

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : *Ecole doctorale 418 Cancérologie*

Laboratoire de Réponses cellulaires au microenvironnement et cancer

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 11/12/2012

par

Emmanuel DORNIER

**Régulation de la métalloprotéase ADAM10/Kuzbanian  
par les tétraspanines à 8 cystéines et conséquences  
sur l'activation de la voie Notch chez les mammifères  
et la Drosophile**

Directeur de thèse : Eric RUBINSTEIN

Composition du jury :

Président du jury : François DAUTRY  
Rapporteurs : Pierre-Emmanuel MILHIET  
Christel BROU  
Examineur : Ludger JOHANNES

# Résumé

---

L'importance des activités protéolytiques associées à la membrane plasmique dans divers processus biologiques fondamentaux est de mieux en mieux définie. Les protéases de la famille ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease), et ADAM10 en particulier, ont suscité un intérêt tout particulier du fait de l'importance de leurs substrats (récepteur de l'EGF, TNF $\alpha$ , Notch, APP...). Néanmoins, peu d'études se sont intéressées aux mécanismes régulant le trafic d'ADAM10.

Les tétraspanines sont une super-famille de protéines de surface impliquées dans de nombreux processus biologiques fondamentaux parmi lesquels la migration, les interactions intercellulaires, la réponse immunitaire, la fusion des gamètes... L'une des caractéristiques majeure des tétraspanines est leur capacité à organiser un réseau d'interactions moléculaires appelé le « tetraspanin web ». De précédentes études menées dans le laboratoire ont montré qu'ADAM10 est associé au « tetraspanin web ». Néanmoins, la tétraspanine en interaction directe avec ADAM10 permettant son association au réseau n'est pas encore connue.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la régulation d'ADAM10 par les tétraspanines. Nous avons ainsi pu identifier une sous-famille de tétraspanines à 8 cystéines, les TspanC8 (Tspan5, Tspan10, Tspan14, Tspan15, Tspan17 et Tspan33), comme étant capables d'interagir directement avec ADAM10 et de réguler sa sortie du réticulum endoplasmique. Nous avons montré que Tspan5, Tspan14, Tspan15 et Tspan33 sont capables de réguler l'expression de surface d'ADAM10 et que Tspan10 et Tspan17 entraînent l'accumulation d'ADAM10 dans un compartiment endosomal tardif. Les TspanC8 pourraient également contribuer à la régulation de la spécificité de substrat d'ADAM10 puisque nous avons montré que l'expression des TspanC8 humaines Tspan5 et Tspan14 augmente l'activation de la voie Notch alors que Tspan15 n'a pas d'effet. Par ailleurs, les TspanC8 de *Drosophila* sont capables d'interagir directement avec Kuzbanian (l'orthologue d'ADAM10), permettent son accumulation à la surface cellulaire et régulent l'activation de la voie Notch dans différents contextes développementaux. Nous proposons que les TspanC8 soient une nouvelle famille de protéines ayant une fonction très conservée dans la régulation de l'activité et du trafic d'ADAM10, capables de réguler l'activation de la voie Notch.

Increasing evidence suggests a critical implication of membrane-associated protease activities in numerous biological processes. ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease) proteases, and especially ADAM10, are of particular interest because of the importance of their substrates (EGF receptor, TNF  $\alpha$ , Notch, APP...). However, few studies focus on the mechanisms of ADAM10 trafficking.

Tetraspanins are a super-family of proteins implicated in numerous biological processes including migration, intercellular interactions, immune response, gamete fusion... One of the most striking features of tetraspanins is their ability to organise multi-molecular complexes called « Tetraspanin Web ». Previous studies in the laboratory have shown that ADAM10 is associated to the « Tetraspanin Web ». Nevertheless, the tetraspanin in direct interaction with ADAM10 that drives its association to the web is not known.

In this study, we focused on ADAM10 regulation by tetraspanins. We identified a subfamily of tetraspanins with 8 cysteines in their large extracellular domain that we called TspanC8 (Tspan5, Tspan10, Tspan14, Tspan15, Tspan17 and Tspan33) that can directly interact with ADAM10 and regulate its egress from the endoplasmic reticulum. We have shown that Tspan5, Tspan14, Tspan15 and Tspan33 regulate the surface expression of ADAM10 and that Tspan10 and Tspan17 accumulate ADAM10 in a late endosomal compartment. TspanC8 could also contribute to substrate specificity since Tspan5 and Tspan14 can increase Notch activation when Tspan15 cannot. *Drosophila* TspanC8 directly interact with the *Drosophila* ADAM10 ortholog Kuzbanian, increase its accumulation at the cell surface and modulate Notch activation in several developmental contexts. We propose that TspanC8 constitute a new family of Notch regulators with conserved functions in the regulation of ADAM10 trafficking and activity.

# Abbreviations

---

ADAM	$\alpha$ -Disintegrin And Metalloproteinase
EGF	Epidermal growth factor
LNR	LIN-12/Notch repeats
HD	Heterodimerization Domain
LAL	leucémies lymphoïdes aiguës
NRR	Negative Regulatory Region
RAM	RBP-J Associated molecule
ANK	domaine ankyrine
TAD	domaine de trans-activation
PEST	domaine riche en Proline, Glutamate, Sérine et Thréonine
NICD	Domaine Intracellulaire de Notch
MAM	Mastermind
CSL	CBF1/RBP-J, Su(H), LAG-1
NEXT	Notch Extracellular Truncation
KO	Knock-Out
SOP	Sensory Organ Precursor cells
PS	Presenilin
DSL	Delta/Serrate/Lag2 family of ligands
HOPS	HOmotypic fusion and vacuole Protein Sorting
MDC	Metalloprotease/Disintegrin/Cysteine-rich domain
SVMP	Snake Venom Metalloproteinase
RAR	Retinoic Acid Receptor
ARNm	ARN messenger
EGF	Epidermal Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
TIMP	Tissue-Inhibitor of Metalloproteinases
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End products
RECK	REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs)
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
MMP	Matrix MetalloProtease
HCC	Carcinomes hépato-cellulaires
sAPP $\alpha$	fragment $\alpha$ soluble d'APP
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
LEL	Large Extracellular Loop (grande boucle extracellulaire)
SEL	Short Extracellular Loop (petite boucle extracellulaire)
NMDA	acide N-méthyl-D-aspartique
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
DRM	Detergent Resistant Membranes
M $\beta$ CD	methyl- $\beta$ -cyclodextrine
TEM	Tetraspanin Enrich Microdomain
EAP	Endothelial Adhesive Platform
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
VIH	Virus d'Immunodéficience Humaine
RANKL	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand

PSG	Pregnancy-Specific Glycoprotein
DARC	Duffy Antigen Receptor for Chemokines
HGF	Hepatocyte Growth Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
IP	Immunoprécipitation
RE	Réticulum Endoplasmique
UAS	Upstream Activation Sequence
Endo-H	Endoglycosidase-H
MGC	Cellules géantes multinucléées
SVF	Sérum de Veau Fœtal
FITC	FluoroIsoThioCianate

# Table des matières

---

<b>Résumé</b> .....	<b>2</b>
<b>Abbréviations</b> .....	<b>2</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>6</b>
<b>La famille des Tétraspamines</b> .....	<b>8</b>
Structure .....	10
Fonction des tétraspamines .....	13
Implication des tétraspamines dans le fonctionnement de différents systèmes et processus biologiques. Apport des souris KO .....	13
Les phénomènes de fusion.....	13
L'activation plaquettaire.....	15
Le système immunitaire.....	15
Les système nerveux et visuels .....	16
Le système rénal .....	17
Compartimentation membranaire .....	19
Régulation de la localisation et/ou de la maturation des protéines partenaires .....	30
La régulation du trafic par CD63 .....	30
Régulation de l'activité et de la localisation du CD19 par CD81.....	31
Régulation de l'activité et/ou de la signalisation des protéines partenaires .....	32
Les tétraspamines comme récepteurs .....	33
Les tétraspamines comme molécules de signalisation.....	34
Tétraspamines et pathologies humaines .....	35
Tétraspamines et cancer .....	35
Les suppresseurs de métastases, CD9 et CD82 .....	36
Co-029/Tspan8, CD151 et leurs capacités pro-tumorales .....	38
Tétraspamines et pathologies.....	40
Implications de CD81 dans l'infection par des pathogènes humains.....	40
Le virus de l'hépatite C.....	41
L'infection par le <i>plasmodium</i> .....	42
Importance dans les pathologies bactériennes.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Les métalloprotéases de la famille ADAM</b> .....	<b>44</b>
<b>Structure des ADAM</b> .....	<b>47</b>
Le prodomaine.....	47
Le domaine MDC (Métalloprotéase/Désintégrine/Cysteine-rich) .....	49
Le domaine cytoplasmique.....	55
<b>ADAM10, une métalloprotéase à part...</b> .....	<b>57</b>
Importance physiopathologique d'ADAM10.....	57
Apport des souris KO conditionnels .....	59
Rôle d'ADAM10 dans le système nerveux central.....	61
ADAM10 et cancer .....	61
<b>Les mécanismes de régulation d'ADAM10</b> .....	<b>62</b>
La régulation transcriptionnelle et traductionnelle .....	62
La régulation par l'acide rétinoïque et ses dérivés .....	64
La régulation par les sirtuines .....	64
Régulation par les micro-ARNs .....	64
Régulations post-transcriptionnelles.....	65
Régulation par clivage protéolytique .....	65
Régulation par les inhibiteurs endogènes : les TIMPs et RECK.....	66
Régulation par les GPCR.....	67
Régulation par les flux de calcium .....	68

Régulation par la compartimentation et le trafic membranaire .....	68
<b>La signalisation Notch.....</b>	<b>70</b>
<b>Maturation et Activation des récepteurs Notch: une étroite relation entre structure et fonction.....</b>	<b>72</b>
Maturation du récepteur : le clivage S1.....	73
Le fragment Notch extracellulaire (N <sup>EC</sup> ) .....	73
Le fragment Notch transmembranaire (N <sup>TM</sup> ) .....	76
Le clivage S2 .....	77
Le clivage S3 .....	81
Mécanisme d'activation de la transcription par le NICD.....	84
<b>Régulation de la signalisation Notch.....</b>	<b>86</b>
Activation et régulation par endocytose.....	86
L'endocytose du récepteur.....	87
L'endocytose du ligand.....	89
Régulation par les tétraspanines .....	90
<b>Les ligands de Notch.....</b>	<b>91</b>
Structure .....	91
<b>Matériel et Méthodes.....</b>	<b>93</b>
<b>Réactifs pour les expériences in-vitro.....</b>	<b>93</b>
Anticorps.....	93
Oligos utilisés pour les expériences de déplétion par ARN interférence .....	93
Lignées cellulaires utilisées.....	93
Plasmides utilisés .....	94
Analyse par cytométrie de flux .....	94
Immunoprécipitation, pontage chimique et marquage des protéines de surface à la biotine .....	94
RT-PCR quantitative.....	95
Immunomarquages et microscopie .....	96
Analyse de la glycosylation d'ADAM10 .....	96
Analyse de l'activité de Notch dans les cellules de mammifères .....	97
<b>Résultats .....</b>	<b>98</b>
<b>Les TspanC8 sont des partenaires directs d'ADAM10 .....</b>	<b>98</b>
<b>L'expression des TspanC8 corrèle avec l'expression de surface d'ADAM10 .....</b>	<b>102</b>
<b>L'expression des TspanC8 dans les cellules HeLa permet la sortie du RE et l'accumulation d'ADAM10 à la surface cellulaire .....</b>	<b>106</b>
<b>Les TspanC8 endogènes régulent le trafic d'ADAM10 .....</b>	<b>113</b>
<b>Rôles des régions conservées dans la grande boucle extracellulaire des TspanC8 pour l'interaction avec ADAM10 .....</b>	<b>115</b>
<b>Les TspanC8 régulent la voie Notch, <i>in-vitro</i>, à une étape pré- gamma-sécrétase.....</b>	<b>120</b>
<b>Etude phylogénétique comparative des TspanC8 et d'ADAM10.....</b>	<b>127</b>
<b>L'interaction ADAM10/Kuzbanian-TspanC8 est conservée chez les invertébrés .....</b>	<b>132</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>133</b>
Les TspanC8 sont des partenaires directs d'ADAM10, chez la Drosophile et chez les mammifères.....	133
Les TspanC8 permettent la sortie d'ADAM10 du réticulum.....	134
Etude phylogénétique des TspanC8 et ADAM10 et étude des zones importantes pour l'interaction ADAM10/TspanC8.....	136
Pourquoi ADAM10 possède-t-il un si grand nombre de tétraspanines partenaires ? .....	142
Nouvelles pistes pour expliquer le phénotype des souris KO Tspan33.....	143
<b>Conclusion.....</b>	<b>145</b>
<b>Références.....</b>	<b>146</b>

# La famille des Tétraspamines

Les tétraspamines sont une famille de glycoprotéines à 4 passages transmembranaires présentes chez tous les métazoaires qui compte 33 membres chez l'homme. Les tétraspamines sont présentes chez les champignons, les plantes et les invertébrés comme *D.Melanogaster* ou *C.Elegans* (Huang et al., 2005; Todres et al., 2000; Wang et al., 2012a; Gourgues et al., 2002). Les tétraspamines sont également présentes à la surface de pathogènes humains, comme le parasite *Schistosoma*, sont immunogènes et pourraient constituer de potentiels vaccins (Fan and Brindley, 1998). Les premiers clonages de protéines appartenant à la famille ont été réalisés à la fin des années 80 avec la découverte de CD63, CD37, CD81, CD9 et CD53 (Schwartz-Albiez et al., 1988; Oren et al., 1990; Boucheix et al., 1991; Wright et al., 1993). D'autres tétraspamines ont été découvertes comme antigènes associés aux tumeurs, comme c'est le cas pour CD63, CD82 (Hotta et al., 1988; Dong et al., 1995)...

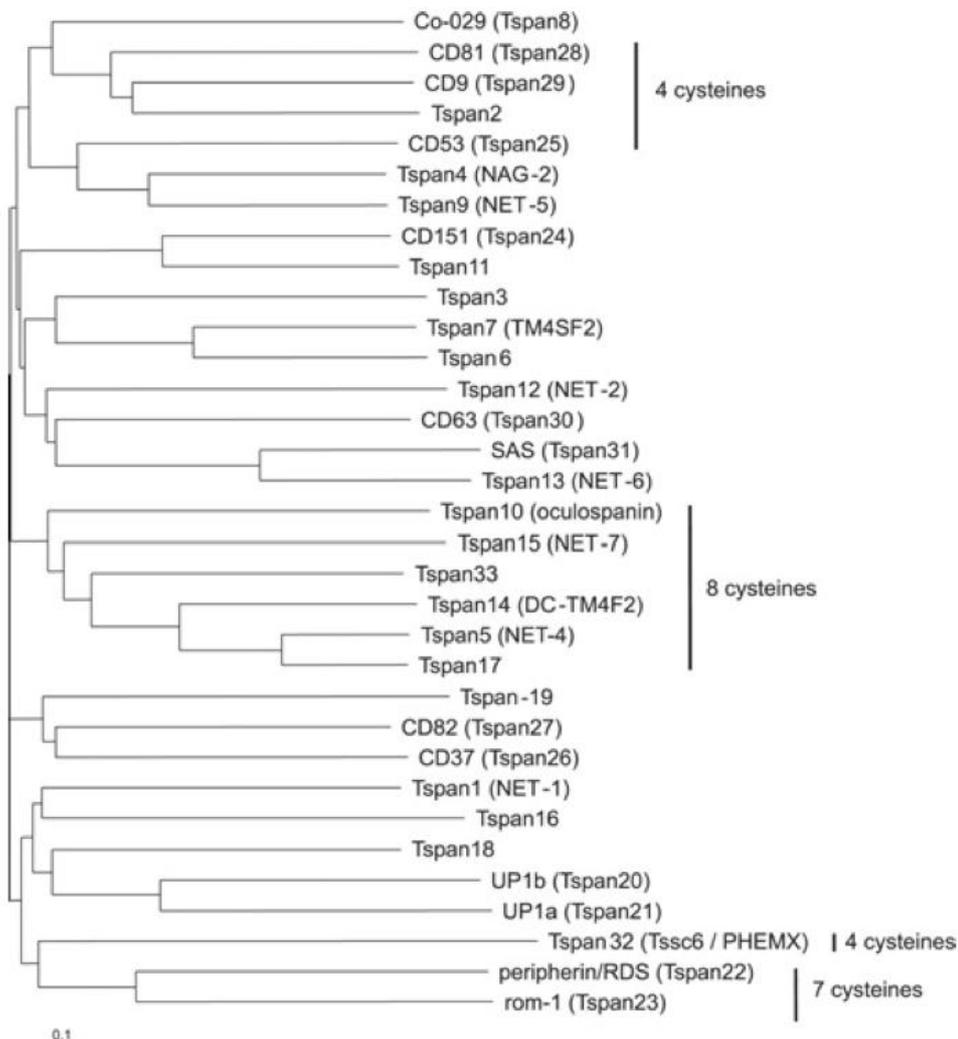


Figure 1: **Arbre de distance des tétraspamines humaines**

Les séquences des 33 tétraspamines humaines ont été alignées et l'arbre a été réalisé à l'aide de ClustalW. Le nombre de cystéines dans la grande boucle extracellulaire est indiqué pour les tétraspamines qui n'en compte pas 6. Adapté de (Charrin et al., 2009).

Parmi les tétraspanines, seules quelques unes ont été étudiées chez les mammifères, en partie à cause du manque d'outils. Il a néanmoins été montré que les tétraspanines sont présentes dans tous les types cellulaires et que plusieurs de ces protéines sont exprimées dans un grand nombre de tissus. En effet, l'expression des tétraspanines est très variable : certaines sont très répandues (par exemple CD9 ou CD81), alors que d'autres sont restreintes à des structures spécialisées (comme les uroplakines de l'urothélium) ou à des types cellulaires (comme c'est le cas pour CD37 ou CD53 qui ne sont présents qu'à la surface des leucocytes). La plupart des tétraspanines étudiées sont exprimées à la surface cellulaire, alors que certaines, comme le CD63 (qui est exprimé dans les endosomes tardifs), sont majoritairement exprimées dans des compartiments intracellulaires.

Les tétraspanines sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques fondamentaux tels que la migration et l'adhésion cellulaire, la fusion, le développement, les interactions inter-cellulaires, la réponse immunitaire... De part ces fonctions très diverses, la dérégulation des tétraspanines peut participer à la progression des cancers et/ou à la formation de métastases. Certains pathogènes humains utilisent les tétraspanines pour infecter les cellules. Chez la souris, le parasite responsable du paludisme *P.yoelii* nécessite la présence du CD81 à la surface des hépatocytes pour infecter les cellules puisque des souris KO pour CD81 sont résistantes à l'infection (Silvie et al., 2003). Le CD81 est également essentiel pour l'entrée du virus de l'hépatite C (VHC) et est un des facteurs qui restreint le tropisme du virus à l'humain et au chimpanzé. En effet, les souris sont naturellement résistantes à l'infection par le VHC et seules des souris transgéniques exprimant le CD81 et l'occludine humains sont infectables, démontrant que l'occludine et le CD81 sont les facteurs minimaux pour permettre l'entrée du virus (Dorner et al., 2011; Ploss et al., 2009). L'étude des tétraspanines est donc d'importance car comprendre leurs mécanismes de fonctionnement c'est aussi découvrir des solutions thérapeutiques pour le traitement de leurs pathologies associées.

## Structure

Les tétraspanines se distinguent des autres protéines à 4 passages transmembranaires par leur petite taille (de 204 acides aminés pour Tspan13 à 355 pour Tspan10), la présence d'une grande boucle extracellulaire (LEL, dont le repliement spécifique est une caractéristique partagée par toutes les tétraspanines) et d'une petite boucle (SEL, composée de moins de 30 acides aminés) ainsi que la conservation de résidus au sein des passages transmembranaires (figure 2B).

La LEL est composée de 76-131 acides aminés et dépasse de quelques nanomètres de la bicouche lipidique (3,5nm pour CD81, 5nm pour les uroplakines...). Elle est organisée en 2 sous-domaines : un domaine constant et un domaine variable. Le domaine constant est constitué des hélices A/B/E, varie en séquence mais est constant dans sa structure. Sur cette base constante se greffe des domaines supplémentaires qui font la spécificité de chaque tétraspanine et qui sont très variables en séquences avec 4 cystéines conservées à 100% (le nombre de cystéines présentes dans la grande boucle est variable avec certaines tétraspanines contenant 4, 6, 7 ou 8 cystéines (figure 1)) qui permettent, grâce à la formation de 2 ponts disulfures, ce repliement spécifique conservé dans toutes les tétraspanines (figure 3A). Pour l'exemple de CD81, deux hélices C et D viennent constituer le domaine variable (en rouge sur la figure 3A), permettant par exemple l'interaction avec la protéine d'enveloppe E2 du virus de l'hépatite C. Seule la LEL de CD81 a été cristallisée et révèle 5 hélices  $\alpha$  (A/B/C/D/E) formant une structure en « champignon », caractéristique de la famille des tétraspanines (cf figure 2A). La tige est constituée des hélices A/E et le chapeau des hélices B/C/D.

La SEL comporte un brin  $\beta$  de 3 à 7 résidus hydrophobes. Le brin  $\beta$  est une structure très instable lorsqu'elle est seule, en règle générale les brins  $\beta$  s'associent entre eux pour former des feuilletts  $\beta$  qui sont stabilisés par des liaisons hydrogènes entre les différents brins du feuillet. Cette structure permettrait ainsi à la SEL d'interagir par liaison hydrogène avec l'hélice B du domaine constant de la LEL pour se stabiliser, ce qui contribuerait au maintien de la structure caractéristique de la LEL (Seigneuret, 2006). Au vu des modélisations de la structure du CD81, la SEL est prédite comme étant en contact avec les 3 hélices A/B/E du domaine constant de la LEL (figure 3B).

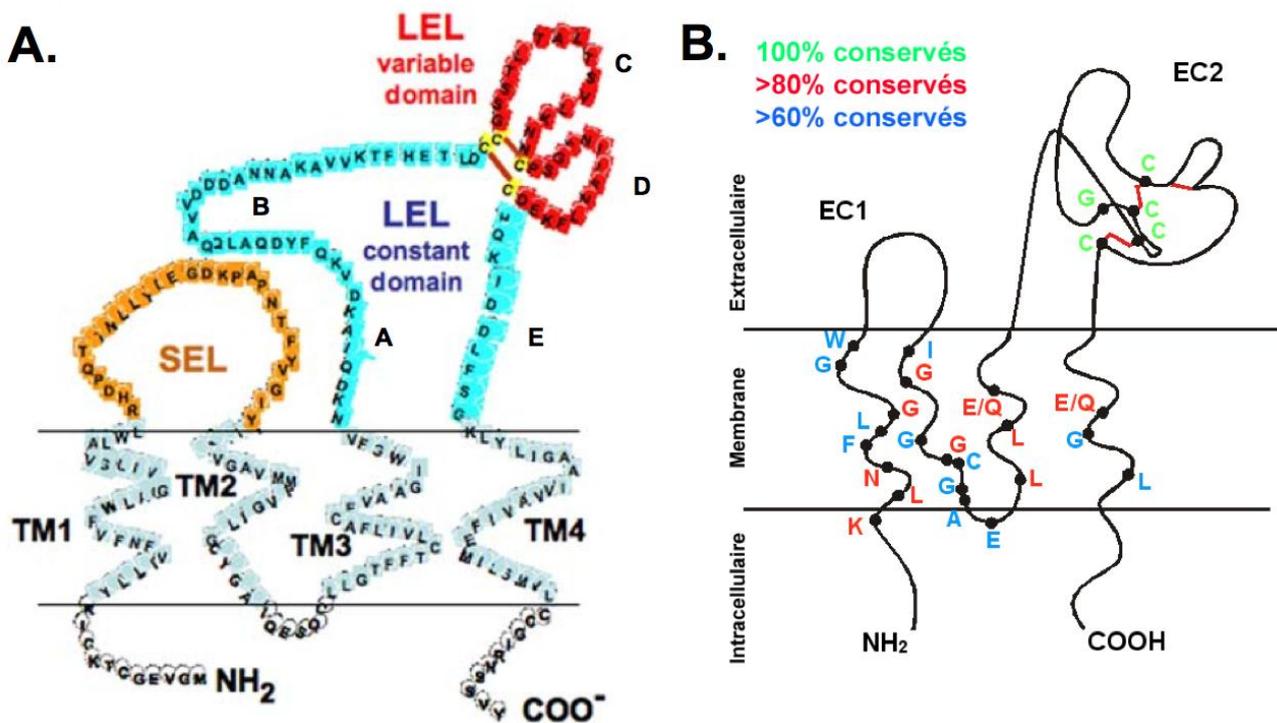


Figure 2 : **Représentation schématique des tétraspanines**

- (A) Structure schématique de la tétraspanine CD81 montrant la SEL (orange) et les domaines constant (bleu clair) ou variable (rouge) de la LEL. Les lettres correspondent à la position approximative des hélices- $\alpha$ . Adapté de (Garcia-España et al., 2009).
- (B) Représentation schématique montrant les principales conservations de résidus parmi les tétraspanines. EC1= petite boucle extracellulaire, EC2= grande boucle extracellulaire. Adapté de (Boucheix and Rubinstein, 2001).

L'alignement des séquences primaires des tétraspanines humaines montre que les régions de plus fortes homologies se trouvent dans les domaines transmembranaires. Des résidus polaires conservés au sein des passages transmembranaires (cf figure 2B) pourraient participer à la stabilisation intra-moléculaire de la protéine en établissant des interactions entre domaines transmembranaires mais aussi en permettant la création d'interactions inter-moléculaires avec d'autres protéines transmembranaires.

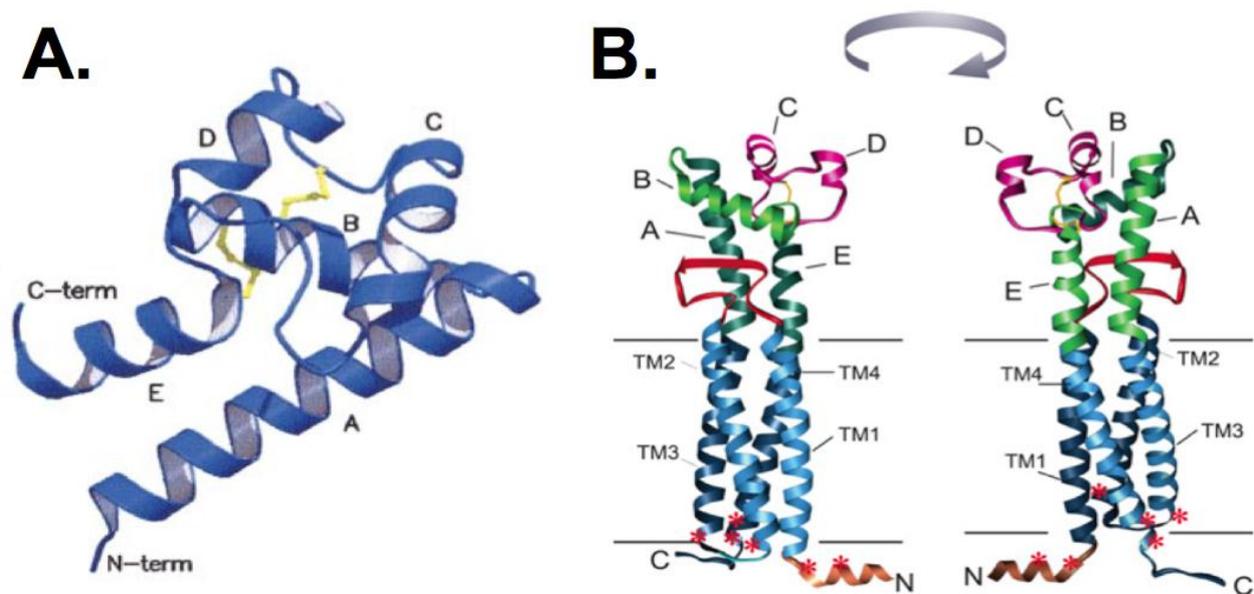


Figure 3 : **Structure du CD81**

- (A) Structure cristallographique de la grande boucle extracellulaire du CD81. Les 2 ponts disulfures qui permettent ce repliement caractéristique des tétraspanines sont en jaune (Adapté de (Kitadokoro et al., 2001))
- (B) Modélisation de la structure du CD81. Les domaines transmembranaires sont colorés en bleu, le domaine constant de la LEL est en vert, le domaine variable de la LEL est en rose, la SEL est en rouge et les ponts disulfures sont en jaune. Les sites de palmitoylation sont indiqués par des étoiles rouges. Adapté de (Seigneuret, 2006).

Les régions N- et C-terminales sont courtes et cytoplasmiques. Des prédictions de structure suggèrent que ces domaines ne possèdent pas de structures secondaires. Néanmoins, la modification par palmitoylation du domaine N-terminal leur permettrait de former une hélice amphiphile qui se plaque contre la membrane, comme c'est proposé dans la modélisation de structure du CD81 (figure 3B).

Plusieurs modifications post-transcriptionnelles sont possibles sur les tétraspanines : palmitoylation (ajout d'un palmitate sur les cystéines cytosoliques juxta-membranaires), glycosylation, ubiquitination ou phosphorylation. La plupart des tétraspanines, à l'exception de CD81 et Tspan12 (Oren et al., 1990; Boucheix and Rubinstein, 2001), contiennent des sites potentiels de N-glycosylations. La glycosylation du CD63 est par exemple indispensable à

son interaction avec le récepteur CXCR4 (Yoshida et al., 2009). La palmitoylation des tétraspanines stabilise les interactions entre tétraspanines et peut modifier la localisation subcellulaire des protéines avec lesquelles elles interagissent (Charrin et al., 2002; Zhou et al., 2004; Yang et al., 2002). CD82 et CD81/CD151 peuvent être ubiquitinées par les ubiquitine ligases gp78 et GRAIL respectivement, ce qui induit leur dégradation (Tsai et al., 2007; Lineberry et al., 2008). Il a été montré très récemment que le CD37 peut être phosphorylé sur ses extrémités N- et C- terminales cytosoliques pour permettre le déclenchement de voies de signalisation pro- ou anti-apoptotiques selon l'extrémité phosphorylée (Lapalombella et al., 2012).

## Fonction des tétraspanines

### Implication des tétraspanines dans le fonctionnement de différents systèmes et processus biologiques. Apport des souris KO

De nombreuses souris KO tétraspanines ont des phénotypes mineurs. D'autres souris KO présentent des phénotypes plus sévères, comme les souris KO CD151 pour lesquelles une perte de la fonction rénale est observée ou encore les souris KO CD9 et CD81 pour lesquelles des défauts dans la fusion des gamètes ou l'activation du système immunitaire sont observés. Les tétraspanines peuvent donc avoir des rôles clés dans des processus biologiques fondamentaux.

### *Les phénomènes de fusion*

Les tétraspanines sont impliquées dans la fusion entre les virus et les cellules hôtes, dans la fusion des gamètes, des myoblastes ou encore des phagocytes mononucléaires (Fanaei et al., 2011). Des anticorps anti-CD81 et anti-CD9 augmentent la formation de syncytia par le VIH-1 (Weng et al., 2009) alors que des anticorps anti-CD81 et anti-CD82 inhibent la formation de syncytia par HTLV-1 (Fukudome et al., 1992).

Il a été montré que les tétraspanines peuvent réguler la différenciation de cellules nécessitant des événements de fusion. Durant leur différenciation, les myoblastes fusionnent pour former des myotubes (Chen et al., 2007a). L'ajout d'anticorps anti-CD9 et/ou anti-CD81 entraîne un délai dans la formation des myotubes et une dégénérescence précoce par apoptose (Tachibana and Hemler, 1999). Cette étude a également démontré que la transfection du CD9

dans une lignée cellulaire de rhabdomyosarcome (tumeur du tissu musculaire squelettique) augmente la fusion et la formation de syncytia. Les monocytes (cellules hématopoïétiques circulantes qui peuvent se différencier en macrophages dans les tissus) peuvent fusionner pendant leur différenciation en macrophage pour former les ostéoclastes et les cellules géantes multinucléées (MGC) qui sont importantes pour la résorption du tissu osseux et l'immunité respectivement. Il a été montré que l'ajout d'anticorps anti-CD9 et anti-CD81 augmentent la fusion sans avoir d'effet sur l'adhérence des monocytes. Ces tétraspanines ont probablement un rôle dans des étapes plus tardive de la formation des MGC.

En accord avec ces observations, les souris KO pour CD9 et CD81 présentent une augmentation de la fusion *in-vitro* et les souris double KO CD9/CD81 présentent une formation spontanée de MGC dans les poumons et une augmentation de la résorption osseuse (Takeda et al., 2003). L'ensemble de ces données suggère que les tétraspanines CD9 et CD81 limitent la fusion des monocytes. Il a également été démontré que l'expression de Tspan5 est augmentée alors que celle de Tspan13 est diminuée durant la différenciation en ostéoclastes d'une lignée RAW264.7 traitée avec le ligand RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand). La déplétion par ARN interférence de Tspan13 et Tspan5 est en accord avec un rôle négatif et positif, respectivement, pour ces deux protéines dans la fusion et la différenciation ostéoclastique (Iwai et al., 2007).

Le phénotype majeur observé des souris KO pour CD9 est une forte réduction de la fertilité des femelles causée par un défaut de fusion des gamètes (Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000; Kaji et al., 2000). Les souris KO pour CD81 présentent également un défaut de fertilité, moins sévère que celui observé pour CD9, et les souris double hétérozygotes (CD9<sup>+/-</sup> CD81<sup>+/-</sup>) ne présentent pas de défaut de fertilité, suggérant que les deux tétraspanines pourraient avoir des rôles complémentaires (Rubinstein et al., 2006). En accord avec cette hypothèse, les souris double KO CD9/CD81 sont complètement infertiles. Ce défaut peut être réversé par injection de l'ARNm de CD9 ou CD81 dans les ovocytes CD9<sup>-/-</sup> (Kaji et al., 2002). Les mécanismes par lesquels CD9 ou CD81 participent à la fusion des gamètes sont encore inconnus (Evans, 2012). CD9 est également présent à la surface des spermatozoïdes (Barraud-Lange et al., 2012; Ito et al., 2010) et l'incubation avec une forme soluble de la LEL de CD9 ne bloque la fusion que lorsqu'elle est incubée avec les ovocytes, suggérant que le CD9 pourrait plutôt agir en cis en organisant la membrane de l'ovocyte. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que les ovocytes CD9<sup>-/-</sup> présentent une morphologie altérée avec moins de microvilli (les spermatozoïdes se fixent préférentiellement dans les zones enrichies

en microvilli) (Runge et al., 2007) et que le CD9 organise des zones d'adhésion qui permettent un renforcement et une stabilisation de l'interaction entre le spermatozoïde et l'ovocyte fournissant le rapprochement membranaire nécessaire à la fusion (Jegou et al., 2011).

### *L'activation plaquettaire*

Le CD9 est l'une des protéines les plus exprimées à la surface des plaquettes et les tétraspanines CD151, CD63, Tspan9 et Tspan32 sont également présentes (Haining et al., 2011). CD9 et CD151 peuvent s'associer au récepteur du fibrinogène, l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , mais les données des souris KO suggèrent que le CD9 a un effet très mineur sur l'activation plaquettaire. En revanche, les souris KO pour CD151 présente des défauts dans l'activation plaquettaire puisque les plaquettes issues de ces souris présentent une forte diminution de l'aggrégation plaquettaire sur le fibrinogène et une diminution des réorganisations du cytosquelette dépendante des intégrines. Les auteurs de cette étude suggère que le CD151 pourrait réguler l'activité de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (Lau et al., 2004). Des défauts similaires ont également été observés dans les souris KO pour Tspan32 (Goschnick et al., 2006). CD151 et Tspan32 semblent être impliqués dans la régulation de l'activation plaquettaire, en partie de part leur interaction et leur capacité à réguler l'activité de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ .

### *Le système immunitaire*

L'implication des tétraspanines dans le fonctionnement du système immunitaire a été très étudié, en particulier par l'utilisation d'anticorps monoclonaux et des souris KO. Les tétraspanines peuvent interagir avec des protéines importantes pour le fonctionnement du système immunitaire comme les antigènes du MHC classe I et II, CD3, CD4, CD8 et CD19 (pour revue voir (Levy and Shoham, 2005; Wright et al., 2004a)).

Les données des souris KO montrent que l'inactivation des tétraspanines CD81, CD37, CD151 et Tspan32 se traduit par une hyperprolifération des cellules-T lorsqu'elles sont soumises à différents stimuli *in-vitro* (pour revue voir (Levy and Shoham, 2005; Wright et al., 2004a)).

L'inactivation de CD37 perturbe la production d'anticorps circulant et démontre un rôle du CD37 dans la protection contre les infections microbiennes et fongiques. De faibles perturbations dans la sécrétion de l'interleukine-2, une augmentation dans la capacité des

cellules dendritiques à présenter les antigènes, une perturbation dans la production d'anticorps avec notamment une très forte augmentation des IgA présentes dans le sérum des souris KO CD37 est observé dans les souris KO pour CD37 (Sheng et al., 2009; van Spriël et al., 2009; van Spriël, 2011). Les IgA sont impliquées dans la défense contre les infections microbiennes et les souris KO CD37 sont résistantes à l'infection par le champignon *C. albicans* grâce à la production d'IgA anti-fongiques spécifiques. L'une des fonctions du CD37 est de réguler la réponse immunitaire anti-microbienne en régulant la quantité d'IgA produites.

L'inactivation du CD81 diminue la réponse Th2 et la production d'anticorps par les cellules-B. Le CD81 interagit avec le CD19 et régule sa localisation et sa maturation. Les conséquences de cette interaction seront développées plus loin. Même si cela est très probable, il n'est pour le moment pas directement démontré que les défauts dans la réponse humorale des souris KO CD81 soient dus à la régulation de CD19 par CD81. Il a été décrit une mutation du CD81 chez l'homme qui aboutit à l'absence de CD81 de la surface des leucocytes, une absence d'expression du CD19 à la surface des cellules-B et une très forte diminution du taux d'immunoglobulines (van Zelm et al., 2010). Cette étude a également démontré que la quantité d'ARNm de CD19 n'est pas touchée dans les cellules-B immortalisées par EBV de ce patient et que la localisation du CD19 est dépendante de la présence de CD81. Les cellules-B de ce patient présentent un défaut d'activation des cellules-B après stimulation du BCR (B-cell receptor). L'ensemble de ces données suggère que le CD81 est important dans la stimulation des cellules-B et leur production d'anticorps.

Les tétraspanines sont donc d'importants régulateurs dans le système immunitaire et peuvent réguler l'amplitude de la réponse humorale. CD37 contrôle la production des IgA qui sont importantes dans l'immunité anti-microbiennes et le CD81, en partie de par son interaction avec CD19, contrôle le seuil d'activation du BCR et la production d'anticorps.

### ***Les système nerveux et visuels***

Le segment externe des cônes (photorécepteur présent dans les rétines de mammifères) est composé d'un grand nombre de protéines dont les tétraspanines periphérine/RDS qui jouent un rôle dans la morphogénèse, l'architecture et la maintenance de ces structures (Goldberg, 2006). Cette fonction est mise en évidence par les phénotypes observés dans les souris KO pour ROM-1 et le modèle souris de rétinite pigmentaire (dans lequel la periphérine-2 porte

une mutation qui est fréquemment retrouvée chez l'homme) dans lesquels une dégénérescence de la rétine est observée (Clarke et al., 2000; McNally et al., 2002).

Chez la souris, plusieurs tétraspanines sont exprimées dans le système nerveux et parmi celles-ci CD9, Tspan-2 et -3 sont associées à la myéline et Tspan5 est exprimé plus largement dans des structures corticales, en particulier dans les cellules de Purkinje (Bronstein, 2000; García-Frigola et al., 2000; 2001). Il a également été montré que l'expression de l'ARNm de Tspan5 corrèle avec le degré de différenciation des cellules de Purkinje : il est faible dans les cellules immatures et augmente jusqu'à être maximum dans les cellules qui élaborent leur arbre dendritique et ne migrent plus (Juenger et al., 2005). Le rôle de Tspan5 dans la formation de l'arbre dendritique n'est pas démontré mais il est connu que les tétraspanines interagissent avec la protéine kinase C qui est impliquée dans la formation des dendrites dans les cellules de Purkinje (Metzger and Kapfhammer, 2000; Zhang et al., 2001). Le CD81 est également exprimé dans le cerveau et peut former des complexes avec CD9, Tspan2 et les intégrines  $\beta 1$  (Terada et al., 2002).

L'expression du CD81 est augmentée dans les astrocytes et les cellules composant la microglie après une lésion de la moelle épinière chez le rat (Dijkstra et al., 2001; 2000). Un rôle du CD81 dans la prolifération des cellules de la glie est renforcé par les données des souris KO pour CD81 dans lesquelles l'une des trois souris KO générées présente un cerveau plus gros à cause d'une augmentation du nombre d'astrocytes et de cellules de la microglie (Geisert et al., 2002).

### *Le système rénal*

Chez l'homme, une insertion d'un nucléotide dans le gène codant pour CD151 aboutissant à la production d'une tétraspanine tronquée a été identifiée chez 3 patients et conduit à une épidermolyse bulleuse restreinte au tibia, à la surdité et à une défaillance rénale (Karamatic Crew et al., 2004). L'étude par microscopie électronique de biopsies de reins de ces patients a permis de mettre en évidence des anomalies dans l'organisation de la membrane basale des glomérules. Chez les souris KO pour CD151, il a également été observé des anomalies dans l'organisation de la membrane basale des glomérules suggérant que le CD151 est important pour le maintien de l'architecture glomérulaire et l'intégrité de la fonction rénale (Sachs et al., 2006).

Nom	Systèmes affectés	Phénotype	Référence
CD151	immunitaire, rénal, métabolisme	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	défauts dans la réponse immunitaire et la fusion des gamètes, anomalies dans l'organisation de structures cérébrales, augmentation de la fusion des monocytes	(Miyazaki et al., 1997) (Maecker and Levy, 1997) (Tsitsikov et al., 1997)
CD9	reproduction, hématopoïétique	défauts dans la fusion des gamètes, augmentation de la fusion des monocytes	(Le Naour et al., 2000) (Kaji et al., 2000) (Miyado et al., 2000)
périphérin/RDS	vision	dégénérescence de la rétine (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)

Figure 4 : **Résumé des principaux défauts observés dans les souris KO pour les tétraspanines** (seules les premières description des souris KO sont listées)

Les tétraspanines sont impliquées dans différents processus biologiques dans différents tissus. L'une des fonctions principale des tétraspanines est celle d'organisateur membranaire grâce à laquelle les tétraspanines peuvent impacter leurs protéines partenaires à plusieurs niveaux : localisation, activité et signalisation.

### Compartimentation membranaire

L'une des principales caractéristiques des tétraspanines est leur capacité à interagir les unes avec les autres ainsi qu'avec d'autres protéines transmembranaires pour construire des complexes moléculaires appelés « Tetraspanin Web ». Les bases moléculaires de ce modèle reposent sur l'observation que, pour un type cellulaire donné et dans des conditions qui préservent les interactions entre tétraspanines, le profil de protéines co-immunoprécipitées avec les différentes tétraspanines est identique (Angelisová et al., 1994; Berditchevski et al., 1996; Rubinstein et al., 1996).

L'étude plus approfondie des complexes construits par les tétraspanines est délicate et nécessite l'utilisation différentielle de détergents. Il a été mis au point des conditions de lyse cellulaire dans lesquelles les interactions tétraspanines-tétraspanines sont conservées (conditions non-stringentes, obtenues avec des détergents comme le Brij58, Brij97, Brij98 ou le CHAPS) et des conditions où elles ne le sont pas (conditions stringentes, obtenues avec des détergents comme la digitonine, le Triton X100 ou le NP40). Les conditions de lyse non-stringentes permettent l'étude des complexes à tétraspanines dans leur globalité alors que les conditions stringentes permettent de disséquer les interactions à l'origine du « Tetraspanin Web » et de révéler différents niveaux d'interactions.

Le premier niveau est direct, entre une tétraspanine et sa protéine partenaire. Une protéine est dite partenaire quand son interaction est conservée dans des conditions stringentes. De nombreuses protéines partenaires ont été identifiées (cf tables I et II), en partie grâce à des approches protéomiques (André et al., 2006; Le Naour et al., 2006a). Elles peuvent être classées en 5 groupes (pour revue voir (Yáñez-Mó et al., 2009; Charrin et al., 2009)) : les intégrines et molécules d'adhésion (cadhérines...), les protéines à domaines immunoglobuline (CD9P1, Ewi2...), les ectoenzymes (ADAM10...), les précurseurs de facteurs de croissance (HB-EGF, TGF $\alpha$ ...) et les protéines de signalisation (PKC, PI4K...).

Le second niveau d'interaction est l'association entre tétraspanines par des interactions tétraspanine-tétraspanine qui permettent la formation d'un réseau d'interaction plus large, le « tetraspanin web », auquel les protéines partenaires des différentes tétraspanines sont adressées.

**Table I: Paires Tétraspaines/protéines partenaires potentielles ou établies**

Tétraspaines	Partenaires	Confirmé par pontage chimique	Référence	Commentaire	Autre tétraspaine interagissant dans des conditions moins stringentes
<b>CD9</b>	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 tétraspaines peu 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)
	Claudine-1	Oui	(Kovalenko et al., 2007)	La Claudine-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 tétraspaines testées	
	Intégrine $\alpha_2\beta_1$	Non	(Cailleateau et al., 2010)	Interaction identifiée par split-ubiquitine et confirmée par co-immunoprécipitation en Brij58	CD151 (Sincock et al., 1999)

<b>UP1a</b>	UPII	Oui	For review (Sun, 2006)	Le couple UP1b/UPIII sert de contrôle	
<b>UP1b</b>	UPIII	Oui	For review (Sun, 2006)	Le couple UP1a/UPII sert de contrôle	
<b>CD81</b>	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 suppose interagir avec le CD81 grâce à son association avec le CD19	CD9, CD81 (Horváth et al., 1998)
	Intégrine $\alpha_4\beta_1$	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)
	Claudine-1	Non	(Harris et al., 2008; Kovalenko et al., 2007)	Des expériences de FRET indiquent une proximité	CD9 CD151 (Kovalenko et al., 2007)

<b>CD151</b>	Intégrine $\alpha_3\beta_1$	Oui	(Serru et al., 1999; Sincock et al., 1999; Yauch et al., 1998; Yauch et al., 2000)	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)
	Intégrine $\alpha_6\beta_1$	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)
	Intégrine $\alpha_6\beta_4$	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)
	Intégrine $\alpha_{Ib}\beta_3$	+/-	(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'apporte pas d'information sur la taille du complexe; les fonctions de l'intégrine $\alpha_{Ib}\beta_3$ 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)
<b>CD53</b>	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)
<b>CD63</b>	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	
	Synaptotagmine VII		(Flannery et al., 2010)		Le CD63 régule la localisation sub-cellulaire de la synaptotagmine VII
<b>Tspan12</b>	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 ont été testées et n'ont pas d'effet sur l'activité du récepteur à la norrine.	
<b>Tspan8</b>	E-cadhérine		(Greco et al., 2010)	Des expériences de pontage chimique ont révélé 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	
<b>TspanC8 (Tspan5, 10, 14, 15, 17, 33)</b>	ADAM10	Oui	(Prox et al., 2012); Tomlinson et al., unpublished; Rubinstein et al., unpublished	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)

**Table II: Protéines interagissant avec les tétraspanines sans candidat pour la tétraspanine partenaire**

Molécules associées	Tétraspanine associée identifiée	Détergent le plus stringent dans lequel l'interaction est conservée et commentaires
<b>Molécules d'adhésion</b>		
Intégrine $\alpha 1\beta 1$	CD9	Brij97 (Lozahic et al., 2000)
Intégrine $\alpha 5\beta 1$	CD9, CD151	CHAPS ; Brij58; interaction pas observée en Brij97 (Rubinstein et al., 1994; Sincock et al., 1999)
Intégrine $\alpha 7\beta 1$	CD151, CD9	CHAPS (Sterk et al., 2000)
Intégrine $\alpha L\beta 2$	CD82	Brij96 (Shibagaki et al., 1999)
Intégrine $\alpha M\beta 2$	CD63	Brij58 (Skubitz et al., 1996)
Intégrine $\alpha v\beta 5$	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 (Protsy 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)
L1-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). Association pas observée 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)

<b>Autres récepteurs</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/ $\gamma$ -glutamyltransferase 1	CD9*, CD37, CD81, CD53, CD82	Brij97 (Le Naour et al., 2006; Nichols et al., 1998)
$\gamma$ -secretase	CD9, CD81	CHAPSO (Wakabayashi et al., 2009)

<b>Protéines à passages 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% Brij 98/0.2% 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)

Les tétraspanines sont présentes dans une fraction de membrane dite résistante aux détergents (DRMs), ce qui indique qu'elles se situent dans un environnement lipidique particulier. Les DRMs comportant les tétraspanines présentent certaines homologues avec les radeaux lipidiques (rafts) mais aussi plusieurs caractéristiques propres aux microdomaines enrichis en tétraspanines (TEMs) qui les différencient. Alors que les rafts sont résistants à un traitement par le TritonX100 à 4°C, les TEMs sont dissociés dans ces conditions. A l'inverse, un traitement au Brij97 à 37°C maintient les TEMs alors qu'il dissocie les rafts (Claas et al., 2001; Charrin et al., 2003b). Les deux domaines diffèrent également par la présence de protéines spécifiques, comme par exemple les protéines à ancre GPI et les cavéolines qui ne sont présentes que dans les rafts, et l'analyse protéomique des complexes CD9 n'a pas révélé la présence de ces protéines (Rajendran and Simons, 2005; Le Naour et al., 2006a; André et al., 2006). Les rafts sont sensibles à la déplétion en cholestérol alors que les TEMs sont résistants. Enfin, il a été montré par suivi de molécules isolées que CD55, une protéine à ancre GPI, et CD9 ont des comportements différents et que sur des cellules vivantes la dynamique des TEMs est distincte des rafts (Espenel et al., 2008; Barreiro et al., 2008).

Les tétraspanines se partitionnent dans les fractions de faible densité en gradient de sucrose et interagissent avec des composants de la bicouche lipidique comme les gangliosides ou le cholestérol (Ono et al., 2001; Charrin et al., 2003a; Delaguillaumie et al., 2004). La lyse des cellules par la digitonine, un réactif qui permet de précipiter le cholestérol, entraîne la précipitation des complexes à tétraspanines, suggérant que le cholestérol participe à la formation du « tetraspanin web ». Néanmoins, la contribution précise du cholestérol est toujours soumise à débat. Il a été démontré que l'ajout de M $\beta$ CD (methyl- $\beta$ -cyclodextrine), une drogue permettant l'extraction du cholestérol, dans le milieu de culture des cellules ne modifie pas le profil de protéines immunoprécipitées par le CD9 dans des conditions de lyse non stringentes mais diminue fortement l'association de CD81 avec les complexes à tétraspanines et l'infection par le parasite responsable de la malaria (dont CD81 est le récepteur) (Claas et al., 2001; Silvie et al., 2006b). Enfin, si la lyse cellulaire est faite en présence de M $\beta$ CD ou avec un détergent qui séquestre le cholestérol (comme la saponine), les interactions entre tétraspanines ne sont plus conservées (Charrin et al., 2003a). Le cholestérol a donc un rôle dans la stabilisation des interactions entre tétraspanines mais est important également pour la fonction de certaines tétraspanines.

La palmitoylation des tétraspanines est également impliquée dans la stabilisation des interactions entre tétraspanines et peut modifier la localisation subcellulaire des protéines avec lesquelles elles interagissent (Charrin et al., 2002; Zhou et al., 2004; Yang et al., 2002). La palmitoylation des tétraspanines est dynamique et peut être induite : la stimulation des lymphocytes B induit une augmentation de la palmitoylation de CD81 alors que les stress oxydants l'inhibe (Clark et al., 2004; Cherukuri et al., 2004a). Il a également été démontré que l'activation plaquettaire augmente la palmitoylation des tétraspanines CD9 et CD63 (Israels and McMillan-Ward, 2010). La palmitoylation peut aussi réguler différenciellement l'association des tétraspanines avec leurs partenaires puisque l'isoforme  $\epsilon$  de la protéine 14-3-3 interagit de façon constitutive avec un mutant non palmitoylable de CD81 et pas avec le CD81 palmitoylé, qu'EWI-2 s'associe plus fortement avec le CD9 non palmitoylé ou qu'ADAM10 ne s'associe qu'à Tspan12 palmitoylé (Clark et al., 2004; Yang et al., 2006; Xu et al., 2009).

La palmitoylation des protéines partenaires est aussi impliquée dans l'interaction avec les tétraspanines puisque la synaptotagmine VII n'interagit avec le CD63 que lorsqu'elle est palmitoylée ou que la palmitoylation d'Ewi-2 est nécessaire pour son interaction avec CD9 et CD81 (Flannery et al., 2010; Montpellier et al., 2011).

Les TEMs (Tetraspanin Enriched Microdomains) représentent l'ensemble des interactions qui constituent le réseau organisé par les tétraspanines (« tetraspanin web »). Il existe également des zones de la membrane enrichies localement en tétraspanines (les TEAs) qui sont stables dans le temps (plusieurs minutes) et dans l'espace. En plus de ces zones ponctuelles enrichies en tétraspanines, des paires tétraspanine/protéine partenaire « libres » circulent librement dans la membrane puisqu'il a été montré que la composante confinée, composante majoritaire pour les tétraspanines présentes dans les TEAs, dans le mouvement du CD9 ne concerne que 20% des molécules (Espenel et al., 2008). Lorsque ces complexes « libres » entrent en contact avec les tétraspanines présentes dans les TEAs, la vitesse de diffusion chute et le mode de déplacement passe de brownien à confiné (Espenel et al., 2008). Ainsi il peut y avoir échange de partenaires entre les tétraspanines pour réguler de façon dynamique la composition protéique des TEAs (figure 5). Toutes les protéines ne sont pas retenues dans les TEAs puisque le CD55 ne présente pas de modifications de son coefficient de diffusion lorsqu'il entre dans les TEAs.

La composition des TEAs est donc dynamique et l'interaction avec les tétraspanines peut permettre de réguler le trafic ou l'activité de leurs protéines partenaires. Il existe un exemple de TEAs spécialisées dans l'adhésion. Barreiro *et al* ont montré qu'il existe des zones riches en CD9 et en CD151 qui sont enrichies en protéines importantes pour l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales, ICAM1 et VCAM1. Ces TEAs spécialisées ont été appelées EAPs (Endothelial Adhesive Platforms). Il existe des interactions entre les tétraspanines et les récepteurs d'adhésion en dehors des EAPs mais elles sont stabilisées dans le temps et l'espace lorsque ces paires « libres » entrent en contact avec les EAPs. L'avidité des récepteurs d'adhésion est alors plus forte que lorsqu'ils sont à l'extérieur des EAPs, ce qui permet une adhésion plus forte et plus efficace des leucocytes à la surface des cellules endothéliales (Barreiro et al., 2008).

L'ensemble de ces données a permis d'établir le modèle des TEAs qui est schématisé ci-dessous.

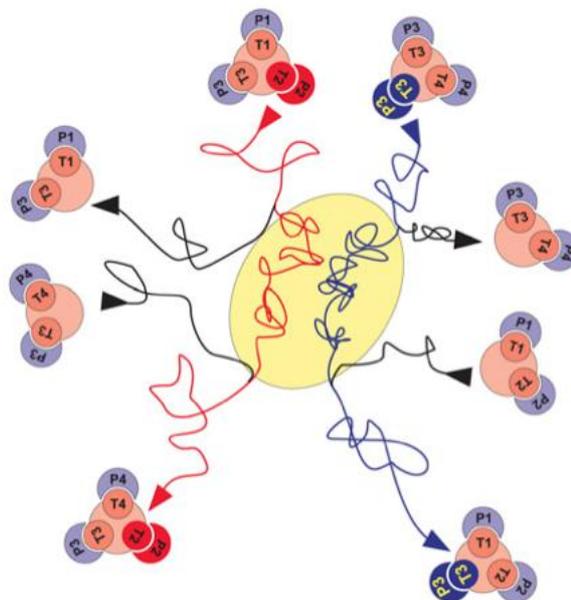


Figure 5 : **Vue schématique des échanges dans les zones enrichies en tétraspanines**

Des échanges dynamiques ont lieu entre les paires Tétraspanines (symbolisées par un T)/protéines partenaires (symbolisées par un P) et les TEAs (symbolisées par l'ovale jaune). Adapté de (Charrin et al., 2009).

## Régulation de la localisation et/ou de la maturation des protéines partenaires

Il existe de nombreux exemples montrant que les tétraspanines peuvent réguler la localisation et/ou la maturation de leurs protéines partenaires (pour revue voir (Berditchevski and Odintsova, 2007)). Par exemple, la présence d'Ewi-2, une protéine partenaire de CD9 et CD81, est fortement réduite à la surface des ovocytes des souris KO pour CD9 (He et al., 2009) et la transfection du CD81 dans les cellules U937 (qui ne possèdent pas de CD81) permet la maturation et l'adressage à la membrane plasmique d'Ewi-2 (Stipp et al., 2003). L'urothélium est formé par l'assemblage des complexes UPIa-UPII et UPIb-UPIII qui forme les plaques urothéliales (pour revue voir (Hu et al., 2005)). L'expression des tétraspanines spécifiques de l'urothélium (UPIa et UPIb) sont nécessaires pour le trafic de leurs protéines partenaires (UPII et UPIII) qui sinon restent bloquées dans le réticulum puis sont dégradées par le protéasome (Tu et al., 2002).

Dans les chapitres suivants les exemples de la régulation de la localisation des protéines lysosomales par CD63 et du CD19 par CD81 seront détaillés plus avant.

### *La régulation du trafic par CD63*

Certaines tétraspanines possèdent des motifs de localisation cellulaire leur permettant d'être exprimées dans d'autres compartiments que la membrane plasmique. C'est le cas de CD63 qui possède une séquence GYEVVM d'adressage au lysosome dans son extrémité C-terminale cytosolique qui lui permet également d'interagir avec le complexe AP-3 qui régule le trafic des protéines adressées aux lysosomes (Rous et al., 2002). Il a été montré que l'interaction de protéines avec CD63 leur permet d'adopter une localisation endosome tardif/lysosome.

La synaptotagmine VII ne forme un complexe avec le CD63 que lorsqu'elle est palmitoylée. La perte d'interaction de la synaptotagmine VII avec CD63 déplace sa localisation des lysosomes et aboutit à son accumulation dans le réseau trans-golgien. En effet, la déplétion du CD63 par interférence ARN, l'expression d'un mutant non palmitoylable de la synaptotagmine ou l'inhibition de la palmitoylation par des inhibiteurs chimiques entraîne la perte d'association avec le CD63 et son exclusion des lysosomes (Flannery et al., 2010).

La sous-unité  $\beta$  de la pompe à protons H,K-ATPase (HK $\beta$ ), est localisée à la membrane plasmique de cellules COS lorsqu'elle est transfectée seule mais est relocalisée dans des vésicules intracellulaires CD63-positives quand elle est co-exprimée avec le CD63. Le CD63

permet une relocalisation de la HK $\beta$  en recrutant les protéines AP-2 et -3 qui se fixent à son extrémité C-terminale contenant le motif GYEVN (Duffield et al., 2003).

Une étude récente a montré que le CD63 a aussi un rôle dans la mise en place et la maturation de structures endosomales tardives spécialisées comme les mélanosomes. Le CD63 protège PMEL de la dégradation en empêchant son trafic ESCRT-dépendant vers les lysosomes, ce qui permet la formation de fibrilles servant ensuite à concentrer la mélanine pour produire des mélanocytes matures (van Niel et al., 2011).

CD63 orchestre donc le trafic de ces protéines partenaires afin de permettre la formation de structures spécialisées ou d'assurer une localisation adaptée afin que ses protéines partenaires puissent exercer leurs fonctions (Pols and Klumperman, 2009).

### *Régulation de l'activité et de la localisation du CD19 par CD81*

CD19 est une protéine clé dans l'activation des lymphocytes B qui participe à la transduction du signal après activation du BCR (récepteur des cellules B). CD81 s'associe à CD19 dès les premières étapes de maturation des cellules B (Shoham et al., 2003). Trois souris KO pour CD81 ont été indépendamment produites et toutes trois montrent une baisse d'expression de CD19 à la surface des lymphocytes B (Maecker and Levy, 1997; Tsitsikov et al., 1997; Miyazaki et al., 1997). En effet, malgré un niveau comparable d'ARNm, la délétion de CD81 entraîne une diminution du marquage CD19 de surface qui peut être diminué jusqu'à 8 fois dans les stades de différenciation pré-BII (Shoham et al., 2003). Cette diminution peut être réversée en ré-exprimant CD81 dans les cellules B précurseurs et l'expression d'une chimère CD9-CD81 ne contenant que le premier passage transmembranaire de CD81 est capable d'augmenter le niveau membranaire de CD19. Il a également été montré que l'expression du CD81 restaure l'expression du CD19 à la surface cellulaire en permettant sa sortie du réticulum (Shoham et al., 2003; 2006). En accord avec ces données, un patient présentant une mutation du CD81 aboutissant à l'absence de CD81 à la surface des cellules présente une forte diminution du niveau de surface de CD19 (van Zelm et al., 2010). Le CD81 est également impliqué dans la signalisation B puisqu'il fait partie, de par son interaction directe avec CD19, du complexe d'activation lymphocytaire CD19/CD21/Leu3/CD81 et l'induction de la palmitoylation du CD81 par l'engagement du BCR permet la relocalisation du complexe CD19/CD21/Leu3/CD81 dans des DRMs, ce qui contribue à l'augmentation du signal (Cherukuri et al., 2004a; b).

## Régulation de l'activité et/ou de la signalisation des protéines partenaires

Les tétraspanines s'associent avec des protéines qui possèdent des activités catalytiques, comme par exemple des peptidases ou des récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, et peuvent moduler leur activité. La stimulation par des anticorps anti-tétraspanines peut aussi réguler l'activité catalytique de peptidases comme ADAM10. Cet exemple sera développé dans la partie suivante consacrée à ADAM10.

Le CD82 est l'une des tétraspanines dont l'association avec les récepteurs aux facteurs de croissance est la plus documentée. La co-immunoprécipitation de CD82 avec le récepteur à l'EGF (EGFR) ou à l'HGF (c-Met) est observée dans des conditions de lyse non-stringentes (Takahashi et al., 2007; Odintsova et al., 2000a). Ces interactions sont régulées par l'expression des gangliosides (Odintsova et al., 2006; 2000a; Todeschini et al., 2007; Wang et al., 2007c). L'expression de CD82 régule négativement l'activation de l'EGFR et c-Met. Il a été montré que l'expression de CD82 diminue la migration induite par la fixation des ligands de l'EGFR et c-Met (Sridhar and Miranti, 2005; Odintsova et al., 2000a). CD82 peut induire une relocalisation de l'EGFR dans des fractions de faibles densités en gradient de sucrose qui est corrélée à une atténuation de la dimérisation de l'EGFR en réponse à la fixation de son ligand (Odintsova et al., 2003). L'ensemble de ces données suggère que le CD82 organise la compartimentation des récepteurs avec la participation des gangliosides et régule l'activité de l'EGFR et c-Met.

L'une des tétraspanines dont l'association avec les intégrines est la mieux caractérisée est le CD151 qui peut interagir avec les intégrines  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  et  $\alpha 6\beta 4$  (Yanez-Mo et al., 1998; Yauch et al., 1998; Sincock et al., 1999; Serru et al., 1999; Hasegawa et al., 1998; Fitter et al., 1999; Sterk et al., 2000). L'interaction avec  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  est directe alors que l'interaction avec  $\alpha 4\beta 1$  se fait par l'intermédiaire du CD81 (Serru et al., 1999). Le CD151 participe à la formation et à la stabilité de différentes structures adhésives comme les hémidesmosomes ou les jonctions inter-cellulaires (Yanez-Mo et al., 1998; Sterk et al., 2000; Shigeta et al., 2003). Il est également impliqué dans la régulation de l'interaction entre les intégrines et leur substrat (Lau et al., 2004; Lammerding et al., 2003; Nishiuchi et al., 2005; Winterwood et al., 2006; Chometon et al., 2006). En effet CD151 participe à la régulation de la glycosylation d' $\alpha 3\beta 1$  qui est importante pour son activité (Baldwin et al., 2008) et permet la mise en relation des intégrines avec les petites protéines G de la famille Rho (Shigeta et al., 2003; Johnson et al., 2009). En accord avec ces données, il a très récemment été démontré un

rôle du CD151 dans l'organisation de structures adhésives spécialisées puisque l'expression du CD151 permet le recrutement et l'activation des GTPases Rac et Cdc42, mais pas Rho, grâce à la formation d'un complexe intégrines/CD151/GTPases. Le CD151 en déplaçant ses partenaires intégrines vers les TEMs permet leur couplage avec les GTPases Rac/Cdc42, augmente l'activation des GTPases en réponse à la liaison des intégrines à la lamine et aboutit à l'augmentation de la migration des cellules et de la transcription de la métalloprotéase MMP9 dans des cellules de mélanome (Hong et al., 2012). Ces données sont d'autant plus importantes que le couple CD151/intégrine  $\alpha 6$  a un rôle dans la progression du cancer du sein (Yang et al., 2008) et que le couple CD151/intégrine  $\beta 1$  augmente la formation de métastases d'une lignée de cancer hépatocellulaire (HCCLM3) chez la souris et est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du foie chez l'homme (Yauch et al., 1998; Devbhandari et al., 2011).

### Les tétraspanines comme récepteurs

Il est bien établi que les tétraspanines interagissent avec un grand nombre de protéines transmembranaires ou cytosoliques, au sein de la même cellule. Il a été aussi montré, dans de rares exemples, que certaines protéines peuvent se fixer sur les tétraspanines en *trans*. Un des exemples les mieux définis est la fixation de la protéine E2 de l'enveloppe du VHC. Cet exemple est détaillé dans le chapitre suivant. D'autres protéines peuvent être des ligands des tétraspanines.

PSG17 (Pregnancy-Specific Glycoprotein 17), est une protéine soluble de la super-famille des immunoglobulines sécrétée par le placenta. Elle interagit de façon spécifique avec un motif SFQ présent dans la grande boucle du CD9 (le même motif que celui qui est impliqué dans la fusion des gamètes (Arduise et al., 2008; Zhu et al., 2002a)) et inhibe la fusion des gamètes chez la souris si elle est pré-incubée avec les ovocytes (Peschon et al., 1998; Ellerman et al., 2003; Waterhouse et al., 2002). L'inhibition de la fusion est réversible car après lavage du PSG17 fixé, la fusion est à nouveau possible.

Le CD9 a aussi été suggéré comme étant un récepteur pour l'IL-16 (Le Gall et al., 2009; Qi et al., 2006). Néanmoins, le seul argument avancé par cette étude est le fait que la fixation de l'IL-16 soit bloquée par des anticorps anti-CD9. Cet argument est insuffisant pour montrer avec certitude qu'une tétraspanine est le récepteur. En effet des anticorps anti-CD9 sont capables de diminuer la fixation de la toxine diphtérique sur les cellules. De plus, l'expression

de CD9 augmente la sensibilité des cellules à la toxine (Zhu et al., 2002a; Iwamoto et al., 1991). Néanmoins, il a été montré que le récepteur à la toxine n'est pas le CD9 mais une de ses protéines partenaires, le HB-EGF. Ainsi, l'effet du CD9 est de potentialiser la fixation de la toxine sur sa protéine partenaire (Ellerman et al., 2003; Iwamoto et al., 1994; Waterhouse et al., 2002), montrant qu'il est très délicat de démontrer qu'une protéine est le ligand d'une tétraspanine et qu'une inhibition par des anticorps n'est pas suffisante pour le démontrer.

Il a été suggéré par double hybride que la tétraspanine CD63 peut interagir avec la partie C-terminale de TIMP-1 (Tissue-Inhibitor of Metalloproteinases 1), un inhibiteur de métalloprotéases, et confirmé biochimiquement que les deux protéines interagissent à la surface de cellules MCF10A (une lignée de cellules épithéliales mammaire). La formation d'un complexe TIMP-1/CD63/intégrine  $\beta$ 1 active Erk et a un effet anti-apoptotique (Qi et al., 2006; Jung et al., 2006).

Les tétraspanines peuvent aussi avoir comme ligands des protéines membranaires situées sur d'autres cellules avec lesquelles elles interagissent en *trans*. C'est le cas de CD82 qui reconnaît la protéine DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines) qui est présente à la surface des cellules endothéliales. Cette interaction a été découverte par double-hybride et la présence de DARC est indispensable à la capacité de suppression de métastases de CD82 *in vivo* (Iwamoto et al., 1991; Bandyopadhyay et al., 2006).

### Les tétraspanines comme molécules de signalisation

Il a très récemment été montré que la tétraspanine CD37 peut être phosphorylée en réponse au traitement par des anticorps spécifiques et déclencher une cascade d'évènements intracellulaires pro- ou anti-apoptotiques. En effet, Lapalombella *et al* ont montré la présence de tyrosines phosphorylables dans les domaines cytosoliques N- et C-terminaux. La tyrosine du domaine N-terminal est comprise dans un motif « ITIM-like » qui permet le recrutement de la protéine SHP1, initiant une voie de signalisation intracellulaire aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. Du côté C-terminal, la tyrosine est incluse dans un motif de type « ITAM » et sa phosphorylation permet l'activation d'une voie PI3K qui promeut la survie cellulaire (Lapalombella et al., 2012). Cette étude démontre un mode d'action de drogues (anticorps) ciblant CD37 dans le traitement de leucémies lymphoïdes chroniques (LLC). En effet, le CD37 est spécifique des lymphocytes B ce qui le désigne naturellement comme cible

pour le traitement des LLC. Il a été montré que des immunothérapies ciblant CD37 induisent la mort des cellules B de patients atteints de LLC (Zhao et al., 2007). Ainsi ces approches thérapeutiques ciblant CD37 dans le cas des LLC sont maintenant en essais cliniques aux Etats-Unis.

## Tétraspanines et pathologies humaines

### Tétraspanines et cancer

L'implication des tétraspanines dans le cancer est connue de longue date puisque certaines tétraspanines ont été découvertes comme antigènes associés aux tumeurs et des tétraspanines sont utilisées comme facteurs pronostiques. Des études *in-vitro* ont montré que les tétraspanines interviennent dans des processus tumoraux grâce à leur capacité à organiser des complexes protéiques qui ont été très largement décrits et en modulant l'expression ou l'activation de leurs protéines partenaires, notamment les intégrines ou les récepteurs aux facteurs de croissance. Il est par exemple très bien décrit que la régulation de la fonction des intégrines par le CD151 est impliquée dans la progression des cancers. Les tétraspanines régulent, dans un grand nombre de cas, la mobilité et le pouvoir invasif des cellules cancéreuses *in-vitro* (Iwamoto et al., 1994; Yáñez-Mó et al., 2009) et sont utilisées comme facteurs pronostics dans différents cancers et elles peuvent être divisées en 2 groupes, selon qu'elles promeuvent ou inhibent le développement et/ou la formation de tumeurs. Je me focaliserai sur les tétraspanines les plus étudiées dans ce contexte : CD9, CD82, CD151 et Tspan8.

CD9 et CD82 sont impliqués dans de nombreux processus biologiques fondamentaux (parmi lesquels l'aggrégation et l'adhésion cellulaire, la mobilité, l'invasion, l'apoptose...). Leur absence provoque de fortes perturbations participant à la formation de métastases (Zöller, 2008; Tonoli and Barrett, 2005; Romanska and Berditchevski, 2010).

## *Les suppresseurs de métastases, CD9 et CD82*

Un très grand nombre d'études *in-vitro* ont montré que CD9 et CD82 inhibent la mobilité et le pouvoir invasif des cellules tumorales. De plus, la présence de l'ARNm de CD9 ou de CD82 est un facteur de bon pronostic dans de nombreux cancers alors que leur absence est corrélée à la survenue de métastases et aux rechutes (Jung et al., 2006; Richardson et al., 2010; Tonoli and Barrett, 2005).

Il a été montré que le CD9 est exprimé sur les tumeurs primaires et que son expression diminue au cours de la progression tumorale des cancers du poumon, du sein, du colon, de la peau, des ovaires, de l'utérus, de l'estomac, de la cavité orale, de la tête et du cou, de la prostate et du pancréas (Si and Hersey, 1993; Miyake et al., 1995; Cajot et al., 1997; Mori et al., 1998; Sho et al., 1998; Uchida et al., 1999; Kusakawa et al., 2001; Miyamoto et al., 2001; Murayama et al., 2002; Sauer et al., 2003; Mhawech et al., 2003; Wang et al., 2007a; De Bruyne et al., 2008; Buim et al., 2010; Yoon et al., 2010; Funakoshi et al., 2003). De plus, des études se sont intéressées à l'expression différentielle des ARNm de tumeurs primaires et de métastases de patients et ont identifié CD9 comme étant réprimé dans les cellules métastatiques, par rapport aux cellules de la tumeur primaire, chez des patients souffrant de cancer du sein (Mimori et al., 2005) et de cancers colorectaux (Cajot et al., 1997). La transfection ou la sur-expression de CD9 diminue fortement le pouvoir migratoire *in-vitro* (Ikeyama et al., 1993; Funakoshi et al., 2003) ainsi que le pouvoir métastatique *in-vivo* (Ikeyama et al., 1993; Miyake et al., 2000; Zheng et al., 2005; Takeda et al., 2007a; Ovalle et al., 2007). Les mécanismes moléculaires sont encore peu connus. Néanmoins, il a été montré que l'expression du CD9 dans des lignées de fibrosarcomes et de cancer du poumon régule la transcription d'un grand nombre de gènes. Parmi ceux-ci des gènes de la voie Wnt sont réprimés et pourraient représenter l'une des explications moléculaires de l'effet anti-tumoral de CD9, de par leur implication dans la transformation cellulaire ou les processus mtastatiques (Huang et al., 2004).

La présence du CD9, *in-vitro*, diminue fortement la mobilité cellulaire (Funakoshi et al., 2003; Ikeyama et al., 1993) et participe à la régulation de l'activité des intégrines. En effet, il a été montré que l'expression de CD9 dans des cellules de carcinomes colique augmente l'adhésion dépendante des intégrines et diminue la mobilité des cellules (Ovalle et al., 2007). CD9 est aussi impliqué dans les remaniements du cytosquelette et de la morphologie cellulaire consécutifs à l'adhésion. Ainsi l'expression du CD9 régule la dynamique du cytosquelette en altérant la localisation des protéines Arp2/3 et en réprimant l'expression de

WAVE2. Ces protéines sont nécessaires à la ramification du cytosquelette d'actine qui permet la formation du lamellipode et la perte de WAVE2 aboutit à une suppression de la mobilité cellulaire. Néanmoins, les mécanismes par lesquels CD9 peut réguler WAVE2 ne sont pas connus (Huang et al., 2006).

Il a également été montré dans les leucémies aigües lymphoblastiques B (LAL-B) que l'expression du CD9 est corrélée au potentiel souche des cellules tumorales puisque les cellules dont l'expression de CD9 est la plus forte sont transplantables en série chez la souris, présentent des capacités d'auto-renouvellement et d'efflux des drogues alors que les cellules négatives pour l'expression de CD9 ne sont pas transplantables en série. Chez des patients souffrant de LAL-B, l'expression de CD9 est corrélée à celle de CD34. Enfin, l'expression de CD9 est corrélée à l'expression de USP22, une dé-ubiquitinase de l'histone H2B, qui est une protéine « signature » du phénotype souche, suggérant que l'expression du CD9 corrèle fortement avec les cellules ayant un phénotype souche (Nishida et al., 2009; Yamazaki et al., 2011).

L'expression de CD82 est, comme pour CD9, perdue au cours de la progression tumorale des cancers de la prostate, du sein, du colon, du pancréas, de la vessie, du poumon, de la cavité orale, de l'estomac, du foie, de l'œsophage, de l'endomètre (Huang et al., 2004; Dong et al., 1996; Yu et al., 1997; Maurer et al., 1999; Lombardi et al., 1999; Yang et al., 2000; Dong et al., 1995). L'expression de CD82 dans des lignées tumorales inhibe le processus métastatique *in-vivo* (Takaoka et al., 1998b; a; Yang et al., 2001; Takeda et al., 2007a). Il existe différentes pistes quant aux mécanismes moléculaires mis en place par CD82. D'abord, CD82 pourrait stabiliser les interactions inter-cellulaires, empêchant ainsi les cellules de quitter la tumeur primaire. En effet, CD82 renforce les adhésions inter-cellulaires dépendante de la E-cadhérine (Nishida et al., 2009; Abe et al., 2008; Yamazaki et al., 2011). Ensuite, CD82 diminue la mobilité et l'invasion cellulaires par plusieurs mécanismes : CD82 s'associe avec l'intégrine  $\alpha 6$  et, en augmentant son internalisation, diminue l'adhésion et la migration sur la laminine et la fibronectine (Dong et al., 1996; He, 2004; Yu et al., 1997; Maurer et al., 1999; Lombardi et al., 1999; Yang et al., 2000). De plus la sur-expression d'Ewi-2, une protéine à domaines immunoglobulines partenaire de CD9 et CD81, augmente l'inhibition de la migration par CD82 (Zhang et al., 2003). Enfin, le CD82 peut aussi s'associer avec les récepteurs à activité tyrosine kinase pour réguler leur activité. En effet, CD82 peut augmenter l'internalisation de l'EGFR et ainsi atténuer l'activation du récepteur (Abe et al., 2008;

Odintsova et al., 2000b). CD82 s'associe aussi avec c-Met, le récepteur de l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) et empêche son activation (He, 2004; Sridhar and Miranti, 2005).

Comme décrit dans le chapitre précédent, CD82 est le récepteur de la protéine DARC qui est exprimée à la surface des cellules endothéliales. L'interaction de CD82 avec son ligand entrainerait l'adhérence aux cellules endothéliales puis la mort des cellules tumorales par sénescence (Bandyopadhyay et al., 2006). Ce mécanisme permet d'empêcher la diffusion des cellules tumorales qui doivent, pour métastaser, le contourner en réprimant l'expression de CD82.

### ***Co-029/Tspan8, CD151 et leurs capacités pro-tumorales***

Les premières expériences qui ont démontré un rôle de CD151 dans la formation de métastases reposent sur l'inhibition *in-vivo*, chez le poulet, de la formation de métastases, sans effet sur l'adhésion ou la prolifération, par le traitement avec un anticorps anti-CD151 (Testa et al., 1999). Depuis, le CD151 a été montré comme sur-exprimé dans les cancers du sein, de la prostate, du colon, du rein, du foie, de l'œsophage, du pancréas, corrélé à un mauvais pronostic, une survie plus faible et un taux de rechute plus élevé (Zöller, 2008; Richardson et al., 2010; Romanska and Berditchevski, 2010; Ang et al., 2004; Ke et al., 2009; Novitskaya et al., 2010; Tokuhara et al., 2001; Huang et al., 2010; Suzuki et al., 2011; Zhu et al., 2011; Yoo et al., 2011; Voss et al., 2011; Lin et al., 2011; Kwon et al., 2012). CD151 semble exercer son effet pro-tumoral en augmentant la mobilité, le pouvoir invasif mais aussi en augmentant la vascularisation tumorale et l'activité de certaines métalloprotéases. En effet, les expériences de sur-expression ou de déplétion par interférence ARN montrent que CD151 promeut la mobilité cellulaire et l'invasion. Il a été montré que l'utilisation d'anticorps anti-CD151 inhibe la migration des cellules HEP3 *in-vitro* et que, *in-vivo* chez le poulet, il empêche les cellules tumorales de quitter la tumeur primaire (Zijlstra et al., 2008). Le CD151 est impliqué dans la communication entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales et son niveau d'expression corrèle avec le degré de néovascularisation tumorale et avec la capacité des tumeurs à induire l'angiogenèse (Sadej et al., 2009; Shi et al., 2010).

Il a été suggéré par double hybride que le CD151 interagit avec MMP7 et que, dans des cellules de carcinome rénal CaR-1 et dans des cellules COS7 exprimant stablement CD151, il l'active et augmente la dégradation de la matrice extracellulaire. Sur des tissus humains de cancer du poumon, MMP-7 et CD151 sont co-localisés à la membrane des cellules (Shiomi et al., 2005). Il a également été montré dans des cellules de carcinomes hépatiques que

l'expression du CD151 augmente l'expression et la sécrétion de MMP-9 et que la forte expression de CD151 et MMP-9 corrèle avec une néoangiogenèse tumorale plus élevée (Shi et al., 2010).

Enfin, CD151 interagit avec les intégrines, régule leur activité et augmente la migration et l'invasion des cellules. CD151 est également impliqué dans le renforcement des adhésions cellule-cellule et cellule-matrice mais aussi dans leur internalisation. Ainsi, un traitement par des anticorps anti-CD151 entraîne une diminution de la migration dû à un défaut de détachement de l'arrière de la cellule (Zijlstra et al., 2008). Il apparaît difficile de concilier le fait que le CD151 augmente les interactions cellule-cellule et cellule-matrice avec le fait qu'il soit un promoteur de métastases mais une étude récente a montré que le CD151 peut amplifier la signalisation activée par les intégrines (notamment la voie PI3K) et induire la transition épithélium-mésenchyme pour permettre l'acquisition du phénotype migratoire et invasif (Ke et al., 2011).

Tspan8 a été pour la première fois découvert comme étant un antigène exprimé à la surface de cellules de cancer colique (Sela et al., 1989). Tspan8 a un rôle actif dans le développement des tumeurs, grâce notamment à son implication dans l'angiogenèse tumorale. En effet, il a été montré *in-vivo* dans des modèles souris de cancer pancréatique que Tspan8 promeut l'angiogenèse tumorale en stimulant la migration et la prolifération des cellules endothéliales, la formation de capillaires et la maturation des progéniteurs endothéliaux (Gesierich et al., 2006; Nazarenko et al., 2010). Enfin, l'expression de Tspan8 dans des cellules de cancer du pancréas entraîne une hémorragie autour de la tumeur primaire et des métastases ainsi qu'une coagulation intravasculaire disséminée (Claas et al., 1998).

Tspan8 est aussi impliqué dans la formation de métastases puisque son expression corrèle avec la formation de métastases dans les carcinomes hépatocellulaires et l'étude protéomique de tumeurs colorectales (métastatique et non métastatique) d'un même patient a montré une expression de Tspan8 restreinte à la tumeur métastatique (Le Naour et al., 2006b). De plus, il a été montré sur des tissus humains que l'expression de Tspan8 est induite dans les clones invasifs de mélanomes alors qu'il n'est pas exprimé dans les mélanocytes normaux ni dans les clones de mélanomes non invasifs (naevus bénins) (Berthier-Vergnes et al., 2011). Enfin, la transfection de Tspan8 dans des lignées non invasives augmente leur pouvoir métastatique et la survenue de métastases (Claas et al., 1998; Kanetaka et al., 2003; Berthier-Vergnes et al., 2011). Tspan8 peut aussi interagir avec les intégrines, comme par exemple l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  et la présence de ces deux protéines permet la formation d'un complexe qui augmente la

mobilité des cellules et entraîne la formation de métastases (Herlevsen, 2003). Il a enfin été démontré que Tspan8 peut interagir avec la E-cadhérine dans des lignées de cancers coliques et former un complexe avec la p120-caténine pour contrôler la migration cellulaire (Greco et al., 2010).

### **Tétraspanines et infections**

Il est maintenant bien établi que les tétraspanines sont utilisées par les pathogènes humains comme porte d'entrée et/ou de sortie pour infecter les cellules (van Sriel and Figdor, 2010). C'est le cas pour les virus tels que le virus d'immunodéficience acquise (VIH) ou le virus de l'hépatite C (VHC) mais aussi pour des parasites tel que l'agent responsable du paludisme. D'autres études montrant que des anticorps dirigés contre des tétraspanines bloquent l'infection par l'agent pathogène ont permis de montrer un rôle de certaines tétraspanines dans d'autres infections virales comme le virus de l'immunodéficience féline (FIV) , le VIH (Thali, 2011) et l'infection chez les canidés par le virus de la maladie de Carré (CDV, Canine Distemper Virus) (Löffler et al., 1997). Les tétraspanines sont également retrouvées intégrées dans la membrane des virions, comme cela a été démontré par une approche protéomique pour le virus de la grippe (Shaw et al., 2008) et pour le VIH (Chertova et al., 2006). L'exemple le mieux étudié et documenté est la relation entre le CD81 et le virus de l'hépatite C que je développerai plus en détail.

### ***Implications de CD81 dans l'infection par des pathogènes humains***

Le CD81 est impliqué dans différentes infections par des pathogènes humains comme HTLV-1, VIH-1, VHC ou *P. Falciparum*. Les exemples les mieux documentés sont l'implication dans l'infection par le VHC et par *P. Falciparum*.

## Le virus de l'hépatite C

Le VHC est un virus qui touche environ 3% de la population mondiale et provoque des pathologies hépatiques qui débutent par une hépatite pouvant évoluer en carcinome hépatocellulaire. Il a été montré que la grande boucle extracellulaire du CD81 est le récepteur de la protéine d'enveloppe E2 du VHC (Pileri et al., 1998; Rajesh et al., 2012). CD81 est un acteur indispensable pour l'entrée du virus puisque des anticorps anti-CD81 ou une forme soluble de la grande boucle extracellulaire sont capables d'inhiber l'entrée du virus, que la déplétion par ARN interférence de CD81 empêche l'infection des cellules HuH7 et que l'expression du CD81 dans les cellules HepG2, insensibles à l'infection, rends les cellules infectables (Zhang et al., 2004; Cai et al., 2005; Lindenbach et al., 2005; Pileri et al., 1998; Bartosch et al., 2003; Wakita et al., 2005).

Les mécanismes moléculaires permettant l'entrée du virus commencent à être décryptés. Lorsque les cellules sont infectées par le VHC ou incubées avec la protéine E2 soluble, CD81 et la claudine-1 sont internalisés par un mécanisme dépendant de la clathrine et des Rho-GTPases (Farquhar et al., 2012). De plus, il a également été montré que la fixation du VHC sur le CD81 peut induire la phosphorylation de l'EGFR qui est alors co-internalisé avec le CD81, ce qui permet l'entrée du virus qui reste fixé à CD81 (Diao et al., 2012). L'entrée du virus semble dépendante de l'internalisation de l'EGFR puisque le traitement avec des inhibiteurs de l'activité kinase de l'EGFR qui bloquent son internalisation inhibe l'infection (Lupberger et al., 2011; Diao et al., 2012). La phosphorylation de l'EGFR activée par le VHC semble indépendante des ligands de l'EGFR puisque des anticorps empêchant la fixation des ligands de l'EGFR n'ont pas d'effet sur l'entrée du VHC. Néanmoins, comme les ligands de l'EGFR induisent l'internalisation de l'EGFR, la stimulation par l'EGF accélère la cinétique d'entrée du VHC. Le CD81 semble être une protéine clé dans ce processus puisqu'il a été démontré que des anticorps empêchant la liaison du VHC sur CD81 et la déplétion par ARN interférence de CD81, qui ne perturbe pas les niveaux de surface d'EGFR, inhibent l'activation de l'EGFR induite par le VHC (Diao et al., 2012).

Enfin, le VHC est un virus dont le tropisme est très restreint puisqu'il n'infecte que l'homme et le chimpanzé. Il a été démontré chez la souris que l'expression de l'occludine et du CD81 humain représentait le récepteur minimum pour permettre l'entrée du virus puisque des souris exprimant ces protéines humaines deviennent alors infectables par le VHC (Diao et al., 2012).

## L'infection par le *plasmodium*

Les premières données sur l'implication de CD81 dans l'infection par *Plasmodium* ont été obtenues chez la souris, quand des souris KO pour CD9 ou CD81 ont été infectées avec *P.yoelii* (le pathogène responsable de la maladie chez la souris) et l'observation que les souris KO pour CD81 sont résistantes à l'infection alors que les souris KO pour CD9 sont sensibles. Des hépatocytes dérivés de ces souris KO ont permis de démontrer *in-vitro* que CD81 est aussi nécessaire pour la formation d'une vacuole parasitophore qui est indispensable à la différenciation du parasite et que des anticorps anti-CD81 humains sont capables de bloquer l'infection d'hépatocytes humains par *P. falciparum* (le pathogène responsable de la maladie chez l'homme) (Silvie et al., 2003). La transfection du CD81 mais pas du CD9 dans des cellules HepG2, qui ne contiennent pas de CD81 et sont résistantes à l'infection par le parasite, les rends sensible à l'infection par *P.Yoelii* (Silvie et al., 2006a). Une étude a montré que les hélices A et B de la grande boucle extracellulaire (LEL) du CD81 sont nécessaires et suffisantes pour permettre l'infection par *P. yoelii*. Des cellules HepG2, non infectables, transfectées avec une chimère CD9/CD81 ne contenant que les hélices A et B de la LEL du CD81 deviennent sensibles à l'infection par *P. yoelii* (Yalaoui et al., 2008). L'ensemble de ces données suggère que le CD81 est un facteur important pour l'infection de *P. yoelii* et *P.falciparum*.

## Implications dans les infections bactériennes

Les premières données qui ont suggéré un rôle des tétraspanines dans les infections bactériennes sont venues de la découverte que CD9 peut augmenter la fixation (augmente le nombre de sites de fixation) et l'efficacité (mesurée par l'inhibition de la synthèse protéique) de la toxine diphtérique (produite par *Corynebacterium diphtheriae*, responsable de la diphtérie) (Mitamura et al., 1992; Brown et al., 1993; Iwamoto et al., 1991). Le récepteur de la toxine est l'HB-EGF qui est en interaction directe avec le CD9, comme le révèle le pontage chimique entre ces deux protéines (Iwamoto et al., 1994) et des expériences de double hybride (Cha et al., 2000). L'interaction CD9/HB-EGF est spécifique puisque CD81, CD82 ou CD63 n'augmentent pas la sensibilité à la toxine. La grande boucle du CD9 est indispensable à l'interaction et à l'augmentation de la sensibilité à la toxine (Lagaudrière-Gesbert et al., 1997; Nakamura et al., 2000).

*In-vitro*, *Escherichia coli* peut adhérer à des plaques urothéliales bovines, humaines ou murines purifiées grâce à la lectine FimH (Wu et al., 1996). *In-vivo* et grâce à des images de microscopie électronique, il a été montré que les bactéries exprimant FimH sont capables de se fixer aux plaques urothéliales des souris en établissant des contacts directs (Mulvey et al., 1998). *In-vitro*, il a été montré que FimH se fixe préférentiellement à l'uroplakine Ia et que sa fixation induit un changement de conformation global du complexe UPIa/UIPb/UPII/UPIIa (qui est le composant de base des plaques urothéliales) qui pourrait permettre l'entrée des bactéries (Zhou et al., 2001; Wang et al., 2009). L'ensemble de ces données suggère que l'uroplakine Ia est le récepteur qui permet la fixation d'*Escherichia coli* à la surface de l'urothélium pour initier la colonisation bactérienne et provoquer des infections urinaires.

L'étude de l'effet des anticorps anti-tétraspanines, l'incubation avec des formes recombinantes solubles de la grande boucle extracellulaire des tétraspanines et des expériences de déplétion par ARN interférence ont permis d'établir que les tétraspanines CD9, CD63 et CD151 jouent un rôle dans l'adhésion de *Neisseria meningitidis*, l'agent infectieux responsable des méningites, alors que CD81 n'a pas d'effet (Green et al., 2011). Cette étude a également démontré qu'un mélange d'anticorps dirigés contre CD9, CD151 et CD63 ou un mélange des formes recombinantes solubles de la grande boucle extracellulaire de ces tétraspanines est capable de diminuer l'adhésion d'*E.coli*, *S.pneumoniae* et *S.aureus* aux cellules épithéliales, suggérant que les tétraspanines pourraient être plus largement utilisées par différents pathogènes. Un rôle de CD81 a également été suggéré dans l'entrée du pathogène *Listeria monocytogenes* (Tham et al., 2010).

Enfin, des tétraspanines sont exprimées à la surface de certains pathogènes et des études tentent d'utiliser ces tétraspanines comme vaccins. Il a par exemple été montré que l'immunisation de souris contre Tsp-1 et -2 qui sont des tétraspanines exprimées à la surface de *Schistosoma mansoni* les protège de l'infection et pourraient représenter des antigènes efficaces pour la vaccination chez l'homme (Tran et al., 2006). Une autre étude préliminaire a testé l'efficacité d'un vaccin ciblant Tsp-1 et -3 qui sont exprimées à la surface d'*Echinococcus multilocularis* (Dang et al., 2009).

# Les métalloprotéases de la famille ADAM

Les métalloprotéases de la famille ADAM ( $\alpha$ -Disintegrin And Metalloproteinase) sont des glyco-protéines transmembranaires de type I d'environ 750 acides aminés qui permettent le clivage et la libération dans le milieu extracellulaire de l'ectodomaine d'un grand nombre de protéines. Les ADAMs sont impliquées dans une grande variété de processus biologiques fondamentaux comme la terminaison de fonction (le clivage de la N-cadhérine permet la dissociation des adhérences intercellulaires (Reiss et al., 2005)), la sécrétion de facteurs solubles (cytokines, facteurs de croissance...) ou encore elles peuvent participer au relargage du domaine intracellulaire de protéines (Notch, APP).

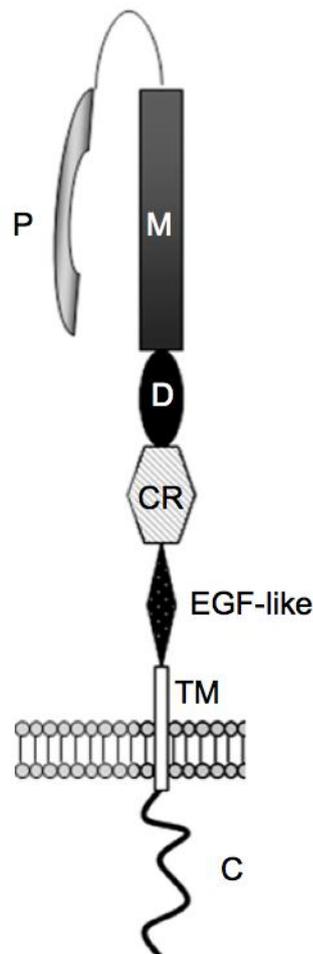


Figure 6 : **Schéma de l'organisation modulaire des ADAMs**

P= pro-domaine, M= domaine métalloprotéase, D= domaine désintégrine, CR= domaine cysteine-riche, TM= domaine transmembranaire, C= queue cytoplasmique.  
Adapté de (Edwards et al., 2008).

Les protéines de la famille ADAM ont été découvertes grâce à des études sur la fécondation et par analogie avec des métalloprotéases contenues dans le venin de serpent. Leur nom est d'ailleurs un clin d'œil à ces 2 domaines qui ont permis leur découverte mais est aussi dû à leur structure modulaire (Wolfsberg et al., 1995). En effet, les premières ADAMs de mammifères ont été découvertes à la surface des spermatozoïdes de cochon d'inde comme étant les deux sous-unités du complexe PH30 (Blobel et al., 1992). La sous-unité  $\beta$  de ce complexe, la Fertiline  $\beta$ /ADAM2, possède un domaine de fixation aux intégrines et le traitement par des anticorps anti-ADAM2 ou des peptides RGD empêche la fusion des gamètes. Les ADAMs sont présentes chez tous les métazoaires ainsi que chez *Saccharomyces pombe*. Aucune ADAM n'a pour le moment été retrouvée chez *Saccharomyces cerevisiae* ou chez les plantes. Les ADAM clivent un grand nombre de protéines (pour revue voir (Pruessmeyer and Ludwig, 2009)) et régulent un très grand nombre de processus biologiques : les interactions spermatozoïde-ovocyte, la migration cellulaire, le guidage axonal, le développement musculaire, le devenir cellulaire dans le système nerveux central, la réponse immunitaire et inflammatoire... Le clivage de l'ectodomaine des substrats des ADAM peut aussi être couplé à la protéolyse intramembranaire par les  $\gamma$ -sécrétases, comme c'est le cas, par exemple, pour Notch ou APP.

Les ADAM font partie des Metzincines : ces protéines sont caractérisées et tiennent leur nom de la présence de sites de fixation du zinc et d'un coude contenant une Méthionine appelé le Met-turn. Les ADAMs appartiennent à la sous-famille des métalloprotéases (ou métalloendopeptidases) qui sont des enzymes hydrolytiques dépendantes du Zinc. Ces protéines sont présentes dans tous les organismes. Parmi les métalloprotéases on distingue les Inverzincines et les Zincines, selon leur site de fixation au Zinc. Les ADAMs font partie des zincines et sont caractérisées par la présence de domaines conservés : le prodomaine, le domaine métalloprotéase, le domaine disintégrine, une région riche en cystéine, un domaine EGF-like (sauf pour ADAM10 et 17), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (figure 6).

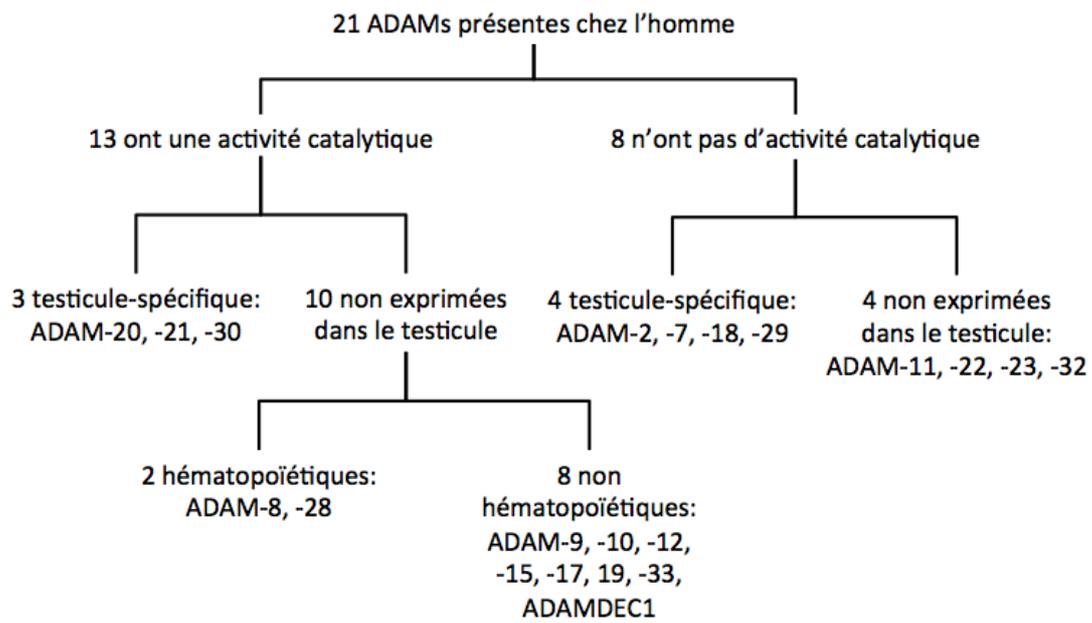


Figure 7 : **Arbre représentant les différentes ADAMs exprimées chez l'homme**

Classement des 21 ADAMs présentes chez l'homme, en fonction de leur activité catalytique et de leur expression tissulaire (Adapté de (Edwards et al., 2008))

## STRUCTURE DES ADAM

La cristallisation de l'ectodomaine ou de seulement le domaine métalloprotéase des ADAMs de mammifères ADAM-33, -12, -8, -17 et -10 a montré une conservation de structure du domaine Métalloprotéase/Désintégrine/Cysteine-rich qui adopte un repliement en C (voir figure 8) (Maskos et al., 1998; Liu et al., 2009; Orth et al., 2004; Hall et al., 2012; Janes et al., 2005). La structure est stabilisée par des ponts disulfures et la coordination de 3 ions Calcium (un dans le domaine métalloprotéase et 2 dans le domaine désintégrine).

### Le prodomaine

Le prodomaine a une double fonction : il inhibe l'activité catalytique de l'enzyme (Moss et al., 2007; Gonzales et al., 2004) mais permet également son bon repliement. Il a en effet été proposé au début des années 90 pour les MMP (Matrix-metalloproteinase), une autre famille de métalloprotéases, qu'une cystéine présente dans le prodomaine, grâce à un mécanisme de « cysteine-switch », permet le passage d'une forme inactive à une forme active (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990; Springman et al., 1990). Le « cysteine-switch » est une compétition pour la fixation de l'atome de Zinc : deux cystéines au sein d'une même protéine sont capables de fixer le zinc mais avec des affinités différentes. Dans le cas des MMPs, la cystéine présente dans le prodomaine a une affinité plus forte que celle du site actif et, tant que le prodomaine est présent, le zinc ne se fixe pas dans le site actif laissant l'enzyme inactive. Au cours de la maturation le prodomaine est retiré et la compétition pour l'atome de zinc levée, permettant sa fixation dans le site actif et l'activation de l'enzyme.

Une cystéine très conservée est présente dans le prodomaine des ADAMs. Par analogie avec les MMP, il a été proposé que le prodomaine exerce son pouvoir inhibiteur par un mécanisme de « cysteine-switch » en fixant préférentiellement l'atome de Zinc nécessaire au fonctionnement du site actif. Il a en effet été démontré que des peptides contenant le site consensus de fixation du Zinc présent dans le prodomaine ont un effet inhibiteur sur les ADAMs en séquestrant le Zinc, l'empêchant d'aller se fixer dans le site actif (Grams et al., 1993; Loechel et al., 1999). De plus, il a été montré pour ADAM12 que lorsque la cystéine permettant la coordination du zinc et le site de clivage du prodomaine sont mutés, l'enzyme est activée alors que son prodomaine est toujours présent (Loechel et al., 1999). Cela démontre que, au moins pour ADAM12, le clivage du prodomaine est nécessaire pour éloigner la cystéine du prodomaine qui fixe le Zinc au détriment du site actif. Néanmoins ce

mécanisme de « cysteine-switch » n'est pas le seul impliqué dans l'inhibition des ADAMs et d'autres zones du prodomaine, pas encore connues à ce jour, sont importantes (Milla et al., 2006). En effet, pour ADAM17 le clivage du prodomaine est nécessaire à la maturation et à l'activité de l'enzyme (Li et al., 2009; Peiretti et al., 2003), mais il a été montré que la cystéine du prodomaine n'était pas impliquée dans cette inhibition et qu'elle avait pour rôle d'augmenter la stabilité en protégeant de la dégradation (Li et al., 2009; Leonard et al., 2005). Dans le cas d'ADAM10, le prodomaine agit comme un inhibiteur compétitif et la mutation de la cystéine du prodomaine entraîne une perte de son action inhibitrice (Moss et al., 2007).

Le prodomaine est clivé lors du trafic de la protéine vers la membrane plasmique par des pro-protéines convertases localisées dans le réseau transgolgien (Nakayama, 1997) au site consensus de clivage RxR/KR (x étant n'importe quel acide aminé). Le clivage est pris en charge par les pro-protéines convertase comme par exemple la PC7 et la furine pour ADAM10 (Anders et al., 2001). Lorsqu'un mutant d'ADAM10 délété pour le prodomaine est exprimé, il n'a pas d'activité catalytique. Si l'on co-exprime le prodomaine avec ce mutant, on retrouve l'activité catalytique, montrant que le prodomaine a une activité de chaperon en *trans* (Anders et al., 2001). C'est également le cas pour ADAM-17, -12, -9 et -19 pour lesquelles la présence du prodomaine est nécessaire à l'activité catalytique ou au trafic (Loechel et al., 1999; Anders et al., 2001; Roghani et al., 1999; Kang et al., 2002). De plus il a été montré pour ADAM17 que la fixation du prodomaine est capable d'induire un changement de conformation qui rends le site actif plus accessible (Leonard et al., 2005).

## Le domaine MDC (Métalloprotéase/Désintégrine/Cysteine-rich)

Environ la moitié des ADAMs humaines ne sont pas actives enzymatiquement (pour revue voir (Edwards et al., 2008)). Des travaux de cristallographie (Orth et al., 2004; Liu et al., 2009; Maskos et al., 1998; Hall et al., 2012; Janes et al., 2005) ont permis de mettre en évidence une conservation de structure du site actif parmi les ADAMs mais aussi une variabilité quant aux zones avoisinantes avec l'insertion de boucles ou d'hélices- $\alpha$  qui modifient la surface du domaine catalytique, participant certainement à la spécificité de substrat. Par exemple, par rapport à ADAM33, ADAM17 présente l'insertion de 2 boucles supplémentaires, soulignées par des flèches dans la figure 9.

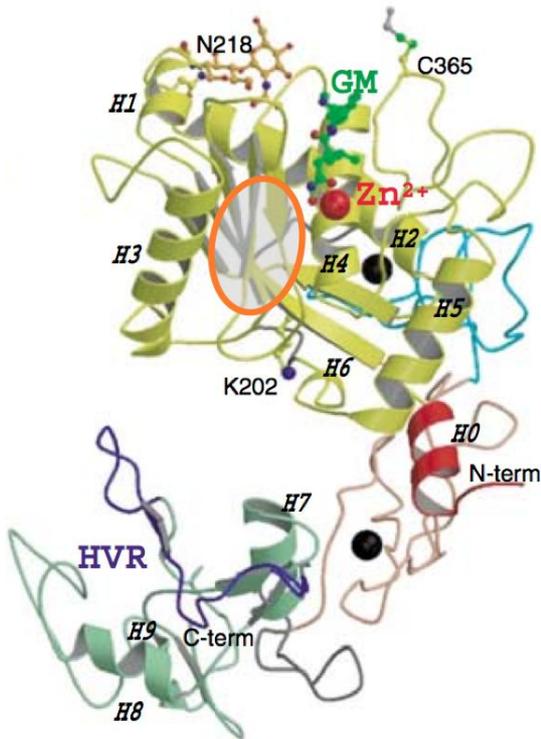


Figure 8 : **Structure du domaine MDC, conservé entre les SVMPs et les ADAMs**

Structure de VAP-1 (Vascular APoptosis-inducing factor-1), une métalloprotéase présente dans le venin de serpent (SVMP) qui possède la même architecture du domaine MDC que les ADAMs, complexée avec l'inhibiteur GM6001. Les hélices sont numérotées depuis l'extrémité N-terminale. Le repliement global en C est bien visible sur cette structure. HVR= domaine hyper-variable. Les sphères noires représentent les ions calcium. La poche de spécificité est indiquée par une ellipse rouge et grisée.

Adapté de (Takeda et al., 2006).

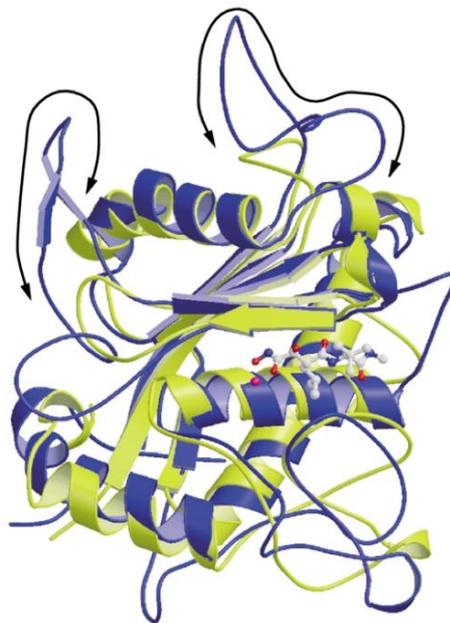


Figure 9 : **Comparaison des domaines métalloprotéase d'ADAM33 (en jaune) et d'ADAM17 (en bleu).** Les boucles supplémentaires uniquement présentes dans ADAM17 sont soulignées par des flèches (adapté de (Orth et al., 2004)).

Le domaine catalytique de l'enzyme est globulaire et peut être divisé en deux sous-domaines, séparés par le « Met-turn », une boucle qui permet de placer correctement la partie inférieure du site actif et qui contient une méthionine importante pour la coordination du zinc dans le site actif. La partie haute est constituée de 5 feuillets- $\beta$  et de 4 hélices- $\alpha$  tandis que la partie basse qui est peu structurée contient une hélice- $\alpha$  (figure 10). Trois ponts disulfures ainsi que la coordination d'un ion Calcium pour certaines ADAM permettent de stabiliser la structure. Le zinc est coordonné par 3 Histidines contenues dans la séquence consensus HExxHxxGxxH présente dans l'hélice 4 et une méthionine présente dans le « Met-turn ». Tous ces éléments sont strictement conservés chez toutes les ADAMs au cours de l'évolution. La poche de spécificité se situe entre ces deux sous-domaines. Le substrat y pénètre de façon parallèle aux feuillets  $\beta$ , de gauche à droite sur l'orientation de la figure 10B.

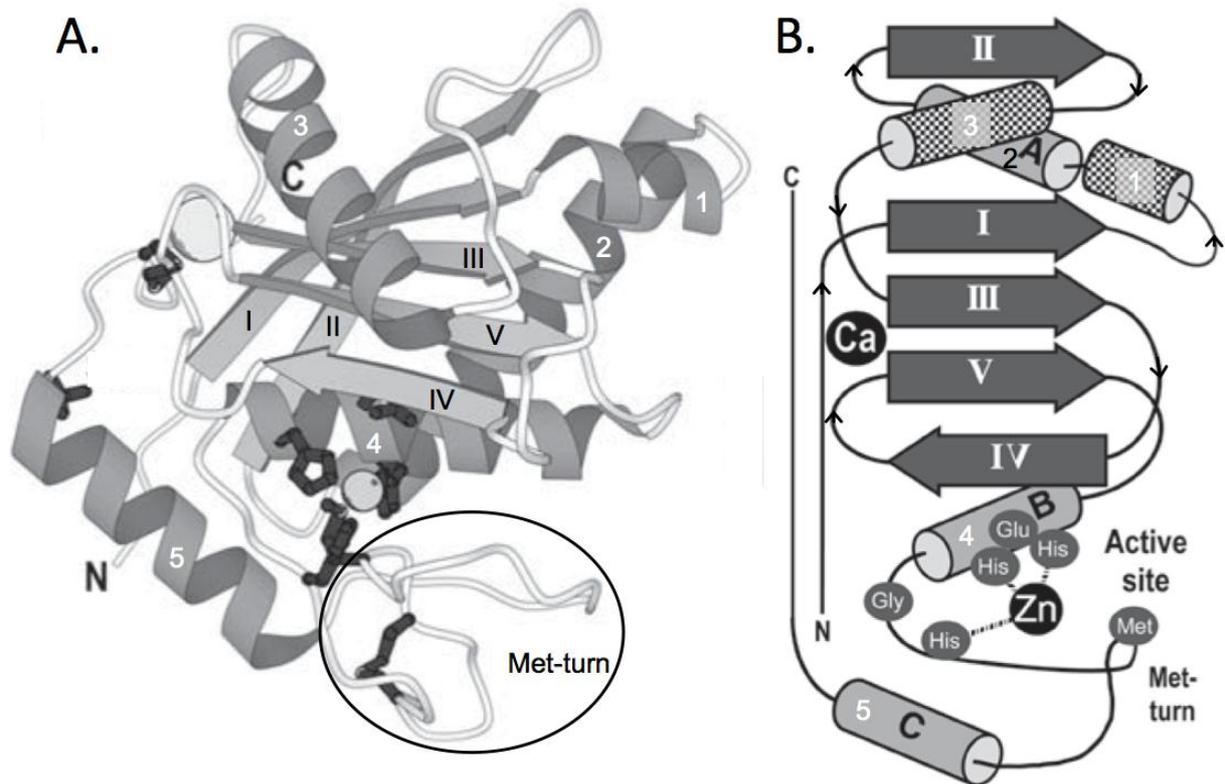


Figure 10 : **Domaine métalloprotéase des ADAMs** (Adapté de (Gomis-Rüth, 2003))

- (A) Structure cristallographique de l'adamalysine II, une métalloprotéase de la famille ADAM. La numérotation des hélices en chiffres blanc et des feuillets- $\beta$  en chiffres romains noirs correspond au schéma de droite.
- (B) Représentation schématique du domaine catalytique des ADAMs. Les hélices- $\alpha$  sont numérotées en chiffres blanc et les feuillets- $\beta$  en chiffres romains.

ADAM-10 et -17 partagent certains de leurs substrats mais une étude a permis d'identifier des différences dans leur poche de spécificité ainsi que dans leurs séquences de clivage en criblant des banques de peptides (figure 11) (Caescu et al., 2009).

**Acides aminés de la poche de spécificité (numérotation par rapport à la séquence d'ADAM17)**

	348	401	402	405	434	439	440
ADAM17	Leu	Leu	Val	His	Val	Ala	Val
ADAM10	Leu	Ile	Thr	His	Ile	Ala	Thr

	Acides aminés entourant le site de clivage dans la séquence du substrat							
	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
ADAM17	P (1,7)	R (1,9)	A (1,6)	A (1,7)	A (1,5)	V (3,1)	K (1,6)	G (1,6)
		H (1,6)	V (1,5)	S (1,5)		L (2,9)	V (1,5)	S (1,6)
		T (1,4)	T (1,5)	R (1,5)		I (1,8)	I (1,4)	K (1,5)
			M (1,4)	E (1,4)				
ADAM10	P (2,1)	T (2,2)	T (1,6)	S (1,6)	A (1,6)	L (3,6)	K (1,8)	G (2,1)
	A (1,5)	R (1,6)	A (1,5)	E (1,6)		Y (2,5)	R (1,6)	A (1,6)
		H (1,5)	H (1,4)	A (1,6)		F (2,0)	V (1,5)	
						Q (1,9)	T (1,4)	

Figure 11 : **Composition en acides aminés de la poche de spécificité et de la spécificité de substrat d'ADAM-10 et -17**

Les chiffres entre parenthèses présente la valeur de sélectivité. Plus cette valeur est forte plus le peptide contenant cet acide aminé à cet emplacement est clivé efficacement. Le clivage a lieu entre les résidus P1 et P1'. Adapté de (Caescu et al., 2009)

Les domaines Désintégrine et Cysteine-rich sont des domaines très peu structurés, ne contenant pas de structures secondaires. Ces domaines permettent l'interaction avec d'autres protéines, de façon indépendante du domaine catalytique, comme les syndécanes (Iba et al., 2000) ou encore la fibronectine. Les ADAMs peuvent également se lier aux intégrines présentes à la surface d'autres cellules, en *trans*, et participer à l'adhérence intercellulaire (Zigrino et al., 2011). Le domaine Désintégrine est sous-divisé en deux parties : le domaine D<sub>S</sub> (« shoulder », épaule) et D<sub>A</sub> (« arm », bras). La partie N-terminale du domaine cysteine-rich qui suit est appelée C<sub>W</sub> (« wrist », poignet). C'est l'ensemble D<sub>S</sub>, D<sub>A</sub> et C<sub>W</sub> qui donne le repliement en C de la molécule. Cette structure est stabilisée par des ponts disulfures et la coordination de 2 ions Calcium. Enfin, ce « bras » est terminé par le domaine C<sub>H</sub> (« hand », main) qui contient la partie hypervariable (HVR). Il a été proposé que ce domaine permette la reconnaissance de la cible (donnant la spécificité de substrat) et place le site actif de l'enzyme de façon à optimiser le clivage. En effet, ce domaine est le domaine le moins conservé entre les ADAMs. Ces données structurales ont permis à Takeda *et al* de proposer un modèle de fonctionnement des ADAMs (figure 12).

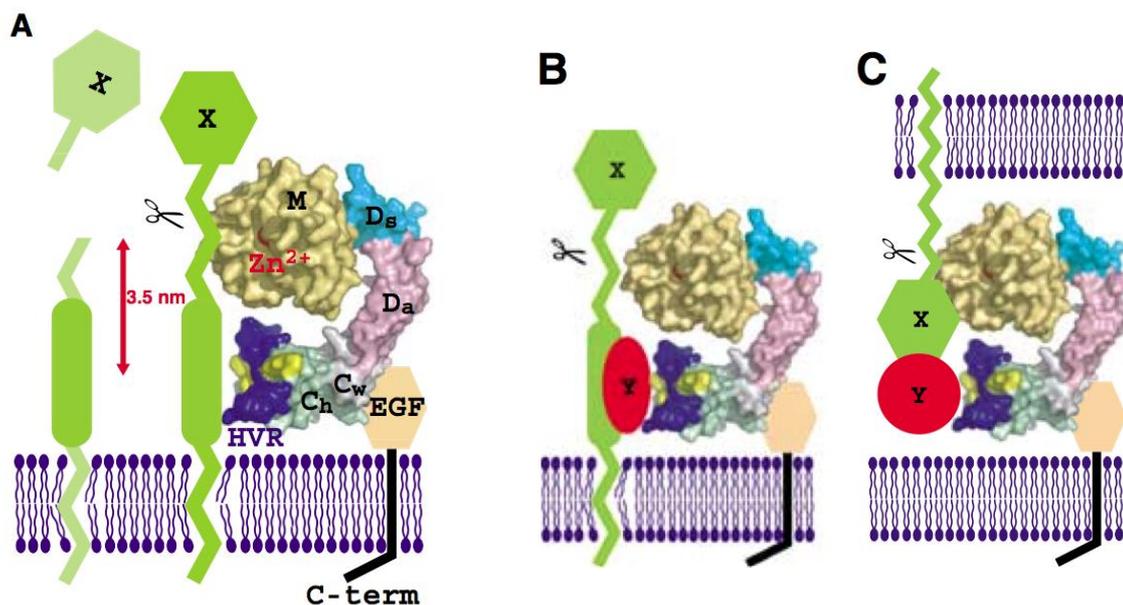


Figure 12 : **Modèles d'activation des ADAMs proposés par Takeda et al.**

- (A) Activation par reconnaissance du HVR de la protéine X cible qui place correctement le domaine métalloprotéase.
- (B) La reconnaissance de la protéine cible est médiée par une protéine adaptatrice Y
- (C) La reconnaissance se fait par une protéine adaptatrice et le clivage se fait en *trans*, sur une protéine située sur une cellule adjacente

Les domaines Désintégrine et Cysteine-rich permettent la régulation de l'activité catalytique et la liaison aux intégrines. La relation des métalloprotéases avec les intégrines vient également de l'étude des métalloprotéases contenues dans le venin de serpent : les SVMP (Snake Venom Metalloproteinases) possèdent une séquence RGD (motif de fixation des intégrines contenu notamment dans la fibronectine) dans un domaine appelé désintégrine. Grâce à ce motif, les SVMP interagissent avec  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (l'intégrine qui se lie au fibrinogène), empêchent l'agrégation plaquettaire et provoquent des hémorragies. Chez l'homme, seule ADAM15 possède le motif RGD présent dans son domaine désintégrine (Nath et al., 1999). En revanche, toutes les ADAMs à l'exception d'ADAM-10 et -17, présentent dans leur domaine désintégrine la séquence consensus R(X)<sub>6</sub>DLPEF qui permet la fixation de l'intégrine  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 (Eto et al., 2002). Cette séquence consensus est présente dans ADAM15, juste à coté de son motif RGD. Les interactions ADAM/intégrines sont indépendantes du domaine métalloprotéase et de l'activité enzymatique. Elles peuvent avoir d'importantes conséquences sur la migration, l'invasion, l'adhésion (Arribas et al., 2006) ou encore l'activité catalytique (Gooz et al., 2012).

ADAM10 peut également grâce à ses domaines Désintégrine/Cysteine-rich interagir avec d'autres protéines comme par exemple EphA3 qui est un récepteur à Tyrosine kinase. Une étude par Janes *et al* a montré qu'ADAM10 interagit avec EphA3 et peut cliver l'EphrinA5 située sur une cellule adjacente en *trans*. ADAM10 ne peut cliver l'Ephrine A5 qu'après sa fixation au récepteur EphA3. Cela montre que la fixation de protéines sur les domaines Désintégrine/Cysteine-rich peut moduler l'activité catalytique en provoquant, dans ce cas, un changement de conformation qui permet le bon placement du domaine catalytique pour avoir un clivage efficace (Weng et al., 2004). C'est aussi un mécanisme qui permet la spécificité de substrat d'ADAM10 pour l'Ephrine A5.

## Le domaine cytoplasmique

C'est le domaine le plus variable en taille et en séquence : il peut aller de 11 acides aminés pour ADAM11 à 231 pour ADAM19 (Seals and Courtneidge, 2003). On retrouve des motifs PxxP riches en proline qui sont des sites de fixation pour des protéines à domaines SH3, des résidus phosphorylables (sérine, thréonine ou tyrosine) qui peuvent servir à recruter des protéines à domaines SH2... Il existe une grande variété de protéines capables de se lier au domaine cytoplasmique des ADAMs (pour revue voir (Edwards et al., 2008)). Le domaine cytoplasmique peut interagir avec des protéines de signalisation (FAK (Fried et al., 2012; Böhm et al., 2009), Src (Stautz et al., 2010; Kang et al., 2000), la sous-unité p85 de la PI3K (Kang et al., 2001)...), des protéines adaptatrices (14-3-3 $\beta$  (Zhu et al., 2002b) et  $\zeta$  (Zhu et al., 2003), Grb2 (Stautz et al., 2012; Poghosyan et al., 2002; Suzuki et al., 2000)...), des protéines de la machinerie d'endocytose (PACSIN3 (Mori et al., 2003)), etc... Les ADAMs peuvent donc également être des échafaudages moléculaires auxquels se fixent d'autres protéines comme par exemple des protéines de signalisation, permettant de créer des zones de membrane spécialisées. Les protéines interagissant avec les ADAMs peuvent moduler l'activité catalytique, la localisation, l'état de phosphorylation et démarrer des voies de signalisation intracellulaires.

Le domaine cytoplasmique peut aussi être clivé pour avoir ensuite une activité de facteur de transcription. En effet, il a été montré qu'*in-vivo*, ADAM13 de xénope régule la migration des cellules de la crête neurale. La partie intracellulaire d'ADAM13 libérée par clivage protéolytique migre dans le noyau où elle active la transcription de la calpaïne 8 qui module la migration des cellules (Cousin et al., 2011). Il a également été montré, *in-vitro*, qu'ADAM10 peut être d'abord clivé par ADAM-9 ou -15 puis par le complexe  $\gamma$ -sécrétase, ce qui libère la partie cytoplasmique d'ADAM10. Ce fragment cytoplasmique est retrouvé dans le noyau, co-localisant avec des zones d'intense transcription génique, suggérant son activité de facteur de transcription (qui reste à démontrer) (Tousseyn et al., 2009).

Le domaine métalloprotéase est l'un des domaines les mieux conservés. Si l'on réalise un arbre phylogénétique des ADAMs humaines basé sur ce domaine métalloprotéase (cf figure 13), on peut s'apercevoir qu'ADAM-10 et -17 forment un groupe à part des autres ADAMs.

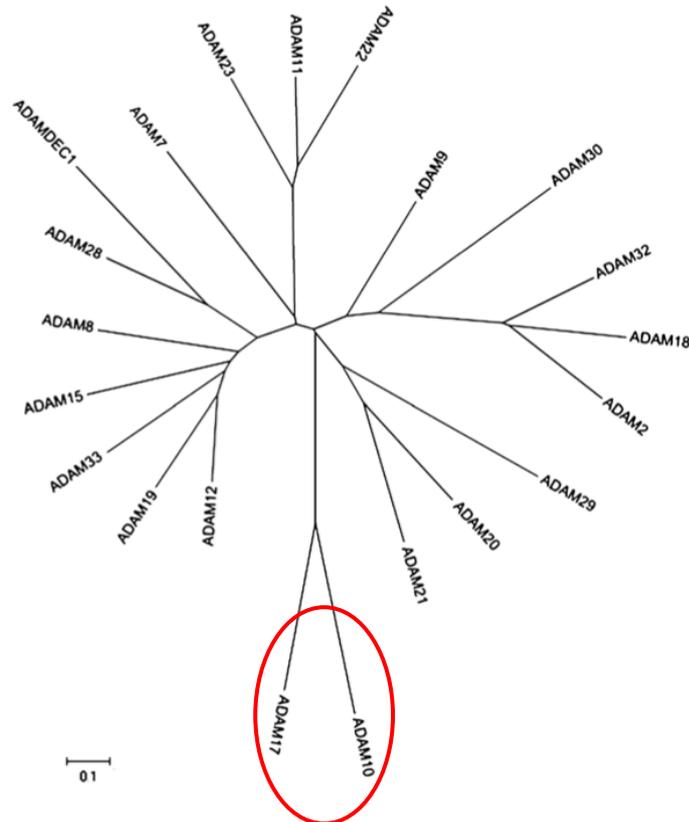


Figure 13 : **Arbre phylogénétique des ADAMs humaines**

Phylogénie basée sur la comparaison des domaines métalloprotéases des ADAMs humaines, montrant le regroupement d'ADAM-10 et -17 (Adapté de (Edwards et al., 2008))

ADAM10 est la protéase qui a été le sujet de nos études. Les parties suivantes s'attachent à détailler les fonctions et régulations physiologiques d'ADAM10 ainsi que son implication dans des pathologies humaines telles que le cancer.

## ADAM10, UNE METALLOPROTEASE A PART...

### Importance physiopathologique d'ADAM10

ADAM10 a été découvert dans des préparations de cerveau bovin comme étant une métalloprotéase pouvant dégrader la myéline . Il a ensuite été montré qu'elle est retrouvée dans la plupart des tissus, du développement embryonnaire jusqu'à l'âge adulte. ADAM10 est une protéine indispensable pour le développement embryonnaire chez la souris puisque le phénotype observé dans les souris KO est similaire à celui des souris perte de fonction de Notch, avec une mort embryonnaire précoce à E9.5, des anomalies cardiaques et vasculaires et une forte perturbation dans la formation et le développement du système nerveux.

ADAM10 est capable de cliver un grand nombre de substrats (cf figure 14 et pour revue voir (Pruessmeyer and Ludwig, 2009)) et participe à la régulation d'un grand nombre de processus biologiques fondamentaux parmi lesquels la migration et l'adhérence cellulaire ou encore la régulation de réactions immunitaires et de l'apoptose. Elle est par exemple impliquée dans les processus d'inflammation en régulant la perméabilité endothéliale et la transmigration des lymphocytes T par le clivage de la VE-cadhérine (Schulz et al., 2008). Il a été montré qu'ADAM10 régule l'intensité de la réponse allergique grâce au clivage du CD23, une protéine importante dans la réponse allergique (Lemieux et al., 2007; Weskamp et al., 2006). Enfin, ADAM10 pourrait être une nouvelle cible thérapeutique pour les patients souffrant d'asthme (inflammation chronique des poumons) car il a été démontré que l'inhibition d'ADAM10 bloque l'induction expérimentale de l'asthme dans un modèle souris (Mathews et al., 2011).

Il a été montré qu'ADAM10 est l' $\alpha$ -sécrétase impliquée dans le clivage d'APP dans des cultures primaires de neurones (Kuhn et al., 2010) et *in-vivo* chez la souris (Jorissen et al., 2010). De plus, l'activité d'ADAM10 influence directement les quantités de sAPP $\alpha$  (fragment soluble produit par le clivage en  $\alpha$  d'APP qui ne forme pas les plaques amyloïdes) et la formation des plaques- $\beta$  (produites par l'accumulation du fragment généré par le clivage en  $\beta$  d'APP) chez la souris (Jorissen et al., 2010; Kuhn et al., 2010; Tippmann et al., 2009; Kojro et al., 2001; Postina et al., 2004) mais aussi chez l'homme (Bekris et al., 2012). Ces données suggèrent qu'ADAM10 serait une bonne piste thérapeutique pour le traitement des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer. Un essai thérapeutique de phase 2 chez l'homme visant à augmenter l'activité d'ADAM10 par l'administration d'acitretine (voir le paragraphe sur la régulation par les acides rétinoïques) est d'ailleurs en cours.

GF/Cytokines	Récepteurs et molécules d'adhérence	Autres
amphiréguline	Axl	APP
CX3CL1	c-Met	Annexin A1
CXCL16	CADM1 (Cell Adhesion Molecule 1	APP-like protéine 2
Jam-A	CD23	Bri2
Pro-betacelluline	CD30	Collagène XVII
Pro-EGF	CD44	Delta-like ligand 1
TRANCE/RANKL	CD84	EphB2
	Desmogléine-2	Ephrine A5
	E-Cadhérine	Fas-ligand
	HER2/ErbB2	Klotho
	L1-CAM	LAG-3
	N-Cadhérine	MICA
	Nectine 1	PrPc
	Notch	Sortiline
	Proto-Cadhérine- $\gamma$ C3 et B4	
	RAGE	
	Récepteur à la Thyrotopine	
	VE-Cadhérine	

Figure 14 : **Substrats d'ADAM10**

Les souris KO pour ADAM10 présentent un phénotype Notch et meurent au stade embryonnaire avec des défauts de formation des systèmes nerveux et cardiovasculaires. Cela indique que l'une des principales, mais pas unique, fonction d'ADAM10 est de participer à l'activation de la voie Notch. Cette hypothèse a été confirmée grâce à l'étude de souris KO conditionnels dans lesquelles l'expression d'ADAM10 est éteinte de façon tissu spécifique et montre un phénotype similaire aux souris KO pour Notch. L'étude du phénotype des souris KO conditionnels ont permis de révéler des rôles majeurs d'ADAM10 dans différents tissus.

## Apport des souris KO conditionnels

Il existe des KO conditionnels pour les lymphocytes-B et -T, les cellules endothéliales, les neurones, les poumons, les kératinocytes et une souris KO inductible par le traitement avec des molécules chimiques.

La délétion dans les cellules endothéliales montre que l'activité d'ADAM10 est indispensable au développement du cœur et du système vasculaire (Zhang et al., 2010). En effet, Notch inhibe le branchement des vaisseaux pendant le développement de l'arbre vasculaire de la rétine (qui est considéré comme un modèle pour le développement du système vasculaire embryonnaire) et l'extinction d'ADAM10 entraîne une densification du réseau vasculaire (Glomski et al., 2011). ADAM10 est donc impliqué dans le remodelage du réseau vasculaire via son implication dans la voie Notch. Enfin, la délétion d'ADAM10 dans les cellules endothéliales induit une splénomégalie provoquée par l'augmentation du nombre de précurseurs érythroïdes (Glomski et al., 2011). Il est possible que les défauts dans la formation du système vasculaire conduisent à une hémolyse et donc à une anémie. L'augmentation de l'érythropoïèse dont la splénomégalie est une conséquence pourrait être une réponse permettant de compenser la baisse de globules rouges observée dans ces souris.

Le développement et/ou la différenciation des cellules-B et -T est dépendant d'ADAM10. En effet, la délétion d'ADAM10 dans les thymocytes entraîne une diminution de la différenciation en double positif (Tian et al., 2008). Néanmoins cet effet est moins prononcé que l'effet sur le développement des cellules-B de la zone marginale de la rate. En effet, dans les souris dont l'expression d'ADAM10 est déplétée dans les cellules-B, les cellules-B de la zone marginale de la rate sont très sévèrement diminuées avec un défaut dans leur différenciation (Gibb et al., 2010). ADAM10 est donc impliqué à différents niveaux dans la différenciation des lymphocytes-T et -B.

La délétion d'ADAM10 dans les cellules basales de l'épiderme conduit à la mort des souris 24h après leur naissance. Les souris présentent des défauts dans la formation de la barrière épidermale, de pigmentation de la peau, des vibrisses courtes et malformées, des défauts dans la formation des dents et une absence totale de poils et de glandes sébacées. ADAM10 est impliqué dans l'homéostasie de l'épiderme puisque sa délétion conduit à des défauts de différenciation et à une hyperprolifération des cellules basales. Dans des souris dont la délétion dans les kératinocytes est inductible, les mêmes défauts sont observés avec une perte totale des poils qui ne repoussent plus, une disparition des glandes sébacées et une hyperprolifération des cellules basales. Enfin, il a été montré que tous ces défauts sont dus à

une inhibition de la voie Notch. Dans l'épiderme, ADAM10 est la protéase indispensable pour l'activation de la voie Notch qui joue un rôle crucial dans le développement de l'épiderme et des organes associés (poils et glandes sébacées) ainsi que dans l'homéostasie épidermale (Weber et al., 2011). La déplétion d'ADAM10 dans les kératinocytes entraîne également une splénomégalie, une atrophie du thymus et des anomalies dans les ganglions lymphatiques.

Le traitement des souris KO inductibles d'ADAM10 par des acides polyinosique:polycytidilique permet la déplétion d'ADAM10 dans tous les tissus et entraîne l'apparition d'un syndrome myéloprolifératif. Les souris présentent une splénomégalie avec une augmentation de cellules myéloïdes, une disparition des lymphocytes T et une augmentation des cellules souches hématopoïétiques (c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>). Ces souris présentent également une forte inhibition dans l'activation de la voie Notch (Yoda et al., 2011).

Enfin, il existe également des souris KO conditionnels pour ADAM10 dans les progéniteurs neuronaux. La plupart de ces souris meurent pendant le développement embryonnaire et présentent de fortes hémorragies intracrâniennes ainsi qu'une forte désorganisation corticale. L'analyse des progéniteurs neuronaux des embryons a permis de montrer qu'ADAM10 est impliqué dans le maintien du compartiment souche car sa déplétion entraîne la différenciation prématurée des précurseurs neuronaux et la diminution du compartiment souche. ADAM10 est également important dans la migration mais pas dans la prolifération et sa déplétion entraîne l'inhibition de la voie Notch. Les précurseurs neuronaux donnent également naissance aux cellules gliales. La déplétion d'ADAM10 entraîne une augmentation de la différenciation en neurones au détriment des cellules gliales indiquant que l'activité d'ADAM10 est nécessaire pour la différenciation en cellules gliales. Enfin, la déplétion d'ADAM10 entraîne une diminution dans la quantité de sAPP $\alpha$ , indiquant qu'ADAM10 est la principale  $\alpha$ -sécrétase d'APP (Jorissen et al., 2010). L'ensemble de ces données démontre qu'ADAM10 est indispensable à la signalisation Notch et au développement du système nerveux central et qu'il est la principale  $\alpha$ -sécrétase responsable du clivage d'APP en  $\alpha$ . Néanmoins, les fonctions protectrices d'ADAM10 dans le système nerveux central ne se limitent pas à la régulation de la voie Notch.

## Rôle d'ADAM10 dans le système nerveux central

ADAM10 a une activité neuro-protective dans le système nerveux central : il permet de cliver la protéine Prion cellulaire (PrP<sup>c</sup>, responsable de la maladie de Creutzfeldt-Jakob) (Altmeyden et al., 2011) et protège de la formation de plaque amyloïde en clivant APP en  $\alpha$ . ADAM10 permet aussi la croissance et le guidage axonal (Chen et al., 2007b) : ADAM10 clive l'éphrine (molécule impliquée dans le guidage axonal) lorsqu'elle est liée à son récepteur, permettant la terminaison de fonction (Janes et al., 2005). De part le clivage d'autres protéines neuronales, comme la sortiline ou la N-cadhérine, ADAM10 est aussi impliqué dans la plasticité synaptique (Donmez et al., 2010; Gardoni et al., 2012). Enfin, de par son implication dans l'activation de la voie Notch (qui sera discutée plus loin), ADAM10 participe également au maintien d'un compartiment de cellules souches neuronales (Imayoshi et al., 2010).

## ADAM10 et cancer

ADAM10 est également impliqué dans la progression des cancers, son expression est augmentée dans les cancers gastriques et colorectaux, est corrélée avec le grade de la tumeur et est de mauvais pronostic (Wang et al., 2011; Knösel et al., 2005). Il a également été montré qu'ADAM10 peut passer dans le noyau et que ce phénomène est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer de la prostate (Arima et al., 2007).

ADAM10 est impliqué dans le cancer par la régulation de quatre processus fondamentaux dans la progression tumorale : la migration, la prolifération, l'invasion et l'échappement du système immunitaire. L'implication d'ADAM10 passe, dans la majorité des cas, par le clivage de protéines impliquées dans la progression tumorale. Dans les leucémies lymphoblastiques T aiguës, l'activation par ADAM10 d'une forme mutante de Notch indépendante de la fixation du ligand est un des événements oncogéniques majeurs (Sulis et al., 2011). Des protéines impliquées dans l'adhésion cellule-cellule et/ ou cellule-matrice comme L1-CAM, la E- ou N-cadhérine, le CD44 sont importantes pour la migration et/ou l'invasion des cellules et leur clivage par ADAM10 est une étape dans la progression tumorale (Gavert et al., 2007; Dittmer et al., 2009; Riedle et al., 2009; Kohutek et al., 2009). D'autres protéines comme les facteurs de croissance de la famille de l'EGF (Epidermal

Growth Factor) (Sahin et al., 2004) sont capables de se fixer et d'activer le récepteur de l'EGF qui est impliqué dans la prolifération des cellules et la migration. Le récepteur HER2/ErbB2, de la même famille que l'EGFR, par ailleurs souvent sur-exprimé dans les cancers, contribue à l'apparition et au développement de tumeurs et peut être clivé par ADAM10 (Liu et al., 2006). Ce clivage de l'ectodomaine aboutit à la formation d'un récepteur constitutivement actif qui permet l'activation de la signalisation indépendamment de la fixation du ligand (Christianson et al., 1998). ADAM10 permet également aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire en clivant MHC class I-related chain A (MICA) qui est une protéine impliquée dans l'activation des cellules NK.

## Les mécanismes de régulation d'ADAM10

### La régulation transcriptionnelle et traductionnelle

L'ARN messenger (ARNm) d'ADAM10 comporte une région 5' non traduite (5'UTR) de 444 nucléotides. Grâce à des délétions de différentes régions du 5'UTR, il a été montré qu'il a un rôle inhibiteur de la traduction d'ADAM10 puisque la transfection d'une construction délétée pour les 259 premiers nucléotides du 5'UTR entraîne la détection en western-blot d'une quantité de protéines 100 fois supérieure par rapport à des cellules transfectées avec une construction d'ADAM10 contenant le 5'UTR complet. De plus, une construction contenant le 5'UTR d'ADAM10 en amont de la luciférase est quatre fois moins active qu'une construction ne contenant pas le 5'UTR d'ADAM10 en amont de la luciférase (Lammich et al., 2010). Il a ensuite été démontré par la même équipe qu'un G-quadruplex (voir figure 15) est formé dans les 155 premiers nucléotides de la région 5' UTR, formant un obstacle au passage des ribosomes. Néanmoins, l'expression d'une construction délétée pour les 155 premiers nucléotides n'aboutit qu'à une augmentation de 9 fois de la quantité de protéine (Lammich et al., 2011). Il apparaît donc que la région 5'UTR du transcrit d'ADAM10 ait un rôle d'inhibiteur puissant de la traduction qui est expliqué, en partie, par la présence de structures secondaires complexes en quadruplex.

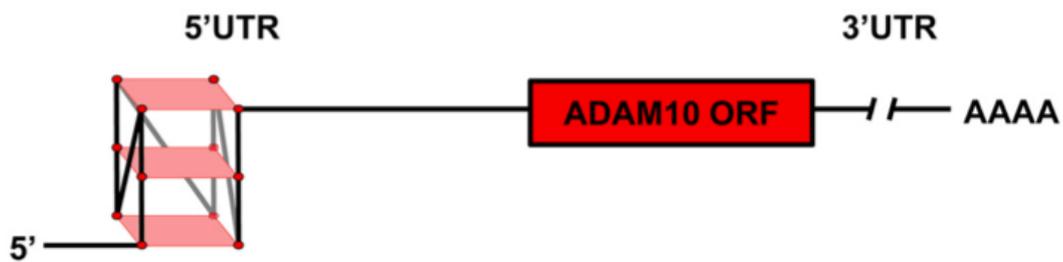


Figure 15 : **Représentation schématique de l'ARNm d'ADAM10**

Schéma présentant la structure secondaire en G-quadruplex formée par les 155 premiers nucléotides du 5'UTR d'ADAM10. ORF= cadre ouvert de lecture, UTR= région non traduite (Adapté de (Lammich et al., 2011))

La quantité d'ARNm d'ADAM10 peut aussi être régulée par les hormones. En effet, lorsque des cellules LnCaP sont traitées avec de l'insulin growth factor 1 (IGF1) on observe une réduction de la quantité d'ARNm. Quand les cellules sont traitées avec de faibles doses de  $5\alpha$ -dihydrotestostérone, la quantité d'ARNm augmente. Si des concentrations plus fortes (10nM) sont utilisées on a alors une diminution (McCulloch et al., 2000). Par contre, si une forte concentration de  $5\alpha$ -dihydrotestostérone est utilisée en combinaison avec l'IGF1, alors la quantité d'ARNm augmente fortement (McCulloch et al., 2004). La régulation de la quantité d'ARNm d'ADAM10 est donc un système intégratif qui adapte, selon les stimuli, la transcription d'ADAM10. Enfin, la stimulation par la  $5\alpha$ -dihydrotestostérone a aussi des répercussions sur la protéine puisqu'elle entraîne un changement de localisation de la forme mature d'ADAM10 qui s'associe avec le récepteur aux androgènes pour migrer dans le noyau (Arima et al., 2007). Cette translocation est impliquée dans la progression du cancer de la prostate et corrèle avec le grade des tumeurs (Arima et al., 2007). En effet, la forme mature d'ADAM10 est exprimée à la membrane des cellules normales mais est retrouvée dans le noyau des cellules tumorales de patients souffrant de cancer de la prostate (McCulloch et al., 2004).

### *La régulation par l'acide rétinoïque et ses dérivés*

En 2005, des études sur la structure du gène codant pour ADAM10 ont permis la découverte de 2 sites de réponse aux acides rétinoïques (dérivés de la vitamine A) (Prinzen et al., 2005). Cette observation est particulièrement intéressante car elle fait le lien entre 2 défauts observés chez les patients souffrants d'Alzheimer : défaut dans le métabolisme de la vitamine A et baisse de l'activité  $\alpha$ -sécrétase. Ce mode de régulation a donc une potentialité thérapeutique et l'utilisation de l'acitretin, un rétinoïde de synthèse déjà utilisé pour le traitement de maladie de peau comme le psoriasis, est actuellement en essai clinique de phase 2 en Allemagne. En effet, il a été montré chez la souris que l'injection d'acitretin en intracrânien permet d'augmenter la transcription d'ADAM10 et de diminuer l'accumulation de plaques amyloïdes. C'est le récepteur à l'acide rétinoïque  $\beta$  (RAR $\beta$ ) qui est impliqué dans la régulation de la transcription d'ADAM10 (Tippmann et al., 2009).

### *La régulation par les sirtuines*

Les sirtuines, sont des déacétylases NAD<sup>+</sup>-dépendante qui participent à la réponse aux stress et peuvent augmenter la transcription d'ADAM10. Lorsque SIRT1 (sirtuine 1) est sur-exprimé dans un modèle souris de la maladie d'Alzheimer, l'accumulation de plaques amyloïdes (responsables de la maladie) est réduite grâce à une augmentation de l'activité  $\alpha$ -sécrétase. SIRT1 permet la déacétylation du RAR $\beta$ , ce qui aboutit à l'augmentation de la transcription d'ADAM10 (Donmez et al., 2010). L'activité enzymatique de SIRT1 est induite par la restriction calorique ainsi que par les polyphénols (comme par exemple ceux contenus dans le vin ou le thé) et des souris modèles de la maladie d'Alzheimer dont le régime est supplémenté en resveratrol présente une diminution de la formation de plaques amyloïdes (Obregon et al., 2006; Karuppagounder et al., 2009). Ainsi, ces études ouvrent un nouveau champ d'essai thérapeutique basé sur l'augmentation de l'expression d'ADAM10 et de l'activité  $\alpha$ -sécrétase comme remède à la maladie d'Alzheimer.

### *Régulation par les micro-ARNs*

Les micro-ARN sont de petits ARN non codants d'environ 21 nucléotides qui jouent un rôle dans la régulation de l'expression d'un très grand nombre de protéines en empêchant la traduction ou en déstabilisant les ARNm. Ils sont souvent trouvés dérégulés dans les pathologies humaines et notamment dans le cancer (pour revue voir (Calin and Croce, 2006)).

miR-122 est un micro-ARN spécifique du foie, chez la souris et chez l'homme. Son expression est forte dans les tissus sains mais est souvent retrouvée diminuée dans les carcinomes hépato-cellulaires (HCC) et sa perte est corrélée à une augmentation du pouvoir métastatique et à un mauvais pronostic pour le patient (Tsai et al., 2009; Coulouarn et al., 2009). La région 3'UTR d'ADAM10 comporte des sites de liaison pour miR-122. Il a en effet été démontré que miR-122 peut se fixer au 3'UTR d'ADAM10 et réguler négativement la transcription du gène. En accord avec cette observation, ADAM10 est souvent sur-exprimé alors que miR-122 est lui trouvé sous-exprimé dans des échantillons de HCC primaires humains (Bai et al., 2009). La perte d'expression de miR-122 pourrait être l'une des étapes de la progression tumorale des HCC (Hsu et al., 2012; Coulouarn et al., 2009). Une étude récente a identifié 3 nouveaux miRNA (miR-103, miR-107, miR-1306 ) pouvant se fixer et réguler ADAM10 (Augustin et al., 2012).

## Régulations post-transcriptionnelles

### *Régulation par clivage protéolytique*

Tousseyn *et al* ont montré que le milieu de culture de fibroblastes contient l'ectodomaine d'ADAM10 qui est toujours capable de cliver un peptide portant le site de clivage par l' $\alpha$ -sécrétase. Ils ont également retrouvé dans les extraits cellulaires une bande d'environ 10kDa ne réagissant qu'avec les anticorps anti-ADAM10 dirigés contre la partie C-terminale et restant associée à la membrane (ADAM10-CTF, ADAM10 C-Terminal Fragment). Ces fragments ne sont pas retrouvés quand les mêmes expériences sont faites avec des fibroblastes issus de souris KO pour ADAM10. L'ADAM10-CTF est retrouvé *in-vivo* dans le cerveau, le foie, les poumons, le cœur et les reins des souris adultes et des embryons. Dans le cerveau des souris KO pour ADAM9 et double KO pour ADAM-9 et -15, on observe une forte réduction de la quantité d'ADAM10-CTF. L'ADAM10-CTF est un substrat du complexe  $\gamma$ -sécrétase qui libère la partie intracellulaire d'ADAM10 (ADAM10-ICD, ADAM10-IntraCellular Domain). L'ADAM10-ICD migre dans le noyau pour co-localiser avec des zones de forte transcription génique (Parkin and Harris, 2009; Tousseyn et al., 2009). Il n'est pour le moment pas établi d'activité transcriptionnelle pour l'ADAM10-ICD. Il a néanmoins été démontré chez la souris que la sur-expression d'ADAM10 ou d'un mutant sans activité catalytique peuvent induire un changement d'expression génique dans le cerveau (Prinzen et al., 2009). Enfin, l'ADAM10-ICD a été démontré comme nécessaire à la réplication du virus

d'immunodéficience acquise 1 (VIH1). L'ADAM10-ICD est nécessaire au transport du matériel génétique du virus dans le noyau des macrophages ou des cellules CD4<sup>+</sup>, permettant ainsi la réplication du virus (Friedrich et al., 2011).

### *Régulation par les inhibiteurs endogènes : les TIMPs et RECK*

Les TIMP-1 et -3, inhibiteur tissulaire de métalloprotéase (TIMP, Tissue-Inhibitor of Metalloproteinases), ainsi que RECK (REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs) sont des inhibiteurs endogènes d'ADAM10. Les TIMPs sont des inhibiteurs sécrétés alors que RECK est une protéine membranaire à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol).

RECK est impliqué dans la régulation de l'activité des ADAMs mais aussi des Matrix MetalloProteinases (MMP) et son expression est associée à un bon pronostic dans les cancers colorectaux, du sein, du poumon et du pancréas (Masui et al., 2003; Span et al., 2003; Takenaka et al., 2004; Takeuchi et al., 2004). En effet, il est présent dans un grand nombre de tissus sains mais son expression est inhibée par méthylation de son promoteur dans les cancers (Chang et al., 2007). Les souris KO pour RECK ont pour phénotype une différenciation précoce de leurs précurseurs neuronaux qui présentent une inactivation de la voie Notch associée à une perte de la capacité d'auto-renouvellement (Muraguchi et al., 2007). Il a été montré que ce phénotype, dans des fibroblastes issus de souris KO pour RECK, pouvait être annulé en traitant les cellules avec des inhibiteurs d'ADAM10 et 17 (GW280264X et GI254023X). En effet, il a été ensuite démontré par des expériences de co-expression que RECK agit en inhibant le clivage de Dll1 (ligand de Notch) par ADAM10, permettant une activation normale de la voie Notch (Muraguchi et al., 2007).

Contrairement à RECK, l'expression de TIMP-1 dans les tumeurs est corrélée à une augmentation du pouvoir métastatique, une résistance aux traitements par chimiothérapie et un mauvais pronostic pour le patient (McCarthy et al., 1999; Ree et al., 1997; Min et al., 2012; Pesta et al., 2011; Zhu et al., 2012; Lee et al., 2011). TIMP-1 est une molécule de 184 acides aminés qui interagit avec le domaine métalloprotéase des MMPs et des ADAMs. Il exerce son activité inhibitrice en prenant la place du substrat, c'est-à-dire en obstruant le site actif (Gomis-Rüth et al., 1997). Dans le cancer du foie, TIMP-1 entraîne l'induction de la signalisation HGF, augmentant le pouvoir métastatique des tumeurs hépatiques (Schelter et al., 2011; Kopitz et al., 2007). Cela montre que l'inhibition des ADAMs peut avoir des effets opposés.

### Régulation par les GPCR

Les GPCR (G-Protein Coupled Receptor) sont une famille de récepteurs à 7 passages transmembranaires qui peuvent être activés par une grande variété d'agonistes (ligands de l'EGFR, acétylcholine, sérotonine, caféine, nicotine...). Les GPCR peuvent être impliqués dans des phénomènes de transactivation. La première démonstration a été faite par Daub *et al* qui ont montré que la fixation d'agonistes (tels que l'endothéline 1, l'acide lysophosphatidique ou la thrombine) de GPCR peut induire une phosphorylation du récepteur de l'EGF (EGFR) et activer la signalisation en aval du récepteur (Daub et al., 1996).

La majorité des agonistes des GPCR nécessite l'activité d'ADAM17 (pour revue voir (Edwards et al., 2008)). Yan *et al* ont néanmoins démontré que la transactivation de l'EGFR après stimulation par la bombésine est dépendante de l'activité enzymatique d'ADAM10 puisque l'expression d'un mutant sans activité catalytique diminue l'activation de l'EGFR (un agoniste de GPCR). Ils ont enfin démontré que la stimulation par la bombésine entraîne la formation d'un complexe CD9/HB-EGF/ADAM10 qui augmente la sécrétion d'HB-EGF par ADAM10 et active l'EGFR (Yan et al., 2002). L'activation d'ADAM10 par les GPCR n'a pas seulement un impact sur l'EGFR. En effet l'activation du GPCR PAC<sub>1</sub> par son agoniste PACAP38 (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) entraîne une augmentation de la sécrétion ADAM10-dépendante du fragment  $\alpha$  soluble d'APP (sAPP $\alpha$ ) (Kojro et al., 2006). La stimulation par PACAP38 peut aussi stimuler le clivage par ADAM10 de RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products), une protéine impliquée dans la maladie d'Alzheimer (le peptide A $\beta$  contenu dans les plaques amyloïdes est un ligand de RAGE) et les maladies inflammatoires. La production du fragment soluble de RAGE (sRAGE) a un intérêt thérapeutique car il permet de capter les ligands de RAGE et de les empêcher d'enclencher la signalisation en se fixant sur leur récepteur. Ainsi, l'administration intranasale de PACAP38 à des souris entraîne l'augmentation du clivage ADAM10-dépendant de RAGE (Metz et al., 2012).

Néanmoins, les mécanismes entre l'activation du GPCR et l'activation d'ADAM10 ne sont pas connus à ce jour.

### Régulation par les flux de calcium

La première démonstration que le calcium joue un rôle dans la régulation du clivage par les métalloprotéases date de 1999, quand Ito *et al* ont observé que le traitement de cellules avec la ionomycine (ionophore qui permet d'augmenter la concentration de calcium intracellulaire) augmente fortement le clivage de la E-cadhérine dépendant des métalloprotéases (Ito et al., 1999; 1999). L'activation du clivage par les métalloprotéases par l'élévation du calcium intracellulaire est maintenant un mécanisme connu et répandu, comme c'est le cas pour de nombreux substrats d'ADAM10 comme RAGE, N- et VE-cadhérine, les ligands de l'EGFR (TGF $\alpha$ , HB-EGF), la beta-celluline, CX3CL1 et CXCL16, le récepteur EphB2, la Nectine 1, le collagène XVII ou encore CD44 (Litterst et al., 2007; Galichet et al., 2008; Le Gall et al., 2009; Horiuchi et al., 2007; Sanderson et al., 2005; Uemura et al., 2006; Schulz et al., 2008; Hundhausen et al., 2007; Franzke et al., 2009; Pan et al., 2012; Kim et al., 2010).

### Régulation par la compartimentation et le trafic membranaire

Il a été démontré que pour le clivage d'APP, l'activité d'ADAM10 est sensible à la composition en lipides de la membrane plasmique. En effet la déplétion du cholestérol entraîne une augmentation de son activité alors que son adressage aux radeaux lipidiques (zone riche en cholestérol) avec des protéines de fusion à ancre GPI la diminue (Kojro et al., 2001; 2010; Harris et al., 2009). Wang *et al* ont étudié l'impact d'un régime enrichi en cholestérol sur la formation de plaques amyloïdes dans la rétine de souris et ont observé que le cholestérol augmente la formation de plaques *in-vivo* (Wang et al., 2012b). *In-vitro*, des cellules de rétines de souris ont été cultivées ou non avec du cholestérol dans leur milieu de culture et la quantité d'ARNm et l'activité des différentes enzymes impliquées dans le clivage d'APP ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -sécrétase) a été mesuré. Ils ont ainsi démontré que la supplémentation en cholestérol dans le milieu de culture de ces cellules entraîne une diminution des ARNm d'ADAM-10 et -17 et de l'activité  $\alpha$ -sécrétase alors que l'ARNm et l'activité des  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétase sont inchangés, démontrant une implication du cholestérol dans la régulation des  $\alpha$ -sécrétases (Wang et al., 2012b).

Les tétraspanines sont des protéines qui permettent la compartimentation de la membrane plasmique. ADAM10 a été retrouvé associé au « Tetraspanin Web » dans des études de spectrométrie de masse (Le Naour et al., 2006b). Il a ensuite été démontré dans le laboratoire que la stimulation par des anticorps anti-tétraspanines (CD9, CD81 et CD82) est capable

d'induire une augmentation de la sécrétion d'EGF et de TNF $\alpha$  dépendante de l'activité d'ADAM10 (Arduise et al., 2008). La stimulation par les anticorps n'entraîne pas de changements d'association d'ADAM10 avec les tétraspanines. Le TNF $\alpha$  est un substrat d'ADAM17. Ces données indiquent que la stimulation des tétraspanines avec des anticorps peut réguler la spécificité de substrat d'ADAM10. En effet, ADAM10 a la potentialité de cliver certains des substrats d'ADAM17 lorsque celui-ci est absent (Mezyk-Kopeć et al., 2009) mais ce clivage reste secondaire quand ADAM17 est présent (Le Gall et al., 2009). L'expression de la tétraspanine Tspan12 peut aussi augmenter la maturation d'ADAM10 et le clivage d'APP (Xu et al., 2009).

L'activité d'ADAM10 est aussi régulée par la localisation subcellulaire de l'enzyme. Des protéines s'associant à ADAM10 sont capables de changer sa localisation. C'est le cas par exemple de SAP97 dans le système nerveux central qui interagit via son domaine SH3 avec les régions riches en proline du domaine cytoplasmique d'ADAM10 et permet son adressage au compartiment post-synaptique après une stimulation NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique) (Marcello et al., 2007). De plus, le domaine cytoplasmique d'ADAM10 contient un motif riche en arginines qui est impliqué dans la rétention de la protéine dans le réticulum. Le remplacement des arginines au sein de ce motif par des alanines permet la sortie d'ADAM10 du réticulum (Marcello et al., 2010).

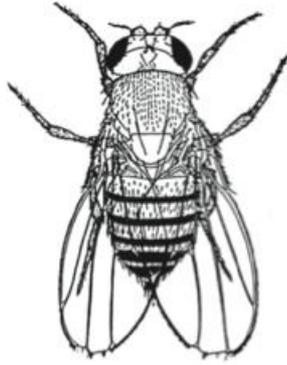
# La signalisation Notch

---

Pendant le développement embryonnaire ainsi que durant toute la vie des organismes pluricellulaires, des processus assurent la production de cellules matures et fonctionnelles mais aussi le maintien de cellules dites souches. La voie Notch est l'une des voies qui contrôle à la fois les processus de différenciation et les processus de maintien du phénotype souche. Elle agit comme un médiateur, permettant la communication entre cellules adjacentes et permet d'adapter le comportement de la cellule à un contexte particulier. Elle peut déclencher la mort cellulaire, augmenter ou inhiber la prolifération, permettre la différenciation ou au contraire le maintien d'un phénotype souche et permet ainsi le maintien de l'homéostasie des tissus. C'est une voie indispensable au développement embryonnaire et à la mise en place du système nerveux central.

L'activation de la voie Notch a lieu entre deux cellules voisines, l'une étant réceptrice (c'est la cellule qui exprime le récepteur) et l'autre émettrice du signal (c'est la cellule qui porte le ligand du récepteur). La transmission du signal requiert un contact physique entre les cellules : l'activation se passe en *trans*, le ligand de la cellule émettrice se fixe sur le récepteur de la cellule réceptrice et permet l'activation de la transcription de toute une série de gènes (comme par exemple *Hes1* ou *Hey*). Son mécanisme d'activation est inhabituel et la rend unique : la fixation du ligand permet de déclencher une série d'évènements protéolytiques, dont l'un est intramembranaire, ce qui libère un fragment intracellulaire qui, en migrant vers le noyau, modifie la transcription des gènes.

La voie Notch a été découverte grâce à des études d'embryologie et de génétique menées chez la drosophile. Notch, qui veut dire entaille en français, a été le mot employé par John Dexter qui travaillait avec le généticien Thomas H. Morgan pour décrire le phénotype observé chez un mutant de drosophile au début des années 20. En effet les femelles présentaient des dentelures sur le bord de leurs ailes (voir dessin original de la Drosophile). Il faudra attendre presque 60 ans pour voir le gène cloné et 70 ans pour que l'on découvre que Notch existe et est conservé chez les mammifères (Weinmaster et al., 1991; Ellisen et al., 1991).



Dessin original d'une femelle *Drosophile* par T.H. Morgan  
pour décrire le phénotype Notch

La signalisation Notch a été depuis l'une des voies de signalisation les plus étudiées. C'est une voie de signalisation cellulaire très conservée chez la majorité des organismes pluricellulaires et présente chez tous les métazoaires. Les récepteurs Notch sont des protéines transmembranaires de type 1. Il en existe un chez *D.Melanogaster* et 2 chez *C.Elegans* mais ils ont une activité redondante. Chez l'homme il en existe 4 différents qui ont des actions redondantes mais aussi des fonctions spécifiques. En effet, Cheng *et al* ont démontré que la délétion ciblée de Notch2 dans le rein de souris, grâce au système Cre-Lox, cause une perte des glomérules (qui est l'unité de filtration du rein) alors que Notch1 est présent, actif et retrouvé dans le noyau. De plus, la délétion ciblée de Notch1 dans le rein n'entraîne pas de défaut de formation des glomérules (Cheng *et al.*, 2007). Néanmoins, Auderset *et al* ont montré que les récepteurs Notch1 et 2 agissent de façon redondante pour induire la différenciation Th1 des cellules T CD4+ naïves. En effet, seule la délétion conjointe des 2 récepteurs bloque la différenciation Th1 alors que la simple délétion de l'un ou l'autre n'a pas d'effet (Auderset *et al.*, 2012).

## MATURATION ET ACTIVATION DES RECEPTEURS NOTCH: UNE ETROITE RELATION ENTRE STRUCTURE ET FONCTION

Les récepteurs Notch sont des protéines transmembranaires organisées en modules. Il existe 4 récepteurs Notch chez les mammifères, Notch1-4 (cf figure 16).

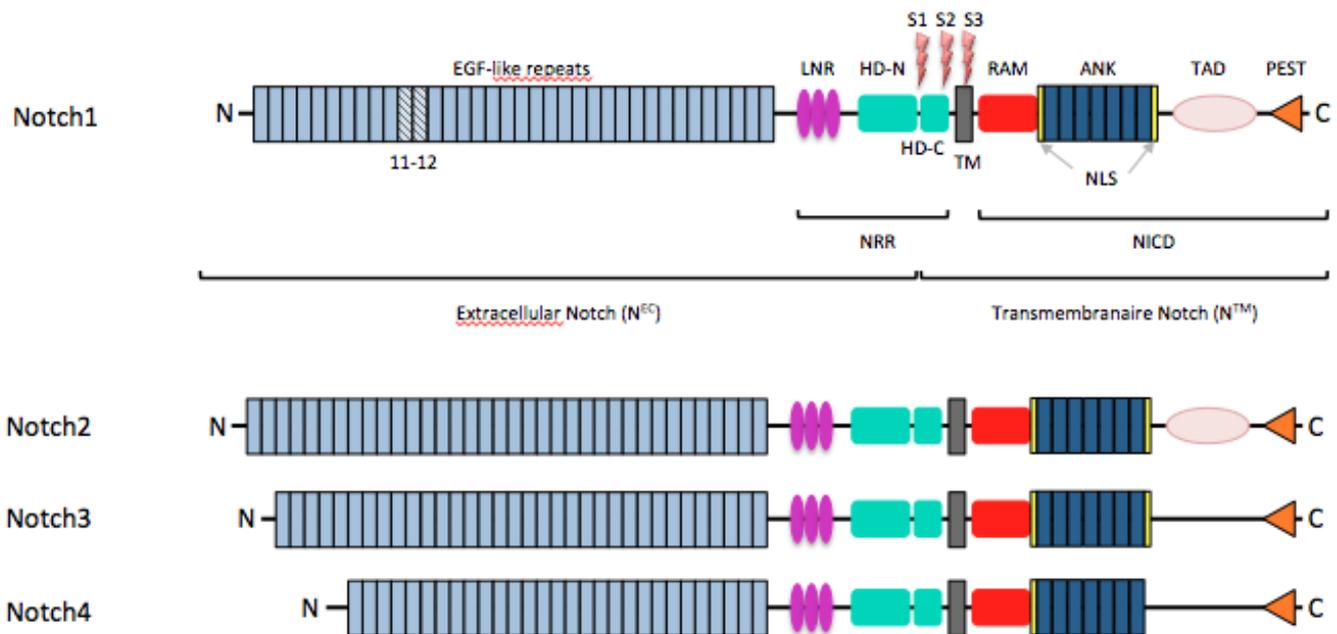


Figure 16 : **Représentation schématique des différents récepteurs Notch humains**

EGF-like repeats= répétitions de domaines Epidermal Growth Factor-like, LNR= Lin-12/Notch Repeats, HD-N= Domaine d'Hétérodimérisation extrémité N-terminale, HD-C= Domaine d'Hétérodimérisation extrémité C-terminale, TM= passage transmembranaire, RAM=RBP-J Associated Molecule, ANK= domaine ankyrin, NLS= signal de localisation nucléaire, TAD= domaine de transactivation, PEST= domaine riche en Proline, Glutamate, Sérine et Thréonine, S1-3= sites de coupure 1-3, NRR= Région de régulation négative, NICD= Domaine intracellulaire de Notch.

Les répétitions EGF-like 11 et 12 responsables de la fixation du ligand sont représentées en hachurés bleu.

L'activation des récepteurs Notch résulte d'une cascade d'évènements protéolytiques (Mumm et al., 2000). Le premier a lieu dans le Golgi et est pris en charge par des protéases convertases (Logeat et al., 1998; Blaumueller et al., 1997). Il permet de produire le récepteur dans sa forme mature, présent à la surface cellulaire (Blaumueller et al., 1997) : un dimère qui reste associé par des liaisons non covalentes et dont l'association est dépendante du calcium puisque le traitement par des chélateurs suffit à le dissocier (Rand et al., 2000). Ce

premier clivage appelé S1 délimite les 2 grandes parties du récepteur (cf figure 16) : le NEC (ectodomaine, comprends toute la partie N-terminale en amont du site de clivage S1) et le N<sup>TM</sup> (corresponds à la partie en aval du site de clivage S1, le passage transmembranaire et le domaine cytoplasmique) dont la structure et la fonction seront détaillés plus bas.

### Maturation du récepteur : le clivage S1

Le clivage S1 a été le premier des 3 clivages à être décrit (Logeat et al., 1998). Le traitement à la Brefeldin A (drogue qui bloque le trafic du *cis*-Golgi vers le *trans*-Golgi) provoque l'accumulation de la forme non clivée, montrant que le clivage S1 se produit dans le *trans*-Golgi. Il génère 2 fragments qui restent associés pour former un hétéro-dimère qui est ensuite adressé à la surface cellulaire (Logeat et al., 1998; Blaumueller et al., 1997).

Le clivage par la furine n'induit pas d'importantes modifications de structure des récepteurs Notch1 et 2 (Gordon et al., 2009). En effet, le site de clivage se situe dans une zone peu structurée. Il est néanmoins crucial dans la cascade d'activation du récepteur puisqu'une forme mutante ne contenant pas le site de clivage S1 aboutit à une perte totale de fonction de la signalisation Notch, *in-vivo*, chez la Drosophile (Lake et al., 2009). Toute la partie de l'extrémité N-terminale de la protéine jusqu'au site de clivage S1 est appelée le N<sup>EC</sup> ou ectodomaine.

### Le fragment Notch extracellulaire (N<sup>EC</sup>)

L'ectodomaine est constitué d'une série de répétitions de domaines Epidermal Growth Factor (EGF)-like (leur nombre est variable selon les espèces) et du domaine NRR (Negative Regulatory Region). Les répétitions 11-12 (hachurées sur le schéma de la figure 16) sont responsables de la fixation du ligand et une mutation Glutamate-Valine de la répétition 12 entraîne l'apparition d'un phénotype perte de fonction Notch chez la drosophile (de Celis et al., 1993). Chez la souris, la délétion des répétitions EGF-like 8-12 ne perturbe pas le trafic du récepteur qui est exprimé à la surface des cellules mais conduit à la mort embryonnaire à E10 avec un phénotype similaire à une perte de fonction Notch (Ge et al., 2008). Il a également été montré qu'un fragment peptidique contenant uniquement les répétitions EGF-like 11-13 est capable de se fixer sur des cellules exprimant DLL1, un ligand de Notch, et ce de façon dépendante du calcium (Hambleton et al., 2004). Cela démontre que ces répétitions sont les éléments minimums nécessaires pour l'interaction de Notch avec son ligand. Chez l'homme, une mutation de la répétition 29 est responsable du CADASIL, une maladie génétique

héréditaire qui touche les artères amenant le sang au cerveau et provoque des infarctus des régions sous-corticales (Kim et al., 2006; Pescini et al., 2008; Dichgans et al., 2001).

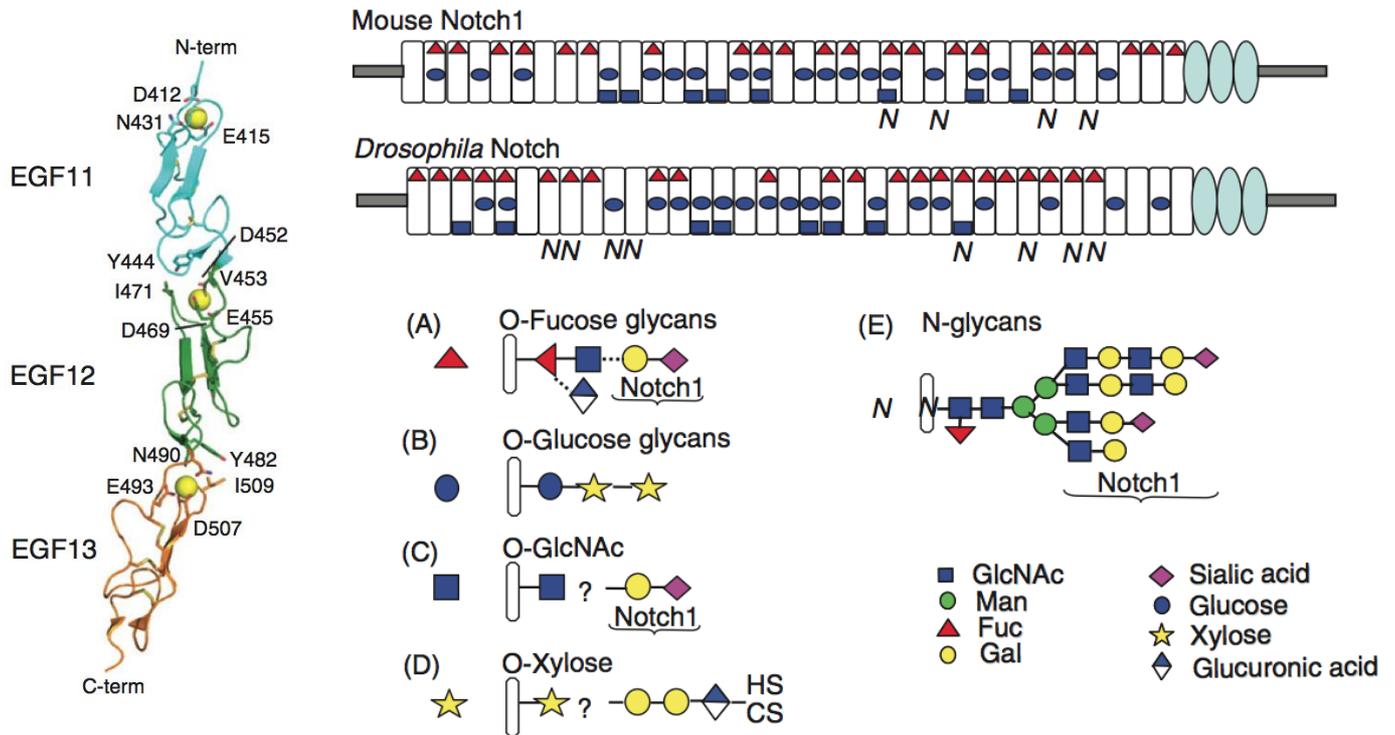


Figure 17 : Structure et glycosylations des répétitions EGF-like

- (A) Structure du domaine de fixation du ligand, les répétitions EGF-like 11-13  
 (B) Carte des différentes glycosylations sur les récepteurs Notch de souris et de Drosophile

Des études de RMN ont permis de dévoiler la structure du domaine de liaison du ligand (cf figure 17A). Les zones de liaison entre domaines EGF-like adjacents sont très importantes pour assurer la rigidité et la forme allongée de l'ensemble : un ion  $\text{Ca}^{2+}$  est coordonné et la tyrosine d'une répétition est plaquée contre une isoleucine de la répétition suivante (cf figure 17A).

La glycosylation des récepteurs Notch de souris et de *Drosophile* est maintenant connue (cf figure 17B, et pour plus d'informations sur la glycosylation de Notch voir (Stanley and Okajima, 2010)). En effet, les répétitions EGF-like sont O-fucosylées, ce qui module l'activité de Notch en réponse à la fixation du ligand. Il existe 23 sites consensus de O-fucosylation dans Notch1 humain dont 13 sont conservés. Parmi ces sites, une mutation T466A inhibant la O-fucosylation du domaine EGF-like 12 est létal embryonnaire (Ge and Stanley, 2008). De plus, les souris KO pour l'enzyme pOfut1 qui participe à la O-fucosylation meurent pendant le développement embryonnaire à E11 (Shi and Stanley, 2003).

Les répétitions EGF-like peuvent aussi être O-glycosylées : 18 des 36 répétitions EGF-like de Notch de *Drosophile* portent le site consensus de O-glycosylation CXSXPC, glycosylable par Rumi (Leonardi et al., 2011). Néanmoins leur rôle paraît mineur : il permet de conserver l'interaction Notch/ligand à haute température mais n'a pas d'impact sur l'activation de la voie. En effet, des cellules délétées pour la glucosyltransférase Rumi présentent une activation de la voie Notch qui est normale (Leonardi et al., 2011).

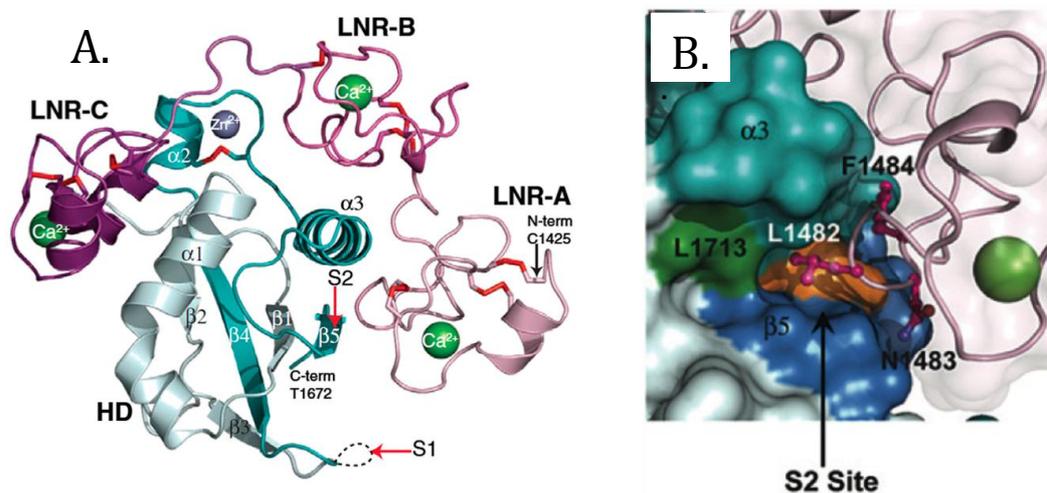


Figure 18 : **Structure du domaine NRR**

(A) Structure obtenue par diffraction des rayons X de la région NRR de Notch2 délétée pour la boucle contenant le site de clivage S1 (représenté en pointillés) (Tien et al., 2009)

(B) Agrandissement montrant le site de clivage S2 et le résidu Leu1482 du domaine LNR-A oblitérant stériquement la poche hydrophobe dans laquelle est enfoui le site S2 (délimité en orange dans l'agrandissement) (Kovall and Blacklow, 2010)

Le domaine NRR est constitué de 3 domaines LNR (LIN-12/Notch Repeats A, B et C) et du domaine d'hétérodimérisation (HD). Le domaine LNR (cf figure 18) est un domaine spécifique des récepteurs Notch empêchant le clivage au site S2 lorsque le ligand est absent (Sanchez-Irizarry et al., 2004). Il est constitué de 3 modules LNR : longs de 40 résidus, leur structure a un repliement irrégulier avec peu de structures secondaires et est stabilisée par 3 ponts disulfures (en rouge sur la structure de la figure 18A) et la coordination d'un ion calcium (Vardar et al., 2003). Le domaine d'hétérodimérisation est constitué de 150 résidus et est stabilisé par un pont disulfure. Il est divisé en 2 par le clivage furine au site S1, générant les domaines HD-N et HD-C, et est nécessaire pour permettre le maintien de Notch sous forme hétérodimérique (Sanchez-Irizarry et al., 2004).

L'ensemble LNR-HD forme une structure en forme de champignon dont le domaine HD serait le pied et le domaine LNR le chapeau. Cela permet un enfouissement du site S2 qui est enfin verrouillé stériquement par la Leu 1482 (figure 18B) qui se trouve au sein de la poche hydrophobe. L'importance du domaine NRR est soulignée par le fait que les mutations observées dans les leucémies aigües lymphoblastiques T (LAL-T) se trouvent dans ce domaine. En effet il existe des mutations des acides aminés constituant la poche hydrophobe, aboutissant ainsi à la déstabilisation thermodynamique du NRR. Ces mutations rendent alors le récepteur constitutivement actif en permettant l'activation ligand-indépendante. C'est le cas dans plus de 50% des LAL-T (Weng et al., 2004).

Il agit donc comme un régulateur négatif de l'activation de Notch, c'est ainsi que ce domaine est considéré comme étant l'interrupteur de la voie.

### **Le fragment Notch transmembranaire (N<sup>TM</sup>)**

Le domaine transmembranaire est constitué de la partie C-terminale du domaine d'hétérodimérisation (HD-C), du domaine transmembranaire et du domaine intracellulaire qui sera libéré lors de l'activation du récepteur (le NICD, Notch Intracellular Domain). Ce fragment subit les deux derniers clivages : le clivage S2 qui permet de produire le fragment NEXT (Notch EXtracellular Truncation) qui est ensuite le substrat du complexe  $\gamma$ -sécrétase, libérant le NICD (Notch IntraCellular Domain) dans le cytoplasme (cf figure 19 ci-dessous pour le schéma global d'activation de la voie).

## Le clivage S2

Le deuxième clivage a lieu après dissociation du dimère, soit par chélation du calcium soit par fixation du ligand. Cela a pour effet de dévoiler le site de clivage S2 qui est clivé par les ADAM (A-Disintegrin And Metalloprotease). Le clivage S2 peut être constitutif si le récepteur est muté, comme c'est par exemple le cas dans les LAL-T (Weng et al., 2004). Le site de clivage S2 se situe dans la partie C-terminale du domaine d'hétérodimérisation, juste avant le passage transmembranaire (figure 19). La coupure par la protéase se fait, chez l'homme, entre l'Alanine 1720 et la Valine 1721 (figure 20).

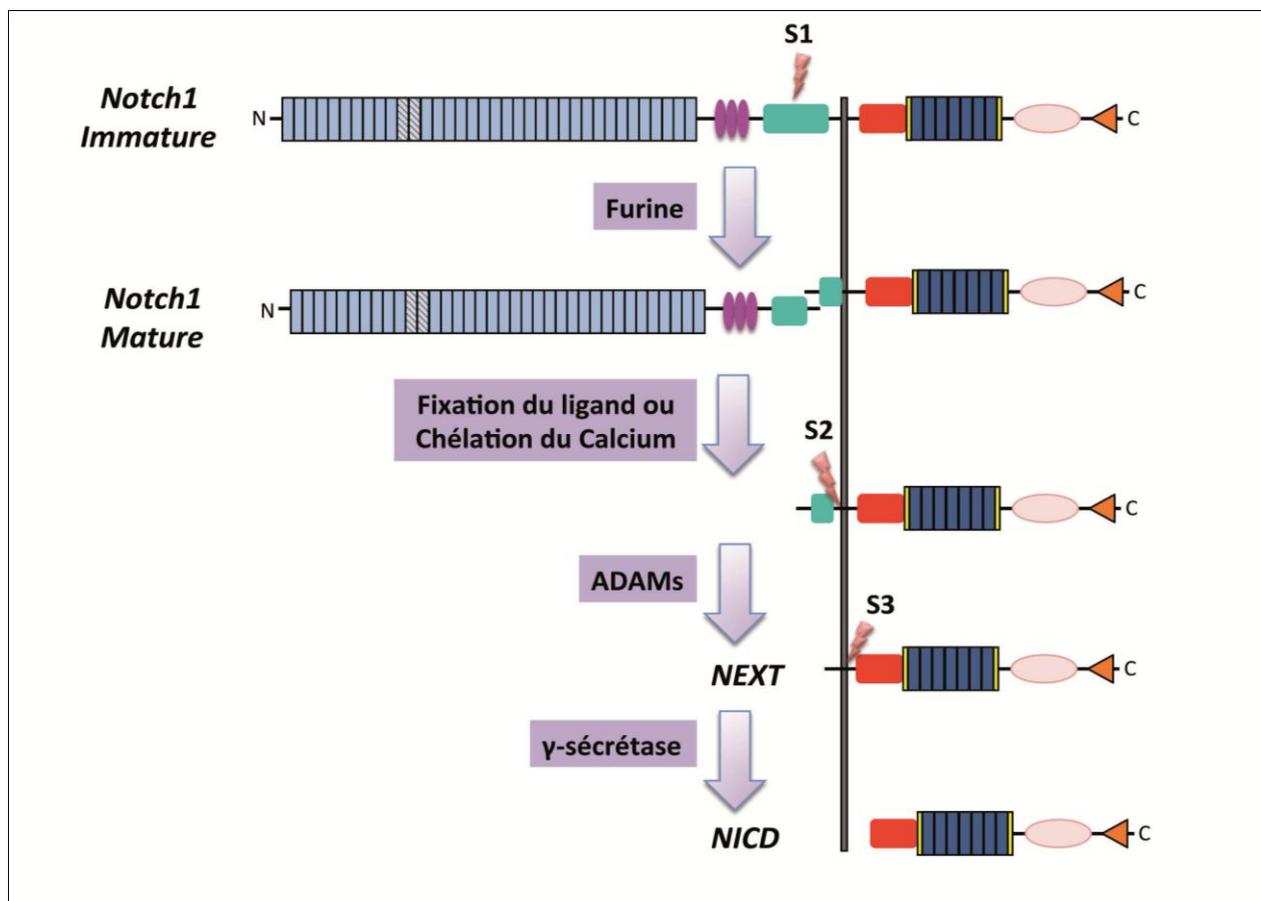


Figure 19 : **Représentation schématique des étapes d'activation de la voie Notch**

La production du NICD (qui est le fragment portant l'activité de facteur de transcription) est le fruit de 3 clivages protéolytiques successifs. La furine clive au site de clivage S1 dans l'appareil de Golgi et permet la formation d'un hétérodimère qui est adressé à la membrane plasmique. Après fixation du ligand ou traitement par des chélateurs de calcium, le site S3 est dévoilé et les ADAMs produisent le fragment NEXT qui est le substrat du complexe γ-sécrétase qui libère le NICD.

Il a existé une controverse quant à la métalloprotéase responsable de ce clivage car ADAM10/Kuzbanian et ADAM17 sont toutes deux capables de cliver Notch (Pan and Rubin, 1997; Brou et al., 2000; Tian et al., 2008; Mumm et al., 2000).

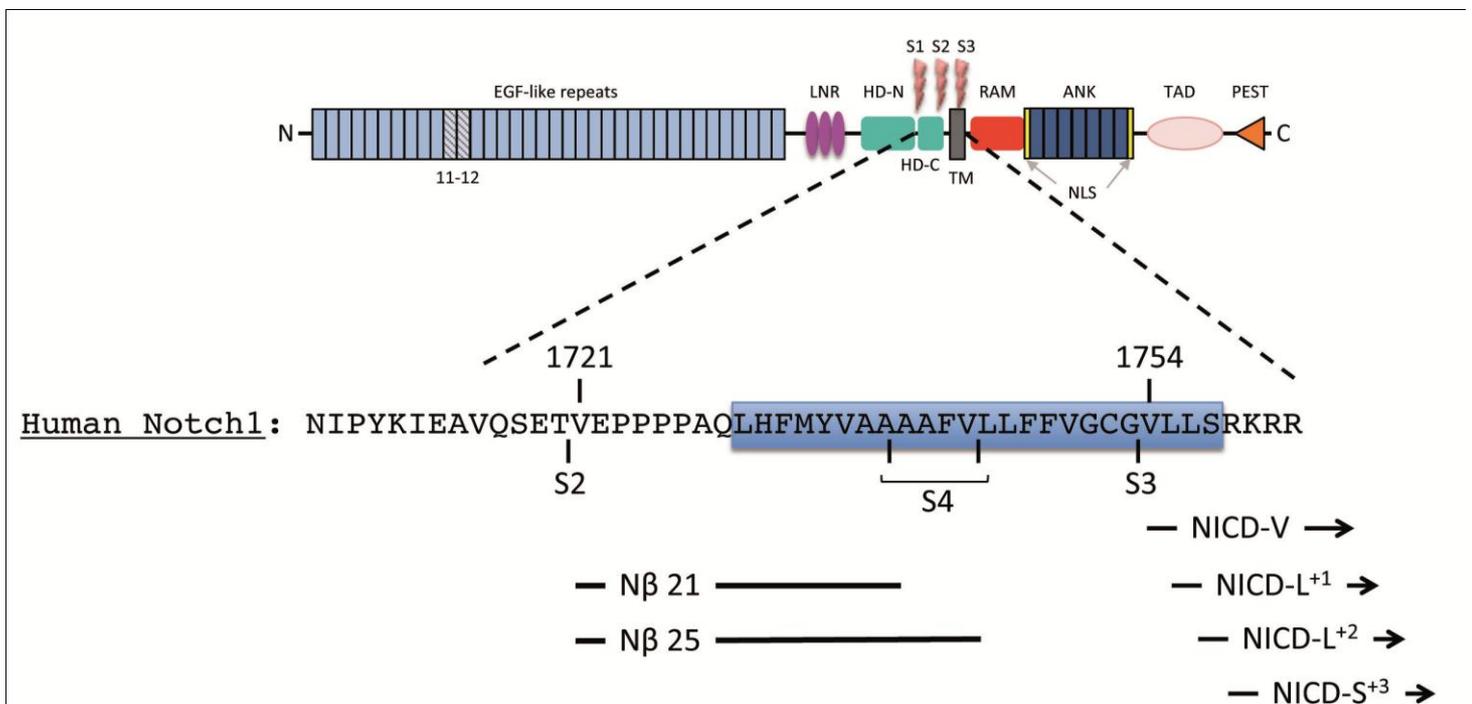
En effet, l'équipe de Gerald Rubin a décrit, en 1996, le phénotype observé chez les *Drosophile* hétérozygotes pour Kuzbanian (Kuz<sup>+/-</sup>) (Rooke et al., 1996). Il a ainsi établi pour la première fois une relation entre Kuzbanian, l'organisation du système nerveux et l'inhibition latérale. En effet, lors de la mise en place des organes sensoriels chez la *Drosophile*, le nombre de cellules précurseur des organes sensoriels (SOP, Sensory Organ Precursor cells) est négativement régulé par la voie Notch. Lorsqu'une cellule acquiert le phénotype SOP, elle exprime le ligand de Notch Delta qui va à la fois inhiber Notch grâce à des interactions en *cis* mais aussi l'activer dans les cellules voisines par des interactions en *trans*. Les cellules adjacentes vont donc recevoir un signal inhibiteur de la différenciation en SOP et devenir des cellules épidermales. Ainsi, lorsque Kuzbanian est non fonctionnel (délétion ou expression d'un mutant dominant négatif), l'inhibition latérale ne peut avoir lieu et le nombre de SOP est fortement augmenté. Les embryons hétérozygotes présentent alors, entre autres défauts, une accumulation de cellules neurales (Pan and Rubin, 1997; Rooke et al., 1996).

Le fait que l'activité enzymatique de Kuzbanian est indispensable pour l'activation de la voie ne sera montré qu'un an plus tard. En effet, Pan *et al* ont montré que l'expression d'un mutant de Kuzbanian sans activité enzymatique agit comme un dominant négatif et ne permet plus de générer les formes clivées de Notch *in-vitro* dans les cellules S2 (lignées cellulaire de *Drosophile*) mais aussi *in-vivo* dans les embryons Kuz<sup>-/-</sup> (Pan and Rubin, 1997). Ces résultats ont été confirmés par une autre équipe qui, la même année, démontre que les mutations perte de fonction de Kuzbanian chez la *Drosophile* donnent les mêmes résultats que les mutations perte de fonction de Notch, indiquant une implication de Kuzbanian dans l'activation de la voie Notch (Sotillos et al., 1997).

Chez la *Drosophile* il apparaît donc clairement que Kuzbanian est la protéase responsable du clivage de Notch. Pourtant, chez les mammifères les premières expériences démontrent qu'ADAM17 plutôt qu'ADAM10/Kuzbanian est capable de cliver Notch et d'inhiber, par exemple, la différenciation monocyttaire qui est sous le contrôle de la voie Notch (Brou et al., 2000; Mumm et al., 2000). Ce n'est qu'avec l'arrivée des souris KO que l'implication d'ADAM10 dans le clivage de Notch chez les mammifères va ré-émerger (Hartmann et al.,

2002). En effet, le phénotype observé dans les souris KO pour ADAM10 est similaire à celui des souris perte de fonction de Notch, avec une mort embryonnaire précoce à E9.5, des anomalies cardiaques et vasculaires et une forte perturbation dans la formation et le développement du système nerveux (Hartmann et al., 2002). La majorité des souris KO pour ADAM17 ont une mort embryonnaire plus tardive à E17,5 avec même certaines souris qui naissent et survivent plusieurs semaines. Les altérations décrites dans ces souris sont des défauts dans la sécrétion du TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor- $\alpha$ ) et des défauts de maturation et d'organisation des tissus épithéliaux (peau, œil...) (Peschon et al., 1998). Le phénotype des souris KO pour ADAM17, par opposition à celui observé dans les souris KO ADAM10, est donc éloigné du phénotype des souris présentant une perte de fonction pour la signalisation Notch (souris double KO Notch1/Notch4, KO Presenilin...), ce qui suggère qu'ADAM10, au moins dans le contexte du développement, a un rôle prépondérant dans l'activation de la voie Notch. D'autres études montrant une prépondérance du rôle d'ADAM10 *in-vivo* se sont accumulées avec l'apparition des souris KO inducibles qui ont permis l'étude plus approfondie des implications d'ADAM10 dans des tissus spécifiques. Il a été ainsi montré qu'ADAM10 est indispensable au bon développement du système nerveux central de la souris, principalement en régulant la voie Notch mais aussi d'autres protéines telles qu'APP (Jorissen et al., 2010). Il a été ainsi possible de montrer qu'ADAM10 est nécessaire au développement et à la différenciation des cellules T dans le thymus, processus sous le contrôle de la voie Notch, alors qu'ADAM17 n'est pas impliqué (Tian et al., 2008; Gravano et al., 2010).

Des études récentes, *in-vitro* et *in-vivo*, ont permis de démontrer que le clivage est pris en



charge par ADAM10 lorsque l'activation du récepteur est ligand-dépendante alors qu'il est pris en charge par ADAM17 lorsque l'activation n'est pas dépendante du ligand (comme c'est le cas par exemple dans les LAL-T ou après une stimulation EDTA, un chélateur du calcium) (Bozkulak and Weinmaster, 2009; van Tetering et al., 2009; Murthy et al., 2012). *In-vivo*, l'activité d'ADAM17 est nécessaire pour la régulation des processus inflammatoires observés dans des maladies de peau (comme le psoriasis) en activant la voie Notch de façon ligand-indépendante (Murthy et al., 2012). Le NICD ainsi produit antagonise l'activité de c-Fos qui est le facteur de transcription responsable de la production des cytokines pro-inflammatoires dans l'épiderme.

**Figure 20 : Aperçu de la séquence des sites de clivages S2 et S3.**

Le passage transmembranaire est encadré en bleu et la numérotation des Valines des différents fragments générés après clivage est indiquée au- dessus de la séquence.

### Le clivage S3

Il a été démontré que ce clivage est effectué, chez les mammifères (De Strooper et al., 1999) et la *Drosophile* (Struhl and Greenwald, 1999), par un complexe protéique appelé  $\gamma$ -sécrétase. Il est composé de 4 protéines : Presenilin (c'est cette protéine qui porte l'activité catalytique), Nicastrin, Aph-1 et Pen-2. Il existe, chez les mammifères, au moins 4 complexes  $\gamma$ -sécrétase différents car il existe 2 Presenilin (PS1 et PS2) et 2 Aph-1 (Aph-1A et Aph-1B). Ces complexes sont présents dans tous les tissus chez la souris adulte (Hébert et al., 2004) mais ne sont pas équivalents et peuvent être substrat-spécifique (Serneels et al., 2009). Les souris KO pour les protéines Aph et Presenilin ont des phénotypes complètement différents : les souris KO Aph-1A et PS1 sont létal embryonnaire et présentent un phénotype similaire aux embryons perte de fonctions de la voie Notch alors que les souris KO PS2 et Aph-1B/C (Aph-1C est issue d'une duplication du gène APH1B retrouvé chez la souris mais pas chez l'homme) sont viables et ne présentent pas de défauts anatomiques ou de fertilité (Serneels et al., 2005; 2009; Herreman et al., 1999; Donoviel et al., 1999; Shen et al., 1997). Cette différence de phénotype entre les KO PS1 et PS2 suggère que PS2 n'est pas indispensable pour la signalisation Notch durant le développement.

Le mécanisme de clivage est pour le moment inconnu. Il a été proposé que le complexe crée une poche d'eau intra-membranaire pour que l'hydrolyse de la liaison peptidique puisse avoir lieu dans un environnement hydrophobe. Il a été démontré que le clivage est séquentiel (Chandu et al., 2006) : il débute au site S3, se termine au site S4 (cf figure 20) pour générer deux fragments, le NICD et le peptide N $\beta$ . Le clivage S4 a été découvert par Okochi *et al* qui ont mis en évidence que la surexpression du fragment NEXT entraîne l'accumulation dans le milieu de culture des cellules d'un peptide (le peptide N $\beta$ ) dont l'extrémité ne correspond pas aux extrémités produites par le clivage S3. Ils ont ainsi conclu que le complexe  $\gamma$ -sécrétase effectue un clivage supplémentaire qu'ils ont appelé S4 (Okochi et al., 2002). Il a également été montré que ce clivage n'a pas lieu si on bloque le clivage au site S3 (grâce à l'utilisation de mutants non clivables), ce qui montre bien que les clivages sont séquentiels.

Il a été montré par MALDI-TOF que trois fragments différents pouvaient être générés après clivage par la  $\gamma$ -sécrétase. Le fragment dont l'extrémité commence par une Valine est le plus stable alors que les 2 autres fragments instables débutent avec une Leucine et une Sérine (Tagami et al., 2008), ce qui est en accord avec la « N-end rule » qui dit que des fragments peptidiques se terminant par Val sont les plus stables (Gonda et al., 1989). Il apparaît

également que les fragments instables sont produits en plus grande quantité lorsque le clivage a lieu dans les endosomes alors que le fragment stable est plutôt produit lorsque le clivage a lieu à la surface cellulaire (Tagami et al., 2008). Le clivage S3 n'est donc pas restreint à la membrane plasmique et peut avoir lieu dans différents compartiments sub-cellulaires. Ceci pourrait être un nouveau niveau de régulation de l'activité de Notch qui couplerait la force/durée du signal avec la localisation du clivage.

Le clivage S3 permet de libérer le domaine intracellulaire de Notch (NICD). Il est constitué de sept domaines ankyrin (ANK) flanqués de part et d'autre par des signaux de localisation cellulaire (NLS), d'un domaine RAM (RBP-J Associated molecule), du domaine de trans-activation (TAD) et du domaine PEST (car riche en Proline (P), Glutamate (E), Serine (S), Thréonine(T)).



Figure 21 : **Structure d'un domaine ANK du récepteur Notch de Drosophile.**

Adapté de (Bertagna et al., 2008), structure détaillée disponible (Ehebauer et al., 2005)

Le domaine ANK est constitué de 5 répétitions ANK pour le Notch1 humain (figure 21). Il permet le recrutement du co-activateur Mastermind (MAM) (Fryer et al., 2002) et interagit également avec le domaine CTD (C-terminal domain) de CSL. Toutefois cette interaction est bien plus faible que l'interaction RAM/CSL. Les domaines ANK peuvent être hydroxylés individuellement mais cela n'a pas de conséquence sur le repliement global ou sur la capacité à former le complexe de transcription. Néanmoins, l'hydroxylation permet d'augmenter la stabilité du domaine ANK. L'hydroxylation est une modification post-transcriptionnelle consistant en l'ajout d'un groupement hydroxyle sur les résidus Proline, Lysine ou encore Acide Aspartique et Tyrosine. L'hydroxy-proline et l'hydroxy-lysine sont, par exemple, les

acides aminés majoritaires dans le collagène. Le niveau d'hydroxylation du domaine ANK est dépendant des conditions d'oxygénation puisqu'il est élevé en normoxie et réduit en hypoxie (Coleman et al., 2007). Le domaine ANK permet également le recrutement de l'ubiquitine ligase E3 Deltex en interagissant avec ses domaines WWE (Fortini and Artavanis-Tsakonas, 1994; Zweifel et al., 2005), ce qui permet la régulation du trafic intracellulaire de Notch.

Les domaines RAM et ANK sont les 2 seuls domaines nécessaires et suffisants pour l'interaction avec CSL, même si la majeure partie de l'affinité du NICD pour CSL est attribuable au domaine RAM.

En effet, le domaine RAM est le domaine majeur de fixation du facteur de transcription CSL (du nom des différents facteurs de transcription CBF1/RBP-J de vertébrés, Suppressor of Hairless Su(H) de *Drosophila* et LAG-1 de nématode). Ce domaine est dépourvu de structures secondaires et présente une structure tertiaire peu rigide. L'interaction du domaine RAM avec la partie BTM ( $\beta$ -trefoil domain) du CSL est directe (Tamura et al., 1995) et induit un changement conformationnel du domaine RAM qui devient rigide. Ce domaine permet également la dimérisation des complexes activateurs de transcription lorsque les gènes cibles contiennent une paire de site de fixation de CSL, comme c'est le cas par exemple pour *Hes1* (Nam et al., 2007). La dimérisation est alors essentielle à l'induction de la transcription. C'est l'un des mécanismes qui est proposé pour expliquer l'extrême sensibilité de l'induction des gènes cibles à la quantité de NICD présente dans le noyau (Nam et al., 2007).

Le domaine TAD est nécessaire pour conférer au complexe sa fonction de facteur de transcription. En effet sa délétion abolit la fonction de facteur de transcription du NICD.

Le domaine PEST peut être phosphorylé par le complexe CyclineC:CDK8 (Fryer et al., 2004). Lorsqu'il est phosphorylé il active l'ubiquitination de Notch par l'ubiquitine ligase *Sel10*, sa dégradation et l'arrêt de la signalisation. Les mutants ne comportant plus ce domaine ont une activité normale mais présentent une durée de vie plus longue (Fryer et al., 2002).

## Mécanisme d'activation de la transcription par le NICD

Même s'il existe 3 formes de NICD qui diffèrent par l'acide aminé en N-terminal, elles sont toutes capables de transloquer dans le noyau et d'initier la transcription des gènes cibles de Notch. En effet, lorsque le NICD entre dans le noyau il se lie à son co-facteur de transcription Mastermind et à son facteur de transcription CSL (RBP-J pour les mammifères) et ce complexe permet de démarrer la transcription des gènes cibles de Notch. Il permet ainsi de retirer les co-répresseurs qui sont fixés sur CSL pour empêcher la transcription (figure 22). La formation du complexe de transcription actif a été en partie élucidée grâce à des études structurales. Il a été démontré que la fixation du domaine RAM de Notch permet d'abord d'induire un changement de conformation de CSL (Friedmann et al., 2008). La séquence d'évènements qui s'ensuit n'est pas encore clairement établie : on sait que pour que le complexe de transcription soit fonctionnel, il faut encore fixer MAM et le domaine ANK de Notch. Le domaine ANK a une affinité pour CSL plus faible que MAM et on ne sait pas si MAM se fixe avant ANK, du fait de sa plus forte affinité. Néanmoins, une modélisation de ces interactions a proposé que la fixation du domaine RAM sur CSL place le domaine ANK parfaitement pour interagir avec CSL. En effet, bien que non structuré, c'est la longueur très conservée du domaine RAM qui permet de placer correctement le domaine ANK et augmente dramatiquement la concentration locale au contact de CSL, favorisant son interaction avec CSL. C'est ce modèle qui est privilégié car la fixation du domaine ANK sur CSL permet de terminer la formation d'un sillon dans CSL, débutée par la fixation du domaine RAM (Friedmann et al., 2008), qui permet ensuite le recrutement de MAM. Le complexe activateur de transcription est alors opérationnel et la transcription des gènes démarre.

La terminaison de la transcription se fait par phosphorylation du domaine PEST du NICD qui va permettre sa dégradation et le désassemblage du complexe (Fryer et al., 2004).

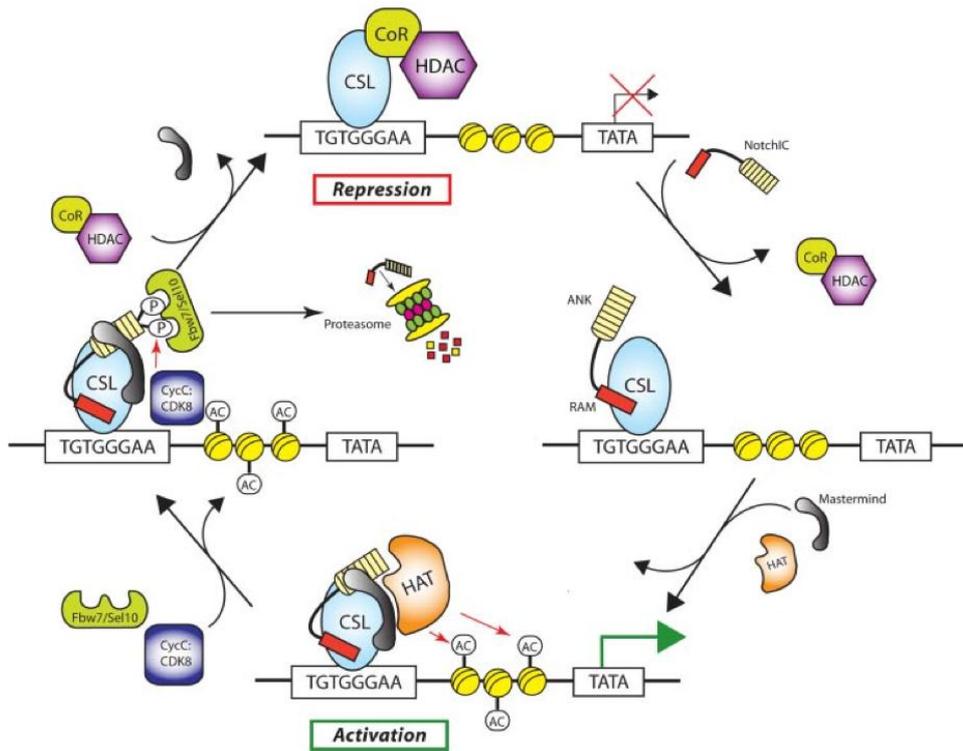


Figure 22 : **Représentation schématique des étapes d'activation de la transcription des gènes par le NICD**

Lorsque le NICD est produit, il passe dans le noyau et se fixe par l'intermédiaire de son domaine RAM sur CSL. Cela a pour effet d'induire un changement de conformation de CSL et de déplacer les corépresseurs qui lui sont fixés et empêchent l'initiation de la transcription. Mastermind se fixe ensuite à CSL et au NICD pour former le complexe capable d'initier la transcription des gènes. Le domaine PEST du NICD peut être phosphorylé par le complexe CyclineC :CDK8. La phosphorylation du domaine PEST permet le recrutement de l'ubiquitine ligase Sel10 qui va permettre l'adressage du NICD au protéasome et l'arrêt de la signalisation Notch. Les co-répresseurs peuvent alors à nouveau se fixer sur CSL et le réprimer.

## REGULATION DE LA SIGNALISATION NOTCH

### Activation et régulation par endocytose

L'endocytose permet, entre autres fonctions, le recyclage et/ou la dégradation de protéines de la membrane plasmique. C'est un phénomène essentiel au fonctionnement de la voie Notch. Son implication dans la voie a été démontrée pour la première fois chez la Drosophile : le mutant *shibire<sup>ts</sup>* (Poodry et al., 1973) est un mutant létal embryonnaire présentant le même phénotype que la perte de fonction Notch. Il a ensuite été montré que *shibire* code pour une GTPase essentielle à l'endocytose qui n'est autre que la dynamine (Seugnet et al., 1997). Ces expériences ont montré que l'endocytose est essentielle à la signalisation Notch dans la cellule émettrice (qui contient le ligand de Notch) mais aussi dans la cellule réceptrice (qui contient le récepteur Notch).

Un des signaux permettant l'activation de l'endocytose est la mono-ubiquitination sur les lysines intracellulaires des protéines devant être endocytées. L'ubiquitine permet l'interaction avec des protéines adaptatrices recrutant ensuite la clathrine pour démarrer la formation de la vésicule d'endocytose (pour plus de détails sur ces mécanismes voir (d'Azzo et al., 2005)). C'est à nouveau l'étude des mutants chez la Drosophile qui a permis de démontrer l'implication de l'ubiquitination dans la voie Notch : la perte des gènes *Neuralized* (Neur) et *Mind bomb* (Mib) entraîne un phénotype similaire à la perte de fonction Notch. Ces gènes codent pour des E3 ligases. Il a été suggéré qu'il existe une spécificité de substrat puisque Neur est plutôt impliqué dans les activations Delta-dépendante alors que Mib est impliqué dans les activations Serrate/Jagged-dépendante. L'endocytose n'est pas seulement importante pour le récepteur, elle est aussi indispensable pour le ligand et joue un rôle majeur dans la régulation de la voie Notch.

## L'endocytose du récepteur

En absence de ligand, le récepteur Notch est internalisé de façon constitutive et envoyé pour dégradation vers les lysosomes. Néanmoins l'endocytose n'a pas seulement pour rôle d'assurer la dégradation des récepteurs non activés, elle peut aussi permettre une activation de ces récepteurs, de façon ligand-indépendante et Deltex-dépendante (Gonda et al., 1989; Hori et al., 2004).

Comme souvent, l'endocytose de Notch débute par son ubiquitination. Il a été montré que Deltex, une E3 ubiquitine ligase, est responsable de l'internalisation de Notch dans des endosomes précoces (Hori et al., 2004). Ce mécanisme est dépendant de la dynamine et de Rab5, une GTPase importante pour la formation et la fusion des endosomes précoces. D'autres E3-ligases telles que celles de la famille Nedd4 comme Suppressor of Deltex (Itch chez la souris et AIP4 chez l'humain) ou DNedd4, chez la Drosophile, peuvent ubiquitiner Notch, permettre son endocytose et l'envoyer à la dégradation via le lysosome (Wilkin et al., 2004; Yamada et al., 2011; Chastagner et al., 2008). Les protéines du système ESCRT (protéines impliquées dans la maturation des endosomes précoces en corps multi-vésiculaires puis en lysosomes, mais aussi en charge de la régulation du trafic de protéines ubiquitinées) participe à la dégradation de Notch en régulant son trafic intracellulaire. En effet, quand Deltex est associé à Kurtz (une  $\beta$ -arrestine de Drosophile) et interagit avec Shrub (une protéine du complexe ESCRT III), le récepteur est poly-ubiquitiné et dégradé dans la lumière des lysosomes. A l'inverse, si Shrub est absent, le récepteur est alors mono-ubiquitiné par Deltex et protégé de la dégradation en restant associé à la membrane des lysosomes (Hori et al., 2011; Wilkin et al., 2008). Par un mécanisme encore inconnu le N<sup>EC</sup> peut alors être dissocié (le pH acide des lysosomes est susceptible de permettre cette dissociation) et le NICD est libéré dans le cytoplasme. L'activation de Notch par Deltex est indépendante des ligands DSL, reste dépendante des complexes  $\gamma$ -sécrétase et des facteurs de transcription CSL et nécessite le complexe HOPS (HOmotypic fusion and vacuole Protein Sorting, complexe qui permet la maturation des endosomes tardifs et la fusion avec les lysosomes) et les protéines du complexe AP-3 (Adaptor protein-3, complexe qui permet la sélection des protéines devant être localisées dans les membranes des endosomes tardifs et des lysosomes) (Wilkin et al., 2008). Les complexes HOPS et AP-3 sont spécifiques de l'activation Deltex-dépendante puisque leur délétion ne perturbe pas l'activation ligand-dépendante de Notch.

Le trafic intracellulaire du récepteur est donc dirigé par son ubiquitination qui permet le recrutement de protéines spécifiques, comme par exemple les protéines du complexe ESCRT qui dirigent la protéine ubiquitinée vers le bon compartiment cellulaire. Les ubiquitine-ligases ont un rôle prépondérant dans ces processus : Deltex permet la mono-ubiquitination alors que les ligases de la famille Nedd4 permettent plutôt la poly-ubiquitination. Il a également été montré que les Nedd4 sont capables, au moins chez les mammifères, d'ubiquitiner Deltex et de permettre sa dégradation (Chastagner et al., 2006), ce qui ajoute à la complexité du système. De plus, l'endocytose peut diriger le lieu du clivage S3 et réguler ainsi la stabilité du NICD généré.

Le complexe  $\gamma$ -sécrétase est présent à la membrane plasmique, dans le compartiment endocytique, les lysosomes, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Le clivage peut donc avoir lieu dans presque tous les compartiments de la cellule. Chez la *Drosophile* il a été montré que des constructions de Notch délétées pour l'ectodomaine (substrat constitutif de la  $\gamma$ -sécrétase) peuvent être clivées lorsqu'elles sont exprimées dans des embryons *shibire* mutants pour la dynamine, montrant que l'endocytose n'est pas nécessaire au clivage S3 (Struhl and Adachi, 2000). Des études montrent également qu'un fragment NEXT non clivable au site S3 peut être détecté dans les endosomes (Gupta-Rossi et al., 2004). Enfin, comme discuté plus haut, il a été plus récemment démontré par Tagami *et al* en 2008 que le NICD peut à la fois être généré à la membrane plasmique et dans les endosomes, générant des fragments NICD différant par leur extrémité N-terminale et leur stabilité. Le rôle de l'endocytose dans l'activation du clivage S3 est donc très controversée, alimenté par la diversité des modèles utilisés (*Drosophile*, lignées cellulaires de mammifères...) et la sur-expression de protéines mutantes. Des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer rigoureusement l'apport de l'endocytose à la régulation de la voie. Etant donné la dépendance de la signalisation Notch à la quantité de NICD produite, l'endocytose pourra jouer en modulant le lieu du clivage et la stabilité des fragments générés qui, malgré la controverse sur sa contribution précise, ajoute indéniablement un degré de complexité et de régulation supplémentaire à tous les mécanismes déjà découverts.

## L'endocytose du ligand

Lorsque les ligands se lient à Notch, ils sont ubiquitinés, ce qui provoque leur endocytose (Meloty-Kapella et al., 2012). De nombreuses études ont démontré génétiquement grâce à des mutants chez la Drosophile et *C. Elegans* que l'endocytose est indispensable à l'activation de Notch (Overstreet et al., 2003; 2004; Wang and Struhl, 2005; Tian et al., 2004). Les derniers modèles subodorent que l'endocytose du ligand fixé au récepteur fournit la force nécessaire pour induire un changement de conformation du récepteur permettant de dévoiler le site de clivage S2. Néanmoins cette théorie a été controversée jusqu'à cette année. En effet, l'équipe de Gerry Weinmaster a démontré grâce à des méthodes biophysiques que la cellule exprimant le récepteur est capable d'exercer la force nécessaire à arracher la partie extracellulaire du récepteur Notch (Meloty-Kapella et al., 2012). Ils ont également montré que ce processus est dépendant de la clathrine, du cytosquelette d'actine et de l'ubiquitination du ligand. Lorsque le ligand se fixe sur le récepteur, cela active son ubiquitination et permet le recrutement de l'epsine via son domaine d'interaction à l'ubiquitine. L'epsine est une molécule adaptatrice interagissant avec la clathrine et ses adaptateurs (comme AP-2) et qui participe à la formation de la vésicule d'endocytose (Chen et al., 1998; Ford et al., 2002). De façon intéressante, les cellules délétées pour l'epsine sont toujours capables de faire de l'endocytose dépendante de la clathrine (Chen et al., 2009), suggérant une spécificité pour l'endocytose de cargo ubiquitinés. Enfin, le KO epsine1/2 chez la souris (Chen et al., 2009) entraîne une mort embryonnaire précoce à E9,5 avec des ressemblances aux phénotypes pertes de fonction de Notch. L'ensemble de ces données montre que l'endocytose du ligand suite à la fixation de Notch est la force qui permet l'activation du récepteur, que ce phénomène est dépendant de l'ubiquitination du ligand et que l'epsine permet de générer une endocytose spécifique médiée par la clathrine. L'endocytose du récepteur est aussi indispensable à la poursuite de l'activation. Néanmoins le fait que l'endocytose soit nécessaire ou non au clivage S3 est soumis à débat.

## Régulation par les tétraspanines

Il a été montré par des approches biochimiques et protéomiques que toutes les protéines du complexe  $\gamma$ -sécrétase sont associées avec les tétraspanines CD9 et CD81 (Wakabayashi et al., 2009). Il a également été montré que les tétraspanines peuvent réguler l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase. Dans des fibroblastes dérivés de souris KO pour CD9, une forte accumulation des fragments de clivage des substrats de la  $\gamma$ -sécrétase est observée et le silencing de Tspan33 et Tspan5 (2 membres d'une même sous-famille de tétraspanines) diminue le clivage de NEXT dans les cellules HeLa (Dunn et al., 2010). Enfin, le traitement par des anticorps anti-CD9 ou CD81 diminue fortement le clivage d'APP (Wakabayashi et al., 2009). Il apparaît donc clair que les tétraspanines peuvent réguler la signalisation Notch en jouant au niveau de la  $\gamma$ -sécrétase mais il n'est pas exclu qu'elles puissent réguler la voie à d'autres niveaux.

## LES LIGANDS DE NOTCH

### Structure

Les ligands du récepteur Notch sont des protéines transmembranaires de type I et font partie de la famille de ligands DSL (Delta/Serrate/Lag2). Ils peuvent être subdivisés en 2 sous-familles selon leur homologie avec les ligands Delta et Serrate de *Drosophila* : les Delta-like (DII1, DII3, DII4) et Serrate-like (Jagged1 et Jagged2). L'une des différences structurales majeures entre les 2 sous-familles de ligands est la présence d'un domaine riche en Cystéines dans les Serrate-like. La structure des différents récepteurs est présentée sur la figure 23.

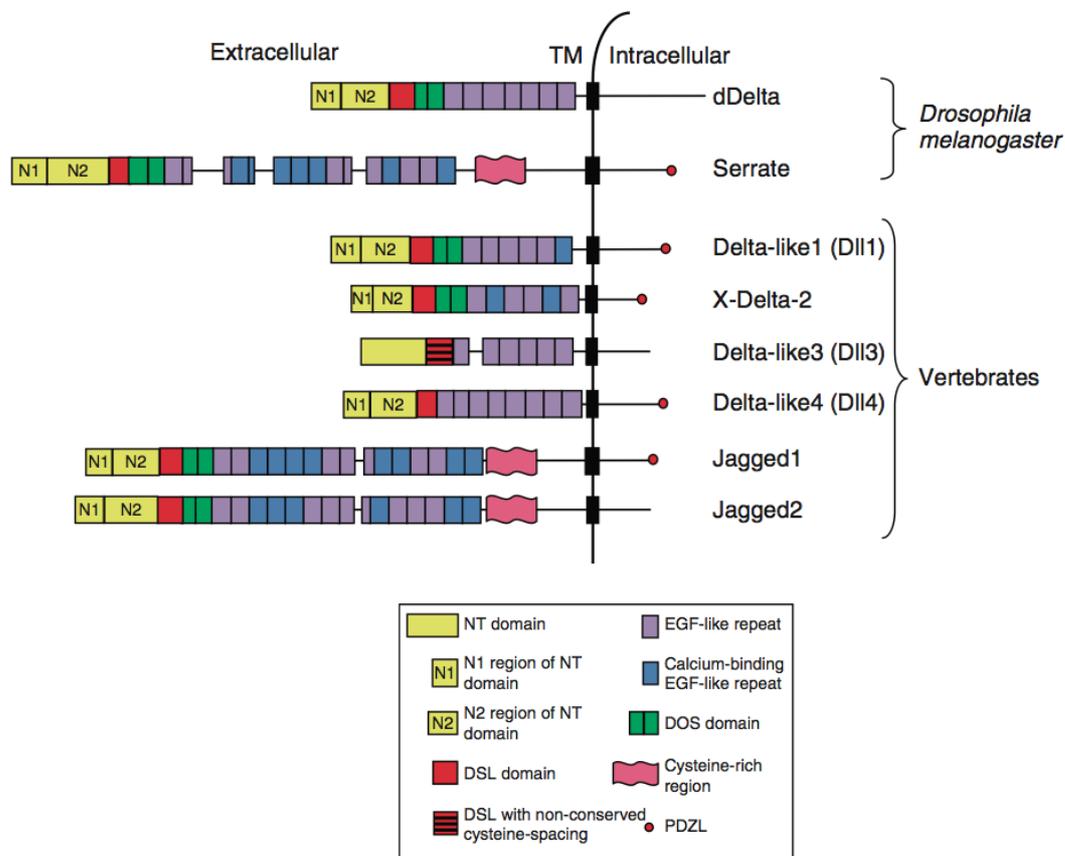


Figure 23 : Représentation schématique des différents ligands de Notch  
(adapté de (D'Souza et al., 2010))

La partie qui permet l'interaction avec le récepteur Notch est constituée des domaines NT, DOS et DSL. L'importance de ces domaines est soulignée par le fait que, chez l'homme, une mutation dans l'un d'eux provoque l'apparition du syndrome d'Alagille (Morrisette et al., 2001; Warthen et al., 2006) qui est une maladie due à un dysfonctionnement de la voie Notch. Le domaine PDZ permet l'interaction avec le cytosquelette d'actine mais sa relevance fonctionnelle reste indéfinie. Les ligands peuvent être O- et N-glycosylés sur leurs répétitions EGF mais aucun rôle dans la liaison au récepteur n'a été démontré.

Il a été décrit plus haut comment les ligands peuvent se lier à Notch en *trans* et activer ainsi la voie. Mais les ligands peuvent également se lier à Notch en *cis* et avoir cette fois une action inhibitrice. Il a été proposé que la quantité de ligand présent dans la cellule peut déterminer la polarité du signal : une cellule qui a plus de ligand va à la fois activer en *trans* les récepteurs Notch des cellules voisines mais aussi inhiber en *cis* les récepteurs Notch présents à sa surface cellulaire (c'est ce qui se passe durant la spéciation des SOP, chez la Drosophile). Ainsi, l'activation de Notch inhibant au niveau transcriptionnel l'expression de son ligand, cela aboutit à l'établissement de la polarité du signal et définit de façon claire les cellules émettrices/réceptrices.

Les ligands chez les mammifères peuvent être clivés par les ADAMs 9, 10, 12, 17 alors que les ligands de Drosophile ne sont clivés que par les homologues d'ADAM10 (Kuzbanian/Kuz et Kuzbanian-like/Kul qui clive exclusivement le ligand). Ce clivage permet le relargage de l'ectodomaine et ces formes solubles des ligands peuvent se lier à Notch. Des études montrent que le ligand doit être immobilisé ou pré-agglutiné pour pouvoir activer Notch, générant ainsi la force requise pour déplacer le N<sup>EC</sup>. Néanmoins, les sites de fixation des ligands solubles ou liés à la membrane étant les mêmes, il existe une compétition pour l'accès au récepteur et donc une régulation de l'activation est possible à ce niveau. Le clivage par les ADAMs aboutit aussi à une levée de l'inhibition en *cis* et permet la reprise de l'activation de Notch en permettant la fixation d'un ligand en *trans*. Le clivage du ligand est donc un mécanisme de régulation très important qui peut avoir, selon le contexte, des rôles activateurs ou inhibiteurs.

# Matériel et Méthodes

---

## REACTIFS POUR LES EXPERIENCES IN-VITRO

### Anticorps

L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre ADAM10 humain est le 11g2, et a été décrit dans (Arduise et al., 2008). Les anticorps monoclonaux de souris anti-Notch et anti-ADAM17 humains sont de chez R&D Systems et l'anti-PDI de chez Abcam. Les anticorps anti-GFP utilisés sont le biclonal de chez Roche (pour les IP) et un polyclonal de lapin de chez Santa Cruz Biotechnologies (pour le western-blot), l'anti-HA est le HA11 de chez Covance, l'anti-V5 est un monoclonal de souris (pour les IP) ou un polyclonal de chez Sigma-Aldrich (pour les western-blots). Les anticorps anti-tétraspanines utilisés sont le TS9 (CD9), TS81 (CD81), TS151 (CD151), TS63 (CD63), 1F11 (CD9P-1) ont été produits au laboratoire.

### Oligos utilisés pour les expériences de déplétion par ARN interférence

Contrôle : Stealth RNAi Negative Control Medium GC

Tspan5 : AUGUCAUCCCGAUAUGCUCUGAUGU

Tspan14 : CGCCAUCUCGCUGUUGCAGAUUUU

Tspan15 : ACAACCUGUACCUUCUCCAAGCAUU

CD81 : GCACCAAGUGCAUCAAGUA-dTdT

### Lignées cellulaires utilisées

Les cellules HeLa (carcinome cervical), HCT116 (carcinome colique), PC3 (carcinome de la prostate), HEK293 (cellules de rein embryonnaire humain) sont cultivées en DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Les cellules sont transfectées avec le Fugene6 (Promega) ou la lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les indications du fournisseur. Les cellules OP9 exprimant le ligand de Notch DLL-1 (OP9-DLL1) et les cellules U2OS exprimant Notch1 (U2OS-N1) ont été obtenues par infection avec des rétrovirus comportant l'ADN complémentaire (ADNc) de DLL-1 cloné dans le vecteur MSCV-IRES-GFP ou l'ADNc de Notch1 humain cloné dans le vecteur pBabe puro. Ces deux lignées cellulaires ont été décrits précédemment (Moretti et al., 2010; Six et al., 2004). Les cellules S2 (cellules de

drosophile) ont été transfectées par le Fugene HD (Promega) suivant les données du fournisseur.

### **Plasmides utilisés**

Toutes les tétraspanines étiquetées V5 ou GFP sont d'origine humaine. Les régions codantes ont été amplifiées par PCR à partir de plasmides précédemment décrits (Tspan1, Tspan5, Tspan9, Tspan12 et Tspan15 (Serru et al., 2000)), de plasmides obtenus auprès d'Open Biosystems (Tspan10 et Tspan33) ou d'une transcription inverse à partir des cellules HCT116 (Tspan14). Les produits PCR ont ensuite été sous-clonés dans les vecteurs Directional TOPO pEGFP-N1, pEGFP-N3 ou pcDNA3. Tspan17 et Tspan5 ont été synthétisés par Eurogentec. Les constructions murines étiquetées Myc de Notch1  $\Delta E$  et NICD (dans le vecteur pCS2+MT) et l'ADAM10 bovin étiqueté HA (dans le vecteur pcDNA3) ont été décrits précédemment (Lammich et al., 1999; Jarriault et al., 1995).

### **Analyse par cytométrie de flux**

Les cellules sont détachées, lavées deux fois en milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF puis incubées pendant 30 minutes à 4°C avec 10 $\mu$ g/ml d'anticorps primaire (la plupart du temps des anticorps produits chez la souris). Après trois lavages, les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 4°C avec un anticorps de chèvre anti-souris conjugué à un fluorochrome (FITC ou PE pour les marquages de cellules non transfectées ; APC pour les marquages de cellules transfectées avec des constructions GFP). Les cellules sont analysées avec un FACScalibur avec les paramètres de compensation appropriés ou un Accuri C6. Les cellules sont détachées avec l'acutase sauf pour les marquages Notch1 pour lesquels les cellules sont détachées avec une solution de citrate de sodium 15mM et chlorure de potassium 0,135mM.

### **Immunoprécipitation, pontage chimique et marquage des protéines de surface à la biotine**

Les cellules sont lavées trois fois en PBS 1X puis incubées avec une solution de biotine à 0,5mg/ml pendant 45 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois en PBS puis lysées dans du tampon de lyse contenant 30mM de Tris pH 7.4, 150mM NaCl, des inhibiteurs de protéase et 1% de détergent (Brij97 ou digitonine). Après 30 minutes d'incubation à 4°C, le matériel insoluble est retiré par une centrifugation à 10.000g pendant 15 minutes. Le lysat cellulaire est ensuite incubé avec du sérum de chèvre inactivé et des billes de protéine G-sepharose (GE Healthcare) pendant 2 heures. Les billes sont retirées par centrifugation et le

lysate cellulaire est incubé avec 1µg d'anticorps primaire et 10µl de billes de protéine G-sépharose pour 200-400µl de lysate pendant 2h à 4°C sur une roue tournante. Les billes sont lavées quatre fois en utilisant le tampon de lyse avec 1% du détergent qui a servi à la lyse puis mises en tampon Laemmli. Les protéines immunoprécipitées sont ensuite séparées par SDS-PAGE en conditions non réductrices et transférées sur membrane PVDF (polyvinyl difluorure, GE Healthcare). Les immunoprécipitats sont analysés par western-blot en utilisant des anticorps primaires directement couplés Alexa Fluor 680 ou une combinaison d'anticorps primaires révélés par des anticorps secondaires couplés Alexa Fluor 680 ou IRDye 800. Les révélations du marquage biotine sont réalisées avec la streptavidine couplée Alexa Fluor 680 ou IRDye800. Les acquisitions sont effectuées avec l'Odyssey Infrared Imaging System® (LI-COR Biosciences).

Pour les expériences de pontage chimique, des cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement avec un plasmide codant pour ADAM10-HA et différentes tétraspanines étiquetées GFP. 48h après la transfection, les cellules sont traitées avec 1mM de dithiobis[succinimidyl propionate] (DSP) pendant 30 minutes à 4°C puis lysées en tampon de lyse supplémenté avec 1% de Triton X100 et à 2% de SDS. Les lysats sont ensuite débarrassés du matériel insoluble et immunoprécipités selon le protocole ci-dessus.

### RT-PCR quantitative

L'ARN est extrait à partir de  $5 \times 10^6$  cellules de différentes lignées cellulaires en utilisant le kit SV Total RNA Isolation System avec une digestion de l'ADN sur colonne (Promega), en suivant les instructions du fournisseur. L'ADNc est synthétisé à partir de 5µg d'ARN total pour chaque échantillon en utilisant 200U de transcriptase inverse SuperScriptIII (Invitrogen) amorcée avec des hexamères aléatoires (Promega). Les réactions de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (qPCR) sont réalisées dans un volume total de 25µl contenant 2x de Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent), 0.4µM des primers sens et anti-sens et 62.5µg d'ADNc. Les quantifications sont faites à l'aide du Mx3005P qPCR Systems et analysées par le logiciel MxPro d'Agilent Technologies. Pour chaque échantillon d'ADNc, les analyses sont faites en triplicats et les données sont normalisées à l'expression de rpl38 en utilisant la méthode du  $\Delta Ct$ . La plupart des oligonucléotides ont été créés avec PrimerBank (Spandidos et al., 2010) :

Tspan5: ACAAGGGTCCTGAAGTCAGTT et TGATGGAAGAGATGTTGGACAGA  
Tspan10: CTGCGTCAAGTATCTGATCTTCC et AAGCCACGTAACAGGCAGG  
Tspan14: GGCTCTGCGGGAGAATATCTG et GCACTGGTTAGCTTTCTGAAGG

Tspan15: ACTTCCTGAACGACAACATTCG et CGCCACAGCACTTGAACCTTT  
Tspan17: CTGCTGCGGGAAATACTTCCT et GATGTTCGAGAGAACGCCCTT  
Tspan33: CTACGCTCGGCTAATGAAGCA et TGAGCAGGAACATGAGGACAC  
ADAM10: AAACACCAGCGTGCCAAAAG et CCCTCTTCATTCGTAGGTTGAAA.

### Immunomarquages et microscopie

Les cellules humaines sont cultivées pendant 24h sur lamelles de verre en DMEM supplémenté de 10% de SVF. Pour les comparaisons des niveaux totaux et de surface d'ADAM10, les cellules ont été fixées en paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 30 minutes à température ambiante, incubées pendant 15 minutes avec une solution de chlorure d'ammonium 50mM pour bloquer les sites réactifs du PFA n'ayant pas réagis et perméabilisées, ou non, avec 0.1% de Triton X100 pendant 2 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite incubées avec 10µg/ml de chaque anticorps primaire (jusqu'à deux anticorps primaires ont été utilisés conjointement) pendant 1h à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées en DMEM supplémenté de 10% de SVF et les anticorps primaires sont révélés par des anticorps secondaires couplés Alexa Fluor 488 et/ou 568 pendant 1h à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées en DMEM supplémenté de 10% de SVF et les cellules sont montées en Mowiol 4-88 (81381 ; Sigma-Aldrich) supplémenté en DABCO (D2522 ; Sigma-Aldrich) et en DAPI. Les acquisitions sont faites à l'aide d'un microscope à fluorescence DMR (Leica) équipé d'une caméra CoolSnap HQ2 (Photometrics) et contrôlé par le logiciel MetaMorph (Molecular Devices). Les acquisitions ont aussi été faites à l'aide du microscope confocal Leica SP5 équipé d'un objectif à immersion 63x. Les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ (National Institute of Health).

### Analyse de la glycosylation d'ADAM10

Les cellules sont lavées trois fois en PBS puis lysées en tampon de lyse avec 1% Brij97 pendant 30 minutes à 4°C. Le matériel insoluble est retiré par centrifugation à 10.000g pendant 15 minutes et le lysat est incubé avec 1µg de 11G2 et 10µl de billes de protéines G-sépharose pendant 2 heures à 4°C sur une roue tournante. Les billes sont lavées quatre fois en utilisant le tampon qui a servi à la lyse. Les protéines immunoprécipitées sont détachées des billes en les faisant bouillir dans une solution de Triton X100 1% et SDS 0.2%. Un tampon au phosphate de sodium 20mM pH 7,2 est ajouté avec la PNGase et l'Endo-H et l'incubation est laissée sur la nuit. Le lendemain, les protéines sont resuspendues en tampon Laemmli, séparées par SDS-PAGE et analysée par western-blot.

### Analyse de l'activité de Notch dans les cellules de mammifères

Ces analyses ont été réalisées comme décrit précédemment (Moretti et al., 2010). Des cellules U2OS-N1 et HeLa sontensemencées à 25.000 cellules/cm<sup>2</sup>. La déplétion par ARN interférence est réalisée par le protocole de transfection inverse Interferin (PolyPlus Transfection). 3nM d'ARNi est déposé dans le puits avant de recouvrir avec les cellules. Les cellules sont ensuite transfectées 24h après avec le rapporteur CSL firefly et le plasmide contrôle Renilla en utilisant le FuGene6 (Promega). 24h après, 35.000 cellules/cm<sup>2</sup> d'OP9+/- DLL1 sont ajoutées et les activités firefly et Renilla luciférase sont déterminées en utilisant le Dual luciferase reporter assay (Promega) selon les données du fournisseur. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le test one-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey.

# Résultats

---

## LES TSPANC8 SONT DES PARTENAIRES DIRECTS D'ADAM10

Il a été démontré dans le laboratoire qu'ADAM10 est associé à plusieurs tétraspanines, dans différentes lignées de lymphomes (Arduise et al., 2008). Néanmoins, ces interactions ont été observées dans des conditions de lyse conservant les interactions entre tétraspanines et il ne peut être exclu qu'elles soient indirectes. Nous avons utilisé une lignée de cancer colique exprimant une grande quantité d'ADAM10, les cellules HCT116 pour étudier les interactions ADAM10/tétraspanines. Alors que l'interaction CD9-CD9P1 est conservée après la lyse en digitonine (détergent qui permet d'isoler les complexes primaires), aucune interaction ADAM10-tétraspanine n'a pu être détectée avec CD9, CD81 ou CD151 (figure 24 ). De nouvelles tétraspanines ont été découvertes dans le laboratoire grâce à des recherches dans les banques d'EST : Tspan1, 5 et 9 (Serru et al., 2000). Des cellules PC3 ont été transfectées avec ces tétraspanines portant l'étiquette V5. Après lyse en digitonine et immunoprécipitation par des anticorps anti-V5 pour précipiter les tétraspanines testées, l'interaction avec ADAM10 est étudiée par western-blot (figure 24). ADAM10 est coimmunoprécipitée uniquement avec Tspan5, indiquant que Tspan5 est la tétraspanine partenaire d'ADAM10. Aucune interaction avec Tspan-1 ou -9 n'a pu être détectée dans ces conditions.

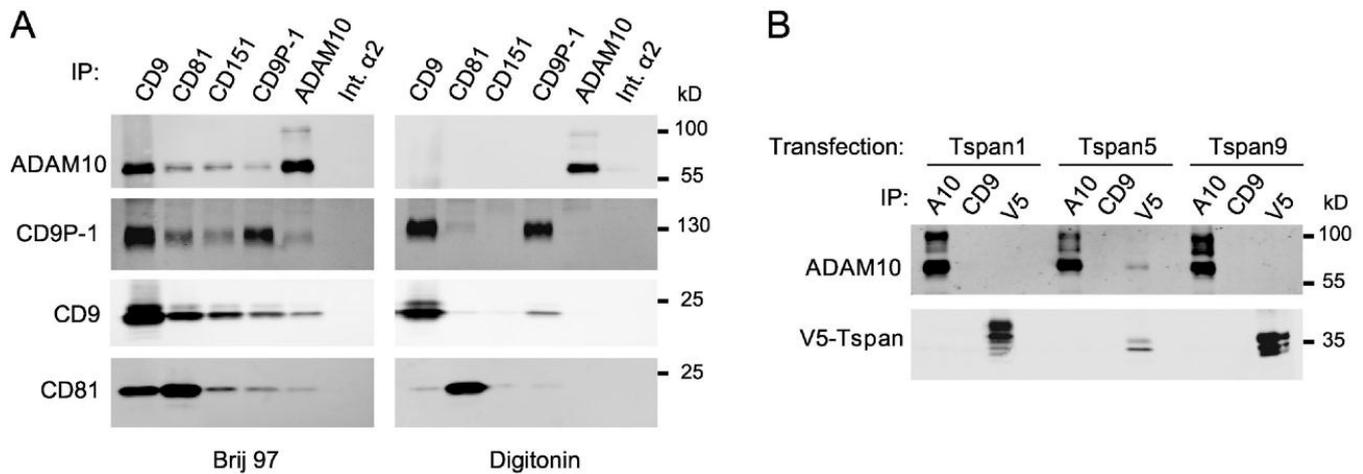
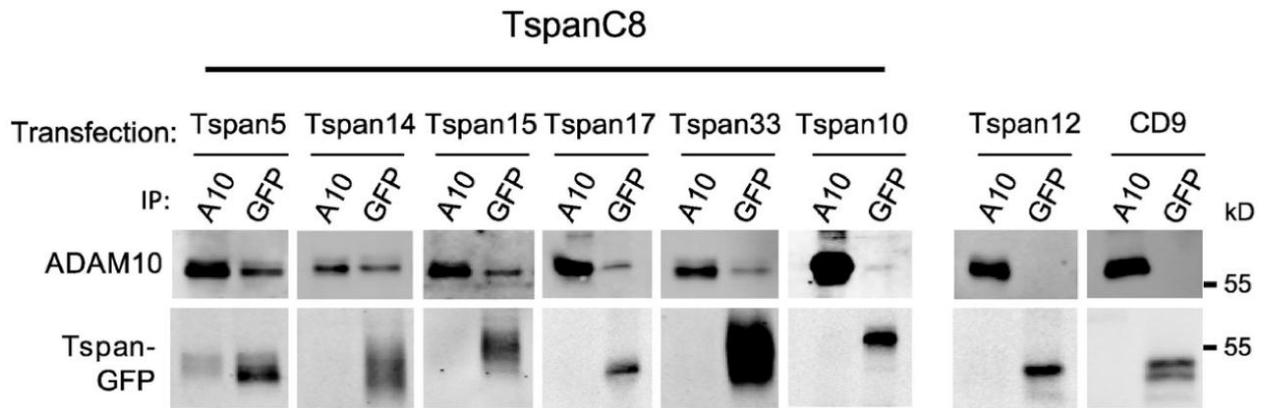


Figure 24 : **Tspan5 est la tétraspanine partenaire d'ADAM10**

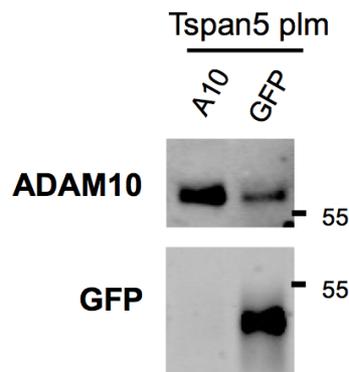
- (A) Des cellules HCT116 ont été lysées en Brij97 ou en digitonine avant de réaliser une immunoprécipitation (IP) comme indiqué en haut de chaque piste. La composition des complexes est ensuite analysée par western-blot.
- (B) Des cellules PC3 ont été transfectées transitoirement avec Tspan-1, -5 et -9 portant une étiquette V5 et leur association avec ADAM10 a été analysée par co-immunoprécipitation après lyse en digitonine et western-blot avec des anticorps anti-ADAM10 et anti-V5.

Tspan5 fait partie d'une sous-famille de tétraspanines qui sont caractérisées par la présence de huit cystéines dans leur domaine extracellulaire (que nous avons appelées les TspanC8). Cette sous-famille comprend également Tspan10 (oculospanin), Tspan14 (DC-TM4F2), Tspan15 (NET-7), Tspan17 and Tspan33 (penumbra). Les tétraspanines de cette sous-famille partagent des zones de fortes homologies et l'hypothèse que la capacité de Tspan5 à interagir avec ADAM10 soit une caractéristique partagée par la sous-famille a été testée. Nous avons ainsi étiqueté les TspanC8 avec la GFP puis transfecté ces protéines de fusion dans des cellules PC3 qui expriment fortement ADAM10 de façon endogène. L'association des TspanC8-GFP avec ADAM10 a été étudiée par western-blot après IP sur des cellules lysées en digitonine. Dans ces conditions, une interaction d'ADAM10 avec Tspan-5, -14, -15, -33 et dans une moindre mesure avec Tspan-10 et -17 est observée, indiquant que ces tétraspanines sont en interaction directe avec ADAM10. Aucune interaction avec les tétraspanines Tspan12 et CD9 qui n'appartiennent pas à la sous-famille n'a pu être détectée dans ces conditions (figure 25).



**Figure 25 : Les TspanC8 sont des partenaires directs d'ADAM10**

Des cellules PC3 transfectées transitoirement avec les TspanC8 portant une étiquette GFP (Green Fluorescent Protein) ont été lysées en digitonine et l'association avec ADAM10 est étudiée par western-blot après IP avec des anticorps anti-ADAM10 et -GFP.

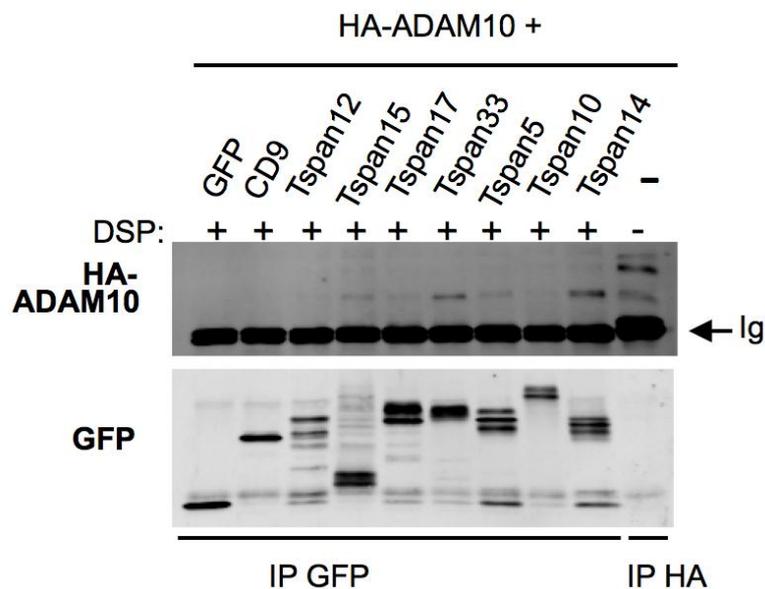


**Figure 26 : L'interaction Tspan5/ADAM10 est indépendante de la palmitoylation de Tspan5**

Association d'ADAM10 avec Tspan5 non palmitoylable étiqueté GFP révélée par western-blot après IP et lyse en digitonine.

La palmitoylation des tétraspanines permet la stabilisation des interactions entre tétraspanines. La mutation des 4 sites potentiels de palmitoylation de Tspan5 n'a pas d'impact sur l'association avec ADAM10 (figure 26), apportant un argument supplémentaire dans la démonstration que l'interaction TspanC8/ADAM10 est directe et indépendante des interactions entre tétraspanines.

Enfin, nous avons confirmé la proximité des TspanC8 et d'ADAM10 par des expériences de pontage covalent. En effet, les complexes TspanC8-ADAM10 sont toujours observés après lyse en Triton-X100/SDS qui sont des conditions détruisant la majorité des interactions dans le « Tetraspanin Web », indiquant que les protéines sont assez proches physiquement pour permettre un pontage chimique efficace (figure 27). On constate néanmoins que pour Tspan10 et Tspan17, la quantité d'ADAM10 co-précipitée est moins forte. L'ensemble de ces données démontre que les TspanC8 sont les tétraspanines partenaires d'ADAM10.



**Figure 27 : L'interaction ADAM10/TspanC8 est révélée par pontage chimique**

Des cellules HEK 293 ont été co-transfectées transitoirement avec ADAM10 étiqueté HA et une tétraspanine étiqueté GFP (comme indiqué en haut de chaque piste) puis l'interaction avec ADAM10 est analysée par western-blot après pontage covalent en DSP, IP avec un anticorps anti-GFP et révélation HA. La migration est réalisée en conditions réductrices pour cliver l'agent chimique DSP.

## L'EXPRESSION DES TSPAN8 CORRELE AVEC L'EXPRESSION DE SURFACE D'ADAM10

Afin d'étudier plus avant le rôle des TspanC8 dans la régulation d'ADAM10, nous avons analysé par FACS l'expression de surface d'ADAM10 dans différentes lignées de carcinomes (figure 29). Nous avons ainsi retenu trois lignées pour le reste de l'étude : deux lignées avec une forte expression de surface (les cellules PC3 et HCT116) et une lignée avec une expression de surface faible (les cellules HeLa). L'expression de l'ARNm d'ADAM10 est légèrement inférieure dans les cellules HeLa, comparé aux deux autres lignées.

Niveau de surface d'ADAM10		
+	++	+++
HeLa, HEK 293	HCT116, LoVo, SW48, SW480	A549, Isreco3
	SW620, Isreco1, Isreco2 PC3,	
	HepG2, HuH7,	

Figure 28 : Niveau de surface d'ADAM10 dans différentes lignées de carcinomes humains

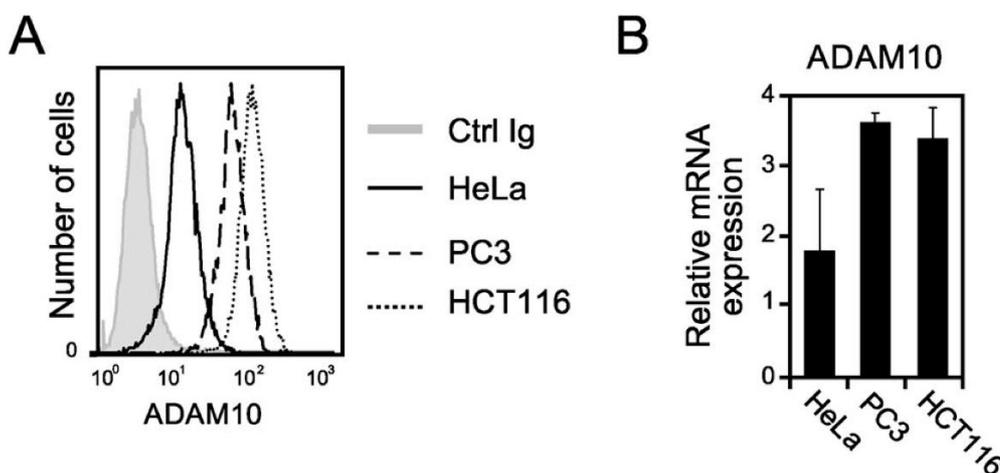


Figure 29 : Comparaison des niveaux d'expression de surface et des quantités d'ARNm d'ADAM10 dans les cellules HeLa, PC3 et HCT116

(A) Analyse de l'expression de surface d'ADAM10 par cytométrie de flux

(B) Analyse par RT-qPCR des niveaux d'ARNm d'ADAM10. Les données présentées sont les moyennes et écart-types obtenus sur 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

Afin de déterminer le rôle des TspanC8 dans le trafic d'ADAM10, nous avons d'abord déterminé par RT-qPCR le profil d'expression des TspanC8 dans les trois lignées cellulaires étudiées. Les cellules HeLa présentent un faible niveau d'expression des TspanC8 avec seulement une expression minimale de Tspan14 détectée. Les cellules PC3 et HCT expriment un éventail beaucoup plus large de TspanC8. Dans les cellules PC3, la TspanC8 majoritaire est Tspan15, Tspan5 est également bien exprimé dans ces cellules alors que Tspan-17 et -33 sont exprimées à des niveaux plus faibles (figure 30). Pour les cellules HCT116, la TspanC8 majoritaire est Tspan14, Tspan-5 est également bien exprimé et Tspan15, -17 et -33 sont plus faiblement exprimées.

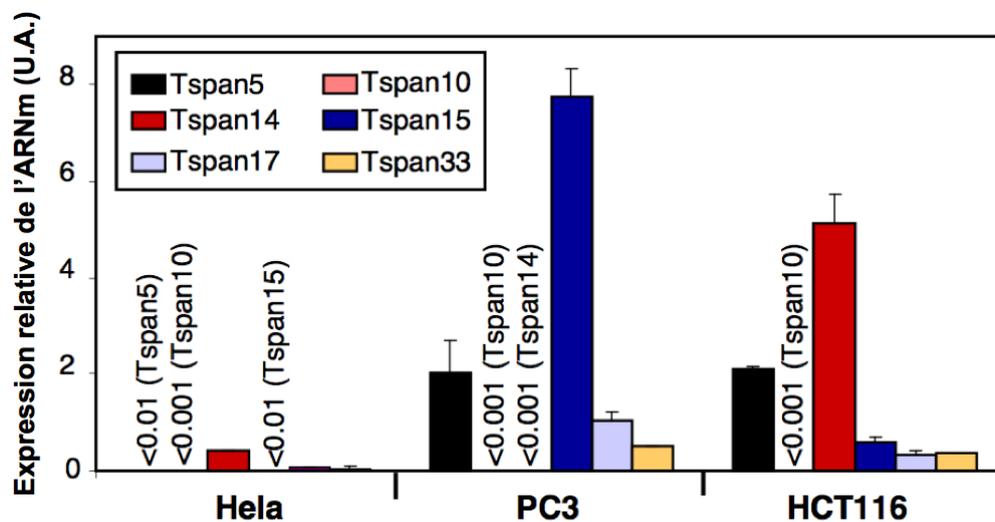


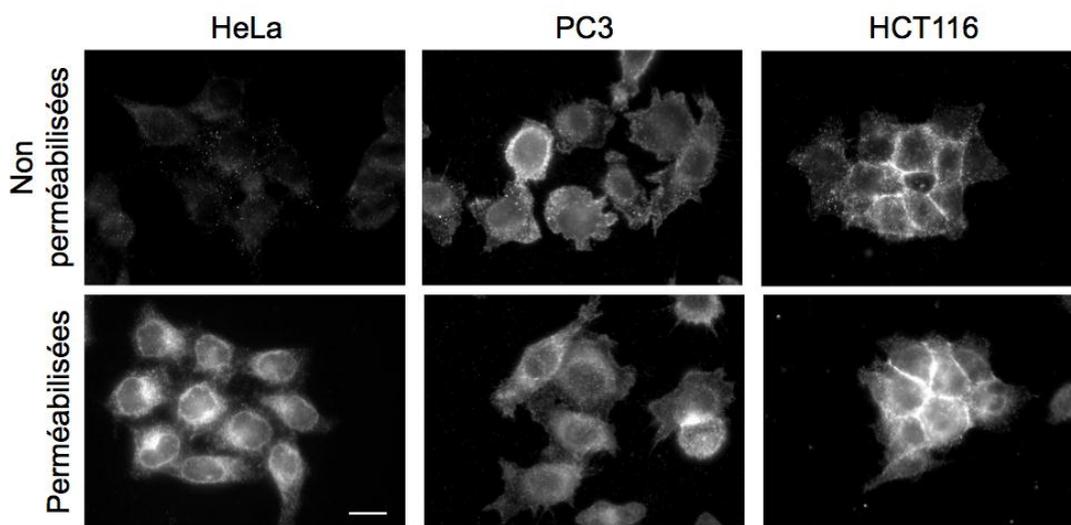
Figure 30 : Profil d'expression des TspanC8 dans les cellules PC3, HCT116 et HeLa

Analyse par RT-qPCR des niveaux d'expression des différentes TspanC8 dans les cellules PC3, HCT116 et HeLa. Les données présentées sont les moyennes et écart-types obtenus sur trois expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Si on confronte ces niveaux d'expression aux quantités d'ADAM10 présentes à la surface de ces différentes lignées, il est possible d'établir une corrélation entre le faible niveau d'expression des TspanC8 dans les cellules HeLa et la faible expression membranaire d'ADAM10. En effet, dans les deux autres lignées qui expriment des TspanC8, le niveau

d'expression de surface d'ADAM10 est supérieur. Une hypothèse rendant compte de ces observations serait que les TspanC8 permettent l'adressage d'ADAM10 à la surface cellulaire.

Afin de tester cette hypothèse, nous nous sommes intéressés à la localisation subcellulaire d'ADAM10. Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-ADAM10 dans des conditions non-perméabilisées, pour ne voir que le marquage de surface. Dans ces conditions, les cellules PC3 et HCT116 présentent un fort marquage alors que celui dans les cellules HeLa est très faible, à la limite de la détection (figure 31). Après perméabilisation des cellules, un fort marquage est toujours observé dans les cellules HCT116 et PC3 alors que pour les cellules HeLa, un fort marquage intracellulaire est révélé (figure 31). Pour déterminer l'identité de ce compartiment intracellulaire, nous avons analysé par microscopie confocale la localisation d'ADAM10 et de différents marqueurs des compartiments intracellulaires. Aucune co-distribution n'est observée avec les marqueurs de l'appareil de Golgi (Golp4) ou du compartiment endosomal tardif (CD63) mais deux différents marqueurs du RE (calnexine et PDI) co-localisent avec ADAM10. Ces données démontrent que, dans les cellules HeLa, ADAM10 est retenu dans le RE (figure 32).



**Figure 31 : ADAM10 est exprimé à la surface des cellules PC3 et HCT116 et présent dans un compartiment intracellulaire dans les cellules HeLa**

Analyse par immunofluorescence de la localisation d'ADAM10 sur cellules PC3, HCT116 et HeLa, avec ou sans TritonX100 pour la perméabilisation. Les réglages d'acquisition sont identiques pour toutes les images. Les images présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

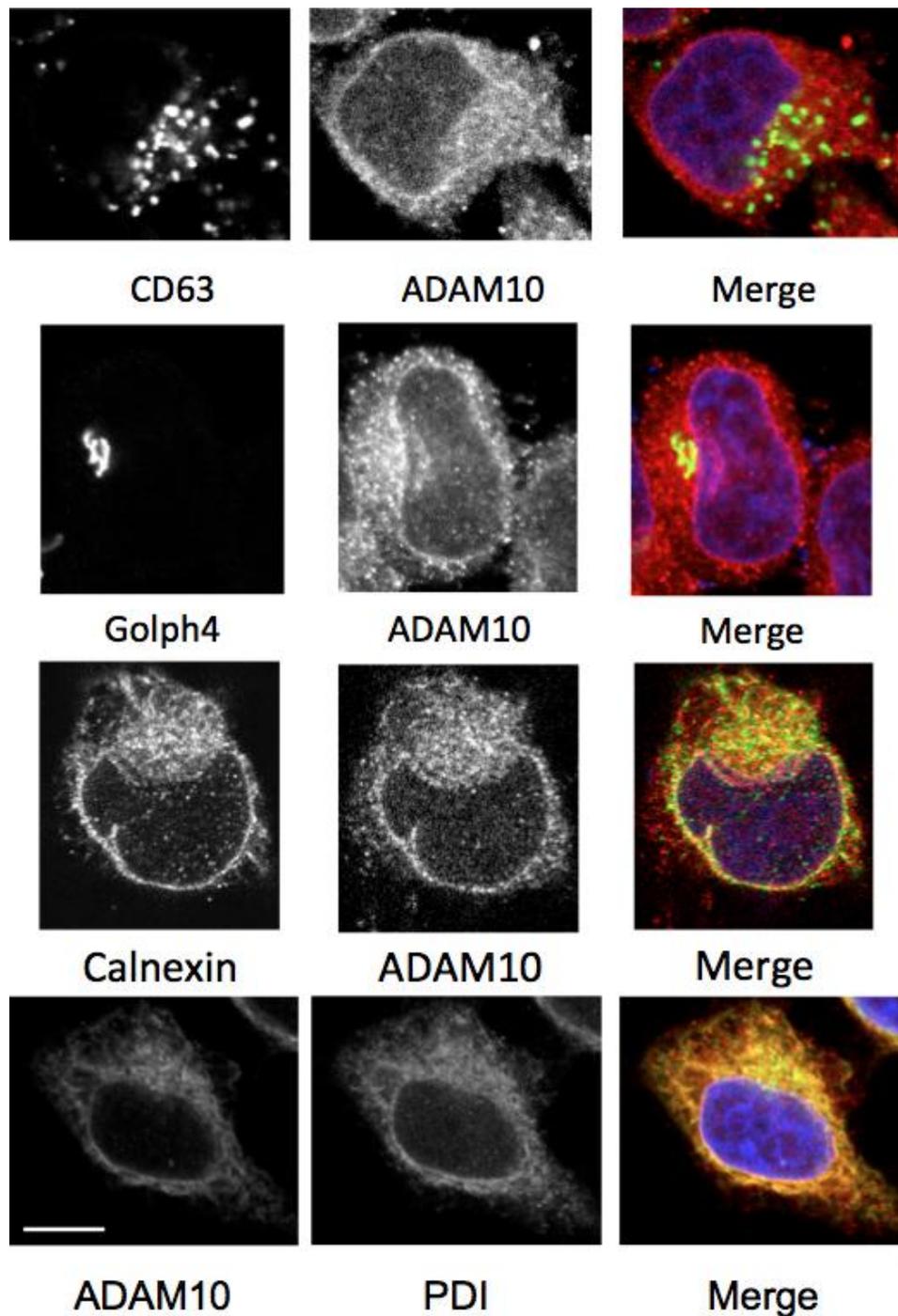


Figure 32 : **ADAM10 est retenu dans le réticulum endoplasmique des cellules HeLa**

Analyse par microscopie confocale dans des cellules HeLa des distributions d'ADAM10 et de différents marqueurs de compartiments intracellulaires : PDI (RE), CD63 (compartiment endosomal/lysosomal), calnexin (RE) et Golph4 (Appareil de Golgi). La barre d'échelle correspond à 10 $\mu$ m.

## **L'EXPRESSION DES TSPAN8 DANS LES CELLULES HELA PERMET LA SORTIE DU RE ET L'ACCUMULATION D'ADAM10 A LA SURFACE CELLULAIRE**

La faible expression de surface d'ADAM10 et sa rétention dans le RE des cellules HeLa est associée à une faible expression des Tspan8. De plus, les cellules PC3 et HCT116 qui expriment plus largement les Tspan8 présentent une expression de surface d'ADAM10 supérieure. Est-il possible que les Tspan8 régulent la localisation d'ADAM10 et permettent son adressage à la membrane plasmique ?

Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé le modèle cellulaire HeLa pour observer les conséquences de l'expression des différents Tspan8 sur l'expression de surface d'ADAM10. Ainsi, les cellules HeLa ont été transfectées transitoirement avec les Tspan8-GFP et le niveau de surface d'ADAM10 a été suivi par des analyses en cytométrie de flux biparamétriques, pour pouvoir suivre à la fois l'expression des Tspan8 (niveau d'expression de la GFP) et le niveau de surface d'ADAM10. La transfection des Tspan-5, -14, -15, -33 induit une augmentation du niveau d'ADAM10 à la surface de ces cellules alors que l'expression des tétraspanines CD9 et Tspan12 n'a pas d'impact (figure 33). L'expression de Tspan-10 n'induit pas de changement dans l'expression de surface d'ADAM10 tandis que l'effet de Tspan17 est bi-phasique, avec une légère augmentation de l'expression de surface dans les cellules qui expriment de faible quantité de la tétraspanine et pas d'effet dans les cellules qui expriment plus fortement Tspan17.

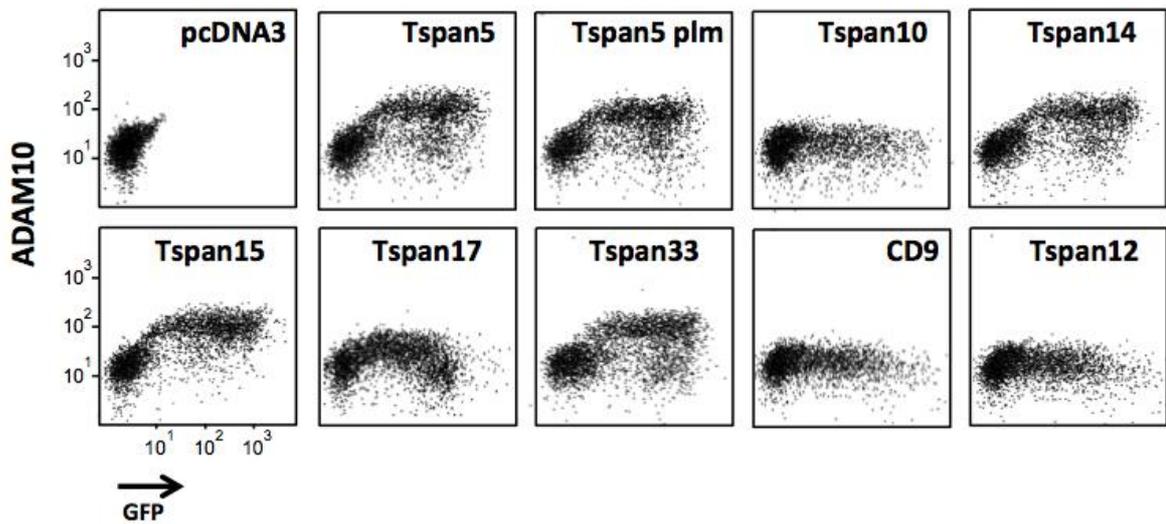


Figure 33 : L'expression des TspanC8 augmente l'expression de surface d'ADAM10

Analyse par cytométrie de flux bi-paramétrique de l'expression de surface d'ADAM10 en fonction de l'expression de la TspanC8-GFP indiquée.

Pour vérifier que cet effet soit spécifique à ADAM10, nous avons étudié l'impact de la transfection des TspanC8 sur le niveau d'expression de surface d'ADAM17 (la métalloprotéase la plus proche d'ADAM10). Aucune modification du niveau membranaire d'ADAM17 après transfection transitoire des TspanC8 n'a été observée, démontrant que les conséquences de l'expression des TspanC8 sont spécifiques à ADAM10 (figure 34).

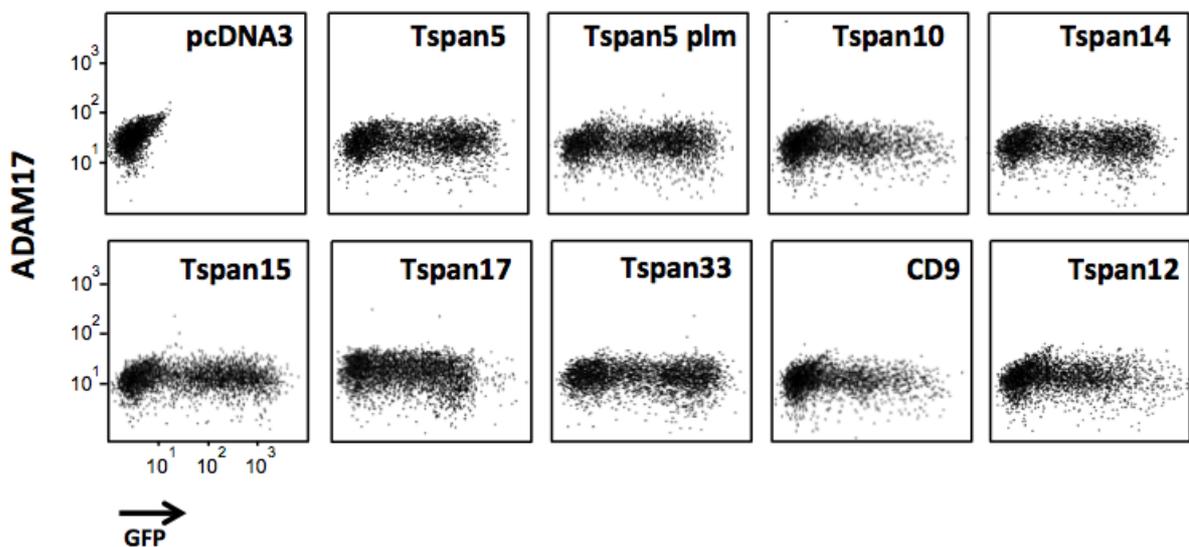
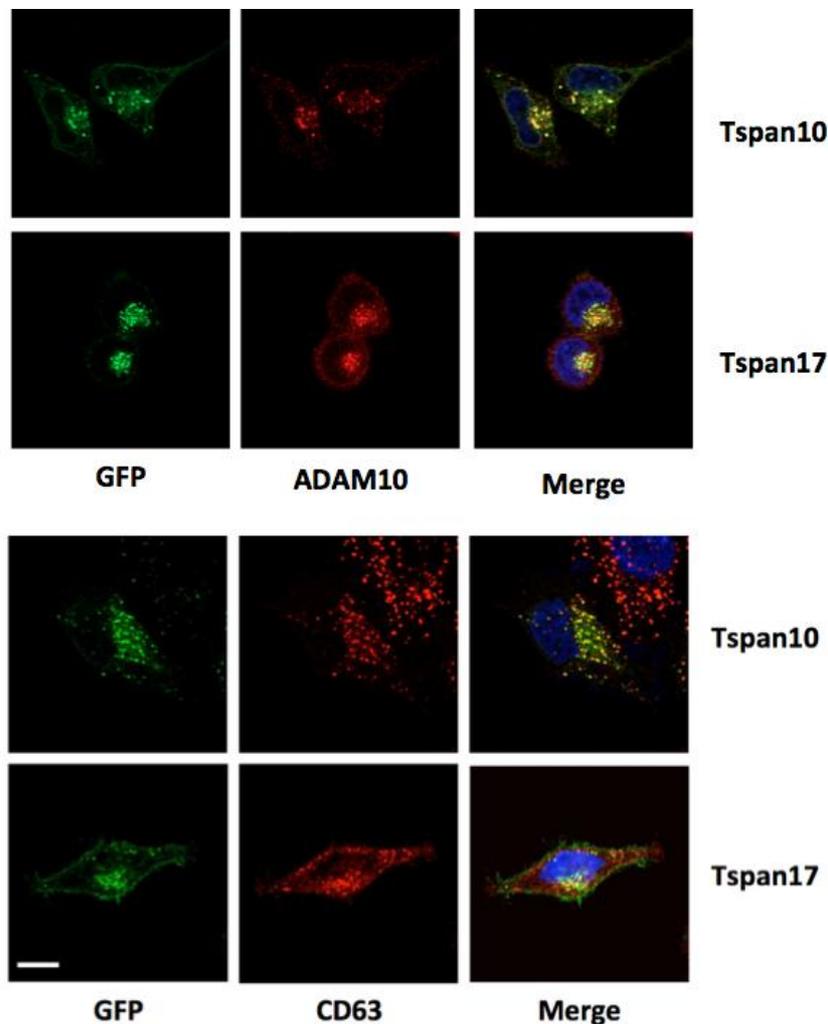


Figure 34 : L'expression des TspanC8 n'a pas d'effet sur l'expression de surface d'ADAM17

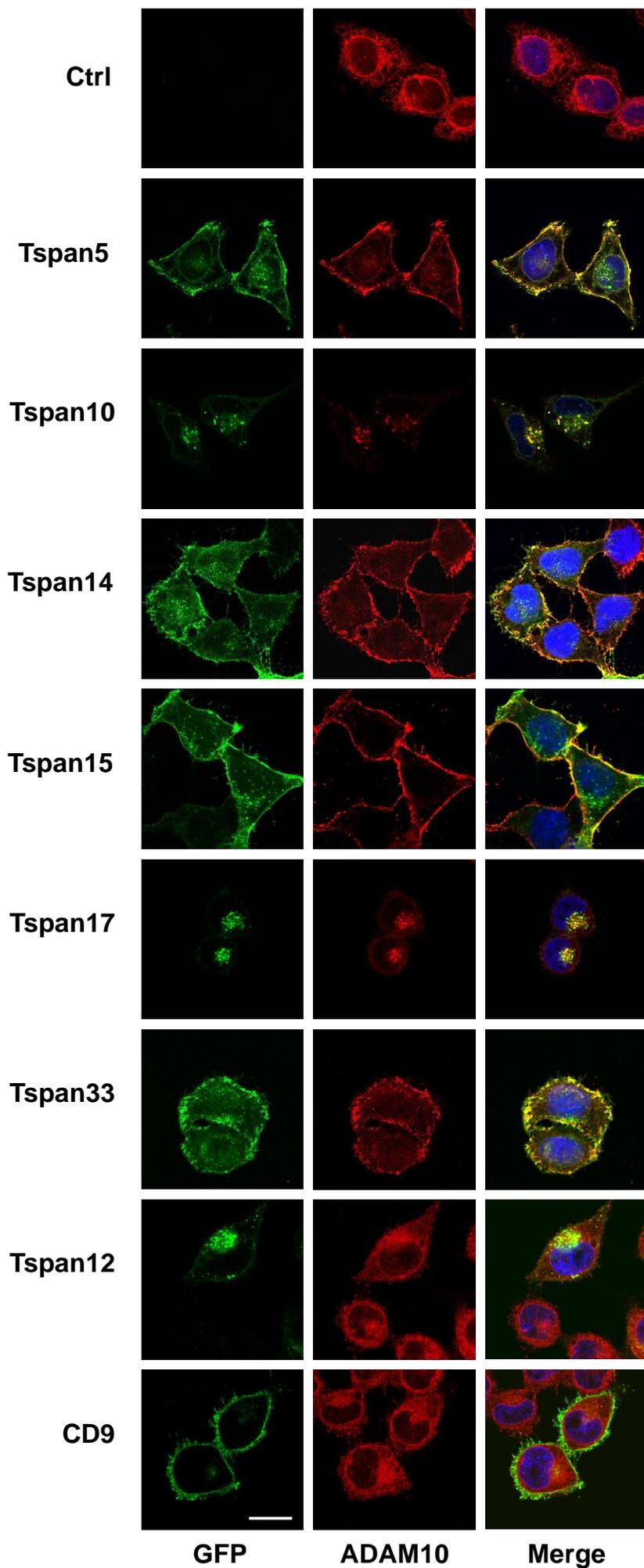
Analyse par cytométrie de flux bi-paramétrique de l'expression de surface d'ADAM17 en fonction de l'expression de la TspanC8-GFP indiquée.

Pour visualiser le changement de localisation d'ADAM10, nous avons étudié par imagerie confocale les conséquences de la transfection des TspanC8 sur la localisation d'ADAM10 dans les cellules HeLa. Nous avons ainsi démontré que la transfection des Tspan-5, -14, -15 et -33, qui sont majoritairement exprimées à la surface cellulaire, induit un changement de localisation d'ADAM10 d'un compartiment intracellulaire à la surface cellulaire pour co-localiser avec les TspanC8 (figure 36). Tspan-10 et -17 sont présentes dans un compartiment intracellulaire et leur expression entraine l'accumulation d'ADAM10 dans ce compartiment TspanC8-positif. Nous avons montré par des analyses de microscopie confocale que les vésicules intracellulaires Tspan-10 ou -17 positives sont co-marquées avec le CD63 qui est un marqueur du compartiment endosomal tardif (figure 35).



**Figure 35 : L'expression de Tspan-10 ou -17 induit la relocalisation d'ADAM10 dans un compartiment intracellulaire co-marqué par CD63**

Analyse par microscopie confocale de cellules HeLa transfectées transitoirement avec les tétraspanines Tspan-10 ou -17 étiquetées GFP et marquées avec un anticorps anti-CD63.



**Figure 36 : L'expression de Tspan-5, 14, -15, -33 induit la relocalisation d'ADAM10 à la surface cellulaire**

Analyse par microscopie confocale de la localisation d'ADAM10 (en rouge) après transfection transitoire des TspanC8-GFP (en vert) dans des cellules HeLa perméabilisées au TritonX100. La barre d'échelle correspond à 10µm.

La présence du complexe ADAM10/TspanC8 à la surface des cellules HeLa a été confirmée biochimiquement. Les protéines de surface de cellules HeLa exprimant stablement Tspan-5, -14, -15 ont été marquées avec la biotine puis analysées par western-blot après IP avec des anticorps anti-GFP et anti-ADAM10. Nous confirmons l'association d'ADAM10 aux TspanC8 testées par la co-immunoprécipitation de la GFP dans l'IP ADAM10 et celle d'ADAM10 dans l'IP GFP (figure 37). De plus, cette fraction d'ADAM10 associée aux tétraspanines est marquée par la biotine, comme le démontre la co-migration d'ADAM10 avec une bande marquée par la streptavidine (réactif permettant de révéler la présence de la biotine) visualisée par western-blot bicolore grâce au système Odyssey® (figure 37). Enfin, la quantité d'ADAM10 co-précipitée avec la GFP est similaire à celle précipitée par l'anticorps spécifique, indiquant que la majeure partie d'ADAM10 est en interaction avec les TspanC8. L'ensemble de ces données indique qu'une forte proportion d'ADAM10 est en interaction directe avec les TspanC8 et que le complexe est présent à la surface cellulaire.

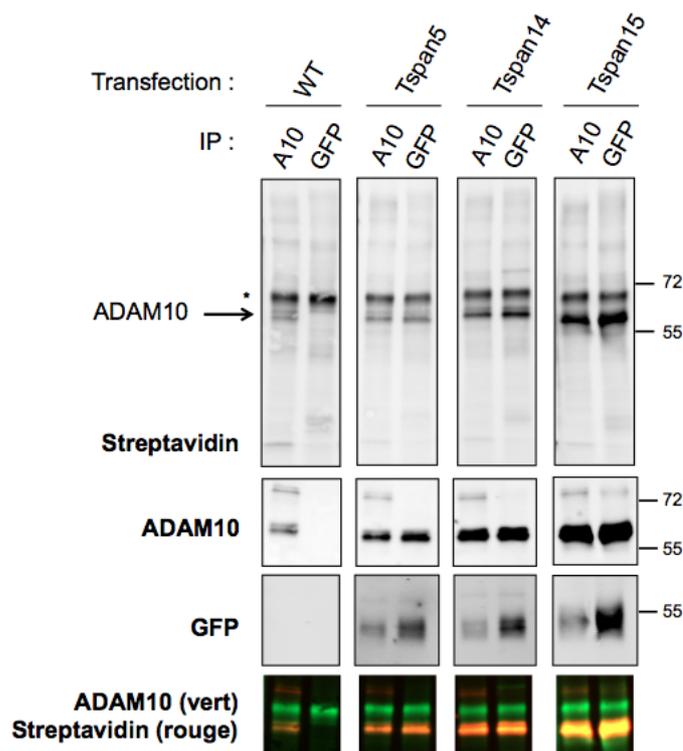
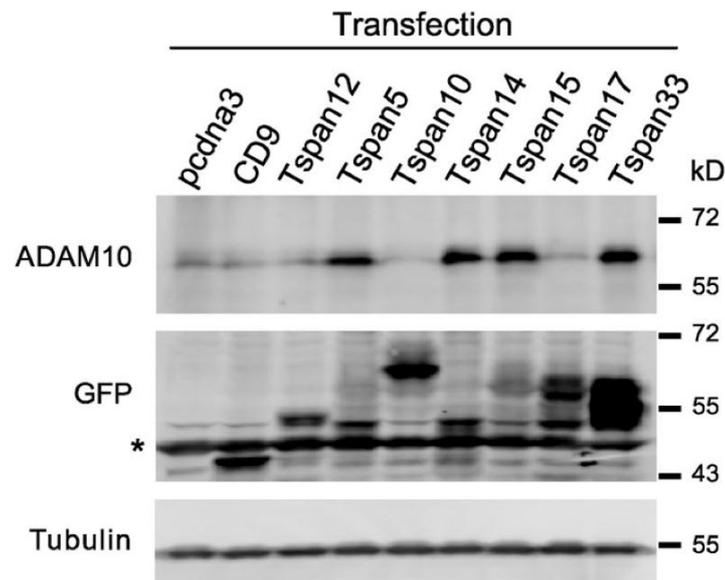


Figure 37 : Les complexes TspanC8/ADAM10 sont présents à la surface cellulaire

L'association entre ADAM10 et les TspanC8 est analysée par western-blot après marquage des protéines de surface par la biotine et co-immunoprécipitation, dans des cellules HeLa exprimant stablement ou non les Tspan-5, -14 ou -15 lysées en digitonine. Une bande non spécifique est indiquée par un « \* ».

Les TspanC8, en plus de diriger la localisation d'ADAM10, ont également un effet sur la quantité totale d'ADAM10. En effet, nous avons montré que la transfection des Tspan-5, -14, -15, et -33 mais pas Tspan-10 et -17, augmente fortement la quantité d'ADAM10 mature (figure 38).



**Figure 38 : L'expression des TspanC8 peut augmenter la quantité totale d'ADAM10**

Des cellules HeLa ont été transitoirement transfectées avec différentes TspanC8-GFP et la quantité d'ADAM10 a été analysée par western-blot après lyse en Laemmli.

La maturation de l'arborisation sucrée qui transforme des structures riches en mannoses en structure composées d'oligosaccharides complexes a lieu dans l'appareil de Golgi et peut être suivie par le traitement avec des glycanases, comme l'endoglycosidase-H (Endo-H, qui clive les structures riches en mannose) et la PNGase (qui clive les structures riches en mannose mais aussi les oligosaccharides complexes) (figure 39).

Nous avons tenté d'utiliser la méthode de digestion par les glycanases pour confirmer biochimiquement qu'ADAM10 progresse du RE vers le Golgi en suivant la maturation de son arborisation sucrée. En effet, si les TspanC8 permettent le trafic d'ADAM10 vers la membrane plasmique en passant par le Golgi, l'arborisation sucrée d'ADAM10 devrait être maturée et devenir résistante au traitement par l'Endo-H mais toujours sensible à la PNGase. Dans les cellules contrôles, les formes mature et immature sont sensibles à l'Endo-H et l'expression de Tspan5, qui entraîne une augmentation de la quantité d'ADAM10, ne modifie pas le type de glycosylation (figure 39). De plus, dans les deux lignées cellulaires, le

traitement par la PNGase entraine la même diminution de masse moléculaire apparente que celle avec l'Endo-H, indiquant qu'ADAM10 ne contient pas d'oligosaccharides complexes. Ces données confirment de précédents travaux qui démontrent que dans les cellules SKOV3 de cancer ovarien, ADAM10 est présent à la surface cellulaire et reste sensible au traitement par l'Endo-H (Escrevente et al., 2008).

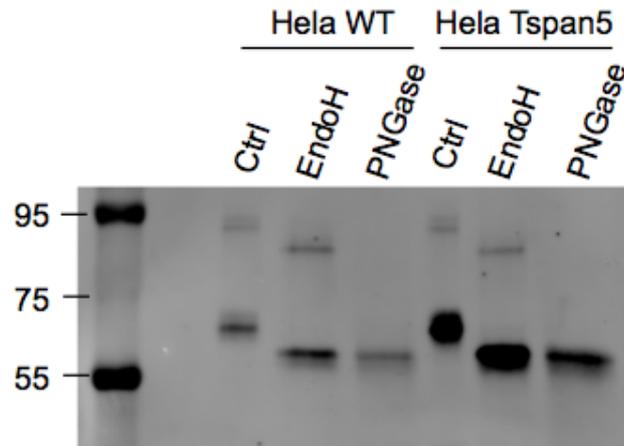


Figure 39 : **Sensibilité d'ADAM10 à la digestion par les glycanases**

Analyse de la résistance d'ADAM10 aux glycanases après lyse et IP ADAM10 dans des cellules HeLa exprimant stablement ou non Tspan5. Le traitement par la PNGase dure 24h et l'exposition prolongée à la PNGase peut entrainer une protéolyse, ce qui peut expliquer la diminution de la quantité d'ADAM10 observée dans ces conditions.

## LES TSPANC8 ENDOGENES REGULENT LE TRAFIC D'ADAM10

Nous avons démontré dans le modèle cellulaire HeLa que la transfection des TspanC8-GFP permet la sortie d'ADAM10 du RE et son accumulation à la surface cellulaire. La présence d'une étiquette et la sur-expression de protéines exogènes peut engendrer des biais expérimentaux. Afin de s'assurer que les effets observés sont dus à la présence des TspanC8, nous avons utilisé deux autres modèles cellulaires, les cellules PC3 et HCT116, qui expriment des TspanC8 endogènes (figure 40). L'expression de Tspan-14 et -15 a donc été déplétée par interférence ARN, respectivement dans les cellules HCT116 et PC3 (figure 40A), et la localisation d'ADAM10 a été analysée par microscopie confocale. La déplétion est efficace et spécifique puisque la déplétion de Tspan-14 ou -15 n'entraîne pas de diminution de l'ARNm de Tspan5 (figure 40A). Nous avons montré par cytométrie de flux que la déplétion des TspanC8 majoritaires dans les cellules PC3 et HCT116 entraîne une diminution de l'expression de surface d'ADAM10 (figure 40B). La déplétion de Tspan-14 dans les cellules HCT116 entraîne une plus forte réduction du niveau de surface d'ADAM10 que celle de Tspan-15 dans les cellules PC3.

Dans les deux lignées cellulaires, la perte de la TspanC8 majoritaire entraîne la rétention d'ADAM10 dans un compartiment intracellulaire co-marqué avec la protéine PDI (figure 40C). Ces données montrent que, dans les cellules PC3 et HCT116, la TspanC8 endogène et majoritaire est indispensable pour l'adressage d'ADAM10 à la surface cellulaire et que son absence provoque son accumulation dans le RE.

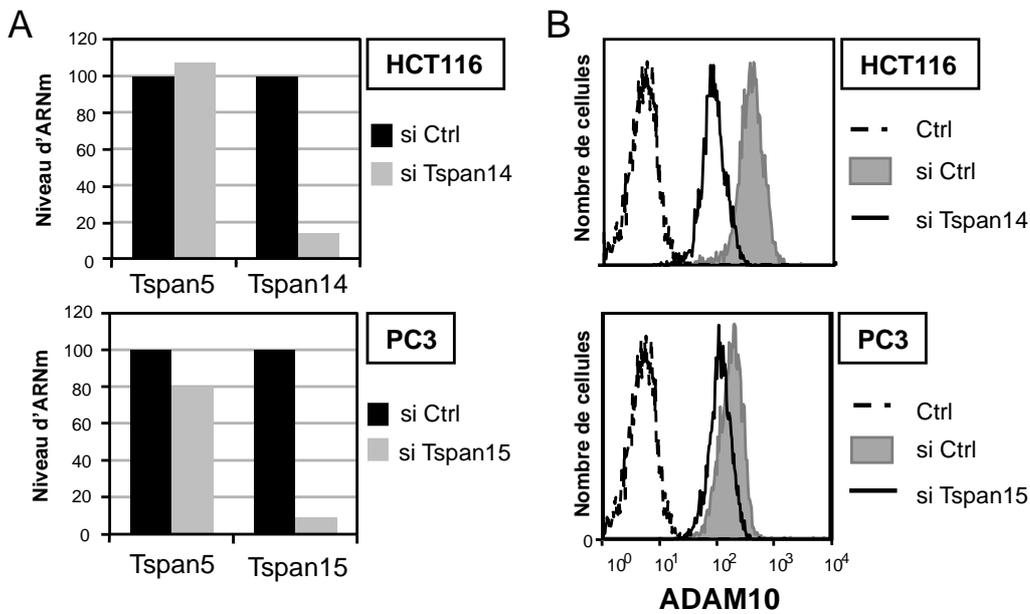
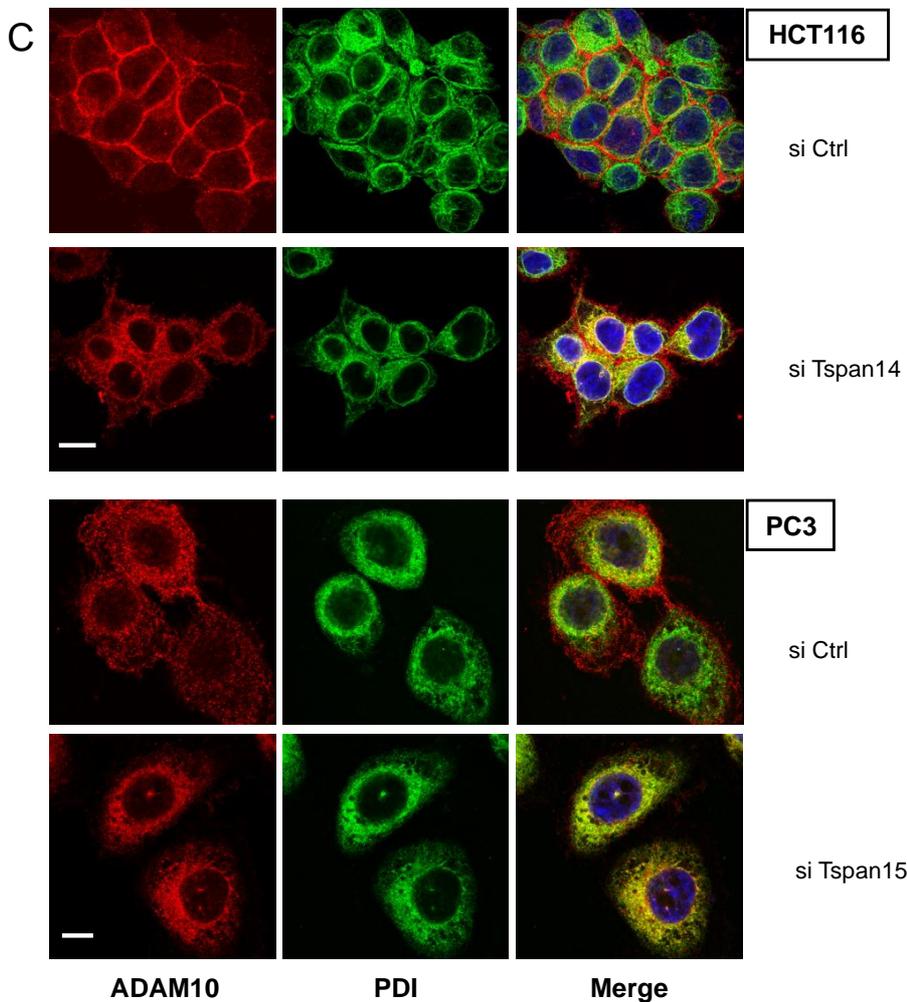


Figure 40 : Les **TspanC8** endogènes présentes dans les cellules PC3 et HCT116 sont indispensables à la sortie du RE d'ADAM10

(A) Analyse de l'expression de Tspan-14 et -15 par RT-qPCR 24h après silencing dans les cellules HCT116 et PC3 respectivement.

(B) Analyse de l'expression de surface d'ADAM10 par cytométrie de flux dans les cellules HCT116 et PC3 48h après le silencing de Tspan-14 et -15 respectivement.



(C) Analyse par microscopie confocale de la localisation d'ADAM10 (rouge) et PDI (vert) dans des cellules HCT116 et PC3 perméabilisées au TritonX100 et 48h après le silencing de Tspan-14 ou -15 respectivement. La barre d'échelle correspond à 10µm.

## ROLES DES REGIONS CONSERVEES DANS LA GRANDE BOUCLE EXTRACELLULAIRE DES TSPANC8 POUR L'INTERACTION AVEC ADAM10

L'alignement des tétraspaniens de la sous-famille des TspanC8 a permis d'identifier des zones de fortes conservations. Ces zones ont une probabilité plus forte de contenir les résidus qui sont importants pour l'interaction avec ADAM10, qui est une fonction partagée par tous les membres de la sous-famille. Ainsi nous avons identifié un motif rDDxDlqn (une minuscule indique que le résidu est conservé dans au moins 4 TspanC8 et une majuscule indique qu'il est conservé dans toutes les TspanC8), situé entre les hélices A et B de la grande boucle extracellulaire, présent dans les TspanC8 mais pas dans CD151 (figure 41A). Cette zone est très peu conservée parmi les différentes tétraspanines mais présente de fortes homologies parmi les membres de la sous-famille TspanC8. En prenant Tspan5 comme modèle nous avons étudié par western-blot après IP l'impact de la mutation des ces résidus sur sa capacité d'interagir avec ADAM10. Des cellules HeLa ont été transfectées transitoirement avec les différents mutants de Tspan5 puis lysées en digitonine pour révéler les complexes primaires. Nous avons ainsi démontré que la mutation des résidus RDD entraîne une perte de l'interaction avec ADAM10, que les résidus DID ne semblent pas essentiels et que la mutation des résidus DLQ, malgré une moins bonne transfection de la tétraspanine mutée et une différence de migration par rapport à la forme sauvage, n'abolit pas l'interaction avec ADAM10 (figure 41B). Un deuxième motif conservé dans les TspanC8 est le motif NxYFN, situé après l'hélice B. La mutation de ce motif dans Tspan5 aboutit à une perte totale de l'interaction avec ADAM10 (figure 41B). Enfin, la capacité des mutants à augmenter le niveau d'expression de surface d'ADAM10 a été analysée par cytométrie de flux bi-paramétrique. Seuls les mutants dont l'interaction a été démontrée biochimiquement sont capables d'augmenter le niveau de surface d'ADAM10 (figure 42A).

L'ensemble de ces données montre que la présence des résidus RD et LQ au sein du motif RDDIDLQ et le motif NIYF sont nécessaires pour avoir une interaction optimale de Tspan5 avec ADAM10 et un adressage à la membrane plasmique.

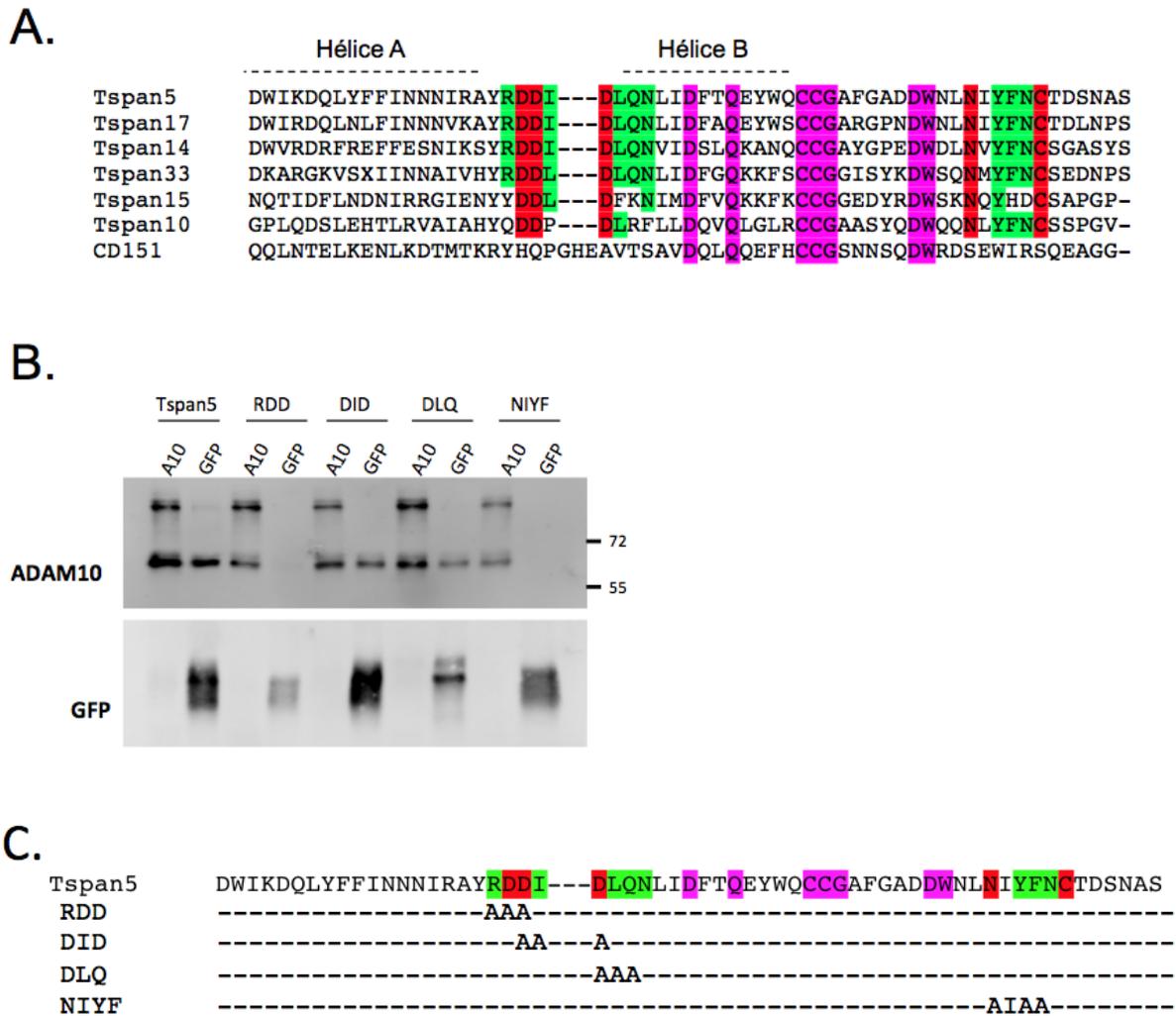
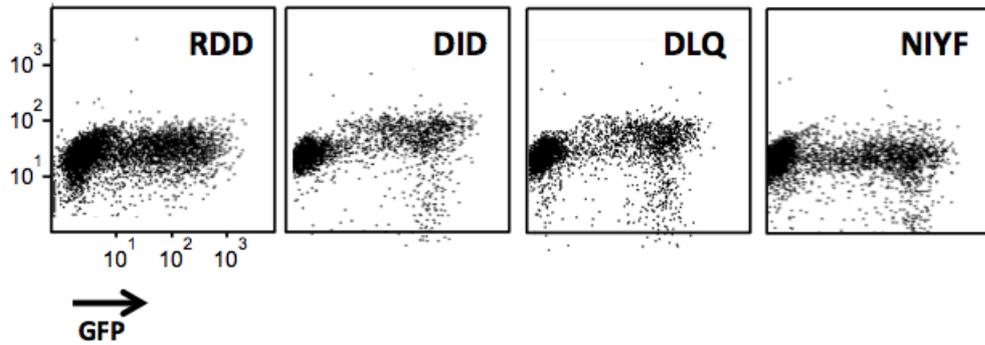


Figure 41 : La mutation de zones conservées dans les TspanC8 entraîne la perte de l'interaction avec ADAM10

- (A) Alignement d'une partie de la grande boucle extracellulaire des tétraspanines montrant la conservation de motifs RDDxDLQN et NxYFN chez les TspanC8, absents dans la séquence du CD151 (une tétraspanine n'appartenant pas à la sous-famille). Les acides aminés en violet sont des acides aminés commun à toutes les tétraspanines, en rouge ceux spécifiques des TspanC8 et en vert ceux spécifiques et présents dans au moins 60% des TspanC8.
- (B) Analyse par western-blot après IP de cellules HeLa transfectées transitoirement avec les différents mutants de Tspan5 et lysées en digitonine. Les séquences après mutation du motif RDDIDLQ sont présentées. Le mutant NIYF correspond au remplacement de ces acides aminés par des alanines.
- (C) Représentation des motifs mutés dans les différentes constructions utilisées.

A.



B.

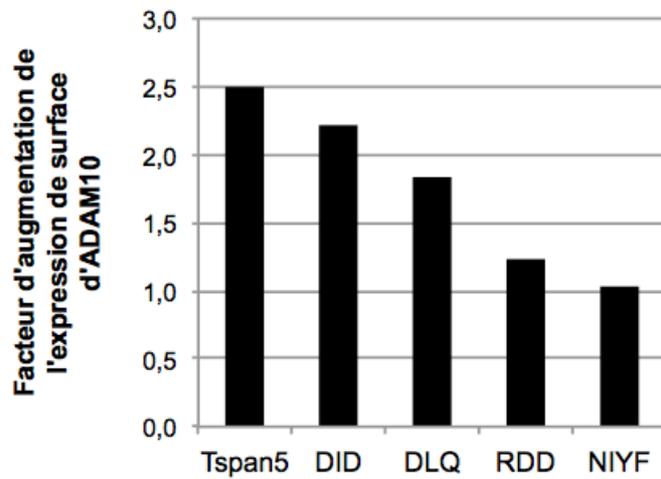


Figure 42 : **La mutation de certains résidus de la grande boucle extracellulaire de Tspan5 ne permet plus l'adressage d'ADAM10 à la surface cellulaire**

- (A) Analyse par cytométrie de flux du niveau d'expression de surface d'ADAM10 de cellules HeLa transfectées transitoirement avec les différents mutants de Tspan5.
- (B) Quantification de l'augmentation de l'expression de surface d'ADAM10. Les données représentent le facteur d'augmentation de l'expression de surface dans les cellules transfectées (GFP positives) par rapport aux cellules non transfectées (GFP négatives) du même échantillon.

Néanmoins, les données sur les mutants de Tspan5 sont à nuancer. En effet, nous avons étudié leur localisation sub-cellulaire dans des cellules HeLa transfectées transitoirement (figure 43). Le mutant DID, qui interagit normalement avec ADAM10, est presque exclusivement exprimé à la surface cellulaire. La localisation du mutant DLQ est plus proche de celle observée pour le Tspan5 non muté, avec une localisation principalement membranaire et une composante intracellulaire. Les mutants NIYF et RDD, qui sont les deux seuls mutants avec lesquels une perte de l'interaction avec ADAM10 est observée, présentent une localisation qui est exclusivement intracellulaire et qui est typique d'un marquage réticulum endoplasmique. A partir de ces données, un défaut dans la conformation de la protéine mutante ne peut être exclu et des données supplémentaires sont nécessaires pour conclure de façon définitive pour les deux mutants RDD et NIYF.

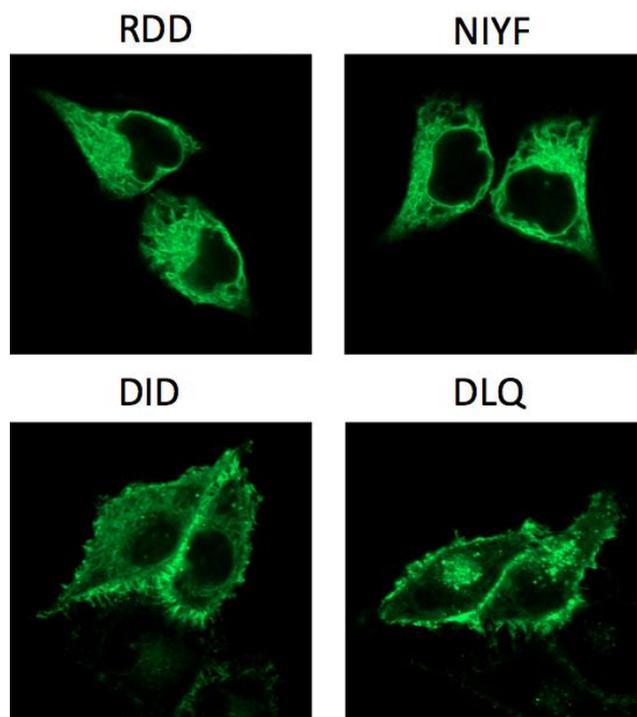
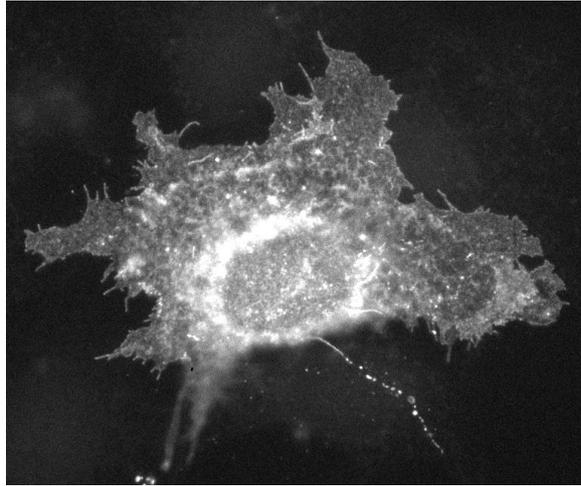


Figure 43 : **Localisation sub-cellulaire des différents mutants de Tspan5**

Analyse de la localisation par microscopie à fluorescence de cellules HeLa transfectées transitoirement avec les mutants de Tspan5 étiquetés GFP.



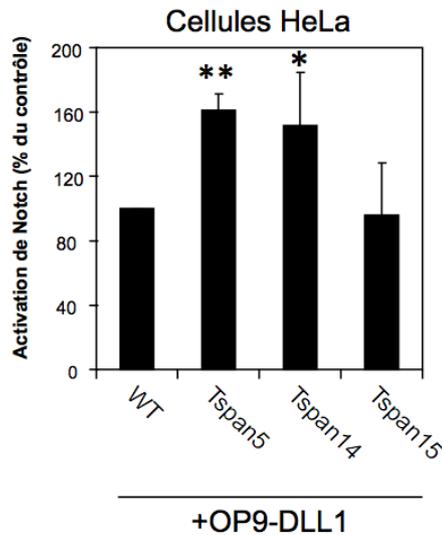
**Figure 44 : ADAM10 n'est pas nécessaire pour l'adressage de Tspan5 à la surface cellulaire**

Des MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) issus de souris KO pour ADAM10 ont été transfectées transitoirement avec Tspan5-GFP et sa localisation a été étudiée par microscopie à fluorescence.

La mutation des résidus RDD du motif RDD $\times$ DLQ ou NIYF entraîne la perte d'interaction avec ADAM10 et la rétention dans le RE. Même si la possibilité d'un défaut de conformation ne peut être exclu, l'interaction de Tspan5 avec ADAM10 pourrait être nécessaire pour l'adressage de Tspan5 à la membrane. Pour tester cette hypothèse, des fibroblastes issus de souris KO pour ADAM10 ont été transfectés transitoirement avec Tspan5-GFP et sa localisation a été étudiée par microscopie à fluorescence (figure 44). Tspan5 est normalement exprimé à la surface cellulaire, indiquant que l'expression d'ADAM10 n'est pas nécessaire au trafic de Tspan5 vers la membrane plasmique.

## **LES TSPANC8 REGULENT LA VOIE NOTCH, *IN-VITRO*, A UNE ETAPE PRE- GAMMA-SECRETASE**

L'expression des TspanC8 dans les cellules HeLa a pour effet d'augmenter la quantité d'ADAM10 mature présent à la surface cellulaire. Nous nous sommes donc intéressés aux conséquences de cette augmentation sur la fonction d'ADAM10. Pour cela, nous avons choisi de nous concentrer sur la voie Notch. L'activation de la voie a été analysée dans des cellules HeLa exprimant ou non stablement Tspan-5, -14 ou -15. Ces cellules ont été transfectées transitoirement avec une construction reportrice de l'activité de Notch (qui contient la firefly luciférase dont l'expression est sous le contrôle de 6 sites de liaison pour CSL) pour mesurer l'impact de l'expression des TspanC8 sur l'activation de la voie. La signalisation Notch est activée par co-culture avec des cellules OP9 ou OP9-DLL1 qui expriment Delta1 (DLL1), un ligand de Notch. L'expression de Tspan-5 ou -14 induit une augmentation de l'activité de Notch d'environ 50% (figure 45). Tspan-5, -14 et -15 permettent toutes trois l'accumulation d'ADAM10 à la surface cellulaire mais l'expression de Tspan15 n'a pas d'effet sur l'activation de la voie Notch, suggérant que l'action des TspanC8 ne passe pas uniquement par une augmentation de la quantité d'ADAM10 à la surface cellulaire.



**Figure 45 : L'expression de Tspan-5 et -14 dans les cellules HeLa augmente l'activation ligand-dépendante de la voie Notch**

Des cellules HeLa exprimant ou non stablement Tspan-5, -14 ou -15 sont transfectées avec la construction reportrice de Notch CSL-luciférase pour mesurer son activité après activation par co-culture avec des cellules OP9 exprimant Delta1, un ligand de Notch. Les données présentées sont les moyennes et écart-types de 4 expériences indépendantes faites en duplicat.

Afin de confirmer les données acquises dans le modèle HeLa, nous avons utilisé une lignée cellulaire dérivée d'un ostéosarcome, les cellules U2OS, qui exprime de façon endogène et majoritaire Tspan-5 et -14 et plus faiblement Tspan17 (figure 46). Ces cellules ont été transduites et expriment Notch1 de façon stable (Moretti et al., 2010). L'expression des TspanC8 a été déplétée et les conséquences sur l'activation de la voie Notch ont été suivies par l'activité de la construction reportrice CSL-firefly luciférase. Lorsque les cellules U2OS sont co-cultivées avec des cellules OP9 n'exprimant pas le ligand Delta1, la voie Notch n'est pas activée. Si la co-culture est faite avec des cellules OP9-DLL1, une augmentation d'un facteur 20 de l'activation est alors observée (correspond à la valeur référence, mise à 100%). Cette activation de la voie est dépendante de l'expression d'ADAM10 puisque sa déplétion d'environ 50% par interférence ARN conduit à une diminution de l'activation de Notch de 50% (figure 47). La déplétion de Tspan-5 ou -14 conduit aussi à une diminution de 45 et 35%,

respectivement et la double déplétion de Tspan-5 et -14 diminue l'activation de près de 60% (figure 47A). Cet effet est spécifique des TspanC8 puisque la déplétion du CD81, une tétraspanine n'appartenant pas à la famille, n'a pas d'effet. Nous avons démontré par cytométrie de flux que la diminution d'activation de la voie Notch observée après déplétion des TspanC8 est corrélée à une diminution de l'expression de surface d'ADAM10 (figure 47B). L'ensemble de ces données suggère que les TspanC8 régule l'activation de la voie Notch en modulant la quantité d'ADAM10 présente à la surface cellulaire.

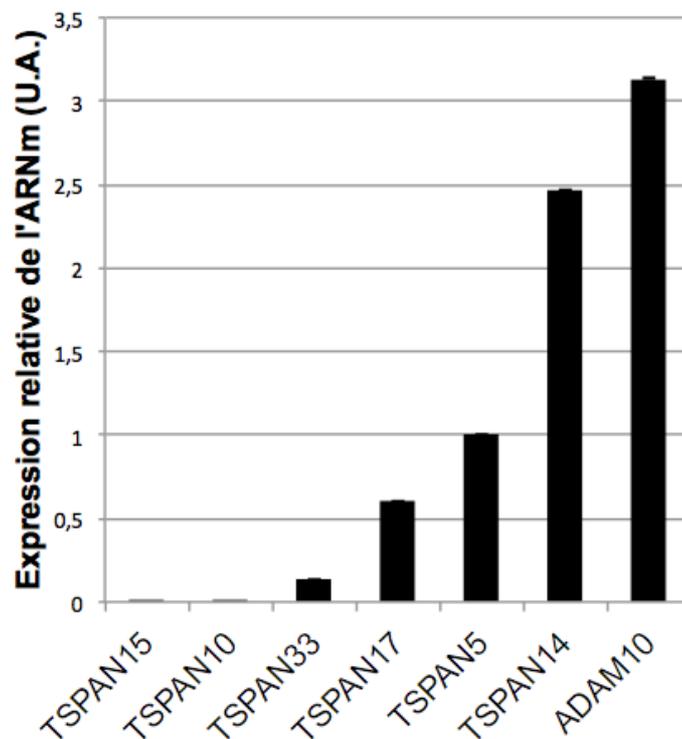


Figure 46 : Profil d'expression des TspanC8 et d'ADAM10 dans les cellules U2OS

Les données présentées ont été rapportées à l'expression de Tspan5 qui est arbitrairement ramenée à 1.

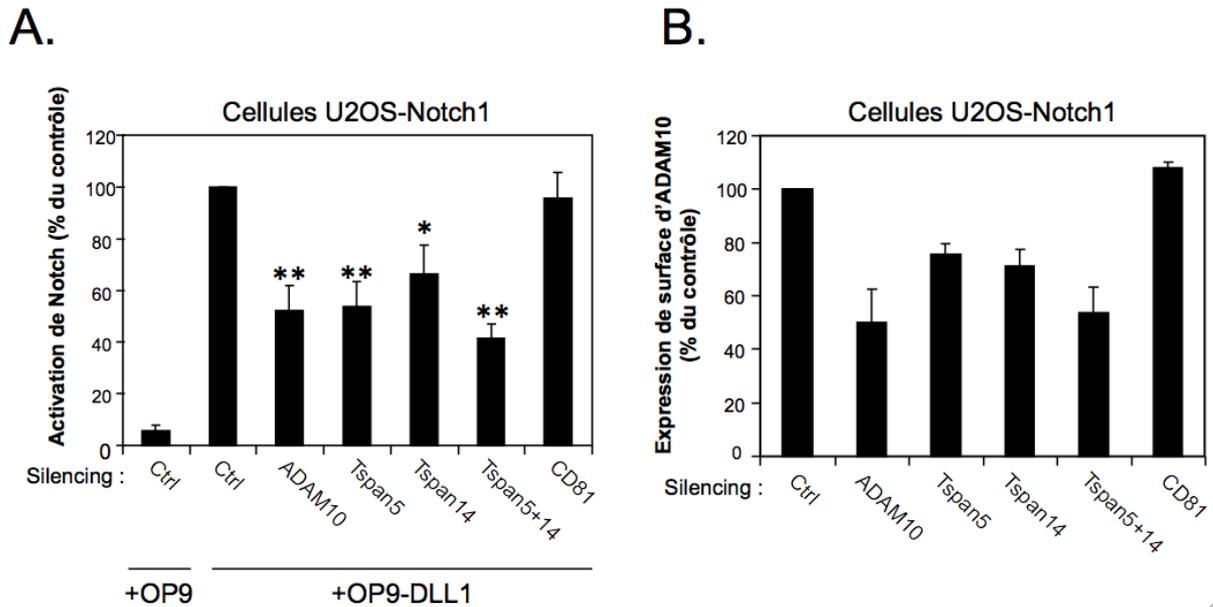


Figure 47 : **La déplétion des TspanC8 dans les cellules U2OS diminue l'expression de surface d'ADAM10 ainsi que l'activation de la voie Notch**

- (A) L'expression des TspanC8, de CD81 et d'ADAM10 dans des cellules U2OS exprimant stablement Notch1 a été déplétée par interférence ARN puis l'activation ligand-dépendante de Notch a été suivie après co-culture avec des cellules OP9 exprimant ou non le ligand de Notch DLL1. Les cellules U2OS-N1 sont transfectées avec la construction CSL-firefly luciférase qui permet de mesurer l'activation de la voie Notch. La figure présente les moyennes et écarts-types obtenus dans 3 expériences indépendantes réalisées en duplicat.
- (B) L'expression de surface d'ADAM10 a été analysée par cytométrie de flux dans les cellules U2OS-N1 dont l'expression d'ADAM10, de CD81 ou des TspanC8 est déplétée par interférence ARN. Les données présentées sont les moyennes et écarts-types obtenus pour trois expériences indépendantes.

Nous avons contrôlé par cytométrie de flux et par immunofluorescence que ni la localisation à la surface cellulaire ni le niveau d'expression de surface de Notch1 ne sont modifiés dans les cellules U2OS-N1 dont l'expression des TspanC8 est déplétée par interférence ARN (figure 48).

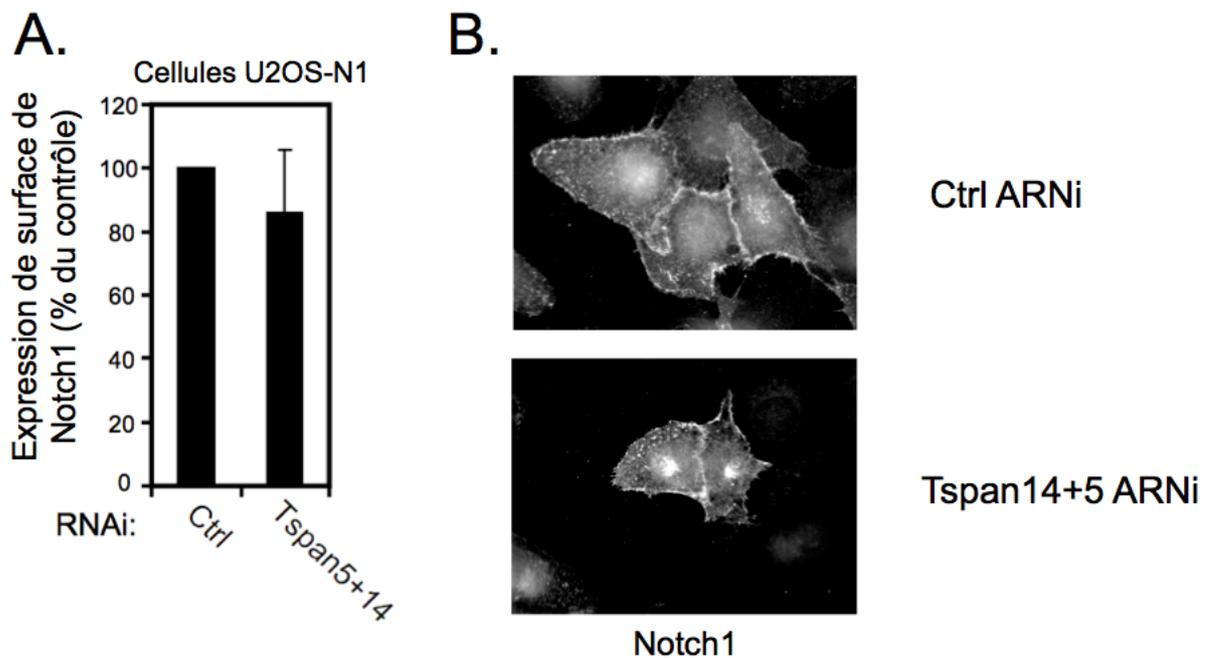


Figure 48 : La déplétion des TspanC8 majoritaires dans les cellules U2OS ne perturbe pas le niveau de surface ou la localisation de Notch1

- (A) Analyse par cytométrie de flux des niveaux d'expression de surface de Notch1 dans des cellules U2OS dont l'expression des TspanC8 majoritaire est déplétée par interférence ARN. Les données présentées sont les moyennes et écart-types obtenus dans 3 expériences indépendantes.
- (B) Analyse par microscopie à fluorescence de la localisation de Notch1 dans des cellules U2OS dont l'expression des TspanC8 majoritaire est déplétée par interférence ARN.

La production du NICD nécessite trois clivages successifs, le deuxième étant pris en charge par ADAM10 et le troisième par le complexe  $\gamma$ -sécrétase, ainsi que la fixation du ligand qui est nécessaire pour permettre le deuxième clivage. Ces clivages permettent la libération du NICD qui active la transcription des gènes cibles de Notch. Afin de préciser l'étape d'activation de la voie Notch qui est régulée par les TspanC8, nous avons testé si les TspanC8, dans notre modèle cellulaire U2OS, pouvait moduler l'activité du complexe  $\gamma$ -sécrétase. Pour cela, nous avons exprimé différentes constructions de Notch indépendantes de la fixation du ligand dans ces cellules. La première, le NICD, est indépendante de tout clivage protéolytique pour l'activation de la voie Notch (figure 49A). La deuxième, le Notch- $\Delta E$ , contient une petite partie du domaine extracellulaire, le passage transmembranaire et le NICD (figure 49A). Cette construction est indépendante d'ADAM10 mais reste dépendante de l'activité  $\gamma$ -sécrétase pour activer la voie Notch (Mumm et al., 2000). Les deux constructions ne contiennent pas le domaine PEST qui participe à la dégradation et l'arrêt de la signalisation (Fryer et al., 2004; 2002). Des cellules U2OS-N1 dont l'expression d'ADAM10 ou des TspanC8 majoritaires est déplétée par interférence ARN ont été transfectées par ces constructions et l'activation de la voie Notch a été analysée par mesure de l'activité luciférase du rapporteur CSL-firefly luciférase. Aucune différence dans l'activation de la construction reportrice n'a été observée dans les cellules dont l'expression d'ADAM10 ou des TspanC8 est déplétée (figure 49B). L'ensemble de nos données démontre un rôle important des TspanC8 dans la régulation de la voie Notch à une étape pré-  $\gamma$ -sécrétase, probablement au niveau d'ADAM10.

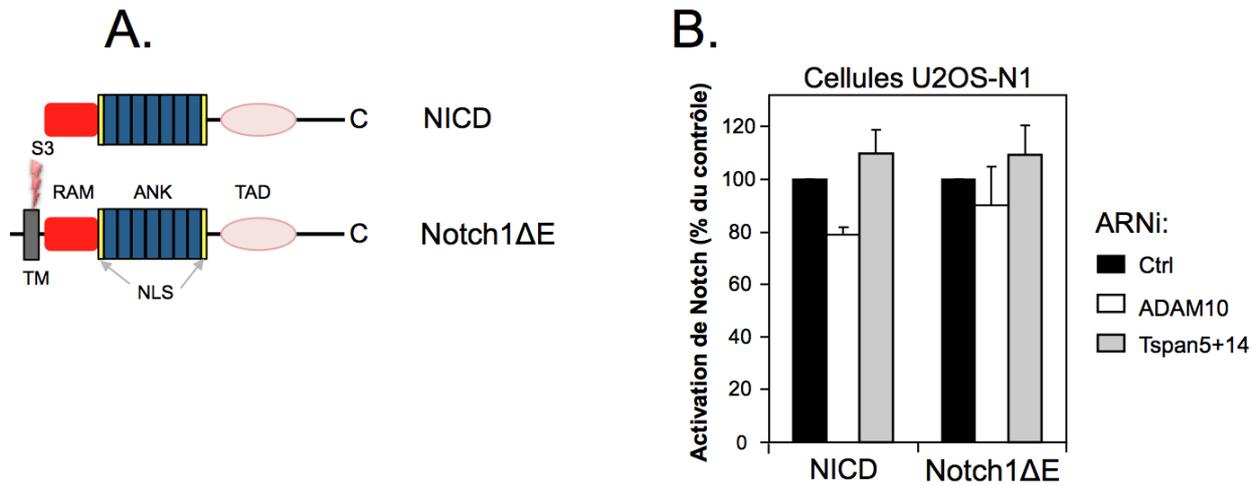


Figure 49 : Les TspanC8 ne régulent pas l'activité du complexe  $\gamma$ -sécrétase dans les cellules U2OS

- (A) Représentation schématique des constructions utilisées. Le Notch- $\Delta E$  est dépendant du clivage par le complexe  $\gamma$ -sécrétase alors que le NICD est indépendant de tout clivage protéolytique pour activer la construction reportrice.
- (B) Quantification de l'activation de la voie Notch après déplétion par ARN interférence des TspanC8 ou d'ADAM10. Les données sont exprimées en % du contrôle.

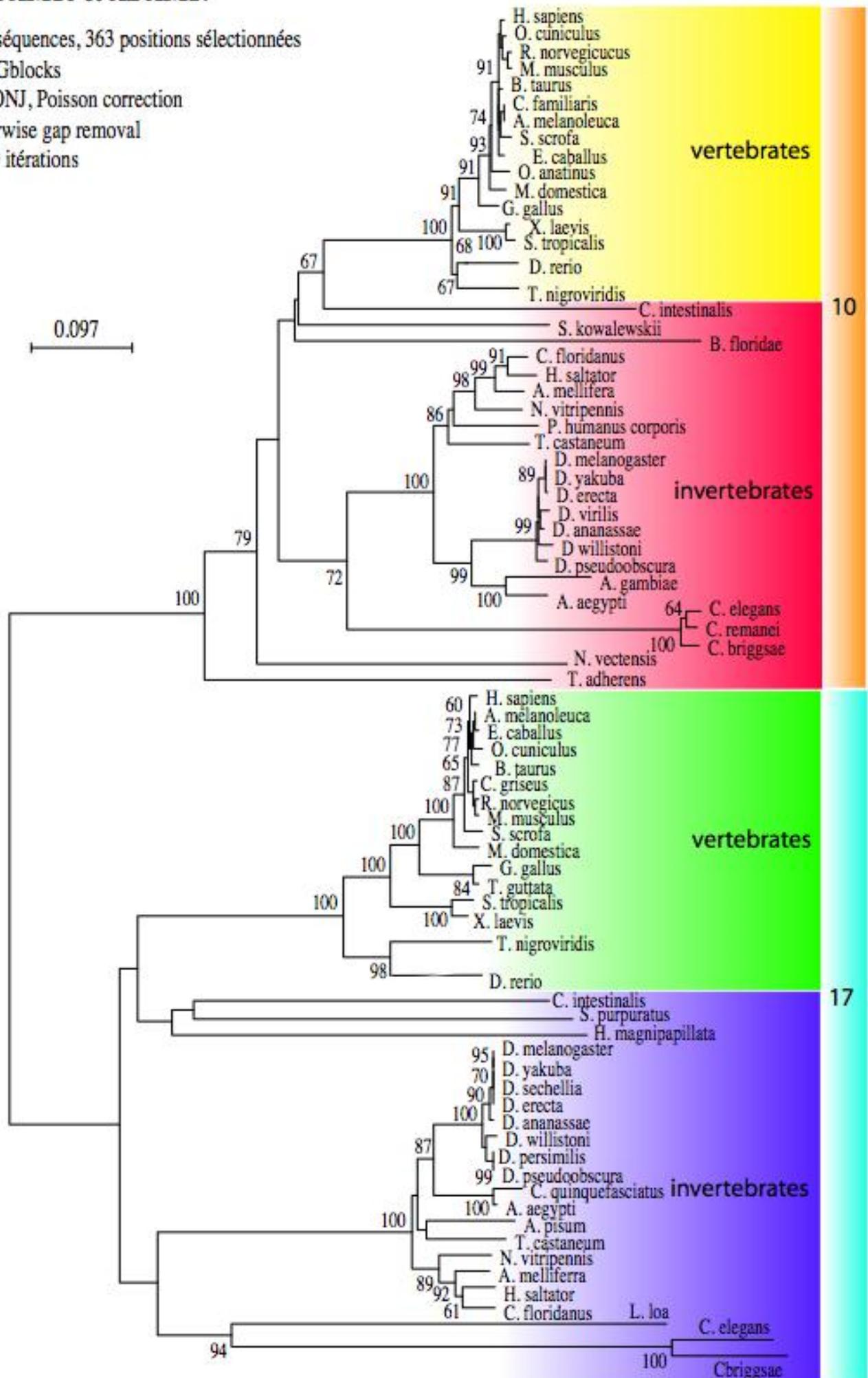
## ETUDE PHYLOGENETIQUE COMPARATIVE DES TSPANC8 ET D'ADAM10

L'étude phylogénétique des protéines est basée sur des alignements multiples de séquences primaires qui permettent de retracer l'histoire évolutive d'une protéine. Il est ainsi possible de dégager des régions conservées au cours de l'évolution qui peuvent être des régions importantes pour la fonction ou la structure. La phylogénie permet également de comparer l'évolution de différentes protéines, ou famille de protéines, et de proposer des mécanismes de co-évolution.

ADAM10 est une protéine qui est apparue très tôt dans l'évolution puisqu'elle est présente dans des organismes très primitifs comme *Nematostella vectensis* (anémone de mer). Lorsque des séquences sont très proches, il y a peu de différences entre les séquences primaires et cela se traduit sur l'arbre par des branches courtes. L'évolution d'ADAM10 est très lente puisque les branches chez les vertébrés et les invertébrés sont courtes, ce qui suggère que peu de mutations ont été accumulées. Cette faible tolérance aux mutations pourrait indiquer que la pression de sélection sur ADAM10 est très forte et que cette protéine assure probablement des fonctions indispensables dans les différentes espèces. La métalloprotéase la plus proche d'ADAM10, ADAM17, est aussi apparue très tôt dans l'évolution. ADAM10 et ADAM17 partagent un ancêtre commun qui est très lointain et ces 2 protéines qui font partie de la même famille existent toutes deux chez les invertébrés et ont évolué de façon indépendante. On constate qu'ADAM17 a également accumulé peu de mutation. ADAM10 et ADAM17 sont donc des protéines apparues très tôt dans l'évolution et dont la vitesse d'évolution est faible, suggérant qu'elles sont toutes deux soumises à une forte pression de sélection.

# ADAM10 et ADAM17

80 séquences, 363 positions sélectionnées  
 28 Gblocks  
 BIONJ, Poisson correction  
 pairwise gap removal  
 500 itérations



Les TspanC8 sont une sous-famille de tétraspanines composée de six membres qui forment deux groupes avec d'un côté les plus récentes Tspan5, Tspan 14, Tspan 17 et de l'autre les plus anciennes Tspan10, Tspan 15 et Tspan 33. En effet, des séquences orthologues (séquence d'une même protéine dans une espèce différente) spécifiques de Tspan10, Tspan15 et Tspan33 sont retrouvées chez les invertébrés ce qui n'est pas le cas pour Tspan5, Tspan14 et Tspan17. Toutes les séquences d'invertébrés trouvées à partir des séquences de Tspan5, Tspan14 ou Tspan17 forment un groupe à la racine de Tspan5, Tspan14 et Tspan17, indiquant qu'elles sont des orthologues de l'ancêtre commun, appelé Tspan5/14/17, présent avant la duplication conduisant à l'apparition des Tspan5, Tspan14 et Tspan17 actuelles. Chez les invertébrés, quatre TspanC8 existent donc: Tspan10, Tspan15, Tspan33 et un orthologue l'ancêtre Tspan5/14/17.

Les TspanC8 dérivent toutes d'un ancêtre commun très primitif. A partir de cet ancêtre commun, deux duplications sont nécessaires pour former les quatre premiers membres de la famille présents chez les invertébrés (Tspan10, Tspan15, Tspan33 et Tspan5/14/17). Deux duplications supplémentaires spécifiques des vertébrés sont à l'origine de Tspan5, Tspan14 et Tspan17 et portent à six le nombre total de TspanC8 exprimées chez les vertébrés. Il est possible d'établir une chronologie pour l'apparition de Tspan5, Tspan14 et Tspan17 mais pas pour les Tspan10, Tspan15 ou Tspan33. Tspan5 est la plus récente, vient ensuite Tspan17 puis Tspan14 et ensuite Tspan10, Tspan15, Tspan33 et Tspan5/14/17. Il n'est pas possible de donner plus de détails quant à la chronologie d'apparition de Tspan10, Tspan15 et Tspan33 car les branches sont trop longues et deviennent non significatives.

Trois TspanC8 sont exprimées chez la *Drosophila* (Tsp3A, Tsp86D et Tsp26A) et une chez *C.elegans*. La séquence orthologue chez *C.elegans* est Tsp-12 et elle se situe au niveau de l'ancêtre Tspan5/14/17. Toutes les TspanC8 de *Drosophila* n'apparaissent pas sur l'arbre phylogénétique. En effet, seule Tsp26A trouve sa place dans le groupe des séquences ancêtres Tspan5/14/17. Les deux autres sont plus difficiles à placer et diminuent la solidité de l'arbre. Néanmoins, on peut dire que Tsp3A et Tsp86D appartiennent au groupe Tspan10/15/33. Des données préliminaires suggèrent que Tsp86D se rapproche plutôt de Tspan33 et Tsp3A plutôt de Tspan10 ou Tspan15 sans pouvoir déterminer avec plus de précision à quelle séquence de mammifères elle se rapproche le plus.

# Tetraspanines 5-10-14-15-17-33

108 séquences

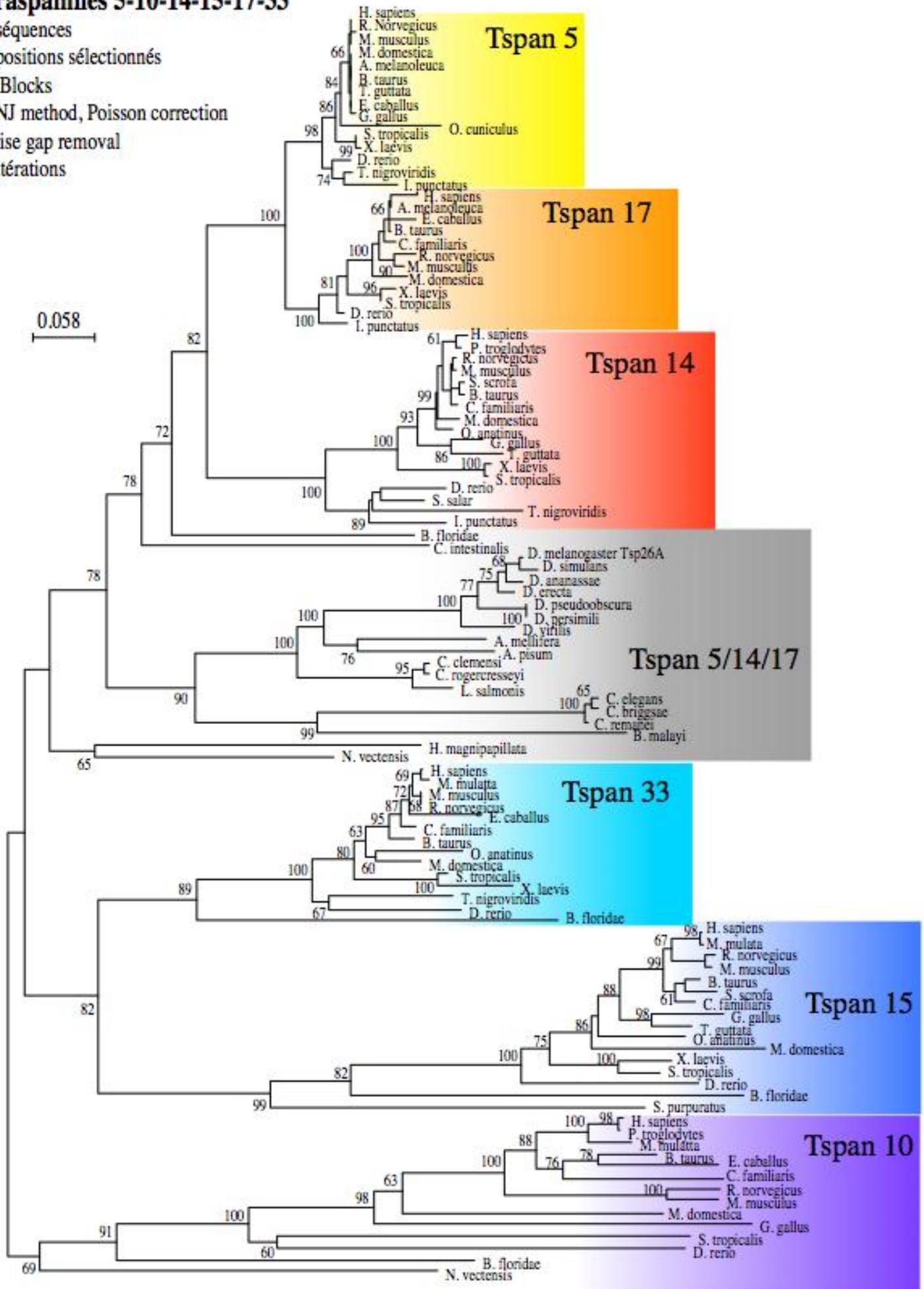
198 positions sélectionnés

10 GBlocks

BIONJ method, Poisson correction

parwise gap removal

500 itérations



L'évolution d'ADAM10 et d'ADAM17 est indépendante, lente et n'est pas permissive aux duplications. A l'inverse, la sous-famille TspanC8 est permissive aux duplications puisque dans le même laps de temps, c'est-à-dire entre les invertébrés et les mammifères, les TspanC8 ont subi deux duplications dont une est spécifique des vertébrés. La pression de sélection est donc moins forte sur cette famille de protéines et l'évolution de la sous-famille est plus rapide. L'ensemble de nos données n'est pas en faveur d'une hypothèse de co-évolution des ADAMs avec les TspanC8. En effet les séquences des ADAMs ont accumulées peu de mutations depuis les invertébrés alors que certaines des séquences de TspanC8 ne sont apparues qu'à partir des vertébrés. La conservation des différentes protéines après duplication peut suggérer que les nouvelles TspanC8 possèdent de nouvelles fonctions, en rapport ou non avec ADAM10, par rapport aux TspanC8 existantes.

Toutes les TspanC8 humaines sont capables d'interagir avec ADAM10. Puisque certaines TspanC8 sont déjà présentes chez les invertébrés, il est intéressant de savoir si l'interaction TspanC8-ADAM10/Kuzbanian est conservée.

## L'INTERACTION ADAM10/KUZBANIAN-TSPANC8 EST CONSERVEE CHEZ LES INVERTEBRES

Certaines TspanC8 et ADAM10 sont retrouvées chez des invertébrés et sont donc très anciennes. Néanmoins, chez les mammifères, les TspanC8 les plus anciennes interagissent aussi avec ADAM10. Il est donc possible que l'interaction entre les TspanC8 et ADAM10 soit apparue très tôt dans l'évolution. Pour tester cette hypothèse, des cellules S2 de *Drosophile* ont été transfectées transitoirement avec Kuzbanian-Myc seul ou en association avec les TspanC8-GFP. Les cellules ont ensuite été lysées en digitonine pour révéler les complexes primaires et des IP avec des anticorps anti-GFP et -Myc ont été réalisées. Seules Tsp3A et Tsp86D ont été testées pour leur interaction avec Kuzbanian. Nous avons ainsi pu démontrer que les TspanC8 de *Drosophile* Tsp3A et Tsp86D sont en interaction directe avec Kuzbanian, comme le montre la co-immunoprécipitation des TspanC8-GFP dans l'IP Kuz-Myc et la co-immunoprécipitation de Kuz-Myc dans les IP TspanC8-GFP (figure 50). Ces données indiquent que l'interaction des TspanC8 avec ADAM10/Kuzbanian a été conservée au cours de l'évolution et qu'elle est apparue très précocement.

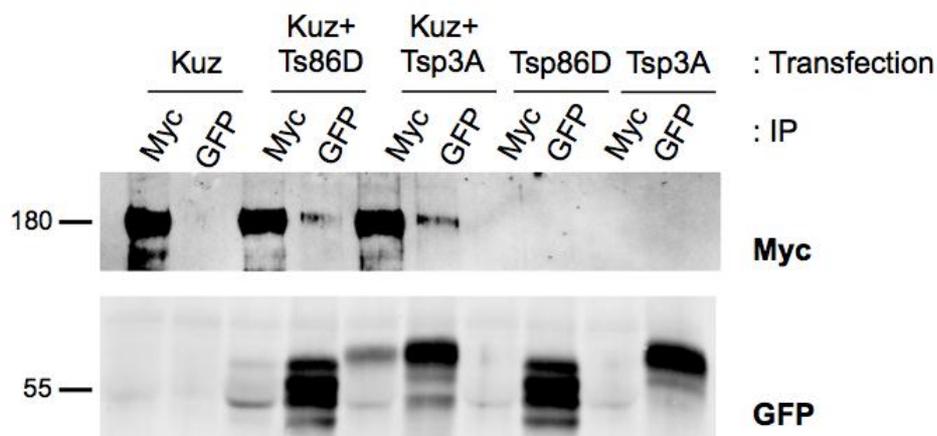


Figure 50 : L'interaction TspanC8/ADAM10-Kuzbanian est conservée chez la *Drosophile*

Des cellules S2 de *Drosophile* ont été transfectées transitoirement avec Kuzbanian-Myc (Kuz) et les TspanC8-GFP (Tsp3A et Tsp86D, Tsp26A n'a pas été testée) et l'interaction Kuz/TspanC8 a été étudiée par western-blot après IP.

# Discussion

---

Cette étude identifie une famille de tétraspanines très conservée, appelée TspanC8, comme étant les tétraspanines partenaires de la métalloprotéase ADAM10. Grâce à cette interaction les TspanC8 sont des régulateurs de la voie Notch, chez les mammifères et la *Drosophile*. Nos résultats supportent cette conclusion puisque nous avons pu démontrer que l'interaction des TspanC8 avec Kuzbanian (l'orthologue d'ADAM10 chez la *Drosophile*) est conservée et que la localisation d'ADAM10 et l'activation de la voie Notch peuvent être contrôlés par l'expression des TspanC8 chez les mammifères et la *Drosophile*.

## Les TspanC8 sont des partenaires directs d'ADAM10, chez la *Drosophile* et chez les mammifères

La digitonine est un outil qui a été développé au laboratoire et qui permet de dissocier les interactions entre tétraspanines mais conserve les interactions tétraspanines/protéines partenaires (Serru et al., 1999). Ce détergent permet donc de mettre en évidence les interactions directes et les interactions spécifiques révélées en digitonine ont été confirmées par d'autres approches comme par exemple pour les complexes CD151 avec les intégrines  $\alpha 3\beta 1$  ou  $\alpha 6\beta 1$  ou encore les complexes CD9/EWI-2 ou CD81/EWI-2 qui ont été confirmés par pontage chimique (Stipp et al., 2001; Yauch et al., 1998). Dans ces conditions, les TspanC8 sont toujours capables de précipiter ADAM10. Néanmoins, certaines TspanC8 semblent avoir une solubilité limitée en digitonine puisque les quantités de Tspan10 et Tspan17 précipitées sont inférieures aux autres TspanC8. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces deux tétraspanines sont présentes dans un compartiment intracellulaire. Des expériences de pontage chimique ont été réalisées pour confirmer par une approche plus classiquement employée pour mettre en évidence les interactions directes et nous avons pu montrer qu'après pontage chimique et lyse en présence de SDS, les complexes TspanC8/ADAM10 sont toujours observés. La différence de précipitation d'ADAM10 par Tspan10 et Tspan17 observée en digitonine est également observée avec cette technique. Il faut également souligner le fait que l'expression de Tspan10 et Tspan17 dans les cellules HeLa n'augmente pas la quantité d'ADAM10 totale, alors que le reste des TspanC8 l'augmente fortement, ce qui pourrait refléter la moindre quantité d'ADAM10 coprecipitée dans les cellules exprimant Tspan10 ou Tspan17.

La palmitoylation des tétraspanines est importante pour la stabilisation des interactions entre tétraspanines (Charrin et al., 2002). C'est un phénomène dynamique qui peut être modulé par différents stimuli (Clark et al., 2004; Cherukuri et al., 2004a) et qui permet de réguler l'interaction des tétraspanines avec leurs protéines partenaires, comme c'est le cas entre CD81 et 14-3-3 (Clark et al., 2004). En accord avec ces données, il a été montré que la forme palmitoylée de Tspan12 peut s'associer avec ADAM10 dans des conditions qui préservent les interactions entre tétraspanines et augmenter sa maturation et le clivage d'APP (Xu et al., 2009). Cette étude a également montré que dans des conditions de faibles concentrations de cations divalents (conditions défavorables aux interactions entre tétraspanines (Charrin et al., 2002)), le CD9 n'est pas associé à ADAM10 alors que l'interaction avec Tspan12 est toujours détectée, suggérant que l'interaction de Tspan12 avec ADAM10 est plus étroite. Nos données montrent que la transfection de Tspan12 dans les cellules HeLa n'entraîne pas de changement de localisation d'ADAM10 ou d'augmentation de la quantité d'ADAM10 mature et l'interaction Tspan12/ADAM10 n'est pas détectable après lyse en digitonine. L'ensemble de ces données pourrait suggérer que l'interaction Tspan12/ADAM10 observée dans l'article de Xu *et al* n'est pas directe et que Tspan12 pourrait faire partie d'un complexe contenant une ou plusieurs TspanC8 et pas le CD9. En effet, à l'inverse de ce qui est observé pour Tspan12, la palmitoylation de Tspan5 n'est pas nécessaire à l'interaction avec ADAM10 dans des conditions ne préservant pas les interactions entre tétraspanines et son expression entraîne une relocalisation d'ADAM10, renforçant l'idée que l'interaction Tspan5/ADAM10 est directe. L'observation que l'expression des TspanC8 mais pas celle des autres tétraspanines testées permette la sortie du réticulum endoplasmique et la relocalisation d'ADAM10 est un argument de plus en faveur d'une interaction spécifique TspanC8/ADAM10.

### **Les TspanC8 permettent la sortie d'ADAM10 du réticulum**

Toutes les TspanC8 sont capables de permettre la sortie d'ADAM10 du réticulum et son accumulation à la surface cellulaire (Tspan5, Tspan14, Tspan15 et Tspan33) ou dans un compartiment intracellulaire (Tspan10 et Tspan17) dans les cellules HeLa. En effet, en l'absence de TspanC8 ADAM10 est retenu dans le réticulum endoplasmique des cellules HeLa. Il a été montré qu'un motif riche en arginines présent dans la partie cytoplasmique d'ADAM10 est responsable de sa rétention dans le réticulum endoplasmique de cellules neuronales (Marcello et al., 2010). La mutation de ce motif permet la sortie du réticulum

endoplasmique et l'expression à la surface cellulaire. Les motifs riches en arginines représentent une famille de motifs responsables de la séquestration de protéines dans le réticulum endoplasmique des cellules (Michelsen et al., 2005). Ces signaux ont été découverts comme étant impliqués dans le trafic des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHCII, (Bakke and Dobberstein, 1990; Lotteau et al., 1990)). Leur mutation entraîne l'expression à la surface cellulaire. Ce motif est utilisé comme « contrôle qualité » de la formation de complexes multimoléculaires comme c'est par exemple le cas pour le canal ionique potassique sensible à l'ATP ( $K_{ATP}$ ) ou le récepteur GABA pour lesquels la formation du canal ionique complet permet le masquage des motifs riches en arginines et l'adressage à la membrane plasmique (Margeta-Mitrovic et al., 2000; Zerangue et al., 1999). Il est ainsi possible que les TspanC8 s'associe avec ADAM10 et permettent, directement ou via un intermédiaire, le masquage des motifs riches en arginines présents dans le domaine cytoplasmique d'ADAM10 en organisant un complexe protéique. Un tel mode de régulation a été montré pour le trafic des uroplakines qui constituent les plaques urothéliales (formées par les paires UPIa-UPII et UPIb-UPIII). Il a été montré dans des cellules HEK293T que les protéines partenaire UPII et UPIII ne sont maturées et adressées à la surface que lorsque leurs tétraspanines partenaires UPIa et UPIb sont exprimées (Tu et al., 2002; Hu et al., 2005).

La méthode souvent utilisée pour suivre la maturation des protéines et la sortie du réticulum est le suivi de la glycosylation (Tu et al., 2002; Marcello et al., 2010). Le CD19 devient par exemple sensible au traitement par l'endo-H lorsque le CD81 est absent (Shoham et al., 2003). Nous avons tenté par cette approche de montrer biochimiquement qu'ADAM10 est mûré et adressé à la membrane plasmique. Malgré un adressage à la membrane plasmique dans les cellules HeLa exprimant Tspan5, la glycosylation d'ADAM10 reste sensible au traitement par l'endo-H. L'association avec les TspanC8 et la formation d'un complexe avec d'autres protéines pourrait protéger ADAM10 de la maturation de son arborisation sucrée.

Les TspanC8 possède un motif di-leucine qui pourrait permettre l'interaction avec l'adaptateur AP-3 (Höning et al., 1998) dans la région comprise entre les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> passage transmembranaire (voir séquence ci-dessous). Cet adaptateur est impliqué dans le trafic des protéines présentes dans le compartiment endosome-lysosome et pourrait permettre le trafic des complexes TspanC8/ADAM10 dans des compartiments endosomaux, comme c'est le cas pour Tspan10 et Tspan17 (Dell'Angelica, 2009).

Tspan_5	GALRENTFLLKFF
Tspan_17	GALRENTFLLKFF
Tspan_14	GALRENICLLNFF
Tspan_10	GALCENTCLLRGF
Tspan_33	GSLRENICLLQTF
Tspan_15	ASLRDNLVLLQAF

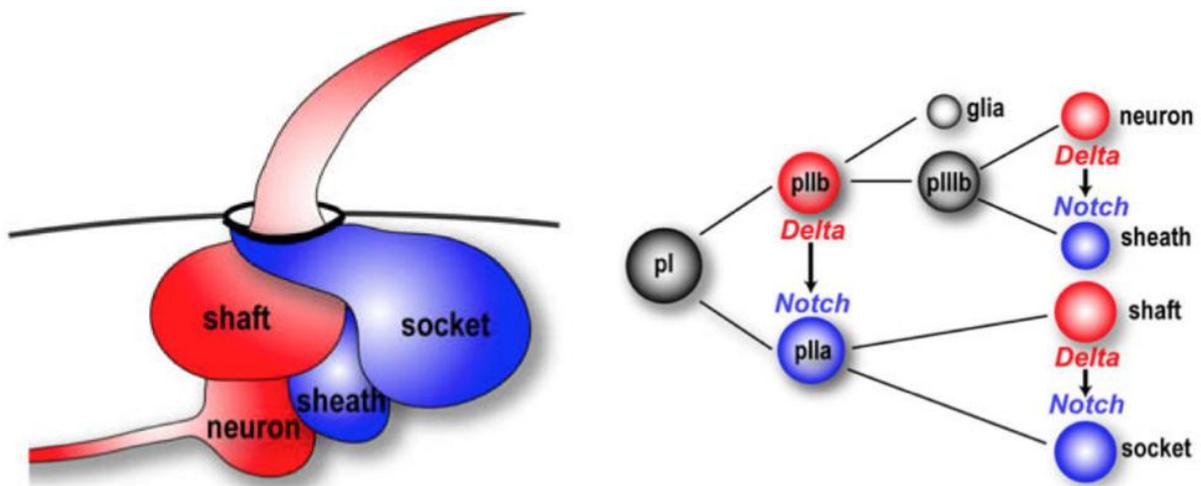
Séquence du domaine compris entre les passages transmembranaires 2 et 3

### Etude phylogénétique des TspanC8 et ADAM10 et étude des zones importantes pour l'interaction ADAM10/TspanC8

L'analyse phylogénétique est basée sur les alignements multiples de différentes séquences primaires de protéines. L'alignement des TspanC8 a permis de mettre en évidence des zones de conservation au sein de la grande boucle extracellulaire qui constitue pourtant l'une des zones les plus variables des tétraspanines. Ces résidus ont été mutés et une perte d'interaction avec ADAM10 a été observée pour certains. Les mutants RDD et NiYF sont retenus dans le réticulum endoplasmique et un problème de conformation de la protéine ne peut pas être exclu. Néanmoins, la mutation de la même zone dans le CD81 n'entraîne pas de différence dans la reconnaissance par différents anticorps suggérant que la conformation n'est pas altérée (Yalaoui et al., 2008). Une autre hypothèse pourrait être que l'interaction avec ADAM10 est nécessaire au trafic de Tspan5 vers la membrane. Afin de tester cette hypothèse nous avons transfecté Tspan5-GFP dans des fibroblastes humains issus de souris KO pour ADAM10 et avons pu démontrer qu'ADAM10 n'est pas nécessaire au trafic de Tspan5 vers la membrane. Cette zone pourrait être importante pour l'interaction avec d'autres protéines permettant par exemple la sortie du réticulum endoplasmique de Tspan5.

Nous avons montré que l'interaction TspanC8/ADAM10 est conservée chez la Drosophile, indiquant qu'elle est apparue très tôt dans l'évolution et a été conservée chez les mammifères les plus récents. En effet, les TspanC8 ont été identifiées en parallèle à notre étude dans un crible pour des régulateurs de la voie Notch. Nos collaborateurs, François Schweisguth et Franck Coumailleau de l'Institut Pasteur, ont réalisé l'extinction dirigée de ces gènes en utilisant le système UAS/GAL4. Ce système permettant d'étudier l'expression des gènes est composé de 2 parties : le gène *Gal4* qui code pour un facteur de transcription de levure (qui

peut être exprimé et activer la transcription de gènes chez la drosophile (Fischer et al., 1988)) et l'UAS (Upstream Activation Sequence) qui est une séquence de fixation spécifique sur laquelle Gal4 se fixe et active ensuite la transcription. En utilisant un promoteur tissu spécifique en amont du gène Gal4, on peut diriger son expression et donc diriger l'activation des ARN interférants qui portent l'UAS en amont. Ainsi on peut éteindre spécifiquement une protéine par ARN interférence dans un tissu donné. Ce système a été utilisé pour diriger l'expression dans les tissus imaginaux donnant naissance au thorax dorsal de la mouche adulte de 11.199 UAS-dsARN ciblant 602 gènes (environ 40% du génome de la drosophile) et permis d'identifier 272 gènes avec une fonction dans le développement des organes sensoriels de la drosophile, dont les TspanC8. L'extinction des trois TspanC8 exprimées chez la Drosophile permet d'observer un phénotype perte de fonction Notch clair (Hartenstein and Posakony, 1990). La déplétion conjointe des trois TspanC8 induit en effet une forte perte des soies sensibles, une forte augmentation du nombre de SOPs (cellules précurseurs des organes sensoriels) et une transformation des cellules externes en cellules internes (accumulation de cellules neuronales marquées en rouge par le marqueur spécifique Elav, figure 52). Ces trois



phénotypes indiquent une forte perte de la signalisation Notch.

Figure 51 : **Représentation schématique de la formation des soies sensorielles de *Drosophile*** (Adapté de (Fürthauer and González-Gaitán, 2009))

La voie Notch est impliquée à différents niveaux de la formation des soies sensorielles. Une série de divisions asymétriques permet de définir le devenir des cellules. Les cellules en bleu sont celles qui expriment le récepteur Notch et dont le développement est dépendant de cette voie. Les cellules en rouge sont celles qui expriment le ligand et dont le développement

est indépendant de la voie Notch. Un défaut dans l'activation de la voie Notch va former un excès de cellules précurseurs pIIb qui engendrera ensuite un excès de neurones.

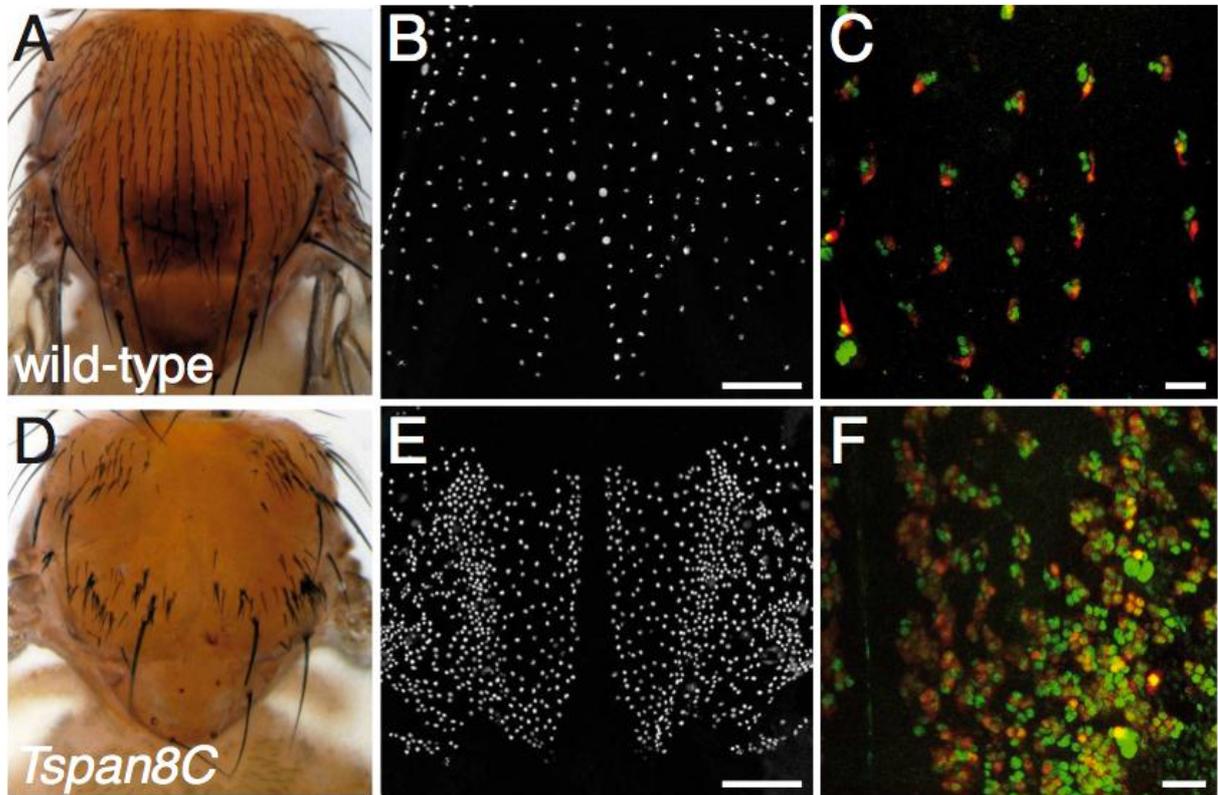


Figure 52 : Les TspanC8 sont impliquées dans la régulation de la voie Notch

- (A,D) Vue du thorax dorsal de mouches sauvages (A) ou dont l'expression des TspanC8 est éteinte (D). L'extinction de Tsp3A et Tsp26A se fait dans des mouches hétérozygotes pour Tsp86D.
- (B,E) Marquage Senseless (spécifique des cellules précurseurs des organes sensoriels) de mouches sauvages (B) ou de mouches dont l'expression des TspanC8 est éteinte (E), 16 heures après la formation de la puppe.
- (C,F) Marquage Cut (vert) et Elav (rouge, spécifique des neurones) des organes sensoriels de mouches sauvages (C) ou dont l'expression des TspanC8 est éteinte (F), 22 heures après la formation de la puppe. A ce moment du développement, les organes sensoriels sont constitués de quatre cellules dont un neurone.

Kuzbanian est très faiblement exprimé dans les tissus larvaires et imaginaux, ce qui rend son étude difficile. De précédents travaux ont néanmoins démontré que Kuzbanian est plus fortement exprimé par un petit groupe de cellules migratoires, appelées les cellules polaires et bordures, dans les ovaires. Dans ces cellules, l'activité de Kuzbanian est nécessaire pour la migration mais aussi pour l'activation de Notch (Wang et al., 2007b). La distribution de Kuzbanian est différente dans les cellules polaires et bordures : il est localisé dans des vésicules intracellulaires dans les cellules polaires alors qu'il est localisé à la périphérie cellulaire et dans le cytoplasme des cellules bordures (figure 53). En utilisant un transgène GFP-Tsp86D ou -Tsp3A, nos collaborateurs ont démontré que les TspanC8 sont fortement exprimées dans les cellules bordures et beaucoup plus faiblement dans les cellules polaires (figure 53).

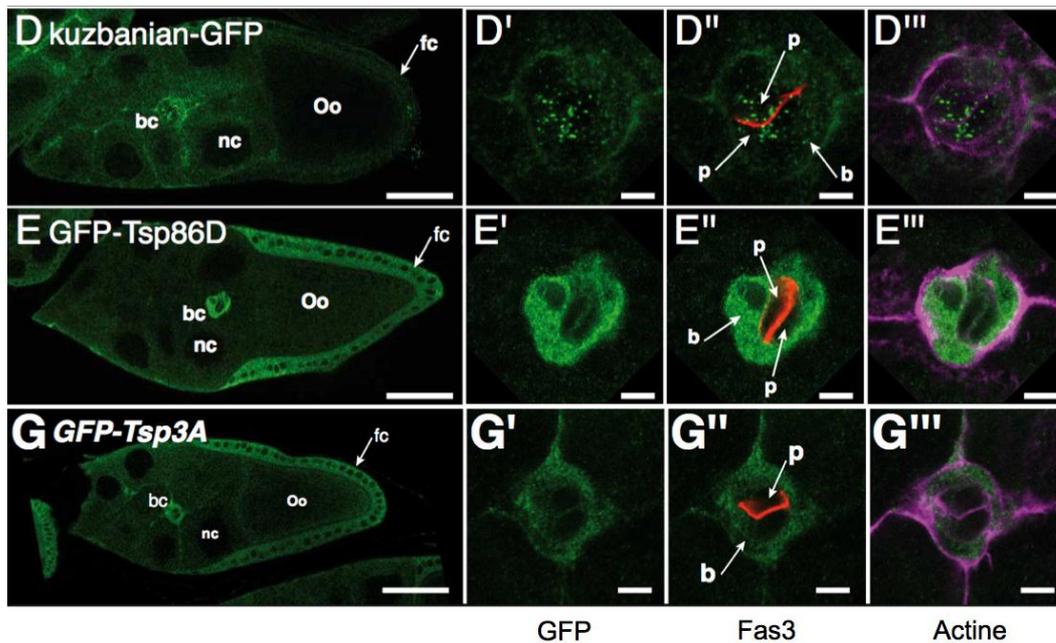


Figure 53 : **La localisation intracellulaire de Kuzbanian corrèle avec le faible niveau d'expression des TspanC8 dans les cellules polaires**

L'expression des protéines portant l'étiquette GFP a été réalisée en utilisant un chromosome bactérien artificiel (BAC) et révélée en utilisant un anticorps anti-GFP. Les cellules polaires (p) sont détectées par l'expression de Fas3 (en rouge) et le contour des cellules bordures (b) et polaires est repéré grâce à un marquage de l'actine (en violet). Les TspanC8 sont aussi exprimées dans les cellules folliculaires (fc). Les barres d'échelles en D, E et G correspondent à 40µm et à 5µm dans les autres cadrans.

Il existe donc une corrélation entre les faibles niveaux d'expression des TspanC8 dans les cellules polaires et la localisation intracellulaire de Kuzbanian. Afin de le confirmer, l'expression de Tsp3A et Tsp26A a été déplétée par interférence ARN dans des *Drosophiles* hétérozygotes pour Tsp86D, uniquement dans les cellules bordures grâce à un promoteur spécifique. Une redistribution de Kuzbanian dans des vésicules intracellulaires a ainsi été observée, démontrant que les TspanC8 régulent la localisation de Kuzbanian dans les cellules bordures (figure 54).

Une précédente étude a démontré que Kuzbanian régule l'activation de Notch dans les cellules bordures. Afin de tester si les TspanC8 peuvent réguler l'activation de Notch dans ces cellules, la construction reportrice de l'activation de Notch Gbe-GFP (Housden et al., 2012) a été exprimée dans les cellules bordures et polaires (figure 54). L'extinction des TspanC8 conduit à une diminution de l'activation de Notch dans les cellules bordures mais pas dans les cellules polaires (figure 54). L'ensemble des données de nos collaborateurs démontre que les TspanC8 régulent la localisation de Kuzbanian dans les cellules bordures et sont nécessaires pour l'activation de la voie Notch.

L'ensemble des données acquises chez la *Drosophile* par nos collaborateurs ont permis de démontrer, *in-vivo*, le rôle des TspanC8 dans la régulation de la localisation de Kuzbanian et de l'activation de la voie Notch dans différents contextes développementaux.

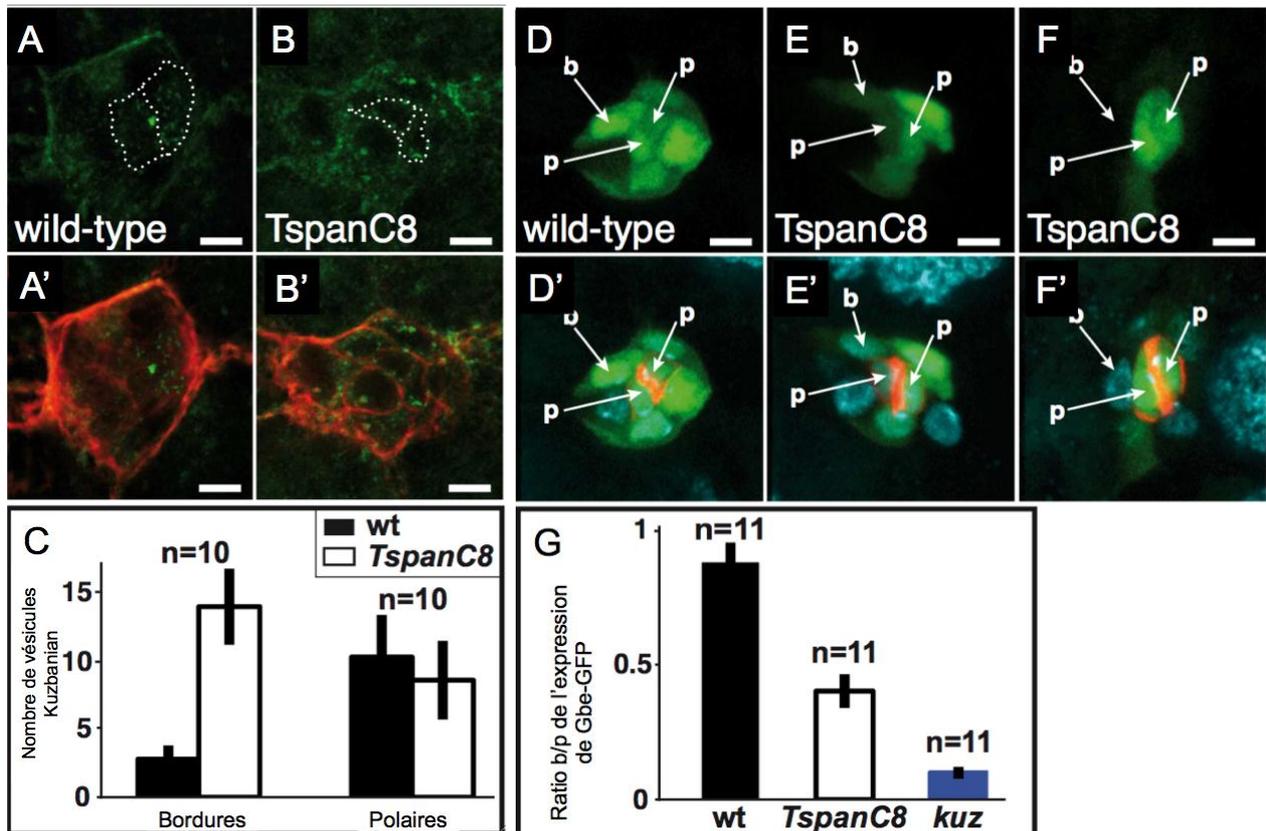


Figure 54 : L'extinction des *TspanC8* dans les cellules bordures de l'ovaire entraîne la rétention de Kuzbanian dans des vésicules intracellulaires et diminue l'activation de Notch

- (A-B) L'extinction des *TspanC8* dans les cellules bordures conduit à la relocalisation de Kuzbanian (en vert) dans des vésicules intracellulaires. Les contours des cellules sont révélés par le marquage actine (en rouge)
- (C) Quantification du nombre de vésicules après extinction des *TspanC8* dans les cellules polaires et bordures
- (D-F) Activité de Notch suivie par l'expression du reporteur Gbe-GFP dans les cellules bordures (b) et polaires (p) après extinction des *TspanC8*
- (G) Quantification du rapport d'expression de Gbe-GFP dans les cellules bordures (b) et polaires (p) après extinction des *TspanC8* ou de Kuzbanian

## Pourquoi ADAM10 possède t'il un si grand nombre de tétraspanines partenaires ?

Les seules protéines capables de s'associer directement à plusieurs tétraspanines sont les protéines Ewi-2 et CD9P-1 qui peuvent s'associer à CD9 et CD81 (Charrin et al., 2001; Stipp et al., 2001). ADAM10 est la première protéine dont la capacité à s'associer avec six différentes tétraspanines est décrite. Plusieurs hypothèses à la présence de ces nombreuses tétraspanines partenaires peuvent être avancées. Nous avons démontré que l'expression des TspanC8 peut réguler la localisation d'ADAM10 et l'adresser à la surface cellulaire ou dans un compartiment endosomal tardif. Les différentes TspanC8 régulent la localisation subcellulaire d'ADAM10 et lui apportent certainement des propriétés de trafic différentes. En effet, les cellules HeLa qui expriment Tspan15 présentent une plus forte accumulation d'ADAM10 à la surface cellulaire que les cellules qui expriment Tspan5. Des études supplémentaires sont nécessaires pour savoir dans quelle mesure les TspanC8 peuvent moduler le trafic et/ou la stabilité d'ADAM10.

Il a été montré que l'activation de la voie Notch peut avoir lieu dans des compartiments endosomaux, générant des fragments NICD de stabilité inférieure à ceux générés lorsque l'activation a lieu à la membrane plasmique (Tagami et al., 2008). Il sera intéressant de tester si Tspan-10 et/ou -17 peuvent réguler la voie Notch et si leur expression entraîne une augmentation dans la production des fragments NICD les plus instables. Ceci pourrait représenter un mode de régulation de la voie Notch par les TspanC8 qui détermineraient le compartiment dans lequel a lieu le clivage par ADAM10 (qui est une étape limitante dans l'activation de la voie Notch). Néanmoins, il est intéressant de noter que la régulation de la localisation d'ADAM10 à la surface cellulaire n'est pas suffisante, dans le cas de Tspan15, pour avoir un effet sur l'activation de la voie Notch dans les cellules HeLa suggérant que les TspanC8 pourraient réguler d'autres processus importants pour l'activation de la voie.

Les TspanC8 pourraient être impliquées dans la spécificité de substrat. Il a été montré que l'expression de Tspan15 augmente le clivage d'APP et de la N-cadhérine (Prox et al., 2012) alors que Tspan15 n'a pas d'effet sur l'activation de la voie Notch. Nous avons également montré que dans les cellules HeLa, l'expression de Tspan5 ou Tspan14 peut augmenter l'activation de la voie Notch et que dans les cellules U2OS la déplétion de ces tétraspanines présentes de façon endogène diminue l'activation de la voie. L'ensemble de ces données semble suggérer que l'expression des différentes TspanC8 pourrait avoir des conséquences sur la sélectivité de substrat d'ADAM10.

Nous avons déterminé que dans notre modèle cellulaire U2OS, les TspanC8 régulent l'activation de la voie Notch à une étape pré- $\gamma$ -sécrétase. Il a été montré dans les cellules

HeLa que la déplétion de Tspan5 ou Tspan33 entraîne une diminution de l'activation de la voie au niveau de la  $\gamma$ -sécrétase (Dunn et al., 2010). Une autre étude a montré par protéomique que le complexe  $\gamma$ -sécrétase est présent au sein des complexes à tétraspanines mais les TspanC8 n'ont pas été retrouvées (Wakabayashi et al., 2009). Il est ainsi possible que Tspan33 régule indirectement l'activité du complexe  $\gamma$ -sécrétase via d'autres tétraspanines n'appartenant pas à la sous-famille des TspanC8. L'implication de Tspan33 dans la régulation de l'activité du complexe  $\gamma$ -sécrétase n'a pas été évaluée dans notre étude puisqu'aucune de nos lignées cellulaires, y compris les HeLa, n'expriment Tspan33 et cette hypothèse est toujours ouverte.

### Nouvelles pistes pour expliquer le phénotype des souris KO Tspan33

Très peu de données sont disponibles au sujet des TspanC8. Chez la souris, l'ARNm de Tspan33 est majoritairement présent dans les tissus hématopoïétiques, préférentiellement dans la moëlle osseuse et plus faiblement dans le foie, la rate et le cerveau. Parmi les cellules de la moëlle, Tspan33 est majoritairement exprimé à la surface des érythroblastes et plus faiblement à la surface des cellules T et B, des neutrophiles, des monocytes ou encore des cellules NK. Les principaux défauts observés dans les souris KO pour Tspan33 sont une splénomégalie, une anémie avec l'apparition de macrocytes basophiles qui sont des érythrocytes de grande taille dont le diamètre dépasse  $9\mu\text{m}$  (Heikens et al., 2007). Certaines souris présentent également une thrombocytopénie, une monocytose, des rates dont les lymphocytes B et T ont été remplacés par des macrocytes basophiles... Ces souris présentent donc un trouble général de l'hématopoïèse.

Nous avons démontré que Tspan33 peut réguler la localisation et la maturation d'ADAM10. Il est possible que le phénotype observé dans les KO Tspan33 soit dû à un défaut dans l'activation d'ADAM10 dans le compartiment hématopoïétique dans lequel Tspan33 est majoritairement exprimé. En accord avec cette hypothèse, des souris KO inducible pour ADAM10 ou KO pour des composants de la voie Notch présentent également une splénomégalie qui est due au développement d'une pathologie myéloïde (Yoda et al., 2011; Klinakis et al., 2011). De plus, il a été montré qu'Hes1 (un des gènes activés par Notch) est impliqué de façon dynamique dans la différenciation érythrocytaire : il est fortement exprimé dans les précurseurs érythroïdes, diminue fortement au stade pro-érythroblaste et remonte dans les érythroblastes plus matures, suggérant que l'activation de la voie Notch est

impliquée à plusieurs étapes de la différenciation des érythrocytes (Ross et al., 2012). Enfin, chez l'homme, il a été montré par FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) que la perte du gène codant pour Tspan33 corrèle avec le développement de pathologies myéloïde (syndrome myéloprolifératif, syndromes myélodysplasiques, leucémies aiguës myéloïdes...) (Chen et al., 2005).

Au vu de l'ensemble de ces données, il est possible de proposer une nouvelle interprétation du phénotype des souris KO Tspan33 dans laquelle la splénomégalie observée pourrait être une conséquence d'une pathologie myéloïde causée par la délétion de Tspan33. Etant donné l'implication de Notch dans l'hématopoïèse, et en particulier dans l'érythropoïèse (Ishiko et al., 2005; Ross et al., 2012), il serait très intéressant de connaître l'état d'activation de la voie dans les souris KO Tspan33, en particulier dans les érythroblastes accumulés dans la rate. Il serait également intéressant d'avoir une analyse plus détaillée des cellules présentes dans la rate afin de savoir si les données seraient compatibles avec une pathologie myéloïde.

# Conclusion

---

L'ensemble des données présentées démontre une interaction directe TspanC8/ADAM10 et un rôle conservé au cours de l'évolution des TspanC8 dans la régulation de la voie Notch. Les données de nos collaborateurs suggèrent qu'il pourrait y avoir redondance fonctionnelle entre les TspanC8 puisqu'il est nécessaire de dépléter conjointement toutes les TspanC8 de *Drosophila* pour observer un phénotype clair. Nos résultats dans les cellules HeLa et les données de Prox *et al.*, démontrent que l'expression de Tspan15 augmente le clivage d'APP et de la N-cadhérine alors qu'elle n'a pas d'effet sur l'activation de la voie Notch, suggérant que les TspanC8 pourraient avoir des rôles spécifiques. Les données disponibles sur le profil d'expression de Tspan-5 et -33 montrent que ces deux TspanC8 sont exprimées dans des organes différents chez la souris, le cerveau et la moëlle osseuse respectivement. La redondance fonctionnelle dans les cellules qui expriment plusieurs TspanC8 n'est donc pas exclue mais nous disposons de différents arguments proposant des rôles spécifiques pour chaque TspanC8. Ces données pourraient suggérer que l'apparition de chaque TspanC8 au cours de l'évolution aurait pu se faire avec l'apparition d'une expression tissulaire différente spécifique ou d'une nouvelle fonction dans la régulation d'ADAM10 (comme par exemple une nouvelle fonction qui permettrait la régulation du trafic d'ADAM10). L'étude de cette famille de tétraspanines se révèle donc très intéressante car, de par leur expression tissulaire différentielle, il est possible d'envisager des thérapies ciblées pour les pathologies dans lesquelles un défaut dans l'activation de la voie Notch est observé.

# Références

---

- Abe, M., T. Sugiura, M. Takahashi, K. Ishii, M. Shimoda, and K. Shirasuna. 2008. A novel function of CD82/KAI-1 on E-cadherin-mediated homophilic cellular adhesion of cancer cells. *Cancer Lett.* 266:163–170.
- Altmeyden, H.C., J. Prox, B. Puig, M.A. Kluth, C. Bernreuther, D. Thurm, E. Jorissen, B. Petrowitz, U. Bartsch, B. de Strooper, P. Saftig, and M. Glatzel. 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.
- Anders, A., S. Gilbert, W. Garten, R. Postina, and F. Fahrenholz. 2001. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* 15:1837–1839.
- André, M., J.-P. Le Caer, C. Greco, S. Planchon, W. El Nemer, C. Boucheix, E. Rubinstein, J. Chamot-Rooke, and F. Le Naour. 2006. Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS. *Proteomics.* 6:1437–1449.
- Ang, J., M. Lijovic, L.K. Ashman, K. Kan, and A.G. Frauman. 2004. CD151 protein expression predicts the clinical outcome of low-grade primary prostate cancer better than histologic grading: a new prognostic indicator? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13:1717–1721.
- Angelisová, P., I. Hilgert, and V. Horejsí. 1994. Association of four antigens of the tetraspans family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics.* 39:249–256.
- Arduise, C., T. Abache, L. Li, M. Billard, A. Chabanon, A. Ludwig, P. Mauduit, C. Boucheix, E. Rubinstein, and F. Le Naour. 2008. Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *J. Immunol.* 181:7002–7013.
- Arima, T., H. Enokida, H. Kubo, I. Kagara, R. Matsuda, K. Toki, H. Nishimura, T. Chiyomaru, S. Tatarano, T. Idesako, K. Nishiyama, and M. Nakagawa. 2007. Nuclear translocation of ADAM-10 contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer. *Cancer Science.* 98:1720–1726.
- Arribas, J., J.J. Bech-Serra, and B. Santiago-Josefat. 2006. ADAMs, cell migration and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 25:57–68.
- Auderset, F., S. Schuster, M. Coutaz, U. Koch, F. Desgranges, E. Merck, H.R. MacDonald, F. Radtke, and F. Tacchini-Cottier. 2012. Redundant Notch1 and Notch2 signaling is necessary for IFN $\gamma$  secretion by T helper 1 cells during infection with *Leishmania major*. *PLoS Pathog.* 8:e1002560.
- Augustin, R., K. Endres, S. Reinhardt, P.-H. Kuhn, S.F. Lichtenthaler, J. Hansen, W. Wurst, and D. Trümbach. 2012. Computational identification and experimental validation of microRNAs binding to the Alzheimer-related gene ADAM10. *BMC Med Genet.* 13:35.

- Bai, S., M.W. Nasser, B. Wang, S.-H. Hsu, J. Datta, H. Kutay, A. Yadav, G. Nuovo, P. Kumar, and K. Ghoshal. 2009. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *Journal of Biological Chemistry*. 284:32015–32027.
- Bakke, O., and B. Dobberstein. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell*. 63:707–716.
- Baldwin, G., V. Novitskaya, R. Sadej, E. Pochev, A. Litynska, C. Hartmann, J. Williams, L. Ashman, J.A. Eble, and F. Berditchevski. 2008. Tetraspanin CD151 regulates glycosylation of (alpha)3(beta)1 integrin. *J. Biol. Chem.* 283:35445–35454.
- Bandyopadhyay, S., R. Zhan, A. Chaudhuri, M. Watabe, S.K. Pai, S. Hirota, S. Hosobe, T. Tsukada, K. Miura, Y. Takano, K. Saito, M.E. Pauza, S. Hayashi, Y. Wang, S. Mohinta, T. Mashimo, M. Iizumi, E. Furuta, and K. Watabe. 2006. Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat. Med.* 12:933–938.
- Barraud-Lange, V., C. Chalas Boissonnas, C. Serres, J. Auer, A. Schmitt, B. Lefèvre, J.-P. Wolf, and A. Ziyat. 2012. Membrane transfer from oocyte to sperm occurs in two CD9-independent ways that do not supply the fertilising ability of Cd9-deleted oocytes. *Reproduction*. 144:53–66.
- Barreiro, O., M. Zamai, M. Yáñez-Mó, E. Tejera, P. López-Romero, P.N. Monk, E. Gratton, V.R. Caiolfa, and F. Sánchez-Madrid. 2008. Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *The Journal of Cell Biology*. 183:527–542.
- Bartosch, B., J. Bukh, J.-C. Meunier, C. Granier, R.E. Engle, W.C. Blackwelder, S.U. Emerson, F.-L. Cosset, and R.H. Purcell. 2003. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:14199–14204.
- Bekris, L.M., F. Lutz, G. Li, D.R. Galasko, M.R. Farlow, J.F. Quinn, J.A. Kaye, J.B. Leverenz, D.W. Tsuang, T.J. Montine, E.R. Peskind, and C.-E. Yu. 2012. ADAM10 expression and promoter haplotype in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 33:2229.e1–2229.e9.
- Berditchevski, F., and E. Odintsova. 2007. Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic*. 8:89–96.
- Berditchevski, F., M.M. Zutter, and M.E. Hemler. 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.
- Bertagna, A., D. Toptygin, L. Brand, and D. Barrick. 2008. The effects of conformational heterogeneity on the binding of the Notch intracellular domain to effector proteins: a case of biologically tuned disorder. *Biochem. Soc. Trans.* 36:157.
- Berthier-Vergnes, O., M.E. Kharbili, A. de la Fouchardière, T. Pointecouteau, P. Verrando, A. Wierinckx, J. Lachuer, F. Le Naour, and J. Lamartine. 2011. Gene expression profiles of human melanoma cells with different invasive potential reveal TSPAN8 as a novel

mediator of invasion. *Br J Cancer*. 104:155–165.

Blaumueller, C.M., H. Qi, P. Zagouras, and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*. 90:281–291.

Blobel, C.P., T.G. Wolfsberg, C.W. Turck, D.G. Myles, P. Primakoff, and J.M. White. 1992. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*. 356:248–252.

Boucheix, C., and E. Rubinstein. 2001. Tetraspanins. *Cell. Mol. Life Sci*. 58:1189–1205.

Boucheix, C., P. Benoit, P. Frachet, M. Billard, R.E. Worthington, J. Gagnon, and G. Uzan. 1991. Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. *J. Biol. Chem*. 266:117–122.

Bozkulak, E.C., and G. Weinmaster. 2009. Selective Use of ADAM10 and ADAM17 in Activation of Notch1 Signaling. *Molecular and Cellular Biology*. 29:5679–5695.

Böhm, B.B., A. Schirner, and H. Burkhardt. 2009. ADAM15 modulates outside-in signalling in chondrocyte-matrix interactions. *J. Cell. Mol. Med*. 13:2634–2644.

Bronstein, J.M. 2000. Function of tetraspan proteins in the myelin sheath. *Curr. Opin. Neurobiol*. 10:552–557.

Brou, C., F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J.R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R.A. Black, and A. Israel. 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Molecular Cell*. 5:207–216.

Brown, J.G., B.D. Almond, J.G. Naglich, and L. Eidels. 1993. Hypersensitivity to diphtheria toxin by mouse cells expressing both diphtheria toxin receptor and CD9 antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:8184–8188.

Buim, M.E., S.V. Lourenco, K.C. Carvalho, R. Cardim, C. Pereira, A.L. Carvalho, J.H. Fregnani, and F.A. Soares. 2010. Downregulation of CD9 protein expression is associated with aggressive behavior of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 46:166–171.

Caescu, C.I., G.R. Jeschke, and B.E. Turk. 2009. Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem J*. 424:79–88.

Cai, Z., C. Zhang, K.-S. Chang, J. Jiang, B.-C. Ahn, T. Wakita, T.J. Liang, and G. Luo. 2005. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *J Virol*. 79:13963–13973.

Cajot, J.F., I. Sordat, T. Silvestre, and B. Sordat. 1997. Differential display cloning identifies motility-related protein (MRP1/CD9) as highly expressed in primary compared to metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Research*. 57:2593–2597.

Calin, G.A., and C.M. Croce. 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 6:857–866.

- Cha, J.H., J.S. Brooke, K.N. Ivey, and L. Eidels. 2000. Cell surface monkey CD9 antigen is a coreceptor that increases diphtheria toxin sensitivity and diphtheria toxin receptor affinity. *J. Biol. Chem.* 275:6901–6907.
- Chandu, D., S.S. Huppert, and R. Kopan. 2006. Analysis of transmembrane domain mutants is consistent with sequential cleavage of Notch by gamma-secretase. *J. Neurochem.* 96:228–235.
- Chang, H.-C., C.-Y. Cho, and W.-C. Hung. 2007. Downregulation of RECK by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Cancer Science.* 98:169–173.
- Charrin, S., F. Le Naour, M. Oualid, M. Billard, G. Faure, S.M. Hanash, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2001. The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J. Biol. Chem.* 276:14329–14337.
- Charrin, S., F. Le Naour, O. Silvie, P.E. Milhiet, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2009. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J.* 420:133–154.
- Charrin, S., S. Manié, C. Thiele, M. Billard, D. Gerlier, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2003a. A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *Eur. J. Immunol.* 33:2479–2489.
- Charrin, S., S. Manié, M. Billard, L. Ashman, D. Gerlier, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2003b. Multiple levels of interactions within the tetraspanin web. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 304:107–112.
- Charrin, S., S. Manié, M. Oualid, M. Billard, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2002. Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Letters.* 516:139–144.
- Chastagner, P., A. Israël, and C. Brou. 2006. Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO reports.* 7:1147–1153.
- Chastagner, P., A. Israël, and C. Brou. 2008. AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PLoS ONE.* 3:e2735.
- Chen, E.H., E. Grote, W. Mohler, and A. Vignery. 2007a. Cell-cell fusion. *FEBS Letters.* 581:2181–2193.
- Chen, H., G. Ko, A. Zatti, G. Di Giacomo, L. Liu, E. Raiteri, E. Perucco, C. Collesi, W. Min, C. Zeiss, P. De Camilli, and O. Cremona. 2009. Embryonic arrest at midgestation and disruption of Notch signaling produced by the absence of both epsin 1 and epsin 2 in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 106:13838–13843.
- Chen, H., S. Fre, V.I. Slepnev, M.R. Capua, K. Takei, M.H. Butler, P.P. Di Fiore, and P. De Camilli. 1998. Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature.* 394:793–797.
- Chen, Y.Y., C.L. Hehr, K. Atkinson-Leadbeater, J.C. Hocking, and S. McFarlane. 2007b.

Targeting of retinal axons requires the metalloproteinase ADAM10. *Journal of Neuroscience*. 27:8448–8456.

Chen, Z., M. Pasquini, B. Hong, S. DeHart, M. Heikens, and S. Tsai. 2005. The human Penumbra gene is mapped to a region on chromosome 7 frequently deleted in myeloid malignancies. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 162:95–98.

Cheng, H.T., M. Kim, M.T. Valerius, K. Surendran, K. Schuster-Gossler, A. Gossler, A.P. McMahon, and R. Kopan. 2007. Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development*. 134:4506–4506.

Chertova, E., O. Chertov, L.V. Coren, J.D. Roser, C.M. Trubey, J.W. Bess, R.C. Sowder, E. Barsov, B.L. Hood, R.J. Fisher, K. Nagashima, T.P. Conrads, T.D. Veenstra, J.D. Lifson, and D.E. Ott. 2006. Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol*. 80:9039–9052.

Cherukuri, A., R.H. Carter, S. Brooks, W. Bornmann, R. Finn, C.S. Dowd, and S.K. Pierce. 2004a. B cell signaling is regulated by induced palmitoylation of CD81. *J. Biol. Chem*. 279:31973–31982.

Cherukuri, A., T. Shoham, H.W. Sohn, S. Levy, S. Brooks, R. Carter, and S.K. Pierce. 2004b. The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts. *The Journal of Immunology*. 172:370–380.

Chometon, G., Z.G. Zhang, E. Rubinstein, C. Boucheix, C. Mauch, and M. Aumailley. 2006. Dissociation of the complex between CD151 and laminin-binding integrins permits migration of epithelial cells. *Exp. Cell Res*. 312:983–995.

Christianson, T.A., J.K. Doherty, Y.J. Lin, E.E. Ramsey, R. Holmes, E.J. Keenan, and G.M. Clinton. 1998. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Research*. 58:5123–5129.

Claas, C., C.S. Stipp, and M.E. Hemler. 2001. Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J. Biol. Chem*. 276:7974–7984.

Claas, C., S. Seiter, A. Claas, L. Savelyeva, M. Schwab, and M. Zöller. 1998. Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy. *The Journal of Cell Biology*. 141:267–280.

Clark, K.L., A. Oelke, M.E. Johnson, K.D. Eilert, P.C. Simpson, and S.C. Todd. 2004. CD81 associates with 14-3-3 in a redox-regulated palmitoylation-dependent manner. *J. Biol. Chem*. 279:19401–19406.

Clarke, G., A.F. Goldberg, D. Vidgen, L. Collins, L. Ploder, L. Schwarz, L.L. Molday, J. Rossant, A. Szél, R.S. Molday, D.G. Birch, and R.R. McInnes. 2000. Rom-1 is required for rod photoreceptor viability and the regulation of disk morphogenesis. *Nat. Genet*. 25:67–73.

Coleman, M.L., M.A. McDonough, K.S. Hewitson, C. Coles, J. Mecinovic, M. Edelmann, K.M. Cook, M.E. Cockman, D.E. Lancaster, B.M. Kessler, N.J. Oldham, P.J. Ratcliffe, and C.J. Schofield. 2007. Asparaginyl Hydroxylation of the Notch Ankyrin Repeat Domain by Factor Inhibiting Hypoxia-inducible Factor. *Journal of Biological Chemistry*. 282:24027–24038.

Coulouarn, C., V.M. Factor, J.B. Andersen, M.E. Durkin, and S.S. Thorgeirsson. 2009. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene*. 28:3526–3536.

Cousin, H., G. Abbruzzese, E. Kerdavid, A. Gaultier, and D. Alfandari. 2011. Translocation of the cytoplasmic domain of ADAM13 to the nucleus is essential for Calpain8-a expression and cranial neural crest cell migration. *Developmental Cell*. 20:256–263.

d'Azzo, A., A. Bongiovanni, and T. Nastasi. 2005. E3 Ubiquitin Ligases as Regulators of Membrane Protein Trafficking and Degradation. *Traffic*. 6:429–441.

Dang, Z., K. Yagi, Y. Oku, H. Kouguchi, K. Kajino, J. Watanabe, J. Matsumoto, R. Nakao, H. Wakaguri, A. Toyoda, and C. Sugimoto. 2009. Evaluation of Echinococcus multilocularis tetraspanins as vaccine candidates against primary alveolar echinococcosis. *Vaccine*. 27:7339–7345.

Daub, H., F.U. Weiss, C. Wallasch, and A. Ullrich. 1996. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*. 379:557–560.

De Bruyne, E., T.J. Bos, K. Asosingh, I. Vande Broek, E. Menu, E. Van Valckenborgh, P. Atadja, V. Coiteux, X. Leleu, K. Thielemans, B. Van Camp, K. Vanderkerken, and I. Van Riet. 2008. Epigenetic silencing of the tetraspanin CD9 during disease progression in multiple myeloma cells and correlation with survival. *Clin. Cancer Res*. 14:2918–2926.

de Celis, J.F., R. Barrio, A. del Arco, and A. García-Bellido. 1993. Genetic and molecular characterization of a Notch mutation in its Delta- and Serrate-binding domain in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4037–4041.

De Strooper, B., W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J.S. Mumm, E.H. Schroeter, V. Schrijvers, M.S. Wolfe, W.J. Ray, A. Goate, and R. Kopan. 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. 398:518–522.

Delaguillaumie, A., J. Harriague, S. Kohanna, G. Bismuth, E. Rubinstein, M. Seigneuret, and H. Conjeaud. 2004. Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to co-stimulation. *Journal of Cell Science*. 117:5269–5282.

Dell'Angelica, E.C. 2009. AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade. *Current Opinion in Cell Biology*. 21:552–559.

Devbhandari, R.P., G.-M. Shi, A.-W. Ke, F.-Z. Wu, X.-Y. Huang, X.-Y. Wang, Y.-H. Shi, Z.-B. Ding, Y. Xu, Z. Dai, J. Fan, and J. Zhou. 2011. Profiling of the tetraspanin CD151 web and conspiracy of CD151/integrin  $\beta$ 1 complex in the progression of hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*. 6:e24901.

- Diao, J., H. Pantua, H. Ngu, L. Komuves, L. Diehl, G. Schaefer, and S.B. Kapadia. 2012. Hepatitis C Virus Induces Epidermal Growth Factor Receptor Activation via CD81 Binding for Viral Internalization and Entry. *J Virol.* 86:10935–10949.
- Dichgans, M., J. Herzog, and T. Gasser. 2001. NOTCH3 mutation involving three cysteine residues in a family with typical CADASIL. *Neurology.* 57:1714–1717.
- Dijkstra, S., E.E. Geisert, C.D. Dijkstra, P.R. Bär, and E.A. Joosten. 2001. CD81 and microglial activation in vitro: proliferation, phagocytosis and nitric oxide production. *J. Neuroimmunol.* 114:151–159.
- Dijkstra, S., J.R. Geisert EE, W.H. Gispen, P.R. Bär, and E.A. Joosten. 2000. Up-regulation of CD81 (target of the antiproliferative antibody; TAPA) by reactive microglia and astrocytes after spinal cord injury in the rat. *J. Comp. Neurol.* 428:266–277.
- Dittmer, A., K. Hohlfeld, J. Lützkendorf, L.P. Müller, and J. Dittmer. 2009. Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:3053–3065.
- Dong, J.T., H. Suzuki, S.S. Pin, G.S. Bova, J.A. Schalken, W.B. Isaacs, J.C. Barrett, and J.T. Isaacs. 1996. Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res.* 56:4387–4390.
- Dong, J.T., P.W. Lamb, C.W. Rinker-Schaeffer, J. Vukanovic, T. Ichikawa, J.T. Isaacs, and J.C. Barrett. 1995. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science.* 268:884–886.
- Donmez, G., D. Wang, D.E. Cohen, and L. Guarente. 2010. SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10. *Cell.* 142:320–332.
- Donoviel, D.B., A.K. Hadjantonakis, M. Ikeda, H. Zheng, P.S. Hyslop, and A. Bernstein. 1999. Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev.* 13:2801–2810.
- Dorner, M., J.A. Horwitz, J.B. Robbins, W.T. Barry, Q. Feng, K. Mu, C.T. Jones, J.W. Schoggins, M.T. Catanese, D.R. Burton, M. Law, C.M. Rice, and A. Ploss. 2011. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature.* 474:208–211.
- Duffield, A., E.-J. Kamsteeg, A.N. Brown, P. Pagel, and M.J. Caplan. 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., M.L. Sulis, A.A. Ferrando, and I. Greenwald. 2010. A conserved tetraspanin subfamily promotes Notch signaling in *Caenorhabditis elegans* and in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 107:5907–5912.
- D'Souza, B., L. Meloty-Kapella, and G. Weinmaster. 2010. Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92:73–129.
- Edwards, D.R., M.M. Handsley, and C.J. Pennington. 2008. The ADAM metalloproteinases.

*Mol. Aspects Med.* 29:258–289.

Ehebauer, M.T., D.Y. Chirgadze, P. Hayward, A. Martinez Arias, and T.L. Blundell. 2005. High-resolution crystal structure of the human Notch 1 ankyrin domain. *Biochem J.* 392:13–20.

Ellerman, D.A., C. Ha, P. Primakoff, D.G. Myles, and G.S. Dveksler. 2003. Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion. *Mol. Biol. Cell.* 14:5098–5103.

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

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

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

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

Evans, J.P. 2012. Sperm-egg interaction. *Annu. Rev. Physiol.* 74:477–502.

Fan, J., and P.J. Brindley. 1998. Characterization of cDNAs encoding a new family of tetraspanins from schistosomes--the Sj25 family. *Gene.* 219:1–8.

Fanaei, M., P.N. Monk, and L.J. Partridge. 2011. The role of tetraspanins in fusion. *Biochem. Soc. Trans.* 39:524–528.

Farquhar, M.J., K. Hu, H.J. Harris, C. Davis, C.L. Brimacombe, S.J. Fletcher, T.F. Baumert, J.Z. Rappoport, P. Balfe, and J.A. McKeating. 2012. Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J Virol.* 86:4305–4316.

Fischer, J.A., E. Giniger, T. Maniatis, and M. Ptashne. 1988. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature.* 332:853–856.

Fitter, S., P.M. Sincock, C.N. Jolliffe, and L.K. Ashman. 1999. Transmembrane 4 superfamily protein CD151 (PETA-3) associates with beta 1 and alpha IIb beta 3 integrins in haemopoietic cell lines and modulates cell-cell adhesion. *Biochem J.* 338 ( Pt 1):61–70.

Flannery, A.R., C. Czibener, and N.W. Andrews. 2010. Palmitoylation-dependent association with CD63 targets the Ca<sup>2+</sup> sensor synaptotagmin VII to lysosomes. *The Journal of Cell Biology.* 191:599–613.

- Ford, M.G.J., I.G. Mills, B.J. Peter, Y. Vallis, G.J.K. Praefcke, P.R. Evans, and H.T. McMahon. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*. 419:361–366.
- Fortini, M.E., and S. Artavanis-Tsakonas. 1994. The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell*. 79:273–282.
- Franzke, C.-W., L. Bruckner-Tuderman, and C.P. Blobel. 2009. Shedding of collagen XVII/BP180 in skin depends on both ADAM10 and ADAM9. *J. Biol. Chem.* 284:23386–23396.
- Fried, D., B.B. Böhm, K. Krause, and H. Burkhardt. 2012. ADAM15 protein amplifies focal adhesion kinase phosphorylation under genotoxic stress conditions. *Journal of Biological Chemistry*. 287:21214–21223.
- Friedmann, D.R., J.J. Wilson, and R.A. Kovall. 2008. RAM-induced allostery facilitates assembly of a notch pathway active transcription complex. *J. Biol. Chem.* 283:14781–14791.
- Friedrich, B.M., J.L. Murray, G. Li, J. Sheng, T.W. Hodge, D.H. Rubin, W.A. O'Brien, and M.R. Ferguson. 2011. A functional role for ADAM10 in human immunodeficiency virus type-1 replication. *Retrovirology*. 8:32.
- Fryer, C.J., E. Lamar, I. Turbachova, C. Kintner, and K.A. Jones. 2002. Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev.* 16:1397–1411.
- Fryer, C.J., J.B. White, and K.A. Jones. 2004. Mastermind Recruits CycC:CDK8 to Phosphorylate the Notch ICD and Coordinate Activation with Turnover. *Molecular Cell*. 16:509–520.
- Fukudome, K., M. Furuse, T. Imai, M. Nishimura, S. Takagi, Y. Hinuma, and O. Yoshie. 1992. Identification of membrane antigen C33 recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation: altered glycosylation of C33 antigen in HTLV-1-positive T cells. *J Virol*. 66:1394–1401.
- Funakoshi, T., I. Tachibana, Y. Hoshida, H. Kimura, Y. Takeda, T. Kijima, K. Nishino, H. Goto, T. Yoneda, T. Kumagai, T. Osaki, S. Hayashi, K. Aozasa, and I. Kawase. 2003. Expression of tetraspanins in human lung cancer cells: frequent downregulation of CD9 and its contribution to cell motility in small cell lung cancer. *Oncogene*. 22:674–687.
- Fürthauer, M., and M. González-Gaitán. 2009. Endocytosis, asymmetric cell division, stem cells and cancer: unus pro omnibus, omnes pro uno. *Mol Oncol*. 3:339–353.
- Galichet, A., M. Weibel, and C.W. Heizmann. 2008. Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 370:1–5.
- Garcia-España, A., R. Mares, T.-T. Sun, and R. DeSalle. 2009. Intron evolution: testing hypotheses of intron evolution using the phylogenomics of tetraspanins. *PLoS ONE*. 4:e4680.

García-Frigola, C., F. Burgaya, L. de Lecea, and E. Soriano. 2001. Pattern of expression of the tetraspanin Tspan-5 during brain development in the mouse. *Mech. Dev.* 106:207–212.

García-Frigola, C., F. Burgaya, M. Calbet, L. de Lecea, and E. Soriano. 2000. Mouse Tspan-5, a member of the tetraspanin superfamily, is highly expressed in brain cortical structures. *Neuroreport.* 11:3181–3185.

Gardoni, F., C. Saraceno, M. Malinverno, E. Marcello, C. Verpelli, C. Sala, and M. Di Luca. 2012. The neuropeptide PACAP38 induces dendritic spine remodeling through ADAM10-N-cadherin signaling pathway. *Journal of Cell Science.* 125:1401–1406.

Gavert, N., M. Sheffer, S. Raveh, S. Spaderna, M. Shtutman, T. Brabletz, F. Barany, P. Paty, D. Notterman, E. Domany, and A. Ben-Ze'ev. 2007. Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res.* 67:7703–7712.

Ge, C., and P. Stanley. 2008. The O-fucose glycan in the ligand-binding domain of Notch1 regulates embryogenesis and T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105:1539–1544.

Ge, C., T. Liu, X. Hou, and P. Stanley. 2008. In vivo consequences of deleting EGF repeats 8–12 including the ligand binding domain of mouse Notch1. *BMC Dev Biol.* 8:48.

Geisert, E.E., R.W. Williams, G.R. Geisert, L. Fan, A.M. Asbury, H.T. Maecker, J. Deng, and S. Levy. 2002. Increased brain size and glial cell number in CD81-null mice. *J. Comp. Neurol.* 453:22–32.

Gesierich, S., I. Berezovskiy, E. Ryschich, and M. Zöller. 2006. Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. *Cancer Research.* 66:7083–7094.

Gibb, D.R., M. El Shikh, D.-J. Kang, W.J. Rowe, R. El Sayed, J. Cichy, H. Yagita, J.G. Tew, P.J. Dempsey, H.C. Crawford, and D.H. Conrad. 2010. ADAM10 is essential for Notch2-dependent marginal zone B cell development and CD23 cleavage in vivo. *J. Exp. Med.* 207:623–635.

Glomski, K., S. Monette, K. Manova, B. de Strooper, P. Saftig, and C.P. Blobel. 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., K. Maskos, M. Betz, A. Bergner, R. Huber, K. Suzuki, N. Yoshida, H. Nagase, K. Brew, G.P. Bourenkov, H. Bartunik, and W. Bode. 1997. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature.* 389:77–81.

Gonda, D.K., A. Bachmair, I. Wüning, J.W. Tobias, W.S. Lane, and A. Varshavsky. 1989.

- Universality and structure of the N-end rule. *J. Biol. Chem.* 264:16700–16712.
- Gonzales, P.E., A. Solomon, A.B. Miller, M.A. Leesnitzer, I. Sagi, and M.E. Milla. 2004. Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain. *J. Biol. Chem.* 279:31638–31645.
- Gooz, P., Y. Dang, S. Higashiyama, W.O. Twal, C.J. Haycraft, and M. Gooz. 2012. A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is regulated by  $\alpha 5\beta 1$  integrin in kidney mesangial cells. *PLoS ONE*. 7:e33350.
- Gordon, W.R., D. Vardar-Ulu, S. L'Heureux, T. Ashworth, M.J. Malecki, C. Sanchez-Irizarry, D.G. McArthur, G. Histen, J.L. Mitchell, J.C. Aster, and S.C. Blacklow. 2009. Effects of S1 Cleavage on the Structure, Surface Export, and Signaling Activity of Human Notch1 and Notch2. *PLoS ONE*. 4:e6613.
- Goschnick, M.W., L.-M. Lau, J.L. Wee, Y.S. Liu, P.M. Hogarth, L.M. Robb, M.J. Hickey, M.D. Wright, and D.E. Jackson. 2006. Impaired “outside-in” integrin  $\alpha 11\beta 3$  signaling and thrombus stability in TSSC6-deficient mice. *Blood*. 108:1911–1918.
- Gourgues, M., P.H. Clergeot, C. Veneault, J. Cots, S. Sibuet, A. Brunet-Simon, C. Levis, T. Langin, and M.H. Lebrun. 2002. A new class of tetraspanins in fungi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297:1197–1204.
- Grams, F., R. Huber, L.F. Kress, L. Moroder, and W. Bode. 1993. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Letters*. 335:76–80.
- Gravano, D.M., B.T. McLelland, K. Horiuchi, and J.O. Manilay. 2010. ADAM17 Deletion in Thymic Epithelial Cells Alters Aire Expression without Affecting T Cell Developmental Progression. *PLoS ONE*. 5:e13528.
- Greco, C., M.P. Bralet, N. Ailane, A. Dubart-Kupperschmitt, E. Rubinstein, F. Le Naour, and C. Boucheix. 2010. E-Cadherin/p120-Catenin and Tetraspanin Co-029 Cooperate for Cell Motility Control in Human Colon Carcinoma. *Cancer Research*. 70:7674–7683.
- Green, L.R., P.N. Monk, L.J. Partridge, P. Morris, A.R. Gorringer, and R.C. Read. 2011. Cooperative role for tetraspanins in adhesin-mediated attachment of bacterial species to human epithelial cells. *Infect. Immun.* 79:2241–2249.
- Gupta-Rossi, N., E. Six, O. LeBail, F. Logeat, P. Chastagner, A. Olry, A. Israël, and C. Brou. 2004. Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor. *The Journal of Cell Biology*. 166:73–83.
- Haining, E.J., J. Yang, and M.G. Tomlinson. 2011. Tetraspanin microdomains: fine-tuning platelet function. *Biochem. Soc. Trans.* 39:518–523.
- Hall, T., H.S. Shieh, J.E. Day, N. Caspers, J.E. Chrencik, J.M. Williams, L.E. Pegg, A.M. Pauley, A.F. Moon, J.M. Krahn, D.H. Fischer, J.R. Kiefer, A.G. Tomasselli, and M.D. Zack. 2012. Structure of human ADAM-8 catalytic domain complexed with batimastat. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 68:616–621.

- Hambleton, S., N.V. Valeyev, A. Muranyi, V. Knott, J.M. Werner, A.J. McMichael, P.A. Handford, and A.K. Downing. 2004. Structural and Functional Properties of the Human Notch-1 Ligand Binding Region. *Structure*. 12:2173–2183.
- Harris, B., I. Pereira, and E. Parkin. 2009. Targeting ADAM10 to lipid rafts in neuroblastoma SH-SY5Y cells impairs amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *Brain Res*. 1296:203–215.
- Hartenstein, V., and J.W. Posakony. 1990. A dual function of the Notch gene in Drosophila sensillum development. *Dev. Biol.* 142:13–30.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lübke, A. Lena Illert, K. von Figura, and P. Saftig. 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Human Molecular Genetics*. 11:2615–2624.
- Hasegawa, H., T. Nomura, K. Kishimoto, K. Yanagisawa, and S. Fujita. 1998. SFA-1/PETA-3 (CD151), a member of the transmembrane 4 superfamily, associates preferentially with alpha 5 beta 1 integrin and regulates adhesion of human T cell leukemia virus type 1-infected T cells to fibronectin. *The Journal of Immunology*. 161:3087–3095.
- He, B. 2004. Tetraspanin CD82 Attenuates Cellular Morphogenesis through Down-regulating Integrin  $\alpha 6$ -Mediated Cell Adhesion. *Journal of Biological Chemistry*. 280:3346–3354.
- He, Z.-Y., S. Gupta, D. Myles, and P. Primakoff. 2009. Loss of surface EWI-2 on CD9 null oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 76:629–636.
- Heikens, M.J., T.M. Cao, C. Morita, S.L. DeHart, and S. Tsai. 2007. Penumbra encodes a novel tetraspanin that is highly expressed in erythroid progenitors and promotes effective erythropoiesis. *Blood*. 109:3244–3252.
- Herlevsen, M. 2003. The association of the tetraspanin D6.1A with the  $\alpha 6 \beta 4$  integrin supports cell motility and liver metastasis formation. *Journal of Cell Science*. 116:4373–4390.
- Herreman, A., D. Hartmann, W. Annaert, P. Saftig, K. Craessaerts, L. Serneels, L. Umans, V. Schrijvers, F. Checler, H. Vanderstichele, V. Baekelandt, R. Dressel, P. Cupers, D. Huylebroeck, A. Zwijsen, F. Van Leuven, and B. De Strooper. 1999. Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:11872–11877.
- Hébert, S.S., L. Serneels, T. Dejaegere, K. Horre, M. Dabrowski, V. Baert, W. Annaert, D. Hartmann, and B. de Strooper. 2004. Coordinated and widespread expression of gamma-secretase in vivo: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol. Dis.* 17:260–272.
- Hong, I.-K., D.-I. Jeoung, K.-S. Ha, Y.-M. Kim, and H. Lee. 2012. Tetraspanin CD151 stimulates adhesion-dependent activation of Ras, Rac, and Cdc42 by facilitating molecular association between  $\alpha 5 \beta 1$  integrins and small GTPases. *Journal of Biological*

*Chemistry.*

Hori, K., A. Sen, T. Kirchhausen, and S. Artavanis-Tsakonas. 2011. Synergy between the ESCRT-III complex and Deltex defines a ligand-independent Notch signal. *The Journal of Cell Biology*. 195:1005–1015.

Hori, K., M. Fostier, M. Ito, T.J. Fuwa, M.J. Go, H. Okano, M. Baron, and K. Matsuno. 2004. Drosophila deltex mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development*. 131:5527–5537.

Horiuchi, K., S. Le Gall, M. Schulte, T. Yamaguchi, K. Reiss, G. Murphy, Y. Toyama, D. Hartmann, P. Saftig, and C.P. Blobel. 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.

Hotta, H., A.H. Ross, K. Huebner, M. Isobe, S. Wendeborn, M.V. Chao, R.P. Ricciardi, Y. Tsujimoto, C.M. Croce, and H. Koprowski. 1988. Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Research*. 48:2955–2962.

Housden, B.E., K. Millen, and S.J. Bray. 2012. Drosophila Reporter Vectors Compatible with  $\Phi$ C31 Integrase Transgenesis Techniques and Their Use to Generate New Notch Reporter Fly Lines. *G3 (Bethesda)*. 2:79–82.

Höning, S., I.V. Sandoval, and K. von Figura. 1998. A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *The EMBO Journal*. 17:1304–1314.

Hsu, S.-H., B. Wang, J. Kota, J. Yu, S. Costinean, H. Kutay, L. Yu, S. Bai, K. La Perle, R.R. Chivukula, H. Mao, M. Wei, K.R. Clark, J.R. Mendell, M.A. Caligiuri, S.T. Jacob, J.T. Mendell, and K. Ghoshal. 2012. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J. Clin. Invest*. 122:2871–2883.

Hu, C.-C.A., F.-X. Liang, G. Zhou, L. Tu, C.-H.A. Tang, J. Zhou, G. Kreibich, and T.-T. Sun. 2005. Assembly of urothelial plaques: tetraspanin function in membrane protein trafficking. *Mol. Biol. Cell*. 16:3937–3950.

Huang, C.L., D. Liu, D. Masuya, K. Kameyama, T. Nakashima, H. Yokomise, M. Ueno, and M. Miyake. 2004. MRP-1/CD9 gene transduction downregulates Wnt signal pathways. *Oncogene*. 23:7475–7483.

Huang, C.L., M. Ueno, D. Liu, D. Masuya, J. Nakano, H. Yokomise, T. Nakagawa, and M. Miyake. 2006. MRP-1/CD9 gene transduction regulates the actin cytoskeleton through the downregulation of WAVE2. *Oncogene*. 25:6480–6488.

Huang, S., S. Yuan, M. Dong, J. Su, C. Yu, Y. Shen, X. Xie, Y. Yu, X. Yu, S. Chen, S. Zhang, P. Pontarotti, and A. Xu. 2005. The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics*. 86:674–684.

Huang, X.-Y., A.-W. Ke, G.-M. Shi, Z.-B. Ding, R.P. Devbhandari, F.-M. Gu, Q.-L. Li, Z. Dai, J.

Zhou, and J. Fan. 2010. Overexpression of CD151 as an adverse marker for intrahepatic cholangiocarcinoma patients. *Cancer*. 116:5440–5451.

Hundhausen, C., A. Schulte, B. Schulz, M.G. Andrzejewski, N. Schwarz, P. von Hundelshausen, U. Winter, K. Paliga, K. Reiss, P. Saftig, C. Weber, and A. Ludwig. 2007. Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *The Journal of Immunology*. 178:8064–8072.

Iba, K., R. Albrechtsen, B. Gilpin, C. Fröhlich, F. Loechel, A. Zolkiewska, K. Ishiguro, T. Kojima, W. Liu, J.K. Langford, R.D. Sanderson, C. Brakebusch, R. Fässler, and U.M. Wewer. 2000. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *The Journal of Cell Biology*. 149:1143–1156.

Ikeyama, S., M. Koyama, M. Yamaoko, R. Sasada, and M. Miyake. 1993. Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *J. Exp. Med.* 177:1231–1237.

Imayoshi, I., M. Sakamoto, M. Yamaguchi, K. Mori, and R. Kageyama. 2010. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *Journal of Neuroscience*. 30:3489–3498.

Ishiko, E., I. Matsumura, S. Ezoe, K. Gale, J. Ishiko, Y. Satoh, H. Tanaka, H. Shibayama, M. Mizuki, T. Era, T. Enver, and Y. Kanakura. 2005. Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J. Biol. Chem.* 280:4929–4939.

Israels, S.J., and E.M. McMillan-Ward. 2010. Palmitoylation supports the association of tetraspanin CD63 with CD9 and integrin alphaIIb beta3 in activated platelets. *Thromb. Res.* 125:152–158.

Ito, C., K. Yamatoya, K. Yoshida, M. Maekawa, K. Miyado, and K. Toshimori. 2010. Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell Tissue Res.* 340:583–594.

Ito, K., I. Okamoto, N. Araki, Y. Kawano, M. Nakao, S. Fujiyama, K. Tomita, T. Mimori, and H. Saya. 1999. Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts. *Oncogene*. 18:7080–7090.

Iwai, K., M. Ishii, S. Ohshima, K. Miyatake, and Y. Saeki. 2007. Expression and function of transmembrane-4 superfamily (tetraspanin) proteins in osteoclasts: reciprocal roles of Tspan-5 and NET-6 during osteoclastogenesis. *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*. 56:457–463.

Iwamoto, R., H. Senoh, Y. Okada, T. Uchida, and E. Mekada. 1991. An antibody that inhibits the binding of diphtheria toxin to cells revealed the association of a 27-kDa membrane protein with the diphtheria toxin receptor. *J. Biol. Chem.* 266:20463–20469.

Iwamoto, R., S. Higashiyama, T. Mitamura, N. Taniguchi, M. Klagsbrun, and E. Mekada.

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. *The EMBO Journal*. 13:2322–2330.

Janes, P.W., N. Saha, W.A. Barton, M.V. Kolev, S.H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C.P. Blobel, J.-P. Himanen, M. Lackmann, and D.B. Nikolov. 2005. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*. 123:291–304.

Jarriault, S., C. Brou, F. Logeat, E.H. Schroeter, R. Kopan, and A. Israel. 1995. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*. 377:355–358.

Jegou, A., A. Ziyat, V. Barraud-Lange, E. Perez, J.P. Wolf, F. Pincet, and C. Gourier. 2011. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108:10946–10951.

Johnson, J.L., N. Winterwood, K.A. DeMali, and C.S. Stipp. 2009. Tetraspanin CD151 regulates RhoA activation and the dynamic stability of carcinoma cell-cell contacts. *J. Cell. Sci*. 122:2263–2273.

Jorissen, E., J. Prox, C. Bernreuther, S. Weber, R. Schwanbeck, L. Serneels, A. Snellinx, K. Craessaerts, A. Thathiah, I. Tesseur, U. Bartsch, G. Weskamp, C.P. Blobel, M. Glatzel, B. de Strooper, and P. Saftig. 2010. The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *Journal of Neuroscience*. 30:4833–4844.

Juenger, C.H., M.I. Holst, K. Duffe, J. Jankowski, and S.L. Baader. 2005. Tetraspanin-5 (Tm4sf9) mRNA expression parallels neuronal maturation in the cerebellum of normal and L7En-2 transgenic mice. *J. Comp. Neurol*. 483:318–328.

Jung, K.-K., X.-W. Liu, R. Chirco, R. Fridman, and H.-R.C. Kim. 2006. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *The EMBO Journal*. 25:3934–3942.

Junge, H.J., S. Yang, J.B. Burton, K. Paes, X. Shu, D.M. French, M. Costa, D.S. Rice, and W. Ye. 2009. TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin- but not Wnt-induced FZD4/beta-catenin signaling. *Cell*. 139:299–311.

Kaji, K., S. Oda, S. Miyazaki, and A. Kudo. 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.

Kaji, K., S. Oda, T. Shikano, T. Ohnuki, Y. Uematsu, J. Sakagami, N. Tada, S. Miyazaki, and A. Kudo. 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat. Genet*. 24:279–282.

Kanetaka, K., M. Sakamoto, Y. Yamamoto, M. Takamura, T. Kanematsu, and S. Hirohashi. 2003. Possible involvement of tetraspanin CO-029 in hematogenous intrahepatic metastasis of liver cancer cells. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 18:1309–1314.

Kang, Q., Y. Cao, and A. Zolkiewska. 2000. Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem J*. 352 Pt

3:883–892.

Kang, Q., Y. Cao, and A. Zolkiewska. 2001. Direct interaction between the cytoplasmic tail of ADAM 12 and the Src homology 3 domain of p85alpha activates phosphatidylinositol 3-kinase in C2C12 cells. *J. Biol. Chem.* 276:24466–24472.

Kang, T., Y.-G. Zhao, D. Pei, J.F. Sucic, and Q.-X.A. Sang. 2002. Intracellular activation of human adamalysin 19/disintegrin and metalloproteinase 19 by furin occurs via one of the two consecutive recognition sites. *J. Biol. Chem.* 277:25583–25591.

Karamatic Crew, V., N. Burton, A. Kagan, C.A. Green, C. Levene, F. Flinter, R.L. Brady, G. Daniels, and D.J. Anstee. 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.

Karuppagounder, S.S., J.T. Pinto, H. Xu, H.-L. Chen, M.F. Beal, and G.E. Gibson. 2009. Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 54:111–118.

Ke, A.-W., G.-M. Shi, J. Zhou, F.-Z. Wu, Z.-B. Ding, M.-Y. Hu, Y. Xu, Z.-J. Song, Z.-J. Wang, J.-C. Wu, D.-S. Bai, J.-C. Li, K.-D. Liu, and J. Fan. 2009. Role of overexpression of CD151 and/or c-Met in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 49:491–503.

Ke, A.-W., G.-M. Shi, J. Zhou, X.-Y. Huang, Y.-H. Shi, Z.-B. Ding, X.-Y. Wang, R.P. Devbhandari, and J. Fan. 2011. CD151 amplifies signaling by integrin  $\alpha 6\beta 1$  to PI3K and induces the epithelial-mesenchymal transition in HCC cells. *Gastroenterology.* 140:1629–41.e15.

Kim, J., C. Lilliehook, A. Dudak, J. Prox, P. Saftig, H.J. Federoff, and S.T. Lim. 2010. Activity-dependent alpha-cleavage of nectin-1 is mediated by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *Journal of Biological Chemistry.* 285:22919–22926.

Kim, Y., J.S. Kim, G. Kim, Y.J. No, and H.-W. Yoo. 2006. Two novel mutations of the NOTCH3 gene in Korean patients with CADASIL. *Mutat. Res.* 593:116–120.

Kitadokoro, K., D. Bordo, G. Galli, R. Petracca, F. Falugi, S. Abrignani, G. Grandi, and M. Bolognesi. 2001. CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *The EMBO Journal.* 20:12–18.

Klinakis, A., C. Lobry, O. Abdel-Wahab, P. Oh, H. Haeno, S. Buonamici, I. van De Walle, S. Cathelin, T. Trimarchi, E. Araldi, C. Liu, S. Ibrahim, M. Beran, J. Zavadil, A. Efstratiadis, T. Taghon, F. Michor, R.L. Levine, and I. Aifantis. 2011. A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. *Nature.* 473:230–233.

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

Knösel, T., A. Emde, K. Schlüns, Y. Chen, K. Jürchott, M. Krause, M. Dietel, and I. Petersen. 2005. Immunoprofiles of 11 Biomarkers Using Tissue Microarrays Identify Prognostic

Subgroups in Colorectal Cancer. *NEO*. 7:741–747.

Kohutek, Z.A., C.G. diPierro, G.T. Redpath, and I.M. Hussaini. 2009. ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *Journal of Neuroscience*. 29:4605–4615.

Kojro, E., G. Gimpl, S. Lammich, W. Marz, and F. Fahrenholz. 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., P. Fügler, C. Prinzen, A.M. Kanarek, D. Rat, K. Endres, F. Fahrenholz, and R. Postina. 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.

Kojro, E., R. Postina, C. Buro, C. Meiringer, K. Gehrig-Burger, and F. Fahrenholz. 2006. The neuropeptide PACAP promotes the alpha-secretase pathway for processing the Alzheimer amyloid precursor protein. *The FASEB Journal*. 20:512–514.

Kopitz, C., M. Gerg, O.R. Bandapalli, D. Ister, C.J. Pennington, S. Hauser, C. Flechsig, H.-W. Krell, D. Antolovic, K. Brew, H. Nagase, M. Stangl, C.W.H. von Weyhern, B.L.D.M. Brücher, K. Brand, L.M. Coussens, D.R. Edwards, and A. Krüger. 2007. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Research*. 67:8615–8623.

Kovall, R.A., and S.C. Blacklow. 2010. Chapter Two - Mechanistic Insights into Notch Receptor Signaling from Structural and Biochemical Studies. *Current Topics in Developmental Biology - Volume 92*. 92:31–71.

Kuhn, P.-H., H. Wang, B. Dislich, A. Colombo, U. Zeitschel, J.W. Ellwart, E. Kremmer, S. Rossner, and S.F. Lichtenthaler. 2010. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *The EMBO Journal*. 29:3020–3032.

Kusukawa, J., F. Ryu, T. Kameyama, and E. Mekada. 2001. Reduced expression of CD9 in oral squamous cell carcinoma: CD9 expression inversely related to high prevalence of lymph node metastasis. *J Oral Pathol Med*. 30:73–79.

Kwon, M.J., S. Park, J.Y. Choi, E. Oh, Y.J. Kim, Y.-H. Park, E.Y. Cho, M.J. Kwon, S.J. Nam, Y.-H. Im, Y.K. Shin, and Y.-L. Choi. 2012. Clinical significance of CD151 overexpression in subtypes of invasive breast cancer. *Br J Cancer*. 106:923–930.

Lagaudrière-Gesbert, C., F. Le Naour, S. Lebel-Binay, M. Billard, E. Lemichez, P. Boquet, C. Boucheix, H. Conjeaud, and E. Rubinstein. 1997. Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity. *Cell. Immunol*. 182:105–112.

Lake, R.J., L.M. Grimm, A. Veraksa, A. Banos, and S. Artavanis-Tsakonas. 2009. In Vivo Analysis of the Notch Receptor S1 Cleavage. *PLoS ONE*. 4:e6728.

Lammerding, J., A.R. Kazarov, H. Huang, R.T. Lee, and M.E. Hemler. 2003. Tetraspanin

CD151 regulates alpha6beta1 integrin adhesion strengthening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:7616–7621.

Lammich, S., D. Buell, S. Zilow, A.-K. Ludwig, B. Nuscher, S.F. Lichtenthaler, C. Prinzen, F. Fahrenholz, and C. Haass. 2010. Expression of the anti-amyloidogenic secretase ADAM10 is suppressed by its 5'-untranslated region. *Journal of Biological Chemistry.* 285:15753–15760.

Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass, and F. Fahrenholz. 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., F. Kamp, J. Wagner, B. Nuscher, S. Zilow, A.-K. Ludwig, M. Willem, and C. Haass. 2011. Translational repression of the disintegrin and metalloprotease ADAM10 by a stable G-quadruplex secondary structure in its 5'-untranslated region. *Journal of Biological Chemistry.* 286:45063–45072.

Lapalombella, R., Y.-Y. Yeh, L. Wang, A. Ramanunni, S. Rafiq, S. Jha, J. Staubli, D.M. Lucas, R. Mani, S.E.M. Herman, A.J. Johnson, A. Lozanski, L. Andritsos, J. Jones, J.M. Flynn, B. Lannutti, P. Thompson, P. Algate, S. Stromatt, D. Jarjoura, X. Mo, D. Wang, C.-S. Chen, G. Lozanski, N.A. Heerema, S. Tridandapani, M.A. Freitas, N. Muthusamy, and J.C. Byrd. 2012. Tetraspanin CD37 Directly Mediates Transduction of Survival and Apoptotic Signals. *Cancer Cell.* 21:694–708.

Lau, L.M., J.L. Wee, M.D. Wright, G.W. Moseley, P.M. Hogarth, L.K. Ashman, and D.E. Jackson. 2004. The tetraspanin superfamily member CD151 regulates outside-in integrin alphaIIb beta3 signaling and platelet function. *Blood.* 104:2368–2375.

Le Gall, S.M., P. Bobé, K. Reiss, K. Horiuchi, X.-D. Niu, D. Lundell, D.R. Gibb, D. Conrad, P. Saftig, and C.P. Blobel. 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.

Le Naour, F., E. Rubinstein, C. Jasmin, M. Prenant, and C. Boucheix. 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science.* 287:319–321.

Le Naour, F., M. André, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2006a. Membrane microdomains and proteomics: Lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics.* 6:6447–6454.

Le Naour, F., M. André, C. Greco, M. Billard, B. Sordat, J.-F. Emile, F. Lanza, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2006b. Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Mol. Cell Proteomics.* 5:845–857.

Lee, J.-H., J.-W. Choi, and Y.-S. Kim. 2011. Plasma or serum TIMP-1 is a predictor of survival outcomes in colorectal cancer: a meta-analysis. *J Gastrointest Liver Dis.* 20:287–291.

Lemieux, G.A., F. Blumenkron, N. Yeung, P. Zhou, J. Williams, A.C. Grammer, R. Petrovich,

P.E. Lipsky, M.L. Moss, and Z. Werb. 2007. The low affinity IgE receptor (CD23) is cleaved by the metalloproteinase ADAM10. *J. Biol. Chem.* 282:14836–14844.

Leonard, J.D., F. Lin, and M.E. Milla. 2005. Chaperone-like properties of the prodomain of TNFalpha-converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch. *Biochem J.* 387:797–805.

Leonardi, J., R. Fernandez-Valdivia, Y.D. Li, A.A. Simcox, and H. Jafar-Nejad. 2011. Multiple O-glycosylation sites on Notch function as a buffer against temperature-dependent loss of signaling. *Development.* 138:3569–3578.

Levy, S., and T. Shoham. 2005. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol.* 5:136–148.

Li, X., Y. Yan, W. Huang, Y. Yang, H. Wang, and L. Chang. 2009. The regulation of TACE catalytic function by its prodomain. *Mol. Biol. Rep.* 36:641–651.

Lin, P.-C., S.-C. Lin, C.-T. Lee, Y.-J. Lin, and J.-C. Lee. 2011. Dynamic change of tetraspanin CD151 membrane protein expression in colorectal cancer patients. *Cancer Invest.* 29:542–547.

Lindenbach, B.D., M.J. Evans, A.J. Syder, B. Wölk, T.L. Tellinghuisen, C.C. Liu, T. Maruyama, R.O. Hynes, D.R. Burton, J.A. McKeating, and C.M. Rice. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science.* 309:623–626.

Lineberry, N., L. Su, L. Soares, and C.G. Fathman. 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.

Litterst, C., A. Georgakopoulos, J. Shioi, E. Ghersi, T. Wisniewski, R. Wang, A. Ludwig, and N.K. Robakis. 2007. Ligand binding and calcium influx induce distinct ectodomain/gamma-secretase-processing pathways of EphB2 receptor. *J. Biol. Chem.* 282:16155–16163.

Liu, H., A.H.R. Shim, and X. He. 2009. Structural characterization of the ectodomain of a disintegrin and metalloproteinase-22 (ADAM22), a neural adhesion receptor instead of metalloproteinase: insights on ADAM function. *Journal of Biological Chemistry.* 284:29077–29086.

Liu, P.C.C., X. Liu, Y. Li, M. Covington, R. Wynn, R. Huber, M. Hillman, G. Yang, D. Ellis, C. Marando, K. Katiyar, J. Bradley, K. Abremski, M. Stow, M. Rupal, J. Zhuo, Y.-L. Li, Q. Lin, D. Burns, M. Xu, C. Zhang, D.-Q. Qian, C. He, V. Sharief, L. Weng, C. Agrios, E. Shi, B. Metcalf, R. Newton, S. Friedman, W. Yao, P. Scherle, G. Hollis, and T.C. Burn. 2006. Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 5:657–664.

Loechel, F., M.T. Overgaard, C. Oxvig, R. Albrechtsen, and U.M. Wewer. 1999. Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. *J. Biol. Chem.* 274:13427–13433.

Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N.G. Seidah, and A. Israel. 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8108–8112.

Lombardi, D.P., J. Geradts, J.F. Foley, C. Chiao, P.W. Lamb, and J.C. Barrett. 1999. Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer. *Cancer Res.* 59:5724–5731.

Lotteau, V., L. Teyton, A. Peleraux, T. Nilsson, L. Karlsson, S.L. Schmid, V. Quaranta, and P.A. Peterson. 1990. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature.* 348:600–605.

Löffler, S., F. Lottspeich, F. Lanza, D.O. Azorsa, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies. 1997. CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *J Virol.* 71:42–49.

Lupberger, J., M.B. Zeisel, F. Xiao, C. Thumann, I. Fofana, L. Zona, C. Davis, C.J. Mee, M. Turek, S. Gorke, C. Royer, B. Fischer, M.N. Zahid, D. Lavillette, J. Fresquet, F.-L. Cosset, S.M. Rothenberg, T. Pietschmann, A.H. Patel, P. Pessaux, M. Doffoël, W. Raffelsberger, O. Poch, J.A. McKeating, L. Brino, and T.F. Baumert. 2011. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* 17:589–595.

Maecker, H.T., and S. Levy. 1997. Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice. *J. Exp. Med.* 185:1505–1510.

Marcello, E., F. Gardoni, D. Mauceri, S. Romorini, A. Jeromin, R. Epis, B. Borroni, F. Cattabeni, C. Sala, A. Padovani, and M. Di Luca. 2007. Synapse-Associated Protein-97 Mediates  $\gamma$ -Secretase ADAM10 Trafficking and Promotes Its Activity. *Journal of Neuroscience.* 27:1682–1691.

Marcello, E., F. Gardoni, M. Di Luca, and I. Perez-Otano. 2010. An Arginine Stretch Limits ADAM10 Exit from the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry.* 285:10376–10384.

Margeta-Mitrovic, M., Y.N. Jan, and L.Y. Jan. 2000. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron.* 27:97–106.

Maskos, K., C. Fernandez-Catalan, R. Huber, G.P. Bourenkov, H. Bartunik, G.A. Ellestad, P. Reddy, M.F. Wolfson, C.T. Rauch, B.J. Castner, R. Davis, H.R. Clarke, M. Petersen, J.N. Fitzner, D.P. Cerretti, C.J. March, R.J. Paxton, R.A. Black, and W. Bode. 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.

Masui, T., R. Doi, T. Koshiba, K. Fujimoto, S. Tsuji, S. Nakajima, M. Koizumi, E. Toyoda, S. Tulachan, D. Ito, K. Kami, T. Mori, M. Wada, M. Noda, and M. Imamura. 2003. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. *Clin. Cancer Res.* 9:1779–1784.

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

Maurer, C.A., H.U. Graber, H. Friess, B. Beyermann, D. Willi, P. Netzer, A. Zimmermann, and M.W. Buchler. 1999. Reduced expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in advanced colon cancer and its metastases. *Surgery*. 126:869–880.

McCarthy, K., T. Maguire, G. McGreal, E. McDermott, N. O'Higgins, and M.J. Duffy. 1999. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int. J. Cancer*. 84:44–48.

McCulloch, D.R., M. Harvey, and A.C. Herington. 2000. The expression of the ADAMs proteases in prostate cancer cell lines and their regulation by dihydrotestosterone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 167:11–21.

McCulloch, D.R., P. Akl, H. Samaratunga, A.C. Herington, and D.M. Odorico. 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.

McNally, N., P.F. Kenna, D. Rancourt, T. Ahmed, A. Stitt, W.H. Colledge, D.G. Lloyd, A. Palfi, B. O'Neill, M.M. Humphries, P. Humphries, and G.J. Farrar. 2002. Murine model of autosomal dominant retinitis pigmentosa generated by targeted deletion at codon 307 of the rds-peripherin gene. *Human Molecular Genetics*. 11:1005–1016.

Meloty-Kapella, L., B. Shergill, J. Kuon, E. Botvinick, and G. Weinmaster. 2012. Notch Ligand Endocytosis Generates Mechanical Pulling Force Dependent on Dynamin, Epsins, and Actin. *Developmental Cell*. 22:1299–1312.

Metz, V.V., E. Kojro, D. Rat, and R. Postina. 2012. Induction of RAGE Shedding by Activation of G Protein-Coupled Receptors. *PLoS ONE*. 7:e41823.

Metzger, F., and J.P. Kapfhammer. 2000. Protein kinase C activity modulates dendritic differentiation of rat Purkinje cells in cerebellar slice cultures. *Eur. J. Neurosci.* 12:1993–2005.

Mezyk-Kopeć, R., M. Bzowska, K. Stalińska, T. Chełmicki, M. Podkalicki, J. Jucha, K. Kowalczyk, P. Mak, and J. Bereta. 2009. Identification of ADAM10 as a major TNF sheddase in ADAM17-deficient fibroblasts. *Cytokine*. 46:309–315.

Mhaweck, P., F. Herrmann, M. Coassin, L. Guillou, and C.E. Iselin. 2003. Motility-related protein 1 (MRP-1/CD9) expression in urothelial bladder carcinoma and its relation to tumor recurrence and progression. *Cancer*. 98:1649–1657.

Michelsen, K., H. Yuan, and B. Schwappach. 2005. Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO reports*. 6:717–722.

Milla, M.E., P.E. Gonzales, and J.D. Leonard. 2006. The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch. *Cell Biochem. Biophys.* 44:342–348.

Mimori, K., A. Kataoka, K. Yoshinaga, M. Ohta, Y. Sagara, Y. Yoshikawa, S. Ohno, G.F. Barnard, and M. Mori. 2005. Identification of molecular markers for metastasis-related genes in primary breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis*. 22:59–67.

Min, B.S., N.K. Kim, H.C. Jeong, and H.C. Chung. 2012. High levels of serum VEGF and TIMP-1 are correlated with colon cancer liver metastasis and intrahepatic recurrence after liver resection. *Oncol Lett.* 4:123–130.

Mitamura, T., R. Iwamoto, T. Umata, T. Yomo, I. Urabe, M. Tsuneoka, and E. Mekada. 1992. The 27-kD diphtheria toxin receptor-associated protein (DRAP27) from vero cells is the monkey homologue of human CD9 antigen: expression of DRAP27 elevates the number of diphtheria toxin receptors on toxin-sensitive cells. *The Journal of Cell Biology.* 118:1389–1399.

Miyado, K., G. Yamada, S. Yamada, H. Hasuwa, Y. Nakamura, F. Ryu, K. Suzuki, K. Kosai, K. Inoue, A. Ogura, M. Okabe, and E. Mekada. 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science.* 287:321–324.

Miyake, M., H. Inufusa, M. Adachi, H. Ishida, H. Hashida, T. Tokuhara, and Y. Kakehi. 2000. Suppression of pulmonary metastasis using adenovirally motility related protein-1 (MRP-1/CD9) gene delivery. *Oncogene.* 19:5221–5226.

Miyake, M., K. Nakano, Y. Ieki, M. Adachi, C.L. Huang, S. Itoi, T. Koh, and T. Taki. 1995. Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Research.* 55:4127–4131.

Miyamoto, S., A. Maruyama, K. Okugawa, K. Akazawa, H. Baba, Y. Maehara, and E. Mekada. 2001. Loss of motility-related protein 1 (MRP1/CD9) and integrin alpha3 expression in endometrial cancers. *Cancer.* 92:542–548.

Miyazaki, T., U. Müller, and K.S. Campbell. 1997. Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81. *The EMBO Journal.* 16:4217–4225.

Montpellier, C., B.A. Tews, J. Poitrimole, V. Rocha-Perugini, V. D'Arienzo, J. Potel, X.A. Zhang, E. Rubinstein, J. Dubuisson, and L. Cocquerel. 2011. Interacting regions of CD81 and two of its partners, EWI-2 and EWI-2wint, and their effect on hepatitis C virus infection. *Journal of Biological Chemistry.* 286:13954–13965.

Moretti, J., P. Chastagner, S. Gastaldello, S.F. Heuss, A.M. Dirac, R. Bernardis, M.G. Masucci, A. Israël, and C. Brou. 2010. The translation initiation factor 3f (eIF3f) exhibits a deubiquitinase activity regulating Notch activation. *PLoS Biol.* 8:e1000545.

Mori, M., K. Mimori, T. Shiraishi, M. Haraguchi, H. Ueo, G.F. Barnard, and T. Akiyoshi. 1998. Motility related protein 1 (MRP1/CD9) expression in colon cancer. *Clin. Cancer Res.* 4:1507–1510.

Mori, S., M. Tanaka, D. Nanba, E. Nishiwaki, H. Ishiguro, S. Higashiyama, and N. Matsuura. 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.

Morrisette, J.D., R.P. Colliton, and N.B. Spinner. 2001. Defective intracellular transport and processing of JAG1 missense mutations in Alagille syndrome. *Human Molecular Genetics.* 10:405–413.

- Moss, M.L., M. Bomar, Q. Liu, H. Sage, P. Dempsey, P.M. Lenhart, P.A. Gillispie, A. Stoeck, D. Wildeboer, J.W. Bartsch, R. Palmisano, and P. Zhou. 2007. The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J. Biol. Chem.* 282:35712–35721.
- Mulvey, M.A., Y.S. Lopez-Boado, C.L. Wilson, R. Roth, W.C. Parks, J. Heuser, and S.J. Hultgren. 1998. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 282:1494–1497.
- Mumm, J.S., E.H. Schroeter, M.T. Saxena, A. Griesemer, X. Tian, D.J. Pan, W.J. Ray, and R. Kopan. 2000. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Molecular Cell.* 5:197–206.
- Muraguchi, T., Y. Takegami, T. Ohtsuka, S. Kitajima, E.P.S. Chandana, A. Omura, T. Miki, R. Takahashi, N. Matsumoto, A. Ludwig, M. Noda, and C. Takahashi. 2007. RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nat. Neurosci.* 10:838–845.
- Murayama, Y., J.-I. Miyagawa, Y. Shinomura, S. Kanayama, K. Isozaki, K. Yamamori, H. Mizuno, S. Ishiguro, T. Kiyohara, Y. Miyazaki, N. Taniguchi, S. Higashiyama, and Y. Matsuzawa. 2002. Significance of the association between heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and CD9 in human gastric cancer. *Int. J. Cancer.* 98:505–513.
- Murthy, A., Y.W. Shao, S.R. Narala, S.D. Molyneux, J.C. Zúñiga-Pflücker, and R. Khokha. 2012. Notch Activation by the Metalloproteinase ADAM17 Regulates Myeloproliferation and Atopic Barrier Immunity by Suppressing Epithelial Cytokine Synthesis. *Immunity.* 36:105–119.
- Nakamura, K., T. Mitamura, T. Takahashi, T. Kobayashi, and E. Mekada. 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.
- Nam, Y., P. Sliz, W.S. Pear, J.C. Aster, and S.C. Blacklow. 2007. Cooperative assembly of higher-order Notch complexes functions as a switch to induce transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:2103–2108.
- Nath, D., P.M. Slocombe, P.E. Stephens, A. Warn, G.R. Hutchinson, K.M. Yamada, A.J. Docherty, and G. Murphy. 1999. Interaction of metargidin (ADAM-15) with alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins on different haemopoietic cells. *Journal of Cell Science.* 112 ( Pt 4):579–587.
- Nazarenko, I., S. Rana, A. Baumann, J. McAlear, A. Hellwig, M. Trendelenburg, G. Lochnit, K.T. Preissner, and M. Zöller. 2010. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Research.* 70:1668–1678.

- Nishida, H., H. Yamazaki, T. Yamada, S. Iwata, N.H. Dang, T. Inukai, K. Sugita, Y. Ikeda, and C. Morimoto. 2009. CD9 correlates with cancer stem cell potentials in human B-acute lymphoblastic leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382:57–62.
- Nishiuchi, R., N. Sanzen, S. Nada, Y. Sumida, Y. Wada, M. Okada, J. Takagi, H. Hasegawa, and K. Sekiguchi. 2005. Potentiation of the ligand-binding activity of integrin  $\alpha 3\beta 1$  via association with tetraspanin CD151. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:1939–1944.
- Novitskaya, V., H. Romanska, M. Dawoud, J.L. Jones, and F. Berditchevski. 2010. Tetraspanin CD151 regulates growth of mammary epithelial cells in three-dimensional extracellular matrix: implication for mammary ductal carcinoma in situ. *Cancer Research.* 70:4698–4708.
- Obregon, D.F., K. Rezai-Zadeh, Y. Bai, N. Sun, H. Hou, J. Ehrhart, J. Zeng, T. Mori, G.W. Arendash, D. Shytle, T. Town, and J. Tan. 2006. ADAM10 activation is required for green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 281:16419–16427.
- Odintsova, E., J. Voortman, E. Gilbert, and F. Berditchevski. 2003. Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *J. Cell. Sci.* 116:4557–4566.
- Odintsova, E., T. Sugiura, and F. Berditchevski. 2000a. Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr. Biol.* 10:1009–1012.
- Odintsova, E., T. Sugiura, and F. Berditchevski. 2000b. Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr. Biol.* 10:1009–1012.
- Odintsova, E., T.D. Butters, E. Monti, H. Sprong, G. van Meer, and F. Berditchevski. 2006. Gangliosides play an important role in the organization of CD82-enriched microdomains. *Biochem J.* 400:315–325.
- Okochi, M., H. Steiner, A. Fukumori, H. Tanii, T. Tomita, T. Tanaka, T. Iwatsubo, T. Kudo, M. Takeda, and C. Haass. 2002. Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *The EMBO Journal.* 21:5408–5416.
- Ono, M., K. Handa, S. Sonnino, D.A. Withers, H. Nagai, and S. Hakomori. 2001. GM3 ganglioside inhibits CD9-facilitated haptotactic cell motility: coexpression of GM3 and CD9 is essential in the downregulation of tumor cell motility and malignancy. *Biochemistry.* 40:6414–6421.
- Oren, R., S. Takahashi, C. Doss, R. Levy, and S. Levy. 1990. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Molecular and Cellular Biology.* 10:4007–4015.
- Orth, P., P. Reichert, W. Wang, W.W. Prosser, T. Yarosh-Tomaine, G. Hammond, R.N. Ingram, L. Xiao, U.A. Mirza, J. Zou, C. Strickland, S.S. Taremi, H.V. Le, and V. Madison. 2004. Crystal structure of the catalytic domain of human ADAM33. *J. Mol. Biol.* 335:129–

137.

Ovalle, S., M.D. Gutiérrez-López, N. Olmo, J. Turnay, M.A. Lizarbe, P. Majano, F. Molina-Jiménez, M. López-Cabrera, M. Yáñez-Mó, F. Sánchez-Madrid, and C. Cabañas. 2007. The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer*. 121:2140–2152.

Overstreet, E., E. Fitch, and J.A. Fischer. 2004. Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells. *Development*. 131:5355–5366.

Overstreet, E., X. Chen, B. Wendland, and J.A. Fischer. 2003. Either part of a Drosophila epsin protein, divided after the ENTH domain, functions in endocytosis of delta in the developing eye. *Curr. Biol*. 13:854–860.

Pan, D., and G.M. Rubin. 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis. *Cell*. 90:271–280.

Pan, Y., C. Han, C. Wang, G. Hu, C. Luo, X. Gan, F. Zhang, Y. Lu, and X. Ding. 2012. ADAM10 promotes pituitary adenoma cell migration by regulating cleavage of CD44 and L1. *J. Mol. Endocrinol*. 49:21–33.

Parkin, E., and B. Harris. 2009. A disintegrin and metalloproteinase (ADAM)-mediated ectodomain shedding of ADAM10. *J. Neurochem*. 108:1464–1479.

Peiretti, F., M. Canault, P. Deprez-Beauclair, V. Berthet, B. Bonardo, I. Juhan-Vague, and G. Nalbone. 2003. Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *Exp. Cell Res*. 285:278–285.

Peschon, J.J., J.L. Slack, P. Reddy, K.L. Stocking, S.W. Sunnarborg, D.C. Lee, W.E. Russell, B.J. Castner, R.S. Johnson, J.N. Fitzner, R.W. Boyce, N. Nelson, C.J. Kozlosky, M.F. Wolfson, C.T. Rauch, D.P. Cerretti, R.J. Paxton, C.J. March, and R.A. Black. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*. 282:1281–1284.

Pescini, F., S. Bianchi, E. Salvadori, A. Poggesi, M.T. Dotti, A. Federico, D. Inzitari, and L. Pantoni. 2008. A pathogenic mutation on exon 21 of the NOTCH3 gene causing CADASIL in an octogenarian paucisymptomatic patient. *J. Neurol. Sci*. 267:170–173.

Pesta, M., V. Kulda, R. Kucera, M. Pesek, J. Vrzalova, V. Liska, L. Pecen, V. Treska, J. Safranek, M. Prazakova, O. Vycital, J. Bruha, L. Holubec, and O. Topolcan. 2011. Prognostic significance of TIMP-1 in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 31:4031–4038.

Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 282:938–941.

Ploss, A., M.J. Evans, V.A. Gaysinskaya, M. Panis, H. You, Y.P. de Jong, and C.M. Rice. 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*. 457:882–886.

- Poghosyan, Z., S.M. Robbins, M.D. Houslay, A. Webster, G. Murphy, and D.R. Edwards. 2002. Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 277:4999–5007.
- Pols, M.S., and J. Klumperman. 2009. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* 315:1584–1592.
- Poodry, C.A., L. Hall, and D.T. Suzuki. 1973. Developmental properties of Shibire: a pleiotropic mutation affecting larval and adult locomotion and development. *Dev. Biol.* 32:373–386.
- Postina, R., A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Endres, C. Hiemke, M. Blessing, P. Flamez, A. Dequenne, E. Godaux, F. van Leuven, and F. Fahrenholz. 2004. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* 113:1456–1464.
- Prinzen, C., D. Trümbach, W. Wurst, K. Endres, R. Postina, and F. Fahrenholz. 2009. Differential gene expression in ADAM10 and mutant ADAM10 transgenic mice. *BMC Genomics.* 10:66.
- Prinzen, C., U. Müller, K. Endres, F. Fahrenholz, and R. Postina. 2005. Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *The FASEB Journal.* 19:1522–1524.
- Prox, J., M. Willenbrock, S. Weber, T. Lehmann, D. Schmidt-Arras, R. Schwanbeck, P. Saftig, and M. Schwake. 2012. Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Pruessmeyer, J., and A. Ludwig. 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.
- Qi, J.C., J. Wang, S. Mandadi, K. Tanaka, B.D. Roufogalis, M.C. Madigan, K. Lai, F. Yan, B.H. Chong, R.L. Stevens, and S.A. Krilis. 2006. Human and mouse mast cells use the tetraspanin CD9 as an alternate interleukin-16 receptor. *Blood.* 107:135–142.
- Rajendran, L., and K. Simons. 2005. Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science.* 118:1099–1102.
- Rajesh, S., P. Sridhar, B.A. Tews, L. Fénéant, L. Cocquerel, D.G. Ward, F. Berditchevski, and M. Overduin. 2012. Structural basis of ligand interactions of the large extracellular domain of tetraspanin CD81. *J Virol.*
- Rand, M.D., L.M. Grimm, S. Artavanis-Tsakonas, V. Patriub, S.C. Blacklow, J. Sklar, and J.C. Aster. 2000. Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Molecular and Cellular Biology.* 20:1825–1835.
- Ree, A.H., V.A. Florenes, J.P. Berg, G.M. Maelandsmo, J.M. Nesland, and O. Fodstad. 1997. High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant

metastases. *Clin. Cancer Res.* 3:1623–1628.

Reiss, K., T. Maretzky, A. Ludwig, T. Tousseyn, B. de Strooper, D. Hartmann, and P. Saftig. 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *The EMBO Journal.* 24:742–752.

Richardson, M.M., L.K. Jennings, and X.A. Zhang. 2010. Tetraspanins and tumor progression. *Clin Exp Metastasis.* 28:261–270.

Riedle, S., H. Kiefel, D. Gast, S. Bondong, S. Wolterink, P. Gutwein, and P. Altevogt. 2009. Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity. *Biochem J.* 420:391–402.

Roghani, M., J.D. Becherer, M.L. Moss, R.E. Atherton, H. Erdjument-Bromage, J. Arribas, R.K. Blackburn, G. Weskamp, P. Tempst, and C.P. Blobel. 1999. Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 274:3531–3540.

Romanska, H.M., and F. Berditchevski. 2010. Tetraspanins in human epithelial malignancies. *J. Pathol.* 223:4–14.

Rooke, J., D. Pan, T. Xu, and G.M. Rubin. 1996. KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science.* 273:1227–1231.

Ross, J., L. Mavoungou, E.H. Bresnick, and E. Milot. 2012. GATA-1 Utilizes Ikaros and Polycomb Repressive Complex 2 To Suppress Hes1 and To Promote Erythropoiesis. *Molecular and Cellular Biology.* 32:3624–3638.

Rous, B.A., B.J. Reaves, G. Ihrke, J.A.G. Briggs, S.R. Gray, D.J. Stephens, G. Banting, and J.P. Luzio. 2002. Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol. Biol. Cell.* 13:1071–1082.

Rubinstein, E., A. Ziyat, M. Prenant, E. Wrobel, J.P. Wolf, S. Levy, F. Le Naour, and C. Boucheix. 2006. Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Dev. Biol.* 290:351–358.

Rubinstein, E., F. Le Naour, C. Lagaudrière-Gesbert, M. Billard, H. Conjeaud, and C. Boucheix. 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.

Runge, K.E., J.E. Evans, Z.-Y. He, S. Gupta, K.L. McDonald, H. Stahlberg, P. Primakoff, and D.G. Myles. 2007. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev. Biol.* 304:317–325.

Sachs, N., M. Kreft, M.A. van den Bergh Weerman, A.J. Beynon, T.A. Peters, J.J. Weening, and A. Sonnenberg. 2006. Kidney failure in mice lacking the tetraspanin CD151. *The Journal of Cell Biology.* 175:33–39.

Sadej, R., H. Romanska, G. Baldwin, K. Gkirtzimanaki, V. Novitskaya, A.D. Filer, Z. Krcova, R. Kusinska, J. Ehrmann, C.D. Buckley, R. Kordek, P. Potemski, A.G. Eliopoulos, E.-N. Lalani, and F. Berditchevski. 2009. CD151 regulates tumorigenesis by modulating the communication between tumor cells and endothelium. *Molecular Cancer Research.*

7:787–798.

Sahin, U., G. Weskamp, K. Kelly, H.-M. Zhou, S. Higashiyama, J. Peschon, D. Hartmann, P. Saftig, and C.P. Blobel. 2004. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of Cell Biology*. 164:769–779.

Sanchez-Irizarry, C., A.C. Carpenter, A.P. Weng, W.S. Pear, J.C. Aster, and S.C. Blacklow. 2004. Notch Subunit Heterodimerization and Prevention of Ligand-Independent Proteolytic Activation Depend, Respectively, on a Novel Domain and the LNR Repeats. *Molecular and Cellular Biology*. 24:9265–9273.

Sanderson, M.P., S.N. Erickson, P.J. Gough, K.J. Garton, P.T. Wille, E.W. Raines, A.J. Dunbar, and P.J. Dempsey. 2005. ADAM10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *J. Biol. Chem.* 280:1826–1837.

Sauer, G., J. Windisch, C. Kurzeder, V. Heilmann, R. Kreienberg, and H. Deissler. 2003. Progression of cervical carcinomas is associated with down-regulation of CD9 but strong local re-expression at sites of transendothelial invasion. *Clin. Cancer Res.* 9:6426–6431.

Schelter, F., M. Grandl, B. Seubert, S. Schaten, S. Hauser, M. Gerg, C. Boccaccio, P. Comoglio, and A. Krüger. 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.

Schröder, J., R. Lullmann-Rauch, N. Himmerkus, I. Pleines, B. Nieswandt, Z. Orinska, F. Koch-Nolte, B. Schröder, M. Bleich, and P. Saftig. 2009. Deficiency of the tetraspanin CD63 associated with kidney pathology but normal lysosomal function. *Molecular and Cellular Biology*. 29:1083–1094.

Schulz, B., J. Pruessmeyer, T. Maretzky, A. Ludwig, C.P. Blobel, P. Saftig, and K. Reiss. 2008. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ. Res.* 102:1192–1201.

Schwartz-Albiez, R., B. Dörken, W. Hofmann, and G. Moldenhauer. 1988. The B cell-associated CD37 antigen (gp40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein. *The Journal of Immunology*. 140:905–914.

Seals, D.F., and S.A. Courtneidge. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17:7–30.

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.

Sela, B.A., Z. Steplewski, and H. Koprowski. 1989. Colon carcinoma-associated glycoproteins recognized by monoclonal antibodies CO-029 and GA22-2. *Hybridoma*. 8:481–491.

Serneels, L., J. Van Biervliet, K. Craessaerts, T. Dejaegere, K. Horre, T. Van Houtvin, H. Esselmann, S. Paul, M.K. Schafer, O. Berezovska, B.T. Hyman, B. Sprangers, R. Sciot, L.

- Moons, M. Jucker, Z. Yang, P.C. May, E. Karran, J. Wiltfang, R. D'Hooge, and B. De Strooper. 2009. -Secretase Heterogeneity in the Aph1 Subunit: Relevance for Alzheimer's Disease. *Science*. 324:639–642.
- Serneels, L., T. Dejaegere, K. Craessaerts, K. Horre, E. Jorissen, T. Tousseyn, S. Hébert, M. Coolen, G. Martens, A. Zwijsen, W. Annaert, D. Hartmann, and B. de Strooper. 2005. Differential contribution of the three Aph1 genes to gamma-secretase activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:1719–1724.
- Serru, V., F. Le Naour, M. Billard, D.O. Azorsa, F. Lanza, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 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., P. Dessen, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2000. Sequence and expression of seven new tetraspans. *Biochim. Biophys. Acta.* 1478:159–163.
- Seugnet, L., P. Simpson, and M. Haenlin. 1997. Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev. Biol.* 192:585–598.
- Shaw, M.L., K.L. Stone, C.M. Colangelo, E.E. Gulcicek, and P. Palese. 2008. Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog.* 4:e1000085.
- Shen, J., R.T. Bronson, D.F. Chen, W. Xia, D.J. Selkoe, and S. Tonegawa. 1997. Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell.* 89:629–639.
- Sheng, K.-C., A.B. van Spriël, K.H. Gartlan, M. Sofi, V. Apostolopoulos, L. Ashman, and M.D. Wright. 2009. Tetraspanins CD37 and CD151 differentially regulate Ag presentation and T-cell co-stimulation by DC. *Eur. J. Immunol.* 39:50–55.
- Shi, G.-M., A.-W. Ke, J. Zhou, X.-Y. Wang, Y. Xu, Z.-B. Ding, R.P. Devbhandari, X.-Y. Huang, S.-J. Qiu, Y.-H. Shi, Z. Dai, X.-R. Yang, G.-H. Yang, and J. Fan. 2010. CD151 modulates expression of matrix metalloproteinase 9 and promotes neoangiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 52:183–196.
- Shi, S., and P. Stanley. 2003. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:5234–5239.
- Shigeta, M., N. Sanzen, M. Ozawa, J. Gu, H. Hasegawa, and K. Sekiguchi. 2003. CD151 regulates epithelial cell-cell adhesion through PKC- and Cdc42-dependent actin cytoskeletal reorganization. *The Journal of Cell Biology.* 163:165–176.
- Shiomi, T., I. Inoki, F. Kataoka, T. Ohtsuka, G. Hashimoto, R. Nemori, and Y. Okada. 2005. Pericellular activation of proMMP-7 (promatrilysin-1) through interaction with CD151. *Lab. Invest.* 85:1489–1506.
- Sho, M., M. Adachi, T. Taki, H. Hashida, T. Konishi, C.L. Huang, N. Ikeda, Y. Nakajima, H. Kanehiro, M. Hisanaga, H. Nakano, and M. Miyake. 1998. Transmembrane 4 superfamily as a prognostic factor in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer.* 79:509–516.
- Shoham, T., R. Rajapaksa, C. Boucheix, E. Rubinstein, J.C. Poe, T.F. Tedder, and S. Levy.

2003. The tetraspanin CD81 regulates the expression of CD19 during B cell development in a postendoplasmic reticulum compartment. *The Journal of Immunology*. 171:4062–4072.

Shoham, T., R. Rajapaksa, C.-C. Kuo, J. Haimovich, and S. Levy. 2006. Building of the tetraspanin web: distinct structural domains of CD81 function in different cellular compartments. *Molecular and Cellular Biology*. 26:1373–1385.

Si, Z., and P. Hersey. 1993. Expression of the neuroglandular antigen and analogues in melanoma. CD9 expression appears inversely related to metastatic potential of melanoma. *Int. J. Cancer*. 54:37–43.

Silvie, O., C. Greco, J.-F. Franetich, A. Dubart-Kupperschmitt, L. Hannoun, G.-J. van Gemert, R.W. Sauerwein, S. Levy, C. Boucheix, E. Rubinstein, and D. Mazier. 2006a. Expression of human CD81 differently affects host cell susceptibility to malaria sporozoites depending on the Plasmodium species. *Cell. Microbiol.* 8:1134–1146.

Silvie, O., E. Rubinstein, J.-F. Franetich, M. Prenant, E. Belnoue, L. Rénia, L. Hannoun, W. Eling, S. Levy, C. Boucheix, and D. Mazier. 2003. Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. *Nat. Med.* 9:93–96.

Silvie, O., S. Charrin, M. Billard, J.-F. Franetich, K.L. Clark, G.-J. van Gemert, R.W. Sauerwein, F. Dautry, C. Boucheix, D. Mazier, and E. Rubinstein. 2006b. Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites. *Journal of Cell Science*. 119:1992–2002.

Sincock, P.M., S. Fitter, R.G. Parton, M.C. Berndt, J.R. Gamble, and L.K. Ashman. 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.

Six, E.M., D. Ndiaye, G. Sauer, Y. Laâbi, R. Athman, A. Cumano, C. Brou, A. Israël, and F. Logeat. 2004. The notch ligand Delta1 recruits Dlg1 at cell-cell contacts and regulates cell migration. *J. Biol. Chem.* 279:55818–55826.

Sotillos, S., F. Roch, and S. Campuzano. 1997. The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of Drosophila imaginal discs. *Development*. 124:4769–4779.

Span, P.N., C.G.J. Sweep, P. Manders, L.V.A.M. Beex, D. Leppert, and R.L.P. Lindberg. 2003. Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. *Cancer*. 97:2710–2715.

Spandidos, A., X. Wang, H. Wang, and B. Seed. 2010. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res.* 38:D792–9.

Springman, E.B., E.L. Angleton, H. Birkedal-Hansen, and H.E. Van Wart. 1990. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a “cysteine switch” mechanism for

activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:364–368.

Sridhar, S.C., and C.K. Miranti. 2005. Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases. *Oncogene*. 25:2367–2378.

Stanley, P., and T. Okajima. 2010. Roles of glycosylation in Notch signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92:131–164.

Stautz, D., A. Leyme, M.V. Grandal, R. Albrechtsen, B. van Deurs, U. Wewer, and M. Kveiborg. 2012. Cell-surface Metalloprotease ADAM12 is Internalized by a Clathrin- and Grb2-dependent Mechanism. *Traffic*.

Stautz, D., A. Sanjay, M.T. Hansen, R. Albrechtsen, U.M. Wewer, and M. Kveiborg. 2010. ADAM12 localizes with c-Src to actin-rich structures at the cell periphery and regulates Src kinase activity. *Exp. Cell Res.* 316:55–67.

Sterk, L.M., C.A. Geuijen, L.C. Oomen, J. Calafat, H. Janssen, and A. Sonnenberg. 2000. The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *The Journal of Cell Biology*. 149:969–982.

Stipp, C.S., T.V. Kolesnikova, and M.E. Hemler. 2001. 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., T.V. Kolesnikova, and M.E. Hemler. 2003. EWI-2 regulates alpha3beta1 integrin-dependent cell functions on laminin-5. *The Journal of Cell Biology*. 163:1167–1177.

Struhl, G., and A. Adachi. 2000. Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Molecular Cell*. 6:625–636.

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

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

Suzuki, A., N. Kadota, T. Hara, Y. Nakagami, T. Izumi, T. Takenawa, H. Sabe, and T. Endo. 2000. Meltrin alpha cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src. *Oncogene*. 19:5842–5850.

Suzuki, S., T. Miyazaki, N. Tanaka, M. Sakai, A. Sano, T. Inose, M. Sohda, M. Nakajima, H. Kato, and H. Kuwano. 2011. Prognostic significance of CD151 expression in esophageal squamous cell carcinoma with aggressive cell proliferation and invasiveness. *Ann. Surg. Oncol.* 18:888–893.

Tachibana, I., and M.E. Hemler. 1999. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *The Journal of Cell Biology*. 146:893–904.

- Tagami, S., M. Okochi, K. Yanagida, A. Ikuta, A. Fukumori, N. Matsumoto, Y. Ishizuka-Katsura, T. Nakayama, N. Itoh, J. Jiang, K. Nishitomi, K. Kamino, T. Morihara, R. Hashimoto, T. Tanaka, T. Kudo, S. Chiba, and M. Takeda. 2008. Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. *Molecular and Cellular Biology*. 28:165–176.
- Takahashi, M., T. Sugiura, M. Abe, K. Ishii, and K. Shirasuna. 2007. Regulation of c-Met signaling by the tetraspanin KAI-1/CD82 affects cancer cell migration. *Int. J. Cancer*. 121:1919–1929.
- Takaoka, A., Y. Hinoda, S. Sato, F. Itoh, M. Adachi, M. Hareyama, and K. Imai. 1998a. Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells. *Jpn J Cancer Res*. 89:397–404.
- Takaoka, A., Y. Hinoda, S. Satoh, Y. Adachi, F. Itoh, M. Adachi, and K. Imai. 1998b. Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene. *Oncogene*. 16:1443–1453.
- Takeda, T., N. Hattori, T. Tokuhara, Y. Nishimura, M. Yokoyama, and M. Miyake. 2007a. Adenoviral transduction of MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 inhibits lymph node metastasis in orthotopic lung cancer model. *Cancer Research*. 67:1744–1749.
- Takeda, Y., A.R. Kazarov, C.E. Butterfield, B.D. Hopkins, L.E. Benjamin, A. Kaipainen, and M.E. Hemler. 2007b. Deletion of tetraspanin Cd151 results in decreased pathologic angiogenesis in vivo and in vitro. *Blood*. 109:1524–1532.
- Takeda, Y., I. Tachibana, K. Miyado, M. Kobayashi, T. Miyazaki, T. Funakoshi, H. Kimura, H. Yamane, Y. Saito, H. Goto, T. Yoneda, M. Yoshida, T. Kumagai, T. Osaki, S. Hayashi, I. Kawase, and E. Mekada. 2003. Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *The Journal of Cell Biology*. 161:945–956.
- Takenaka, K., S. Ishikawa, Y. Kawano, K. Yanagihara, R. Miyahara, Y. Otake, Y. Morioka, C. Takahashi, M. Noda, H. Wada, and F. Tanaka. 2004. Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer*. 40:1617–1623.
- Takeuchi, T., M. Hisanaga, M. Nagao, N. Ikeda, H. Fujii, F. Koyama, T. Mukogawa, H. Matsumoto, S. Kondo, C. Takahashi, M. Noda, and Y. Nakajima. 2004. The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. *Clin. Cancer Res*. 10:5572–5579.
- Tamura, K., Y. Taniguchi, S. Minoguchi, T. Sakai, T. Tun, T. Furukawa, and T. Honjo. 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.
- Tarrant, J.M., J. Groom, D. Metcalf, R. Li, B. Borobokas, M.D. Wright, D. Tarlinton, and L. Robb. 2002. The absence of Tssc6, a member of the tetraspanin superfamily, does not affect lymphoid development but enhances in vitro T-cell proliferative responses. *Molecular and Cellular Biology*. 22:5006–5018.

- Terada, N., K. Baracska, M. Kinter, S. Melrose, P.J. Brophy, C. Boucheix, C. Bjartmar, G. Kidd, and B.D. Trapp. 2002. The tetraspanin protein, CD9, is expressed by progenitor cells committed to oligodendrogenesis and is linked to beta1 integrin, CD81, and Tspan-2. *Glia*. 40:350–359.
- Testa, J.E., P.C. Brooks, J.M. Lin, and J.P. Quigley. 1999. Eukaryotic expression cloning with an antimetastatic monoclonal antibody identifies a tetraspanin (PETA-3/CD151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. *Cancer Research*. 59:3812–3820.
- Thali, M. 2011. Tetraspanin functions during HIV-1 and influenza virus replication. *Biochem. Soc. Trans.* 39:529–531.
- Tham, T.N., E. Gouin, E. Rubinstein, C. Boucheix, P. Cossart, and J. Pizarro-Cerda. 2010. Tetraspanin CD81 is required for *Listeria monocytogenes* invasion. *Infect. Immun.* 78:204–209.
- Tian, L., X. Wu, C. Chi, M. Han, T. Xu, and Y. Zhuang. 2008. ADAM10 is essential for proteolytic activation of Notch during thymocyte development. *International Immunology*. 20:1181–1187.
- Tian, X., D. Hansen, T. Schedl, and J.B. Skeath. 2004. Epsin potentiates Notch pathway activity in *Drosophila* and *C. elegans*. *Development*. 131:5807–5815.
- Tien, A.C., A. Rajan, and H.J. Bellen. 2009. A Notch updated. *The Journal of Cell Biology*. 184:621–629.
- Tippmann, F., J. Hundt, A. Schneider, K. Endres, and F. Fahrenholz. 2009. Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *The FASEB Journal*. 23:1643–1654.
- Todeschini, A.R., J.N. Dos Santos, K. Handa, and S.-I. Hakomori. 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., J.B. Nardi, and H.M. Robertson. 2000. The tetraspanin superfamily in insects. *Insect Mol. Biol.* 9:581–590.
- Tokuhara, T., H. Hasegawa, N. Hattori, H. Ishida, T. Taki, S. Tachibana, S. Sasaki, and M. Miyake. 2001. Clinical significance of CD151 gene expression in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 7:4109–4114.
- Tonoli, H., and J.C. Barrett. 2005. CD82 metastasis suppressor gene: a potential target for new therapeutics? *Trends Mol Med.* 11:563–570.
- Tousseyn, T., A. Thathiah, E. Jorissen, T. Raemaekers, U. Konietzko, K. Reiss, E. Maes, A. Snellinx, L. Serneels, O. Nyabi, W. Annaert, P. Saftig, D. Hartmann, and B. de Strooper. 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.

- Tran, M.H., M.S. Pearson, J.M. Bethony, D.J. Smyth, M.K. Jones, M. Duke, T.A. Don, D.P. McManus, R. Correa-Oliveira, and A. Loukas. 2006. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat. Med.* 12:835–840.
- Tsai, W.-C., P.W.-C. Hsu, T.-C. Lai, G.-Y. Chau, C.-W. Lin, C.-M. Chen, C.-D. Lin, Y.-L. Liao, J.-L. Wang, Y.-P. Chau, M.-T. Hsu, M. Hsiao, H.-D. Huang, and A.-P. Tsou. 2009. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 49:1571–1582.
- Tsai, Y.C., A. Mendoza, J.M. Mariano, M. Zhou, Z. Kostova, B. Chen, T. Veenstra, S.M. Hewitt, L.J. Helman, C. Khanna, and A.M. Weissman. 2007. The ubiquitin ligase gp78 promotes sarcoma metastasis by targeting KAI1 for degradation. *Nat. Med.* 13:1504–1509.
- Tsitsikov, E.N., J.C. Gutierrez-Ramos, and R.S. Geha. 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.
- Tu, L., T.-T. Sun, and G. Kreibich. 2002. Specific heterodimer formation is a prerequisite for uroplakins to exit from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* 13:4221–4230.
- Uchida, S., Y. Shimada, G. Watanabe, Z.G. Li, T. Hong, M. Miyake, and M. Imamura. 1999. Motility-related protein (MRP-1/CD9) and KAI1/CD82 expression inversely correlate with lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 79:1168–1173.
- Uemura, K., T. Kihara, A. Kuzuya, K. Okawa, T. Nishimoto, H. Ninomiya, H. Sugimoto, A. Kinoshita, and S. Shimohama. 2006. Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1. *Neurosci. Lett.* 402:278–283.
- van Niel, G., S. Charrin, S. Simoes, M. Romao, L. Rochin, P. Saftig, M.S. Marks, E. Rubinstein, and G. Raposo. 2011. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Developmental Cell.* 21:708–721.
- van Spriël, A.B. 2011. Tetraspanins in the humoral immune response. *Biochem. Soc. Trans.* 39:512–517.
- van Spriël, A.B., and C.G. Figdor. 2010. The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes and Infection.* 12:106–112.
- van Spriël, A.B., M. Sofi, K.H. Gartlan, A. van der Schaaf, I. Verschueren, R. Torensma, R.A.P. Raymakers, B.E. Loveland, M.G. Netea, G.J. Adema, M.D. Wright, and C.G. Figdor. 2009. The tetraspanin protein CD37 regulates IgA responses and anti-fungal immunity. *PLoS Pathog.* 5:e1000338.
- van Tetering, G., P. van Diest, I. Verlaan, E. van der Wall, R. Kopan, and M. Vooijs. 2009. Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. *Journal of Biological Chemistry.* 284:31018–31027.
- Van Wart, H.E., and H. Birkedal-Hansen. 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix

metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:5578–5582.

van Zelm, M.C., J. Smet, B. Adams, F. Mascart, L. Schandene, F. Janssen, A. Ferster, C.C. Kuo, S. Levy, J.J. van Dongen, and M. van der Burg. 2010. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J. Clin. Invest.* 120:1265–1274.

Vardar, D., C.L. North, C. Sanchez-Irizarry, J.C. Aster, and S.C. Blacklow. 2003. Nuclear Magnetic Resonance Structure of a Prototype Lin12-Notch Repeat Module from Human Notch1 †. *Biochemistry.* 42:7061–7067.

Voss, M.A., N. Gordon, S. Maloney, R. Ganesan, L. Ludeman, K. McCarthy, R. Gornall, G. Schaller, W. Wei, F. Berditchevski, and S. Sundar. 2011. Tetraspanin CD151 is a novel prognostic marker in poor outcome endometrial cancer. *Br J Cancer.* 104:1611–1618.

Wakabayashi, T., K. Craessaerts, L. Bammens, M. Bentahir, F. Borgions, P. Herdewijn, A. Staes, E. Timmerman, J. Vandekerckhove, E. Rubinstein, C. Boucheix, K. Gevaert, and B. de Strooper. 2009. Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains. *Nat. Cell Biol.* 11:1340–1346.

Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.-G. Kräusslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T.J. Liang. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11:791–796.

Wang, F., K. Vandepoele, and M. Van Lijsebettens. 2012a. Tetraspanin genes in plants. *Plant Sci.* 190:9–15.

Wang, H., G. Min, R. Glockshuber, T.-T. Sun, and X.-P. Kong. 2009. Uropathogenic E. coli adhesin-induced host cell receptor conformational changes: implications in transmembrane signaling transduction. *J. Mol. Biol.* 392:352–361.

Wang, J., K. Ohno-Matsui, and I. Morita. 2012b. Cholesterol enhances amyloid  $\beta$  deposition in mouse retina by modulating the activities of A $\beta$ -regulating enzymes in retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*

Wang, J.C., L.R. Begin, N.G. Berube, S. Chevalier, A.G. Aprikian, H. Gourdeau, and M. Chevrette. 2007a. Down-regulation of CD9 expression during prostate carcinoma progression is associated with CD9 mRNA modifications. *Clin. Cancer Res.* 13:2354–2361.

Wang, W., and G. Struhl. 2005. Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in Drosophila. *Development.* 132:2883–2894.

Wang, X., J.C. Adam, and D. Montell. 2007b. Spatially localized Kuzbanian required for specific activation of Notch during border cell migration. *Dev. Biol.* 301:532–540.

Wang, X.Q., Q. Yan, P. Sun, J.W. Liu, L. Go, S.M. McDaniel, and A.S. Paller. 2007c. Suppression of epidermal growth factor receptor signaling by protein kinase C- $\alpha$  activation requires CD82, caveolin-1, and ganglioside. *Cancer Res.* 67:9986–9995.

Wang, Y.-Y., Z.-Y. Ye, L. Li, Z.-S. Zhao, Q.-S. Shao, and H.-Q. Tao. 2011. ADAM 10 is associated with gastric cancer progression and prognosis of patients. *J Surg Oncol.*

103:116–123.

Warthen, D.M., E.C. Moore, B.M. Kamath, J.J.D. Morrisette, P. Sanchez, D.A. Piccoli, I.D. Krantz, and N.B. Spinner. 2006. Jagged1 (JAG1) mutations in Alagille syndrome: increasing the mutation detection rate. *Hum. Mutat.* 27:436–443.

Waterhouse, R., C. Ha, and G.S. Dveksler. 2002. Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. *J. Exp. Med.* 195:277–282.

Weber, S., M.T. Niessen, J. Prox, R. Lullmann-Rauch, A. Schmitz, R. Schwanbeck, C.P. Blobel, E. Jorissen, B. de Strooper, C.M. Niessen, and P. Saftig. 2011. The disintegrin/metalloproteinase Adam10 is essential for epidermal integrity and Notch-mediated signaling. *Development.* 138:495–505.

Weinmaster, G., V.J. Roberts, and G. Lemke. 1991. A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development. *Development.* 113:199–205.

Weng, A.P., A.A. Ferrando, W. Lee, J.P. Morris, L.B. Silverman, C. Sanchez-Irizarry, S.C. Blacklow, A.T. Look, and J.C. Aster. 2004. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science.* 306:269–271.

Weng, J., D.N. Krementsov, S. Khurana, N.H. Roy, and M. Thali. 2009. Formation of syncytia is repressed by tetraspanins in human immunodeficiency virus type 1-producing cells. *J Virol.* 83:7467–7474.

Weskamp, G., J.W. Ford, J. Sturgill, S. Martin, A.J.P. Docherty, S. Swendeman, N. Broadway, D. Hartmann, P. Saftig, S. Umland, A. Sehara-Fujisawa, R.A. Black, A. Ludwig, J.D. Becherer, D.H. Conrad, and C.P. Blobel. 2006. ADAM10 is a principal “shedase” of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nat. Immunol.* 7:1293–1298.

Wilkin, M., P. Tongngok, N. Gensch, S. Clemence, M. Motoki, K. Yamada, K. Hori, M. Taniguchi-Kanai, E. Franklin, K. Matsuno, and M. Baron. 2008. Drosophila HOPS and AP-3 complex genes are required for a Deltex-regulated activation of notch in the endosomal trafficking pathway. *Developmental Cell.* 15:762–772.

Wilkin, M.B., A.-M. Carbery, M. Fostier, H. Aslam, S.L. Mazaleyrat, J. Higgs, A. Myat, D.A.P. Evans, M. Cornell, and M. Baron. 2004. Regulation of notch endosomal sorting and signaling by Drosophila Nedd4 family proteins. *Curr. Biol.* 14:2237–2244.

Winterwood, N.E., A. Varzavand, M.N. Meland, L.K. Ashman, and C.S. Stipp. 2006. A critical role for tetraspanin CD151 in alpha3beta1 and alpha6beta4 integrin-dependent tumor cell functions on laminin-5. *Mol. Biol. Cell.* 17:2707–2721.

Wolfsberg, T.G., P.D. Straight, R.L. Gerena, A.P. Huovila, P. Primakoff, D.G. Myles, and J.M. White. 1995. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev. Biol.* 169:378–383.

Wright, M.D., G.W. Moseley, and A.B. van Spriel. 2004a. Tetraspanin microdomains in immune cell signalling and malignant disease. *Tissue Antigens.* 64:533–542.

- Wright, M.D., J.M. Rochelle, M.G. Tomlinson, M.F. Seldin, and A.F. Williams. 1993. Gene structure, chromosomal localization, and protein sequence of mouse CD53 (Cd53): evidence that the transmembrane 4 superfamily arose by gene duplication. *International Immunology*. 5:209–216.
- Wright, M.D., S.M. Geary, S. Fitter, G.W. Moseley, L.-M. Lau, K.-C. Sheng, V. Apostolopoulos, E.G. Stanley, D.E. Jackson, and L.K. Ashman. 2004b. Characterization of mice lacking the tetraspanin superfamily member CD151. *Molecular and Cellular Biology*. 24:5978–5988.
- Wu, X.R., T.T. Sun, and J.J. Medina. 1996. In vitro binding of type 1-fimbriated Escherichia coli to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:9630–9635.
- Xu, D., C. Sharma, and M.E. Hemler. 2009. Tetraspanin12 regulates ADAM10-dependent cleavage of amyloid precursor protein. *The FASEB Journal*. 23:3674–3681.
- Yalaoui, S., S. Zougbedé, S. Charrin, O. Silvie, C. Arduise, K. Farhati, C. Boucheix, D. Mazier, E. Rubinstein, and P. Froissard. 2008. Hepatocyte permissiveness to Plasmodium infection is conveyed by a short and structurally conserved region of the CD81 large extracellular domain. *PLoS Pathog.* 4:e1000010.
- Yamada, K., T.J. Fuwa, T. Ayukawa, T. Tanaka, A. Nakamura, M.B. Wilkin, M. Baron, and K. Matsuno. 2011. Roles of Drosophila deltex in Notch receptor endocytic trafficking and activation. *Genes Cells*. 16:261–272.
- Yamazaki, H., C.W. Xu, M. Naito, H. Nishida, T. Okamoto, F.I. Ghani, S. Iwata, T. Inukai, K. Sugita, and C. Morimoto. 2011. Regulation of cancer stem cell properties by CD9 in human B-acute lymphoblastic leukemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 409:14–21.
- Yan, Y., K. Shirakabe, and Z. Werb. 2002. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *The Journal of Cell Biology*. 158:221–226.
- Yanez-Mo, M., A. Alfranca, C. Cabanas, M. Marazuela, R. Tejedor, M.A. Ursa, L.K. Ashman, M.O. de Landazuri, and F. Sanchez-Madrid. 1998. Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *The Journal of Cell Biology*. 141:791–804.
- Yang, X., C. Claas, S.-K. Kraeft, L.B. Chen, Z. Wang, J.A. Kreidberg, and M.E. Hemler. 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., L. Wei, C. Tang, R. Slack, E. Montgomery, and M. Lippman. 2000. KAI1 protein is down-regulated during the progression of human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 6:3424–3429.
- Yang, X., L.L. Wei, C. Tang, R. Slack, S. Mueller, and M.E. Lippman. 2001. Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells.

*Cancer Res.* 61:5284–5288.

Yang, X.H., A.L. Richardson, M.I. Torres-Arzayus, P. Zhou, C. Sharma, A.R. Kazarov, M.M. Andzelm, J.L. Strominger, M. Brown, and M.E. Hemler. 2008. CD151 accelerates breast cancer by regulating alpha 6 integrin function, signaling, and molecular organization. *Cancer Research*. 68:3204–3213.

Yang, X.H., O.V. Kovalenko, T.V. Kolesnikova, M.M. Andzelm, E. Rubinstein, J.L. Strominger, and M.E. Hemler. 2006. Contrasting effects of EWI proteins, integrins, and protein palmitoylation on cell surface CD9 organization. *J. Biol. Chem.* 281:12976–12985.

Yauch, R.L., F. Berditchevski, M.B. Harler, J. Reichner, and M.E. Hemler. 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.

Yáñez-Mó, M., O. Barreiro, M. Gordon-Alonso, M. Sala-Valdés, and F. Sánchez-Madrid. 2009. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends in Cell Biology.* 19:434–446.

Yoda, M., T. Kimura, T. Tohmonda, S. Uchikawa, T. Koba, J. Takito, H. Morioka, M. Matsumoto, D.C. Link, K. Chiba, Y. Okada, Y. Toyama, and K. Horiuchi. 2011. Dual functions of cell-autonomous and non-cell-autonomous ADAM10 activity in granulopoiesis. *Blood.* 118:6939–6942.

Yoo, S.H., K. Lee, J.Y. Chae, and K.C. Moon. 2011. CD151 expression can predict cancer progression in clear cell renal cell carcinoma. *Histopathology.* 58:191–197.

Yoon, S.O., X. Zhang, A.S. Freedman, D. Zahrieh, I.S. Lossos, L. Li, and Y.S. Choi. 2010. Down-regulation of CD9 expression and its correlation to tumor progression in B lymphomas. *The American Journal of Pathology.* 177:377–386.

Yoshida, T., H. Ebina, and Y. Koyanagi. 2009. N-linked glycan-dependent interaction of CD63 with CXCR4 at the Golgi apparatus induces downregulation of CXCR4. *Microbiol. Immunol.* 53:629–635.

Yu, Y., J.L. Yang, B. Markovic, P. Jackson, G. Yardley, J. Barrett, and P.J. Russell. 1997. Loss of KAI1 messenger RNA expression in both high-grade and invasive human bladder cancers. *Clin. Cancer Res.* 3:1045–1049.

Zerangue, N., B. Schwappach, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. 1999. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron.* 22:537–548.

Zhang, C., L. Tian, C. Chi, X. Wu, X. Yang, M. Han, T. Xu, Y. Zhuang, and K. Deng. 2010. Adam10 is essential for early embryonic cardiovascular development. *Dev. Dyn.* 239:2594–2602.

Zhang, J., G. Randall, A. Higginbottom, P. Monk, C.M. Rice, and J.A. McKeating. 2004. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol.* 78:1448–1455.

- Zhang, X.A., A.L. Bontrager, and M.E. Hemler. 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., W.S. Lane, S. Charrin, E. Rubinstein, and L. Liu. 2003. EW12/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Research.* 63:2665–2674.
- Zhao, X., R. Lapalombella, T. Joshi, C. Cheney, A. Gowda, M.S. Hayden-Ledbetter, P.R. Baum, T.S. Lin, D. Jarjoura, A. Lehman, D. Kussewitt, R.J. Lee, M.A. Caligiuri, S. Tridandapani, N. Muthusamy, and J.C. Byrd. 2007. Targeting CD37-positive lymphoid malignancies with a novel engineered small modular immunopharmaceutical. *Blood.* 110:2569–2577.
- Zheng, R., S. Yano, H. Zhang, E. Nakataki, I. Tachibana, I. Kawase, S. Hayashi, and S. Sone. 2005. CD9 overexpression suppressed the liver metastasis and malignant ascites via inhibition of proliferation and motility of small-cell lung cancer cells in NK cell-depleted SCID mice. *Oncol. Res.* 15:365–372.
- Zhou, B., L. Liu, M. Reddivari, and X.A. Zhang. 2004. The palmitoylation of metastasis suppressor KAI1/CD82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity. *Cancer Research.* 64:7455–7463.
- Zhou, G., W.J. Mo, P. Sebbel, G. Min, T.A. Neubert, R. Glockshuber, X.R. Wu, T.T. Sun, and X.P. Kong. 2001. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J. Cell. Sci.* 114:4095–4103.
- Zhu, D., X. Zha, M. Hu, A. Tao, H. Zhou, X. Zhou, and Y. Sun. 2012. High expression of TIMP-1 in human breast cancer tissues is a predictive of resistance to paclitaxel-based chemotherapy. *Med Oncol.*
- Zhu, G.-H., C. Huang, Z.-J. Qiu, J. Liu, Z.-H. Zhang, N. Zhao, Z.-Z. Feng, and X.-H. Lv. 2011. Expression and prognostic significance of CD151, c-Met, and integrin alpha3/alpha6 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig. Dis. Sci.* 56:1090–1098.
- Zhu, G.-Z., B.J. Miller, C. Boucheix, E. Rubinstein, C.C. Liu, R.O. Hynes, D.G. Myles, and P. Primakoff. 2002a. Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development.* 129:1995–2002.
- Zhu, P., Y. Sang, R. Xu, J. Zhao, C. Li, and S. Zhao. 2002b. The interaction between ADAM22 and 14-3-3beta. *Sci. China, C, Life Sci.* 45:577–582.
- Zhu, P.C., Y. Sun, R. Xu, Y. Sang, J. Zhao, G. Liu, L. Cai, C. Li, and S. Zhao. 2003. The interaction between ADAM 22 and 14-3-3zeta: regulation of cell adhesion and spreading. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301:991–999.
- Zigrino, P., R. Nischt, and C. Mauch. 2011. The disintegrin-like and cysteine-rich domains of ADAM-9 mediate interactions between melanoma cells and fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry.* 286:6801–6807.
- Zijlstra, A., J. Lewis, B. Degryse, H. Stuhlmann, and J.P. Quigley. 2008. The inhibition of

tumor cell intravasation and subsequent metastasis via regulation of in vivo tumor cell motility by the tetraspanin CD151. *Cancer Cell*. 13:221–234.

Zöller, M. 2008. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nature Publishing Group*. 9:40–55.

Zweifel, M.E., D.J. Leahy, and D. Barrick. 2005. Structure and Notch Receptor Binding of the Tandem WWE Domain of Deltex. *Structure*. 13:1599–1611.