

Université de Reims Champagne Ardenne
Ecole Doctorale Sciences – Technologies – Santé

THESE

Présentée en vue de l'obtention du titre de
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE**
Spécialité : Biochimie et Biologie Cellulaire

Par

Gwenn PERROT

**IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU PARTENAIRE DE LRP1 :
CD44, LE RECEPTEUR DE L'ACIDE HYALURONIQUE**

Membres du jury

Rapporteurs :

Dr. Emmanuelle LIAUDET-COOPMAN (Montpellier)

Pr. Philippe BOUCHER (Strasbourg)

Examineurs :

Pr. Patrick HENRIET (Bruxelles)

Dr. Hervé EMONARD (Reims)

Directeurs de thèse :

Professeur Laurent MARTINY (Reims)

Docteur Stéphane DEDIEU (Reims)

Laboratoire SiRMa-Signalisation des Récepteurs Matriciels
Unité MEDyC, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire
FRE CNRS/URCA N° 3481

UFR sciences Exactes et Naturelles de Reims
Université de Reims Champagne-Ardenne

Titre : Identification d'un nouveau partenaire de LRP1 : CD44, le récepteur de l'acide hyaluronique

LRP1 est un récepteur d'endocytose multifonctionnel capable non seulement d'interagir avec de nombreux ligands et de réguler leur endocytose, mais également de moduler certaines voies de signalisation intracellulaire. Ce récepteur se révèle impliqué dans de nombreux mécanismes physiologiques et pathologiques, comme l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer ou encore le cancer. La multiplicité de ses partenaires fait émerger le concept selon lequel LRP1 est capable de réguler le protéome membranaire et ainsi d'influencer le comportement migratoire de nombreuses cellules. De plus, les résultats récents obtenus au sein de notre laboratoire indiquent que ce récepteur d'endocytose est capable de contrôler la dynamique d'adhérence des cellules tumorales. Nous avons donc cherché à identifier un nouveau partenaire membranaire de LRP1, capable de participer à la régulation de l'adhérence tumorale. Notre étude s'est portée sur le récepteur d'adhérence CD44. L'utilisation de RAP, un antagoniste de LRP1 révèle que ce récepteur d'endocytose module la présence de CD44 à la membrane plasmique. Nous avons également découvert que ces deux récepteurs colocalisent fortement dans la cellule tumorale, que ce soit à la surface cellulaire ou au niveau intracellulaire. De plus LRP1 et CD44 co-immunoprécipitent à partir d'extraits totaux et membranaires, indiquant que ces deux récepteurs sont fortement associés au sein d'un même complexe moléculaire. L'étude de la répartition membranaire du complexe LRP1/CD44 a montré qu'il était en grande partie situé dans les radeaux lipidiques et particulièrement les cavéoles. Toutefois ces structures n'apparaissent pas nécessaires à l'établissement du complexe et ne sont pas impliquées dans les processus d'endocytose relatifs à ces récepteurs. En effet, des expérimentations visant à quantifier l'endocytose de CD44 couplées à différents traitements (β -MCD, conditions hyperosmotiques) révèlent que l'endocytose de ce complexe implique principalement la voie des vésicules tapissées de clathrine. Nous avons également démontré que ce mécanisme dynamique permettait de réguler l'adhérence tumorale. Enfin, des travaux sur le *shedding* de CD44 ont permis d'identifier les protéases impliquées (MT1MMP, ADAMs 10 et 17) et mettent en évidence un effet protecteur de LRP1 sur le clivage de l'ectodomaine de CD44.

Mots clés : LRP1, CD44, endocytose, adhérence, cancer, radeaux lipidiques

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité FRE CNRS/URCA N° 3481 MEDyC et plus particulièrement au laboratoire SiRMA. Je tiens donc tout d'abord à remercier le Professeur François-Xavier Maquart de m'avoir accueilli au sein de son unité.

Je tiens également à remercier le Professeur Philippe Boucher, ainsi que le Docteur Emmanuelle Liaudet-Coopman d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. De même, je remercie le Professeur Patrick Henriot d'avoir apporté son jugement sur mon travail de thèse.

J'adresse également mes remerciements au Professeur Laurent Martiny et au Docteur Stéphane Dedieu qui ont dirigé cette thèse. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes et je vous remercie pour l'autonomie que vous m'avez accordée. Stéphane, votre passion pour la recherche et votre optimisme m'ont aidée à avancer durant ces années, à ne pas baisser les bras dans les moments de doutes et à mener au mieux mes travaux.

Je remercie également Hervé Emonard qui m'a prodigué de nombreux conseils. Un grand merci également à Laetitia Parent et Cathy Hachet pour leur soutien technique et Hervé Sartelet pour son aide dans l'isolement des radeaux lipidiques. Je remercie aussi Jérôme Devy pour son aide dans le traitement de l'imagerie et Sébastien Almagro qui, même s'il n'est arrivé qu'à la fin de mes travaux, m'a permis d'appréhender la vidéomicroscopie. Enfin, merci à Fanja pour son aide en biologie moléculaire.

Je remercie également l'ensemble des membres de l'unité qui ont participé à ce travail et tout particulièrement Christine Terryn et Hélène Bobichon pour leurs conseils et leur participation à la mise au point des travaux d'imagerie.

Je tiens également à adresser mes remerciements aux personnes qui ont collaborées à ce travail et notamment le Professeur Michel Khrestchatisky de la société VECT-HORUS S.A.S., Marseille pour m'avoir permis d'utiliser les microdomaines de LRP1. Je remercie

également toutes les personnes participantes à l'ANR TIMPAD pour leur accueil à Marseille et pour m'avoir fait découvrir la bouillabesse.

J'ai également une pensée pour les organismes ayant permis le financement de ce travail et tout particulièrement le Ministère de l'Education Nationale et de l'Enseignement Supérieur, le CIES, la région Champagne-Ardenne, le CNRS, l'ANR, et également la SFBBM et la FEBS pour avoir en partie financé ma participation à des congrès nationaux et internationaux.

Je tiens également à remercier les personnes m'ayant encadrée ou conseillée dans ma fonction de moniteur, notamment Frédéric et Christelle (Oudot-)Delacoux, Marie-Pierre Courageot, Gwenola Simon, Jean-Louis Druelle. Cette expérience m'a beaucoup appris et a été très agréable à réaliser en leur compagnie.

J'ai bien sûr une pensée particulière pour Benoît Langlois qui m'a précédé. Je lui souhaite un avenir plein de réussite et le remercie pour tous les conseils qu'il m'a fournis et la passion pour la recherche qu'il transpirait. Je pense également à ceux que j'ai vu partir comme Lucie, Bénito ou Farid, je leur souhaite beaucoup de bonheur personnel et professionnel.

Ensuite, je voudrais exprimer toute la gratitude et l'amitié que j'ai envers tous les membres du laboratoire SiRMA qui ont fait de ces quatre années passées avec eux une grande expérience humaine. La joie et la bonne humeur que vous m'avez procurées m'ont permis de toujours venir travailler avec le sourire même lorsque mes travaux devenaient pénibles. Je pense particulièrement aux membres du bureau BI18 Marie-Line, Titof, Albin et Oliver, les nombreux goûters que l'on a partagés resteront longtemps marqués sur mes hanches. Merci aussi à la Coq, Jess, Callaghan, Dude, Nikétic, Sébastien, Nicolas, Stéphanie, Florence avec qui j'ai passé plus que des bons moments et qui me manqueront terriblement. Nos interminables conversations sur des sujets plus ou moins douteux, nos fous rires, je ne les oublierai pas. J'ai bien sûr une pensée à tous les autres que je n'ai pas encore cités : Francine, Aurélie, Emmanuelle, Véréne, Hassan, Laurent, Katia, Jean-Luc, Annie, Isabelle, Bertrand, Stéphanie S., Michel et Manu.

J'ai aussi une pensée à tous les étudiants qui ont eu la chance de faire un passage au sein du laboratoire. Certains sont restés, notamment Laurie à qui je souhaite le meilleur. Pour ceux qui nous ont quittés mais sont restés dans la recherche, je leur souhaite bon courage ; je pense surtout à Alexandra, Damien et Simon.

Enfin, je ne pouvais pas terminer ces remerciements sans un mot pour ma famille qui m'a soutenu dans mes études. Votre fierté aide à gommer mon éternelle insatisfaction dans ce que j'entreprends. Je pense bien sûr à mes parents, mes frères et sœurs et aussi à Marie-Thérèse et Christophe qui sont passés par là également. Marie-Thé, la règle des 80/20 m'aide maintenant à relativiser les choses.

Mes dernières paroles iront à Jérôme qui partage ma vie depuis bientôt 10 ans, il m'a connu lorsque je n'étais même pas encore bachelière et m'aura accompagné jusqu'à ce que je sois Docteur. Son soutien inconditionnel m'a aidé à tenir lorsque je voulais baisser les bras. Il a toujours cru en moi et en ce que je faisais peut-être même plus que je n'y croyais moi-même. Il m'a apporté énormément de bonheur et sans doute le plus beau cadeau que l'on puisse faire à une femme : un petit garçon, notre Enaël.

Sommaire

Liste des publications	1
Liste des communications orales	2
Liste des communications par voie d’affiche	3
Liste des abréviations	5
Liste des illustrations	8
Liste des tableaux	10
Introduction	11
I. Les étapes et composantes de la progression tumorale	11
I.A. Les caractéristiques de la cellule tumorale	11
I.A.1. Les cellules tumorales prolifèrent de manière incontrôlée	12
I.A.2. Les cellules tumorales ne répondent pas aux signaux anti-prolifératifs	13
I.A.3. Les cellules tumorales présentent un moindre potentiel apoptotique	13
I.A.4. Les cellules tumorales disposent d’un potentiel de réplication illimité	14
I.A.5. Les cellules tumorales participent à l’angiogenèse	14
I.A.6. Les cellules tumorales sont susceptibles d’envahir d’autres tissus	15
I.B. Les acteurs du microenvironnement tumoral	15
I.B.1. La matrice extracellulaire : caractéristiques et fonctions	15
I.B.2. La protéolyse matricielle (MMPs, ADAMs, plasminogène)	17
I.B.2.a. Les métalloprotéases matricielles (MMPs)	18
I.B.2.a.1. La structure des MMPs	19
I.B.2.a.2. La régulation des MMPs	20
I.B.2.a.3. Les fonctions associées aux MMPs	21
I.B.2.b. Les disintegrin metalloprotéases : ADAMs	24
I.B.2.b.1. La structure des ADAMs	24
I.B.2.b.2. La régulation des ADAMs	25

I.B.2.b.3. Les fonctions associées aux ADAMs	26
I.B.2.c. La cascade du plasminogène	27
I.C. Le mécanisme de la migration	28
I.C.1. Les étapes de la migration	28
I.C.2. Les différents modes migratoires et leurs transitions	31
I.C.3. Les récepteurs d'adhérence	32
I.C.3.a. Les intégrines	32
I.C.3.b. CD44	35
I.C.3.b.1. Structure d'une glycoprotéine possédant de multiples variants	35
I.C.3.b.2. Modifications post-traductionnelles	37
I.C.3.b.3. Ligands et fonction	38
I.C.3.b.4. Distribution membranaire	41
I.C.3.b.5. Une modification post-traductionnelle particulière : le <i>shedding</i>	41
I.C.3.b.6. Le rôle de CD44 dans la progression tumorale	43
II. Le récepteur d'endocytose LRP1	45
II.A. La famille des récepteurs au LDL	45
II.B. LRP-1 : organisation structurale	47
II.B.1. Le domaine extracellulaire	47
II.B.2. Le domaine intracellulaire	49
II.C. L'importance de RAP : protéine chaperonne et antagoniste de LRP1	51
II.D. Le rôle de LRP1 dans les processus physiologiques et pathologiques.	52
II.E. Répartition membranaire de LRP1	55
II.F. Le <i>shedding</i> de LRP1	56
II.G. Régulation du protéome membranaire par LRP1	57
III. But du travail	59
Matériel et méthodes	61
I. Modèle et culture cellulaire	61
I.A. Modèle cellulaire	61

I.B. Culture cellulaire	62
I.C. Traitements cellulaires	62
I.C.1. Traitement par RAP	62
I.C.2. Traitement avec les inhibiteurs de protéases	63
I.C.3. Déplétion et dosage du cholestérol	63
I.C.4. Choc osmotique	64
I.D. Transfection cellulaire	64
I.D.1. Les plasmides	64
I.D.2. Les siRNA	65
I.D.3. Mise en œuvre de la transfection transitoire	66
I.E. Test d'adhérence	67
I.F. Test d'endocytose	67
II. Etude des ARN messagers	68
II.A. Extraction des ARN totaux	68
II.B. Transcription inverse	69
II.C. RT-PCR et PCR en temps réel	69
II.D. Migration sur gel d'agarose	70
III. Préparation des échantillons protéiques	71
III.A. Prélèvement des milieux conditionnés et concentration	71
III.B. Préparation des extraits protéiques totaux	71
III.C. Préparation des extraits protéiques enrichis en membranes	71
III.D. Préparation des extraits protéiques enrichis en rafts	72
III.E. Dosage protéique	72
III.F. Biotinylation des protéines membranaires	73
III.G. Immunoprécipitation	74
IV. Isolement des rafts	75
V. Analyse des échantillons protéiques	76
V.A. Dénaturation des protéines et migration sur gel de polyacrylamide	76
V.B. Transfert sur membrane de nitrocellulose	77
V.C. Immunomarquage et visualisation de protéines	77
VI. Immunomarquages et microscopie	78
VI.A. Immunomarquages	78
VI.B. Acquisition des images en microscopie	79

VII.Purification de la protéine RAP	79
Résultats	82
<u>Chapitre I</u> : Mise en évidence d'un nouveau partenaire de LRP1 : CD44, récepteur de l'acide hyaluronique.	82
A.Caractérisation de l'expression de CD44 dans les cellules FTC133.	83
B.Etude de l'expression de CD44 suite à l'inhibition de l'endocytose de LRP1.	86
C.Mise en évidence de l'existence d'un complexe associant LRP1 et CD44	88
D.Etude du domaine extracellulaire de LRP1 impliqué dans l'interaction avec CD44.	89
<u>Chapitre II</u> : Localisation cellulaire du complexe LRP1/CD44.	92
A.Etude de la colocalisation entre LRP1 et CD44	92
B.Etude de la localisation du complexe LRP1/CD44 vis-à-vis des radeaux lipidiques.	94
B.1. Isolement des microdomaines membranaires	94
B.2. Mise au point d'un protocole de déplétion en cholestérol	95
B.3. Etude de la présence du complexe LRP1/CD44 dans les radeaux lipidiques	97
<u>Chapitre III</u> : Etude de l'endocytose de CD44 et effets du complexe LRP1/CD44 sur l'adhérence cellulaire	100
A.Etude de la localisation endosomale de CD44.	100
B.Etude de la localisation lysosomiale de CD44.	102
C.Etude de l'endocytose de CD44 par LRP1	104
D.Etude de la voie empreintée pour l'endocytose de CD44	105
E.Effet de l'interaction LRP1 : CD44 sur le comportement migratoire des cellules FTC133	107

Chapitre IV : Etude du shedding de CD44	109
A.Effet de LRP1 sur le shedding de CD44	109
B.Recherche des protéases impliquées dans le shedding de CD44 dans les cellules FTC133.	110
C.Etude de l'effet d'une déplétion en cholestérol sur le <i>shedding</i> de CD44.	113
Discussions et perspectives	115
I. Découverte de l'interaction entre LRP1 et CD44	115
II. Localisation du complexe LRP1/CD44	118
III. Etude de l'endocytose de CD44 et effets du complexe LRP1/CD44 sur l'adhérence cellulaire	119
IV. Mise en évidence de l'influence de LRP1 sur le <i>shedding</i> de CD44 et du rôle des cavéoles	121
Bibliographie	126

Liste des publications

Perrot G., Langlois B., Devy J., Almagro S., Sartelet H., Schneider C., Jeanne A., Hachet C., David M., Vlieghe P., Khrestchatisky M., Emonard E., Martiny L. and Dedieu S. "LRP-1: CD44, identification of a new cell surface complex regulating tumor cell adhesion." Soumission février 2012.

Selvais C., D'Auria L., Tyteca D., **Perrot G.**, Lemoine P., Troeberg L., Dedieu S., Noël A., Nagase H., Henriët P., Courtoy PJ., Marbaix E. and Emonard H. (2011). "Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of LRP-1 (low-density lipoprotein receptor-related protein-1) and clearance function." *FASEB Journal*, Vol. 25(6).

Langlois B., **Perrot G.**, Schneider C., Henriët P., Emonard H., Martiny L. and Dedieu S. (2010). "LRP-1 Promotes Cancer Cell Invasion by Supporting ERK and Inhibiting JNK Signaling Pathways." *PLoS ONE*, Vol. 5(7).

Letousey P., Baillieul F., **Perrot G.**, Boulay M., Vaillant-Gaveau N., Clément C. and Fontaine F. (2010). "Early events prior to visual symptoms in the apoplectic form of grapevine esca disease." *Phytopathology*, Vol. 100(5) : 424-431.

Liste des communications orales

Langlois B., Dedieu S., **Perrot G.**, Schneider C., Henriot P., Martiny L., Emonard H. "The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) mediates the clearance of extracellular proteinases but promotes cancer cell invasion by regulating MAPK signaling". XXIIInd FECTS meeting, Davos, Suisse. 3-7 juillet 2010.

Perrot G., Langlois B., Emonard H., Martiny L. et Dedieu S. "Identification of a new molecular partner for the endocytic receptor LRP-1: CD44, the hyaluronan receptor." Forum des Jeunes Chercheurs, Nancy, France. 25-27 août 2009.

Perrot G., Langlois B., Emonard H., Martiny L. et Dedieu S.

Identification d'un nouveau partenaire d'interaction du récepteur LRP-1 : CD44, récepteur à l'acide hyaluronique. Journée des jeunes chercheurs de l'IFR53, Reims. 10 avril 2009.

Dedieu S., Langlois B., **Perrot G.**, Devy J., Sid B., Emonard H. et Martiny L.

LRP-1: a new modulator of cytoskeleton dynamics and adhesive complex turnover in cancer cells. 2ème Forum du Cancéropôle Grand-Est, Vittel, France. 17 octobre 2008.

Liste des communications par voie d'affiche

Selvais C., D'auria L., Lemoine P., Tyteca D., **Perrot G.**, Troeberg L., Dedieu S., Noël A., Nagase H., Henriët P., Marbaix E., Courtoy P.J., Emonard H.

Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-1 and clearance function. Gordon Research Conference "Regulated Proteolysis of Cell Surface Proteins", Davidson, NC, USA. 10-15 juillet 2011.

Thevenard J, Langlois B., **Perrot G.**, David M., Vlieghe P., Devy J., Martiny L., Khrestchatisky M., Rivera S., Dedieu S., Emonard H.

Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) promotes binding and endocytosis of the matrix metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in neurons. Implications for Abeta accumulation? The 10th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's diseases, Barcelone, Espagne. 9-13 mars 2011.

Langlois B, **Perrot G.**, Schneider C., Henriët P., Martiny L., Emonard H., Dedieu S. "LRP-1 promotes cancer cell invasion by supporting ERK and inhibiting JNK signaling pathways". 4ème Forum du Cancéropôle Grand-Est, Strasbourg, France. 4-5 novembre 2010.

Perrot G., Langlois B., Emonard H., Martiny L. and Dedieu S.

LRP-1-mediated endocytosis of CD44: a new molecular mechanism to control cancer cell adhesion and invasion ? FEBS Congress, Göteborg, Suède. 26 juin-2 juillet 2010.

Perrot G., Langlois B., Emonard H., Martiny L., Dedieu S.

LRP-1-mediated endocytosis of CD44: a new molecular mechanism to control cancer cell adhesion and invasion? International symposium of the federative research institute n°53, Reims, France. 7-9 juin 2010.

Langlois B., **Perrot G.**, Schneider C., Henriet P., Emonard H., Martiny L., Dedieu S.

LRP-1 promotes cancer cell invasion by supporting ERK and inhibiting JNK signaling. International symposium of the federative research institute n°53, Reims, France. 7-9 juin 2010.

Perrot G., Langlois B., Emonard H., Martiny L. et Dedieu S.

LRP-1: a new molecular partner for CD44 in tumor context. Second Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies and CARD, Reims, France. 3-5 juin 2009.

Langlois B., **Perrot G.**, Martiny L., Emonard H. et Dedieu S.

LRP-1 controls carcinoma cell invasive properties through MAPK-mediated regulation of actin cytoskeleton and focal adhesion dynamics. Second Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies and CARD. Reims, France. 3-5 juin 2009.

Langlois B., **Perrot G.**, Devy J., Sid, B., Henriet P., Emonard H., Martiny L. et Dedieu S.

LRP-1 and cancer cell invasion: a multifunctional endocytic receptor controlling matrix proteolysis and focal adhesion turnover. "Early Tumor Invasion", Paul Basset memorial meeting, Illkirch, France. 30 janvier 2009.

Dedieu S., Langlois B., **Perrot G.**, Devy J., Martiny L. et Emonard H.

LRP-1 silencing prevents malignant cell invasion despite increased pericellular proteolytic activities. Cancer Degradome Symposium, London, UK. 8-9 octobre 2008.

Liste des abréviations

Aβ	Amiloïd β
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADAMTS	ADAM with Thrombospondine motif
AH	Acide hyaluronique
ApoER2	Apolipoprotéine E Receptor 2
APP	β -Amiloïd Precursor Protein
APS	Ammonium PerSulfate
β-ME	β -MercaptoEthanol
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BSA	Bovine Serum Albumine
CaMKII	Ca ²⁺ /calmoduline dependent kinase II
CBP	CREB Binding Protein
cdc42	Cell division control protein 42
CHO	Chinese hamster ovary
CR	Complement repeat
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
D-MEM	Dulbecco-Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRM	Detergent resistant domain
EDTA	Ethylene diamine tétracétique
EEA1	Early Endosomes Antigen 1
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	EGF receptor
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic
ERBB	EGF Receptor B
ERM	Ezrine, Radixine, Moesine
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FRET	Förster resonance energy transfer
FTC	Follicular Thyroïd Carcinoma
GAG	Glycosaminoglycane
GFP	Green fluorescent protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTPase	Guanosine triphosphate hydrolase
HA	Hemagglutinine
HB-EGF	Heparin Binding-EGF
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HRP	Horseradish Peroxidase
IAA	Alcool isoamylique
ICAM	Intracellular Cell Adhesion Molecule

IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-1β	Interleukine-1 β
IPTG	IsoPropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
JIP	JNK Interacting Protein
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinase
LAMP1	Lysosomal-Associated Membrane Protein 1
LDLR	Low-Density Lipoprotein Receptor
LR11	Lipoprotein receptor 11
LRP	Low Density Lipoprotein receptor-related protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
β-MCD	Méthyl- β -cyclodextrine
MEC	Matrice extracellulaire
MEGF7	Multiple EGF repeat containing protein 7
MLCK	Myosin-Light Chain Kinase
MMPs	Matrix Metalloprotease
MT-MMP	Membrane-Type-MMP
PFA	Paraformaldéhyde
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBS-B	Phosphate Buffer Saline-Biomerieux
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PGDFR-β	PDGF receptor- β
PI3-kinase	Phosphatidyl Inositol 3-kinase
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PKA	Protein Kinase AMPc-dependent
PKC	Protéine Kinase C
PLCγ	Phospholipase C γ
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
PTB	PhosphoTyrosine-Binding
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PTRF	Polymerase I and Transcript Release Factor
RAP	Receptor-Associated Protein
Rb	Rétinoblastome
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RIP	Regulated Intramembrane Proteolysis
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SH3	Proline-rich Src homology 3
SVF	Sérum de veau foetal
TBS	Tris Buffer Saline
TBS-T	Tris Buffered Saline-Tween
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TfR	Transferrin Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloprotease
TMA	Transition mésenchymal-amiboïde
TNF-α	Tumor Necrosis Factor- α

tPA	Tissue Plasminogen Activator
TSH	Thyrotropine
TSP	Thrombospondine
uPA	Urokinase Plasminogen Activator
uPAR	uPA Receptor
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VE-cadhérine	Vasculaire endotheliale cadhérine
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDLR	Very Low Density Lipoprotein Receptor

Liste des illustrations

Figure 1 :	Capacités acquises par les cellules tumorales au cours de la tumorigenèse.	12
Figure 2 :	La structure protéique des MMPs.	20
Figure 3 :	Dualité de la fonction des MMPs dans la progression tumorale.	23
Figure 4 :	La structure protéique des ADAMs.	25
Figure 5 :	La cascade protéolytique du plasminogène.	28
Figure 6 :	Représentation schématique des différentes étapes de la migration.	30
Figure 7 :	Les différents modes de migration et leurs transitions.	32
Figure 8 :	Les différentes familles d'intégrines.	33
Figure 9 :	Le lien entre les intégrines et le cytosquelette d'actine.	34
Figure 10 :	La structure du gène de CD44.	35
Figure 11 :	La structure protéique de CD44.	36
Figure 12 :	La régulation des cascades de signalisation induites par l'association CD44/HA et leur implication dans la progression tumorale.	40
Figure 13 :	Représentation schématique des différents membres de la famille des récepteurs au LDL.	46
Figure 14 :	La structure protéique de LRP1.	48
Figure 15 :	Les différents ligands connus de LRP1 et leur fonction respective.	49
Figure 16 :	Les différentes protéines cytoplasmiques connues pour interagir avec le domaine intracellulaire de LRP1 et leur fonction.	50
Figure 17 :	Les multiples mécanismes par lesquels LRP1 pourrait moduler le protéome membranaire.	58
Figure 18 :	Représentation schématique du plasmide ayant permis le clonage et l'expression des minidomains de LRP1.	65
Figure 19 :	Schéma du plasmide pT7 ayant permis le clonage et l'expression du gène de la protéine RAP taggée par un hexahistidine.	80
Figure 20 :	L'adhérence des cellules FTC133 est fortement augmentée sur l'acide hyaluronique.	82

Figure 21 :	Différentes formes de CD44 sont exprimées dans les cellules FTC133.	83
Figure 22 :	Seule la forme standard de CD44, CD44s, est exprimée dans les cellules FTC133.	85
Figure 23 :	La présence de CD44 à la membrane est fortement augmentée suite à l'inhibition de LRP1 par RAP.	86
Figure 24 :	L'inhibition ou l'invalidation de LRP1 ne modifie pas l'expression transcriptionnelle de CD44.	87
Figure 25 :	LRP1 et CD44 peuvent co-exister dans un même complexe protéique.	88
Figure 26 :	Le domaine de liaison IV est suffisant pour lier CD44.	90
Figure 27 :	LRP1 et CD44 colocalisent au niveau membranaire et intracellulaire.	93
Figure 28 :	Isolement des radeaux lipidiques.	95
Figure 29 :	Mise au point de la déplétion en cholestérol dans les cellules FTC133.	96
Figure 30 :	Vérification de l'efficacité de la déplétion en cholestérol sur l'abolition des radeaux lipidiques.	97
Figure 31 :	Le complexe LRP1/CD44 est largement en grande partie localisé dans les cavéoles.	98
Figure 32 :	La présence des cavéoles n'est pas nécessaire à la formation du complexe LRP1/CD44.	98
Figure 33 :	CD44 est en partie localisé dans les endosomes précoces et ceci sous l'influence de LRP1.	101
Figure 34 :	CD44 et EEA1 colocalisent au niveau intracellulaire.	102
Figure 35 :	CD44 est localisé dans les lysosomes.	103
Figure 36 :	LRP1 est capable d'endocyter en partie CD44.	104
Figure 37 :	LRP1 endocyte CD44 en empruntant la voie des vésicules clathrées.	106
Figure 38 :	L'effet pro-adhésif de RAP est aboli par l'invalidation de CD44.	107
Figure 39 :	L'inhibition sur 24 heures ou l'invalidation de LRP1 ne modifient pas sa présence à la membrane plasmique.	109
Figure 40 :	L'inhibition ou l'invalidation de LRP1 augmente le <i>shedding</i> de CD44.	110
Figure 41 :	Les métalloprotéases sont responsables du <i>shedding</i> de CD44.	111

Figure 42 :	CD44 est <i>sheddé</i> par la MT1-MMP et les ADAMs 10 et 17.	112
Figure 43 :	Le <i>shedding</i> de CD44 augmente en absence de radeaux lipidiques.	113

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Les différents composants de la MEC.	16
Tableau 2 :	Les différentes familles de MMPs.	18
Tableau 3 :	Spécificité des TIMPs vis-à-vis des ADAMS.	26
Tableau 4 :	Liste des inhibiteurs de protéases.	63
Tableau 5 :	Références commerciales des différents siRNA utilisés.	66
Tableau 6 :	Liste des amorces utilisées en PCR semi-quantitative.	70
Tableau 7 :	Quantités d'anticorps utilisées pour les immunoprécipitations	74
Tableau 8 :	Composition des gels de séparation	76
Tableau 9 :	Composition du gel de concentration	77
Tableau 10 :	Liste des anticorps utilisés en Western Blot.	78
Tableau 11 :	Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence	79

INTRODUCTION

Introduction

I. LES ÉTAPES ET COMPOSANTES DE LA PROGRESSION TUMORALE

I.A. LES CARACTÉRISTIQUES DE LA CELLULE TUMORALE

La tumorigenèse est un processus multi-étapes, qui se manifeste pour une large part au travers d'altérations génétiques qui n'ont pu être réparées par la cellule. Ces altérations conduisent à la transformation progressive d'une cellule normale en une cellule tumorale. Plusieurs différences fondamentales dissocient les cellules malignes des cellules bénignes, la principale étant un défaut de régulation de la prolifération des cellules aboutissant à la formation d'une tumeur. En conditions physiologiques, les cellules possèdent différents mécanismes de régulation permettant le maintien de l'homéostasie et évitant la formation de tumeurs. Lors de la transformation tumorale, les cellules subissent des altérations fondamentales qui peuvent être regroupées en six catégories distinctes (Hanahan et Weinberg 2000) (Fig. 1) :

- des signaux de croissance autosuffisants,
- une insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance,
- l'échappement à la mort cellulaire programmée ou apoptose,
- un potentiel réplicatif illimité,
- le soutien de l'angiogenèse,
- l'invasion d'autres tissus de l'organisme par le développement de métastases.

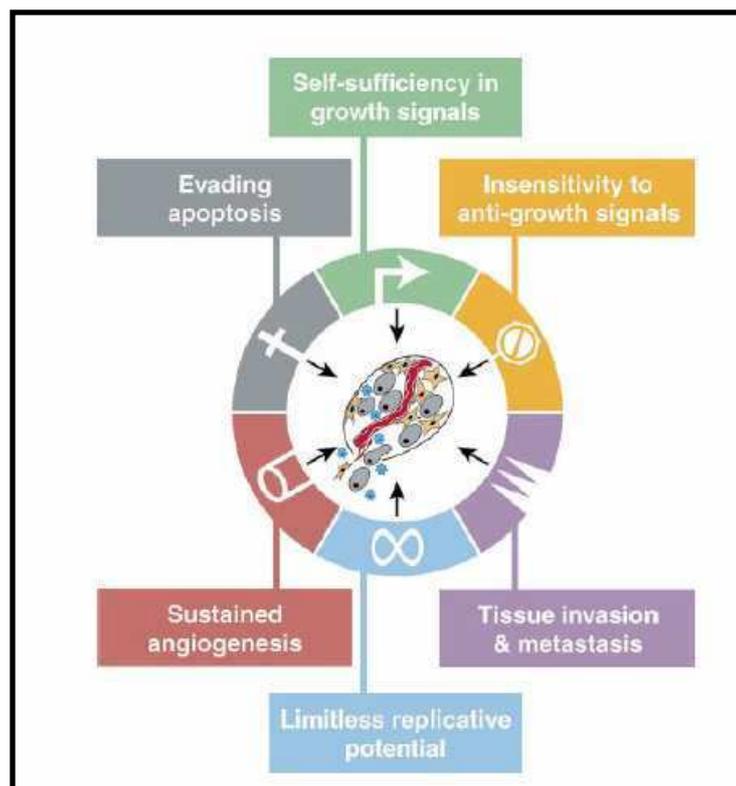


Figure 1 : Capacités acquises par les cellules tumorales au cours de la tumorigenèse. (Hanahan et Weinberg 2000)

I.A.1. Les cellules tumorales prolifèrent de manière incontrôlée

Pour proliférer, les cellules saines doivent bénéficier de signaux de croissance afin de quitter leur état quiescent. Ces signaux sont généralement constitués de facteurs de croissance qui se fixent à leur récepteur transmembranaire ou encore des signaux apportés par les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire. Les cellules tumorales sont capables de générer de façon autonome leurs signaux de prolifération, soit en altérant les signaux de croissance eux-mêmes, soit en altérant les voies de transduction et d'exécution de ces signaux. Par exemple, certaines cellules malignes sont capables de produire leurs propres facteurs de croissance et ainsi de réguler de façon autocrine leur prolifération. Ce qui est par exemple le cas des tumeurs thyroïdiennes qui surexpriment l'IGF (*insulin-like growth factor*) (Vella *et al.* 2001). De même, certaines modifications des récepteurs peuvent conduire à des effets identiques. Ainsi des mutations les rendant hypersensibles ou des modifications dans leur motif d'expression favorisent les récepteurs transmettant les signaux de prolifération. Ainsi, le récepteur à l'EGF (*epidermal growth factor*, EGFR) est surexprimé dans nombre de

cancers, dont des cancers épithéliaux ; ce qui en fait une cible thérapeutique majeure dans le traitement du cancer (Lorch 2009). Mais les cellules tumorales peuvent aussi corrompre les cellules adjacentes, appelées cellules stromales, en induisant chez elles la sécrétion de facteurs de croissance qui de façon paracrine vont stimuler la croissance tumorale.

I.A.2. Les cellules tumorales ne répondent pas aux signaux anti-prolifératifs

L'homéostasie tissulaire est maintenue grâce à une balance entre signaux prolifératifs et non-prolifératifs. Comme pour l'intégration de signaux prolifératifs (*Cf. I.A.1*), les cellules tumorales présentent également des altérations significatives au niveau des signaux anti-prolifératifs. Comme précédemment, des défaillances peuvent intervenir dans l'intégration des signaux que ce soit des modifications dans l'expression de molécules anti-prolifératives (TGF- β , *transforming growth factor- β*) ou de leurs récepteurs ou encore dans l'intégration du signal, comme la dérégulation de la phosphorylation de la protéine Rb (rétinoblastome), qui contrôle l'avancée dans le cycle cellulaire. Quelques soient les mécanismes moléculaires impliqués, la diminution ou la perte de sensibilité aux signaux anti-prolifératifs prévient la quiescence et limite la différenciation cellulaire (Hanahan et Weinberg 2000).

I.A.3. Les cellules tumorales présentent un moindre potentiel apoptotique

En condition physiologique, il existe un mécanisme fondamental ancré dans chaque cellule qui provoque la mort cellulaire programmée de toute cellule dérivant vers un phénotype anormal ; il s'agit de l'apoptose. Ce phénomène est sous le contrôle de sentinelles postées à la membrane plasmique, comme le récepteur Fas et le récepteur du TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), ou dans le cytoplasme qui, en cas de détérioration irréversible de la cellule, déclenchent une cascade de mécanismes aboutissant à la mort de la cellule. Parmi ces anomalies, nous pouvons citer des dommages induits de l'ADN ne pouvant être réparés, un déséquilibre majeur dans la signalisation intracellulaire (notamment mitochondriale), des facteurs de survie insuffisants, l'hypoxie ou encore la perte de contact (*anoïkis*). Ainsi, les cellules tumorales sont capables d'échapper à ce mécanisme notamment par perte des régulateurs pro-apoptotiques (par exemple, la dérégulation du suppresseur de tumeur PTEN,

phosphatase and tensin homolog) ou gain de régulateurs anti-apoptotiques (oncogène Bcl2) (Hanahan et Weinberg 2000).

I.A.4. Les cellules tumorales disposent d'un potentiel de réplication illimité

Toute cellule possède intrinsèquement un programme limitant sa multiplication : à partir d'un certain nombre de doublement, les cellules entrent automatiquement en sénescence. Cette régulation est sous le contrôle des télomères, une séquence de plusieurs milliers de paires de bases située à l'extrémité des chromosomes. Cette séquence composée de multiples répétitions d'éléments de 6 paires de bases est, à la façon d'un compteur, raccourcie de 50 à 100 paires de bases à chaque réplication. Une enzyme, la télomérase, est capable de rétablir ces répétitions. Cette enzyme est surexprimée dans 85 à 90% des cellules cancéreuses, les exposant ainsi à des processus de réplication illimités.

I.A.5. Les cellules tumorales participent à l'angiogenèse

Comme nous l'avons vu, les cellules tumorales sont capables de proliférer de manière incontrôlée et anarchique. Avec l'augmentation du volume tumoral, les cellules sont donc rapidement confrontées à un problème d'approvisionnement en oxygène et nutriments. C'est pourquoi nombre de tumeurs acquièrent la capacité d'induire la formation de nouveaux vaisseaux, appelée néoangiogenèse. L'angiogenèse est nécessaire à des processus physiologiques comme le développement embryonnaire ou la cicatrisation, elle est étroitement régulée et dépend d'une balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. Les cellules tumorales sont capables de modifier la balance en favorisant la formation de nouveaux vaisseaux au niveau de la tumeur. Ce processus fondamental pour le développement de la tumeur est appelé le *switch* angiogénique. Différents mécanismes sont mis en place comme la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, *vascular endothelial growth factor* ; FGF, *fibroblast growth factor*) ou l'expression de protéases matricielles (MMPs, *matrix metalloproteinases*) capables de libérer des facteurs séquestrés dans la matrice extracellulaire (Shchors et Evan 2007). Inversement, la diminution d'expression de facteurs anti-angiogéniques comme la thrombospondine-1 (TSP) peut faire pencher la balance du côté de l'angiogenèse (Roberts *et al.* 2007). Cette néovascularisation tumorale va permettre son

expansion rapide aboutissant à la formation d'une tumeur macroscopique et faciliter le phénomène d'invasion et de formation de métastases.

I.A.6. Les cellules tumorales sont susceptibles d'envahir d'autres tissus

En effet, la dernière caractéristique des cellules tumorales réside dans leur capacité à envahir les tissus environnants et à développer des métastases colonisant ainsi d'autres zones du corps. Ce mécanisme assez complexe fait intervenir de nombreux facteurs. Les cellules doivent rompre les liaisons cellule-cellule afin de pouvoir échapper à la tumeur primaire. De plus, pour progresser au sein de la matrice extracellulaire, elles doivent sécréter un certain nombre de protéases matricielles, en majorité des MMPs, et diminuer l'impact des inhibiteurs associés (TIMPs, *tissue inhibitor of metalloproteases*). Cette sécrétion de protéases peut également être l'oeuvre des cellules stromales entourant la tumeur. Ces protéases participent activement aux processus d'intravasation et d'extravasation qui permettent aux cellules tumorales d'entrer dans la circulation sanguine, d'en sortir et de progresser dans le nouveau tissu pour y former une nouvelle colonie (Chambers et Matrisian 1997). C'est pourquoi de nombreux inhibiteurs de MMPs ont été mis au point et ont montré une diminution du nombre de métastases dans les mélanomes, les cancers mammaires et colorectaux.

I.B. LES ACTEURS DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

I.B.1. La matrice extracellulaire : caractéristiques et fonctions

L'ensemble des molécules constituant l'espace intercellulaire forme la matrice extracellulaire (MEC). Elle est synthétisée à la fois par les cellules épithéliales et les cellules stromales, comme les fibroblastes ou les ostéoblastes (Kim *et al.* 2011). Elle est constituée d'un assemblage complexe et dynamique de nombreux constituants qui sont regroupés en quatre grandes familles (Tabl. 1) :

	Principales caractéristiques	Exemple et fonction au sein de la MEC
Collagènes	Homo- ou hétérotrimères de chaîne α , formant une hélice grâce aux répétitions GXY (X : proline ; Y : hydroxyproline).	27 membres (I à XXVII). Résistance mécanique aux tissus.
Protéoglycanes	Chaîne protéique sur laquelle sont fixées une à plusieurs dizaines de chaînes de glycosaminoglycanes.	Décorine, versicane, aggécane, fibromoduline. Fixation d'eau : résistance aux variations de pression. Contrôle de la biodisponibilité de certains facteurs de croissance.
Elastine	Protéine très hydrophobe associée à des microfibrilles (fibrillines).	Elasticité aux tissus.
Glycoprotéines	Protéines sur lesquelles sont fixées de courtes chaînes glucidiques.	Fibronectine, laminine, thrombospondine, ténaïcine. Mise en place de nombreuses interactions avec les autres composants de la MEC : maintien de la cohésion tissulaire.

Tableau 1 : Les différents composants de la MEC.

La MEC est essentielle à l'organisation d'un tissu puisque, outre sa fonction principale de support structural nécessaire à l'organisation des tissus, elle constitue le lien entre les cellules, une plateforme d'échange ainsi qu'un réservoir pour de nombreuses molécules telles que les facteurs de croissance.

Les composants de la MEC sont très nombreux et permettent une multitude de combinaisons d'association différentes. Comme elle doit être adaptée à la fonctionnalité du tissu ou de l'organe, la répartition de ses constituants en sera spécifique. C'est pourquoi elle peut prendre des formes variables allant de la fibre au gel en passant par des formes plus ou moins lâches et élastiques. Ainsi les collagènes, une famille d'une trentaine de membres, ont pour fonction primaire de fournir un support structural à la matrice en lui apportant aussi une certaine rigidité notamment par sa capacité de liaison avec d'autres constituants de la matrice, comme d'autres collagènes, des protéoglycanes (perlécane) et des glycoprotéines (nidogène, ostéonectine). Ces multiples interactions permettent ainsi la formation d'un véritable réseau. Une autre protéine, l'élastine, fortement exprimée dans les tissus mammaires, pulmonaires et artériels, apporte quant à elle l'élasticité nécessaire au bon fonctionnement de ces tissus.

Enfin, une plus forte représentation de protéoglycanes (décorine, aggrecane) va favoriser un relâchement de la matrice, notamment grâce à leur capacité à retenir l'eau (Jacob 2006).

La capacité des constituants de la matrice à se lier entre eux ou à interagir avec des facteurs de croissance, des récepteurs ou molécules d'adhérence est régie par la présence de différents sites de liaison en leur sein. Par exemple, la séquence RGD va permettre l'interaction avec les intégrines. Cette séquence est retrouvée dans de nombreuses glycoprotéines comme la fibronectine, la thrombospondine ou encore les ténascines.

La MEC joue également un rôle crucial dans la signalisation associée aux récepteurs de surface. Par exemple, l'interaction du collagène de type I avec l'intégrine $\beta 1$ favorise la survie des fibroblastes *via* la voie de signalisation Akt (Nho *et al.* 2005). De plus, par sa capacité à lier des facteurs de croissance, la MEC constitue un véritable réservoir de ces facteurs qui une fois libérés vont pouvoir se fixer sur leur récepteur. C'est par exemple le cas du VEGF qui est séquestré au sein de la MEC par sa liaison à l'héparine et qui pourra ensuite être libéré grâce à l'action protéolytique de la plasmine (Ferrara 2010). De même la liaison préalable de certains de ces facteurs à des constituants de la matrice est nécessaire à leur interaction avec leur récepteur. Ainsi, le FGF, relativement instable dans la MEC sous sa forme libre, se lie à l'héparine. Cette association a un double effet, elle va pouvoir stabiliser le facteur de croissance et faciliter sa présentation à son récepteur pour potentialiser ses effets, notamment sur la croissance cellulaire (Ostrovsky *et al.* 2002).

Même si nous savons que la mise en place d'un phénotype tumoral est liée à de nombreux dysfonctionnements cellulaires agissant en cascade, il semble de plus en plus évident que la MEC joue un rôle majeur dans la mise en place de ces processus. En effet, toutes les altérations spécifiques des cellules cancéreuses peuvent se développer par le biais de dérégulations touchant les interactions cellule-matrice.

I.B.2. La protéolyse matricielle (MMPs, ADAMs, plasminogène)

Le maintien de l'intégrité de la MEC, nécessaire à l'homéostasie tissulaire, est assuré par un équilibre étroit entre synthèse et dégradation de l'ensemble de ses constituants. La protéolyse de la MEC fait intervenir de très nombreuses enzymes issues de familles variées ; les plus étudiées étant le système plasmine et les métalloprotéases. La protéolyse extracellulaire peut moduler les interactions cellule-cellule et cellule-matrice, influençant

ainsi la prolifération, la survie, la migration et la différenciation cellulaire. Ce processus intervient à la fois dans des phénomènes physiologiques comme la réponse inflammatoire ou la cicatrisation et dans les processus pathologiques comme la tumorigénèse. D'où la nécessité d'une régulation très fine de l'activité des différentes protéases qui sont associées à la MEC.

I.B.2.a. Les métalloprotéases matricielles (MMPs)

Les MMPs, aussi appelées matrixines, regroupent 24 membres classés en différentes familles suivant leur spécificité de substrat. Ainsi, nous pouvons citer les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrylsines, les membranes-type protéases (MT-MMPs, liées à la membrane plasmique) et un sous groupe regroupant celles n'ayant pu trouver leur place dans les catégories précédentes (Tabl. 2) (Bourboulia et Stetler-Stevenson 2010).

Famille de MMP	Membres
Collagénase	MMP1, MMP8, MMP13, MMP18
Gélatinases	MMP2, MMP9
Stromélysines	MMP3, MMP10, MMP11
Matrylsines	MMP7, MMP26
Membrane-type MMP	Transmembranaires : MT1-MMP (MMP14), MT2-MMP (MMP15), MT3-MMP (MMP16), MT5-MMP (MMP24)
	GPI-ancrées : MT4-MMP (MMP17), MT5-MMP (MMP25)
Autres	MMP12, MMP19, MMP20, MMP21, MMP23, MMP27, MMP28.

Tableau 2 : Les différentes familles de MMPs.

I.B.2.a.1. La structure des MMPs

Les MMPs présentent une structure modulaire (Fig. 2) dont la forme minimale est constituée de 3 modules :

- une séquence signal amino-terminale permettant l'adressage au réticulum endoplasmique,
- un propeptide contenant la séquence PRCGXPD et dont le groupement thiol de la cystéine est nécessaire à l'interaction avec le Zinc du site catalytique maintenant ainsi la protéase sous sa forme zymogène ou inactive,
- le site catalytique de l'enzyme renfermant la séquence HEXGHXXGXXH qui permet le maintien d'une molécule de Zinc en son sein (Egeblad et Werb 2002).

A cette structure minimale peuvent se greffer un ou plusieurs modules supplémentaires parmi lesquels nous pouvons citer le domaine hémopexine (Piccard *et al.* 2007). Ce domaine joue aussi bien un rôle dans l'activation des MMPs, notamment dans l'activation de la MMP13 par des protéases associées à la membrane comme la MT1-MMP que dans leur inhibition en permettant l'interaction avec leurs inhibiteurs. Le domaine hémopexine influence également la multimérisation des MMPs, la liaison et le clivage de substrats, l'attachement de certaines MMPs à la membrane ou encore leur endocytose. Pour ce dernier mécanisme, il a précédemment été décrit que l'endocytose de la MT1-MMP était régulée par l'association de son domaine hémopexine avec la tétraspanine (CD63) (Takino *et al.* 2003), la protéase étant par la suite soit recyclée au front de migration, soit dégradée.

D'autres modules existent comme des séquences semblables aux répétitions de type II de la fibronectine liant le collagène, le domaine de reconnaissance par la furine, un domaine transmembranaire ou un domaine d'ancrage par le glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui permettent le maintien des MT-MMPs à la membrane plasmique des cellules.

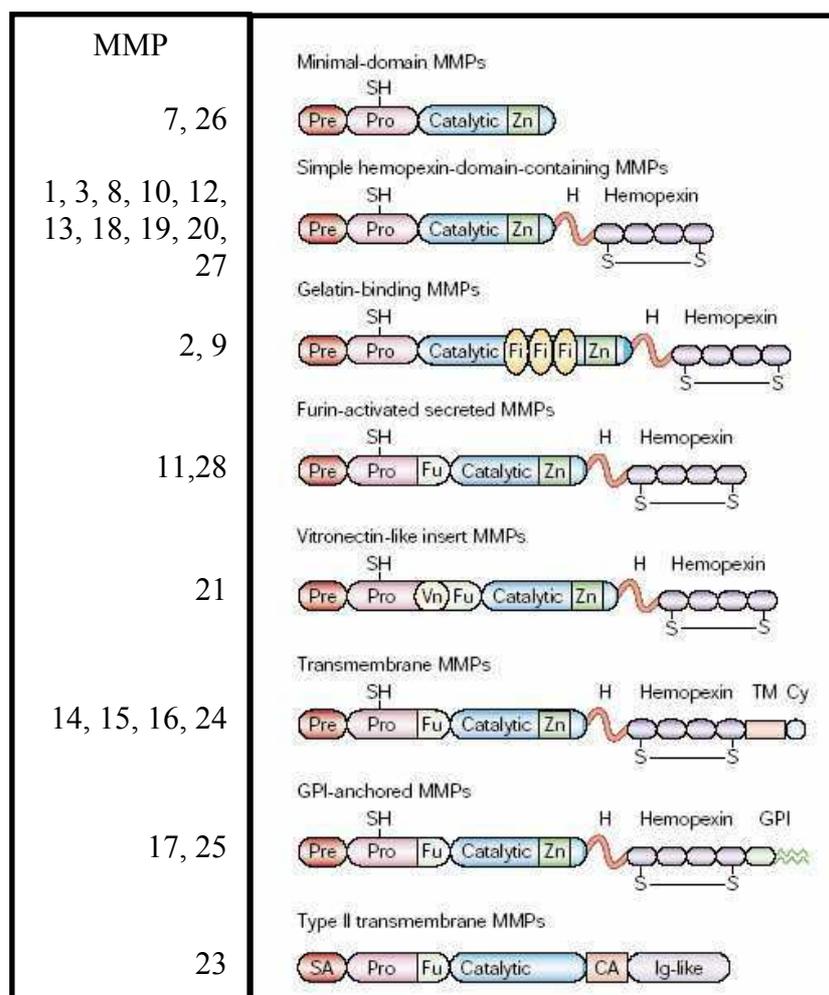


Figure 2 : La structure protéique des MMPs. (Egeblad et al. 2002, Visse et al. 2003)

Les MMPs sont des protéines modulaires pouvant contenir une séquence signal (**Pre**), un propeptide (**Pro**), un domaine catalytique avec un site de liaison du zinc (**Zn**), un domaine hémopexine relié au domaine catalytique par une charnière (**H**), les premières et quatrièmes répétitions du domaine hémopexine étant liées par un pont dissulfure (**S-S**), un domaine de liaison au collagène similaire aux répétitions de type II de la fibronectine (**Fi**), un site de reconnaissance à la furine (**Fu**), un site ressemblant à la vitronectine (**Vn**), un domaine transmembranaire (**TM**), une queue cytoplasmique (**Cy**), un ancrage de type GPI (**GPI**), un signal d'ancrage à la membrane N-terminal (**SA**), une région cystéine (**CA**) et un domaine de type immunoglobuline (**Ig-like**).

I.B.2.a.2. La régulation des MMPs

Les MMPs sont étroitement régulées et ce à plusieurs niveaux. Même si elles peuvent être régulées au niveau transcriptionnel, le principal mode de régulation concerne l'activation de la forme zymogène (proMMP) en forme active. Ce mécanisme nécessite la protéolyse du prodomaine de l'enzyme qui se dissocie ainsi du domaine catalytique. Ce processus implique

différentes protéases comme la plasmine ou d'autres MMPs. Il a par exemple été démontré que la proMMP2 interagissait avec son inhibiteur spécifique, le TIMP2, et que ce complexe moléculaire pouvait se fixer au niveau membranaire à la MT1-MMP. Une autre MT1-MMP située à proximité, peut alors cliver le prodomaine de la MMP2 conduisant ainsi à son activation (Piccard *et al.* 2007).

De plus, les MMPs possèdent des inhibiteurs naturels, les TIMPs qui sont au nombre de quatre (TIMP1 à 4). Ces petites glycoprotéines d'environ 21 kDa sont capables d'interagir avec le domaine hémapexine des MMPs via leur domaine C-terminal, leur partie N-terminale possédant diverses fonctions biologiques agissant entre autre sur la prolifération cellulaire et l'apoptose (Cruz-Munoz et Khokha 2008). Toutefois, la fonction des TIMPs, notamment dans les processus pathologiques, reste assez controversée puisque ces inhibiteurs sont impliqués à la fois dans l'activation et l'inhibition des MMPs (Baker *et al.* 2002). Enfin, le dernier mécanisme moléculaire intervenant dans le contrôle des MMPs est l'endocytose qui aboutit au catabolisme intracellulaire de ces enzymes. Ce mécanisme faisant intervenir le récepteur d'endocytose LRP1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein-1*) sera évoqué dans un prochain chapitre (*Cf. II.D.*).

I.B.2.a.3. Les fonctions associées aux MMPs

Comme il a été précisé précédemment, les MMPs sont nécessaires pour bon nombre de processus physiologiques (embryogenèse, cicatrisation, etc). Au niveau pathologique, et plus particulièrement en ce qui concerne les processus de cancérisation, il a été de nombreuses fois démontré qu'une forte activité des MMPs était corrélée avec un mauvais diagnostic pour les patients (Rydova *et al.* 2008). En effet, les MMPs peuvent influencer tous les processus caractérisants une cellule tumorale (Egeblad et Werb 2002) (Fig. 3). Tout d'abord, les MMPs peuvent agir sur la croissance cellulaire par différents mécanismes : en libérant des facteurs de croissance séquestrés dans la matrice (IGF, TGF- α) et/ou en modifiant la nature de la matrice, perturbant ainsi les signaux transmis entre autre par les intégrines. Les MMPs agissent également de manière positive et/ou négative sur l'apoptose notamment en modulant la libération de facteurs pro- ou anti-apoptotiques (Fas Ligand, HB-EGF, *heparin-binding EGF*) ou par clivage de protéines membranaires comme le Fas ligand ou les VE-cadhérines (*vascular endothelial cadherin*). L'angiogenèse est aussi modulée par les MMPs puisque,

outre leur rôle dans la dégradation de la matrice facilitant la migration des cellules endothéliales, elles peuvent également libérer des facteurs pro- ou anti-angiogéniques contenus dans la matrice extracellulaire comme le facteur de croissance VEGF (pro-angiogénique) ou encore des fragments obtenus après clivage de composants de la MEC comme l'angiostatine ou les peptides d'élastine (respectivement anti- et pro-angiogéniques). Enfin, les MMPs jouent un rôle prépondérant dans l'invasion tissulaire et le développement de métastases par dégradation des composants de la MEC. Ainsi, ces enzymes facilitent la migration des cellules tumorales et leur permettent de se détacher du groupe cellulaire d'origine. Le clivage protéolytique MMP dépendant de la E-cadhérine, une protéine intervenant dans la liaison cellule-cellule, en est le parfait exemple. De plus, il a été décrit que durant l'invasion tumorale, certaines MMPs (MMP2, 9, 14) étaient spécifiquement localisées à la surface cellulaire au niveau des protusions membranaires, aussi appelées invadopodia (Motoharu 2003).

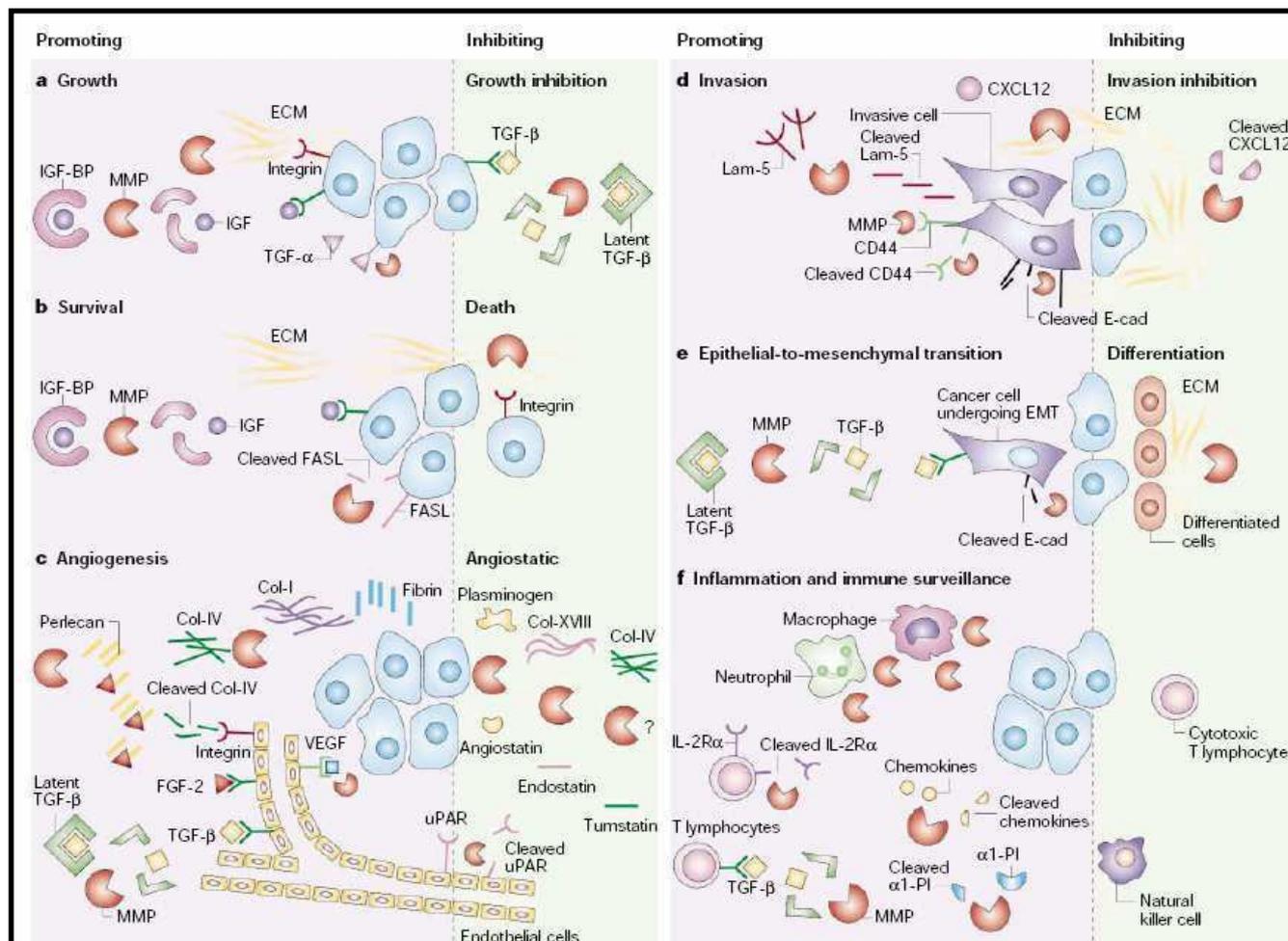


Figure 3 : Dualité de la fonction des MMPs dans la progression tumorale. (Egeblad et al. 2002)

a | Les MMPs favorisent la croissance des cellules tumorales en libérant l'IGF, en clivant les précurseurs membranaires de facteurs de croissance (TGF- α) et en régulant la MEC, modifiant ainsi les interactions MEC-intégrines. Les MMPs peuvent inhiber la croissance des cellules tumorales en libérant le TGF- β . **b** | Les MMPs favorisent la survie des cellules cancéreuses en libérant l'IGF et en clivant le Fas ligand (FASL), un ligand du récepteur de mort Fas. Elles permettent aussi indirectement l'apoptose en changeant la composition de la MEC. **c** | Les MMPs encouragent l'angiogenèse en augmentant la biodisponibilité du VEGF, du FGF-2, et du TGF- β , des facteurs stimulant la prolifération et la migration des cellules endothéliales. De plus, les MMPs améliorent l'invasion des cellules endothéliales en clivant les composants de la MEC (collagène-I, -IV et fibrine). Les MMPs jouent un rôle anti-angiogénique à travers le clivage du plasminogène et du collagène-XVIII, d'où résultent l'angiostatine et l'endostatine. Elles participeraient aussi à la génération de la tumstatine. Le clivage de l'uPAR des cellules endothéliales inhiberait l'angiogenèse. **d** | Les MMPs régulent l'invasion en dégradant les composants de la MEC (laminine 5), mais aussi en clivant des molécules d'adhérence (CD44 et E-cadherine). Elles inhiberaient toutefois l'invasion en clivant des chémokines (CXCL12) pro-invasives. **e** | Les MMPs favorisent la TEM en clivant l'E-cadhérine et en libérant le TGF- β . Elles participent aussi à la différenciation probablement en modifiant la composition de la MEC. **f** | Les cellules inflammatoires fournissent certaines MMPs impliquées dans la progression tumorale, mais elles peuvent aussi inhiber la réaction immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuses. Elles clivent le récepteur de l'interleukine-2 des lymphocytes T, inhibant aussi leur prolifération. Elles clivent l'inhibiteur de la protéase α 1, provoquant une diminution de la sensibilité des cellules tumorales aux cellules tueuses. Enfin elles dégradent de nombreuses chémokines résultant en une diminution de l'attraction des leucocytes.

I.B.2.b. Les disintegrin metalloprotéases : ADAMs

Les ADAMs ou *A Disintegrin And Metalloproteinases*, forment la famille des reprotéases, elles appartiennent à la même super-famille que les MMPs (les métzincines) et partagent donc avec elles la particularité d'avoir un ion Zinc en leur site catalytique. Aux 25 ADAMs exprimées chez l'Homme, nous pouvons associer 19 ADAMTSs qui possèdent en plus un domaine thrombospondine et sont sécrétées dans la MEC (Paulissen *et al.* 2009; Apte 2009). Nombre de ces protéases ont été décrites comme modulant l'activité des cytokines et de facteurs de croissance ainsi que leur récepteur mais également des molécules d'adhérence. Les ADAMs sont aussi bien impliquées dans des processus physiologiques comme la fertilisation ou le développement, qu'associées à des pathologies comme l'inflammation, le cancer ou encore la maladie d'Alzheimer. Plus d'une vingtaine d'ADAMs ont été décrites mais seules 13 d'entre elles ont conservé un domaine catalytique fonctionnel (Murphy 2008).

I.B.2.b.1. La structure des ADAMs

Les ADAMs sont également des protéines modulaires comportant un propeptide permettant l'initiation du repliement de la protéine, suivi du domaine catalytique. Viennent ensuite trois types de domaines : le domaine disintegrine, une région riche en ponts disulfures et souvent un domaine de répétition EGF-like. Enfin, les ADAMs possèdent un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (Fig. 4). Des études utilisant des chimères de ces différents domaines, tendent à montrer que les régions extracellulaires non catalytiques confèrent la spécificité de substrat aux protéases (Murphy 2008).

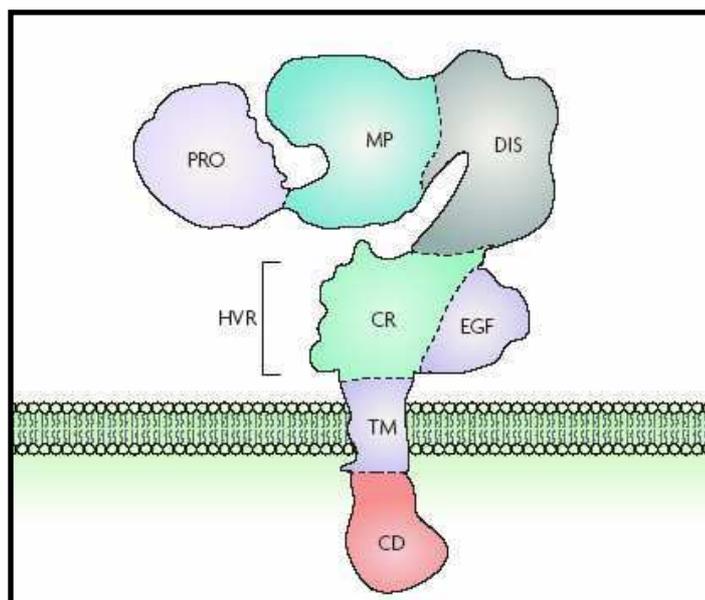


Figure 4 : La structure protéique des ADAMs. (Murphy 2008)

La structure protéique des ADAMs est définie par un large propeptide amino-terminal (**PRO**) ayant un rôle dans le repliement protéique et dans le maintien inactif du domaine catalytique durant le trafic intracellulaire, un domaine catalytique de type métalloprotéase (**MP**), un domaine disintégrine (**DIS**), une région riche en cystéine (**CR**) contenant souvent des répétitions de type EGF (**EGF**). Il s'avère que les régions CR et EGF puissent former une région hypervariable (**HVR**) importante dans l'interaction avec d'autres molécules et notamment des ligands. Ces domaines constituent l'ectodomaine des ADAMs et est complété par un domaine transmembranaire (**TM**) et une queue cytoplasmique (**CD**).

I.B.2.b.2. La régulation des ADAMs

Les ADAMs possèdent différents niveaux de régulation. Tout d'abord, une régulation transcriptionnelle. En effet dans divers processus pathologiques, une surexpression génique et protéique de certaines ADAMs a pu être observé. Par exemple, dans le neuroblastome, l'IL-1 β (interleukine-1 β) augmente l'expression de l'ARNm de l'ADAM17. Les ADAMs sont également régulées au niveau post-traductionnel puisqu'elles possèdent un prodomaine qui une fois clivé remplit le double rôle de protéine chaperonne et d'inhibiteur dans la voie de maturation et d'excrétion. Un autre critère de régulation majeur semble être la localisation membranaire des ADAMs. Ainsi, la forme mature de l'ADAM17 a été décrite dans de nombreuses lignées cellulaires comme étant préférentiellement présente dans les radeaux lipidiques. La déplétion en cholestérol, éliminant ces microdomaines membranaires, modifie la répartition membranaire des protéases et augmente le clivage des substrats des ADAMs.

Des preuves s'accumulent également pour montrer que les ADAMs sont capables de moduler et d'être modulées par différentes voies de signalisation (Murphy 2009). En effet, le domaine cytoplasmique des ADAMs possède de potentiels domaines SH3 (*proline-rich Src homology 3*) ainsi que des domaines de phosphorylation sur tyrosine et sérine/théonine. Les ADAMs sont aussi régulées par des protéines modulatrices permettant de rapprocher les ADAMs de leur substrat. Il a par exemple été décrit que la liaison de la tétraspanine à l'HB-EGF était essentielle à la transactivation de l'EGF par l'ADAM10 (Yan *et al.* 2002). Enfin, les ADAMs partagent avec les MMPs des inhibiteurs endogènes, les TIMPs, chaque TIMP ayant une spécificité pour un certain nombre d'ADAMs (Tabl. 3).

TIMP1	ADAM10
TIMP2	ADAMs 12 et 33
TIMP3	ADAMs 10, 12, 17, 28 et 33
TIMP4	ADAMs 28 et 33

Tableau 3 : Spécificité des TIMPs vis-à-vis des ADAMs.

I.B.2.b.3. Les fonctions associées aux ADAMs

Les ADAMs sont principalement décrites pour leur capacité à agir comme une *shedase*. Cette activité protéolytique consiste à cliver l'ectodomaine de protéines transmembranaires libérant ainsi ce domaine dans le milieu extracellulaire. Dans le cas des ADAMs, les principales cibles sont les cytokines, les chemokines et facteurs de croissance (TNF α , CX₃CL₁, EGF) produits sous une forme liée à la membrane et nécessitant un clivage pour être libérés et actifs. Ceci implique les ADAMs dans la régulation autocrine et paracrine de certains mécanismes cellulaires. Les récepteurs de ces molécules comme ErbB-1 (ou HER 1, pour *EGF Receptor B*), ainsi que certains récepteurs d'adhérence, comme CD44 ou certaines cadhérines, sont également touchés. De plus, en clivant l'ectodomaine de certains récepteurs, les ADAMs peuvent initier le phénomène de *RIPping* (*Regulated intramembrane Proteolysis*) qui consiste, après libération de l'ectodomaine par une *shedase*, au clivage du domaine intracellulaire de cette même protéine par une γ -sécrétase. Le domaine

cytoplasmique ainsi libéré peut alors être transloqué dans le compartiment nucléaire de la cellule et agir comme un modulateur transcriptionnel (Murphy 2008).

I.B.2.c. *La cascade du plasminogène*

Un autre composant prépondérant de la protéolyse matricielle est la cascade du plasminogène. Cette cascade fait intervenir différents acteurs comme les activateurs du plasminogène, leurs inhibiteurs et leur récepteur et aboutit à la conversion du plasminogène en plasmine, une sérine protéase. La plasmine joue un rôle important puisqu'elle peut cliver des protéines matricielles, activer des protéases et libérer des facteurs de croissance séquestrés dans la matrice. Ainsi elle intervient à la fois dans des phénomènes physiologiques comme la cicatrisation et dans des phénomènes pathologiques comme le cancer (Myöhänen et Vaheri 2004).

Tout d'abord, le plasminogène, synthétisé principalement par le foie, est retrouvé sous forme inactive dans la circulation sanguine. Cette glycoprotéine de 92 kDa est clivée par les activateurs du plasminogène. Les deux chaînes qui résultent de ce clivage sont liées par un pont disulfure et l'activité sérine protéase est localisée dans la partie C-terminale. Cette forme biologiquement active constitue la plasmine.

Deux activateurs du plasminogène existent : le *tissue Plasminogen Activator* (tPA) et l'*urokinase Plasminogen Activator* (uPA). Si l'expression du tPA est plutôt spécifique des cellules endothéliales, des kératinocytes, des mélanocytes et des neurones, celle de l'uPA est plus ubiquitaire. D'une manière globale, ces deux protéines sont très souvent surexprimées dans différents types de cancer. Le tPA et l'uPA sont des glycoprotéines respectivement de 70 et 53 kDa, synthétisées sur la forme d'une seule chaîne qui sera clivée par différentes protéases pour former deux chaînes liées par un pont disulfure.

Concrètement, les activateurs du plasminogène vont être activés protéolytiquement et vont à leur tour cliver le plasminogène en enzyme active, la plasmine (Fig. 5). Comme toutes les voies de protéolyse, la voie du plasminogène est extrêmement et finement régulée. Deux inhibiteurs naturels existent, PAI-1 et -2 (*Plasminogen Activator Inhibitor*) ; ces glycoprotéines appartenant à la famille des serpins et peuvent se fixer sur les formes actives et inactives des activateurs du plasminogène. Un autre système de régulation concerne l'endocytose des activateurs du plasminogène. Cette voie fait intervenir le récepteur à l'uPA

(uPAR) une glycoprotéine GPI-ancrée de 55 kDa, ainsi que le récepteur LRP1. L'uPA lié à son inhibiteur PAI-1 vient se fixer sur l'uPAR ; ce complexe tripartite peut interagir avec LRP1 et subir une endocytose. LRP1 et uPAR seront recyclés à la membrane plasmique et le complexe uPA/PAI-1 sera dégradé *via* la voie lysosomale. L'endocytose de tPA associé à son inhibiteur PAI-1 se déroule de manière identique dans les cellules hépatiques (Nykjaer *et al.* 1992).

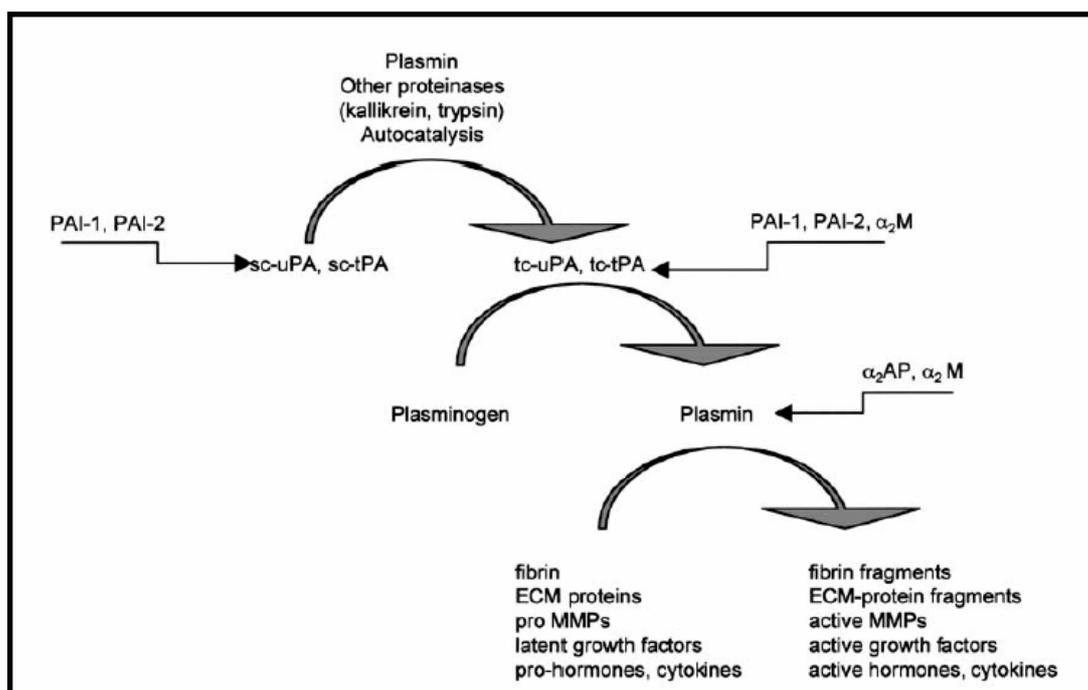


Figure 5 : La cascade protéolytique du plasminogène. (Myöhänen et Vaheri 2004)

I.C. LE MÉCANISME DE LA MIGRATION

La migration des cellules est un processus essentiel tout au long de la vie, de l'embryogenèse à la réponse immune en passant par la cicatrisation. Ce mécanisme étroitement régulé peut toutefois être altéré et aboutir ou contribuer à des pathologies telles que des maladies inflammatoires chroniques ou la dissémination des cellules tumorales conduisant à la formation de métastases ; d'où l'intérêt toujours aussi important des scientifiques pour la compréhension de ce mécanisme complexe (Horwitz et Webb 2003).

I.C.1. Les étapes de la migration

La migration des cellules est initiée par des stimuli externes qui conduisent à la polarisation de la cellule. Celle-ci va former des protrusions, appelées pseudopodes, lamellipodes, filopodes ou encore invadopodes, dans la direction de son déplacement. La formation de ces protrusions se fait sous l'action de la polymérisation de l'actine et de son assemblage en filaments. Au front de migration, les pseudopodes vont "sonder" la MEC et initier la liaison de molécules d'adhérence avec le substrat ; ce processus implique principalement les intégrines ainsi que d'autres récepteurs d'adhérence tel que CD44. La liaison des intégrines avec leur substrat va induire leur couplage avec le cytosquelette d'actine ainsi que leur regroupement en structures qui correspondent à des plaques d'adhérence focales. De plus la concentration des intégrines et récepteurs d'adhérence au front de migration va conduire au recrutement de protéases matricielles telles que la MT1-MMP ou la MMP2. Ce phénomène va permettre une dégradation de la matrice au front de migration facilitant ainsi le passage des cellules (Friedl et Wolf 2003) (Fig. 6).

Au niveau intracellulaire, la polymérisation de l'actine aboutit à la formation de fibres de stress qui grâce à divers intermédiaires protéiques, comme la myosineII, vont permettre la contraction du corps cellulaire nécessaire à son déplacement. L'assemblage et la contraction des fibres de stress sont dirigés par certaines voies de signalisation intracellulaires impliquant de petites protéines G telles que RhoA, Rac1 et cdc42 (*cell division control protein 42*) (Huveneers et Danen 2009). A l'arrière de la cellule, la rupture des adhérences est requise pour la migration. En effet, une augmentation de la force d'adhérence ou une diminution du détachement limite/empêche une migration optimale des cellules. C'est pourquoi la vitesse de migration est en partie définie par la cinétique d'adhérence et de détachement de la cellule à la MEC.

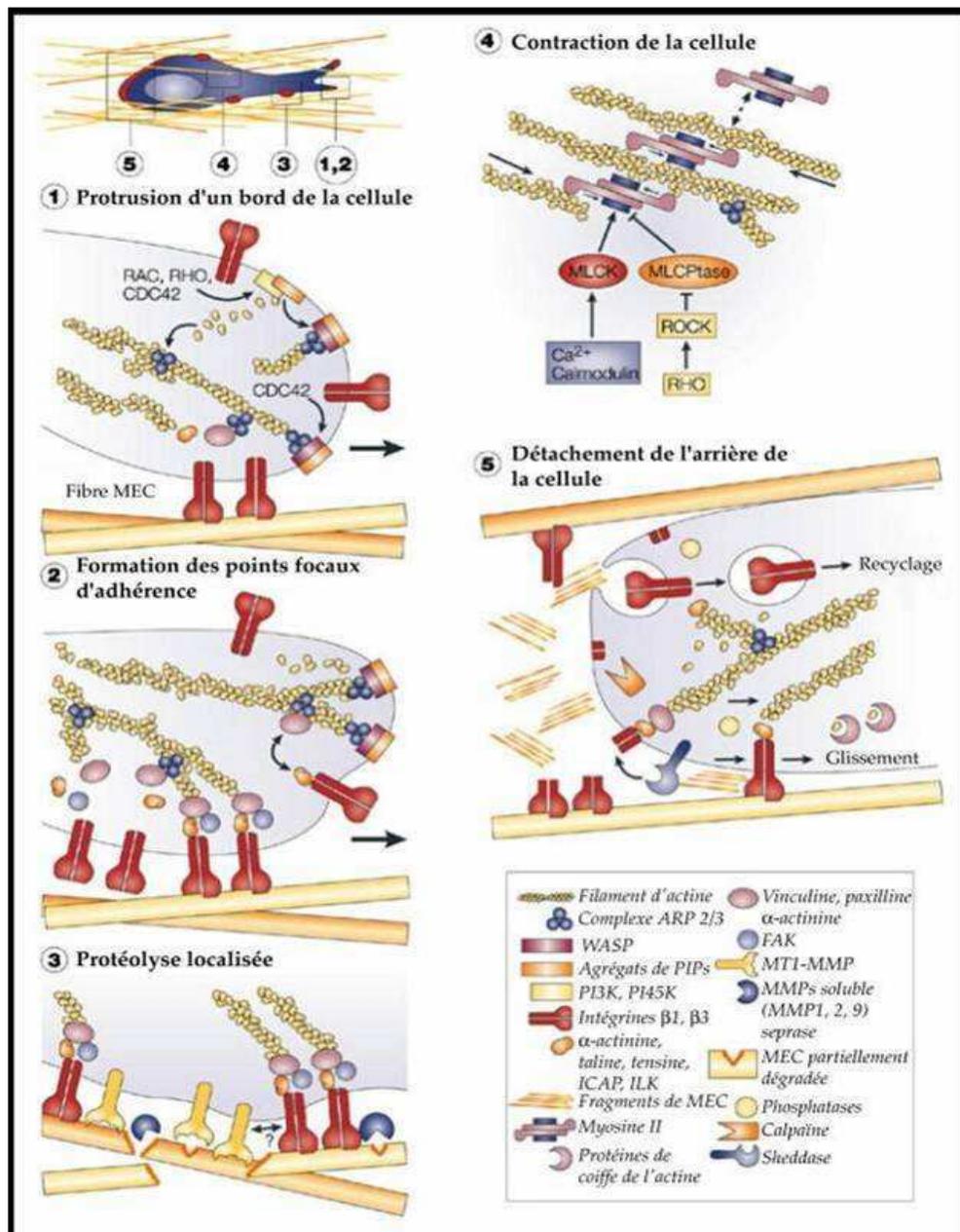


Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes de la migration. (Friedl et Wolf 2003)

1: Formation de protusions au front de migration. Les filaments d'actine en croissance se connectent à des protéines adaptatrices et poussent la membrane vers l'extérieur de la cellule. Les Phosphoinositides (PIPs) lient et activent les *guanine-nucleotide exchange factors* (GEFs) qui régulent l'activité des petites GTPases (RAC, CDC42 et Rho). **2:** Interaction cellule-matrice et formation de contacts focaux. Les intégrines viennent au contact de la MEC et se regroupent à la surface des cellules. Elles recrutent ensuite des protéines adaptatrices et de signalisation induisant ainsi l'émission de signaux dans la cellule. Elles interagissent directement avec l' α -actinine, la taline et la *focal adhesion kinase* (FAK). Ces protéines peuvent recruter des protéines adaptatrices liant l'actine (vinculine, paxilline) aussi bien que des molécules régulatrices (PI3K et GTPases de la famille Rho). **3:** Recrutement de protéases à la surface des cellules et protéolyse focalisée. Les protéases deviennent concentrées à proximité des sites de liaison au substrat et clivent les composants de la MEC (collagène, fibronectine et laminines) et des proMMPs pour les activer (MMP2). **4:** Contraction des cellules par l'actomyosine. La myosineII lie les filaments d'actine (ensuite appelés actomyosine) et génère leur contraction. Les Ca^{2+} - et *calmodulin-dependent myosin light-chain kinases* (MLCK) phosphorylent le MLC, qui active la myosineII. Rho régule la contraction de l'actomyosine principalement par ROCK. **5:** Détachement de la queue de rétractation. Le désassemblage des contacts focaux a lieu à travers différents mécanismes. La gelsoline et la cofiline capent les filaments d'actine et causent leur rupture. Les calpaïnes clivent les composants des contacts focaux (taline). Ceux-ci sont affaiblis par le clivage protéolytique des récepteurs d'adhérence par les *shedases*. Après le désassemblage des contacts focaux, les intégrines se détachent de leur substrat et sont internalisées pour être recyclées au front de migration.

1.C.2. Les différents modes migratoires et leurs transitions

Différents modes migratoires existent, la migration mésenchymateuse et amiboïde. La première correspond au mode migratoire décrit ci-dessus, il est sous l'influence étroite des intégrines, des protéases (MMPs, uPA) et de la signalisation transduite par les GTPases (guanosine triphosphate hydrolases) de type Rho et MLCK (*Myosin-Light Chain Kinase*). La seconde se caractérise par une extraordinaire déformabilité des cellules qui vont se "faufiler" dans le maillage constitué par la MEC. Ce type de migration est indépendant des intégrines et des protéases matricielles, ce qui en fait une échappatoire à certains traitements anti-cancéreux (Friedl et Wolf 2003).

Il est également important de noter que les cellules peuvent migrer seules, indépendamment des autres, en chaîne, ce qui est par exemple le cas des cellules endothéliales lors de la formation de nouveaux vaisseaux, ou encore en groupe. Dans ce dernier cas, les cellules d'un même amas migrant peuvent présenter des caractéristiques différentes, celles situées au front de migration générant l'élan migratoire par leurs pseudopodes ou lamellipodes, les autres montrant un comportement plus passif.

Au cours de leur existence, les cellules peuvent subir des transitions dans leur phénotype migratoire (Fig. 7). Ainsi sont reconnues la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et la transition mésenchymal-amiboïde (TMA). La TEM se caractérise par la perte de polarité cellulaire, la déstabilisation des jonctions cellule-cellule, le remodelage des composants du cytosquelette, l'apparition d'une motilité cellulaire et la suppression de l'apoptose. Cette transition peut être déclenchée entre autre par des récepteurs aux facteurs de croissance (EGF, FGF, PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*) et les intégrines et font intervenir différentes voies de signalisation comme la voie Akt ou celles dépendantes des Rho-GTPases (Savagner 2010). Dans la TMA, on peut remarquer des modifications de la morphologie cellulaire, des altérations dans la distribution des intégrines et dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Cette transition peut être déclenchée par l'inhibition de l'activité des protéases matricielles, l'affaiblissement des liaisons avec la MEC et l'inhibition de la voie Rho. Ce mode de transition est particulièrement redouté dans la lutte contre le cancer puisqu'il constitue un mode potentiel de résistance aux médicaments et d'échappement aux traitements chimiothérapeutiques (Friedl et Wolf 2003).

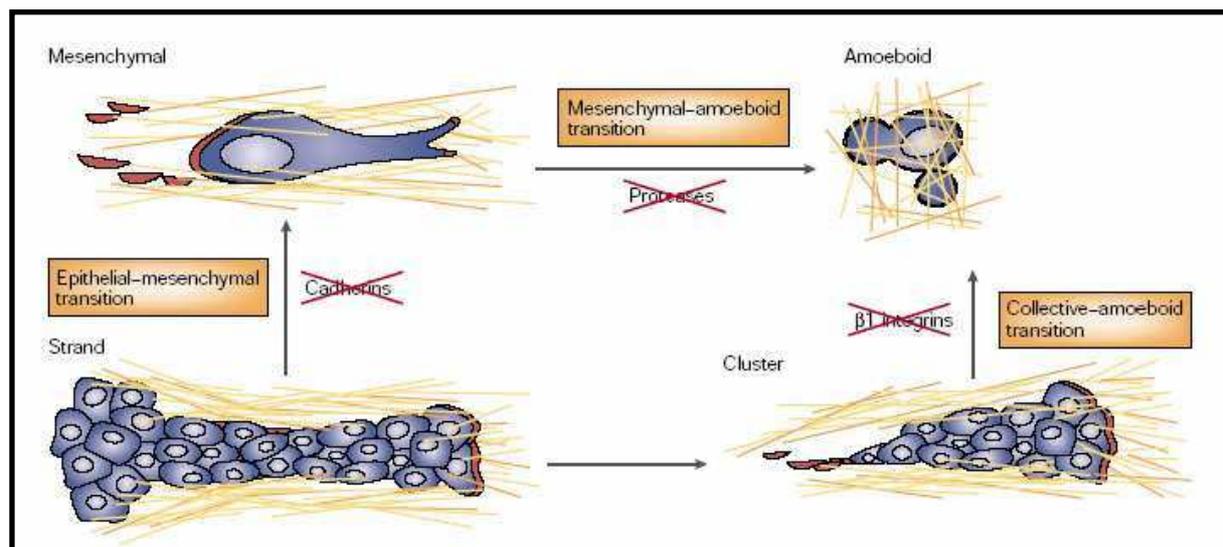


Figure 7 : Les différents modes de migration et leurs transitions. (Friedl et Wolf 2003)

Dans la tumeur, les cellules individualisées, qui ont perdu leurs interactions cellule-cellule parfois due à l'inhibition de la fonction des cadhérines, peuvent se détacher et utiliser les protéases et les intégrines pour développer une TEM. Quand les protéases comme les MMPs ou les sérine protéases sont bloquées dans les cellules subissant la migration mésenchymateuse, celles-ci peuvent s'adapter en employant la TMA. Cette migration amoiboïde de cellules isolées peut aussi résulter de dérèglements dans la fonction de l'intégrine $\beta 1$. Toutes ces transitions peuvent être induites par des traitements initialement destinés à inhiber la migration des cellules cancéreuses (antagonistes de récepteurs d'adhérence, inhibiteurs de protéases); mais elles peuvent également avoir lieu spontanément durant la progression tumorale.

I.C.3. Les récepteurs d'adhérence

I.C.3.a. Les intégrines

Les intégrines constituent une superfamille de récepteurs d'adhérence qui lient les molécules de la MEC, des ligands situés à la surface des cellules ou encore des molécules solubles (Barczyk *et al.* 2010). Ce sont des hétérodimères transmembranaires formés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . A l'heure actuelle, chez l'humain, on ne dénombre pas moins de 18 sous-unités α et 8 β capables de former 24 hétérodimères différents. La répartition de ces hétérodimères varie selon les types cellulaires et leur affinité dépend des sous-unités qui les composent (Fig. 8). Si la spécificité de substrat est davantage dirigée par la sous-unité α , la sous-unité β contrôle quant à elle la connexion avec le cytosquelette et la

signalisation associée. La reconnaissance des ligands est permise par des séquences consensus.

Trois d'entre elles sont connues :

- La séquence RGD présente par exemple sur la fibronectine, la vitronectine et le fibrinogène,
- la séquence GFOGER, portée majoritairement par les collagènes,
- la séquence LDV permettant la reconnaissance des ICAM (*Intracellular Cell Adhesion Molecule*) et VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*).

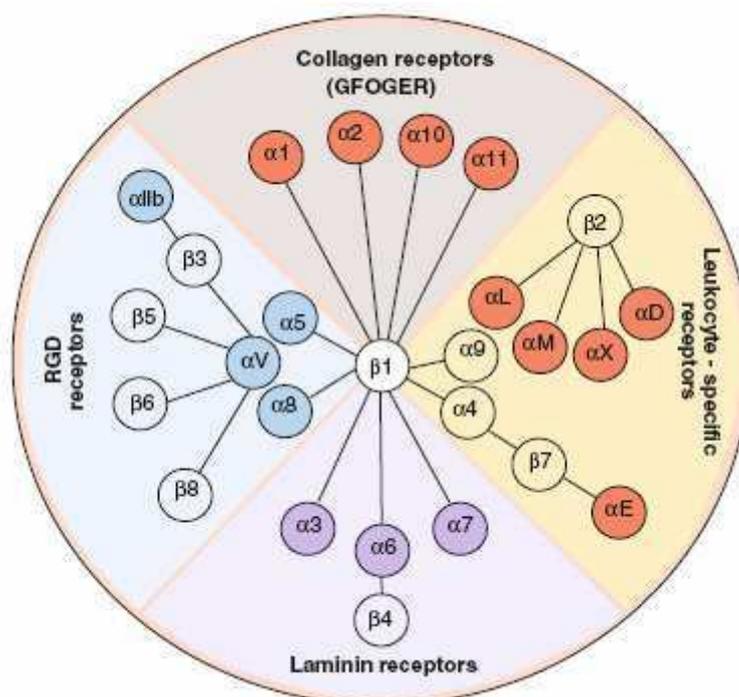


Figure 8 : Les différentes familles d'intégrines. (Barczyk et al. 2010)

Les intégrines sont constituées d'hétérodimères composés d'une unité α et d'une unité β . Ces hétérodimères peuvent être classés en 4 familles suivant le type de ligand reconnu : les récepteurs au collagène, ceux spécifiques de la séquence RGD, des laminines ou encore les récepteurs spécifiques des leucocytes.

Toutefois, pour être fonctionnels, les dimères d'intégrines doivent être activés sans quoi leur affinité pour leur ligand reste très faible (Takada *et al.* 2007). Cette activation a lieu au niveau intracellulaire et constitue la signalisation *inside-out* des intégrines. Lorsqu'elles sont inactives, le domaine extracellulaire des intégrines est replié sur lui-même et le domaine de liaison aux ligands n'est pas accessible. L'intégrine peut être activée par phosphorylation par un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) ou encore par son association avec la taline

(Ginsberg *et al.* 2005). Ces modifications vont provoquer des changements conformationnels des intégrines aboutissant à leur dépliement, à la découverte de leur site de liaison et ainsi à leur activation.

Le rôle fondamental des intégrines est de réaliser un lien moléculaire entre le substrat et le cytosquelette d'actine (Fig. 9). Ces interactions induiront à la fois leur regroupement et leur concentration à la membrane plasmique mais également le recrutement de nombreuses protéines adaptatrices (comme la paxilline, la taline ou encore l' α -actinine), de molécules de signalisation comme la FAK (*Focal Adhesion Kinase*), Src ou encore de petites protéines G telles que Ras et Rho. Les signaux intracellulaires induits par les intégrines constituent la signalisation *outside-in*.

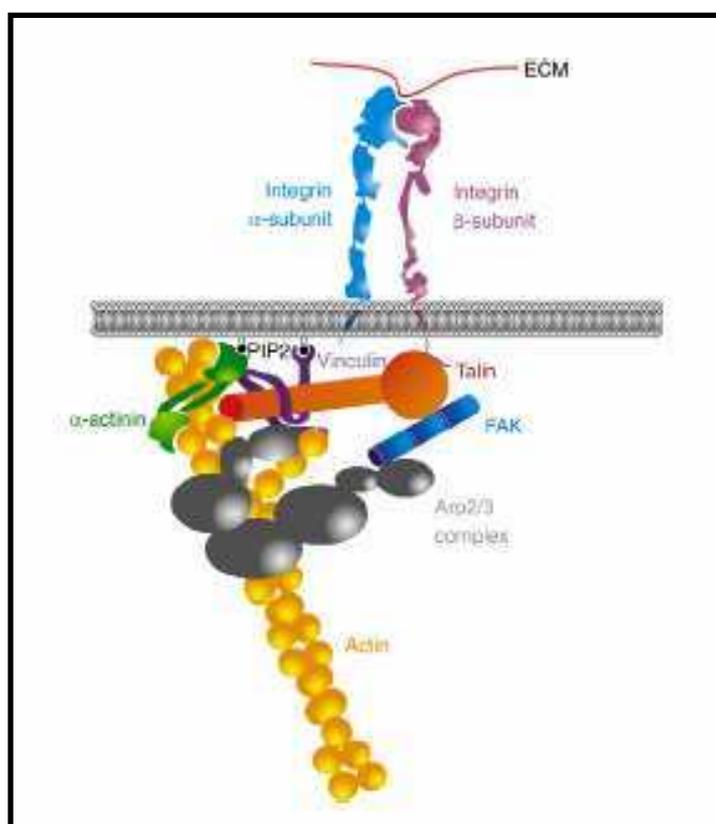


Figure 9 : Le lien entre les intégrines et le cytosquelette d'actine. (Vicente *et al.* 2009)

Les intégrines peuvent se lier directement à la taline. Celle-ci peut directement se fixer au cytosquelette d'actine ou à d'autres composants comme la vinculine. La vinculine peut également se lier à l'actine aussi bien qu'à l' α -actinine. Ces deux protéines sont ancrées à la membrane plasmique et leur activité est modulée par des interactions avec le phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP2). Enfin, la vinculine et FAK peuvent se fixer au nucléateur d'actine, Arp2/3.

I.C.3.b. CD44

I.C.3.b.1. Structure d'une glycoprotéine possédant de multiples variants

CD44 est le principal récepteur de l'acide hyaluronique (AH). Cette glycoprotéine transmembranaire de type I est exprimée par un seul gène mais présente de nombreuses formes issues d'un épissage alternatif. En effet, la particularité du gène de CD44 est de contenir 20 exons que l'on peut diviser en deux groupes (Fig. 10). Les exons 1-5 et 16-20 codent pour la forme ubiquitaire de CD44, c'est la forme dite standard ou encore CD44s. Les exons 6-15 aussi appelés v1-v10 subissent un épissage alternatif. Il est estimé qu'en théorie, le gène de CD44 peut générer jusqu'à plus de 1000 variants (CD44v) (Goodison *et al.* 1999).

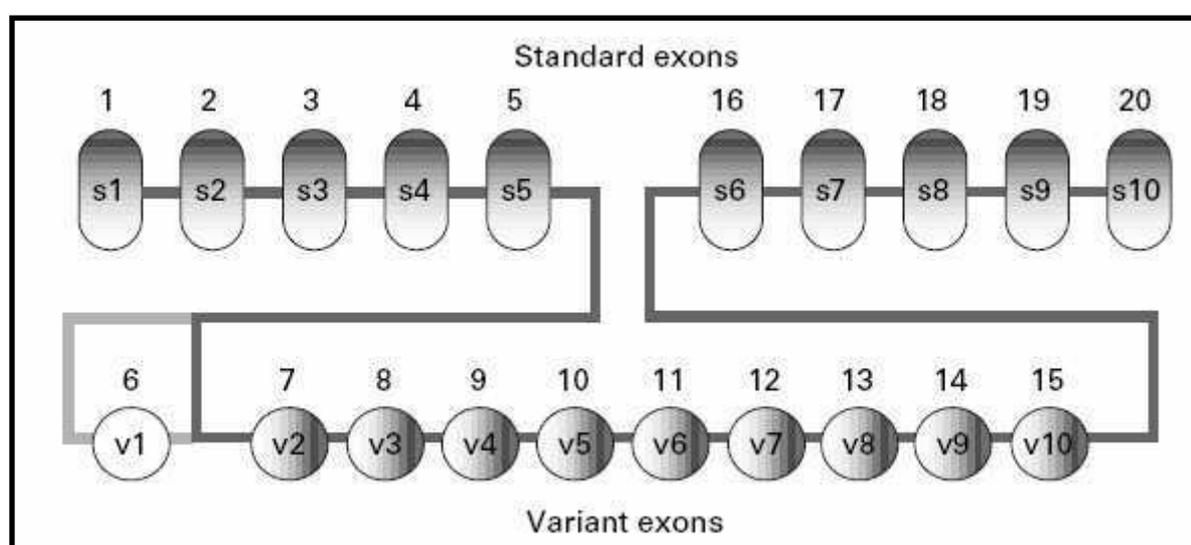


Figure 10 : La structure du gène de CD44. (Goodison *et al.* 1999)

Le gène de CD44 est composé de 20 exons dont 10 exons constitutifs, dits standards (1-5 et 16-20) et 10 exons variants (6-15). Les formes variantes de CD44 peuvent contenir un ou plusieurs exons variants.

Au niveau protéique, CD44 comporte trois domaines principaux (Fig. 11). L'ectodomaine N-terminal liant l'acide hyaluronique constitue le premier. Ce domaine triglobulaire contient des sites de reconnaissance pour des molécules de la matrice extracellulaire et est capable, *in vitro*, de se lier à l'acide hyaluronique, au collagène, à la laminine et à la fibronectine. Ensuite, vient le domaine dit "souche" situé entre le domaine globulaire et le domaine transmembranaire. Ce domaine assez court (46 acides aminés) pour la forme standard de CD44 voit sa taille augmentée par l'insertion de régions variantes. Ce domaine contient notamment un site de clivage potentiel pour des *shedases*. Enfin, CD44

comporte un domaine transmembranaire hautement conservé et une queue cytoplasmique. Le domaine transmembranaire possède une cystéine conservée permettant, par formation de pont disulfure, la multimérisation du récepteur. Le domaine intracellulaire est quant à lui important pour la localisation cellulaire de CD44. Il possède également la capacité de lier des protéines membres de la famille de la bande 4.1 et en particulier les protéines de la famille ERM (*Ezrin, Radixin, Moesin*). Cette interaction est possible grâce à un motif riche en acides aminés basiques et permet la connexion de CD44 avec le cytosquelette d'actine ainsi que d'autres protéines qui y sont associées (Ponta *et al.* 2003).

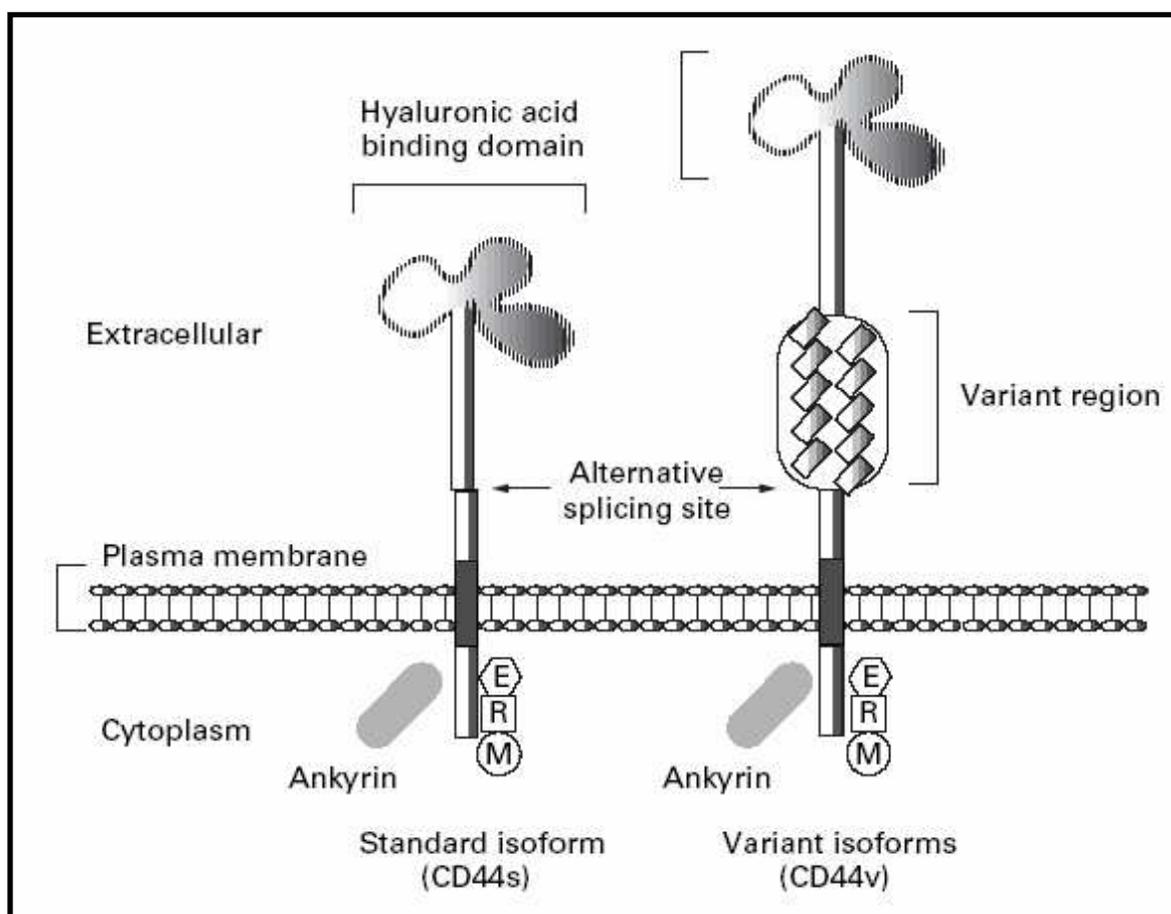


Figure 11 : La structure protéique de CD44. (Goodison *et al.* 1999)

La structure de CD44 est composée d'une extrémité N-terminale globulaire permettant la liaison de l'acide hyaluronique, suivi d'un domaine extracellulaire pouvant contenir une région variante. Le récepteur est ancré à la membrane plasmique par un domaine transmembranaire hautement conservé et possède une extrémité cytoplasmique (CD44-ICD) capable d'interagir avec des protéines de type ankyrines ou de la famille ERM.

I.C.2.b.2. Modifications post-traductionnelles

Outre le fait qu'il existe différents variants de CD44, ce récepteur subit de nombreuses modifications post-traductionnelles. En effet, la masse moléculaire théorique du CD44s est de 37 kDa ; or celle-ci est estimée à 85 kDa pour la forme standard par analyse en gel d'électrophorèse. Cette différence peut s'expliquer par les nombreuses glycosylations que peut subir le récepteur. Il a été dénombré au moins 5 séquences consensus de N-glycosylations et 2 sites d'attachement à la chondroïtine sulfate dans la séquence codée par l'exon 5, ainsi que plusieurs sites potentiels de O-glycosylations et d'attachement pour l'héparane sulfate et la kératine sulfate (Goodison *et al.* 1999). En plus d'affecter la masse moléculaire du récepteur, ces multiples glycosylations peuvent modifier l'affinité de CD44 pour ses ligands et ainsi altérer ses fonctions.

L'ectodomaine de CD44 n'est pas le seul à subir des modifications post-traductionnelles. Son domaine intracellulaire possède deux cystéines conservées qui peuvent être le siège de palmitoylation (Isacke 2004). Il semble que l'acylation de CD44 influe sur son association avec ses partenaires intracellulaires et puisse modifier sa répartition au niveau surfacique, notamment par rapport aux microdomaines membranaires comme les radeaux lipidiques. De plus, le domaine cytoplasmique de CD44 contient cinq sérines conservées et potentiellement phosphorylables. Dans les cellules en culture (entre autre dans les cellules COS-1 et les cellules de mélanome RPM-MC), la Ser 325 est constitutivement phosphorylée. Cette phosphorylation, en partie régulée par la CaMII (Ca^{2+} /calmodulin dependent kinase II), semble modifier la capacité de migration de CD44 sur acide hyaluronique. Il semble de plus en plus évident que la phosphorylation des sérines de CD44 soit sous le contrôle de PKC (*Protein Kinase C*) et PKA (*Protein Kinase AMPc-dependent*) et qu'elle modifie significativement les fonctions de CD44 en modulant son interaction avec les protéines ERM (Isacke 2004).

I.C.2.b.3. Ligands et fonction

CD44 est le principal récepteur de l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane linéaire de haut poids moléculaire largement répandu dans l'organisme. La liaison entre l'acide hyaluronique et CD44 est permise par l'extrémité globulaire N-terminale du récepteur. Sur cette région, se trouvent trois motifs de liaison à l'acide hyaluronique, composés de deux acides aminés basiques (arginine ou lysine) séparés par sept acides aminés non acides (BX7B) (Borland *et al.* 1998). Toutefois, il est clairement établi que l'expression de CD44 n'est pas corrélée à la liaison de l'acide hyaluronique. Deux principaux mécanismes régulent l'affinité de CD44 pour son ligand. D'une part son taux de glycosylation modifie son affinité avec l'acide hyaluronique puisque l'inhibition de la N-glycosylation de la partie globulaire du récepteur augmente la liaison de l'acide hyaluronique. D'autre part, il a été montré que le domaine cytoplasmique de CD44 était nécessaire à la liaison de son ligand (Jiang *et al.* 2002). De plus, il semble que la multimérisation de CD44 favorise son interaction avec l'acide hyaluronique.

En outre, si l'acide hyaluronique est le principal ligand de CD44, le récepteur est capable de lier d'autres composants de la matrice extracellulaire comme l'ostéopontine ou encore le collagène, la fibronectine, la laminine et la serglycine par l'intermédiaire de polysaccharides de type chondroïtines (Goodison *et al.* 1999). Toutefois, si aucune donnée précise n'existe à ce sujet, il semble que l'utilisation d'anticorps activant CD44 n'influence pas l'adhérence des cellules de mélanome sur gélatine (Takahashi *et al.* 1999).

Les fonctions principales de CD44 sont associées à l'adhérence et la migration cellulaire. Grâce à la liaison de molécules matricielles, CD44 est impliqué dans le maintien de la structure tridimensionnelle des tissus. Il joue également un rôle important dans la fonction des lymphocytes en permettant leur adhérence aux cellules endothéliales vasculaires et l'extravasation. D'ailleurs, une augmentation du niveau d'expression de CD44 est observée dans les cellules T activées. L'adhérence et la migration étant deux mécanismes clés de la tumorigenèse, CD44 est aussi un des acteurs majeurs de l'invasion tumorale et de la formation de métastases où il semble surtout avoir un rôle délétère lorsqu'un changement s'opère dans son expression. L'apparition de formes variantes de CD44 favorise souvent le caractère agressif des cellules malignes. De même, des modifications dans le nombre de glycosylations

ou d'ajout de glycosaminoglycanes (GAG) peuvent influencer sur les propriétés métastatiques des tumeurs (Borland *et al.* 1998).

En plus CD44 est également capable de réaliser l'endocytose de l'acide hyaluronique qui sera suivie par sa dégradation au niveau cellulaire (Culty *et al.* 1992). Même si toute la lumière n'a pas été faite sur ce mécanisme, il semble que l'endocytose de l'acide hyaluronique par CD44 n'empêche ni la voie des vésicules tapissées de clathrine, ni celle des cavéoles et que si l'acide hyaluronique est dégradé par les lysosomes, le récepteur CD44 est quant à lui recyclé à la membrane (Culty *et al.* 1992; Tammi *et al.* 2001). Cette fonction de CD44 pourrait présenter un rôle important lors de la morphogenèse tissulaire et la migration cellulaire.

CD44 est également capable de s'associer avec des enzymes au niveau membranaire. Par exemple, il peut se lier à la MMP9, favorisant ainsi la dégradation du collagène-IV et l'invasion tumorale. Cette association peut également permettre la conversion du TGF- β en forme active, influant ainsi notamment la survie cellulaire.

Enfin, une autre fonction émergente de CD44 est sa capacité à se comporter comme un co-récepteur, ce qui est par exemple le cas avec les récepteurs Met, ErbB et TGF- β R. Ce mécanisme pourrait expliquer en partie la manière dont CD44 influe sur la signalisation intracellulaire car même si le domaine intracellulaire de CD44 peut interagir avec de nombreuses protéines de signalisation (Src, RhoGTPase, PKC...), le caractère direct et fonctionnel de ces interactions reste flou et finalement mal compris (Ponta *et al.* 2003) (Fig. 12).

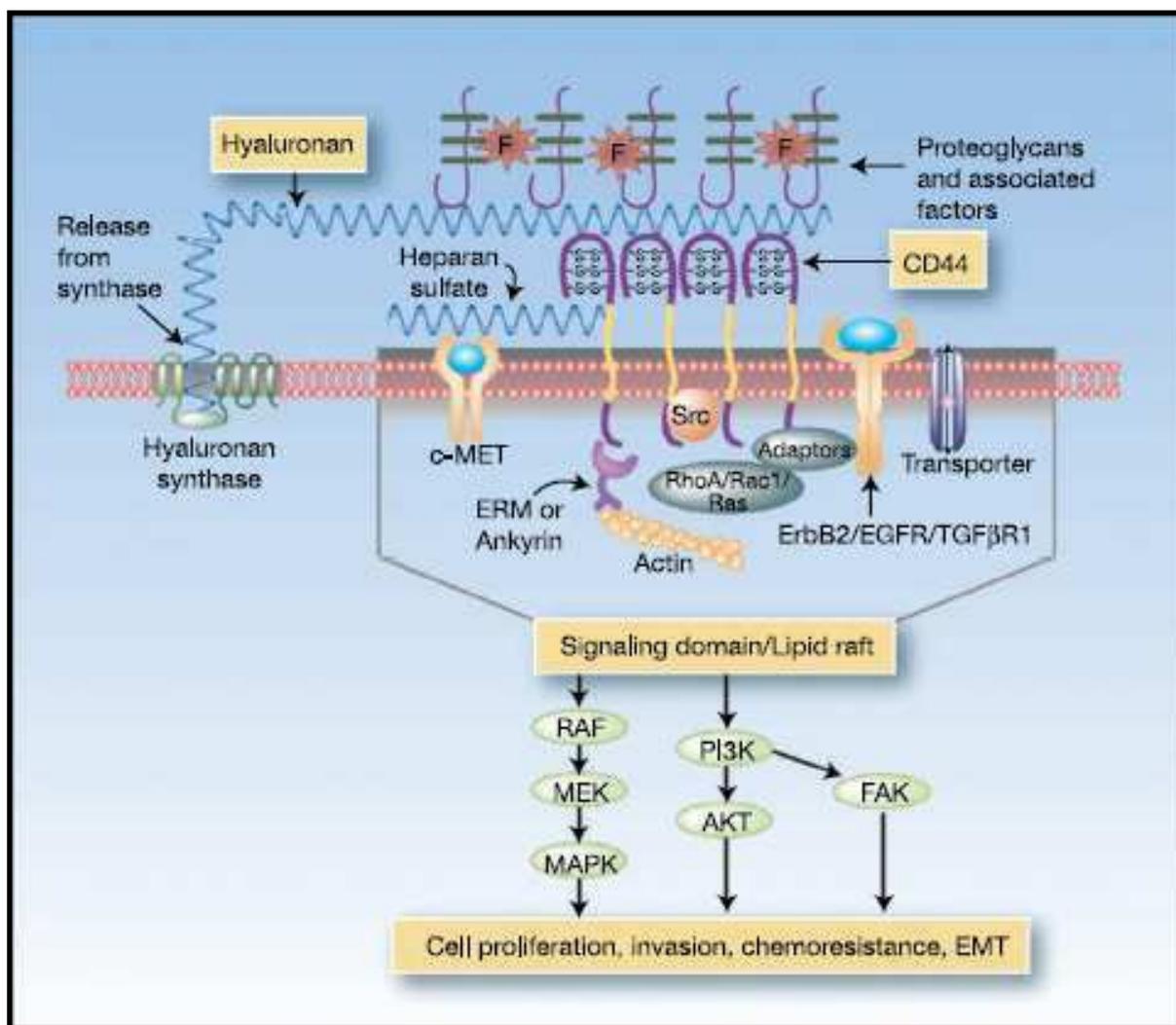


Figure 12 : La régulation des cascades de signalisation induites par l'association CD44/AH et leur implication dans la progression tumorale. (Toole 2009)

Les hyaluronanes synthases produisent l'acide hyaluronique qui est soit retenu par les synthases, soit libéré dans le milieu extracellulaire. Il interagit de façon multivalente avec CD44 pour induire ou stabiliser les domaines de signalisation à la membrane plasmique. Ceux-ci contiennent des récepteurs à tyrosine kinases (ErbB2 et EGFR), d'autres récepteurs (TGF- β R1) et des kinases (famille Src), qui dirigent des voies oncogéniques. Par exemple, les MAP kinases et PI3 kinase/Akt modulent la prolifération et la survie cellulaire. Certains transporteurs participent à la résistance aux médicaments. De nombreuses protéines adaptatrices (Vav2, Grb2 et Gab-1) servent d'intermédiaire à l'interaction de CD44 avec des effecteurs (RhoA, Rac1 et Ras). Dans d'autres cas, les carbohydrates fixés à la région variée de CD44 (héparane sulfate) lie des facteurs de régulation et co-actives des récepteurs à tyrosine kinase (c-Met). Les filaments d'actine joignent le domaine cytoplasmique de CD44 *via* les membres de la famille ERM ou ankyrine ce qui peut modifier la motilité et l'invasion cellulaire. D'ailleurs, les protéoglycans et facteurs associés attachés à l'acide hyaluronique influencerait ces mécanismes.

I.C.2.b.4. Distribution membranaire

CD44 a été décrit comme pouvant être localisé à la fois sur la face dorsale et ventrale des cellules en culture et semble être fortement concentré dans les microvilli, une forme de protusions membranaires très fines ayant l'aspect de cheveux ou poils à la surface de la cellule. Toutefois même s'il semble exclu, ou tout au moins peu détectable, dans les puits recouverts de clathrine (Isacke 2004), CD44 a déjà été décrit comme pouvant être colocalisé avec la clathrine dans un mécanisme impliquant le TNF α et le TGF- β (Takahashi *et al.* 2010).

Des études de plus en plus nombreuses montrent que CD44 peut être en partie localisé dans les radeaux lipidiques. Ces microdomaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides sont résistants aux détergents. Un type de radeaux lipidiques particuliers, les cavéoles, comportent sur le feuillet intracellulaire de la cavéoline, une petite protéine en forme d'épingle à cheveux. Ces microdomaines constituent de véritables plateformes de signalisation puisqu'elles concentrent des récepteurs, notamment aux facteurs de croissance (PDGF, EGF, IGF) et de nombreuses protéines de signalisation comme Src et Fyn (de Laurentiis *et al.* 2007). Même si la fonction de CD44 dans ces microdomaines reste floue, il a été montré, dans des cellules épithéliales, que la palmitoylation du récepteur était essentielle pour dicter cette localisation et qu'elle était requise pour l'internalisation de l'acide hyaluronique (Thankamony et Knudson 2006). Une autre étude intéressante montre que, dans une lignée d'adénocarcinome gastrique AZ521 et de cancer colorectal HT29, l'activation de CD44 par l'ostéopontine conduit à sa translocation dans les radeaux lipidiques, accompagné de Src et de l'intégrine β 1. Cette relocalisation apparaît dépendante de la palmitoylation de CD44 ainsi que de sa liaison avec le cytosquelette d'actine. La relocalisation de Src dans les radeaux lipidiques va permettre l'activation de l'intégrine β 1 suivant la voie *inside-out* ; ce qui au final influencera l'adhérence et la survie cellulaire (Lee *et al.* 2008).

I.C.2.b.5. Une modification post-traductionnelle particulière : le *shedding*

CD44 a été depuis une vingtaine d'année décrit comme pouvant subir le *shedding*. Ce clivage protéolytique de l'ectodomaine du récepteur provoque la libération d'une forme soluble de CD44 (sCD44) dans le milieu extracellulaire. Différentes protéases sont impliquées dans ce mécanisme, les principales étant les métalloprotéases comme la MT1-MMP, la MT3-

MMP et les ADAMs 10 et 17 (Cichy et Puré 2003). Les sérines protéases semblent également jouer un rôle dans le clivage de l'ectodomaine de CD44 puisque des inhibiteurs de ces enzymes accentuent son *shedding*. Toutefois, ce mécanisme reste sous la dépendance des métalloprotéases car il est annulé par un prétraitement aux inhibiteurs de métalloprotéases (Okamoto *et al.* 1999).

Le *shedding* de CD44 est sous la dépendance de différents facteurs. D'abord, même s'il semble être constitutif, il peut être régulé par différents facteurs dont des cytokines (TNF α , interféron- γ) (Ristamaki *et al.* 1997). De plus, le *shedding* de CD44 est contrôlé par les GTPases Ras et Rho, probablement *via* la régulation de l'assemblage du cytosquelette d'actine (Cichy et Puré 2003). Enfin, il a été plus récemment découvert que les radeaux lipidiques pouvaient jouer un rôle important dans ce processus. Il a ainsi récemment été montré que la déplétion en cholestérol des radeaux lipidiques par la méthyl- β -cyclodextrine améliorait le *shedding* de CD44 médié par l'ADAM-10 (Murai *et al.* 2011).

La libération de la partie soluble de CD44 dans le milieu extracellulaire peut induire différents effets. D'une part, il pourrait entrer en compétition avec le CD44 ancré à la membrane plasmique dans sa liaison aux ligands. En effet, il a déjà été décrit que l'ajout exogène de sCD44 pouvait diminuer la liaison de l'acide hyaluronique par les cellules de carcinome mammaire murin et favoriser l'apoptose, diminuer la prolifération cellulaire et l'invasion modulée par les MMPs (Cichy et Puré 2003; Peterson *et al.* 2000). D'autre part, le clivage de CD44 pourrait altérer l'adhérence cellule-matrice ou cellule-cellule sous l'influence du récepteur membranaire. Enfin, de façon cohérente, le *shedding* de CD44 semble réguler la migration cellulaire. Il a en effet été démontré dans une lignée de cellules tumorales pancréatique (MIA PaCa-2) que le *shedding* de CD44 accompli par la MT1-MMP stimulait la migration tumorale (Kajita *et al.* 2001). De même, le clivage de CD44 semble faciliter le détachement des cellules de l'acide hyaluronique, facilitant ainsi la migration et l'invasion des cellules tumorales de poumon sur ce substrat (Okamoto *et al.* 1999).

Il a été par la suite mis en évidence que le *shedding* de CD44 était suivi d'un autre clivage du récepteur. Celui-ci a lieu dans la partie intracellulaire résiduelle (CD44-ICD) et est réalisé par des γ -sécrétases. Ce phénomène est couramment appelé RIP. Cette protéolyse va permettre la libération dans le compartiment intracellulaire de la queue cytoplasmique du

récepteur qui va pouvoir être transloquée dans le noyau où elle peut agir comme un facteur de transcription pour activer ou réprimer l'expression de différents gènes (Cichy et Puré 2003). Ainsi, il a été observé que le CD44-ICD pouvait participer à la transformation de cellules fibroblastiques de rat, notamment en influant sur leur capacité à croître en absence de support (Pelletier *et al.* 2006). De plus, il a été prouvé que le CD44-ICD pouvait potentialiser la transactivation modulée par le co-activateur CBP (*CREB Binding Protein*)/p300 et également augmenter l'expression transcriptionnelle de CD44 lui-même (Okamoto *et al.* 2001).

C'est pourquoi, le *shedding* de CD44 est considéré comme un mécanisme important dans la tumorigenèse. En effet, même s'il se produit de manière constitutive dans les cellules normales, il a été décrit qu'une stimulation de ce mécanisme pouvait avoir lieu dans de nombreux types de tumeurs parmi lesquelles on trouve les carcinomes du sein, du colon, des ovaires ou encore des tumeurs non à petites cellules du poumon (Guo *et al.* 1994; Okamoto *et al.* 2002). Ces travaux ont amené les chercheurs à considérer la présence du sCD44 comme un marqueur potentiel de la progression tumorale. En effet le sCD44 peut être retrouvé dans le sérum sanguin et en plus grande quantité dans le sérum de patients atteints de cancer colorectal ou gastrique. Comme la concentration sanguine en sCD44 peut être corrélée avec l'avancement métastatique de la tumeur, il semblerait qu'il puisse constituer un potentiel marqueur de l'agressivité tumorale (Guo *et al.* 1994).

I.C.2.b.6. Le rôle de CD44 dans la progression tumorale

De par son activité majeure dans le contrôle de l'adhérence et de la migration cellulaire, une dérégulation de l'expression de CD44 peut s'avérer extrêmement délétère pour la cellule et conduire à différentes pathologies. Dans le cadre du cancer, CD44 semble favoriser l'invasion cellulaire et la formation de métastases.

La multitude d'isoformes et de variants de CD44 rend l'étude de ses effets sur le cancer très difficile. Si dans certains types de tumeurs (tumeurs thyroïdiennes papillaires et folliculaires par exemple), l'expression de CD44 est fortement augmentée par rapport aux cellules saines, bien souvent c'est l'apparition de nouveaux variants qui est à l'origine des effets néfastes liés au récepteur. En effet certains variants de CD44 ne sont exprimés que dans

les cellules malignes, en particulier le CD44v6 (possédant l'exon variant 6) est particulièrement présent dans les carcinomes pancréatiques, les lymphomes non-Hodgkiniens, les carcinomes du colon ou encore les cancers thyroïdiens papillaires (Rudzki et Jothy 1997). D'autres modifications peuvent conduire à un dérèglement de la fonction de CD44, notamment les changements dans les motifs de glycosylation et d'ajout de GAG. Peu de données sont disponibles sur l'effet de ces modifications sur le comportement tumoral du fait probablement d'un manque de compréhension du *pattern* de glycosylation basal de CD44 (Borland *et al.* 1998).

Même si ces altérations dans l'expression de CD44 ne sont pas à elles seules responsables des capacités métastatiques des cellules tumorales, il apparaît actuellement évident qu'elles y contribuent fortement. Ces effets peuvent s'expliquer de différentes manières et sont spécifiques d'un type cellulaire donné. Ainsi, l'affinité du récepteur pour l'acide hyaluronique peut être mise en cause et conduire à un détachement facilité des cellules de leur support et faciliter ainsi leur migration. Une dégradation plus rapide de ce substrat pourra quant à elle faciliter la progression des cellules tumorales jusqu'aux vaisseaux sanguins et favoriser l'extravasation. Ceci sans oublier que CD44 peut influencer sur différentes cascades de signalisation intracellulaire, sur l'assemblage et la dynamique du cytosquelette d'actine et sur l'expression de nombreuses protéines, elles-mêmes impliquées dans ces processus. Tous ces aspects rendent la compréhension du rôle de CD44 lors des processus de cancérisation extrêmement complexe et de nombreuses zones d'ombres restent encore à éclaircir (Underhill 1992).

II. LE RÉCEPTEUR D'ENDOCYTOSE LRP1

II.A. LA FAMILLE DES RÉCEPTEURS AU LDL

Historiquement, le LDLR (*Low-Density Lipoprotein Receptor*), a été découvert en 1988 à cause de son dysfonctionnement dans l'hypercholestérolémie, associée à l'athérosclérose ou à des maladies coronariennes (Kajinami *et al.* 1988). Par la suite, six autres protéines ont été mises en corrélation avec le LDLR pour former la famille des récepteurs au LDL. Si le LDLR est principalement exprimé dans le foie, siège du métabolisme lipidique, les autres membres présentent une répartition tissulaire plus large, voire ubiquitaire, ce qui suppose qu'ils peuvent remplir des fonctions variées (Herz et Bock 2002). Chez les mammifères, sept membres de cette famille ont été répertoriés (Fig. 13) :

■ Le LDLR, un des premiers récepteur cargo découvert, présente une expression ubiquitaire mais est exprimé en majorité dans le foie où il permet le métabolisme des lipoprotéines transportant le cholestérol. Son poids moléculaire varie entre 100 et 160 kDa suivant son état de glycosylation.

■ Le *LDL receptor-related protein* (LRP ou encore LRP1) qui, étant donné sa place centrale dans cette étude sera plus largement développé par la suite (*Cf Chap. II.B. et suite*).

■ Le LRP1B dont la taille avoisine les 500 kDa partage ~60% d'homologie avec LRP1. Il semble particulièrement exprimé dans le cerveau et posséderait une fonction de gène suppresseur de tumeur.

■ La mégaline (ou LRP2) est surtout exprimée dans les cellules épithéliales tapissant les tubules proximaux du rein sous la forme d'une simple chaîne glycosylée de 600 kDa. Elle régule l'épuration de plusieurs protéines et est impliquée dans le processus de fabrication de la vitamine D.

■ Le VLDLR (*very-LDLR*) présente une structure très proche du LDLR mais n'est pas exprimé dans le foie ; sa répartition tissulaire comprend le cœur, le cerveau, les muscles squelettiques et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins principaux. Son poids moléculaire varie entre 140 et 180 kDa. Il semble avoir un rôle dans la protection contre l'obésité ainsi que dans le développement du système nerveux central.

■ L'ApoER2 (*Apolipoprotein E Receptor 2* ou LRP8) dont l'expression est limitée au cerveau et aux testicules a une fonction cruciale dans la production et la maturation du sperme. Sa masse moléculaire est de 74 kDa.

■ Le MEGF7 (*Multiple EGF-repeat-containing protein 7*) est exprimé, avec une masse moléculaire de 250 kDa, dans le système nerveux central où sa fonction reste encore à préciser même si elle semble impliquer la fonction de signalisation du récepteur.

Tous ces membres possèdent une structure modulaire et des motifs communs dont des domaines de liaison aux ligands riches en cystéines suivies par des répétitions de type EGF riches en cystéines également, des domaines YWTD, un segment unique traversant la membrane plasmique et un court domaine cytoplasmique possédant au moins un motif NPXY et YXXL.

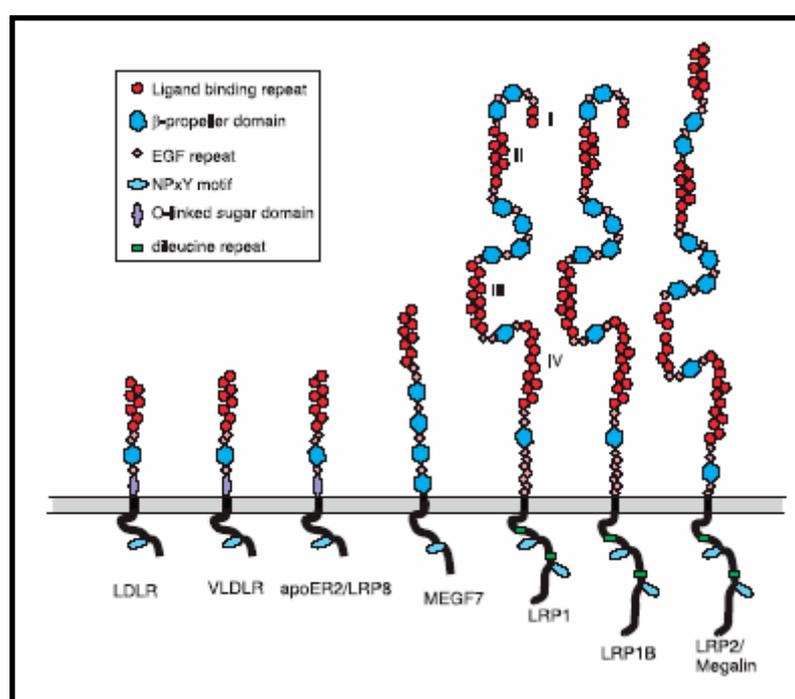


Figure 13 : Représentation schématique des différents membres de la famille des récepteurs au LDL. (Lillis et al. 2008)

La famille des récepteurs au LDL contient sept membres dont la taille varie entre 100 et 600 kDa. Ces membres ont en commun une ou plusieurs répétitions de type complément permettant la fixation de ligands et un à deux domaines NPXY au sein de leur domaine cytoplasmique.

Trois autres récepteurs sont voisins de la famille des récepteurs au LDL car ils possèdent des répétitions de type liaison de ligand dans leur partie extracellulaire ainsi qu'un motif YXXL dans leur domaine cytoplasmique insinuant un rôle dans l'endocytose. Ces récepteurs sont nommés LRP5, LRP6 et LR11 (*lipoprotein receptor*).

II.B. LRP-1 : ORGANISATION STRUCTURALE

Du haut de ses 600 kDa, le récepteur LRP1 est le plus imposant représentant de la famille des récepteurs au LDL. Décrit pour la première fois par Joachim Hertz (Herz *et al.* 1988), ce récepteur était d'abord supposé intervenir uniquement dans le métabolisme lipidique, mais il s'est très vite imposé comme un récepteur cargo multifonctionnel. Initialement synthétisé sous forme d'un précurseur de 600 kDa, LRP1 est clivé dans l'appareil de Golgi par une furine-convertase pour former une sous-unité de haut poids moléculaire (chaîne α , 515 kDa) et une sous-unité de faible poids moléculaire (chaîne β , 85 kDa) qui seront toutes deux liées de manière non covalente (Strickland *et al.* 1990).

II.B.1. Le domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire de LRP1 est composé de différents domaines fondamentaux (Fig. 14) :

■ les répétitions riches en cystéines de type complément (CR), aussi appelées répétitions de liaison au ligand. Ces domaines sont composés d'une structure en épingle β suivie par une série de coudes β qui forme une cage entourant un ion calcium qui stabilise la structure. Les CR sont regroupés dans 4 régions, numérotées de I à IV.

■ Les régions homologues au précurseur de l'EGF consistent en des successions de domaines de type EGF riches en cystéines encadrant des motifs YWTD, formant un propulseur β . Ces domaines YWTD ont une importance capitale dans le découplage de LRP1 avec ses ligands au niveau du compartiment lysosomal puisqu'à faible pH, ils s'associent avec les CR, induisant la séparation du ligand.

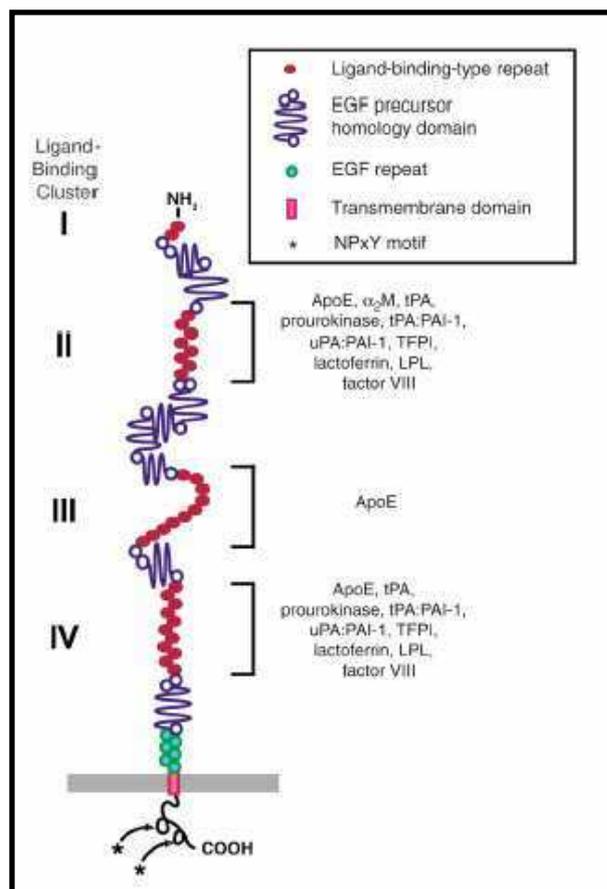


Figure 14 : La structure protéique de LRP1. (Hertz et Strickland 2001)

Cette structure permet à LRP1 d'interagir avec de nombreux ligands extracellulaires. A ce jour, plus d'une trentaine ont été répertoriés et ils balayent une large gamme de molécules comme des lipoprotéines, des virus, des protéases associées ou non à leur inhibiteur ou des molécules de la MEC (Herz et Strickland 2001) (Fig. 15). Cette diversité de ligands implique plus ou moins directement LRP1 dans des mécanismes variés comme le métabolisme des lipides ou encore l'homéostasie des protéases matricielles.

Des études basées sur l'expression de mini-récepteurs contenant chacun un domaine de liaison de LRP1, ont montré que ce sont principalement les domaines II et IV qui s'associent avec les divers ligands (Obermoeller-McCormick *et al.* 2001). Toutefois, face à la multiplicité de ceux-ci, on peut se demander comment LRP1 peut reconnaître autant de ligands structurellement différents. Une des réponses semble impliquer la présence d'acides aminés basiques et notamment de lysines et d'arginines. C'est le cas pour l'ApoE, PAI-1, l' α_2 -macroglobuline ou encore RAP qui possèdent dans leur séquence certaines lysines et/ou arginines qui, lorsqu'elles sont mutées, provoquent une diminution de leur affinité pour LRP1 (Lillis *et al.* 2008).

Proteins involved in lipoprotein metabolism

Apolipoprotein E-enriched lipoproteins (chylomicron and VLDL remnants), Lipoprotein lipase (LPL), Hepatic lipase, Sphingolipid activator protein

Proteases and protease/inhibitor complexes

Activated α 2-macroglobulin, α 2-macroglobulin protease complexes, pregnancy zone protein–protease complexes, Aprotinin, Urokinase plasminogen activator (uPA), pro-uPA, plasminogen activator inhibitor (PAI-1), uPA/PAI-1 complexes, tissue-type plasminogen activator (tPA), tPA/PAI-1 complexes, Thrombin/PA-1, Thrombin/anti-thrombin III, Thrombin/protease nexin-1, Thrombin/heparin cofactor II, Neuroserpin, Neuroserpin/tPA complexes, C1s/C1q inhibitor, Protease/protein C inhibitor, Elastase/ α 1-anti-trypsin, MMP-9, MMP-13, TSP-2/MMP-2 complexes, Tissue factor pathway inhibitor (TFPI), Factor VIIa/TFPI, Factor VIIIa, Factor IXa, Factor IXa/protease nexin-1, b-amyloid precursor protein, cathepsinD

Matrix proteins

Thrombospondin-1, Thrombospondin-2, Fibronectin

Intracellular proteins

Receptor associated protein (RAP), Calreticulin, HIV Tat protein

Growth factors

Platelet-derived growth factor (PDGF), Midkine, Insulin-like growth factor (IGF)- binding protein-3 (IGFBP-3), Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2), Transforming growth factor (TGF- β)

Others

Circumsporozoite protein, Lactoferrin, Ricin A, Saposin, Rhinovirus A peptide (monomer), Gentamicin. Polymvcin B. Pseudomonas exotoxin A. Complement C3. Collectins (via calreticulin)

Figure 15 : Les différents ligands connus de LRP1. (extrait de Boucher et Hertz 2011)

II.B.2. Le domaine intracellulaire

Le domaine intracellulaire de LRP1 est de petite taille par rapport au reste du récepteur. Il comporte une centaine d'acides aminés et des motifs fortement conservés dont 2 motifs NPXY et deux motifs dileucine (LL). Il a été montré que le domaine cytoplasmique de LRP1 était capable d'interagir avec de nombreuses molécules adaptatrices impliquées dans le trafic vésiculaire ou dans la signalisation intracellulaire (Fig. 16) (Lillis *et al.* 2008).

Si les motifs NPXY semblent requis pour une endocytose rapide de LRP1 par les vésicules à clathrine, le motif YXXL apparaît comme signal dominant pour l'endocytose avec la participation d'un motif LL (Li *et al.* 2000). De plus, le motif NPXY proximal a été décrit comme dirigeant le trafic de LRP1 durant sa biosynthèse. Dans cette même étude, le motif YXXL ainsi que le motif LL ont été impliqués dans le trafic vésiculaire de LRP1 et notamment dans son recyclage (Donoso *et al.* 2009). Enfin, il a récemment été mis en évidence que le motif NPXYXXL distal concernait davantage l'internalisation du récepteur (Reekmans *et al.* 2009).

LRP1 peut subir des phosphorylations sur tyrosines, notamment celles contenues dans les motifs NPXY (NPXY₄₄₇₃ et NPXY₄₅₀₇). Ces motifs sont impliqués dans l'interaction de

LRP1 avec de nombreuses protéines intracellulaires, que leur tyrosine soit phosphorylée ou non. Ces interactions sont possibles grâce au domaine PTB (*PhosphoTyrosine-Binding*), ce qui est le cas pour les protéines Fe65 et Disabled, deux adaptateurs protéiques neuronaux (Trommsdorff *et al.* 1998). D'autres études moléculaires du domaine intracellulaire de LRP1 ont révélé que ce récepteur était capable d'interagir avec de nombreuses protéines adaptatrices parmi lesquelles nous pouvons citer Grb-2, Shc-3, PI3-kinase (*Phosphatidyl Inositol 3-kinase*), PLC γ (Phospholipase C γ) et Src. Si ces interactions impliquent les deux motifs NPXY, la majorité d'entre elles se font avec le NPXY₄₅₀₇, phosphorylé ou non (Guttman *et al.* 2009). La faculté de LRP1 à interagir avec de nombreuses protéines adaptatrices en fait un modulateur de nombreuses voies de signalisation. En particulier, il a été observé que LRP1 pouvait intervenir dans la voie des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). D'une part, il a été décrit qu'il était capable d'inhiber la voie JNK (*c-Jun NH₂-terminal Kinase*) en le séquestrant par l'intermédiaire de la protéine JIP1/2 (*JNK Interacting Protein*) (Lutz *et al.* 2002). D'autre part, il peut moduler la voie ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) jouant ainsi un rôle dans l'adhérence, la migration et l'invasion cellulaire (Webb *et al.* 2000; Langlois *et al.* 2010)

Disabled-1 (Dab1)	Src activation, neuronal migration
Shc	Signal transduction by protein-tyrosine kinases
PKC α	Proliferation, apoptosis, differentiation and motility
FE65	Actin, APP processing
PSD95	Coupling to NMDA receptors
SEMCAP-1	Axon guidance
JIP1, JIP2	MAPK pathway
GULP	Phagocytosis
Talin-like protein	Coupling to actin cytoskeleton
OMP25	Mitochondrial transport
CAPON	NO synthase
PIP4,5 kinase like protein	Inositol signaling
ICAP1	Integrin-mediated signaling
Cbl	E3 ligase, receptor tyrosine kinase downregulation

Figure 16 : Les différentes protéines cytoplasmiques connues pour interagir avec le domaine intracellulaire de LRP1 et leur fonction. (Lillis *et al.* 2008)

Par sa multitude de ligands ainsi que par les nombreuses molécules adaptatrices avec lesquelles il peut interagir, LRP1 apparaît comme un récepteur multifonctionnel (endocytose

et signalisation) impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires comme la survie, la différenciation, la migration ou encore l'invasion cellulaire.

II.C. L'IMPORTANCE DE RAP : PROTÉINE CHAPERONNE ET ANTAGONISTE DE LRP1

La variété de ligands de LRP1 suppose l'existence d'un mécanisme empêchant l'association prématurée du récepteur avec ceux-ci durant la voie de synthèse et de sécrétion des protéines. Une protéine chaperonne, appelée RAP (*Receptor Associated Protein*), remplit ce rôle. Cette protéine de 39 kDa, se lie étroitement aux récepteurs du LDL à pH neutre et joue le rôle d'antagoniste ; la liaison de RAP au récepteur s'effectuant par l'intermédiaire des domaines II, III et IV (Jensen *et al.* 2009). RAP est composé de trois domaines, D1 à D3, montrant tous trois une topologie similaire. Ils sont constitués chacun de trois hélices α séparées par une boucle flexible, chaque domaine étant stabilisé par des interactions hydrophobes (Lillis *et al.* 2008).

RAP possède initialement une fonction de protéine chaperonne de LRP1. En effet, des souris déficientes en RAP montrent une réduction de la quantité de LRP1 mature dans le foie et le cerveau. Il est important de noter que RAP n'est pas sécrété par les cellules puisqu'il possède dans sa région C-terminale le motif HNEL, permettant sa séquestration dans le réticulum endoplasmique (RE). Après avoir accompagné LRP1 du RE au Golgi, RAP doit se dissocier de LRP1. Ce mécanisme est permis par la diminution de pH ayant lieu au cours de la voie sécrétoire *via* le domaine D3 de RAP. En effet, une région de ce domaine voit sa charge positivement augmenter dans des conditions acides, grâce à la présence de résidus histidines. Ce changement de charge module finement la balance liaison/libération de RAP par LRP1.

La fonction d'antagoniste de cette protéine chaperonne pourra être exploitée pour l'étude de LRP1 puisque ajoutée de manière exogène sur des cellules en culture, RAP empêche la liaison du récepteur avec la plupart de ses ligands.

II.D. LE RÔLE DE LRP1 DANS LES PROCESSUS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES.

Sa fonction d'endocytose associée à la diversité de ses ligands, ainsi que son rôle dans la signalisation intracellulaire impliquent LRP1 dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques. De plus, face à l'étendue de ses fonctionnalités, aux effets parfois contradictoires, il est difficile d'en établir une liste exhaustive.

Tout d'abord, le LRP1 exprimé dans le foie contribue largement à l'homéostasie en enlevant du plasma nombre de molécules telles que des enzymes et cofacteurs intervenant dans la coagulation sanguine et la fibrinolyse, des complexes enzymes-inhibiteurs ou encore des lipoprotéines. D'ailleurs, l'intervention de LRP1 dans le métabolisme lipidique ne se situe pas uniquement dans le foie puisqu'il a été mis en évidence que le récepteur était exprimé dans les adipocytes et qu'il y contrôlait à la fois l'adipogenèse et l'homéostasie lipidique (Masson *et al.* 2009; Terrand *et al.* 2009; Woldt *et al.* 2011).

LRP1 participe également activement à la protection des vaisseaux sanguins notamment contre l'artérosclérose. En effet, cette pathologie est en partie due à une prolifération et une migration excessive des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins modulée en partie par le PDGF. Des expériences de délétion du gène LRP1 dans ces cellules causent une forte prolifération des cellules musculaires lisses et augmente la sensibilité à l'artérosclérose due au cholestérol. Il a également été découvert que ces effets étaient régulés par le récepteur au PDGF (PDGFR- β) (Boucher *et al.* 2003). Si l'altération de l'endocytose du PDGF et du trafic du PDGFR- β qui découle de l'absence de LRP1 constituait les premières hypothèses, des études menées au sein de l'équipe du Pr. Boucher ont montré que c'était la fonction de signalisation cellulaire du récepteur qui était en jeu. Concrètement, le PDGFBB va induire la phosphorylation sur tyrosine du second motif NPXY de LRP1 *via* le PDGFR- β et le recrutement de kinases de la famille Src. Cette phosphorylation de LRP1 va permettre son association avec la protéine adaptatrice Shc (Loukinova *et al.* 2002). Une étude parallèle a également mis en évidence une phosphorylation de LRP1 impliquant le PDGFR- β et la PI3kinase et que ce mécanisme avait lieu dans les cavéoles (Boucher *et al.* 2002). Ces observations soulignent la possibilité pour LRP1 de se comporter comme un co-récepteur.

LRP1 est fortement exprimé dans le cerveau, notamment dans les cellules musculaires lisses vasculaires, les péricytes, les astrocytes, les neurones et dans les endothélia (Lillis *et al.* 2008). Il n'est donc pas surprenant que LRP1 soit impliqué dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, il a été montré que LRP1 pouvait contrôler la perméabilité de la BHE en réponse au tPA (Yepes *et al.* 2003). De plus, un déséquilibre dans l'expression de LRP1 apparaît jouer un rôle très important dans le développement et l'évolution d'une pathologie neurodégénérative très étudiée de nos jours, la maladie d'Alzheimer. L'un des aspects de cette maladie se caractérise par l'accumulation de peptide amyloïde β (A β) issu de la dégradation protéolytique de l'APP (*β -Amyloid Precursor Protein*). Cette accumulation va être à l'origine de la formation de plaques amyloïdes essentiellement sur le néocortex et l'hippocampe. LRP1 est capable d'interagir avec l'APP, de l'endocyter et de faciliter sa conversion en A β (Ulery *et al.* 2000). Cette fonction semble désigner LRP1 comme un promoteur de la maladie d'Alzheimer. D'ailleurs, un défaut dans l'endocytose de LRP1 provoque une accumulation de l'APP à la surface des neurones et une diminution de sa conversion en A β (Cam *et al.* 2005). Toutefois, son rôle dans la maladie d'Alzheimer est plus controversé puisque son expression au niveau de la BHE facilite l'efflux de l'A β du cerveau vers la circulation sanguine, limitant ainsi son accumulation dans le cerveau. D'ailleurs, une diminution de l'expression du récepteur au niveau de la BHE est souvent associée à cette pathologie (Ulery et Strickland 2000). De plus, l'ectodomaine soluble de LRP1 ayant subi le *shedding* et présent dans le plasma sanguin est capable de séquestrer l'A β (Deane *et al.* 2009). Il apparaît donc évident que le rôle de LRP1 dans la maladie d'Alzheimer dépend en majorité du type cellulaire dans lequel il est exprimé : au niveau des neurones, il semble présenter un effet plutôt délétère ; au niveau de la BHE, LRP1 apparaît au contraire bénéfique.

Enfin, un des rôles de plus en plus étudié de LRP1 est sa participation à la progression tumorale, même si la multiplicité de ses ligands et sa fonction de signalisation rend l'étude de son rôle dans le cancer extrêmement complexe. L'une des principales classes de ligands de LRP1 englobe les protéases matricielles couplées ou non à leur(s) inhibiteur(s). Les deux systèmes protéolytiques les plus étudiés, les MMPs et le système du plasminogène, peuvent être régulés par LRP1.

Premièrement, il a été mis en évidence que LRP1 était capable d'interagir, d'endocyter et d'induire la dégradation de trois MMPs : les MMP2, -9 et -13. Toutefois, pour chacune

d'entre elles, le mécanisme d'action est différent. Si l'interaction de LRP1 avec la proMMP13 semble directe, elle implique un co-récepteur toujours inconnu (Barmina *et al.* 1999). L'endocytose de la proMMP9 semble quant à elle être précédée par l'association de la protéase avec son inhibiteur le TIMP1 (Hahn-Dantona *et al.* 2001). En ce qui concerne la MMP2, deux mécanismes ont été rapportés. L'un implique la liaison de la proMMP2 avec son inhibiteur le TIMP2 (Emonard *et al.* 2004), l'autre l'intervention d'une molécule de la matrice extracellulaire, la thrombospondine 2 (Yang *et al.* 2001).

Deuxièmement, LRP1 régule en partie la présence de sérine protéases impliquées dans le système du plasminogène et en particulier l'uPA. Ce processus nécessite la formation d'un complexe quaternaire comportant uPA, PAI1, uPAR et LRP1. Dans un premier temps, l'endocytose de l'uPA par LRP1 va nécessiter son couplage avec son inhibiteur PAI1. Le complexe uPA/PAI1 va ensuite se fixer à son récepteur l'uPAR avant d'interagir avec LRP1 pour être endocyté. Au niveau intracellulaire, le complexe uPA/PAI1 va se séparer des deux récepteurs pour être dégradé par la voie lysosomale alors que LRP1 et uPAR vont être recyclés à la membrane plasmique (Nykjaer *et al.* 1992; Nykjaer *et al.* 1997; Croucher *et al.* 2006).

Cette capacité à endocyter des protéases matricielles fait de LRP1 un régulateur important de la protéolyse matricielle. En effet, il va permettre de diminuer leur concentration au niveau péricellulaire et en conséquence limiter le remodelage matriciel excessif, en partie responsable de l'invasion tumorale. C'est grâce à cette fonction majeure que LRP1 a d'abord été qualifié de potentiel facteur suppresseur de tumeur. Malheureusement, le rôle de LRP1 dans la tumorigenèse ne se cantonne pas à l'endocytose de protéases et apparaît bien plus complexe à la lumière des résultats les plus récents. En effet, il a par exemple été montré que, à l'encontre de sa fonction d'endocytose, LRP1 pouvait augmenter l'expression transcriptionnelle des MMP2 et -9 dans une lignée de glioblastome (Song *et al.* 2009). Ce récepteur semble également faciliter le développement et la croissance tumorale dans un contexte hypoxique (Montel *et al.* 2007).

II.E. RÉPARTITION MEMBRANAIRE DE LRP1

Plusieurs des ligands ou protéines interagissant indirectement avec LRP1 sont connues pour être localisées dans des microdomaines membranaires, les cavéoles. C'est par exemple le cas pour le récepteur au PDGF ou l'uPAR (Boucher *et al.* 2002; Blasi et Carmeliet 2002). Ceci a posé la question de la répartition membranaire de LRP1 au sein des cellules. Même si les données actuelles semblent controversées ou du moins largement dépendantes du type cellulaire étudié, plusieurs études ont mis en évidence la localisation de LRP1 dans les cavéoles. Il a notamment été montré dans des fibroblastes embryonniques murins et dans des fibrosarcomes HT1080 que LRP1 pouvait être localisé en partie dans les cavéoles. Ce n'est toutefois pas le cas dans des cellules musculaires lisses et dans les CHO (*Chinese hamster ovary*) (Wu et Gonias 2005). De plus, cette localisation membranaire semble être transitoire et est supposée faciliter l'endocytose de protéines localisées dans ces microdomaines membranaires.

Si la localisation de LRP1 dans les radeaux lipidiques semble momentanée dans certains types cellulaires, dans d'autres, elle peut être induite. En effet, il a été observé dans des adipocytes (3T3-L1) que suite à un traitement à l'insuline, la proportion de LRP1 localisé dans les cavéoles était significativement augmentée (Zhang *et al.* 2004).

Même si la fonction précise de LRP1 dans ces microdomaines reste obscure, il semble que l'endocytose ne soit pas sa seule activité. En effet, les cavéoles forment de véritables plateformes de signalisation où entre autres, la tyrosine kinase Src est fortement exprimée. Il a d'ailleurs été montré que la liaison du PDGFBB à LRP1 provoquait sa phosphorylation par le PDGFR et que ce mécanisme avait lieu dans les cavéoles (Loukinova *et al.* 2002; Boucher *et al.* 2002). Enfin, d'autres données, même peu nombreuses, concernent le *shedding* de LRP1. Des travaux récents relatent ainsi que la libération de l'ectodomaine de LRP1 pouvait être augmenté par une déplétion en cholestérol (Selvais *et al.* 2011).

II.F. LE *SHEDDING* DE LRP1

Il a été remarqué il y a plus d'une dizaine d'années qu'une forme soluble de LRP1 (sLRP) circulait dans le plasma humain (Quinn *et al.* 1997). La caractérisation du sLRP a montré qu'il était composé de la chaîne α du récepteur liée de façon non covalente à une partie de sa chaîne β d'un poids moléculaire de 55 kDa, indiquant que LRP1 peut subir le relargage de son ectodomaine après clivage de sa chaîne β à proximité de la membrane plasmique. De plus il a été observé que ce *shedding* était dépendant de métalloprotéases et ne semblait *a priori* pas impliquer de sérine protéases (Quinn *et al.* 1999).

Des études plus récentes ont permis de connaître plus précisément les protéases concernées. D'abord, dans des cellules de carcinome mammaire MCF-7, il a été mis en évidence que la MT1-MMP ainsi que les MT2-, MT3- et MT4-MMPs pouvaient cliver l'ectodomaine de LRP1 (Rozanov *et al.* 2004). De plus, il semble que les ADAM10 et -17 soient impliquées notamment dans la libération du sLRP dans le tissu cérébral et le fluide cérobrospinal (Liu *et al.* 2009). Enfin, l'ADAM-12 paraît également capable de cliver LRP1 dans l'endomètre (Selvais *et al.* 2009).

Le *shedding* de LRP1 peut avoir différentes conséquences, d'une part, la diminution de la présence du récepteur à la surface cellulaire qui va provoquer en conséquence une diminution de l'endocytose de ses ligands préférentiels. C'est par exemple le cas des protéases matricielles qui voit leur quantité péricellulaire dramatiquement augmentée en l'absence d'endocytose dépendante de LRP1 et qui aboutit à une augmentation de la protéolyse matricielle (Selvais *et al.* 2009). D'autre part, le sLRP pourrait être capable de séquestrer ses ligands empêchant leur liaison à leur récepteur(s) membranaire(s) spécifique(s). Enfin, le *shedding* de l'ectodomaine de LRP1 peut induire le clivage de sa partie intracellulaire (LRP-ICD) par une γ -sécrétase. Ce RIP va permettre la libération du LRP-ICD dans le cytoplasme de la cellule, sa potentielle translocation dans le noyau où il pourrait moduler l'expression de gènes (May *et al.* 2002). Il a notamment été montré que LRP-ICD pouvait interagir avec le facteur de régulation de l'interféron 3 entraînant son export du noyau et sa dégradation par le protéasome. Ainsi, et bien que des preuves supplémentaires soient nécessaires, LRP-ICD pourrait influencer l'expression de l'interféron γ (Zurhove *et al.* 2008). Ce

phénomène s'ajoutant à la capacité de LRP1 à réguler certaines voies de signalisation peut néanmoins subir une régulation négative. En effet il a été montré que la liaison de la cathepsine-D à LRP1 inhibait la libération du LRP-ICD notamment en empêchant le premier clivage protéolytique de l'ectodomaine du récepteur (Derocq *et al.* 2011).

II.G. RÉGULATION DU PROTÉOME MEMBRANAIRE PAR LRP1

Par toutes ses fonctionnalités, il semble de plus en plus évident que LRP1 puisse constituer un régulateur du protéome membranaire (Gonias *et al.* 2004). Il apparaît que six voies sont possibles pour ce contrôle protéomique.

■ Premièrement, par sa fonction d'endocytose, LRP1 est capable d'internaliser des protéines membranaires, perturbant ainsi leur répartition entre la surface cellulaire et le *pool* intracellulaire (Fig. 17-1). Même si la protéine membranaire est recyclée, ce qui est par exemple le cas de l'uPAR, sa quantité à la membrane est temporairement diminuée ce qui altère ses fonctions d'activation de protéases et de signalisation (Webb *et al.* 2000).

■ Cet effet est accentué si la protéine membranaire est dégradée puisque sa distribution membranaire est durablement perturbée (Fig. 17-2). Ce qui pourrait être le cas du PDGFR qui *via* le PDGFBB peut interagir et être endocyté par LRP1. Même si, une déficience en LRP1 augmente la présence à la membrane du PDGFR, le fait que le récepteur soit recyclé ou dégradé reste à éclaircir (Boucher *et al.* 2003).

■ Par ses effets sur la signalisation cellulaire, LRP1 semble tout à fait capable de réguler l'expression de certains gènes, que ce soit de manière directe ou non (Fig. 17-3).

■ Un autre mode d'action de LRP1 touche la maturation de protéines et leur trafic vésiculaire (Fig. 17-4). Il a notamment été décrit que LRP1 pouvait améliorer la maturation de l'intégrine $\beta 1$, augmentant ainsi sa présence à la membrane plasmique (Salicioni *et al.* 2004).

■ Même si ce mode de régulation n'a jamais été formellement démontré, il est tout à fait envisageable qu'en interagissant directement ou indirectement avec des protéines membranaires, LRP1 puisse modifier leur répartition membranaire, notamment au niveau des radeaux lipidiques (Fig. 17-5).

Enfin, par sa capacité à modifier la composition de la MEC (Gaultier *et al.* 2006), LRP1 pourrait affecter la stabilité de protéines membranaires interagissant avec la matrice (Fig. 17-6). Ceci a notamment été observé dans le cas de la fibronectine, un ligand de LRP1, qui en son absence s'accumule. Cette accumulation provoque la formation de fibrilles, elles-mêmes à l'origine du regroupement et de l'activation des intégrines (Wierzbicka-Patynowski et Schwarzbauer 2003).

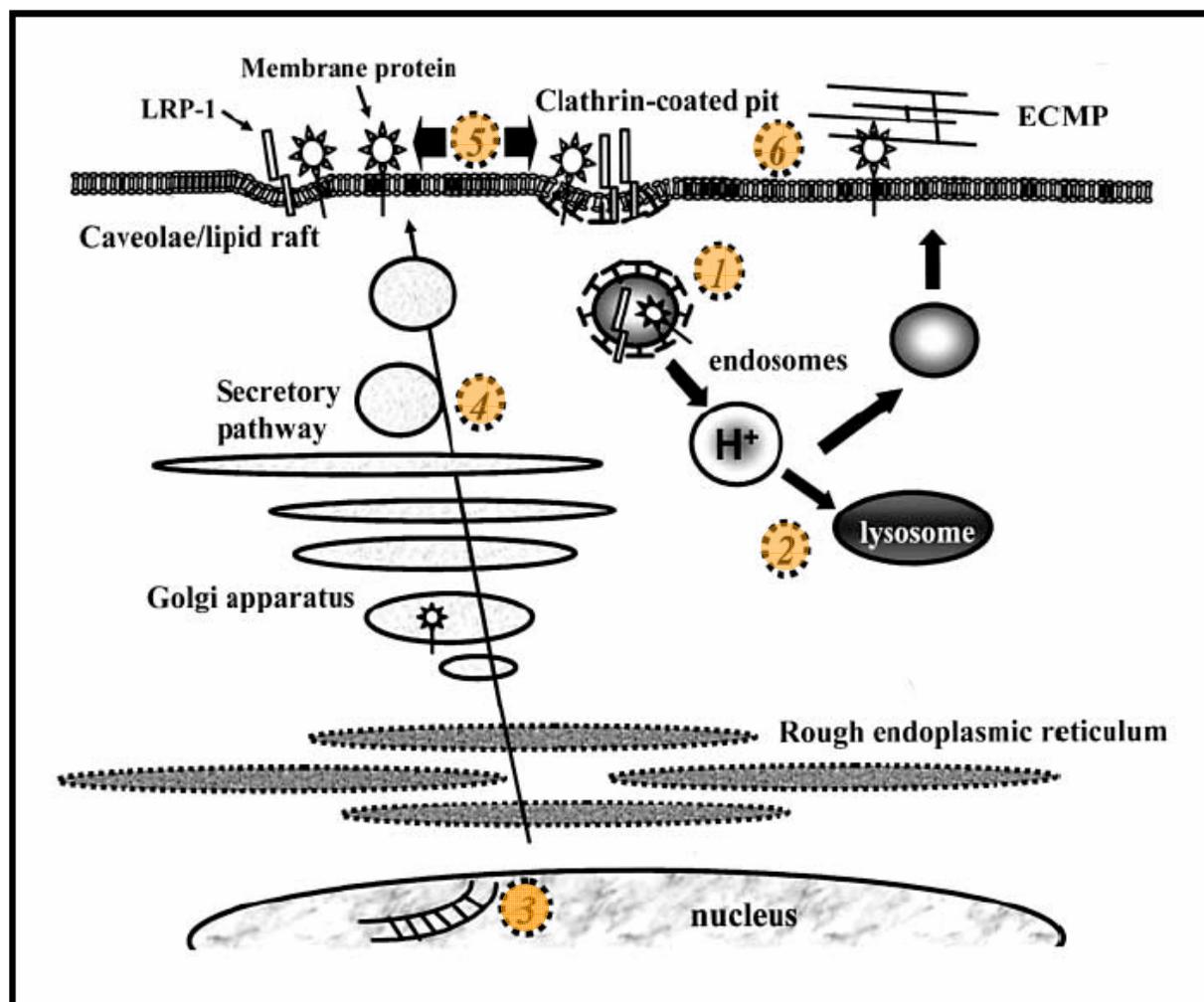


Figure 17 : Les multiples mécanismes par lesquels LRP1 pourrait moduler le protéome membranaire. (Gonias *et al.* 2004)

III. BUT DU TRAVAIL

L'intérêt croissant pour le décryptage du rôle de LRP1 dans le cancer a poussé notre équipe à étudier et à mieux caractériser les fonctions de ce récepteur dans la pathologie tumorale. Différentes approches expérimentales ont donc été menées au sein de notre équipe ces dernières années. Nous avons par exemple entrepris de moduler l'expression de LRP1, notamment par différentes approches d'interférence à l'ARN sur une lignée de cellules de carcinome thyroïdien (FTC133) (Dedieu *et al.* 2008). De façon surprenante, bien que les événements protéolytiques associés au microenvironnement tumoral soient nettement augmentés dans les clones déficients en LRP1, nous avons observé que l'invasion tumorale était fortement altérée. Des études en microscopie confocale ont révélé que ces cellules présentaient des changements morphologiques majeurs avec principalement une perte des protrusions et projections membranaires, une augmentation de la surface cellulaire et une stabilisation des fibres de stress et de l'actine corticale. Nous avons également démontré que ces clones possédaient une cinétique d'adhérence accrue sur différents substrats (gélatine, fibronectine, vitronectine...) et présentaient une capacité moindre à se détacher de ces substrats. Lors de cette étude, nous avons également mis en lumière la capacité du récepteur LRP1 à réguler la composition moléculaire et la dynamique des adhérences focales. L'ensemble de ces résultats expliquent pourquoi les cellules déficientes en LRP1, moins aptes à rompre les contacts focaux et à se détacher du substrat, apparaissent très peu invasives malgré des activités protéolytiques accumulées au niveau péricellulaire. Ainsi, le récepteur LRP1 semble pouvoir se comporter comme un mécanosenseur du microenvironnement tumoral et participer au maintien d'une balance optimale entre les processus d'adhérence et de dé-adhérence à la matrice, favorisant ainsi la progression tumorale.

Ces travaux originaux nous ont donc permis de faire émerger de nouvelles fonctions pour ce récepteur au niveau de la cellule tumorale et de son microenvironnement. Mon projet de recherche s'inscrivait dans la continuité directe de ces travaux originaux et prometteurs. Ce projet visait à identifier un nouveau partenaire d'interaction pour LRP1, capable de coopérer avec lui dans le contrôle de l'adhérence tumorale. Nos résultats ont révélés que CD44, le principal récepteur de l'acide hyaluronique, constituait un nouveau partenaire de LRP1 à la surface cellulaire et que cette interaction était impliquée dans la régulation de la progression

tumorale. La mise en évidence et la caractérisation du complexe moléculaire LRP1/CD44, jamais décrit auparavant, a fait l'objet de la plus grande partie de mes travaux de thèse.

MATERIEL
ET
METHODES

Matériel et méthodes

I. MODÈLE ET CULTURE CELLULAIRE

I.A. MODÈLE CELLULAIRE

Les cellules utilisées lors de tous nos travaux sont dérivées d'un cancer folliculaire thyroïdien d'un patient de 42 ans, qui s'est ensuite généralisé. Elles sont dénommées FTCs (*Follicular Thyroid Carcinomas*) et nous ont été fournies par *European Collection of Cell Cultures* (ECACC).

La lignée de cellules FTC133 (N° ECACC 94060901) est une lignée immortalisée établie à partir d'une métastase lymphatique de ce patient. Elles ont conservé leurs fonctions de thyrocytes différenciés et restent sensibles à la thyrotropine (TSH). Elles sont également sensibles à d'autres facteurs de croissance comme l'EGF et l'IGF. Bien que pour certains auteurs, elles ne semblent pas posséder de récepteurs à la TSH (Derwahl *et al.* 1993), une autre équipe a montré que les FTC133 l'exprimaient, mais que la transduction du signal était déficiente (Demeure *et al.* 1997). Elles possèdent également une immunoréactivité à la thyroglobuline. Ces cellules présentent un caractère peu invasif. Elles comportent en revanche un fort indice de prolifération, qui nécessite toutefois un apport en sérum de veau foetal (SVF) pour leur entretien *in vitro*.

Une autre lignée cellulaire dérive du même patient, les FTC238 qui proviennent quant à elles d'une métastase pulmonaire. Ces lignées présentent un caractère invasif bien plus important, mais elles n'ont toutefois pas été utilisées dans nos travaux car leur expression de LRP1 est moindre que dans les FTC133. Néanmoins, l'intérêt d'exploiter en parallèle ces lignées selon leur différences d'agressivité, a donné lieu à plusieurs publications (Hoelting *et al.* 1996; Hölting *et al.* 1994; Sid *et al.* 2006).

I.B. CULTURE CELLULAIRE

Les cellules FTC133 sont cultivées à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂ dans du milieu composé de D-MEM (*Dulbecco-modified Eagle medium*) et de Ham's F-12, en proportion 1:1, contenant du Glutamax-1 (PAN Biotech) et supplémenté avec 10% (v/v) de SVF (PAN Biotech) préalablement inactivé.

Lorsqu'elles sont confluentes, les cellules sont lavées au PBS (*Phosphate Buffer Saline* ; 138 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl ; Sigma) puis détachées à la trypsine-EDTA 0,05% (acide éthylène diamine tétracétique ; Invitrogen) pendant 3 minutes. La réaction est arrêtée par l'ajout de milieu complet et les cellules sont délicatement homogénéisées pour éviter les agrégations avant comptage en cellules de Malassez. Pour un entretien courant, elles sont diluées au 1/5^{ème} 2 fois par semaine ou 1/10^{ème} une fois par semaine.

L'approvisionnement en cellules pour la culture est réalisé à partir d'un stock conservé dans l'azote liquide. Pour cela, après comptage, les cellules sont ramenées à une concentration de 2.10⁶ cellules/mL dans du milieu nutritif complet. Dans un cryotube, nous déposons 400µL de SVF, 100µL de DMSO (diméthylsulfoxyde) et 500µL de cellules (soit 1.10⁶ cellules). Les cryotubes sont congelés à -80°C dans une boîte spéciale contenant de l'isopropanol ; cet alcool permet une chute lente et régulière de la température de 1°C toutes les minutes, après 24 heures, les cryotubes sont placés dans l'azote liquide.

Afin d'éviter les dérives dans le phénotype des cellules, celles-ci sont utilisées jusqu'à leur 15^{ème} passage. A ce stade, elles sont éliminées et nous procédons à la décongélation d'une nouvelle ampoule. Pour ce faire, nous décongelons rapidement une ampoule de cellules au bain-marie et nous versons la totalité dans un flasque (75cm²) contenant 15mL de milieu complet. Nous laissons adhérer les cellules une nuit avant de réaliser un changement de milieu pour retirer le DMSO résiduel contenu dans le cryotube ainsi que les cellules n'ayant pas survécu à la décongélation, elles sont ensuite cultivées selon le protocole habituel.

I.C. TRAITEMENTS CELLULAIRES

I.C.1. Traitement par RAP

Durant cette étude, les cellules ont subi différents traitements. Le principal est l'utilisation de RAP, une protéine chaperonne de LRP1, qui au niveau intracellulaire permet

un repliement correct de LRP1 et empêche son interaction avec ses ligands à durant la voie d'excrétion. Quand elle est ajoutée de manière exogène, cette protéine agit comme un antagoniste de LRP1 et possède une affinité pour le récepteur de l'ordre du nanomolaire. Elle limite son interaction avec la plupart de ses ligands. La Protéine RAP est synthétisée et purifiée au sein de notre laboratoire (*Cf VII*). Elle est utilisée à une concentration de 500nM pendant 1 heure en milieu complet ou dépourvu de sérum en fonction des conditions expérimentales.

I.C.2. Traitement avec les inhibiteurs de protéases

Pour étudier le *shedding* de CD44, nous avons utilisé différents inhibiteurs de protéases (Tabl. 4). Pour cette étude, les cellules sont déprivées durant 24 heures.

Inhibiteur	Fournisseur	Spécificité	Concentration
E64	Sigma	Cystéine protéase	10 μ M
Pepstatine	Sigma	Aspartyl protéase	15 μ M
Aprotinine	Sigma	Sérine protéase	100 μ g/mL
GM6001	Sigma	Métalloprotéases	1nM

Tableau 4 : Liste des inhibiteurs de protéases.

I.C.3. Déplétion et dosage du cholestérol

La déplétion en cholestérol a été réalisée grâce à la méthyl- β -cyclodextrine (β -MCD ; Sigma) (Rodal *et al.* 1999). Nous avons d'abord effectué une mise au point en faisant une gamme de concentration et de temps de traitement suivie d'un dosage en cholestérol pour mesurer l'efficacité des différentes conditions. Le traitement avec le méthyl- β -cyclodextrine est réalisé dans du milieu sans sérum.

Pour le dosage du cholestérol, nous avons utilisé le kit *Amplex® Red Cholesterol Assay Kit* (Molecular Probes). Ce kit est une méthode fluorimétrique pour la quantification du cholestérol. Le cholestérol contenu dans les cellules est oxydé par la cholestérol oxidase ; cette réaction libère de l' H_2O_2 qui pourra être détecté grâce au 10-acetyl-3,7-

dihydroxyphenoxazine (réactif Amplex Red). Ce réactif, en présence d'HRP (*Horseradish peroxidase*), réagit stoechiométriquement (1 :1) avec l' H_2O_2 pour produire de la résorutine, un composé hautement fluorescent dont les longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont respectivement de 571 et 585 nm.

En pratique, 1.10^6 cellules traitées ou non ont été lavées au PBS avant d'être lysées dans 500 μ L de tampon de réaction 1X (0,1M de phosphate de potassium pH 7,4, 50mM de NaCl, 5mM d'acide cholique, 0,1% de Triton® X100) fourni dans le kit. Après une sonication de 30 secondes, nous avons procédé au dosage du cholestérol en respectant le protocole du fournisseur. L'efficacité de la déplétion sera exprimée en pourcentage de diminution de la quantité de cholestérol des cellules traitées à la methyl- β -cyclodextrine par rapport aux témoins non traités.

I.C.4. Choc osmotique

Le choc osmotique des cellules a pour effet de bloquer l'endocytose, notamment celle employant les vésicules recouvertes de clathrine (Oka *et al.* 1989). Pour effectuer ce choc osmotique, les cellules ont été incubées 1 heure dans du milieu complet additionné de 400mM de saccharose.

Ce traitement a servi durant le test d'endocytose. Le saccharose était ajouté au milieu de culture tempéré à 37°C utilisé lors de la phase d'endocytose à proprement parlée du test.

I.D. TRANSFECTION CELLULAIRE

I.D.1. Les plasmides

Les plasmides permettant la surexpression des minidomains de LRP1 ont été mis au point par la société Vect'Horus (Marseille). Ils ont été réalisés à partir d'un plasmide pEGFP-N1 (Fig. 18) au sein duquel a été clonée la portion de séquence de LRP1 souhaitée. Cette séquence est encadrée par un tag hémagglutinine (HA) en N-terminal qui va nous permettre d'immunoprécipiter spécifiquement le LRP1 surexprimé et un tag GFP (*green fluorescent protein*) en C-terminal facilitant la visualisation des mini-récepteurs surexprimés par fluorescence.

Ainsi, durant nos travaux, trois constructions ont été utilisées :

- **SPCT** : expression de la chaîne β de LRP1 (106 kDa),
- **Mini LRP-II** : expression de la chaîne β de LRP1 couplé à son domaine de liaison II (153 kDa),
- **Mini LRP-IV** : expression de la chaîne β de LRP1 couplé à son domaine de liaison IV (164 kDa).

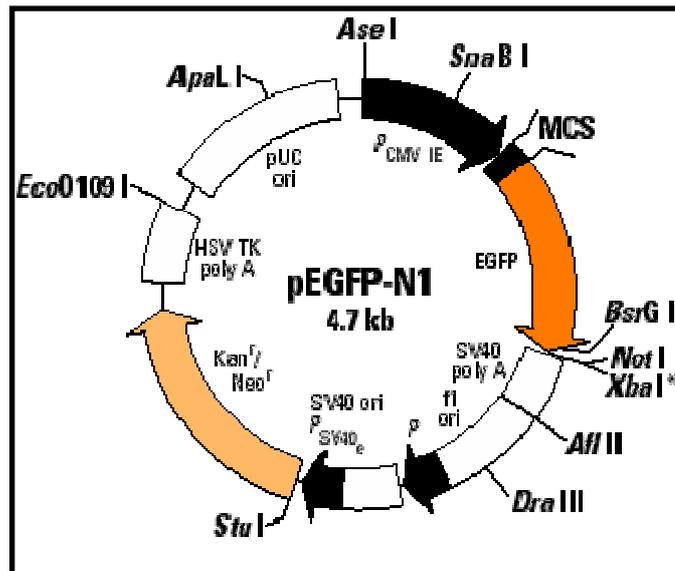


Figure 18 : Représentation schématique du plasmide ayant permis le clonage et l'expression des minidomains de LRP1.

I.D.2. Les siRNA

Les siRNA sont synthétisés par Dharmacon.

Les séquences dirigées contre LRP1 ont été déterminées et validées au sein du laboratoire (Dedieu *et al.* 2008). Leurs séquences sont :

GACUUGCAGCCCCAAGCAGUU et CUGCUUGGGGCUGCAAGUCUU

Les autres siRNA utilisés sont des séquences commerciales développées par Dharmacon (Tabl. 5).

ARNmessagers interférés	Séquences nucléotidiques
Contrôles	UAGCGACUAAACACAUCAA
CD44	GAAUAUAACCGCCGCUUU CAAGUGGACUCAACGGAGA CGAAGAAGGUGUGGGCAGA GAUCAACAGUGGCAAUGGA
MT1-MMP	GAACAAAUACUGGAAAUUC
ADAM10	CAUCUGACCCUAAACCAA CAAGGGAAGGAAUAUGUAA GAACUAUGGGUCUCAUGUA CGAGAGAGUUAUCAAAUGG
ADAM12	CCAAUGCCGUUCCAUAAGA CCAGAGGAAUGUAUGAAUC UCAAGGCAACUAAGUAUGU CAAUGCUCUGUAAGUCAG
ADAM17	GAACACGUGUAAAUAUUG

Tableau 5 : Références commerciales des différents siRNA utilisés.

I.D.3. Mise en œuvre de la transfection transitoire

Les cellules sont introduites en plaques 6 puits (250000 cellules par puits), en milieu supplémenté de 10% de sérum, pendant 24 heures pour permettre leur adhésion avant transfection. Nous procédons ensuite à la transfection transitoire. L'agent transfectant utilisé est la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en respectant les préconisations du fournisseur. Pour la transfection des siRNA, 8µg de Lipofectamine 2000 et 50nM de siRNA sont utilisés. Pour la transfection de plasmides, un rapport plasmide/lipofectamine 2000 de ½ est conservé (soit, pour un puits, 1µg de plasmide pour 2µg de lipofectamine 2000).

En pratique, les cellules sont rincées au PBS avant l'ajout de milieu sans sérum. La quantité de plasmide/siRNA ainsi que la lipofectamine 2000 sont diluées séparément dans de l'OPTIMEM (Invitrogen). Le mélange de lipofectamine 2000 est incubé 5 minutes à température ambiante avant le mélange avec la solution d'acides nucléiques. Le tout est incubé 20 minutes à température ambiante puis ajouté aux cellules. Les cellules sont laissées en contact avec les acides nucléiques pendant 2 heures puis rincées au PBS avant la remise en milieu complet.

Pour la transfection concernant les siRNA anti-LRP1 et anti-CD44, nous estimons que la meilleure efficacité se situe à 48 heures post-transfection. Pour les siRNA dirigés contre les protéases, l'efficacité de l'interférence à l'ARN est suffisante après 8 heures et est maintenue après 24 heures. Enfin, pour la transfection des plasmides exprimant les minidomains de LRP-1 le meilleur compromis entre mortalité des cellules et efficacité de la transfection se situe à 15 heures post-transfection.

I.E. TEST D'ADHÉRENCE

Les tests d'adhérence sont réalisés en plaques 96 puits préalablement recouvertes avec de la gélatine 1% ou de l'acide hyaluronique (Fluka) de haut poids moléculaire à 1mg/mL pendant 1 heure à température ambiante.

50000 cellules fraîchement détachées à la trypine, sont déposées et l'adhésion est permise pendant 30 minutes. Les cellules sont alors lavées 2 fois au PBS et fixées au méthanol pendant une vingtaine de minutes. Après 2 nouveaux rinçages, les cellules sont colorées au cristal violet 0,1% (p/v ; HEPES 0,2M pH6,0 ; acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) pendant 20 minutes. Des rinçages sont effectués jusqu'à ce que le cristal violet non fixé soit éliminé. Celui-ci est alors solubilisé dans 40µL de DMSO sous agitation douce pendant quelques minutes puis l'absorbance est mesurée à 560nm (*Microplate reader Model 550*, Biorad).

I.F. TEST D'ENDOCYTOSE

Le test d'endocytose résulte de la détection de protéines membranaires biotinylées au niveau intracellulaire, ce protocole est inspiré de la méthode utilisée par Wu et Gonias (Wu et Gonias 2005). Pour cela, nous plaçons les cellules sur glace ou à 4°C pour bloquer tout processus d'endocytose. Après 2 rinçages au PBS froid, les protéines membranaires sont biotinylées (*Cf III.F.*). Après 2 nouveaux rinçages, les cellules sont mises en présence de glycine 100mM pendant 15 minutes. Après lavages, les cellules sont remises en milieu complet à 37°C à l'étuve pendant 1 heure pour permettre l'endocytose. Elles sont de nouveau mises sur glace et traitées avec 1mg/mL de pronase (*Protease type XIV bacterial from*

Streptomyces griseus ; Sigma) pendant 10 minutes afin de dégrader toutes les protéines à la surface cellulaire. Après resuspension, les cellules sont centrifugées 10 minutes à 1000rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire subit une lyse (*Cf III.C.*), suivie d'un dosage protéique. Entre 500 et 750µg de protéines sont ensuite mis en contact une nuit avec 40µL de billes avidine agarose. Après 5 rinçages des billes avec le tampon de lyse, les protéines biotinylées fixées sont dénaturées dans du tampon d'échantillon 5 minutes à 100°C, centrifugées à 10000g pendant 10 minutes et enfin déposées sur gel pour analyse par Western blot.

Pour valider l'efficacité de cette expérience, il nous a fallu contrôler l'efficacité « décapante » de la pronase. Pour cela, nous avons réalisé un témoin à 4°C sans traitement à la pronase correspondant à la totalité des protéines membranaires biotinylées et un témoin conservé à 4°C mais traité à la pronase reflétant l'efficacité de celle-ci. La comparaison de ces deux conditions montre que la pronase dégrade presque la totalité des protéines membranaires.

II. ETUDE DES ARN MESSAGERS

II.A. EXTRACTION DES ARN TOTAUX

Les cellules sont lavées une à deux fois au PBS à 37°C, puis sont lysées avec 500µL de Trizol froid (*Extract All* ; Eurobio) en procédant à des aspirations/refoulements sur toute la surface du puits. Le lysat est introduit dans un eppendorff, vortexé une fois et laissé à température ambiante 5 minutes. Ensuite 100µL de chloroforme : IAA (alcool isoamylique) 24 : 1 est ajouté (un rapport chloroforme : IAA/trizol de 1/5^{ème} doit être respecté). Le mélange est vortexé fortement puis incubé 3 minutes à température ambiante avant centrifugation à 12000g (15 minutes à 4°C). La phase aqueuse (incolore) est récupérée et de nouveau le même volume de chloroforme : IAA est ajouté pour répéter la procédure. La phase aqueuse est de nouveau récupérée et un volume équivalent d'isopropanol est additionné. On procède à une agitation douce par retournement pour précipiter l'ARN, puis on incube 10 minutes à température ambiante avant centrifugation à 12000g (10 minutes à 4°C). Le surnageant est éliminé et les ARN sont lavés avec de l'éthanol 75% pour éliminer les sels. Après une centrifugation de 5 minutes à 7500g (à 4°C), l'éthanol est éliminé et le culot d'ARN est séché

complètement à température ambiante, avant d'être resuspendu dans de l'eau stérile. Les échantillons sont congelés à -20°C immédiatement avant dosage.

Le dosage est réalisé par spectrométrie à 260nm (*Biowave DNA*, WPA). Les ARN sont dilués au 1/70^{ème} dans de l'eau stérile. Pour des ARN de qualité, le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ doit être compris entre 1,8 et 2,0. Une solution d'ARN à 100 µg/mL est alors réalisée et nous servira à la vérification électrophorétique de la bonne qualité des ARN puis à la synthèse d'ADNc.

II.B. TRANSCRIPTION INVERSE

La synthèse d'ADNc a été réalisée à l'aide du kit *Verso SYBR 2-Step QRT Rox* (Thermo scientific) à partir de 1µg d'ARN totaux. La réaction se déroule durant 30 minutes à 42°C. Chaque tube réactionnel contient le tampon spécifique de l'enzyme, 0,4mM de chaque dNTP, 125ng d'oligoDT, 300ng d'hexamères, 1µg d'ADNc, l'enzyme et son catalyseur (QSP avec de l'eau).

II.C. RT-PCR ET PCR EN TEMPS RÉEL

Les amorces sont synthétisées par Eurogenetec et leurs séquences sont les suivantes (Tabl. 6).

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est ensuite réalisée à partir de 0,5µL d'ADN complémentaires, en présence de 0,25 unités de Taq polymérase, 200µM de dNTP, 1,5mM de MgCl₂ et 400nM d'amorces. Pour observer des différences dans l'expression de gènes, nous réalisons 25 cycles afin d'être dans la phase exponentielle de la PCR. Pour observer l'expression de variants de CD44 nous procédons à 35 cycles (Akisik *et al.* 2002).

La PCR en temps réel a été effectuée grâce au kit *Absolute QPCR SYBR Green Rox* (Thermo Fisher Scientific) et à l'aide du *Chromo4 Real-Time Detector* (Bio-Rad). Les résultats représentés sont représentatifs de 3 expériences distinctes.

Gène cible	Amorces (-5' -3')	Tm	Taille fragment
LRP-1	F : -AGAAGTAGCAGGACCAGAGGG-	60°C	301pb
	R : -TCAGTACCCAGGCAGTTATGC-		
CD44	F : -CCACATTCTGCAGGTTTCCTT-	60°C	89pb
	R : -GTGATCAACAGTGGCAATGG-		
CD44 variants	F : -ACACATATTGCTTCAATGCTTCAGC-	55°C	CD44s : 482pb CD44v : >482pb
	R : -GATGCCAAGATGATCAGCCATTCTGGA-		
βactine	F : -GTGTGACGTGGACATCCGC-	60°C	91pb
	R : -CTGCATCCTGTCCGGCAATG-		
MT1-MMP	F : -GGGACCTACGTACCCACACA-	60°C	194pb
	R : -GTAGCGCTTCCTTCGAACATT-		
ADAM10	F : -GCAACATCTGGGGACAAACT-	60°C	200pb
	R : -GCATCGAAGCAGCATTCATCT-		
ADAM12	F : -GGGCTGTAGCTGTCAAATGG-	60°C	168pb
	R : -CTGACTTCCGGCAGGTTAAA-		
ADAM17	F : -AAAGGCGTGTCTACTGCAC-	60°C	112pb
	R : -GGATGCATTTCCCATCCTTAC-		

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées en PCR semi-quantitative.

II.D. MIGRATION SUR GEL D'AGAROSE

Afin de vérifier l'intégrité des ARN totaux extraits et de contrôler les résultats de RT-PCR, nous réalisons une migration électrophorétique en gel d'agarose. Le pourcentage d'agarose utilisé varie suivant la taille des fragments à visualiser, il va de 1% (p/v) d'agarose pour la migration des ARNs totaux à 1,8% (p/v) pour les fragments d'amplification dont la taille est proche de 100pb.

Les gels sont réalisés en solubilisant par chauffage l'agarose dans un tampon TBE 0,5X (0,11M de Tris pH 8,3, 90mM d'acide borique, 2,5mM d'EDTA). Pour la visualisation des acides nucléiques, du BET est ajouté (1/50000^{ème} de volume). Après dépôt des échantillons, la migration est réalisée dans du TBE 0,5X à 100V. Les résultats sont visualisés grâce au *GelDoc* (Biorad).

III. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS PROTÉIQUES

III.A. PRÉLÈVEMENT DES MILIEUX CONDITIONNÉS ET CONCENTRATION

Les milieux conditionnés sont réalisés en déprivant les cellules dans un milieu sans sérum durant 24 heures. Les surnageants de culture sont prélevés puis centrifugés à 1000rpm pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les débris cellulaires et sont ensuite conservés à -20°C.

Pour pouvoir être analysés par Western blot, les milieux conditionnés sont concentrés 20 à 50 fois par centrifugation en Vivaspin (Sartorius) dont le seuil de coupure est 10 kDa. Afin que le rouge de phénol contenu dans le milieu de culture n'interfère pas avec la suite des expérimentations (dosage protéique), de l'eau distillée est ajoutée durant la concentration jusqu'à disparition de la coloration rosée.

III.B. PRÉPARATION DES EXTRAITS PROTÉIQUES TOTAUX

Après un lavage au PBS, les cellules sont lysées dans un tampon contenant : 1% (v/v) de Triton® X-100, 80mM de glycérophosphate, 50mM d'EGTA (*ethylene glycol tetraacetic*), 15mM de MgCl₂, dilués dans du PBS et équilibré à pH 7,4. Ce tampon est complété avec 1mM d'orthovanadate, 1mM de PMSF (*phenylmethanesulfonylfluoride*) et du PIC (*Protease Inhibitor Cocktail* ; Sigma) dilué au 1/500^{ème}. Le lysat cellulaire est incubé 20 minutes dans la glace en vortexant toutes les 5 minutes puis de nouveau 20 minutes dans la glace sans agitation. Cette suspension est centrifugée 30 minutes à 4°C à 20000g. Le surnageant est récupéré et conservé à -20°C avant analyse.

III.C. PRÉPARATION DES EXTRAITS PROTÉIQUES ENRICHIS EN MEMBRANES

Après un lavage au PBS, les cellules sont lysées dans un tampon contenant 10mM de Tris, 150mM de NaCl, 1% de Triton® X-100 et 5mM d'EDTA dilués dans de l'eau et ajusté à un pH 7,5. Ce tampon est complété avec 1mM d'orthovanadate, 1mM de PMSF et du PIC

dilué au 1/500^{ème}. Le lysat est incubé 30 minutes dans la glace en vortexant toutes les 5 minutes. Après une centrifugation à 10000g pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant est récupéré et conservé à -20°C avant analyse.

III.D. PRÉPARATION DES EXTRAITS PROTÉIQUES ENRICHIS EN RAFTS

Les rafts sont des microdomaines membranaires riches en cholestérol et relativement résistants aux détergents classiques, on parle alors de DRM (*detergent resistant domain*). Ce protocole permet une purification en plus grande quantité des protéines contenues dans ces microdomaines.

La partie technique est identique à la préparation d'extraits protéiques enrichis en membranes. Néanmoins le tampon est composé de 10mM de Chaps, 150mM de NaCl, 20mM d'Hepes et 2mM de CaCl₂. Ce tampon est complété avec 1mM d'orthovanadate, 1mM de PMSF et du PIC dilué au 1/500^{ème}.

III.E. DOSAGE PROTÉIQUE

Pour déterminer la concentration en protéines de nos échantillons, nous avons utilisé la méthode de Bradford (Bradford 1976). Cette méthode colorimétrique est basée sur la variation d'absorbance, se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans l'échantillon protéique.

Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouges et vertes avec une absorption à 465-470nm ; alors que les formes anioniques (liées) sont bleues et absorbent à 595nm. Ainsi, l'absorbance est proportionnelle à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

La méthode de Bradford est moins sensible aux interférences dues aux divers agents présents dans les échantillons protéiques que d'autres méthodes de dosage. Elle est toutefois affectée par les détergents, modifiée par le pH, et donne un résultat positif également aux polyphénols hydrosolubles de haut poids moléculaire (tanins) ce qui rend son utilisation délicate pour le dosage d'extraits végétaux.

D'une manière pratique, nous avons réalisé une gamme étalon allant de 2 à 150 μ g/mL, correspondant à l'intervalle de linéarité du colorant, à l'aide de BSA (*Bovine Serum Albumin*). Dans ce contexte, nous avons dosé nos échantillons dilués 500 fois (2 μ L dans 1mL de volume réactionnel final). Le réactif est ajouté (Biorad) et après une brève agitation, l'absorbance est mesurée à 595nm. Les échantillons sont dosés en triplicata et la moyenne des trois valeurs est utilisée pour déterminer la concentration de l'échantillon correspondant.

III.F. BIOTINYLATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux protéines présentes à la surface des cellules. La récupération de cette unique fraction de protéines a nécessité une biotinylation.

La biotinylation des protéines de surface repose sur la très forte affinité entre la biotine et l'avidine. Pour notre étude, nous avons choisi une biotine modifiée, la *Sulfo-NHS-Biotin*, qui a pour particularité de se fixer aux groupements amines des protéines et de ne pas pouvoir traverser la membrane plasmique. Les protéines membranaires ainsi couplées à la biotine pourront être purifiées par affinité grâce à l'avidine.

A 4°C, les cellules sont lavées au PBS, puis incubées 30min avec de la *EZ-Link*® *Sulfo-NHS-LC-Biotin* (Pierce) à 0,5mg/mL diluée dans du PBS. Après trois nouveaux rinçages, les cellules sont mises en présence de 100mM de glycine diluée dans du PBS afin d'éviter d'éventuelles fixations aspécifiques de la *Sulfo-NHS-Biotin*. Enfin après trois nouveaux rinçages au PBS, les cellules sont lysées (*Cf III.C.*).

Après dosage protéique, 500 μ g à 1mg de protéines sont mises en contact avec 40 μ L de billes d'agarose couplées à l'avidine (*Monomeric avidin agarose* ; Pierce) préalablement lavées avec 400 μ L de tampon d'extraction de protéines. Le culottage des billes avidine se fait par des centrifugations d'une minute à 10000g à 4°C. Les protéines couplées à la biotine et les billes sont laissées en contact durant une nuit à 4°C sous agitation douce (10rpm). Les billes sont ensuite rincées 5 fois avec 200 μ L de tampon d'extraction avant récupération des protéines biotinylées.

Cette récupération est réalisée selon deux protocoles distincts en fonction de l'emploi ultérieur des protéines biotinylées :

■ Pour un Western Blot, 40µL de tampon d'échantillon 2X (Tris 0,5M pH6,8, bleu bromophénol 0,2%, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 4%, saccharose 8%) sont ajoutés. La solution est incubée 5 minutes à 100°C avant une centrifugation pendant 10 minutes à 10000g. Le surnageant est alors récupéré pour subir une séparation électrophorétique.

■ Pour une immunoprécipitation, nous procédons à une compétition avec 50µL de D-Biotine Immunopure (Pierce) à une concentration de 10 mM pendant une journée ou une nuit à 4°C sous agitation douce (10rpm). Après une centrifugation à 10000g pendant 10 minutes à 4 °C, le surnageant est récupéré pour subir une immunoprécipitation. Pour augmenter le volume de réaction, nous ajoutons 200µL de PBS.

III.G. IMMUNOPRÉCIPITATION

Sept cent cinquante microgrammes à 1mg de protéines sont aliquotés puis incubés en présence d'anticorps (IgG) (Tabl. 7) pendant une nuit à 4°C sous agitation douce (10rpm). Ensuite 40µL de protéines G sépharose (GE Healthcare) sont rincées avec le tampon d'extraction approprié puis le mélange protéines/anticorps est ajouté. L'immunoprécipitation est réalisée à 4°C sous agitation douce (10rpm) pendant 4 heures. Après centrifugation à 2000g à 4°C pendant 2 minutes, le culot de billes est rincé trois fois avec 200µL de tampon d'extraction. Après le dernier lavage, 40µL de tampon d'échantillon 2X sont ajoutés sur les billes et les protéines sont dénaturées 5 minutes à 100°C. Après centrifugation à 10000g pendant 10 minutes, le surnageant est soumis à une séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes.

Anticorps	Quantité pour 1mg de protéines
Anti-LRP-1 α -chaîne (8G1)	10µg
Anti-LRP-1 β -chaîne (5A6)	10µg
Anti-CD44 (F-10-44-2)	2µg
Anti-immunoglobuline humaine	10µg

Tableau 7 : Quantités d'anticorps utilisées pour les immunoprécipitations

IV. ISOLEMENT DES RAFTS

Nous avons procédé à l'isolement des rafts par centrifugation différentielle, sans utilisation de détergent et en utilisant un gradient discontinu de saccharose comme préconisé par la méthode de Persaud-Sawin et al. (Persaud-Sawin *et al.* 2009).

Cinq millions de cellules ont été lysées avec 500 μ L de tampon de lyse sans détergent (*Tris Buffer Saline* (TBS) pH8, 1% PIC, 1mM PMSF, 5mM NaF, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂ and 1mM Na orthovanadate). L'extrait récupéré a été passé 20 fois dans une seringue avec aiguille avant centrifugation à 1000g pendant 10 minutes à 4°C. Le volume du surnageant est ajusté à 750 μ L avec le tampon TBS.

La suite des manipulations se déroule sur glace avec des solutions préalablement réfrigérées. Les échantillons sont mélangés avec 750 μ L d'une solution à 85% (p/v) de saccharose/TBS. Dans des tubes de centrifugation pour rotor SW40 (Beckman), nous déposons au fond l'échantillon sur lequel nous ajoutons précautionneusement 10mL d'une solution à 35% (p/v) de saccharose/TBS et pour finir, nous déposons dessus 2mL de TBS contenant 5% (p/v) de saccharose. Les tubes sont centrifugés à 200000g pendant 18 heures à 4°C.

Après centrifugation, un voile peut apparaître à la frontière entre le saccharose 5% et 35%, celui-ci correspond aux rafts. Treize fractions de 1mL sont soigneusement récupérées à partir du haut du tube, aliquotées et conservées à -80°C avant analyse.

Pour vérifier l'efficacité de la méthode, 50 μ L (avec 10 μ L de tampon d'échantillon 5X) de chaque fraction sont déposés en gel de polyacrylamide 10% et analysé par Western-Blot. La cavéoline-1 et le PTRF (*Polymerase I and Transcript Release Factor*, ou cavine1) sont des marqueurs de rafts et plus précisément des cavéoles, le récepteur à la transferrine est un marqueur de la fraction soluble de la cellule. Une immunoprécipitation est effectuée sur 400 μ L de chaque fraction d'intérêt, pour pallier aux problèmes de viscosité due au saccharose, nous ajoutons 400 μ L de TBS au volume réactionnel.

V. ANALYSE DES ÉCHANTILLONS PROTÉIQUES

Cette technique réalisée en de multiples étapes associe la migration sur gel de protéines dénaturées, leur transfert sur membrane et la détection spécifique de protéines grâce à l'immunomarquage.

V.A. DÉNATURATION DES PROTÉINES ET MIGRATION SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

La quantité d'échantillon protéique souhaitée est aliquotée et supplémentée de tampon d'échantillon 5X (TrisHCl 0,5M pH6,8, bleu de bromophénol 0,5% (p/v), SDS 10% (p/v), saccharose 20% (p/v)). En fonction de l'anticorps qui sera utilisé, du β -Mercaptoéthanol (β -ME ; 10% (v/v) ; Sigma) pourra être ajouté. Les échantillons sont chauffés ensuite 5 minutes à 100°C pour assurer la dénaturation complète des protéines.

Les échantillons préparés sont déposés sur gel de polyacrylamide pour être séparés selon leur masse moléculaire. La composition des gels de séparation varie de 8 à 10% d'acrylamide selon la (les) protéine(s) observée(s) (Tabl. 8), le gel de concentration contient quant à lui 4% d'acrylamide (Tabl. 9).

La migration est faite à température ambiante à un ampérage constant de 40mA dans un tampon TrisHCl 25mM pH 8,3, glycine 192mM et SDS 0,1%.

% d'acrylamide	8%	9%	10%
TrisHCL 1,5M pH 8,8 (mL)	2,5	2,5	2,5
Acylamide 30% (mL)	2,67	3	3,33
Eau (mL)	4,73	4 ?4	4,07
SDS 10% (µL)	100	100	100
APS 25% (µL)	50	50	50
TEMED (µL)	5	5	5
Volume final (mL)	10	10	10

Tableau 8 : Composition des gels de séparation

% d'acrylamide	4%
TrisHCl 0,5M pH 6,8 (mL)	2,5
Acylamide 30% (mL)	1,34
Eau (mL)	6,06
SDS 10% (µL)	100
APS 25% (µL)	50
TEMED (µL)	10
Volume final (mL)	10

Tableau 9 : Composition du gel de concentration

V.B. TRANSFERT SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE

Une fois la migration électrophorétique terminée, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Whatman) (transfert liquide). Le transfert est réalisé à 70V, à 4°C, dans un tampon TrisHCl 25mM pH 8,3, glycine 192mM et éthanol 20% pendant 2 à 4 heures suivant la masse moléculaire des protéines à étudier.

Une coloration réversible des protéines au Rouge Ponceau (rouge Ponceau S 0,2% (p/v), TCA 3% (p/v)) permet de contrôler l'efficacité et la qualité du transfert.

V.C. IMMUNOMARQUAGE ET VISUALISATION DE PROTÉINES

La membrane de nitrocellulose est saturée pendant 1 heure à température ambiante dans du tampon TBS-T (*Tris Buffered Saline-Tween* : Tris/HCl 50mM pH 7,5, NaCl 150mM, Tween® 20 0,1% (v/v)) contenant 5% (p/v) de lait écrémé. Elle est ensuite incubée une nuit à 4°C sous agitation douce dans une solution de TBS-T/lait 1% (p/v) contenant l'anticorps primaire à la concentration optimale d'utilisation (Tabl. 10). Elle est alors lavée 3 fois 5 minutes avec du TBS-T puis incubée 1 heure à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire dilué au 1/5000^{ème} couplé à la peroxydase et toujours dilué dans une solution TBS-T/lait 1% (p/v). Après 3 lavages de 5 minutes au TBS-T, les protéines sont révélées par chimioluminescence (kit ECL, Millipore.) à l'aide du ChemiDoc (Biorad).

Anticorps	Fournisseur	Dilution	Anticorps secondaire	Taille protéine
LRP-1 α (8G1)	Calbiochem	1/1000	Souris	515 kDa
LRP-1 β (5A6)	Calbiochem	1/1000	Souris	85 kDa
CD44 (A020)	Calbiochem	1/1000	Rat	85-95 kDa
PTRF	Bethyl	1/2000	Lapin	56 kDa
Cavéoline-1	Cell signalling	1/500	Lapin	21 kDa
TfR	Abcam	1/100	Lapin	85 kDa

Tableau 10 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot.

Après révélation, la membrane peut, au besoin, être rincée au TBS-T, séchée et conservée à sec à 4°C. Un nouvel anticorps primaire peut être testé après un décapage de la membrane, que l'on incube dans un tampon glycine 100mM pH2,5 pendant 4 heures sous agitation orbitale. Après trois lavages de 5 minutes au TBS-T pour rétablir le pH, la membrane peut de nouveau être utilisée.

VI. IMMUNOMARQUAGES ET MICROSCOPIE

VI.A. IMMUNOMARQUAGES

Pour l'immunomarquage, les cellules sont déposées sur des lamelles rondes en verre de 12mm (VWR) de diamètre préalablement recouvertes 1 heure avec de la gélatine 1% (p/v d'eau) stérile. Les cellules sont déposées en milieu nutritif complet sur ce support. Le nombre de cellules et le temps de culture sur lamelles avant marquage dépend des conditions testées : cellules isolées ou confluentes, ou du comportement observé : adhérence ou migration.

Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS à 37°C puis fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% (p/v) (Electron Microscopy Sciences) pendant 5 minutes. A partir de cette étape, toutes les solutions de lavages ainsi que les solutions d'incubations sont réalisés avec du PBS-B (131mM NaCl, 5,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄ ; Biomérieux) qui permet une meilleure conservation de la fluorescence. Après deux lavages, les cellules sont saturées par une solution de PBS-B/BSA 3% (p/v) pendant 1 heure. Ensuite, la solution d'anticorps à la concentration adéquate (Tabl. 11) diluée dans le PBS-B est incubée avec les cellules pendant 45 minutes. Après 3 rinçages, la solution d'anticorps secondaire correspondante est appliquée pendant la même durée. Dans le cas de doubles marquages, une courte resaturation est effectuée pendant 30 minutes puis les incubations avec les anticorps

suivants sont réalisées de la même manière. Les cellules sont rincées 5 fois au PBS-B et le montage est réalisé dans du milieu contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, *ProLong® Gold antifade reagent with DAPI*; Molecular Probes) pour le marquage nucléaire.

Anticorps primaire	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
LRP-1 β (5A6)	1/100	Alexa488	1/100
CD44 (A020)	1/100	Alexa488 ou 568	1/100
EEA1	1/100	Alexa568	1/100
LAMP1	1/200	Alexa568	1/50

Tableau 11 : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence

VI.B. ACQUISITION DES IMAGES EN MICROSCOPIE

Les acquisitions en immunofluorescence ont été réalisées avec le microscope confocal Zeiss LSM 710 (zeiss, heidelberg) et le logiciel Zen. Les différents fluorochromes ont été excités en utilisant la raie laser appropriée. Pour une même expérience, les réglages de l'appareil sont identiques entre chaque condition (puissance laser, gain...). Nous avons utilisé un objectif 63x et un $z=0.200\mu\text{m}$. Les images ont été traitées et reconstruites avec les logiciels ImageJ et Amira (projections, représentations surfaciques).

VII. PURIFICATION DE LA PROTÉINE RAP

RAP avec une hexahistidine tag est cloné dans un vecteur pT7 (Fig. 19) et transformé dans des E. coli BL21 pLysS. Le plasmide pT7H6FX-RAP (Ampicilline résistant) a été fourni par le Docteur Morten Nielsen (*The Danish National Research Foundation Centre for Cardiac Arrhythmia and Department of Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark*).

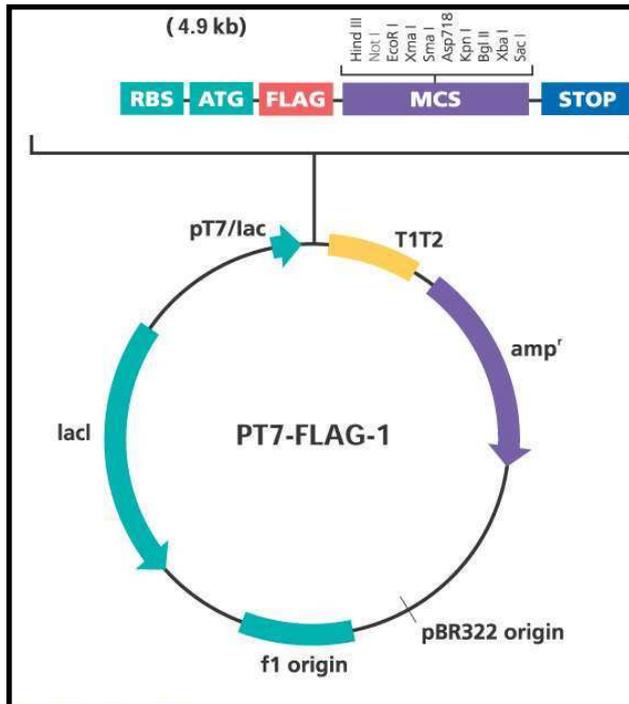


Figure 19 : Schéma du plasmide pT7 ayant permis le clonage et l'expression du gène de la protéine RAP taggée par un hexahistidine.

Dans un premier temps, nous procédons à l'amplification bactérienne en partant d'une préculture contenant 5 mL de LB Broth (AthenaES) supplémenté en ampicilline (200 μ g/mL) et en chloramphénicol (25 μ g/mL) ; un petit volume de bactérie (20 μ L) y est ensemencé. L'amplification des bactéries est permise une nuit à 37°C sous agitation douce (200rpm). La totalité de la préculture est ensuite versée dans 250mL de milieu de culture identique au précédent, la croissance de la culture est vérifiée régulièrement par lecture de la densité optique à 600nm. Lorsque celle-ci est comprise entre 0,5 et 0,6, nous ajoutons l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, 0,4mM final) pour stimuler l'expression de la protéine par les bactéries, puis la culture est laissée en incubation une nuit à 37°C sous agitation (200rpm).

Les bactéries sont ensuite centrifugées à 3500rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le culot bactérien est repris dans 12,5mL (1/20^{ème} du volume de culture) de tampon HEPES 0,25M, imidazole 15mM pH 7,25 final, les bactéries subissent une sonication de 2 cycles de 30 secondes avec remise dans la glace entre chaque sonication jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'agrégats. Enfin le lysat est centrifugé à 10000g pendant 30 minutes à 4°C, seul le surnageant sera utilisé pour la purification.

La purification de la protéine RAP recombinante exprimant l'étiquette « 6 histidines » est rendue possible grâce à des billes de Nickel-agarose (Ni-NTA agarose ; Qiagen). Trois millilitres de ces billes sont nettoyées avec du tampon HEPES et centrifugées à 3000g à 4°C pendant 2 minutes afin de les sédimenter. La solution de lavage est retirée en veillant à ce que les billes ne sèchent pas par la suite. Le surnageant issu de la lyse bactérienne est ensuite ajouté sur les billes et incubé sous agitation à 4°C pendant 1 heure. Le mélange extrait bactérien/billes est déposé dans une colonne bouchée, une fois que les billes ont sédimenter par gravité, le bouchon est retiré pour laisser s'écouler le lysat bactérien, la protéine RAP restant accrochée aux billes. Les billes sont ensuite lavées avec un grand volume de tampon HEPES (environ 50 volumes de billes). Enfin, la protéine RAP est éluée une dizaine de fois avec 0,5mL d'imidazole à 250mM.

Afin de vérifier la présence et la pureté de la protéine RAP, nous déposons chacun des éluats sur gel de polyacrylamide 10%. Après migration en conditions dénaturantes, le gel est coloré au bleu de Coomassie (0,1% p/v de bleu de Coomassie, 40% v/v de méthanol, 10% v/v d'acide acétique). Les fractions les plus chargées en protéines (généralement les fractions 2 à 7) subissent une étape de concentration et de changement de tampon en Vivaspin. L'imidazole est ainsi remplacé par du PBS stérile et sa concentration résiduelle est estimée à 15mM. Le RAP est ensuite dosé et aliquoté avant conservation à -20°C.

RESULTATS

Résultats

Lors de précédentes études menées au sein de notre laboratoire, il a été mis en évidence que LRP1 pouvait contrôler les mécanismes d'adhérence et de dé-adhérence cellulaire dans un contexte tumoral (Dedieu, *et al.* 2008). Pour compléter ces recherches, nous avons voulu déterminer si LRP1 pouvait réguler le comportement des cellules tumorales en modifiant le protéome membranaire.

CHAPITRE I : MISE EN ÉVIDENCE D'UN NOUVEAU PARTENAIRE DE LRP1 : CD44, RÉCEPTEUR DE L'ACIDE HYALURONIQUE.

Dans cette première partie, nous avons tenté de découvrir un nouveau partenaire de LRP1 capable d'influencer le comportement adhésif des cellules. Pour cela, des tests d'adhérence ont été réalisés sur des substrats matriciels variés (gélatine, fibronectine, vitronectine, acide hyaluronique). Les résultats les plus probants concernent l'acide hyaluronique (Fig. 20).

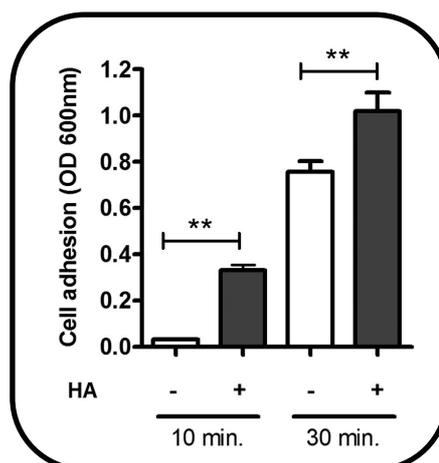


Figure 20 : L'adhérence des cellules FTC133 est fortement augmentée sur l'acide hyaluronique.

Cinquante mille cellules ont été ensemencées sur de la gélatine 1% (-HA) ou sur de l'acide hyaluronique à 1mg/mL (+HA). Au bout de 10 ou 30 minutes, les cellules adhérentes ont été lavées, fixées grâce au méthanol puis colorées au cristal violet 0,1%. Après plusieurs rinçages, le cristal violet a été dissout dans 40µL de DMSO et l'absorbance a été mesurée à 600nm. **, $p < 0,01$

Nous avons en effet pu remarquer qu'un plus grand nombre de cellules FTC133 adhèrent sur l'acide hyaluronique par rapport à la gélatine. Ceci est d'autant plus remarquable que le temps d'adhérence est court. Nous observons par exemple que huit fois plus de cellules adhèrent sur ce substrat au bout de 10 minutes par rapport à un *coating* gélatine.

L'acide hyaluronique dispose de différents récepteurs, mais un seul est exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme, il s'agit de CD44. Ce récepteur impliqué entre autre dans l'adhérence et la migration des cellules a été montré comme pouvant participer à la tumorigenèse (Marhaba et Zöller 2004). A ce propos, il a été mis en évidence une augmentation de son expression dans certains cancers thyroïdiens (folliculaires et papillaires) par rapport aux cellules thyroïdiennes saines (Figge *et al.* 1994). Toutefois, ce récepteur est connu pour posséder de nombreuses formes, dues à des glycosylations différentielles, ainsi que différents variants, produits de l'épissage alternatif d'une dizaine d'exons présents au cœur de son gène (Goodison *et al.* 1999). L'expression de variants de CD44 pouvant radicalement modifier le comportement cellulaire, notamment dans un contexte tumoral, il est important d'appréhender son profil d'expression dans notre système cellulaire.

A. CARACTÉRISATION DE L'EXPRESSION DE CD44 DANS LES CELLULES FTC133.

Dans un premier temps, nous avons étudié le profil d'expression de CD44 dans des extraits protéiques totaux de cellules FTC133 en conditions réductrices ou non réductrices.

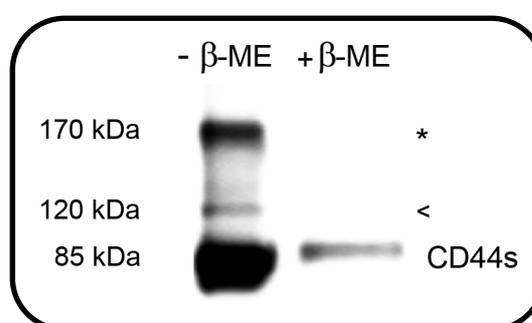


Figure 21 : Différentes formes de CD44 sont exprimées dans les cellules FTC133.

Cinquante microgrammes de protéines totales ont été analysés par Western-blot en conditions réductrices (+β-ME, avec ajout de β-mercaptoéthanol) ou en condition non réductrice (-β-ME, sans ajout de β-mercaptoéthanol).

Les premiers résultats obtenus nous révèlent qu'en condition non réductrices, trois formes de CD44 sont observables (Fig. 21) : une d'environ 170 kDa (*), une seconde minoritaire de 120 kDa (<) et une troisième majoritaire d'approximativement 85 kDa. Cette dernière forme, la plus abondamment exprimée, correspond à la forme standard de CD44, le CD44s, qui ne comporte pas d'exons variants. Les deux autres formes observées pouvant potentiellement être des formes de glycosylations différentielles ou des variants d'épissage.

L'analyse de ce même extrait protéique en conditions réductrices nous donne des précisions sur la forme de 170 kDa de CD44. En effet, ce récepteur est connu pour pouvoir former des dimères, notamment grâce à la présence d'une cystéine très conservée dans son domaine transmembranaire (Ponta *et al.* 2003). Après l'ajout de β -mercaptoéthanol, un composé chimique dissociant les ponts disulfures, nous n'observons plus la forme à 170 kDa de CD44. De plus, cette masse moléculaire de 170 kDa correspond parfaitement au double du poids moléculaire de la forme standard du récepteur (85 kDa). Ces résultats suggèrent que le CD44 apparaissant à 170 kDa en conditions non réductrices correspond à un dimère du CD44s.

En revanche, à ce stade, aucune autre conclusion ne peut être apportée sur la forme de CD44 de 120 kDa.

Pour compléter notre analyse, nous avons recherché le nombre de variants d'épissage de CD44 exprimés dans nos cellules. Nous avons pour cela réalisé une PCR semi-quantitative sur les ADN complémentaires issus de la transcription reverse des ARN totaux des cellules FTC133. Nous avons utilisé un couple d'amorces préalablement validé et s'hybridant de part et d'autre de la région variable du gène de CD44 (Akisik *et al.* 2002).

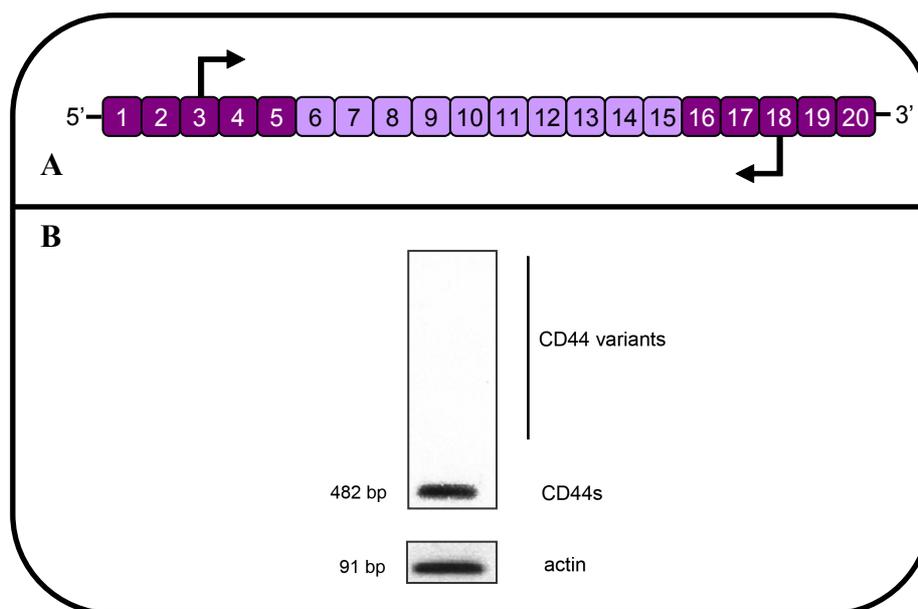


Figure 22 : Seule la forme standard de CD44 est exprimée dans les cellules FTC133.

- A. Représentation schématique du gène de CD44 composé des exons constitutivement exprimés (1 à 5 et 16 à 20) ainsi que de sa région variable centrale (exons 6 à 15). Les amorces utilisées, issues des travaux du Dr. Akisik et collaborateurs (Akisik *et al.* 2002), sont représentées par les flèches coudées et s'hybrident au niveau de l'exon 3 et de l'exon 18, encadrant ainsi la région variante.
- B. Les ARN totaux de cellules FTC133 ont été analysés par PCR semi-quantitative avec des amorces encadrant la région variante du gène (A). Trente cinq cycles de PCR ont été réalisés et le produit PCR a été analysé après migration en gel d'agarose à 1% (p/v).

Le couple d'amorces utilisé pour l'amplification du gène de CD44 doit générer un amplicon de 482pb pour la forme standard de CD44 (Fig. 22A). Les formes variantes, intégrant un ou plusieurs exons supplémentaires, fournissent des amplicons de plus haut poids moléculaire (Akisik *et al.* 2002). La présence d'une unique bande à 482pb sur notre gel nous indique que seule la forme standard de CD44 est détectable dans notre lignée cellulaire (Fig. 22B). Ainsi, ces résultats sont en corrélation avec les observations précédentes (Fig. 21) et apportent une précision complémentaire quand à la forme de CD44 de 120 kDa qui pourrait correspondre à une forme de glycosylation différentielle du récepteur.

B. ETUDE DE L'EXPRESSION DE CD44 SUITE À L'INHIBITION DE L'ENDOCYTOSE DE LRP1.

Après avoir caractérisé l'expression de CD44 dans nos cellules, nous avons cherché à savoir si sa présence à la membrane plasmique pouvait être modulée par l'activité d'endocytose du récepteur LRP1.

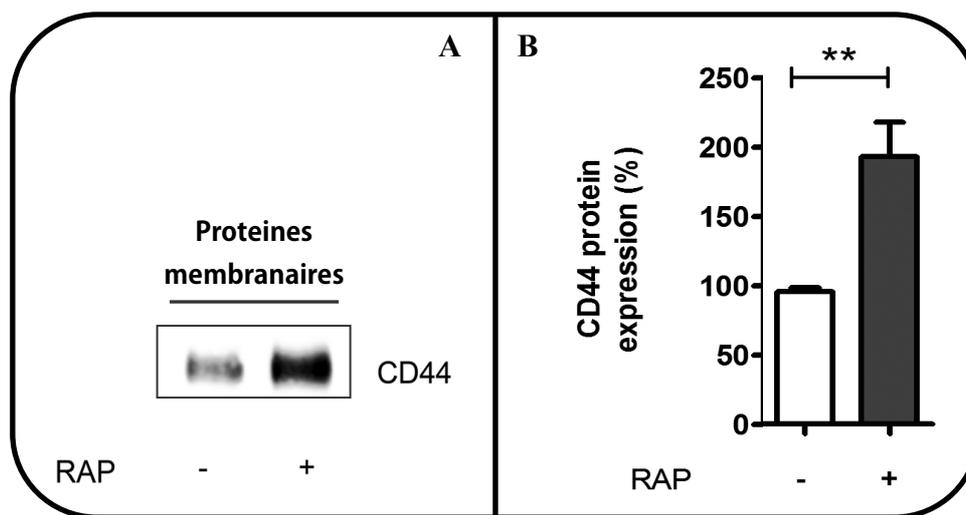


Figure 23 : La présence de CD44 à la membrane est fortement augmentée suite à l'inhibition de LRP1 par RAP.

A. Les cellules FTC133 ont été cultivées jusqu'à confluence puis traitées 1 heure avec 500nM de RAP. Grâce à la biotinylation, les protéines surfaciques ont été récupérées, excluant ainsi la fraction intracellulaire de CD44, et analysées par Western-Blot.

B. Représentation graphique de la quantification après densitométrie. **, $p < 0,01$

Nous pouvons observer que l'inhibition de l'endocytose médiée par LRP1 *via* l'antagoniste RAP provoque une augmentation de la présence de CD44 à la surface des cellules d'environ deux fois (Fig. 23). Ce premier résultat encourageant semble montrer que LRP1 pourrait réguler la présence de CD44 à la membrane et ainsi modifier les fonctionnalités de ce récepteur.

Dans une seconde expérience, nous avons tenté de déterminer si l'inhibition de LRP1 (par RAP ou par interférence ARN) pouvait modifier l'expression transcriptionnelle de CD44. Une étude par PCR quantitative de l'expression de CD44 a donc été réalisée suite à un

traitement avec RAP ou sur des cellules dont l'expression de LRP1 a été invalidée par interférence à l'ARN.

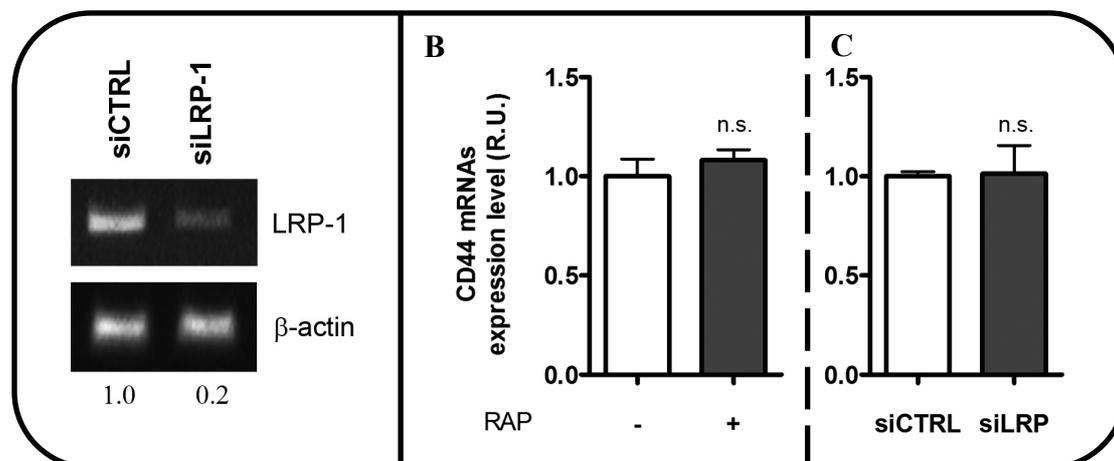


Figure 24 : L'inhibition ou l'invalidation de LRP1 ne modifie pas l'expression transcriptionnelle de CD44.

- A. Les cellules FTC133 ont été transfectées soit avec une séquence contrôle (siCTRL), soit avec une séquence invalidant l'expression de LRP1 (siLRP-1). Les ARN totaux des cellules ont été extraits 48 heures après la transfection pour analyse par PCR semi-quantitative de l'expression de LRP1. L'actine a été utilisée pour normaliser les résultats obtenus.
- B. Les ARN totaux de cellules traitées 24 heures avec 500nM de RAP ont été extraits puis analysés par PCR quantitative avec des amorces spécifiques de CD44.
- C. Des cellules FTC133 ont été transfectées avec des siRNA contrôles ou des siRNA spécifiques de LRP1. A 48 heures post-transfection, les ARN totaux ont été extraits avant analyse de l'expression de CD44 par PCR quantitative. NS, non significatif

Tout d'abord, l'étude par PCR semi-quantitative de l'efficacité des siRNA invalidant l'expression de LRP1 nous montre que les siRNA diminuent de 80% l'expression de LRP1 (Fig. 24A). Ensuite, l'analyse de l'expression transcriptionnelle de CD44 nous indique que ni RAP, ni l'invalidation de l'expression de LRP1 n'induisent de modifications de celle-ci (Fig. 24B et C). Il apparaît donc que si LRP1 est capable de moduler l'expression de CD44, ce mécanisme ne fait pas intervenir l'expression transcriptionnelle de son gène mais plutôt un processus impliquant la protéine CD44.

C. MISE EN ÉVIDENCE DE L'EXISTENCE D'UN COMPLEXE ASSOCIANT LRP1 ET CD44.

LRP1 est connu pour posséder de très nombreux ligands, plus d'une quarantaine ont à l'heure actuelle été répertoriés, mais il peut également, par l'intermédiaire de ceux-ci interagir de manière indirecte avec de nombreuses autres protéines. Ce qui est par exemple le cas avec l'uPAR *via* le complexe uPA/PAI1 ou encore du PDGFR *via* le PDGFBB (Nykjaer *et al.* 1997; Loukinova *et al.* 2002; Boucher *et al.* 2002). De plus, LRP1 et CD44 possèdent plusieurs ligands communs comme la fibronectine (Ponta *et al.* 2003; Herz et Strickland 2001). C'est pourquoi, nous avons voulu déterminer si LRP1 et CD44 étaient suffisamment proches pour co-exister au sein d'un même complexe protéique. Pour cela, différentes expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées.

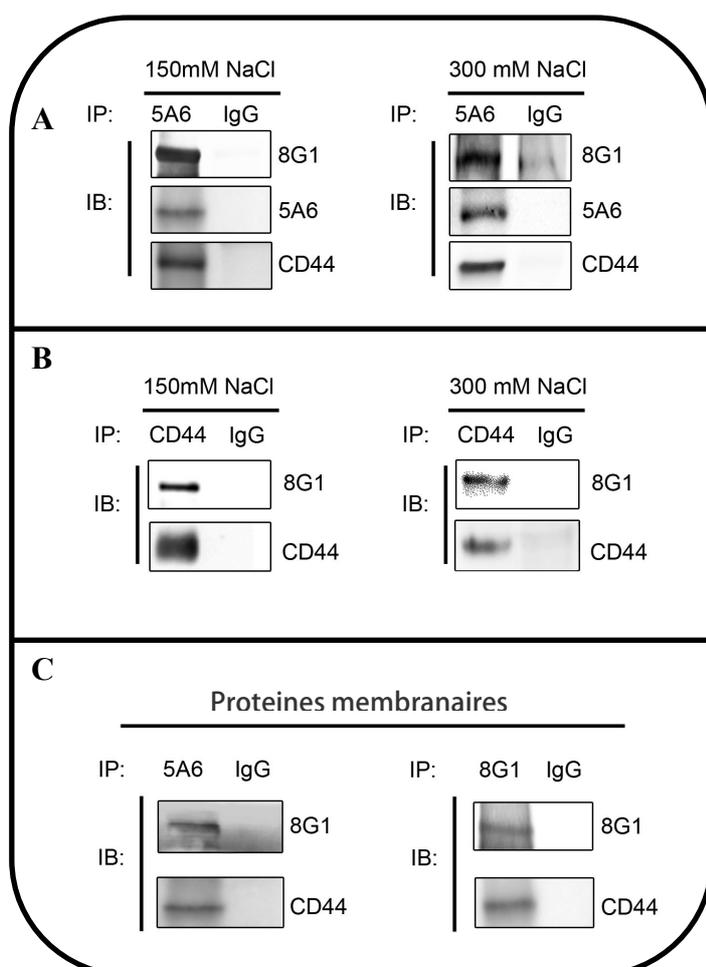


Figure 25 : LRP1 et CD44 peuvent co-exister dans un même complexe protéique.

- A. Immunoprécipitation de la chaîne β de LRP1 (anticorps 5A6) à partir d'1mg d'extrait protéique enrichi en membranes contenant une concentration en NaCl de 150mM. Pour tester la robustesse de l'interaction, la même expérience a été effectuée en utilisant le même tampon d'extraction mais à une concentration en sodium plus drastique de 300mM.
- B. Immunoprécipitation de CD44 à partir de 1mg d'extrait protéique total contenant 150 ou 300mM de NaCl.
- C. Immunoprécipitation de la chaîne α (8G1) ou β (5A6) de LRP1 sur des protéines membranaires préalablement biotinylées.

Dans toutes ces expérimentations, nous avons utilisé des IgG non spécifiques de l'humain pour vérifier la spécificité de nos résultats.

Tout d'abord, nous avons procédé à une mise au point des immunoprécipitations. En effet, l'efficacité de celles-ci dépendait en grande partie du tampon d'extraction utilisé et de la solubilité des protéines concernées dans chacun de ces tampons. Ainsi, nous avons privilégié les extraits protéiques enrichis en membranes ou enrichis en rafts pour l'immunoprécipitation de LRP1 et les extraits protéiques totaux pour CD44 (*Cf Matériel et Méthodes, Ch III-B, C et D*). Concernant LRP1, lorsque nous immunoprécipitons la chaîne β du récepteur, nous co-immunoprécipitons bien sa chaîne α , ce qui valide notre méthode.

La première manipulation nous montre que CD44 est capable de co-immunoprécipiter avec LRP1 (Fig. 25A). Cette interaction apparaît robuste puisqu'elle n'est pas diminuée par une forte concentration en sels. De façon complémentaire, LRP1 peut également co-immunoprécipiter avec CD44 (Fig. 25B). Là encore, les fortes conditions de stringence n'altèrent pas l'interaction entre les deux récepteurs. Ces résultats nous indiquent que LRP1 et CD44 peuvent exister au sein d'un même complexe protéique.

Toutefois, il est nécessaire de vérifier si ce complexe protéique est bien situé à la membrane plasmique des cellules. C'est pourquoi nous avons réalisé une immunoprécipitation de LRP1 sur des protéines membranaires. De nouveau, nous avons pu observer que LRP1 et CD44 co-immunoprécipitent, que ce soit en utilisant un anticorps dirigé contre la chaîne α ou la chaîne β du récepteur cargo (Fig. 25C). Il semble donc évident que ces deux récepteurs coexistent fortement dans un même complexe protéique et que celui-ci est présent à la membrane plasmique.

D. ETUDE DU DOMAINE EXTRACELLULAIRE DE LRP1 IMPLIQUÉ DANS L'INTERACTION AVEC CD44.

LRP1 possède quatre domaines de liaison extracellulaires numérotés de I à IV. De nombreuses études ont montré que les domaines II et IV étaient plus fortement impliqués dans la liaison de ligands (Herz et Strickland 2001). Cependant, des résultats récents indiquent que l'extrémité amino-terminale de la chaîne β peut également induire des interactions moléculaires avec la pro-cathepsine D (Beaujouin *et al.* 2010). Il en va de même avec le domaine intra-cellulaire de la chaîne β (Fe65, Disabled).

Ainsi, nous avons souhaité déterminer par quel(s) domaine(s) LRP1 était capable de lier CD44. Pour ce faire, nous avons utilisé trois constructions pour surexprimer des minirécepteurs de LRP1. La première, **SPCT**, n'exprime que la chaîne β du récepteur, la seconde, **mini LRP-II**, exprime la chaîne β ainsi que le domaine de liaison au ligand numéro II, enfin la troisième, **mini LRP-IV**, exprime la chaîne β ainsi que le domaine de liaison au ligand numéro IV.

Ces trois constructions possèdent un tag hémagglutinine N-terminal et un tag GFP en C-terminal permettant la visualisation de la protéine en fluorescence (Fig. 26A).

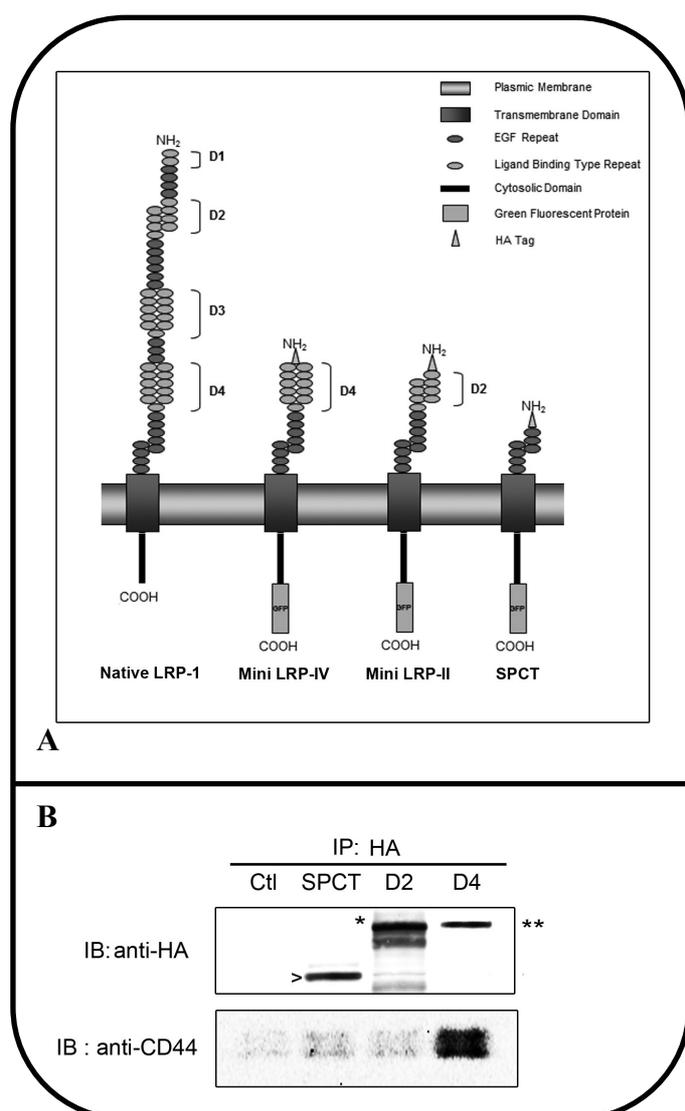


Figure 26 : Le domaine de liaison IV est suffisant pour lier CD44.

- A. Représentation schématique du LRP1 natif ainsi que des minirécepteurs qui en sont dérivés. La forme SPCT contient uniquement la chaîne β du récepteur, les mini-LRP-II et -IV contiennent en plus le domaine de liaison II ou IV, respectivement.
- B. Les cellules ont été transfectées avec le plasmide exprimant la forme SPCT, mini-LRP-II ou mini-LRP-IV taggés HA. Des cellules non transfectées servent de contrôle (Ctl). Les protéines surfaciques ont été biotinylées 24 heures après la transfection avant une immuno-précipitation avec un anticorps anti-HA. Ensuite une analyse par Western-blot a été réalisée avec un anti-HA et un anticorps dirigé contre CD44.

Ces constructions moléculaires ont été obtenues auprès de la société de biotechnologie Vect-Horus (Marseille, Dr. Michel Khrestchatisky) et ont été surexprimées dans les cellules FTC133.

Tout d'abord, l'étude du poids moléculaire des minirécepteurs nous donne des valeurs conformes à celles attendues : SPCT est observé à un poids moléculaire de 106 kDa (>), miniLRP-II à 153 kDa (*) et miniLRPIV à 164 kDa (**) (Fig. 26B, panel du haut). D'autre part, l'immunoprécipitation du tag HA sur les protéines surfaciques des cellules transfectées ou non nous montre que même si la forme SPCT et miniLRP-II semblent capables de lier de faible quantité de CD44, c'est majoritairement le domaine IV qui assure cette liaison (Fig. 26B, panel du bas).

En conclusion de ce premier chapitre, différents éléments clés ont été mis en évidence. Tout d'abord, il a été montré que CD44 était exprimé dans notre système cellulaire et que sa forme majoritaire était le CD44s, la forme standard du récepteur. De plus, nous avons pu remarquer que même si l'inhibition de LRP1 ne modifiait pas l'expression transcriptionnelle de ce récepteur, le blocage de l'activité endocytaire de LRP1 par RAP provoquait une augmentation de la présence de CD44 à la membrane plasmique. En outre, nous avons pour la première fois démontré que LRP1 et CD44 pouvaient co-exister au sein d'un même complexe protéique et que ces deux récepteurs étaient fortement colocalisés au niveau membranaire. Enfin, nous avons découvert que le domaine de liaison IV de LRP1 semblait suffisant pour lier CD44.

CHAPITRE II : ETUDE DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DU COMPLEXE LRP1/CD44.

Des protéines membranaires associées à LRP1 sont connues pour être présentes, au moins de façon transitoire, dans les radeaux lipidiques, ce qui a soulevé la question de sa répartition membranaire. Les différentes études menées ont mis en évidence que LRP1 pouvait être localisé dans les radeaux lipidiques mais que cette répartition était largement dépendante du type cellulaire étudié et qu'elle pouvait être transitoire ou encore induite (Wu et Gonias 2005; Zhang *et al.* 2004). De même, CD44 semble lui aussi en partie localisé dans ces microdomaines (Thankamony et Knudson 2006). Ces constatations nous ont poussé à nous interroger sur la répartition membranaire du complexe LRP1/CD44 vis-à-vis des *rafts* dans notre système cellulaire.

Dans cette partie de notre étude, nous nous sommes donc attachés à mieux caractériser la localisation cellulaire de ce complexe LRP1/CD44, notamment par rapport aux radeaux lipidiques.

A. ETUDE DE LA COLOCALISATION ENTRE LRP1 ET CD44

Dans un premier temps, nous avons cherché à appuyer les résultats précédents et à préciser la (co)localisation de LRP1 et de CD44 au niveau cellulaire. Dans ce but, nous avons effectué des co-immunomarquages de LRP1 et CD44 qui ont été visualisés en microscopie confocale.

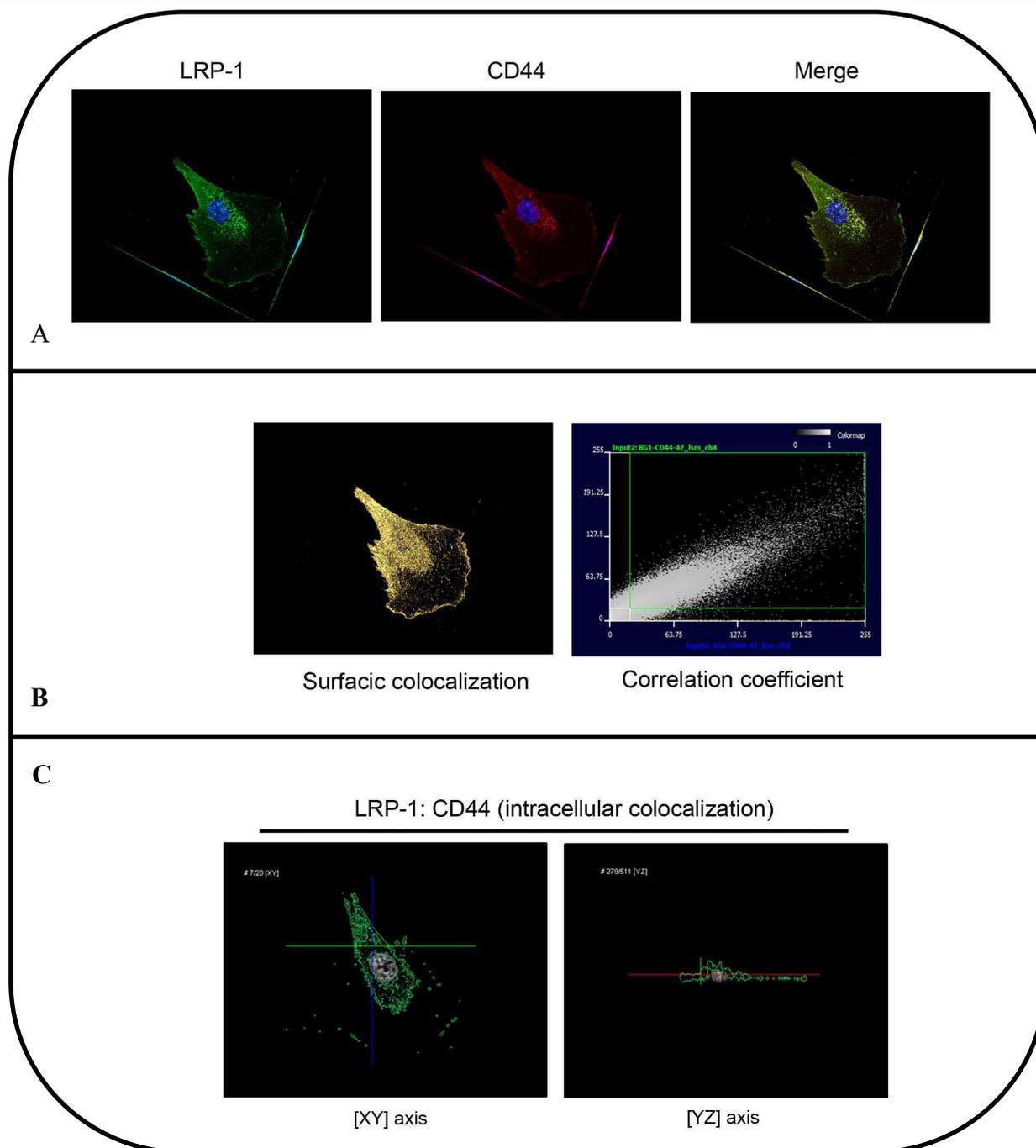


Figure 27 : LRP1 et CD44 colocalisent au niveau membranaire et intracellulaire.

Les cellules FTC133 ont été ensemencées sur lamelles de verre préalablement coâtées avec de la gélatine 1% (p/v) puis ont subi un co-immunomarquage avec des anticorps spécifiques de LRP1 (vert, Alexa fluor488) et de CD44 (rouge, Alexa fluor568) avant d’être visualisées en microscopie confocale.

- A. Marquage de LRP1, à gauche, de CD44, au milieu et des deux récepteurs, à droite.
- B. Représentation surfacique de tous les points de colocalisation entre LRP1 et CD44 (à gauche), ainsi que l’histogramme de corrélation entre ces points (à droite). Ces représentations ont été réalisées à l’aide du logiciel AMIRA.
- C. Représentation des points colocalisés suivant un axe [XY] (à gauche) et [YZ] (à droite) effectuées grâce au logiciel AMIRA. Pour l’axe [YZ], l’arrière de la cellule est à gauche et le front de migration à droite.

Premièrement, nous pouvons remarquer que LRP1 et CD44 sont effectivement fortement colocalisés au niveau cellulaire et notamment au niveau des protusions membranaires situées au front de migration et au niveau de la queue de rétraction de la cellule (Fig. 27A). Pour mieux représenter et quantifier la proportion de colocalisation entre les deux récepteurs, nous avons effectué une représentation surfacique de tous les pixels colocalisés ainsi que son histogramme de corrélation. Dans cette dernière représentation, tous les pixels, ceux correspondant à LRP1 et à CD44, sont représentés dans un graphique. Les pixels colocalisés sont situés sur une droite, ceux qui ne le sont pas se répartissent de part et d'autre de celle-ci. A l'aide de ces 2 représentations, nous pouvons mieux appréhender la très forte proportion de LRP1 et de CD44 qui colocalise (Fig. 27B, coefficient de corrélation : 0.931). Enfin, nous avons choisi une valeur de z qui nous permet de visualiser si cette colocalisation est également effective au niveau cytoplasmique. De ce point de vue, il est aisé de remarquer que LRP1 et CD44 sont colocalisés non seulement au niveau membranaire mais également dans le cytoplasme de la cellule, notamment à l'arrière de celle-ci (Fig. 27C). Ces résultats suggèrent dès à présent que LRP-1 pourrait endocyter CD44.

B. ETUDE DE LA LOCALISATION DU COMPLEXE LRP1/CD44 VIS-À-VIS DES RADEAUX LIPIDIQUES.

B.1. Isolement des microdomaines membranaires

Les radeaux lipidiques sont des microdomaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides particulièrement résistants aux détergents ce qui rend leur étude plus pointue. Pour les isoler, nous avons utilisé la méthode de centrifugation différentielle à gradient de saccharose d'après un protocole préalablement mis au point et validé (Persaud-Sawin *et al.* 2009). Pour marquer les radeaux lipidiques et plus particulièrement les cavéoles, nous avons recherché dans chaque fraction la présence de la cavéoline-1, une protéine fortement exprimée dans ces microdomaines (Schlegel et Lisanti 2001). La cavéoline-1 étant également présente dans des vésicules d'endocytose ou dans les voies de sécrétion, nous avons utilisé un deuxième marqueur, le PTRF (également dénommé Cav-p60 ou cavine), qui est quant à lui spécifique des cavéoles matures (Liu et Pilch 2008; Hill *et al.* 2008). Pour marquer la fraction membranaire soluble, nous avons utilisé le récepteur à la transferrine (TfR).

gamme de concentration allant de 0 à 20 mM et sur une gamme de temps de 15 à 45 minutes. Nous avons ensuite procédé au dosage de cholestérol sur le lysat cellulaire.

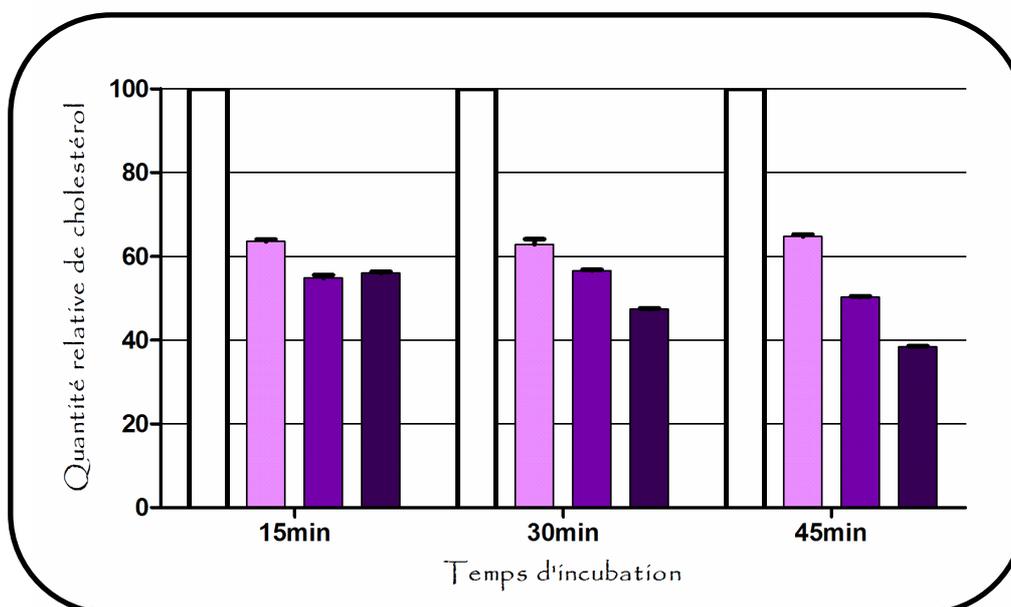


Figure 29 : Mise au point de la déplétion en cholestérol dans les cellules FTC133.

Un million de cellules ont été traitées avec 0, 10, 15 ou 20 mM de β -MCD pendant 15, 30 ou 45 minutes. Celles-ci ont ensuite été lysées et soniquées avant le dosage du cholestérol. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution par rapport à la quantité de cholestérol du témoin non traité.

Nous observons que l'efficacité de la déplétion en cholestérol est liée à la fois à une concentration croissante en β -MCD et au temps de traitement effectué (Fig. 29). Pour la suite des expérimentations, nous nous sommes placés dans les conditions où la déplétion était optimale, c'est-à-dire un traitement à une concentration de 20 mM pendant 45 minutes.

Pour vérifier l'efficacité de ce traitement sur la formation des radeaux lipidiques, nous avons réalisé une centrifugation différentielle à gradient de saccharose sur des cellules traitées ou non au β -MCD.

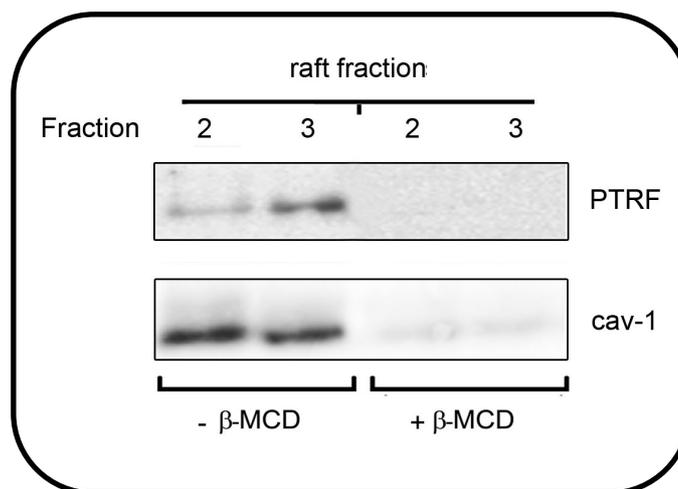


Figure 30 : Vérification de l'efficacité de la déplétion en cholestérol sur l'abolition des radeaux lipidiques.

Cinq millions de cellules ont été traitées ou non avec 20mM de β -MCD pendant 45 minutes. Après une lyse dans un tampon TBS dépourvu de détergent, les protéines extraites ont été séparées par centrifugation différentielle à gradient discontinu de saccharose. La présence de PTRF et de la cavéoline1 a été recherchée dans chacune des fractions pour apprécier la présence des cavéoles.

L'étude des marqueurs des cavéoles (PTRF et cavéoline-1) sur les fractions insolubles (fractions 2 et 3) confirme que le traitement au β -MCD abolit presque totalement la formation de ces microdomaines membranaires ; ce qui confirme l'efficacité de notre méthode (Fig. 30).

B.3. Etude de la présence du complexe LRP1/CD44 dans les radeaux lipidiques

Pour étudier la présence du complexe LRP1/CD44 dans les cavéoles, nous avons effectué une immunoprécipitation de la chaîne α de LRP1 sur les fractions 1 à 9 obtenues lors de la centrifugation différentielle à gradient discontinu de saccharose.

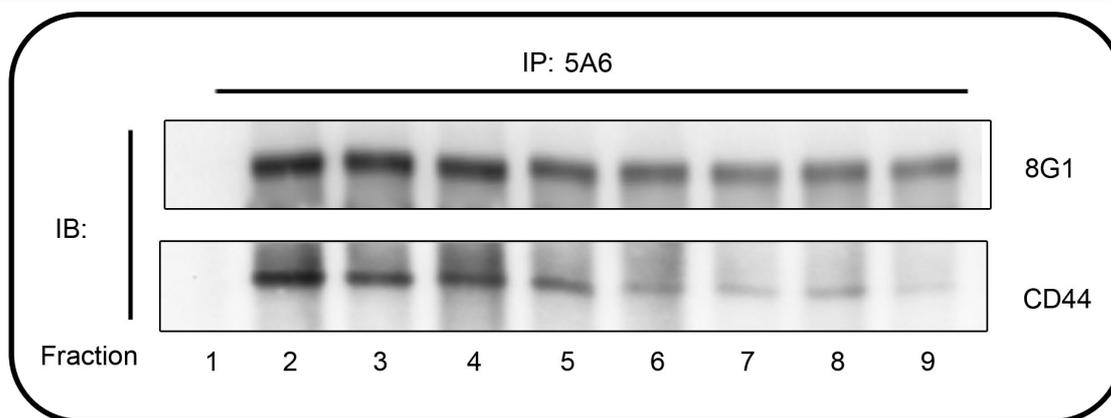


Figure 31 : Le complexe LRP1/CD44 est en grande partie localisé dans les cavéoles.

Une immunoprécipitation de la chaîne α de LRP1 a été réalisée dans les fractions 1 à 9 obtenues après séparation des radeaux lipidiques obtenue par centrifugation différentielle à gradient discontinu de saccharose. Ensuite, la présence du complexe a été recherchée par Western blot.

Les résultats obtenus nous indiquent que le complexe LRP1/CD44 est largement répandu dans les cavéoles (fractions 2 et 3) mais qu'il est également présent, en moindre proportion, dans les fractions solubles (Fig. 31). Forts de ces conclusions, nous nous sommes demandé si la présence des cavéoles était une condition nécessaire à la formation ou au maintien du complexe-récepteurs. Pour répondre à cette question, nous avons procédé à des immunoprécipitations de chacun des récepteurs sur des extraits totaux de protéines déplétées ou non en cholestérol.

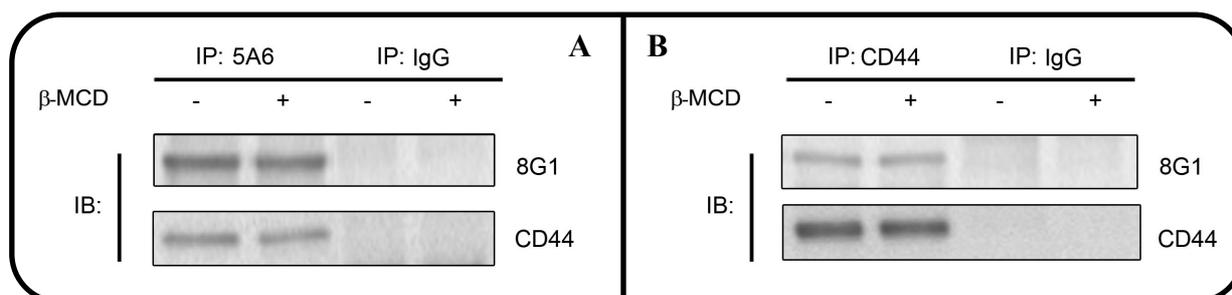


Figure 32 : La présence des cavéoles n'est pas nécessaire à la formation du complexe LRP1/CD44.

- A. $2,5 \cdot 10^6$ cellules FTC133 ont été traitées ou non avec 20mM de β -MCD pendant 45 minutes. Un extrait protéique enrichi en radeaux lipidiques a été réalisé, suivi par une immunoprécipitation de LRP1.
- B. $2,5 \cdot 10^6$ cellules FTC133 ont été traitées ou non avec 20mM de β MCD pendant 45 minutes. Un extrait de protéines totales a été réalisé, suivi par une immunoprécipitation de CD44.

Nous pouvons observer que la co-immunoprécipitation de LRP1 avec CD44 et inversement, est effective dans les mêmes proportions que les cellules aient été traitées ou non avec le β -MCD (Fig. 32). De plus, nous pouvons remarquer que cette co-immunoprécipitation est spécifique puisque la présence de LRP1 ou CD44 n'est pas détectable dans les immunoprécipitations avec les IgG contrôles. Ceci indiquerait que la présence des cavéoles n'est pas nécessaire à la formation et au maintien du complexe LRP1/CD44.

Dans ce chapitre dédié à la localisation du complexe LRP1/CD44 au sein des cellules FTC133, nous avons mis en lumière différents points. Tout d'abord, LRP1 et CD44 sont très fortement colocalisés dans les cellules de carcinome thyroïdien, que ce soit au niveau des protusions membranaires mais également dans le cytoplasme, préférentiellement à l'arrière de la cellule. De plus, l'étude de la répartition du complexe vis-à-vis des radeaux lipidiques et plus particulièrement des cavéoles nous a montré que le complexe-récepteurs était largement, mais pas exclusivement, localisé dans des domaines membranaires, mais que ceux-ci n'étaient pas nécessaires à l'établissement du complexe LRP1/CD44.

CHAPITRE III : ETUDE DE L'ENDOCYTOSE DE CD44 ET EFFETS DU COMPLEXE LRP1/CD44 SUR L'ADHÉRENCE CELLULAIRE

En plus de médier l'adhérence sur acide hyaluronique, il a été montré que CD44 pouvait diriger l'endocytose de ce glycosaminoglycane. Ce mécanisme est assez peu connu mais il semble qu'il n'empreinte ni la voie des vésicules recouvertes de clathrine, ni la voie des cavéoles (Culty *et al.* 1992; Tammi *et al.* 2001). De plus, à ce jour, aucun récepteur n'a été associé à l'endocytose de CD44.

L'augmentation de la présence de CD44 à la membrane plasmique suite à l'inhibition de l'activité d'endocytose de LRP1 par RAP observée dans le chapitre I (Fig. 23) nous oriente vers une possible endocytose du récepteur de l'acide hyaluronique par LRP1. Dans ce chapitre, nous allons déterminer si le récepteur de l'acide hyaluronique peut être endocyté par LRP1 dans les cellules de carcinome thyroïdien.

A. ETUDE DE LA LOCALISATION ENDOSOMALE DE CD44.

Tout d'abord, nous avons remarqué dans le chapitre II que le complexe LRP1/CD44 pouvait être localisé au niveau intracellulaire, notamment à l'arrière du corps cellulaire. Ce lieu est connu pour subir une forte endocytose dans le but de permettre à la fois le détachement de l'arrière des cellules et également de recycler vers l'avant de celle-ci les différents acteurs de l'adhérence et de la migration cellulaire comme les récepteurs d'adhérence (Friedl et Wolf 2003). Dans la première partie de ce chapitre, nous avons voulu déterminer si CD44 pouvait être localisé dans des compartiments vésiculaires et notamment dans les endosomes précoces. Des co-immunomarquages de CD44 avec un marqueur de ces endosomes, le *Early Endosomes Antigen 1* (EEA1) ont donc été réalisés (Wilson *et al.* 2000).

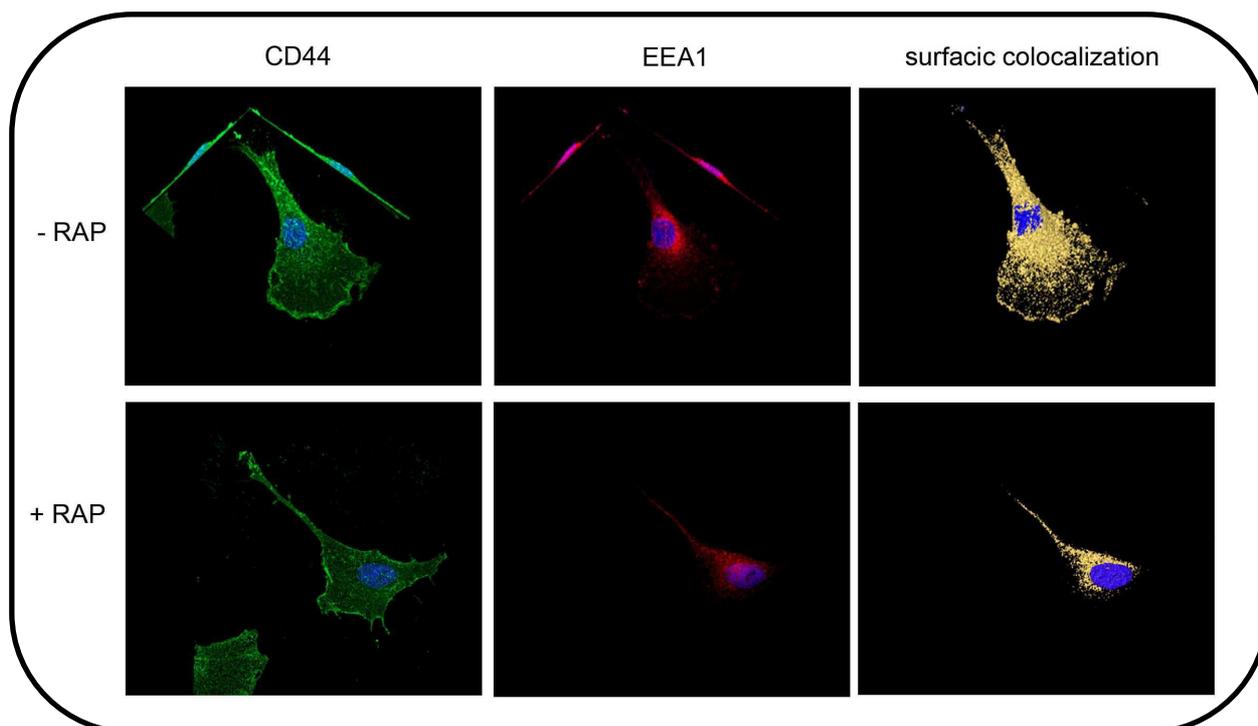


Figure 33 : CD44 est en partie localisé dans les endosomes précoces et ceci sous l'influence de LRP1.

Les cellules FTC133 ont été ensemencées sur lamelles coatées de gélatine 1% (p/v) et laissées adhérer durant 18 heures. Après un traitement avec ou sans 500nM de RAP, elles ont été immunomarquées spécifiquement pour CD44 (vert, Alexa fluor 488, panels de gauche) et EEA1 (rouge, Alexa fluor 568, panels centraux). Les noyaux sont visualisables grâce à un marquage au DAPI (bleu). Dans les panels de droite sont exposées les représentations surfaciques des points de colocalisation entre CD44 et EEA1 (jaune) effectuées à l'aide du logiciel AMIRA.

Dans les cellules non traitées avec RAP (Fig. 33, panel du haut), nous pouvons observer une forte colocalisation entre CD44 et le marqueur d'endosomes précoces, EEA1. Cette colocalisation prend place au niveau du front de migration, des protusions membranaires ainsi qu'à l'arrière de la cellule. Toutefois, le prétraitement des cellules avec RAP diminue de manière radicale cette colocalisation (Fig. 33, panel du bas). Nous réalisons ensuite la visualisation des pixels colocalisés au sein d'un plan intra-cytoplasmique par le logiciel AMIRA (Fig. 34).

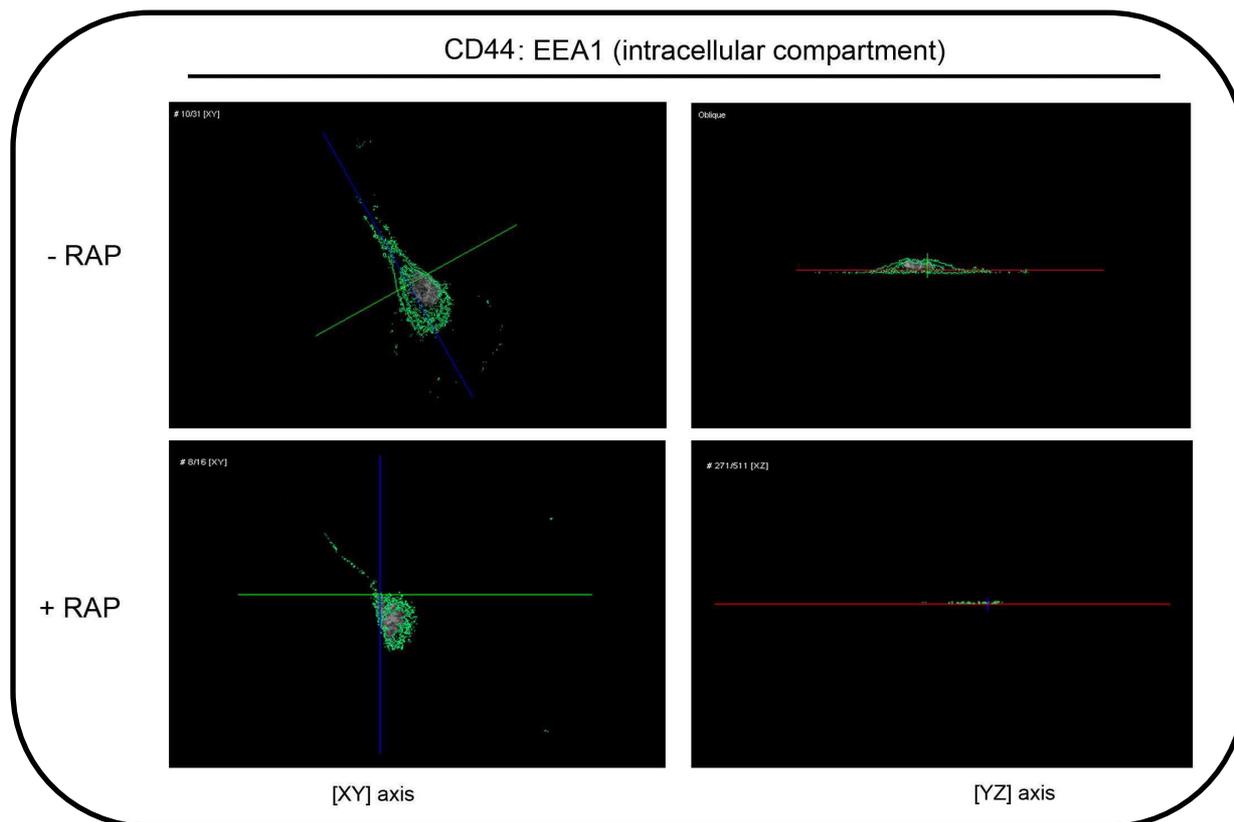


Figure 34 : CD44 et EEA1 colocalisent au niveau intracellulaire.

Représentation surfacique des points de colocalisation entre CD44 et EEA1 suivant un axe [XY] (cellules vues de haut) ou [YZ] (cellules vues par la tranche) réalisées grâce au logiciel AMIRA. Pour l'axe [YZ], l'arrière de la cellule est à droite et le front de migration

Cette représentation des points de colocalisation entre CD44 et EEA1 confirme le caractère intracellulaire de celle-ci (Fig. 34, panel du haut) ; de nouveau, nous pouvons remarquer que le prétraitement des cellules avec RAP diminue cette colocalisation (Fig.34, panel du bas). Ces premiers résultats nous dirigent donc vers l'existence d'un processus d'endocytose de CD44 dans notre type cellulaire puisqu'il apparaît clairement que CD44 existe dans les endosomes précoces. Nos résultats révèlent que cette internalisation est, au moins en partie, sous l'influence directe de LRP1.

B. ETUDE DE LA LOCALISATION LYSOSOMIALE DE CD44.

L'endocytose de l'acide hyaluronique par CD44 conditionne sa dégradation ; toutefois, il semble que dans ce processus, CD44 soit recyclé à la membrane et non dégradé (Tammi *et al.* 2001). Après avoir mis en évidence que CD44 pouvait être localisé dans les

endosomes précoces, nous avons voulu connaître sa position vis-à-vis du compartiment lysosomal. C'est pourquoi des co-immunomarquages de CD44 avec un marqueur des lysosomes, le *Lysosomal-Associated Membrane Protein 1* (LAMP1) (Gasingirwa *et al.* 2008), ont été effectués.

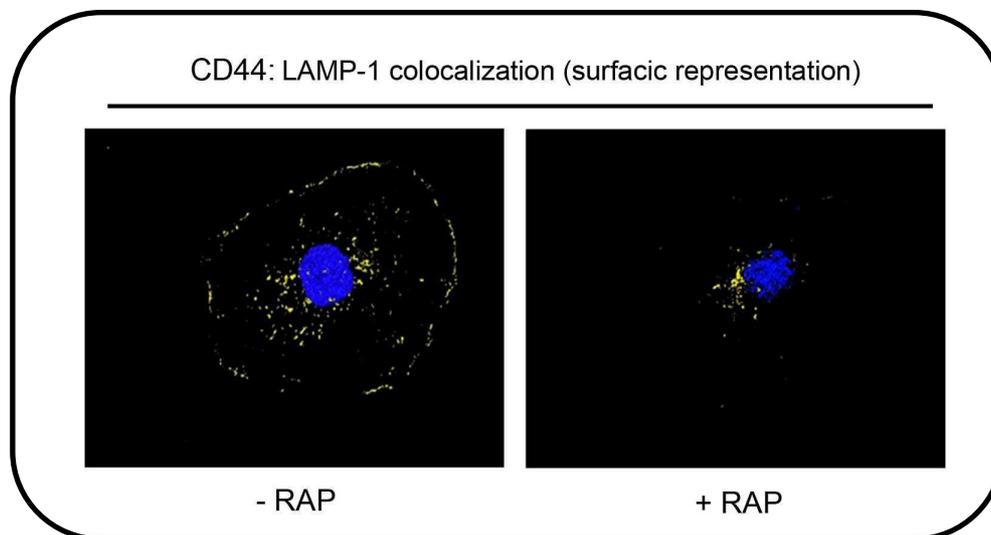


Figure 35 : CD44 est localisé dans les lysosomes.

Les cellules FTC133 ont été ensemencées sur lamelles coatées de gélatine 1% (p/v) et laissées adhérer durant 18 heures. Après un traitement avec ou sans 500nM de RAP, elles ont été immunomarquées spécifiquement pour CD44 et LAMP1. Les noyaux sont visualisables grâce à un marquage au DAPI (bleu). Les images présentées correspondent aux représentations surfaciques des points de colocalisation entre CD44 et LAMP1 (jaune) effectuées à l'aide du logiciel AMIRA.

La représentation isosurfacique des points de colocalisation entre CD44 et LAMP1 nous indique que ces deux protéines sont en partie colocalisées à proximité de la membrane plasmique et au niveau intracellulaire (Fig.35). Cette localisation atypique de vésicules positives pour LAMP-1 près de la membrane plasmique peut surprendre mais a déjà été décrite par le passé comme une voie d'adressage minoritaire de la protéine, particulièrement au niveau de cellules cancéreuses (Rohrer *et al.* 1996).

De plus, le prétraitement avec l'antagoniste de LRP1 diminue drastiquement cette colocalisation. Il semble donc que CD44 puisse être routé vers le compartiment lysosomal dans les cellules FTC133 et que cette localisation est sous l'influence de LRP1.

C. ETUDE DE L'ENDOCYTOSE DE CD44 PAR LRP1

Nous avons pu observer que CD44 pouvait être localisé dans des compartiments vésiculaires comme les endosomes précoces et les lysosomes et que cette localisation était sous le contrôle de LRP1. Afin de confirmer ces résultats et d'étayer notre hypothèse concernant l'endocytose de CD44 par le récepteur LRP1, nous avons étudié les processus d'endocytose associés aux cellules FTC133 par une méthode biochimique. Le test d'endocytose utilisé dérive d'un protocole précédemment validé par les Drs Wu et Gonias (Wu et Gonias 2005). Ce type de test consiste à réaliser une biotinylation des protéines membranaires des cellules maintenues à 4°C pour bloquer les mouvements membranaires et donc l'endocytose. Après un passage à 37°C pendant 1 heure autorisant l'endocytose, les cellules sont de nouveau placées à 4°C et les protéines membranaires sont décapées. Après avoir effectué une lyse des cellules, la fraction de protéines biotinylées, soit celle qui a été endocytée, est récupérée puis analysée par Western-blot.

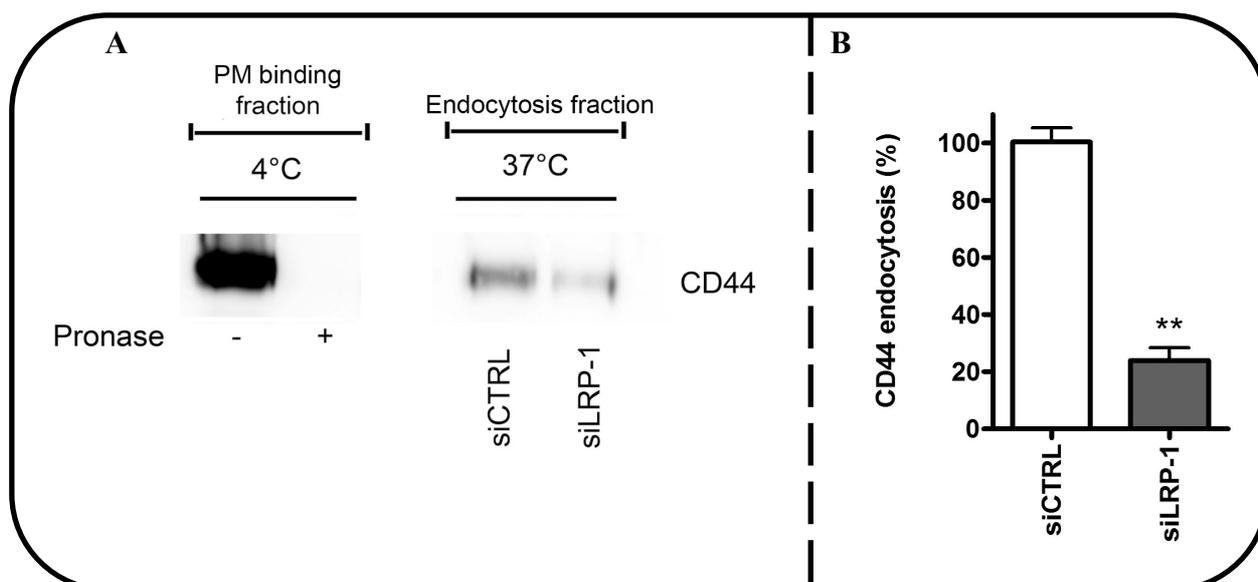


Figure 36 : LRP1 est capable d'endocyter en partie CD44.

- A. Les cellules FTC133 préalablement invalidées ou non pour LRP1 ont subi un test d'endocytose. Le panel de gauche illustre l'efficacité du clivage des protéines membranaires par la pronase, le panel de droite la fraction de CD44 endocytée.
- B. Représentation graphique de la quantification densitométrique de la fraction de CD44 endocytée. **, $p < 0,01$.

Tout d'abord, pour valider notre protocole, il nous faut vérifier l'efficacité du clivage des protéines membranaires par la pronase. En effet, l'observation de la fraction endocytée du

récepteur CD44 dépend de ce paramètre puisque le CD44 resté à la membrane après l'action de la pronase pourrait constituer un bruit de fond et risquerait de fausser l'évaluation de la fraction de CD44 endocytée. Nous avons donc recherché la présence de CD44 à la surface de cellules non traitées conservées à 4°C (fraction totale) ou traitées à la pronase (fraction résiduelle). Le résultat obtenu nous indique que la pronase a décapé la totalité du CD44 présent à la membrane (Fig. 36A, panel de gauche). Ceci valide donc notre protocole et nous garantit que le CD44 observé dans la fraction endocyté n'est pas contaminé par celui situé à la membrane plasmique.

Nous avons ensuite procédé à un test d'endocytose sur des cellules préalablement transfectées avec des siRNA contrôles ou invalidant LRP1. L'analyse de la fraction endocytée par Western-blot nous indique formellement que le CD44 est endocyté dans les cellules FTC133 (Fig. 36A, panel de droite). Cette endocytose est diminuée de 75% lorsque LRP1 est invalidé (Fig. 36A, panel de droite et Fig. 36B). Ces résultats confirment les résultats précédemment obtenus avec RAP par imagerie confocale (Fig. 33-35). Nous pouvons donc en conclure que dans les cellules FTC133, CD44 est en grande partie endocyté par l'intermédiaire de LRP1.

D. ETUDE DE LA VOIE EMPREINTÉE POUR L'ENDOCYTOSE DE CD44

Différentes voies d'endocytose existent (Benmerah et Lamaze 2002), deux d'entre elles sont constituées par les voies dépendantes de la clathrine ou des radeaux lipidiques. Nos précédents résultats nous ont indiqués que le complexe LRP1/CD44 était fortement localisé dans les *rafts*, c'est pourquoi nous avons d'abord étudié l'endocytose de CD44 via ces microdomaines membranaires. Les données bibliographiques semblent exclure CD44 des vésicules recouvertes de clathrine (Isacke 2004), néanmoins, une endocytose médiée par LRP1 pourrait modifier ce paramètre. Pour amorcer une discrimination de ces deux voies d'endocytose, nous avons réalisé des tests d'endocytose dans différentes conditions. Nous avons d'abord procédé à un prétraitement des cultures avec du β -MCD pour dépléter les cellules en cholestérol, désorganiser les radeaux lipidiques et donc perturber la voie d'endocytose des cavéoles (Fig. 37A et B). Nous avons ensuite effectué un choc osmotique des cellules pour court-circuiter la voie des clathrés (Oka *et al.* 1989) (Fig. 37C et D).

Premièrement, nous pouvons observer dans les cellules non traitées avec le β -MCD que RAP a le même effet sur l'inhibition de l'endocytose que les siRNA invalidant LRP1 puisqu'il diminue de près de 4 fois la proportion de CD44 endocyté (Fig. 37A et B, comparaison avec la Fig. 36 A). En revanche, la déplétion des cellules en cholestérol à l'aide du β -MCD n'a aucune répercussion sur l'endocytose de CD44 (Fig. 37A et B). Ceci indique que l'endocytose de CD44 par les cellules FTC133 n'utilise a priori pas la voie des cavéoles.

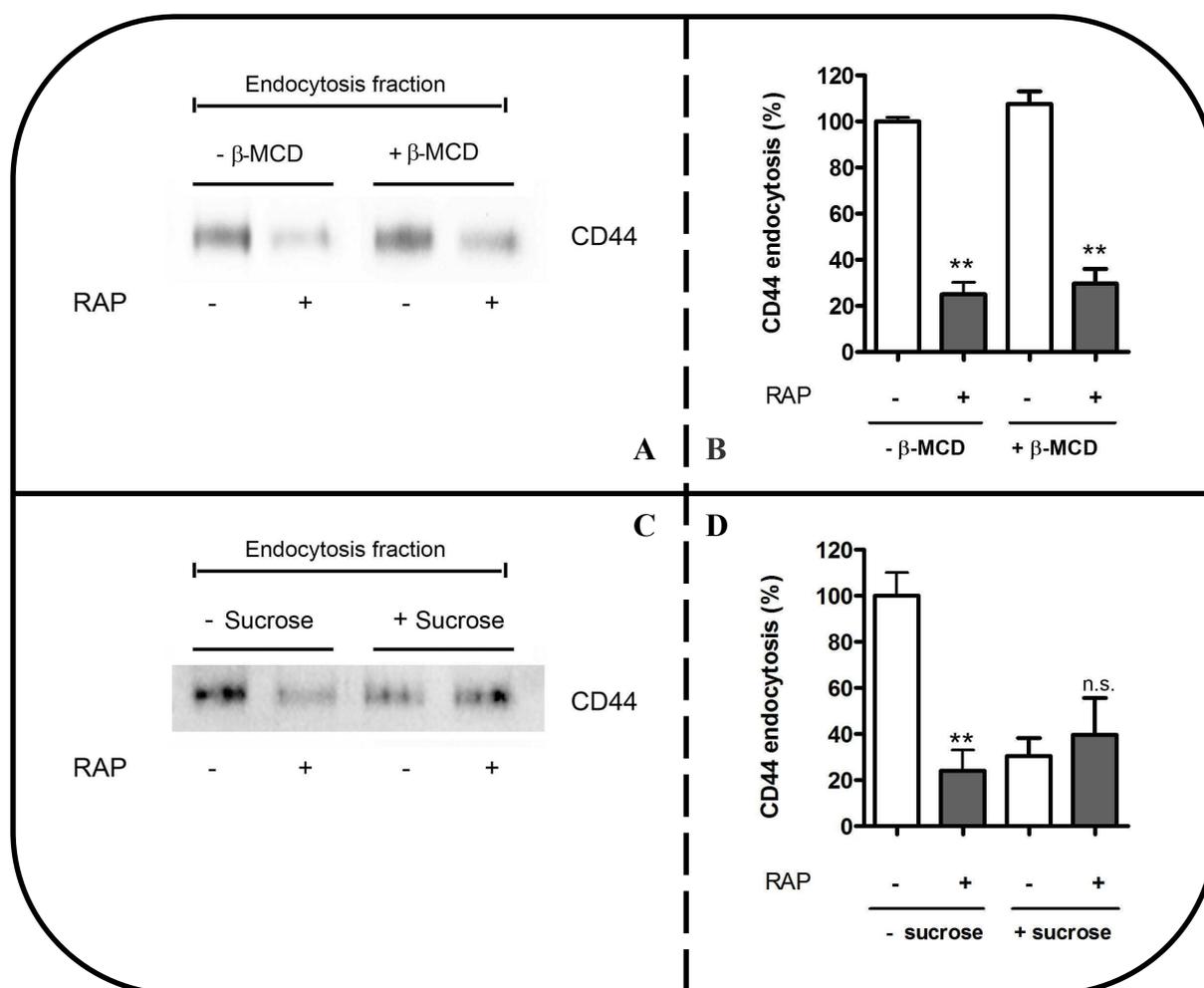


Figure 37 : LRP1 endocyte CD44 en empruntant la voie des vésicules tapissées de clathrine.

- A. Les cellules FTC133 prétraitées ou non avec 20mM de β -MCD pendant 45 minutes puis avec ou sans RAP pendant 1 heure ont subi un test d'endocytose. La fraction endocyté de CD44 a été étudiée par Western-blot.
 - B. Quantification de la fraction de CD44 endocytée
 - C. Les cellules FTC133 prétraitées ou non avec 500nM de RAP pendant 1 heure ont subi un test d'endocytose. L'ajout ou non de 400mM de saccharose durant la phase d'endocytose a permis de bloquer la voie des clathrines. La fraction de CD44 endocyté est analysée par Western-blot.
 - D. Quantification de la fraction de CD44 endocytée.
- NS, non significatif ; **, $p < 0,01$; les échantillons -RAP et +RAP sont comparés deux à deux.

Deuxièmement, nous pouvons voir que le choc osmotique des cellules visant à inhiber l'endocytose par la voie des clathrés diminue drastiquement l'endocytose de CD44 par les cellules FTC133 (Fig. 37C et D). De plus, dans ces conditions, RAP n'a pas d'effet sur la proportion de CD44 endocyté. Ceci nous apprend que l'endocytose de CD44 médiée par LRP1 dans les FTC133 emprunte exclusivement la voie des vésicules tapissées de clathrine.

E. EFFET DE L'INTERACTION LRP1 : CD44 SUR LE COMPORTEMENT MIGRATOIRE DES CELLULES FTC133

A partir des résultats précédents, nous avons voulu étudier la signification biologique du complexe LRP1/CD44 que nous venons d'identifier. Des travaux menés au sein de notre équipe ont précédemment mis en évidence que LRP1 pouvait influencer le comportement adhésif des cellules FTC133 (Dedieu *et al.* 2008). De plus, par sa capacité à remanier le protéome membranaire, il est tout à fait envisageable que LRP1 puisse modifier le comportement cellulaire (adhérence, migration) en faisant varier la proportion de différentes protéines membranaires (récepteur d'adhérence, etc.) (Gonias *et al.* 2004). La fonction première de CD44 étant de moduler l'adhérence des cellules, nous avons voulu savoir si l'interaction entre les deux récepteurs pouvait altérer l'adhérence des cellules tumorales.

Nous avons dans un premier temps développé une stratégie d'interférence ARN dirigée contre le récepteur CD44. Les résultats obtenus nous permettent de vérifier l'efficacité des siRNA invalidant CD44 (Fig. 38A).

Dans un second temps, nous avons effectué un test d'adhérence sur cellules invalidées ou non pour CD44 et traitées ou non avec RAP (Fig. 38B). Nous pouvons tout d'abord remarquer une légère diminution du nombre de cellules adhérentes dans les cellules siCD44 non traitées par RAP. La non-significativité de ce résultat est probablement due à l'effet compensatoire d'autres récepteurs d'adhérence tels que les intégrines. Dans les cellules contrôles, nous pouvons voir que RAP augmente la proportion de cellules adhérentes de plus de 50% par rapport aux cellules non traitées. L'invalidation du CD44 permet de réverser totalement cet effet induit par RAP.

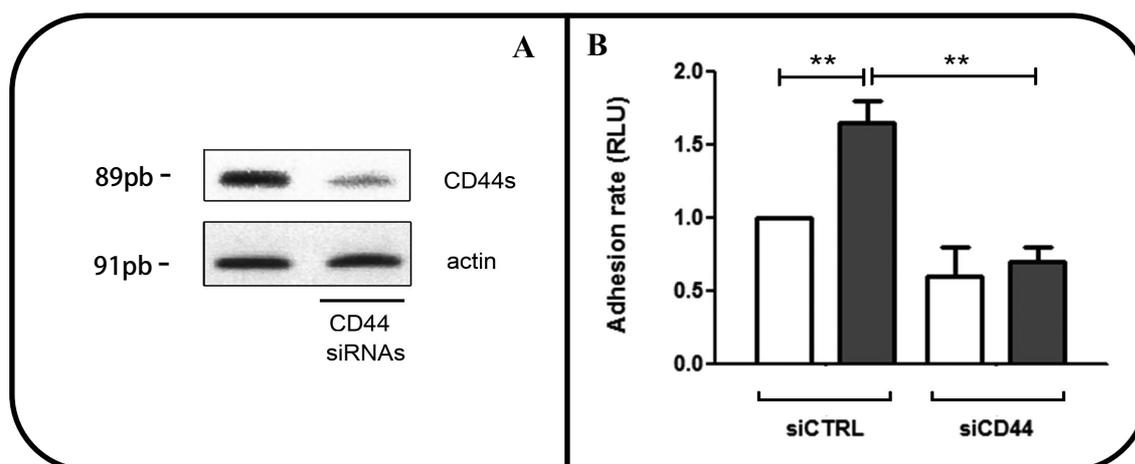


Figure 38 : L'effet pro-adhésif de RAP est aboli par l'inactivation de CD44.

- A. Les cellules FTC133 ont été transfectées avec des siRNA contrôles ou invalidant l'expression de CD44. Après 48 heures de transfection, leurs ARN totaux ont été extraits puis analysés par PCR semi-quantitative avec des amorces spécifiques de CD44 ou de l'actine.
- B. Les cellules FTC133 invalidées ou non pour CD44 ont été traitées avec ou sans RAP durant 1 heure. Après détachement et comptage, 50000 cellules ont étéensemencées sur gélatine pendant 30 minutes. Les cellules non adhérentes ont été éliminées par rinçages alors que les cellules adhérentes ont été fixées au méthanol puis colorées au cristal violet. Après addition de 40µL de DMSO, l'absorbance a été lue à 600nm.

Dans ce troisième chapitre, nous avons essayé de déterminer si CD44 pouvait être endocyté par les cellules FTC133. Dans un premier temps, l'étude par immunofluorescence de la localisation subcellulaire de CD44 par rapport aux compartiments endocytiques nous a appris que ce récepteur pouvait être localisé dans les endosomes précoces ainsi que dans les lysosomes. De plus, cette localisation de CD44 est largement dépendante de LRP1. Dans un deuxième temps, l'utilisation d'un test d'endocytose basé sur la biotinylation des protéines membranaires nous a confirmé que CD44 pouvait être endocyté par les FTC133 et que ce processus était en grande partie sous l'influence de LRP1. Nous avons également pu souligner le fait que cette endocytose était majoritairement effective au sein de la voie des vésicules de clathrine. Enfin, nous avons recherché les effets de l'interaction de LRP1 et CD44 sur l'adhérence cellulaire. Nos résultats nous indiquent que l'effet pro-adhésif de RAP est en grande partie attribuable à CD44. Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontrent que l'endocytose de CD44 par LRP-1 joue un rôle important dans le contrôle de l'adhérence tumorale.

CHAPITRE III : ETUDE DU SHEDDING DE CD44

A. EFFET DE LRP1 SUR LE SHEDDING DE CD44

Lors de nos expérimentations précédentes, nous avons pu remarquer que si une inhibition de LRP1 par RAP sur un temps court (1 heure) conduisait à une augmentation significative de la présence de CD44 à la surface des cellules FTC133 (Cf. Fig. 23), un traitement avec l'antagoniste sur un temps plus long (24 heures) ou l'invalidation de l'expression de LRP1 par interférence ARN n'aboutissait pas au même résultat (Fig. 39).

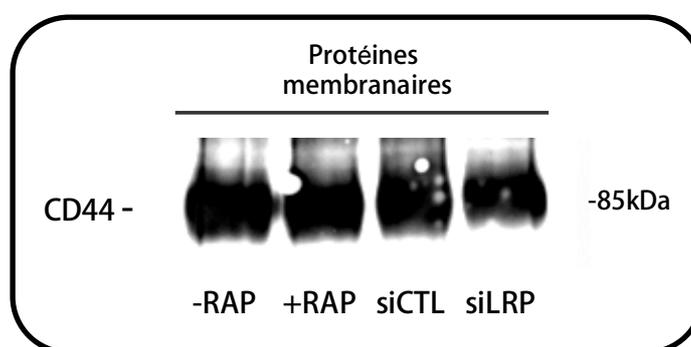


Figure 39 : L'inhibition sur 24 heures ou l'invalidation de LRP1 ne modifient pas sa présence à la membrane plasmique.

Trois million de cellules FTC133 traitées ou non avec 500nM de RAP pendant 24 heures ou invalidées ou non pour l'expression de LRP1 (pendant 48 heures) ont été soumises à une biotinylation des protéines de surface. La présence de CD44 a été analysée par Western-blot.

Il semble donc qu'il existe un autre mécanisme de régulation de la présence de CD44 à la membrane plasmique qui compenserait son accumulation membranaire due à l'inhibition de son endocytose médiée par LRP1. Nous nous sommes donc orientés vers la piste du *shedding* de CD44. En effet, CD44 est un récepteur décrit comme subissant constitutivement le clivage de son ectodomaine, permettant la libération dans le milieu extracellulaire de sa forme soluble, le sCD44. La présence du sCD44 dans le milieu extracellulaire des cellules peut altérer les fonctions du récepteur et par conséquent le comportement cellulaire, notamment la migration (Cichy et Puré 2003; Kajita *et al.* 2001).

Dans un premier temps, nous avons déprivé des cellules FTC133 durant 24 heures avec ou sans la présence de RAP. La même expérience a été réalisée avec des cellules

invalidées ou non pour LRP1. Après concentration et dosage protéique, la présence de CD44 dans le milieu de culture a été recherchée par Western-blot (Fig. 40).



Figure 40 : L'inhibition ou invalidation de LRP1 augmente le shedding de CD44.

Les cellules FTC133 ont été placées dans du milieu sans sérum durant 24h. Les surnageants de culture ont ensuite été concentrés 20 fois à l'aide de Vivaspins et dosés. Vingt cinq microgrammes de protéines ont été analysés par Western-blot. Le signal obtenu représente donc la forme soluble du CD44

Nous avons observé que dans les cellules FTC133, l'ectodomaine de CD44 pouvait être *sheddé* de façon endogène et retrouvé dans les milieux de culture. De façon *a priori* surprenante, l'utilisation de RAP augmente de manière importante la présence du CD44 clivé et libéré dans les milieux de culture d'un facteur 2. Nous pouvons observer le même phénomène dans les surnageants de cellules invalidées pour LRP1. Il semble donc que LRP1 puisse également influencer le mécanisme de *shedding* du récepteur CD44.

B. RECHERCHE DES PROTÉASES IMPLIQUÉES DANS LE SHEDDING DE CD44 DANS LES CELLULES FTC133.

Suite au résultat précédent, nous avons cherché à identifier le(s) protéase(s) impliquée(s). Devant la multitude de protéases présentes dans le milieu extracellulaire des cellules FTC133, nous avons d'abord utilisé des inhibiteurs spécifiques de différentes classes de ces protéases pour effectuer un premier tri (Fig. 41).

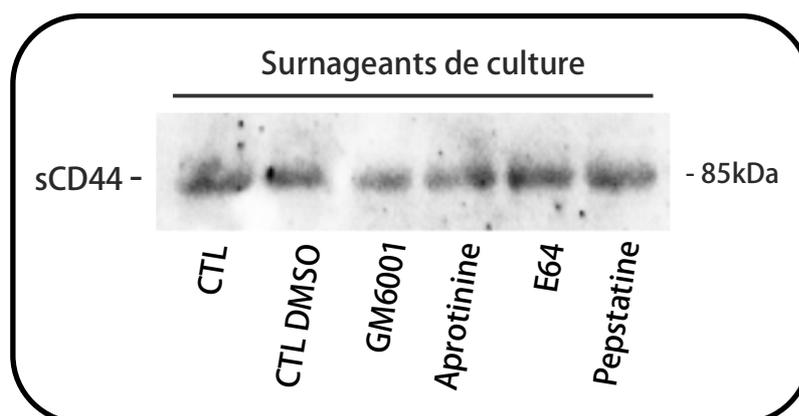


Figure 41 : Les métalloprotéases sont responsables du shedding de CD44.

Les cellules FTC133 ont été placées dans du milieu sans sérum additionné de différents inhibiteurs de protéases à des concentrations préalablement validées pendant 24 heures. Les surnageants de culture ont été récupérés, concentrés puis dosés. Vingt cinq microgrammes de protéines ont été analysés par Western-blot.

Ces premiers résultats nous montrent que ni le E64, inhibiteur des cystéine protéases, ni la pepstatine, inhibiteur des aspartyl protéases, n'influencent le *shedding* de CD44. En revanche, nous observons une nette diminution de la quantité de CD44 dans les milieux conditionnés de cellules traitées au GM6001, un inhibiteur des métalloprotéases. Nous pouvons également observer une légère diminution de la quantité du sCD44 dans les surnageants de cellules traitées à l'aprotinine, un inhibiteur des sérine protéases. Ce dernier résultat est à interpréter avec précaution puisqu'il a été précédemment décrit que l'effet des sérine protéases sur le *shedding* de CD44 était davantage dû à leur capacité à activer les métalloprotéases qu'à leur capacité à cliver directement le CD44 (Okamoto *et al.* 2002). C'est pourquoi, à la vue de ces résultats, nous avons choisi de focaliser notre attention sur les métalloprotéases pour la poursuite de notre étude. Afin de confirmer l'implication des MMPs dans le *shedding* de CD44, d'autres inhibiteurs ont été utilisés : le KB-R7785 (1 μ M), le TAPI-1 (10 μ M) ayant tous deux une affinité accrue pour les ADAMs et le TIMP1 (1 μ M). L'utilisation de ces 3 inhibiteurs a également provoqué une diminution du *shedding* de CD44 (données non exposées)

Toutefois, cette première analyse reste relativement imprécise puisque de nombreuses métalloprotéases ont été décrites comme pouvant cliver l'ectodomaine de CD44. Parmi elles, nous trouvons la MT1-MMP et les ADAM10 et -17 (Cichy et Puré 2003). Devant le manque d'inhibiteurs sélectifs de chacune de ces protéases, nous avons opté pour la technique d'interférence à l'ARN pour invalider spécifiquement l'expression de chacune d'entre elles.

Quatre métalloprotéases ont été testées : la MT1-MMP, et les ADAM10, -12 et -17. Les cellules ont été transfectées avec les siRNA spécifiques de chaque enzyme. Huit heures après la transfection, les cellules ont été déprivées en sérum durant 24 heures, puis les surnageants de culture ont été analysés par Western-blot.

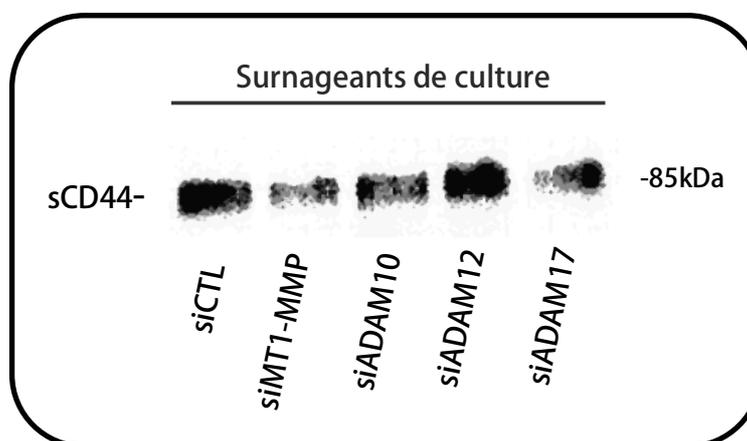


Figure 42 : CD44 est sheddé par la MT1-MMP et les ADAMs 10 et 17.

2,5.10⁶ cellules ont été transfectées avec des siRNA contrôles ou invalidant l'expression de différentes métalloprotéases. Huit heures après la transfection, les cellules ont été placées 24 heures dans du milieu sans sérum. Celui-ci a ensuite été récolté, concentré et dosé. Vingt cinq microgrammes de protéines ont été analysés par Western-blot.

Tout d'abord, il convient de préciser que l'efficacité des siRNA dirigés contre les différentes métalloprotéases a été testée par PCR semi-quantitative 8 heures et 24 heures après la transfection. Mis à part l'expression de la MT1-MMP qui n'est plus invalidée après 24 heures, toutes les invalidations se sont révélées satisfaisantes, avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 50% (données non exposées).

La recherche de sCD44 dans les milieux de culture de cellules invalidées ou non pour l'expression de différentes métalloprotéases nous révèle que plusieurs d'entre elles peuvent être impliquées dans le *shedding* de CD44. En effet, une nette diminution de la quantité du sCD44 est observable dans les milieux de culture des cellules invalidées pour MT1-MMP, ADAM10 et ADAM17 (Fig. 42). En revanche, ADAM12 n'apparaît pas capable de cliver le CD44 ancré à la membrane plasmique des cellules FTC133.

C. ETUDE DE L'EFFET D'UNE DÉPLÉTION EN CHOLESTÉROL SUR LE *SHEDDING* DE CD44.

Une étude très récente de Murai et collaborateurs a démontré que les radeaux lipidiques pouvaient jouer un rôle majeur dans le *shedding* de CD44 (Murai *et al.* 2011). En effet, dans cette étude, la déplétion en cholestérol à l'aide du β -MCD augmentait drastiquement le clivage de l'ectodomaine de CD44 induit par l'ADAM10. Souhaitant savoir si ce type de mécanisme était effectif dans notre système cellulaire, nous avons étudié la présence du sCD44 dans les milieux de culture de cellules FTC133 déplétées ou non en cholestérol.

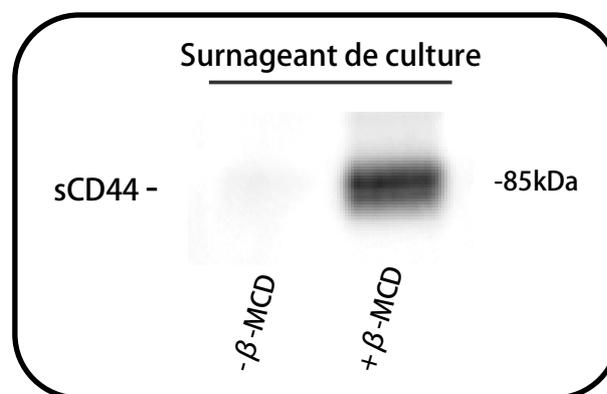


Figure 43 : Le shedding de CD44 augmente en absence de radeaux lipidiques. $2,5 \cdot 10^6$ cellules ont été traitées 45 minutes avec 20mM de β -MCD, puis elles ont été placées dans un milieu sans sérum durant 24 heures. Les surnageants de culture ont été récupérés, concentrés et dosés et 25 μ g de protéines ont été analysés par Western blot

En accord avec les données bibliographiques récentes et avec les résultats que nous avons récemment obtenus sur des fibrosarcomes (Selvais *et al.* 2011), nous avons pu observer que la déplétion en cholestérol des cellules FTC133 augmentait considérablement le *shedding* de CD44 (Fig. 43).

En conclusion de cette dernière partie, nous avons découvert que l'inhibition ou l'inactivation de LRP1 sur des temps plus longs (à partir de 24 heures) n'induisait plus une augmentation du niveau d'expression de CD44 à la membrane plasmique. Ce résultat suggère qu'un autre mécanisme prend le relais afin de pallier au manque d'endocytose du récepteur et d'empêcher son accumulation à la surface cellulaire. L'étude du *shedding* de CD44 nous a révélé que suite à l'inhibition ou l'inactivation de LRP1 celui-ci était fortement augmenté

suggérant un rôle protecteur de LRP1 vis-à-vis du *shedding* de CD44. Les premières recherches visant à préciser la nature moléculaire de ce processus, nous ont permis de mettre en évidence que la MT1-MMP et les ADAMs 10 et 17 étaient capables de libérer l'ectodomaine de CD44 dans les cellules FTC133. De plus, la régulation de ce mécanisme semble faire intervenir les radeaux lipidiques, puisque la déplétion en cholestérol induit une forte augmentation de celui-ci. Il semblerait que donc que le récepteur LRP1, lorsqu'il est complexé avec le CD44, et principalement au sein des radeaux lipidiques, puisse protéger ce dernier du *shedding*.

DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES

Discussion et perspectives

LRP1 est un récepteur d'endocytose multifonctionnel capable de réguler certaines voies de signalisation intracellulaire. D'abord considéré comme un simple récepteur cargo, LRP1 s'est révélé être un acteur majeur de nombreuses fonctions cellulaires et être impliqué dans plusieurs pathologies comme l'athérosclérose ou la maladie d'Alzheimer. De nos jours, un nombre croissant d'études atteste du rôle de LRP1 dans la tumorigenèse. Toutefois la complexité de fonctionnement du récepteur, en partie due à l'étendue de ses partenaires, empêche d'estimer si LRP1 est un récepteur pro- ou anti-tumoral (Langlois *et al.* 2009).

Des études sur le rôle de LRP1 dans le caractère invasif de cellules de carcinome thyroïdien (FTC133) ont été réalisées au sein de notre équipe. Il a été mis en évidence que malgré l'augmentation de la protéolyse matricielle induite par l'inactivation de LRP1, les cellules présentaient un potentiel migratoire et invasif altéré dû à un défaut dans les mécanismes d'adhérence et de dé-adhérence cellulaire. En effet, LRP1 s'est révélé être un acteur du *turnover* des adhérences focales (Dedieu *et al.* 2008). En parallèle de cette étude, nous avons voulu étudier la possibilité que les modifications comportementales des cellules cancéreuses, notamment vis-à-vis de l'adhérence, pouvaient résulter d'altérations du protéome membranaire induites par LRP1. Dans cette optique, nous avons recherché un partenaire de LRP1 impliqué dans ce mécanisme qui s'est révélé être le récepteur d'adhérence CD44, dont le rôle dans la tumorigenèse n'est plus à démontrer (Marhaba et Zöller 2004).

I.

DÉCOUVERTE DE L'INTERACTION ENTRE LRP1 ET CD44

Pour débiter notre étude, nous avons analysé le profil d'expression de CD44 dans notre système cellulaire. En effet, si à l'heure actuelle plusieurs études décrivent une augmentation de l'expression de variants de CD44 (CD44v6) dans des biopsies de tumeurs thyroïdiennes folliculaires (Gu *et al.* 1998; Maruta *et al.* 2004; Nasir *et al.* 2004), aucune donnée sur son expression dans les cellules FTC133 n'était disponible. Il s'avère que dans

notre environnement cellulaire, seule la forme standard de CD44 est exprimée. Au niveau protéique, des dimères de CD44s ainsi qu'une forme intermédiaire, probablement le fruit de glycosylations différentielles, sont observables.

Nous avons par la suite mis en évidence que le blocage de l'activité d'endocytose de LRP1 par l'antagoniste RAP induisait une augmentation de la présence de CD44 à la membrane plasmique. Plusieurs hypothèses pouvaient alors être envisagées, la première étant que l'inhibition de LRP1 provoquait une augmentation de l'expression transcriptionnelle de CD44. Même si cette supposition semblait improbable compte tenu des données bibliographiques en notre possession, nous avons étudié l'expression transcriptionnelle de CD44 suite à l'inhibition ou l'invalidation de LRP1. Aucune modification n'a été détectée. Pour la suite de cette étude, nous nous sommes donc orientés vers un effet de LRP1 sur la protéine CD44.

Dans cette optique, nous avons recherché l'existence d'un complexe protéique au sein duquel LRP1 et CD44 pourrait coexister. Les résultats obtenus nous indiquent qu'un tel complexe moléculaire existe à la surface des cellules tumorales. Il est à noter que ces résultats sont obtenus à partir des formes endogènes des récepteurs dans des conditions expérimentales "relevantes" (pas de surexpression de protéines recombinantes) et que le complexe résiste à des fortes conditions de stringence. Il est également à mentionner que si pour notre étude, nous nous sommes concentrés essentiellement sur la forme standard de CD44, les autres formes observées sont elles aussi capables de co-immunoprécipiter avec LRP1. Une étude plus poussée de ces formes protéiques, notamment la forme de 120 kDa, pourrait s'avérer utile afin de compléter nos travaux. Nous pourrions par exemple envisager de traiter les cellules FTC133 avec des glycosidases et analyser la conséquence de tels traitements sur l'établissement et le maintien des complexes LRP1/CD44. Toutefois, si la découverte d'une interaction entre LRP1 et CD44 est sans précédent, elle soulève néanmoins de nombreuses questions. La première étant l'identification du domaine de LRP1 qui en est responsable. Pour y répondre, nous avons surexprimé dans notre lignée cellulaire des mini-récepteurs exprimant certains domaines de LRP1 que nous avons ensuite immunoprécipités avant de rechercher la présence ou non du CD44 endogène. Les résultats obtenus nous indiquent que même si la chaîne β de LRP1 ainsi que son domaine de liaison II semble pouvoir co-immunoprécipiter *a minima* CD44, l'interaction avec le récepteur d'adhérence se fait majoritairement par le domaine de liaison IV de LRP1. Ces données sont malheureusement mises à mal par notre incapacité à abolir la formation du complexe LRP1/CD44 puisque l'utilisation de RAP ou

d'un anticorps bloquant LRP1 ne perturbe pas l'association entre les deux récepteurs. Ceci pourrait s'expliquer par une forte stabilité de l'interaction entre LRP1 et CD44 qui ne laisserait pas la possibilité aux antagonistes d'agir ou par une association ne faisant pas exclusivement intervenir les domaines d'affinité de ces antagonistes (chaîne β de LRP1 par exemple). Nous pourrions également envisager la possibilité d'un intermédiaire d'interaction insensible à RAP, comme cela a précédemment été évoqué dans le cadre de l'interaction entre LRP1 et le complexe proMMP2/TIMP2 (Emonard *et al.*, 2004). Ces données rendent d'autant plus complexe l'étude de la fonction du complexe sur le phénotype tumoral.

Toutefois, d'autres zones d'ombre restent à éclaircir à propos de l'interaction entre les deux récepteurs. Il conviendrait principalement de déterminer si celle-ci a lieu de manière directe ou indirecte. En effet, LRP1 et CD44 possèdent des ligands (fibronectine), des partenaires membranaires (MT1-MMP) ainsi que des protéines adaptatrices intracellulaires (Src) communs (Goodison *et al.* 1999; Kajita *et al.* 2001; Herz et Strickland 2001; Rozanov *et al.* 2004). Des tentatives de double immunoprécipitation de LRP1 et CD44 ont été réalisées pour observer si d'autres protéines étaient associées à ces récepteurs, malheureusement sans succès. C'est pourquoi pour poursuivre ces travaux, nous étudions la possibilité d'utiliser des constructions permettant de réaliser des GST-*pull-down* afin de déterminer si LRP1 et CD44 peuvent interagir directement *in vitro*. Cette stratégie nous permettra également de confirmer les domaines de LRP1 responsables de cette interaction. De plus, la technique de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) pourrait être envisagée pour mieux apprécier la proximité entre les deux récepteurs. Enfin, si l'interaction entre les deux récepteurs apparaît directe, nous pourrions tenter d'examiner quel domaine ou séquence de CD44 permet sa fixation sur LRP1. La structure protéique de CD44 comporte une tête globulaire N-terminale qui permet la reconnaissance de certains de ses ligands (acide hyaluronique). Cette structure offre donc a priori une première piste dans la compréhension de l'interaction entre LRP1 et CD44. Néanmoins les premiers travaux effectués employant un anticorps bloquant CD44 par fixation sur son extrémité N-terminale ne montrent pas de modifications dans la formation du complexe-récepteurs.

II.

**ETUDE DE LA LOCALISATION DU COMPLEXE
LRP1/CD44**

Dans la seconde partie de notre étude, nous avons observé la répartition subcellulaire du complexe LRP1/CD44 dans les cellules de carcinome thyroïdien. L'imagerie confocale a révélé que les deux récepteurs étaient très fortement colocalisés à la membrane plasmique (coefficient de corrélation de 0.931). Même si la colocalisation de protéines observée par immunomarquages présente des limites dues notamment à la taille des pixels qui empêchent de conclure quant à une interaction directe entre les deux partenaires, ce résultat est parfaitement cohérent avec les résultats issus des expérimentations précédentes et va dans le sens de l'existence de relations étroites entre les deux récepteurs.

Les données bibliographiques sur la répartition membranaire de LRP1 et CD44 indiquent que ces deux récepteurs peuvent être localisés dans des microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques (Oliferenko *et al.* 1999; Wu et Gonias 2005, Boucher *et al.* 2002). Toutefois, cette localisation est largement dépendante du type cellulaire étudié et sa fonction reste souvent à déterminer. Les travaux de centrifugation différentielle à gradient de saccharose nous ont permis de déterminer que le complexe LRP1/CD44 était principalement localisé dans les microdomaines membranaires et notamment dans les cavéoles. Néanmoins, les *rafts* n'apparaissent nécessaires ni à l'établissement, ni au maintien du complexe LRP1/CD44 puisqu'une déplétion en cholestérol n'empêche pas sa détection et n'induit vraisemblablement pas non plus une relocalisation. Une étude plus poussée du rôle de cette répartition membranaire serait nécessaire pour compléter notre étude et notamment pour mieux préciser la fonction du complexe LRP1/CD44 sur le comportement tumoral. En effet, les cavéoles sont connues pour être des plateformes de signalisation, il est alors envisageable que le complexe LRP1/CD44 y trouve des adaptateurs protéiques communs (Src, cdc42, Rho) capables d'enclencher un signal intracellulaire et de modifier le comportement tumoral. En effet, les deux récepteurs sont capables de moduler des voies de signalisation communes comme la voie ERK ou celle des RhoGTPases (Langlois *et al.* 2010; Kothapalli *et al.* 2008; Mantuano *et al.* 2010; Bourguignon 2008) et ainsi d'influencer la survie, la prolifération et la progression tumorale. En considérant les travaux récents issus de notre groupe de recherche (Langlois *et al.* 2010), nous chercherons à déterminer si ce complexe moléculaire est capable de réguler certaines MAPK, et en particulier ERK-1/2 et JNK-1/2/3. Pour ce faire, des

mutants dominant-négatifs et constitutivement-actifs de chacune de ces kinases qui sont en notre possession, seront utilisés pour répondre à cette question (Dedieu *et al.* 2006 ; Langlois *et al.* 2010). De façon complémentaire, des *IP-GTPase assays* viennent d'être initiés afin de déterminer l'influence de ce complexe sur les protéines G monomériques de la famille Rho.

III.

ETUDE DE L'ENDOCYTOSE DE CD44 ET EFFETS DU COMPLEXE LRP1/CD44 SUR L'ADHÉRENCE CELLULAIRE

Face à l'augmentation de la présence de CD44 à la membrane plasmique suite à l'inhibition de l'activité d'endocytose de LRP1, nous avons voulu étudier l'endocytose de CD44 dans notre système cellulaire. Indépendamment de LRP1, CD44 est connu pour pouvoir effectuer l'endocytose de l'acide hyaluronique dans le cadre de la régulation de son catabolisme (Culty *et al.* 1992). A l'heure actuelle, ce mécanisme est assez peu décrit mais il semble qu'il n'implique pas les voies d'endocytose dites traditionnelles constituées par la voie des vésicules tapissées de clathrine et celle des cavéoles (Eyster *et al.* 2009).

Au cours de l'étude des mécanismes d'endocytose dans les cellules FTC133, nous avons réalisé des co-immunomarquages de CD44 et de marqueurs d'endosomes précoces (EEA1) ou de lysosomes (LAMP1). Après analyse en microscopie confocale, nous avons mis en évidence que CD44 était en partie localisé dans les endosomes précoces ainsi que dans les lysosomes. De plus, cette répartition est très largement affectée par l'utilisation de RAP. Il semble donc que, dans les cellules FTC133, CD44 soit endocyté et que ce mécanisme fasse majoritairement intervenir LRP1. Toutefois, nos observations semblent en contradiction avec la bibliographie actuelle sur CD44. En effet, même si ces données sont controversées, l'endocytose de CD44 apparaît être suivie par un recyclage du récepteur à la membrane et non par une dégradation de celui-ci dans le compartiment lysosomal (Tammi *et al.* 2001; Knudson *et al.* 2002). Il est donc nécessaire pour la suite de nos travaux de conforter ces résultats et de savoir si CD44 peut-être catabolisé dans les lysosomes. L'utilisation de chloroquine devrait par exemple nous être utile afin de renforcer le signal issu des vésicules lysosomales. L'utilisation de *Lysotracker* (Invitrogene) en vidéomicroscopie devrait également permettre de mieux appréhender cette question.

Les résultats issus des stratégies d'imagerie ont été largement confirmés par les tests d'endocytose biochimiques que nous avons développés, notamment en inhibant LRP1 à l'aide de RAP ou en invalidant son expression par l'interférence à l'ARN. Les résultats obtenus montrent sans équivoque que CD44 est endocyté dans notre système cellulaire et que cette endocytose fait en grande partie intervenir LRP1. Nous pouvons tout à fait envisager que l'endocytose résiduelle de CD44 suite à l'inhibition de LRP1 puisse provenir du mécanisme d'endocytose intrinsèque du récepteur préalablement décrit. Pour tenter de déterminer la voie d'endocytose empruntée, des tests d'endocytose ont été réalisés suite à une déplétion en cholestérol (abolissant l'endocytose par les cavéoles) ou avec un choc osmotique (abolissant l'endocytose par la voie des vésicules à clathrine). Ils ont révélé que l'endocytose de CD44 n'avait pas lieu par l'intermédiaire des cavéoles mais plutôt par la voie des vésicules tapissées de clathrine. Compte tenu des données bibliographiques actuelles, nos résultats restent singuliers. En effet, CD44 semblait majoritairement exclu des vésicules tapissées de clathrine et utiliser une voie d'endocytose indépendante de celles-ci (Isacke 2004; Eyster *et al.* 2009). Il a également été décrit que l'acylation de CD44 et sa localisation dans les rafts était nécessaire pour l'endocytose de l'acide hyaluronique dans des cellules COS-7 et Flp-293 (Thankamony et Knudson 2006). Cependant, à l'heure actuelle, très peu de données sont disponibles sur l'endocytose de CD44 par la voie des clathrines. Notons que les travaux publiés à ce sujet concernent exclusivement l'endocytose de CD44 impliquant l'acide hyaluronique et que rien ne prouve à l'heure actuelle que cette voie soit dépendante de LRP1. Nous devons donc prochainement envisager d'étudier si l'acide hyaluronique est associé au complexe LRP1/CD44 lorsque celui-ci est endocyté dans notre environnement cellulaire. Nous pourrions pour cela utiliser des marqueurs fluorescents de l'acide hyaluronique (basés sur son affinité pour la *hyaluronic acid binding protein*) en imagerie confocale, définir si ce GAG est endocyté ou non dans les cellules FTC133 et si cette endocytose est dépendante de LRP1 et/ou du complexe LRP1/CD44. Pour compléter nos travaux, l'étude du rôle de l'acide hyaluronique sur la formation du complexe-récepteurs semble indispensable. Nous avons d'ores et déjà procédé à une co-immunoprécipitation de LRP1 sur des cellules FTC133 traitées ou non avec de l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire. La quantité de CD44 immunoprécipité reste inchangée. Toutefois, l'acide hyaluronique peut également se présenter sous des formes tronquées de plus petit poids moléculaire et ayant des fonctions différentes de la forme de haut poids moléculaire (Mizrahy *et al.* 2011; Bourguignon *et al.* 2011). Tester l'effet de l'acide hyaluronique de faible poids moléculaire présente également un intérêt

certain. Il pourrait également être envisagé que la complexation de LRP1 avec CD44 module transitoirement la localisation subcellulaire de ce dernier. Nous souhaitons donc conforter ces résultats en utilisant notamment des stratégies d'imagerie confocale et des protocoles de séparation des compartiments d'endocytose par centrifugation différentielle à gradient de saccharose.

Le but principal de mon travail de thèse était de déterminer si la capacité de LRP1 à réguler le protéome membranaire pouvait modifier le comportement cellulaire notamment vis-à-vis de l'adhérence. En effet, il a été précédemment montré que l'inhibition ou l'invalidation de LRP1 augmentait l'adhérence cellulaire (Dedieu *et al.* 2008). Dans la continuité, nous avons voulu étudier si l'étroite relation entre LRP1 et le récepteur d'adhérence CD44 que nous avons mise en évidence pouvait influencer l'adhérence des cellules tumorales. Pour ce faire nous avons procédé à des tests d'adhérence suite à l'invalidation de CD44 couplée ou non à l'inhibition de LRP1. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que la capacité de LRP1 à réguler l'adhérence était en grande partie due à la présence de CD44. Nous pouvons donc supposer que, à l'image des intégrines, l'endocytose de CD44 par LRP1 régulant sa présence à la membrane plasmique, contribue à l'établissement d'une balance adhérence/dé-adhérence optimale pour favoriser la migration. Afin de compléter ces travaux, des expériences de vidéomicroscopie ont d'ores et déjà été initiés avec des résultats préliminaires qui apparaissent conforter nos hypothèses.

IV.

MISE EN EVIDENCE DE L'INFLUENCE DE LRP1 SUR LE *SHEDDING* DE CD44 ET DU RÔLE DES CAVÉOLES

Dans la dernière partie de notre étude, nous nous sommes intéressés à la question du *shedding* de ces récepteurs. Nos observations laissaient en effet supposer qu'il existait un mécanisme compensatoire contrecarrant l'augmentation de la présence de CD44 à la membrane plasmique suite au déficit de son endocytose. Les premiers résultats obtenus ont révélé que l'inhibition ou l'invalidation de LRP1 provoquait une augmentation significative de la présence de CD44 dans les milieux de culture des cellules. Ceci semble donc indiquer un rôle protecteur de LRP1 vis-à-vis du *shedding* de CD44. Nous pouvons également faire une

remarque sur le poids moléculaire de la forme *shedde* de CD44 dans les cellules FTC133. En effet, la forme soluble retrouvée dans nos surnageants de culture possède une masse moléculaire sensiblement proche de la forme membranaire de CD44s (~85 kDa). Si nos observations ne sont pas en contradiction avec la bibliographie qui décrit des formes solubles de CD44 allant jusqu'à 200 kDa (Guo *et al.* 1994), elle soulève néanmoins un doute quant à la forme membranaire de CD44 *shedde* dans notre environnement cellulaire. La partie intracellulaire de CD44 ayant une masse moléculaire approximative de 25 kDa (Okamoto *et al.* 2002), nous pouvons supposer que la forme soluble observée dans les cellules FTC133 correspond plutôt au *shedding* de la forme de CD44 de 120 kDa. Cette hypothèse reste bien sûr à vérifier, notamment par le biais de glycosidases.

Dans la suite de nos travaux, nous tenterons de mieux appréhender les mécanismes moléculaires régulant le *shedding* de CD44 et qui impliquent LRP1. Plusieurs hypothèses sont envisageables. D'une part, il est concevable que l'augmentation de la présence de CD44 à la membrane plasmique le rende plus "disponible" pour un clivage protéolytique qui permettrait de limiter cette accumulation. Nous pouvons également envisager que l'interaction entre LRP1 et CD44 limite le clivage de l'ectodomaine de ce dernier afin de favoriser celui de LRP1. Cette hypothèse impliquerait que les deux récepteurs puissent partager les mêmes *sheddases*. Enfin, nous pouvons penser que la répartition de CD44 au niveau membranaire puisse influencer son *shedding*. En effet, il a récemment été décrit que la déplétion en cholestérol abolissant la formation des radeaux lipidiques augmentait le clivage de CD44 par l'ADAM10 (Murai *et al.* 2011). Etant donné la forte proportion de complexe LRP1/CD44 localisée dans les radeaux lipidiques dans notre système cellulaire, il serait intéressant de vérifier cette hypothèse et d'estimer le rôle protecteur des radeaux lipidiques sur le *shedding* de CD44. Les toutes premières manipulations effectuées nous apprennent que dans les cellules FTC133, la déplétion en cholestérol augmente de manière drastique le *shedding* de CD44. Là encore d'autres expérimentations sont à prévoir pour mieux définir ce processus puisqu'il faut déterminer s'il est dépendant de LRP1 (*via* la combinaison du β -MCD avec RAP ou l'interférence à l'ARN). Nous pourrions également envisager d'utiliser d'autres molécules permettant la diminution du cholestérol membranaire comme la lovastatine ou au contraire saturant les cellules en cholestérol comme le β -MCD chargé en cholestérol.

Les travaux préliminaires pour mieux caractériser le *shedding* de CD44 dans les cellules FTC133 ont révélé qu'il était effectué majoritairement par des métalloprotéases. Des stratégies d'interférence ARN dirigées contre différents membres de cette famille indiquent

que la MT1-MMP et les ADAMs 10 et 17 sont impliquées, mais pas l'ADAM12. Ces résultats sont tout à fait en accord avec les données bibliographiques (Cichy et Puré 2003). Toutefois, il s'avère nécessaire de connaître la(es)quelle(s) de ces protéases joue(nt) un rôle dans le *shedding* de CD44 induit par l'inhibition de LRP1. Ce dernier partage les mêmes *sheddases* que CD44 dans les FTC133, ce qui appuie l'hypothèse d'une éventuelle coopération des protéases dans la régulation du clivage de l'un ou l'autre des récepteurs.

De plus, il a été décrit que la MT1-MMP pouvait être localisée dans les radeaux lipidiques, mais il semble que cette répartition membranaire et plus particulièrement sa colocalisation avec la cavéoline-1, affecte sa capacité protéolytique, notamment dans l'activation de la proMMP2 {Citation}. Concernant les ADAMs 10 et 17, il a été observé qu'une déplétion en cholestérol potentialisait leur capacité protéolytique (Matthews *et al.* 2003). Ces constatations nous seront utiles dans la détermination de l'éventuel rôle protecteur des radeaux lipidiques sur le *shedding* de CD44. Nous pourrions alors envisager que la localisation du complexe LRP1/CD44 dans les cavéoles empêche le *shedding* de CD44 et que par conséquent, la déplétion en cholestérol impose une réorganisation de la répartition membranaire du complexe l'exposant davantage aux métalloprotéases membranaires.

Enfin, nous tenterons de déterminer la fonction de la forme clivée de CD44 sur nos cellules. En effet, il a été précédemment décrit que la forme soluble de CD44 pouvait influencer le phénotype tumoral et notamment la migration cellulaire (Cichy et Puré 2003; Peterson *et al.* 2000). Ces observations s'expliquent en partie par le fait que le sCD44 entre en compétition avec le CD44 membranaire dans la fixation des ses ligands et notamment de l'acide hyaluronique. La diminution de liaison du CD44 membranaire à l'acide hyaluronique va faciliter le détachement des cellules et ainsi la migration cellulaire (Okamoto *et al.* 1999). Nous pourrions dans ce cadre surexprimer une forme recombinante soluble de CD44 (comportant les exons 1-5 et 16) et observer les conséquences sur l'adhérence, la migration et l'invasion tumorale. Des travaux recherchant l'existence du *RIPping* impliquant le CD44-ICD aurait également beaucoup d'intérêt. Nous pourrions dans cet objectif surexprimer une forme de CD44 couplée dans sa partie C-terminale à un fluorophore (GFP) et observer la présence de fluorescence dans le noyau des cellules. Cette technique couplée à des inhibiteurs de γ -sécrétases nous permettrait de déterminer si un tel mécanisme est effectif dans notre environnement tumoral.

Malgré son aspect novateur, la découverte de l'interaction entre LRP1 et CD44 soulève encore beaucoup de questions. Des recherches complémentaires nous seront donc nécessaires pour mieux définir les différents aspects et enjeux de cette interaction et clarifier son implication lors de la tumorigenèse.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Akisik E, S Bavbek, et N Dalay. 2002. « CD44 variant exons in leukemia and lymphoma ». *Pathology Oncology Research: POR* 8 (1): 36-40.
- Annabi B, M Lachambre, N Bousquet-Gagnon, M Pagé, D Gingras, et R Béliveau. 2001. « Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains ». *The Biochemical Journal* 353 (Pt 3): 547-553.
- Apte S S. 2009. « A Disintegrin-like and Metalloprotease (Reprolysin-type) with Thrombospondin Type 1 Motif (ADAMTS) Superfamily: Functions and Mechanisms ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (46): 31493-31497. doi:10.1074/jbc.R109.052340.
- Baker A H, D R Edwards, et G Murphy. 2002. « Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities ». *Journal of Cell Science* 115 (Pt 19): 3719-3727.
- Barczyk M, S Carracedo, et D Gullberg. 2010. « Integrins ». *Cell and Tissue Research* 339 (1): 269-280. doi:10.1007/s00441-009-0834-6.
- Barmina O Y., H W. Walling, G J. Fiacco, J M. P. Freije, C López-Otín, J J. Jeffrey, et N C. Partridge. 1999. « Collagenase-3 Binds to a Specific Receptor and Requires the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein for Internalization ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (42): 30087 -30093. doi:10.1074/jbc.274.42.30087.
- Beaujouin M, C Prébois, D Derocq, V Laurent-Matha, O Masson, S Pattingre, P Coopman, *et al.* 2010. « Pro-cathepsin D interacts with the extracellular domain of the β chain of LRP1 and promotes LRP1-dependent fibroblast outgrowth ». *Journal of Cell Science* 123 (19): 3336 -3346. doi:10.1242/jcs.070938.

- Blasi F, et P Carmeliet. 2002. « uPAR: a versatile signalling orchestrator ». *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (12): 932-943. doi:10.1038/nrm977.
- Borland G, J A Ross, et K Guy. 1998. « Forms and functions of CD44. » *Immunology* 93 (2): 139-148.
- Boucher P, M Gotthardt, W-P Li, R G. W. Anderson, et J Herz. 2003. « LRP: Role in Vascular Wall Integrity and Protection from Atherosclerosis ». *Science* 300 (5617): 329 -332. doi:10.1126/science.1082095.
- Boucher P, P Liu, M Gotthardt, T Hiesberger, R G W Anderson, et J Herz. 2002. « Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low Density lipoprotein receptor-related protein in caveolae ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (18): 15507-15513. doi:10.1074/jbc.M200428200.
- Bourboulia D, et W G. Stetler-Stevenson. 2010. « Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion ». *Seminars in Cancer Biology* 20 (3): 161-168. doi:10.1016/j.semcancer.2010.05.002.
- Bourguignon L Y W. 2008. « Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression ». *Seminars in Cancer Biology* 18 (4): 251-259. doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.007.
- Bourguignon L Y W, G Wong, C A Earle, et W Xia. 2011. « Interaction of low molecular weight hyaluronan with CD44 and toll-like receptors promotes the actin filament-associated protein 110-actin binding and MyD88-NFκB signaling leading to proinflammatory cytokine/chemokine production and breast tumor invasion ». *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 68 (12): 671-693. doi:10.1002/cm.20544.
- Bradford M M. 1976. « A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding ». *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

- Cam J A., C V. Zerbinatti, Y Li, et G Bu. 2005. « Rapid Endocytosis of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Modulates Cell Surface Distribution and Processing of the β -Amyloid Precursor Protein ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (15): 15464 -15470. doi:10.1074/jbc.M500613200.
- Chambers A F., et L M. Matrisian. 1997. « Changing Views of the Role of Matrix Metalloproteinases in Metastasis ». *Journal of the National Cancer Institute* 89 (17): 1260 -1270. doi:10.1093/jnci/89.17.1260.
- Cichy J, et E Puré. 2003. « The liberation of CD44 ». *The Journal of Cell Biology* 161 (5): 839-843. doi:10.1083/jcb.200302098.
- Croucher D, Dn N. Saunders, et M Ranson. 2006. « The Urokinase/PAI-2 Complex ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (15): 10206 -10213. doi:10.1074/jbc.M513645200.
- Cruz-Munoz W, et R Khokha. 2008. « The role of tissue inhibitors of metalloproteinases in tumorigenesis and metastasis ». *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 45 (3): 291-338. doi:10.1080/10408360801973244.
- Culty M, H A Nguyen, et C B Underhill. 1992. « The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. » *The Journal of Cell Biology* 116 (4): 1055 -1062. doi:10.1083/jcb.116.4.1055.
- Deane R, RD Bell, A Sagare, et BV Zlokovic. 2009. « Clearance of amyloid- β peptide across the blood-brain barrier: Implication for therapies in Alzheimer's disease ». *CNS & neurological disorders drug targets* 8 (1): 16-30.
- Dedieu S, et P Lefebvre. 2006. « Retinoids interfere with the AP1 signalling pathway in human breast cancer cells ». *Cellular Signalling* 18 (6): 889-898. doi:10.1016/j.cellsig.2005.08.001.

- Dedieu S, B Langlois, J Devy, B Sid, P Henriet, H Sartelet, G Bellon, H Emonard, et L Martiny. 2008. « LRP-1 silencing prevents malignant cell invasion despite increased pericellular proteolytic activities ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (9): 2980-2995. doi:10.1128/MCB.02238-07.
- Demeure M J, K M Doffek, et S D Wilson. 1997. « Defective thyrotropin receptor G-protein cyclic adenosine monophosphate signaling mechanism in the FTC human follicular thyroid cancer cell line ». *Surgery* 122 (6): 1195-1201; discussion 1201-1202.
- Derocq D, C Prebois, M Beaujouin, V Laurent-Matha, S Patingre, G K Smith, et E Liaudet-Coopman. 2011. « Cathepsin D is partly endocytosed by the LRP1 receptor and inhibits LRP1-regulated intramembrane proteolysis ». *Oncogene* . <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.501>.
- Derwahl M, M Kuemmel, P Goretzki, H Schatz, et M Broecker. 1993. « Expression of the human TSH receptor in a human thyroid carcinoma cell line that lacks an endogenous TSH receptor: growth inhibition by cAMP ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 191 (3): 1131-1138. doi:10.1006/bbrc.1993.1334.
- Donoso M, J Cancino, J Lee, P van Kerkhof, C Retamal, G Bu, A Gonzalez, A Cáceres, et M-P Marzolo. 2009. « Polarized Traffic of LRP1 Involves AP1B and SNX17 Operating on Y-dependent Sorting Motifs in Different Pathways ». *Molecular Biology of the Cell* 20 (1): 481 -497. doi:10.1091/mbc.E08-08-0805.
- Egeblad M, et Z Werb. 2002. « New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression ». *Nature Reviews. Cancer* 2 (3): 161-174. doi:10.1038/nrc745.
- Emonard H, G Bellon, P de Diesbach, M Mettlen, W Hornebeck, et P J. Courtoy. 2005. « Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) activity by the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP). A new function for an “old friend” ». *Biochimie* 87 (3-4): 369-376. doi:10.1016/j.biochi.2004.11.013.

- Eyster C A, J D Higginson, R Huebner, N Porat-Shliom, R Weigert, W W Wu, R-F Shen, et J G Donaldson. 2009. « Discovery of new cargo proteins that enter cells through clathrin-independent endocytosis ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 10 (5): 590-599. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00894.x.
- Ferrara N. 2010. « Binding to the Extracellular Matrix and Proteolytic Processing: Two Key Mechanisms Regulating Vascular Endothelial Growth Factor Action ». *Molecular Biology of the Cell* 21 (5): 687 -690. doi:10.1091/mbc.E09-07-0590.
- Figge J, A D del Rosario, G Gerasimov, I Dedov, M Bronstein, K Troshina, G Alexandrova, B V Kallakury, H X Bui, et G Bratslavsky. 1994. « Preferential expression of the cell adhesion molecule CD44 in papillary thyroid carcinoma ». *Experimental and Molecular Pathology* 61 (3): 203-211.
- Friedl P, et K Wolf. 2003. « Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms ». *Nat Rev Cancer* 3 (5): 362-374. doi:10.1038/nrc1075.
- Gasingirwa M-C, J Thirion, C Costa, B Flamion, P Lobel, et M Jadot. 2008. « A method to assess the lysosomal residence of proteins in cultured cells ». *Analytical Biochemistry* 374 (1): 31-40. doi:10.1016/j.ab.2007.11.021.
- Gaultier A, A M Salicioni, S Arandjelovic, et S L. Gonias. 2006. « Regulation of the Composition of the Extracellular Matrix by Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-1 ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (11): 7332 -7340. doi:10.1074/jbc.M511857200.
- Ginsberg M H, A Partridge, et S J Shattil. 2005. « Integrin regulation ». *Current Opinion in Cell Biology* 17 (5): 509-516. doi:10.1016/j.ceb.2005.08.010.
- Gonias S L, L Wu, et A M Salicioni. 2004. « Low density lipoprotein receptor-related protein: regulation of the plasma membrane proteome ». *Thrombosis and Haemostasis* 91 (6): 1056-1064. doi:10.1267/THRO04061056.

- Goodison S, V Urquidi, et D Tarin. 1999. « CD44 cell adhesion molecules. » *Molecular Pathology* 52 (4): 189-196.
- Gu J, T Daa, K Kashima, S Yokoyama, I Nakayama, et S Noguchi. 1998. « Expression of splice variants of CD44 in thyroid neoplasms derived from follicular cells ». *Pathology International* 48 (3): 184-190.
- Guo, Y J, G Liu, X Wang, D Jin, M Wu, J Ma, et M S Sy. 1994. « Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer ». *Cancer Research* 54 (2): 422-426.
- Guttman M, G N. Betts, H Barnes, M Ghassemian, Pr van der Geer, et E A. Komives. 2009. « Interactions of the NPXY microdomains of the LDL Receptor-Related Protein 1 ». *Proteomics* 9 (22): 5016-5028. doi:10.1002/pmic.200900457.
- Hahn-Dantona E, J F. Ruiz, P Bornstein, et D K. Strickland. 2001. « The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Modulates Levels of Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) by Mediating Its Cellular Catabolism ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (18): 15498 -15503. doi:10.1074/jbc.M100121200.
- Hanahan D, et R A Weinberg. 2000. « The Hallmarks of Cancer ». *Cell* 100 (1): 57-70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- Herz J, U Hamann, S Rogne, O Myklebost, H Gausepohl, et K K Stanley. 1988. « Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor ». *The EMBO Journal* 7 (13): 4119-4127.
- Herz J, et D K Strickland. 2001. « LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor ». *The Journal of Clinical Investigation* 108 (6): 779-784. doi:10.1172/JCI13992.
- Herz J, et H H Bock. 2002. « Lipoprotein receptors in the nervous system ». *Annual Review of Biochemistry* 71: 405-434. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135342.

- Hill M M, M Bastiani, R Luetterforst, M Kirkham, A Kirkham, S J Nixon, P Walser, *et al.* 2008. « PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function ». *Cell* 132 (1): 113-124. doi:10.1016/j.cell.2007.11.042.
- Hoelting T, Q Y Duh, O H Clark, et C Herfarth. 1996. « Somatostatin analog octreotide inhibits the growth of differentiated thyroid cancer cells in vitro, but not in vivo ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 (7): 2638-2641.
- Horwitz R, et D Webb. 2003. « Cell migration ». *Current Biology* 13 (19): R756-R759. doi:10.1016/j.cub.2003.09.014.
- Huveneers S, et E H. J. Danen. 2009. « Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho ». *Journal of Cell Science* 122 (8): 1059 -1069. doi:10.1242/jcs.039446.
- Hölting T, A Zielke, A E Siperstein, O H Clark, et Q Y Duh. 1994. « Transforming growth factor-beta 1 is a negative regulator for differentiated thyroid cancer: studies of growth, migration, invasion, and adhesion of cultured follicular and papillary thyroid cancer cell lines ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79 (3): 806-813.
- Isacke C M. 2004. « The role of the cytoplasmic domain in regulating CD44 function ». *Journal of Cell Science* 107 (9): 2353 -2359.
- Jacob M-P. 2006. « [Extracellular matrix and vascular ageing] ». *Médecine Sciences: M/S* 22 (3): 273-278. doi:10.1051/medsci/2006223273.
- Jalkanen S, et M Jalkanen. 1992. « Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. » *The Journal of Cell Biology* 116 (3): 817 -825. doi:10.1083/jcb.116.3.817.

- Jensen J K., K Dolmer, C Schar, et P G. W. Gettins. 2009. « Receptor-associated protein (RAP) has two high-affinity binding sites for the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP): consequences for the chaperone functions of RAP » 421 (Pt 2): 273-282. doi:10.1042/BJ20090175.
- Jiang H, R S. Peterson, W Wang, E Bartnik, C B. Knudson, et W Knudson. 2002. « A Requirement for the CD44 Cytoplasmic Domain for Hyaluronan Binding, Pericellular Matrix Assembly, and Receptor-mediated Endocytosis in COS-7 Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (12): 10531 -10538. doi:10.1074/jbc.M108654200.
- Kajinami K, H Mabuchi, H Itoh, I Michishita, M Takeda, T Wakasugi, J Koizumi, et R Takeda. 1988. « New variant of low density lipoprotein receptor gene. FH-Tonami ». *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 8 (2): 187-192.
- Kajita M, Y Itoh, T Chiba, H Mori, A Okada, H Kinoh, et M Seiki. 2001. « Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration ». *The Journal of Cell Biology* 153 (5): 893-904.
- Kim H-N, et H-S Chung. 2008. « Caveolin-1 inhibits membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity ». *BMB Reports* 41 (12): 858-862.
- Kim S-H, J Turnbull, et S Guimond. 2011. « Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor ». *The Journal of Endocrinology* 209 (2): 139-151. doi:10.1530/JOE-10-0377.
- Knudson W, G Chow, et C B Knudson. 2002. « CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 21 (1): 15-23.
- Kothapalli D, J Flowers, T Xu, E Puré, et R K Assoian. 2008. « Differential activation of ERK and Rac mediates the proliferative and anti-proliferative effects of hyaluronan and CD44 ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (46): 31823-31829. doi:10.1074/jbc.M802934200.

- Langlois B., H. Emonard, L. Martiny, et S. Dedieu. 2009. « Implications multiples du récepteur LRP-1 dans la progression tumorale ». *Pathologie Biologie* 57 (7-8): 548-554. doi:10.1016/j.patbio.2008.07.015.
- Langlois B, G Perrot, C Schneider, P Henriët, H Emonard, L Martiny, et S Dedieu. 2010. « LRP-1 Promotes Cancer Cell Invasion by Supporting ERK and Inhibiting JNK Signaling Pathways ». *PLoS ONE* 5 (7). doi:10.1371/journal.pone.0011584.
- de Laurentiis A, L Donovan, et A Arcaro. 2007. « Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors ». *The Open Biochemistry Journal* 1: 12-32. doi:10.2174/1874091X00701010012.
- Lee J-L, M-J Wang, P-R Sudhir, et Ju-Y Chen. 2008. « CD44 Engagement Promotes Matrix-Derived Survival through the CD44-SRC-Integrin Axis in Lipid Rafts ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (18): 5710 -5723. doi:10.1128/MCB.00186-08.
- Li Y, M P Marzolo, P van Kerkhof, G J. Strous, et G Bu. 2000. « The YXXL Motif, but Not the Two NPXY Motifs, Serves as the Dominant Endocytosis Signal for Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (22): 17187 -17194. doi:10.1074/jbc.M000490200.
- Lillis A P, L B Van Duyn, J E Murphy-Ullrich, et D K Strickland. 2008. « LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies ». *Physiological Reviews* 88 (3): 887-918. doi:10.1152/physrev.00033.2007.
- Liu L, et P F Pilch. 2008. « A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (7): 4314-4322. doi:10.1074/jbc.M707890200.
- Liu Q, J Zhang, H Tran, M M Verbeek, K Reiss, S Estus, et G Bu. 2009. « LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17 ». *Molecular Neurodegeneration* 4: 17. doi:10.1186/1750-1326-4-17.

- Lorch J H. 2009. « Role of EGF inhibitors in the treatment of recurrent or metastatic squamous cell head and neck cancer ». *Cancer Management and Research* 1 : 151-154.
- Loukinova E, S Ranganathan, S Kuznetsov, N Gorlatova, M M Migliorini, D Loukinov, P G Ulery, I Mikhailenko, D A Lawrence, et D K Strickland. 2002. « Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (18): 15499-15506. doi:10.1074/jbc.M200427200.
- Lutz C, J Nimpf, M Jenny, K Boecklinger, C Enzinger, G Utermann, G Baier-Bitterlich, et G Baier. 2002. « Evidence of Functional Modulation of the MEKK/JNK/cJun Signaling Cascade by the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (45): 43143 -43151. doi:10.1074/jbc.M204426200.
- Mantuano E, M Jo, S L Gonias, et W M Campana. 2010. « Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) regulates Rac1 and RhoA reciprocally to control Schwann cell adhesion and migration ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (19): 14259-14266. doi:10.1074/jbc.M109.085126.
- Marhaba R, et M Zöller. 2004. « CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation ». *Journal of Molecular Histology* 35 (3): 211-231.
- Maruta J, H Hashimoto, H Yamashita, H Yamashita, et S Noguchi. 2004. « Immunostaining of galectin-3 and CD44v6 using fine-needle aspiration for distinguishing follicular carcinoma from adenoma ». *Diagnostic Cytopathology* 31 (6): 392-396. doi:10.1002/dc.20156.
- Masson O, C Chavey, C Dray, A Meulle, D Daviaud, D Quilliot, C Muller, P Valet, et E Liaudet-Coopman. 2009. « LRP1 receptor controls adipogenesis and is up-regulated in human and mouse obese adipose tissue ». *PloS One* 4 (10): e7422. doi:10.1371/journal.pone.0007422.

- Matthews V, B Schuster, S Schütze, I Bussmeyer, A Ludwig, C Hundhausen, T Sadowski, *et al.* 2003. « Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE) ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (40): 38829-38839. doi:10.1074/jbc.M210584200.
- May P, Y K Reddy, et J Herz. 2002. « Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (21): 18736-18743. doi:10.1074/jbc.M201979200.
- Mizrahy S, S Rebe Raz, M Hasgaard, H Liu, N Soffer-Tsur, K Cohen, R Dvash, *et al.* 2011. « Hyaluronan-coated nanoparticles: the influence of the molecular weight on CD44-hyaluronan interactions and on the immune response ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 156 (2): 231-238. doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.031.
- Montel V, A Gaultier, R D. Lester, W. M Campana, et S L. Gonias. 2007. « The Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Regulates Cancer Cell Survival and Metastasis Development ». *Cancer Research* 67 (20): 9817 -9824. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0683.
- Motoharu S. 2003. « Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion ». *Cancer Letters* 194 (1): 1-11. doi:10.1016/S0304-3835(02)00699-7.
- Murai T, Y Maruyama, Ko Mio, H Nishiyama, M Suga, et C Sato. 2011. « Low cholesterol triggers membrane microdomain-dependent CD44 shedding and suppresses tumor cell migration ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (3): 1999-2007. doi:10.1074/jbc.M110.184010.
- Murphy G. 2008. « The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment ». *Nature Reviews. Cancer* 8 (12): 929-941. doi:10.1038/nrc2459.

- Murphy G. 2009. « Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the Sheddases ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (2): 138-145. doi:10.1016/j.semcdb.2008.09.004.
- Myöhänen H., et A. Vaheri. 2004. « Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 2840-2858. doi:10.1007/s00018-004-4230-9.
- Nasir A, E Catalano, S Calafati, A Cantor, H E Kaiser, et D Coppola. 2004. « Role of p53, CD44V6 and CD57 in differentiating between benign and malignant follicular neoplasms of the thyroid ». *In Vivo (Athens, Greece)* 18 (2): 189-195.
- Nho R S, H Xia, J Kahm, J Kleidon, D Diebold, et C A Henke. 2005. « Role of integrin-linked kinase in regulating phosphorylation of Akt and fibroblast survival in type I collagen matrices through a beta1 integrin viability signaling pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (28): 26630-26639. doi:10.1074/jbc.M411798200.
- Nykjaer A, C M Petersen, B Møller, P H Jensen, S K Moestrup, T L Holtet, M Etzerodt, H C Thøgersen, M Munch, et P A Andreasen. 1992. « Purified alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes. » *Journal of Biological Chemistry* 267 (21): 14543 -14546.
- Nykjaer A, M Conese, E I. Christensen, D Olson, O Cremona, J Gliemann, et F Blasi. 1997. « Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes ». *EMBO J* 16 (10): 2610-2620. doi:10.1093/emboj/16.10.2610.
- Obermoeller-McCormick L M, Y Li, H Osaka, D J FitzGerald, A L Schwartz, et G Bu. 2001. « Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 5): 899-908.

- Oka J A, M D Christensen, et P H Weigel. 1989a. « Hyperosmolarity inhibits galactosyl receptor-mediated but not fluid phase endocytosis in isolated rat hepatocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 264 (20): 12016-12024.
- Okamoto I, Y Kawano, D Murakami, T Sasayama, N Araki, T Miki, A J Wong, et H Saya. 2001. « Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway ». *The Journal of Cell Biology* 155 (5): 755-762. doi:10.1083/jcb.200108159.
- Okamoto I, Y Kawano, H Tsuiki, J Sasaki, M Nakao, M Matsumoto, M Suga, M Ando, M Nakajima, et H Saya. 1999. « CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration ». *Oncogene* 18 (7): 1435-1446. doi:10.1038/sj.onc.1202447.
- Okamoto I, H Tsuiki, L C Kenyon, A K Godwin, D R Emlet, M Holgado-Madruga, I S Lanham, et al. 2002. « Proteolytic cleavage of the CD44 adhesion molecule in multiple human tumors ». *The American Journal of Pathology* 160 (2): 441-447. doi:10.1016/S0002-9440(10)64863-8.
- Oliferenko S, K Paiha, T Harder, V Gerke, C Schwärzler, H Schwarz, H Beug, U Günthert, et L A. Huber. 1999. « Analysis of Cd44-Containing Lipid Rafts ». *The Journal of Cell Biology* 146 (4): 843-854.
- Ostrovsky O, B Berman, J Gallagher, B Mulloy, D G. Fernig, M Delehedde, et D Ron. 2002. « Differential Effects of Heparin Saccharides on the Formation of Specific Fibroblast Growth Factor (FGF) and FGF Receptor Complexes ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (4): 2444 -2453. doi:10.1074/jbc.M108540200.
- Paulissen G, N Rocks, M M Gueders, C Crahay, F Quesada-Calvo, S Bekaert, J Hacha, et al. 2009. « Role of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in airway diseases ». *Respiratory Research* 10 (1): 127. doi:10.1186/1465-9921-10-127.

- Pelletier L, P Guillaumot, B Frêche, C Luquain, D Christiansen, S Brugière, J Garin, et S N Manié. 2006. « Gamma-secretase-dependent proteolysis of CD44 promotes neoplastic transformation of rat fibroblastic cells ». *Cancer Research* 66 (7): 3681-3687. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3870.
- Persaud-Sawin D-A, S Lightcap, et G J Harry. 2009. « Isolation of rafts from mouse brain tissue by a detergent-free method ». *Journal of Lipid Research* 50 (4): 759-767. doi:10.1194/jlr.D800037-JLR200.
- Peterson R M, Q Yu, I Stamenkovic, et B P Toole. 2000. « Perturbation of hyaluronan interactions by soluble CD44 inhibits growth of murine mammary carcinoma cells in ascites ». *The American Journal of Pathology* 156 (6): 2159-2167. doi:10.1016/S0002-9440(10)65086-9.
- Piccard H, P E Van den Steen, et G Opdenakker. 2007. « Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins ». *Journal of Leukocyte Biology* 81 (4): 870-892. doi:10.1189/jlb.1006629.
- Ponta H, L Sherman, et P A. Herrlich. 2003. « CD44: From adhesion molecules to signalling regulators ». *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (1): 33-45. doi:10.1038/nrm1004.
- Quinn K A., P G. Grimsley, Y-P Dai, M Tapner, C N. Chesterman, et D A. Owensby. 1997. « Soluble Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) Circulates in Human Plasma ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (38): 23946 -23951. doi:10.1074/jbc.272.38.23946.
- Quinn K A., V J. Pye, Y-P Dai, C N. Chesterman, et D A. Owensby. 1999. « Characterization of the Soluble Form of the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP) ». *Experimental Cell Research* 251 (2): 433-441. doi:10.1006/excr.1999.4590.
- Rydlova M., L. Holubec, M. Ludvikova, D. Kalfert, J. Franekova, C. Povysil, et M. Ludvikova. 2008. « Biological Activity and Clinical Implications of the Matrix Metalloproteinases ». *Anticancer Research* 28 (2B): 1389 -1397.

- Reekmans S M., T Pflanzner, P L. S. M. Gordts, S Isbert, P Zimmermann, W Annaert, S Weggen, A J. M. Roebroek, et C U. Pietrzik. 2009. « Inactivation of the proximal NPXY motif impairs early steps in LRP1 biosynthesis ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 135-145. doi:10.1007/s00018-009-0171-7.
- Ristamaki R, H Joensuu, K Gron-Virta, M Salmi, et S Jalkanen. 1997. « Origin and function of circulating CD44 in non-Hodgkin's lymphoma ». *The Journal of Immunology* 158 (6): 3000 -3008.
- Roberts D D, J S Isenberg, L A Ridnour, et D A Wink. 2007. « Nitric oxide and its gatekeeper thrombospondin-1 in tumor angiogenesis ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13 (3): 795-798. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1758.
- Rodal S K, G Skretting, O Garred, F Vilhardt, B van Deurs, et K Sandvig. 1999. « Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles ». *Molecular Biology of the Cell* 10 (4): 961-974.
- Rohrer J, A Schweizer, D Russell, et S Kornfeld. 1996. « The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. » *The Journal of Cell Biology* 132 (4): 565 -576. doi:10.1083/jcb.132.4.565.
- Rozanov D V., E Hahn-Dantona, D K. Strickland, et A Y. Strongin. 2004. « The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein LRP Is Regulated by Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) Proteolysis in Malignant Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (6): 4260 -4268. doi:10.1074/jbc.M311569200.
- Rudzki Z, et S Jothy. 1997. « CD44 and the adhesion of neoplastic cells ». *Molecular Pathology: MP* 50 (2): 57-71.

- Salicioni A M, A Gaultier, C Brownlee, M K. Cheezum, et S L. Gonias. 2004. « Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-1 Promotes β 1 Integrin Maturation and Transport to the Cell Surface ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (11): 10005 -10012. doi:10.1074/jbc.M306625200.
- Savagner P. 2010. « The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon ». *Annals of Oncology* 21 (Supplement 7): vii89-vii92. doi:10.1093/annonc/mdq292.
- Schlegel A, et M P Lisanti. 2001. « The caveolin triad: caveolae biogenesis, cholesterol trafficking, and signal transduction ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 12 (1): 41-51.
- Selvais C, L D'Auria, D Tyteca, G Perrot, P Lemoine, L Troeberg, S Dedieu, *et al.* 2011. « Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function ». *The FASEB Journal* 25 (8): 2770 -2781. doi:10.1096/fj.10-169508.
- Selvais C, H P. Gaide Chevronnay, P Lemoine, S Dedieu, P Henriet, P J. Courtoy, E Marbaix, et H Emonard. 2009. « Metalloproteinase-Dependent Shedding of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Ectodomain Decreases Endocytic Clearance of Endometrial Matrix Metalloproteinase-2 and -9 at Menstruation ». *Endocrinology* 150 (8): 3792 -3799. doi:10.1210/en.2009-0015.
- Shchors K, et G Evan. 2007. « Tumor Angiogenesis: Cause or Consequence of Cancer? » *Cancer Research* 67 (15): 7059 -7061. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2053.
- Sid B, S Dedieu, N Delorme, H Sartelet, G M Rath, G Bellon, et L Martiny. 2006. « Human thyroid carcinoma cell invasion is controlled by the low density lipoprotein receptor-related protein-mediated clearance of urokinase plasminogen activator ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (10): 1729-1740. doi:10.1016/j.biocel.2006.04.005.

- Song H, Y Li, J Lee, A L. Schwartz, et G Bu. 2009. « Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Inducing the Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 ». *Cancer Research* 69 (3): 879 -886. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3379.
- Strickland D K, J D Ashcom, S Williams, W H Burgess, M Migliorini, et W S Argraves. 1990. « Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. » *Journal of Biological Chemistry* 265 (29): 17401 -17404.
- Takada Y, X Ye, et S Simon. 2007. « The integrins ». *Genome Biology* 8 (5): 215. doi:10.1186/gb-2007-8-5-215.
- Takahashi E, O Nagano, T Ishimoto, T Yae, Y Suzuki, T Shinoda, S Nakamura, et al. 2010. « Tumor Necrosis Factor- α Regulates Transforming Growth Factor- β -dependent Epithelial-Mesenchymal Transition by Promoting Hyaluronan-CD44-Moesin Interaction ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (6): 4060-4073. doi:10.1074/jbc.M109.056523.
- Takahashi K, H Eto, et K K Tanabe. 1999. « Involvement of CD44 in matrix metalloproteinase-2 regulation in human melanoma cells ». *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 80 (3): 387-395.
- Takino T, H Miyamori, N Kawaguchi, T Uekita, M Seiki, et H Sato. 2003. « Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304 (1): 160-166.
- Tammi R, K Rilla, J-P Pienimäki, K. MacCallum, M Hogg, M Luukkonen, V C. Hascall, et M Tammi. 2001. « Hyaluronan Enters Keratinocytes by a Novel Endocytic Route for Catabolism ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (37): 35111 -35122. doi:10.1074/jbc.M103481200.

- Terrand J, V Bruban, L Zhou, W Gong, Z El Asmar, P May, K Zurhove, et al. 2009. « LRP1 controls intracellular cholesterol storage and fatty acid synthesis through modulation of Wnt signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (1): 381-388. doi:10.1074/jbc.M806538200.
- Thankamony S P., et W Knudson. 2006. « Acylation of CD44 and Its Association with Lipid Rafts Are Required for Receptor and Hyaluronan Endocytosis ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (45): 34601 -34609. doi:10.1074/jbc.M601530200.
- Trommsdorff M, J-P Borg, B Margolis, et J Herz. 1998. « Interaction of Cytosolic Adaptor Proteins with Neuronal Apolipoprotein E Receptors and the Amyloid Precursor Protein ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (50) : 33556 -33560. doi:10.1074/jbc.273.50.33556.
- Underhill C. 1992. « CD44: The hyaluronan receptor ». *Journal of Cell Science* 103 (2) : 293 -298.
- Ulery P G., J Beers, I Mikhailenko, R E. Tanzi, G. W Rebeck, B T. Hyman, et D K. Strickland. 2000. « Modulation of β -Amyloid Precursor Protein Processing by the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (10): 7410 -7415. doi:10.1074/jbc.275.10.7410.
- Ulery P G. et D K. Strickland. 2000. « LRP in Alzheimer's disease: friend or foe? » *Journal of Clinical Investigation* 106 (9): 1077-1079.
- Vella V, L Sciacca, G Pandini, R Mineo, S Squatrito, R Vigneri, et A Belfiore. 2001. « The IGF system in thyroid cancer: new concepts ». *Molecular Pathology: MP* 54 (3): 121-124.
- Webb D.J., D.H. Nguyen, et S.L. Gonias. 2000. « Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion ». *Journal of Cell Science* 113 (1): 123 -134.

- Wierzbicka-Patynowski I, et J E. Schwarzbauer. 2003. « The ins and outs of fibronectin matrix assembly ». *Journal of Cell Science* 116 (16): 3269 -3276. doi:10.1242/jcs.00670.
- Wilson J M., M de Hoop, N Zorzi, B-H Toh, C G. Dotti, et R G. Parton. 2000. « EEA1, a Tethering Protein of the Early Sorting Endosome, Shows a Polarized Distribution in Hippocampal Neurons, Epithelial Cells, and Fibroblasts ». *Molecular Biology of the Cell* 11 (8): 2657 -2671.
- Woldt E, R L Matz, J Terrand, M Mlih, C Gracia, S Foppolo, S Martin, et al. 2011. « Differential signaling by adaptor molecules LRP1 and ShcA regulates adipogenesis by the insulin-like growth factor-1 receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (19): 16775-16782. doi:10.1074/jbc.M110.212878.
- Wu L, et S L Gonias. 2005. « The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts ». *Journal of Cellular Biochemistry* 96 (5): 1021-1033. doi:10.1002/jcb.20596.
- Yan Y, K Shirakabe, et Z Werb. 2002. « The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors ». *The Journal of Cell Biology* 158 (2): 221-226. doi:10.1083/jcb.200112026.
- Yang Z, D K. Strickland, et Bornstein. 2001. « Extracellular Matrix Metalloproteinase 2 Levels Are Regulated by the Low Density Lipoprotein-related Scavenger Receptor and Thrombospondin 2 ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (11): 8403 -8408. doi:10.1074/jbc.M008925200.
- Yepes M, M Sandkvist, E G. Moore, T H. Bugge, D K. Strickland, et A. Lawrence. 2003. « Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein ». *Journal of Clinical Investigation* 112 (10): 1533-1540. doi:10.1172/JCI200319212.

Zhang H, P H. Links, J K. Ngsee, K Tran, Z Cui, K W. S. Ko, et Z Yao. 2004. « Localization of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 to Caveolae in 3T3-L1 Adipocytes in Response to Insulin Treatment ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (3): 2221 -2230. doi:10.1074/jbc.M310679200.

Zurhove K, C Nakajima, J Herz, H H. Bock, et P May. 2008. « γ -Secretase Mediates Self-Limitation of the Inflammatory Response by Processing LRP1 ». *Science signaling* 1 (47): ra15. doi:10.1126/scisignal.1164263.