

TITRE DU PROJET : Optimisation de l'efficacité de molécules antitumorales en bloquant le clivage et la fonction de la cadhérine N *via* le ciblage moléculaire de la tétraspanine 15.

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR : **oui**
Nom : **LASCOMBE**
Prénom : **Isabelle**

2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :

- Nom et label de l'unité de recherche (ainsi que l'équipe interne s'il y a lieu) : **Laboratoire SINERGIES**
- Localisation : **Université de Franche-Comté, UFR Santé, bâtiment Recherche Rabelais**
- Nom du directeur de thèse et du co-directeur s'il y a lieu : **Dr. Isabelle Lascombe**
- Adresse courriel du contact scientifique : isabelle.lascombe@univ-fcomte.fr

- Description du projet (2 pages maximum) :

Les tumeurs de vessie n'infiltrant pas le muscle vésical sont très hétérogènes sur le plan de leur évolution clinique avec des risques de récurrence et de progression variables selon le grade histologique et le stade. En particulier, le sous-groupe des tumeurs pT1G3 récidive dans 60 à 80% des cas la première année et progresse dans 10 à 40% des cas vers un envahissement du plan musculaire. La décision thérapeutique pour les traiter repose sur deux stratégies possibles : la résection transurétrale associée à une instillation endovésicale de chimiothérapie ou de BCG ou bien la cystectomie pour les patients résistants au BCG. Actuellement, il n'est pas possible de distinguer les pT1G3 qui vont uniquement récidiver de celles qui vont progresser vers une forme plus agressive. Une étude immunohistochimique sur des pièces de résection obtenues au diagnostic initial nous a permis de montrer que la cadhérine N, absente dans l'urothélium normal, était un marqueur indépendant de progression tumorale des pT1G3.

La cadhérine N est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans l'adhérence et la migration cellulaires en activant la voie du FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor). Dans la plupart des carcinomes, son expression anormale dote les cellules tumorales d'origine épithéliale de capacités migratoires et invasives. Dans ce contexte, elle représente une cible thérapeutique pertinente pour traiter le cancer. D'ailleurs, pour inhiber sa fonction d'adhérence, des peptides bloquants synthétiques comme ADH-1, ainsi qu'un anticorps monoclonal noté GC-4, ciblant la partie extracellulaire de la protéine, ont été développés mais n'ont pas montré à ce jour une efficacité optimale. Aucune de ces molécules n'est utilisée actuellement pour traiter les patients et sont toujours en cours d'évaluation clinique. GC-4 pourrait être intéressant dans les cancers urothéliaux car il inhibe *in vitro* l'invasion de cellules tumorales de vessie. L'efficacité partielle de ces molécules à potentiel thérapeutique pourrait être due au clivage de la cadhérine N qui libère ainsi des peptides avec des effets pro-tumoraux. En effet, la cadhérine N est le substrat de la métalloprotéase ADAM10. Son clivage protéolytique conduit à la libération de deux fragments : un fragment extracellulaire soluble NTF (N-Terminal Fragment) et un fragment CTF1 (C-Terminal Fragment 1) enchâssé

dans la membrane plasmique. CTF1 est ensuite clivé par le complexe préséniline/ γ -sécrétase en un fragment cytoplasmique CTF2. NTF régule l'adhérence et la migration cellulaires, la voie de signalisation du FGFR et favorise l'angiogenèse. La translocation de CTF2 dans le noyau contrôle la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire. Les antagonistes de la cadhérine N précédemment cités ciblent l'ectodomaine de la protéine entière donc aussi le fragment NTF, bloquant ainsi leur fonction mais n'affectent pas l'activité de CTF2 puisqu'ils n'agissent pas sur le clivage de la cadhérine N. Par ailleurs, à la suite du clivage de la cadhérine N, le NTF libéré peut neutraliser/titrer GC-4 et/ou ADH-1 qui seront par conséquent moins efficaces pour bloquer la cadhérine N qui pourra toujours agir et être clivée. Il apparaît alors judicieux d'identifier des molécules permettant d'inhiber le clivage de la cadhérine N. Ainsi, l'utilisation combinée de molécules bloquant la libération de NTF et de CTF2 augmenteraient l'efficacité des antagonistes de la cadhérine N qui ciblent la partie extracellulaire de la protéine. Toutefois, agir directement et uniquement sur ADAM10 ne semble pas pertinent car cette enzyme ne clive pas exclusivement la cadhérine N mais aussi de nombreux substrats ce qui conduirait à des effets secondaires potentiellement délétères. Très récemment, il a été montré que les tétraspanines C8 sont des régulateurs de l'activité d'ADAM10 sur un substrat donné. En particulier, la tétraspanine 15 (Tspan15), régule l'activité protéolytique d'ADAM10 sur la cadhérine N. Ainsi, inhiber la Tspan15 pour bloquer l'activité d'ADAM10 sur la cadhérine N semble être une piste novatrice et plus prometteuse. Des résultats obtenus récemment au laboratoire montrent que le GW501516, un agoniste du récepteur nucléaire PPAR β , est un inhibiteur spécifique de l'expression de la Tspan15, sans effet sur ADAM10. Il bloque ainsi le clivage de la cadhérine N, maintient donc la forme entière de la molécule à la surface cellulaire et diminue la libération de NTF.

Exprimée classiquement à la surface cellulaire, la cadhérine N est aussi détectée dans les exosomes qui sont des nanovésicules lipidiques d'origine endosomale transportant des molécules bioactives (protéines, ADN, ARN, lipides). Ils sont produits par toutes les cellules normales ou pathologiques et sont retrouvés dans tous les liquides biologiques. En particulier, ils sont libérés par les cellules tumorales. Décrits comme de nouveaux acteurs de la communication inter-cellulaire, ils transfèrent leur contenu membranaire et/ou luminal dans une cellule receveuse normale ou pathologique, entraînant des changements phénotypiques. De nombreux travaux ont démontré le rôle de ces nanovecteurs dans la progression tumorale et la formation de métastases. Ainsi, les exosomes tumoraux augmentent la prolifération, la migration et les capacités invasives des cellules tumorales cibles. Ils modifient aussi le comportement des cellules non tumorales du microenvironnement tumoral, en favorisant l'angiogenèse, en perturbant la réponse immunitaire anti-tumorale ou encore en contribuant à la formation de niches pré-métastatiques. Reflétant l'état pathologique de la cellule tumorale productrice, leur contenu membranaire et luminal est un véritable réservoir de biomarqueurs potentiels. Dans ce contexte, notre équipe a démontré récemment la présence de la cadhérine N à la surface des exosomes produits par des cellules tumorales de vessie T24 de grade élevé, à potentiel métastatique. **Hypothèse de travail** : inhiber l'expression ou l'activité de la Tspan15 pourrait bloquer le clivage de la cadhérine N par ADAM10 dans les carcinomes et ainsi empêcher la libération des fragments NTF et CTF2. Les inhibiteurs de la Tspan15 pourraient potentialiser les effets des antagonistes de la cadhérine N, GC-4 et ADH1. **Objectifs et méthodologie** : 1) **Analyser l'effet de l'association GC-4 (et/ou ADH-1) + GW501516 sur la prolifération, la migration et l'invasion des cellules T24,** 2) **Etudier les mécanismes moléculaires de la régulation de la Tspan15 par le GW501516 ou d'autres agonistes de PPAR β / δ** : au niveau transcriptionnel en déterminant si l'action du GW501516 est dépendante ou non de PPAR β / δ (recherche *in silico* d'une séquence PPRE dans le promoteur du gène *Tspan15*, quantification des transcrits par PCR en temps réel en présence d'un antagoniste de PPAR β / δ ou d'un siRNA ciblant le récepteur), au niveau post-transcriptionnel (étude de

miRNA ciblant la Tspan15 par PCR en temps réel, détermination de la demi-vie des transcrits *Tspan15* en utilisant l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription), au niveau post-traductionnel (étude de l'adressage membranaire de la Tspan15 : isolement noyau, cytosol et membrane plasmique, détermination de la demi-vie de la protéine Tspan15 en présence de cycloheximide, puis analyse de la protéine par western blotting), **3) Rechercher de nouvelles molécules inhibitrices ciblant directement la protéine Tspan15 à l'aide de la modélisation moléculaire par docking ligand-protéine** : après modélisation 3D de la protéine, il s'agira de repérer la ou les cavité(s) de fixation préférentielle(s). Les essais de ligands seront réalisés par docking avec la recherche de la configuration optimale. Les ligands candidats à des tests cellulaires seront issus d'un tri hautement sélectif reposant sur leur score, leur non-toxicité évaluée par la règle des 5 de Lipinski et leur disponibilité commerciale dans la base de données rationalisée ZINC15. **4) Analyser *in vitro* l'effet des ligands candidats sélectionnés sur des modèles cellulaires de cancer de la vessie disponibles au laboratoire** : un effet dose (10 doses) et une cinétique (24h, 48h, 72h) seront réalisés dans des lignées cellulaires dérivées de cancer de la vessie avec les ligands candidats sélectionnés. Pour chaque condition expérimentale, la survie, la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires seront évaluées (test de prolifération CCK8, test de la blessure, chambre de Boyden avec ou sans Matrigel). Le fragment NTF sera dosé dans les surnageants cellulaires (précipitation à l'acétone et western blotting, test ELISA) comme témoin de l'effet des molécules candidates. **5) Déterminer si les exosomes présentant à leur surface la cadhérine N peuvent être les témoins de l'efficacité des molécules anti-Tspan15 candidates** : les surnageants de culture de cellules témoins ou traitées par les ligands candidats seront récupérés pour isoler les exosomes présentant la cadhérine N à leur surface en utilisant des billes magnétiques recouvertes d'un anticorps spécifique dirigé contre la partie extracellulaire de la protéine. Après analyse par western blotting, les exosomes issus de cellules dans lesquelles la Tspan15 a été inhibée, devraient présenter plus de cadhérine N à leur surface, traduisant ainsi l'efficacité des antagonistes de la Tspan15. Ces exosomes pourraient être utilisés à terme comme biomarqueurs de l'efficacité d'un traitement anti-Tspan15 à partir de biopsies liquides et permettre de stratifier les patients en bons répondeurs ou mauvais répondeurs à la thérapie anti-Tspan15.

- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat) :

- **AAP Région 2024 – 2025 *via* GS INTHERAPI (fonctionnement) : 25.000 €**

- **Dotation récurrente du Laboratoire SINERGIES : 6500 €**

- Connaissances et compétences requises :

Connaissances requises : cancérologie, signalisation cellulaire, régulation de l'expression des gènes. **Compétences pratiques** : culture cellulaire, techniques de Biologie Moléculaire (extraction acides nucléiques, PCR, PCR en temps réel, clonage), de Biologie Cellulaire (transfection, microscopie confocale, microscopie électronique, cytométrie en flux, tests de prolifération, de migration et d'invasion cellulaires), de Biochimie (western-blotting) et de Biophysique (NTA = Nanoparticle Tracking Analysis). Techniques d'isolement des exosomes (ultracentrifugation, ultrafiltration).

Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)

La cadhérine N est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans l'adhérence et la migration cellulaires. C'est un marqueur de progression tumorale dans les carcinomes

urothéliaux de la vessie. Des peptides synthétiques (ADH-1) ou des anticorps (GC-4) ont été développés pour bloquer sa fonction mais n'ont montré qu'une efficacité partielle. Cela pourrait être dû au clivage de la cadhérine N par ADAM10 et le complexe de la γ -sécrétase, qui libèrent un fragment extracellulaire (NTF) et un fragment soluble CTF2. NTF et CTF2 favorisent la migration et la prolifération cellulaires. Les antagonistes de la cadhérine N ciblent l'ectodomaine de la protéine entière donc aussi le fragment NTF libéré, bloquant ainsi leur fonction mais n'affectent pas l'activité de CTF2. Bloquer la fonction de clivage d'ADAM10 inhiberait la production de NTF et surtout de CTF2. **Notre objectif** est d'inhiber le clivage de la cadhérine N pour optimiser les effets des molécules ADH-1 et GC-4, sans cibler ADAM10. ADAM10 ne clive pas exclusivement la cadhérine N, mais aussi de nombreux substrats. Agir directement sur ADAM10 produirait des effets secondaires délétères. Pour cela, il faudrait plutôt inhiber la tétraspanine 15 (Tspan15) qui permet à ADAM10 de cliver uniquement la cadhérine N. Nous avons identifié, le GW501516 (un agoniste de PPAR β/δ) comme un inhibiteur de la Tspan15, sans effet sur ADAM10. La recherche de nouvelles molécules inhibitrices de Tspan15 sera entreprise. Nous analyserons les effets de traitements associant des antagonistes de la cadhérine N (ADH-1, GC-4) avec les inhibiteurs de la Tspan15 sur la survie, la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires. L'efficacité de ces traitements sera évaluée en isolant les exosomes (nanovésicules issues de cellules tumorales traitées ou non) portant à leur surface la cadhérine N. Une augmentation de cadhérine N entière sur ces exosomes reflètera l'inhibition de la Tspan15 par les molécules analysées. Ces exosomes pourraient être utilisés à terme comme biomarqueurs pour stratifier les patients sensibles ou non à la thérapie anti-Tspan15.

N-cadherin is a transmembrane glycoprotein involved in cell adhesion and migration. It is a tumor progression marker in urothelial carcinomas of the bladder. Synthetic peptides (ADH-1) or antibodies (GC-4) have been developed to block its function, but have shown only partial efficacy. This may be due to the cleavage of N-cadherin by ADAM10 and the γ -secretase complex, which release an extracellular fragment (NTF) and a soluble fragment CTF2. NTF and CTF2 promote cell migration and proliferation. N-cadherin antagonists target the ectodomain of the whole protein and also the released NTF fragment, thus blocking their function but not affecting CTF2 activity. Blocking the cleavage function of ADAM10 would inhibit NTF and especially CTF2 production. Our aim is to inhibit N-cadherin cleavage to optimize the effects of ADH-1 and GC-4, without targeting ADAM10. ADAM10 not only cleaves N-cadherin, but also many other substrates. Acting directly on ADAM10 would produce deleterious side-effects. Instead, it would be necessary to inhibit tetraspanin 15 (Tspan15), which enables ADAM10 to cleave only N-cadherin. We have identified GW501516 (a PPAR β/δ agonist) as a Tspan15 inhibitor, with no effect on ADAM10. The search for new Tspan15-inhibiting molecules will be undertaken. We will analyze the effects of treatments combining N-cadherin antagonists (ADH-1, GC-4) with Tspan15 inhibitors on cell survival, proliferation, migration and invasion. The efficacy of these treatments will be assessed by isolating exosomes (nanovesicles derived from treated or untreated tumour cells) bearing N-cadherin on their surface. An increase in full length N-cadherin on these exosomes will reflect inhibition of Tspan15 by the analyzed molecules. These exosomes could eventually be used as biomarkers to stratify patients sensitive or not to anti-Tspan15 therapy.

Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum – ne pas modifier les intitulés : ils sont imposés par certains sites web) :

Biologie

Mots clés : cancer – exosomes – N-cadhérine – ADAM10 – tétraspanine 15 – PPAR