. *Development* *134*, 1347–1356.
- Sato, T., Diehl, T.S., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., De Strooper, B., Steiner, H., Haass, C., and Wolfe, M.S. (2007). Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J. Biol. Chem.* *282*, 33985–33993.
- Saxton, M.J. (1989). Lateral diffusion in an archipelago. Distance dependence of the diffusion coefficient. *Biophys. J.* *56*, 615–622.
- Scheffer, K.D., Gawlitza, A., Spoden, G.A., Zhang, X.A., Lambert, C., Berditchevski, F., and Florin, L. (2013). Tetraspanin CD151 mediates papillomavirus type 16 endocytosis. *J. Virol.* *87*, 3435–3446.
- Scheffer, K.D., Berditchevski, F., and Florin, L. (2014). The tetraspanin CD151 in papillomavirus infection. *Viruses* *6*, 893–908.

- Schelter, F., Kobuch, J., Moss, M.L., Becherer, J.D., Comoglio, P.M., Boccaccio, C., and Krüger, A. (2010). A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *J. Biol. Chem.* 285, 26335–26340.
- Schelter, F., Grandl, M., Seubert, B., Schaten, S., Hauser, S., Gerg, M., Boccaccio, C., Comoglio, P., and Krüger, A. (2011). Tumor cell-derived Timp-1 is necessary for maintaining metastasis-promoting Met-signaling via inhibition of Adam-10. *Clin. Exp. Metastasis* 28, 793–802.
- Schiffmacher, A.T., Padmanabhan, R., Jhingory, S., and Taneyhill, L.A. (2014). Cadherin-6B is proteolytically processed during epithelial-to-mesenchymal transitions of the cranial neural crest. *Mol. Biol. Cell* 25, 41–54.
- Schlöndorff, J., Becherer, J.D., and Blobel, C.P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem. J.* 347 Pt 1, 131–138.
- Schmidt, C., Künemund, V., Wintergerst, E.S., Schmitz, B., and Schachner, M. (1996). CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J. Neurosci. Res.* 43, 12–31.
- Schröder, J., Lüllmann-Rauch, R., Himmerkus, N., Pleines, I., Nieswandt, B., Orinska, Z., Koch-Nolte, F., Schröder, B., Bleich, M., and Saftig, P. (2009). Deficiency of the tetraspanin CD63 associated with kidney pathology but normal lysosomal function. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1083–1094.
- Schroeder, R., London, E., and Brown, D. (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 12130–12134.
- Schulte, M., Reiss, K., Lettau, M., Maretzky, T., Ludwig, A., Hartmann, D., de Strooper, B., Janssen, O., and Saftig, P. (2007). ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ.* 14, 1040–1049.
- Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., Ludwig, A., Blobel, C.P., Saftig, P., and Reiss, K. (2008). ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ. Res.* 102, 1192–1201.
- Schweigert, O., Dewitz, C., Möller-Hackbarth, K., Trad, A., Garbers, C., Rose-John, S., and Scheller, J. (2014). Soluble T cell immunoglobulin and mucin domain (TIM)-1 and -4 generated by A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM)-10 and -17 bind to phosphatidylserine. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 275–287.
- Schweisguth, F., and Posakony, J.W. (1994). Antagonistic activities of Suppressor of Hairless and Hairless control alternative cell fates in the Drosophila adult epidermis. *Development* 120, 1433–1441.
- Seals, D.F., and Courtneidge, S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17, 7–30.
- Seehafer, J.G., Slupsky, J.R., Tang, S.C., and Shaw, A.R. (1988a). The functional cell surface glycoprotein CD9 is distinguished by being the major fatty acid acylated and a major iodinated cell-surface component of the human platelet. *Biochim. Biophys. Acta* 952, 92–100.
- Seehafer, J.G., Tang, S.C., Slupsky, J.R., and Shaw, A.R. (1988b). The functional glycoprotein CD9 is variably acylated: localization of the variably acylated region to a membrane-associated peptide containing the binding site for the agonistic monoclonal antibody 50H.19. *Biochim. Biophys. Acta* 957, 399–410.
- Seigneuret, M. (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. *Biophys. J.* 90, 212–227.

- Sengupta, P., Jovanovic-Taliman, T., Skoko, D., Renz, M., Veatch, S.L., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis. *Nat. Methods* 8, 969–975.
- Sens, P., Johannes, L., and Bassereau, P. (2008). Biophysical approaches to protein-induced membrane deformations in trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 476–482.
- Serru, V., Le Naour, F., Billard, M., Azorsa, D.O., Lanza, F., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (1999). Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem. J.* 340 ( Pt 1), 103–111.
- Serru, V., Dessen, P., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2000). Sequence and expression of seven new tetraspans. *Biochim. Biophys. Acta* 1478, 159–163.
- Seugnet, L., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev. Biol.* 192, 585–598.
- Sheetz, M.P., Schindler, M., and Koppel, D.E. (1980). Lateral mobility of integral membrane proteins is increased in spherocytic erythrocytes. *Nature* 285, 510–511.
- Shenoy-Scaria, A.M., Dietzen, D.J., Kwong, J., Link, D.C., and Lublin, D.M. (1994). Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae. *J. Cell Biol.* 126, 353–363.
- Shergill, B., Meloty-Kapella, L., Musse, A.A., Weinmaster, G., and Botvinick, E. (2012). Optical tweezers studies on Notch: single-molecule interaction strength is independent of ligand endocytosis. *Dev. Cell* 22, 1313–1320.
- Shevchenko, A., and Simons, K. (2010). Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 593–598.
- Shi, W., Fan, H., Shum, L., and Derynck, R. (2000). The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF-alpha and regulates TGF-alpha-induced EGF receptor activation and cell proliferation. *J. Cell Biol.* 148, 591–602.
- Shibagaki, N., Hanada, K. i, Yamashita, H., Shimada, S., and Hamada, H. (1999). Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA-1 / ICAM-1-mediated cell-cell adhesion: functional association between CD82 and LFA-1 in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 29, 4081–4091.
- Shiomi, T., Inoki, I., Kataoka, F., Ohtsuka, T., Hashimoto, G., Nemori, R., and Okada, Y. (2005). Pericellular activation of proMMP-7 (promatrilysin-1) through interaction with CD151. *Lab. Invest.* 85, 1489–1506.
- Shirakabe, K., Wakatsuki, S., Kurisaki, T., and Fujisawa-Sehara, A. (2001). Roles of Meltrin beta /ADAM19 in the processing of neuregulin. *J. Biol. Chem.* 276, 9352–9358.
- Shoham, T., Rajapaksa, R., Boucheix, C., Rubinstein, E., Poe, J.C., Tedder, T.F., and Levy, S. (2003). The tetraspanin CD81 regulates the expression of CD19 during B cell development in a postendoplasmic reticulum compartment. *J. Immunol.* 171, 4062–4072.
- Sicinska, E., Aifantis, I., Le Cam, L., Swat, W., Borowski, C., Yu, Q., Ferrando, A.A., Levin, S.D., Geng, Y., von Boehmer, H., et al. (2003). Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell* 4, 451–461.
- Silvie, O., Rubinstein, E., Franetich, J.-F., Prenant, M., Belnoue, E., Rénia, L., Hannoun, L., Eling, W., Levy, S., Boucheix, C., et al. (2003). Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat. Med.* 9, 93–96.
- Silvie, O., Charrin, S., Billard, M., Franetich, J.-F., Clark, K.L., van Gemert, G.-J., Sauerwein, R.W.,

- Dautry, F., Boucheix, C., Mazier, D., et al. (2006). Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites. *J. Cell. Sci.* *119*, 1992–2002.
- Simons, K., and Gerl, M.J. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 688–699.
- Simons, K., and van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* *27*, 6197–6202.
- Simons, K., and Sampaio, J.L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*, a004697.
- Simons, K., and Vaz, W.L.C. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *33*, 269–295.
- Sincock, P.M., Fitter, S., Parton, R.G., Berndt, M.C., Gamble, J.R., and 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. *J. Cell. Sci.* *112* ( Pt 6), 833–844.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* *175*, 720–731.
- Six, E.M., Ndiaye, D., Sauer, G., Laâbi, Y., Athman, R., Cumano, A., Brou, C., Israël, A., and Logeat, F. (2004). The notch ligand Delta1 recruits Dlg1 at cell-cell contacts and regulates cell migration. *J. Biol. Chem.* *279*, 55818–55826.
- Skovronsky, D.M., Moore, D.B., Milla, M.E., Doms, R.W., and 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. *J. Biol. Chem.* *275*, 2568–2575.
- Skubitz, K.M., Campbell, K.D., Iida, J., and Skubitz, A.P. (1996). CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils. *J. Immunol.* *157*, 3617–3626.
- Slack, B.E., Ma, L.K., and Seah, C.C. (2001). Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem. J.* *357*, 787–794.
- Slepnev, V.I., and De Camilli, P. (2000). Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat. Rev. Neurosci.* *1*, 161–172.
- Slupsky, J.R., Seehafer, J.G., Tang, S.C., Masellis-Smith, A., and Shaw, A.R. (1989). Evidence that monoclonal antibodies against CD9 antigen induce specific association between CD9 and the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* *264*, 12289–12293.
- Slupsky, J.R., Cawley, J.C., Kaplan, C., and Zuzel, M. (1997a). Analysis of CD9, CD32 and p67 signalling: use of degranulated platelets indicates direct involvement of CD9 and p67 in integrin activation. *Br. J. Haematol.* *96*, 275–286.
- Slupsky, J.R., Kamiguti, A.S., Rhodes, N.P., Cawley, J.C., Shaw, A.R., and Zuzel, M. (1997b). The platelet antigens CD9, CD42 and integrin alpha IIb beta IIIa can be topographically associated and transduce functionally similar signals. *Eur. J. Biochem.* *244*, 168–175.
- Smith, K.M., Gaultier, A., Cousin, H., Alfandari, D., White, J.M., and DeSimone, D.W. (2002). The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *J. Cell Biol.* *159*, 893–902.
- Solanas, G., Cortina, C., Sevillano, M., and Batlle, E. (2011). Cleavage of E-cadherin by ADAM10 mediates epithelial cell sorting downstream of EphB signalling. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1100–1107.

- Spevacek, A.R., Evans, E.G.B., Miller, J.L., Meyer, H.C., Pelton, J.G., and Millhauser, G.L. (2013). Zinc drives a tertiary fold in the prion protein with familial disease mutation sites at the interface. *Structure* 21, 236–246.
- Van Spriel, A.B. (2011). Tetraspanins in the humoral immune response. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 512–517.
- Van Spriel, A.B., Puls, K.L., Sofi, M., Pouniotis, D., Hochrein, H., Orinska, Z., Knobloch, K.-P., Plebanski, M., and Wright, M.D. (2004). A regulatory role for CD37 in T cell proliferation. *J. Immunol.* 172, 2953–2961.
- Van Spriel, A.B., de Keijzer, S., van der Schaaf, A., Gartlan, K.H., Sofi, M., Light, A., Linssen, P.C., Boezeman, J.B., Zuidschewoude, M., Reinieren-Beeren, I., et al. (2012). The tetraspanin CD37 orchestrates the  $\alpha(4)\beta(1)$  integrin-Akt signaling axis and supports long-lived plasma cell survival. *Sci Signal* 5, ra82.
- Springer, T.A., and Dustin, M.L. (2012). Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 107–115.
- Sprinzak, D., Lakhanpal, A., Lebon, L., Santat, L.A., Fontes, M.E., Anderson, G.A., Garcia-Ojalvo, J., and Elowitz, M.B. (2010). Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature* 465, 86–90.
- Sridhar, S.C., and Miranti, C.K. (2006). Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases. *Oncogene* 25, 2367–2378.
- Stanley, P., and Okajima, T. (2010). Roles of glycosylation in Notch signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92, 131–164.
- Staubach, S., and Hanisch, F.-G. (2011). Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert Rev Proteomics* 8, 263–277.
- Stephenson, N.L., and Avis, J.M. (2012). Direct observation of proteolytic cleavage at the S2 site upon forced unfolding of the Notch negative regulatory region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E2757–E2765.
- Sterk, L.M., Geuijen, C.A., Oomen, L.C., Calafat, J., Janssen, H., and Sonnenberg, A. (2000). The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin  $\alpha6\beta4$  and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J. Cell Biol.* 149, 969–982.
- Sterk, L.M.T., Geuijen, C.A.W., van den Berg, J.G., Claessen, N., Weening, J.J., and Sonnenberg, A. (2002). Association of the tetraspanin CD151 with the laminin-binding integrins  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha6\beta1$ ,  $\alpha6\beta4$  and  $\alpha7\beta1$  in cells in culture and in vivo. *J. Cell. Sci.* 115, 1161–1173.
- Steuble, M., Diep, T.-M., Schätzle, P., Ludwig, A., Tagaya, M., Kunz, B., and Sonderegger, P. (2012). Calsyntenin-1 shelters APP from proteolytic processing during anterograde axonal transport. *Biol Open* 1, 761–774.
- Stipp, C.S. (2010). Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential antimetastatic targets. *Expert Rev Mol Med* 12, e3.
- Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V., and Hemler, M.E. (2001a). EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J. Biol. Chem.* 276, 40545–40554.
- Stipp, C.S., Orlicky, D., and Hemler, M.E. (2001b). FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific CD81- and CD9-associated protein. *J. Biol. Chem.* 276, 4853–4862.
- Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V., and Hemler, M.E. (2003). Functional domains in tetraspanin proteins.

Trends Biochem. Sci. 28, 106–112.

Stöcker, W., and Bode, W. (1995). Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 383–390.

Struhl, G., and Greenwald, I. (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 522–525.

Sugimoto, M., Cutler, A., Shen, B., Moss, S.E., Iyengar, S.K., Klein, R., Folkman, J., and Anand-Apte, B. (2013). Inhibition of EGF signaling protects the diabetic retina from insulin-induced vascular leakage. *Am. J. Pathol.* 183, 987–995.

Suh, J., Choi, S.H., Romano, D.M., Gannon, M.A., Lesinski, A.N., Kim, D.Y., and Tanzi, R.E. (2013). ADAM10 missense mutations potentiate  $\beta$ -amyloid accumulation by impairing prodomain chaperone function. *Neuron* 80, 385–401.

Sulis, M.L., Saftig, P., and Ferrando, A.A. (2011). Redundancy and specificity of the metalloprotease system mediating oncogenic NOTCH1 activation in T-ALL. *Leukemia* 25, 1564–1569.

Sun, T.-T. (2006). Altered phenotype of cultured urothelial and other stratified epithelial cells: implications for wound healing. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291, F9–F21.

Sundberg, C., Thodeti, C.K., Kveiborg, M., Larsson, C., Parker, P., Albrechtsen, R., and Wewer, U.M. (2004). Regulation of ADAM12 cell-surface expression by protein kinase C epsilon. *J. Biol. Chem.* 279, 51601–51611.

Suzuki, K., Hayashi, Y., Nakahara, S., Kumazaki, H., Prox, J., Horiuchi, K., Zeng, M., Tanimura, S., Nishiyama, Y., Osawa, S., et al. (2012). Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron* 76, 410–422.

Swaminathan, G., Rossi, F., Sierra, L.-J., Gupta, A., Navas-Martín, S., and Martín-García, J. (2012). A role for microRNA-155 modulation in the anti-HIV-1 effects of Toll-like receptor 3 stimulation in macrophages. *PLoS Pathog.* 8, e1002937.

Szöllösi, J., Horejsí, V., Bene, L., Angelisová, P., and Damjanovich, S. (1996). Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J. Immunol.* 157, 2939–2946.

Tachibana, I., Bodorova, J., Berditchevski, F., Zutter, M.M., and Hemler, M.E. (1997). NAG-2, a novel transmembrane-4 superfamily (TM4SF) protein that complexes with integrins and other TM4SF proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 29181–29189.

Takahashi, M., Sugiura, T., Abe, M., Ishii, K., and Shirasuna, K. (2007). Regulation of c-Met signaling by the tetraspanin KAI-1/CD82 affects cancer cell migration. *Int. J. Cancer* 121, 1919–1929.

Takahashi, S., Doss, C., Levy, S., and Levy, R. (1990). TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, is associated on the cell surface with the Leu-13 antigen. *J. Immunol.* 145, 2207–2213.

Takebe, N., Nguyen, D., and Yang, S.X. (2014). Targeting notch signaling pathway in cancer: clinical development advances and challenges. *Pharmacol. Ther.* 141, 140–149.

Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., and Araki, S. (2006). Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J.* 25, 2388–2396.

Takeda, S., Takeya, H., and Iwanaga, S. (2012). Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 164–176.

Takeda, Y., Tachibana, I., Miyado, K., Kobayashi, M., Miyazaki, T., Funakoshi, T., Kimura, H.,

- Yamane, H., Saito, Y., Goto, H., et al. (2003). Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *J. Cell Biol.* *161*, 945–956.
- Takeda, Y., Kazarov, A.R., Butterfield, C.E., Hopkins, B.D., Benjamin, L.E., Kaipainen, A., and Hemler, M.E. (2007). Deletion of tetraspanin Cd151 results in decreased pathologic angiogenesis in vivo and in vitro. *Blood* *109*, 1524–1532.
- Takeda, Y., He, P., Tachibana, I., Zhou, B., Miyado, K., Kaneko, H., Suzuki, M., Minami, S., Iwasaki, T., Goya, S., et al. (2008). Double deficiency of tetraspanins CD9 and CD81 alters cell motility and protease production of macrophages and causes chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in mice. *J. Biol. Chem.* *283*, 26089–26097.
- Tallant, C., García-Castellanos, R., Baumann, U., and Gomis-Rüth, F.X. (2010). On the relevance of the Met-turn methionine in metzincins. *J. Biol. Chem.* *285*, 13951–13957.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., and Honjo, T. (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr. Biol.* *5*, 1416–1423.
- Tanigaki, K., and Honjo, T. (2010). Two opposing roles of RBP-J in Notch signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* *92*, 231–252.
- Tarrant, J.M., Groom, J., Metcalf, D., Li, R., Borobokas, B., Wright, M.D., Tarlinton, D., and Robb, L. (2002). The absence of Tssc6, a member of the tetraspanin superfamily, does not affect lymphoid development but enhances in vitro T-cell proliferative responses. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 5006–5018.
- Tarrant, J.M., Robb, L., van Spriël, A.B., and Wright, M.D. (2003). Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface. *Trends Immunol.* *24*, 610–617.
- Tax, F.E., Thomas, J.H., Ferguson, E.L., and Horvitz, H.R. (1997). Identification and characterization of genes that interact with lin-12 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *147*, 1675–1695.
- Taylor, S.R., Markesbery, M.G., and Harding, P.A. (2014). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) and proteolytic processing by a disintegrin and metalloproteinases (ADAM): A regulator of several pathways. *Semin. Cell Dev. Biol.* *28C*, 22–30.
- Tejera, E., Rocha-Perugini, V., López-Martín, S., Pérez-Hernández, D., Bachir, A.I., Horwitz, A.R., Vázquez, J., Sánchez-Madrid, F., and Yáñez-Mo, M. (2013). CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase. *Mol. Biol. Cell* *24*, 261–273.
- Termini, C.M., Cotter, M.L., Marjon, K.D., Buranda, T., Lidke, K.A., and Gillette, J.M. (2014). The membrane scaffold CD82 regulates cell adhesion by altering  $\alpha 4$  integrin stability and molecular density. *Mol. Biol. Cell* *25*, 1560–1573.
- Van Tetering, G., van Diest, P., Verlaan, I., van der Wall, E., Kopan, R., and Vooijs, M. (2009). Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. *J. Biol. Chem.* *284*, 31018–31027.
- Thathiah, A., and De Strooper, B. (2011). The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 73–87.
- Tian, S., Huajun, W., and Wu, J. (2012). Computational prediction of furin cleavage sites by a hybrid method and understanding mechanism underlying diseases. *Sci Rep* *2*, 261.
- Tien, A.-C., Rajan, A., and Bellen, H.J. (2009). A Notch updated. *J. Cell Biol.* *184*, 621–629.
- Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K., and Fahrenholz, F. (2009). Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J.* *23*, 1643–1654.
- Tiyanont, K., Wales, T.E., Aste-Amezaga, M., Aster, J.C., Engen, J.R., and Blacklow, S.C. (2011).

- Evidence for increased exposure of the Notch1 metalloprotease cleavage site upon conversion to an activated conformation. *Structure* 19, 546–554.
- Tiyanont, K., Wales, T.E., Siebel, C.W., Engen, J.R., and Blacklow, S.C. (2013). Insights into Notch3 activation and inhibition mediated by antibodies directed against its negative regulatory region. *J. Mol. Biol.* 425, 3192–3204.
- Todeschini, A.R., Dos Santos, J.N., Handa, K., and Hakomori, S. (2007). Ganglioside GM2-tetraspanin CD82 complex inhibits met and its cross-talk with integrins, providing a basis for control of cell motility through glycosynapse. *J. Biol. Chem.* 282, 8123–8133.
- Todres, E., Nardi, J.B., and Robertson, H.M. (2000). The tetraspanin superfamily in insects. *Insect Mol. Biol.* 9, 581–590.
- Tohami, T., Drucker, L., Radnay, J., Shapira, H., and Lishner, M. (2004). Expression of tetraspanins in peripheral blood leukocytes: a comparison between normal and infectious conditions. *Tissue Antigens* 64, 235–242.
- Tominaga, N., Hagiwara, K., Kosaka, N., Honma, K., Nakagama, H., and Ochiya, T. (2014). RPN2-mediated glycosylation of tetraspanin CD63 regulates breast cancer cell malignancy. *Mol. Cancer* 13, 134.
- Toomre, D., and Bewersdorf, J. (2010). A new wave of cellular imaging. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 285–314.
- Tousseyn, T., Thathiah, A., Jorissen, E., Raemaekers, T., Konietzko, U., Reiss, K., Maes, E., Snellinx, A., Serneels, L., Nyabi, O., et al. (2009). ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* 284, 11738–11747.
- Toyo-oka, K., Yashiro-Ohtani, Y., Park, C.S., Tai, X.G., Miyake, K., Hamaoka, T., and Fujiwara, H. (1999). Association of a tetraspanin CD9 with CD5 on the T cell surface: role of particular transmembrane domains in the association. *Int. Immunol.* 11, 2043–2052.
- Troost, T., Jaeckel, S., Ohlenhard, N., and Klein, T. (2012). The tumour suppressor Lethal (2) giant discs is required for the function of the ESCRT-III component Shrub/CHMP4. *J. Cell. Sci.* 125, 763–776.
- Tsai, Y.C., and Weissman, A.M. (2011). Dissecting the diverse functions of the metastasis suppressor CD82/KAI1. *FEBS Lett.* 585, 3166–3173.
- Tsai, Y.C., Mendoza, A., Mariano, J.M., Zhou, M., Kostova, Z., Chen, B., Veenstra, T., Hewitt, S.M., Helman, L.J., Khanna, C., et al. (2007). The ubiquitin ligase gp78 promotes sarcoma metastasis by targeting KAI1 for degradation. *Nat. Med.* 13, 1504–1509.
- Tsitsikov, E.N., Gutierrez-Ramos, J.C., and Geha, R.S. (1997). Impaired CD19 expression and signaling, enhanced antibody response to type II T independent antigen and reduction of B-1 cells in CD81-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 10844–10849.
- Turk, B.E., Huang, L.L., Piro, E.T., and Cantley, L.C. (2001). Determination of protease cleavage site motifs using mixture-based oriented peptide libraries. *Nat. Biotechnol.* 19, 661–667.
- Vaccari, T., Lu, H., Kanwar, R., Fortini, M.E., and Bilder, D. (2008). Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* 180, 755–762.
- Vaccari, T., Rusten, T.E., Menut, L., Nezis, I.P., Brech, A., Stenmark, H., and Bilder, D. (2009). Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants. *J. Cell. Sci.* 122, 2413–2423.

- Vardar, D., North, C.L., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2003). Nuclear magnetic resonance structure of a prototype Lin12-Notch repeat module from human Notch1. *Biochemistry* *42*, 7061–7067.
- Vassar, R. (2013). ADAM10 prodomain mutations cause late-onset Alzheimer's disease: not just the latest FAD. *Neuron* *80*, 250–253.
- Veenbergen, S., and van Sriel, A.B. (2011). Tetraspanins in the immune response against cancer. *Immunol. Lett.* *138*, 129–136.
- Velásquez, S.Y., García, L.F., Opelz, G., Alvarez, C.M., and Süsal, C. (2013). Release of soluble CD30 after allogeneic stimulation is mediated by memory T cells and regulated by IFN- $\gamma$  and IL-2. *Transplantation* *96*, 154–161.
- Vereb, G., Szöllosi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Mátyus, L., Waldmann, T.A., and Damjanovich, S. (2003). Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 8053–8058.
- Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., De Strooper, B., Grassi, J., Lopez-Perez, E., and Checler, F. (2001). The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* *276*, 37743–37746.
- Vingtdeux, V., and Marambaud, P. (2012). Identification and biology of  $\alpha$ -secretase. *J. Neurochem.* *120 Suppl 1*, 34–45.
- Vogel, S.K., Petrasek, Z., Heinemann, F., and Schwille, P. (2013). Myosin motors fragment and compact membrane-bound actin filaments. *Elife* *2*, e00116.
- Wack, A., Soldaini, E., Tseng, C., Nuti, S., Klimpel, G., and Abrignani, S. (2001). Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. *Eur. J. Immunol.* *31*, 166–175.
- Wakabayashi, T., Craessaerts, K., Bammens, L., Bentahir, M., Borgions, F., Herdewijn, P., Staes, A., Timmerman, E., Vandekerckhove, J., Rubinstein, E., et al. (2009). Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1340–1346.
- Wallberg, A.E., Pedersen, K., Lendahl, U., and Roeder, R.G. (2002). p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7812–7819.
- Wang, M.M. (2011). Notch signaling and Notch signaling modifiers. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 1550–1562.
- Wang, W., and Struhl, G. (2004). Drosophila Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* *131*, 5367–5380.
- Wang, W., and Struhl, G. (2005). Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in Drosophila. *Development* *132*, 2883–2894.
- Wang, F., Vandepoele, K., and Van Lijsebettens, M. (2012). Tetraspanin genes in plants. *Plant Sci.* *190*, 9–15.
- Wang, H.-X., Li, Q., Sharma, C., Knoblich, K., and Hemler, M.E. (2011). Tetraspanin protein contributions to cancer. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 547–552.
- Wang, Y., Shao, L., Shi, S., Harris, R.J., Spellman, M.W., Stanley, P., and Haltiwanger, R.S. (2001). Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. *Molecular cloning and expression*

of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 276, 40338–40345.

Weber, S., and Saftig, P. (2012). Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development* 139, 3693–3709.

Weber, S., Niessen, M.T., Prox, J., Lüllmann-Rauch, R., Schmitz, A., Schwanbeck, R., Blobel, C.P., Jorissen, E., de Strooper, B., Niessen, C.M., et al. (2011). The disintegrin/metalloproteinase Adam10 is essential for epidermal integrity and Notch-mediated signaling. *Development* 138, 495–505.

Weber, S., Wetzel, S., Prox, J., Lehmann, T., Schneppenheim, J., Donners, M., and Saftig, P. (2013). Regulation of adult hematopoiesis by the a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 442, 234–241.

Wei, S., Whittaker, C.A., Xu, G., Bridges, L.C., Shah, A., White, J.M., and Desimone, D.W. (2010). Conservation and divergence of ADAM family proteins in the *Xenopus* genome. *BMC Evol. Biol.* 10, 211.

Wen, C., Metzstein, M.M., and Greenwald, I. (1997). SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. *Development* 124, 4759–4767.

Weng, A.P., and Aster, J.C. (2004). Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 48–54.

Weng, A.P., Millholland, J.M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M.L., Lau, A., Wai, C., Del Bianco, C., Rodriguez, C.G., Sai, H., Tobias, J., et al. (2006). c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.* 20, 2096–2109.

Weskamp, G., Ford, J.W., Sturgill, J., Martin, S., Docherty, A.J.P., Swendem an, S., Broadway, N., Hartmann, D., Saftig, P., Umland, S., et al. (2006). ADAM10 is a principal “shedase” of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nat. Immunol.* 7, 1293–1298.

Wild-Bode, C., Fellerer, K., Kugler, J., Haass, C., and Capell, A. (2006). A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration. *J. Biol. Chem.* 281, 23824–23829.

Wilke, G.A., and Bubeck Wardenburg, J. (2010). Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 13473–13478.

Wilkin, M., Tongngok, P., Gensch, N., Clemence, S., Motoki, M., Yamada, K., Hori, K., Taniguchi-Kanai, M., Franklin, E., Matsuno, K., et al. (2008). *Drosophila* HOPS and AP-3 complex genes are required for a Deltex-regulated activation of notch in the endosomal trafficking pathway. *Dev. Cell* 15, 762–772.

Wilkin, M.B., Carbery, A.-M., Fostier, M., Aslam, H., Mazaleyrat, S.L., Higgs, J., Myat, A., Evans, D.A.P., Cornell, M., and Baron, M. (2004). Regulation of notch endosomal sorting and signaling by *Drosophila* Nedd4 family proteins. *Curr. Biol.* 14, 2237–2244.

Willems, S.H., Tape, C.J., Stanley, P.L., Taylor, N.A., Mills, I.G., Neal, D.E., McCafferty, J., and Murphy, G. (2010). Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem. J.* 428, 439–450.

Wodarz, A., and Näthke, I. (2007). Cell polarity in development and cancer. *Nat. Cell Biol.* 9, 1016–1024.

Wojtalewicz, N., Sadeqzadeh, E., Weiß, J.V., Tehrani, M.M., Klein-Scory, S., Hahn, S., Schmiegel, W., Warnken, U., Schnölzer, M., de Bock, C.E., et al. (2014). A soluble form of the giant cadherin Fat1 is released from pancreatic cancer cells by ADAM10 mediated ectodomain shedding. *PLoS ONE*

Wolfsberg, T.G., Primakoff, P., Myles, D.G., and White, J.M. (1995). ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J. Cell Biol.* *131*, 275–278.

Wollert, T., Yang, D., Ren, X., Lee, H.H., Im, Y.J., and Hurley, J.H. (2009). The ESCRT machinery at a glance. *J. Cell. Sci.* *122*, 2163–2166.

Wolpert, F., Tritschler, I., Steinle, A., Weller, M., and Eisele, G. (2014). A disintegrin and metalloproteinases 10 and 17 modulate the immunogenicity of glioblastoma-initiating cells. *Neuro-Oncology* *16*, 382–391.

Wright, M.D., Rochelle, J.M., Tomlinson, M.G., Seldin, M.F., and Williams, A.F. (1993). Gene structure, chromosomal localization, and protein sequence of mouse CD53 (Cd53): evidence that the transmembrane 4 superfamily arose by gene duplication. *Int. Immunol.* *5*, 209–216.

Wright, M.D., Geary, S.M., Fitter, S., Moseley, G.W., Lau, L.-M., Sheng, K.-C., Apostolopoulos, V., Stanley, E.G., Jackson, D.E., and Ashman, L.K. (2004a). Characterization of mice lacking the tetraspanin superfamily member CD151. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 5978–5988.

Wright, M.D., Moseley, G.W., and van Spriell, A.B. (2004b). Tetraspanin microdomains in immune cell signalling and malignant disease. *Tissue Antigens* *64*, 533–542.

Wu, E., Croucher, P.I., and McKie, N. (1997). Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *235*, 437–442.

Wu, L., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S., and Griffin, J.D. (2000). MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat. Genet.* *26*, 484–489.

Wunderlich, F., Kreutz, W., Mahler, P., Ronai, A., and Heppeler, G. (1978). Thermotropic fluid goes to ordered “discontinuous” phase separation in microsomal lipids of *Tetrahymena*. An X-ray diffraction study. *Biochemistry* *17*, 2005–2010.

Xu, A., Haines, N., Dlugosz, M., Rana, N.A., Takeuchi, H., Haltiwanger, R.S., and Irvine, K.D. (2007). In vitro reconstitution of the modulation of *Drosophila* Notch-ligand binding by Fringe. *J. Biol. Chem.* *282*, 35153–35162.

Xu, D., Sharma, C., and Hemler, M.E. (2009). Tetraspanin12 regulates ADAM10-dependent cleavage of amyloid precursor protein. *FASEB J.* *23*, 3674–3681.

Xu, H., Lee, S.-J., Suzuki, E., Dugan, K.D., Stoddard, A., Li, H.-S., Chodosh, L.A., and Montell, C. (2004). A lysosomal tetraspanin associated with retinal degeneration identified via a genome-wide screen. *EMBO J.* *23*, 811–822.

Xu, Q., Liu, X., Chen, W., and Zhang, Z. (2010). Inhibiting adenoid cystic carcinoma cells growth and metastasis by blocking the expression of ADAM 10 using RNA interference. *J Transl Med* *8*, 136.

Yacoub, D., Benslimane, N., Al-Zoobi, L., Hassan, G., Nadiri, A., and Mourad, W. (2013). CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner. *J. Biol. Chem.* *288*, 36083–36093.

Yamada, M., Sumida, Y., Fujibayashi, A., Fukaguchi, K., Sanzen, N., Nishiuchi, R., and Sekiguchi, K. (2008a). The tetraspanin CD151 regulates cell morphology and intracellular signaling on laminin-511. *FEBS J.* *275*, 3335–3351.

Yamada, M., Tamura, Y., Sanzen, N., Sato-Nishiuchi, R., Hasegawa, H., Ashman, L.K., Rubinstein,

- E., Yáñez-Mó, M., Sánchez-Madrid, F., and Sekiguchi, K. (2008b). Probing the interaction of tetraspanin CD151 with integrin alpha 3 beta 1 using a panel of monoclonal antibodies with distinct reactivities toward the CD151-integrin alpha 3 beta 1 complex. *Biochem. J.* *415*, 417–427.
- Yamamoto, S., Charng, W.-L., and Bellen, H.J. (2010). Endocytosis and intracellular trafficking of Notch and its ligands. *Curr. Top. Dev. Biol.* *92*, 165–200.
- Yamazaki, K., Mizui, Y., Sagane, K., and Tanaka, I. (1997a). Assignment of a disintegrin and metalloproteinase domain 10 (Adam10) gene to mouse chromosome 9. *Genomics* *46*, 528–529.
- Yamazaki, K., Mizui, Y., and Tanaka, I. (1997b). Radiation hybrid mapping of human ADAM10 gene to chromosome 15. *Genomics* *45*, 457–459.
- Yan, X., Lin, J., Talabattula, V.A.N., Mußmann, C., Yang, F., Wree, A., Rolfs, A., and Luo, J. (2014). ADAM10 negatively regulates neuronal differentiation during spinal cord development. *PLoS ONE* *9*, e84617.
- Yañez-Mó, M., Barreiro, O., Gonzalo, P., Batista, A., Megías, D., Genís, L., Sachs, N., Sala-Valdés, M., Alonso, M.A., Montoya, M.C., et al. (2008). MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in primary endothelial cells. *Blood* *112*, 3217–3226.
- Yáñez-Mó, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdés, M., and Sánchez-Madrid, F. (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol.* *19*, 434–446.
- Yáñez-Mó, M., Gutiérrez-López, M.D., and Cabañas, C. (2011a). Functional interplay between tetraspanins and proteases. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 3323–3335.
- Yáñez-Mó, M., Sánchez-Madrid, F., and Cabañas, C. (2011b). Membrane proteases and tetraspanins. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 541–546.
- Yang, K., Lu, L., Liu, Y., Zhang, Q., Pu, L.J., Wang, L.J., Zhu, Z.B., Wang, Y.N., Meng, H., Zhang, X.J., et al. (2013). Increase of ADAM10 level in coronary artery in-stent restenosis segments in diabetic minipigs: high ADAM10 expression promoting growth and migration in human vascular smooth muscle cells via Notch 1 and 3. *PLoS ONE* *8*, e83853.
- Yang, X., Claas, C., Kraeft, S.-K., Chen, L.B., Wang, Z., Kreidberg, J.A., and Hemler, M.E. (2002). Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol. Biol. Cell* *13*, 767–781.
- Yang, X., Kovalenko, O.V., Tang, W., Claas, C., Stipp, C.S., and Hemler, M.E. (2004). Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes. *J. Cell Biol.* *167*, 1231–1240.
- Yang, X.H., Richardson, A.L., Torres-Arzuayus, M.I., Zhou, P., Sharma, C., Kazarov, A.R., Andzelm, M.M., Strominger, J.L., Brown, M., and Hemler, M.E. (2008). CD151 accelerates breast cancer by regulating alpha 6 integrin function, signaling, and molecular organization. *Cancer Res.* *68*, 3204–3213.
- Yang, X.H., Mirchev, R., Deng, X., Yacono, P., Yang, H.L., Golan, D.E., and Hemler, M.E. (2012). CD151 restricts the  $\alpha 6$  integrin diffusion mode. *J. Cell. Sci.* *125*, 1478–1487.
- Yaron, A., and Sprinzak, D. (2012). The cis side of juxtacrine signaling: a new role in the development of the nervous system. *Trends Neurosci.* *35*, 230–239.
- Yauch, R.L., Berditchevski, F., Harler, M.B., Reichner, J., and Hemler, M.E. (1998). Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha3beta1 with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration. *Mol. Biol. Cell* *9*, 2751–2765.
- Yavari, R., Adida, C., Bray-Ward, P., Brines, M., and Xu, T. (1998a). Human metalloprotease-

- disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 1161–1167.
- Yavari, R., Adida, C., Bray-Ward, P., Brines, M., and Xu, T. (1998b). Human metalloprotease-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 1161–1167.
- Yavropoulou, M.P., and Yovos, J.G. (2014). The role of Notch signaling in bone development and disease. *Hormones (Athens)* *13*, 24–37.
- Ye, X., Wang, Y., and Nathans, J. (2010). The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends Mol Med* *16*, 417–425.
- Yeaman, C., Grindstaff, K.K., and Nelson, W.J. (1999). New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol. Rev.* *79*, 73–98.
- Yoda, M., Kimura, T., Tohmonda, T., Uchikawa, S., Koba, T., Takito, J., Morioka, H., Matsumoto, M., Link, D.C., Chiba, K., et al. (2011). Dual functions of cell-autonomous and non-cell-autonomous ADAM10 activity in granulopoiesis. *Blood* *118*, 6939–6942.
- Yoon, S., and Baik, J.-H. (2013). Dopamine D2 receptor-mediated epidermal growth factor receptor transactivation through a disintegrin and metalloprotease regulates dopaminergic neuron development via extracellular signal-related kinase activation. *J. Biol. Chem.* *288*, 28435–28446.
- Yoshida, T., Kawano, Y., Sato, K., Ando, Y., Aoki, J., Miura, Y., Komano, J., Tanaka, Y., and Koyanagi, Y. (2008). A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic* *9*, 540–558.
- Yoshimura, T., Tomita, T., Dixon, M.F., Axon, A.T.R., Robinson, P.A., and Crabtree, J.E. (2002). ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) messenger RNA expression in *Helicobacter pylori*-infected, normal, and neoplastic gastric mucosa. *J. Infect. Dis.* *185*, 332–340.
- Yuan, S., Lei, S., and Wu, S. (2013). ADAM10 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma and contributes to the proliferation, invasion and migration of HepG2 cells. *Oncol. Rep.* *30*, 1715–1722.
- Yue, Y., Shao, Y., Luo, Q., Shi, L., and Wang, Z. (2013). Downregulation of ADAM10 expression inhibits metastasis and invasiveness of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Biomed Res Int* *2013*, 434561.
- Van Zelm, M.C., Smet, J., Adams, B., Mascart, F., Schandené, L., Janssen, F., Ferster, A., Kuo, C.-C., Levy, S., van Dongen, J.J.M., et al. (2010). CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J. Clin. Invest.* *120*, 1265–1274.
- Zhang, L., Bukulin, M., Kojro, E., Roth, A., Metz, V.V., Fahrenholz, F., Nawroth, P.P., Bierhaus, A., and Postina, R. (2008). Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* *283*, 35507–35516.
- Zhang, T., Zhang, X., and Sun, Z. (2010). Global network analysis of lipid-raft-related proteins reveals their centrality in the network and their roles in multiple biological processes. *J. Mol. Biol.* *402*, 761–773.
- Zhang, W., Liu, S., Liu, K., Wang, Y., Ji, B., Zhang, X., and Liu, Y. (2014). A disintegrin and metalloprotease (ADAM)10 is highly expressed in hepatocellular carcinoma and is associated with tumour progression. *J. Int. Med. Res.* *42*, 611–618.
- Zhang, X.A., Bontrager, A.L., and Hemler, M.E. (2001). Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J. Biol. Chem.* *276*, 25005–25013.

- Zhang, X.A., Lane, W.S., Charrin, S., Rubinstein, E., and Liu, L. (2003). EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res.* *63*, 2665–2674.
- Zhao, R., Ni, D., Tian, Y., Ni, B., and Wang, A. (2014a). Aberrant ADAM10 expression correlates with osteosarcoma progression. *Eur. J. Med. Res.* *19*, 9.
- Zhao, R., Wang, A., Hall, K.C., Otero, M., Weskamp, G., Zhao, B., Hill, D., Goldring, M.B., Glomski, K., and Blobel, C.P. (2014b). Lack of ADAM10 in endothelial cells affects osteoclasts at the chondro-osseous junction. *J. Orthop. Res.* *32*, 224–230.
- Zheng, Y.Z., and Foster, L.J. (2009). Biochemical and proteomic approaches for the study of membrane microdomains. *J Proteomics* *72*, 12–22.
- Zhou, S., and Hayward, S.D. (2001). Nuclear localization of CBF1 is regulated by interactions with the SMRT corepressor complex. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 6222–6232.
- Zhou, B., Liu, L., Reddivari, M., and Zhang, X.A. (2004). The palmitoylation of metastasis suppressor KAI1/CD82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity. *Cancer Res.* *64*, 7455–7463.
- Zhou, J., Fujiwara, T., Ye, S., Li, X., and Zhao, H. (2014). Downregulation of Notch Modulators, Tetraspanin 5 and 10, Inhibits Osteoclastogenesis in Vitro. *Calcif. Tissue Int.*
- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J.J., Chen, L., Miyamoto, A., Weinmaster, G., and Hayward, S.D. (2000). SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 2400–2410.
- Zhu, G.Z., Lin, Y., Myles, D.G., and Primakoff, P. (1999). Identification of four novel ADAMs with potential roles in spermatogenesis and fertilization. *Gene* *234*, 227–237.
- Zilber, M.-T., Setterblad, N., Vasselon, T., Doliger, C., Charron, D., Mooney, N., and Gelin, C. (2005). MHC class II/CD38/CD9: a lipid-raft-dependent signaling complex in human monocytes. *Blood* *106*, 3074–3081.
- Zolkiewska, A. (1999). Disintegrin-like/cysteine-rich region of ADAM 12 is an active cell adhesion domain. *Exp. Cell Res.* *252*, 423–431.
- Zöller, M. (2009). Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 40–55.





Il est maintenant reconnu que la ségrégation latérale des composants de la membrane plasmique, ou compartimentation membranaire, joue un rôle important dans la régulation de la fonction de nombreuses protéines membranaires. Les tétraspanines constituent une famille de protéines intégrales à quatre régions transmembranaires possédant une capacité unique à s'associer entre elles et avec des nombreuses autres molécules de surface pour former un réseau d'interactions moléculaires, le « tetraspanins web ». Il a été proposé que via l'organisation de ce réseau, les tétraspanines joueraient un rôle dans la compartimentation membranaire des protéines auxquelles elles s'associent. Elles jouent également un rôle dans la compartimentation cellulaire en contrôlant le trafic de certaines des protéines associées.

Le laboratoire a précédemment démontré que six tétraspanines conservées (Tspan5, 10, 14, 15, 17 et 33) de la sous-famille des TspanC8 (caractérisées par la présence de huit cystéines dans le grand domaine extracellulaire) interagissent directement avec la métalloprotéase ADAM10 et régulent sa sortie du réticulum endoplasmique. Cette protéase ancrée à la membrane est responsable du clivage protéolytique de l'ectodomaine de diverses molécules de surface et est indispensable pour l'activation de la voie de signalisation NOTCH. Nous démontrons que Tspan5 et Tspan14 sont des régulateurs positifs de la voie de signalisation Notch et que Tspan15 est un régulateur négatif, agissant en amont de la  $\gamma$ -sécrétase. Cette régulation négative est associée à un changement d'environnement membranaire ainsi qu'à une dynamique différente d'ADAM10 comme le montre un suivi de la protéase à l'échelle de la molécule unique. Par ailleurs, l'analyse par spectrométrie de masse quantitative a montré que la capacité d'ADAM10 à s'associer à des composants connus du réseau de tétraspanines était influencée par son interaction avec ces tétraspanines. Enfin, nous avons identifié une région de la cellule enrichie en CD9 qui contenait également ADAM10 lorsque Tspan5 est exprimée, mais ce n'est pas le cas avec Tspan15.

Cette étude démontre que les différentes TspanC8 influencent différemment la capacité d'ADAM10 à cliver certains de ses substrats et illustre la capacité des tétraspanines à réguler l'activité de leurs protéines partenaires en contrôlant leur compartimentation membranaire.

Mots clés : tétraspanines, ADAM10, NOTCH, microdomaines membranaires