



HAL
open science

Mécanisme et régulation de l'interaction entre molécules de cadherines

Olivier Courjean

► **To cite this version:**

Olivier Courjean. Mécanisme et régulation de l'interaction entre molécules de cadherines. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2006. Français. NNT : . tel-00583053

HAL Id: tel-00583053

<https://theses.hal.science/tel-00583053>

Submitted on 4 Apr 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS 7 – DENIS DIDEROT

UFR de PHYSIQUE

Ecole Doctorale

Interfaces de la Chimie, de la Physique et de l'Informatique avec la Biologie

**THESE de DOCTORAT
en Biophysique Moléculaire**

OLIVIER COURJEAN

**MECANISME ET REGULATION DE
L'INTERACTION
ENTRE MOLECULES DE CADHERINES**

Thèse dirigée par le Dr Hélène FERACCI

Soutenue le

07 décembre 2006

JURY

Professeur François GALLET	(Président)
Professeur Pierre BONGRAND	(Rapporteur)
Docteur Olivier THOUMINE	(Rapporteur)
Docteur Philippe BAROIS	(Examineur)
Docteur Véronique DELMAS	(Examineur)
Docteur Hélène FERACCI	(Directrice de Thèse)

Je tiens à remercier les membres de différents laboratoires qui m'ont donné les moyens de réaliser ces travaux de thèse.

Tout d'abord l'Institut Curie, à Paris, et plus particulièrement l'unité de Compartimentation et Dynamique Cellulaire (UMR 144), sous la direction de Jean-Paul Thiery puis de Bruno Goud, m'a ouvert la porte au monde de la recherche dans un environnement scientifique de haut niveau. La transition depuis les amphis de physique et de chimie n'a pas été des plus aisées, surtout le lundi, de 13h à 14h : séminaire de biologie cellulaire en anglais (!)... difficile à suivre au début, mais comment rester insensible à la beauté de la machinerie cellulaire ? Au-delà de la biologie, ces premières années de thèse ont été très enrichissantes, notamment de part le dynamisme scientifique de cet institut.

Je tiens également à remercier le Centre de Recherche Paul Pascal, à Pessac pour m'avoir accueilli et permis de finaliser mes travaux de thèse, durant ces derniers mois. Ce retour aux sources – le domaine de la physico-chimie – est d'autant plus stimulant que l'environnement scientifique est également de haut niveau.

Enfin je tiens à remercier le CNRS (bourse BDI), ainsi que l'ARC (financement de ma 4^{ème} année de thèse) pour leur confiance.

Je tiens à remercier particulièrement le Dr Hélène Feracci pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et m'avoir dirigé durant ces travaux de recherche, et surtout pour sa confiance, sa disponibilité et les nombreuses discussions qui ont ponctué ces travaux. Ces discussions ont toujours été stimulantes, malgré quelques difficultés ponctuelles : biologistes et physiciens ne communiquent pas toujours avec le même langage ... Je tiens également à la remercier de m'avoir invité à partager l'aventure Bordelaise et l'installation au CRPP.

Merci au Professeur Pierre Bongrand, directeur de l'unité INSERM U600 à Marseille, d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse. Je tiens également à le remercier pour m'avoir accueilli plusieurs semaines et initié à la méthode de Chambre à Flux, durant mon DEA, ainsi que pour l'ensemble des discussions fructueuses qui m'ont notamment permis de remonter cette technique dans notre laboratoire.

Merci au Docteur Olivier Thoumine, Chargé de Recherche à l'UMR 5091 à Bordeaux, d'avoir également accepté de juger ce travail de thèse en temps que rapporteur, d'avoir soulevé autant de questions, le tout en un temps record.

Merci au Professeur François Gallet, responsable de l'équipe Biophysique dans l'UMR 7057 à Paris, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Merci au Docteur Philippe Barois, directeur du CRPP – UPR 8641 à Pessac, ainsi que Véronique Delmas, chargée de recherche à l'UMR 146 à Orsay, d'avoir porté un regard critique sur ce travail en temps qu'examineurs.

Je tiens à remercier les différentes personnes avec qui j'ai pu partager la paillasse – ou au moins les mêmes couloirs – durant ces années de thèse.

Un grand merci à Sébastien Chevalier pour son humour – c'est si important, surtout en fin de thèse ! – sa sympathie et son aide précieuse, notamment pour me conduire d'un campus à l'autre, à n'importe quelle heure de la journée. Merci à Sophie Lalanne pour sa bonne humeur et son aide récente mais déjà précieuse dans l'équipe.

Merci à Emilie Perret qui m'a transmis son flambeau, pour ses conseils en temps qu'aînée, ainsi que le travail que nous avons pu effectuer ensemble.

Merci à Anne Morel qui m'a initié à la biologie moléculaire, à Aurélie Dewaele pour son aide précieuse durant ma thèse, ainsi qu'à Sylvain, Camille et Mathilde qui ont contribué à l'avancement de ce travail.

Merci à Nathalie Blin, Jacqueline Jouanneau et Françoise Poiron pour leur gentillesse et les nombreux services qu'elles m'ont rendus.

Merci à Odile Viratelle pour son aide et ses conseils qui me permettront prochainement de découvrir les joies de l'enseignement.

Merci à Anne-Marie Benofiel, Anne Pierres, Joana Vitte et Dominique Touchard, du laboratoire du Professeur Pierre Bongrand, pour leur accueil chaleureux, leur générosité et leur sympathie.

Merci à Damien, ainsi qu'à Laure pour m'avoir chaleureusement hébergé à plusieurs reprises durant mes passages à Marseille.

Merci à Ludovic Tricoire, avec qui j'ai pu partager mes premiers balbutiements de recherche en biologie, pour son aide précieuse même à distance.

Merci à Bertrand Lambolez pour sa confiance en me faisant partager son travail de recherche.

Un grand merci à Michelle Rondeau, grâce à qui j'ai autant de plaisir à faire de la science, aujourd'hui. Je tiens particulièrement à lui exprimer ma reconnaissance pour sa confiance et pour m'avoir transmis sa passion et son enthousiasme.

Je tiens à remercier ma famille et mes amis qui ont partagé cette thèse avec moi durant toutes ces années. Merci pour leur soutien, leurs encouragements et leur curiosité à comprendre à quoi peuvent bien servir les cadhérines.

Enfin un énorme merci à Olivia pour son amour et sa patience, pour son courage également en vivant cette thèse à mes côtés. Un immense merci pour son aide en relisant l'intégralité de ce manuscrit, ses conseils et sa confiance.

Table des Matières

Table des Matières	4
Abréviations	6
Résumé	8
Summary	9
Introduction	11
I- L'adhésion cellulaire	12
1- Généralités	12
2- Conservation et évolution des systèmes adhésifs	14
II- Cadhérines et adhésion cellulaire	16
1- La superfamille des cadhérines	16
2- La E-cadhérine et autres cadhérines classiques	23
a- L'échafaudage moléculaire	23
b- Des fonctions variées	25
i) <i>Développement embryonnaire, morphogenèse cellulaire et intégrité des tissus.</i>	25
ii) <i>Cadhérines et cancer</i>	28
III- Mesures physiques de l'adhésion cellulaire à différentes échelles	30
1- Mesures à l'échelle cellulaire	30
2- Mesures à l'échelle du système adhésif	33
3- Mesures à l'échelle de molécules isolées	37
IV- Mesures à l'échelle de la liaison unique et conditions physiologiques	41
1- Généralités	41
2- Adhésion cellulaire et systèmes hors équilibre	42
3- Protéines membranaires et géométrie de l'interaction	43
4- Protéines d'adhésion et contraintes de tension	45
5- Vérification expérimentale de la liaison unique	49
6- Exemples de techniques et considérations expérimentales	50
a- Principes physiques de la Chambre à Flux Laminaire	51
b- Limites de la technique et solutions	54
c- Exemple de propriétés d'adhésion mises en évidence par la Chambre à Flux Laminaire	56

V-	Propriétés de l'adhésion réalisée par les cadhérines	59
1-	Spécificité d'interaction des cadhérines	59
2-	Structure moléculaire du segment extracellulaire	62
3-	Rôle du motif EC1 et du tryptophane-2	67
4-	Rôle des autres motifs EC.....	69
5-	Rôle du calcium	70
6-	Propriétés thermodynamiques de l'interaction entre cadhérines.....	75
VI-	Objectifs du travail	77
Résultats	79
	Article I : Tryptophan 2: the cadherin feeler, finding the way for the <i>trans</i> interaction	81
	Article II : Folding maturation of the E-cadherin monomer modulated by cooperative binding of calcium ions	113
	Travail en cours : Régulation de l'activité adhésive des cadhérines par le calcium : Mesures à l'échelle de la liaison unique	159
Discussion	179
Références Bibliographiques	185

Abréviations

A-CAM : Cell Adhesion Molecule

ADNc: Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

AFM : Atomic Force Microscopy

AGPs : ArabinoGalactanProteins

B-cadhérine : Brain-cadherin

BSA : Bovine Serum Albumin

BFP : Biomembrane Force Probe

cellules ES : cellules souches embryonnaires (Embryonic Stem Cells)

CNRs : Cadherin-related Neuronal Receptor

DAH : Differential Adhesion Hypothesis

E-cadhérine : Epithelial-cadherin (ou Uvomoruline)

E-sélectine : endothelial selectin

EC : motif ExtraCellulaire des cadhérines

EGF : Epidermal Growth Factor

GTPases : enzyme qui hydrolysent le GTP (guanosine triphosphate) en GDP (guanosine diphosphate)

ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule-1

L-CAM: Cell Adhesion Molecule

L-sélectine: leukocyte selectin

LFA-1: autre nom de l'intégrine $\alpha_L\beta_2$

LOT : Laser Optical Tweezers

Mac-1 : autre nom de l'intégrine $\alpha_M\beta_2$

N-cadhérine : Neural-cadherin

P-cadhérine : Placental-cadherin

P-sélectine : platelet selectin

PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1

R-cadhérine : Retinal-cadherin

RGD : motif constituées des trois acides aminés successifs Arginine-Glycine-Aspartate

RICM : Reflection Interference Contrast Microscopy

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RX : cristallographie aux rayons X

SFA : Surface Force Apparatus

T-cadhérine : Truncated-cadherin

TCF/LEF: T-cell factor / lymphoid enhancer factor

TCR / pMHC : T-cell Receptor / peptide-MHC (Major Histocompatibility Complex)

Trp2 : Tryptophane en position 2, conservé parmi les cadhérines classiques et desmosomales

VE-cadhérine : Vascular Endothelium-cadherin

Résumé

Les cadhérines classiques sont des glycoprotéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion, mais aussi dans diverses fonctions comme la différenciation ou la ségrégation cellulaire. L'interaction adhésive, dont les mécanismes moléculaires restent mal connus ou controversés, est mise en place par les 5 motifs répétés (EC) du segment extracellulaire. Le but de ce travail a été de déterminer le rôle de deux éléments très conservés: le tryptophane (Trp2) et les ions calcium (Ca^{2+}) dans ce mécanisme moléculaire. La Chambre à Flux Laminaire, une approche très sensible, nous a permis l'étude des paramètres cinétiques d'interaction entre fragments EC12 de la E-cadhérine, à l'échelle de la liaison unique. Le Trp2 favorise la formation et la stabilité des interactions qui semblent se dérouler en au moins deux étapes. Un processus inattendu a été révélé où une des deux molécules suffirait à initier l'interaction. L'existence d'un complexe intermédiaire dissymétrique suggère un renforcement du contact par oligomérisation des cadhérines. La fixation coopérative de 3 ions Ca^{2+} entre EC1 et EC2 a été mesurée très précisément par spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes. La forte affinité ($K_D=23\mu\text{M}$) suggère que cette fixation est toujours réalisée aux concentrations physiologiques de Ca^{2+} . Ces ions, nécessaires à la conformation active, ne modèleraient pas la cinétique d'interaction, mais seraient essentiels à la résistance de la liaison soumise à une force de dissociation. Ces résultats nous aident à mieux comprendre les processus moléculaires permettant à la fois le maintien de la cohésion cellulaire et la plasticité de l'adhésion réalisée par les cadhérines.

Summary

Classical cadherins are transmembrane glycoproteins involved in cellular adhesion, but also in various functions such as differentiation or cell sorting. Adhesive interactions are achieved by their extracellular segment, composed of 5 repeated motifs (EC), but the molecular mechanism is still unclear and controversial. The aim of this work was to determine the role of two highly conserved elements, the tryptophan in position 2 (Trp2) and calcium ions (Ca^{2+}), in this molecular mechanism. The Laminar Flow Chamber method was used as a very sensitive approach to study the kinetics parameters of E-cadherin fragments interactions at the unimolecular scale. Interestingly Trp2 favored binding formation and stability of these contacts, which appeared to occur in two steps. Our measurements strongly suggest an unexpected process by which one of both molecules is sufficient to initiate the adhesive interaction. Moreover, the dissymmetrical intermediate complex could participate in the reinforcement of adhesive contacts by cadherin oligomerization. Cooperative binding of 3 Ca^{2+} ions between both N-terminal EC motifs was precisely characterized by non-denaturing mass spectrometry. High affinity ($K_D=23\mu\text{M}$) suggests that this Ca^{2+} binding constantly occurred in physiological Ca^{2+} concentrations. These ions, necessary for the biologically active conformation of cadherins, do not seem to regulate interaction kinetics, but are essential for interaction strength under dissociating forces. These results provide a better understanding of the molecular processes used by cadherins for maintenance of cohesion and also plasticity of cell-cell adhesion.

Introduction

I- L'adhésion cellulaire

1- Généralités

L'adhésion cellulaire peut être définie comme la force mécanique qui maintient la cohésion entre les cellules. Les systèmes adhésifs qui établissent ces interactions ont plusieurs caractéristiques communes. Les **protéines d'adhésion** sont des *molécules membranaires* qui possèdent au moins une **partie extracellulaire**. Ce domaine interagit soit directement avec une protéine d'adhésion présente sur la cellule lui faisant face, soit avec une macromolécule servant d'intermédiaire entre plusieurs cellules. Ainsi, on distingue généralement deux types d'adhésion cellulaire : l'adhésion cellule-cellule et l'adhésion cellule-matrice (Fig. 1).

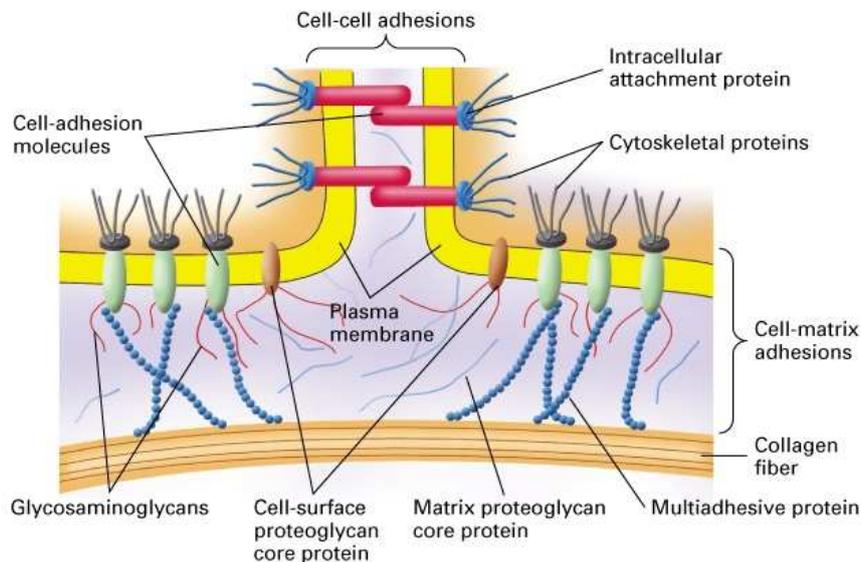


Figure 1 : Organisation générale des différents types d'adhésion cellulaire chez les métazoaires. Les protéines d'adhésion interagissent avec leur partenaire extracellulaire : une autre protéine d'adhésion ou une protéine de la matrice. Ces interactions adhésives sont souvent renforcées en reliant ces protéines au cytosquelette cellulaire. Extrait de Lodish et al., 2000.

Les principales familles de protéines d'adhésion sont : les cadhérines, les sélectines, les intégrines et la superfamille des immunoglobulines. Un grand nombre de protéines d'adhésion sont des molécules *transmembranaires*. Ces molécules réalisent, en plus de leurs interactions adhésives, une ou plusieurs interactions, via leur **partie cytoplasmique**, avec divers **partenaires intracellulaires**. Le système adhésif est alors constitué d'un échafaudage moléculaire complexe. En particulier, ces échafaudages moléculaires peuvent servir à relier, de manière plus ou moins directe, les protéines d'adhésion au cytosquelette de la cellule, mais

aussi les cytosquelettes entre différentes cellules. Différents « types » de **jonctions cellulaires** ont été établis à partir de la composition et de la morphologie du système adhésif qui réalise cette jonction (Fig 2). Chaque type de système adhésif permet de réaliser un ensemble de fonctions biologiques particulières.

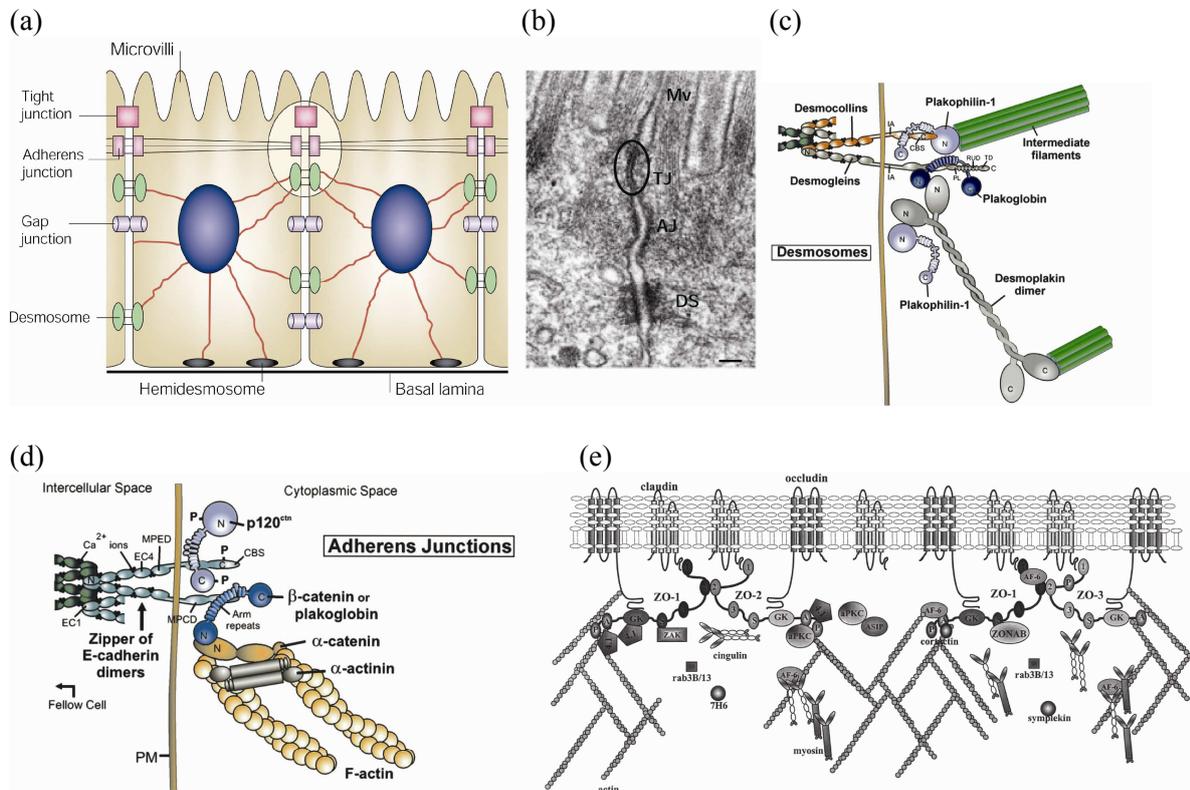


Figure 2 : Exemples de quelques jonctions cellulaires et de l'échafaudage moléculaire qui les structure.

(a) Schéma de jonctions réalisées entre deux cellules épithéliales et de leurs connexions au cytosquelette. Les filaments d'actine sont représentés par les traits fins noirs, les filaments intermédiaires par les traits rouges épais. (b) Image transversale, obtenue par microscopie électronique, d'un contact entre deux cellules épithéliales, dans la région apicale (Mv pour Microvillosité). Cette image permet d'observer le profil d'une jonction serrée (TJ), d'une jonction adhérente (AJ) et d'un desmosome (DS). (c, d et e) Schémas montrant les principaux constituants moléculaires des desmosomes, jonctions adhérentes et jonctions serrées, respectivement. Extraits de Tsukita et al., 2001 (a et b) ; Nollet et al., 2000 (c et d) ; Gonzalez-Mariscal et al., 2000 (e).

Les interactions adhésives sont directement impliquées dans la **morphologie** et la **mobilité cellulaire**, ainsi que dans la **structure des tissus**. En plus de leurs propriétés mécaniques et architecturales, les systèmes adhésifs font partie de **voies de signalisation** impliquées aussi bien dans l'organisation et la régulation des différents systèmes adhésifs présents sur la cellule, que dans l'activation d'autres fonctions cellulaires comme la **différenciation**, la **prolifération** ou même l'**apoptose** (mort cellulaire). Ces multiples

fonctions, qui doivent être finement régulées dans le temps et dans l'espace, sont le reflet de la complexité des systèmes adhésifs. Par exemple, les cadhérines classiques, qui sont les protéines d'adhésion impliquées dans les jonctions adhérentes, sont connues pour jouer un rôle dans la différenciation cellulaire, ce qui n'est pas le cas d'autres systèmes adhésifs. Plus précisément, la nature de la cadhérine exprimée semble influencer le phénotype de la cellule différenciée. L'expression de la E-cadhérine dans des cellules ES de souris conduit à la formation de cellules de type épithélial, alors que l'expression de la N-cadhérine conduit à un phénotype neuroépithélial et cartilagineux (Larue et al., 1996). Ainsi, malgré une organisation et des propriétés générales communes, chaque système adhésif est constitué de protéines d'adhésion et de partenaires cytoplasmiques spécifiques. La nature des protéines exprimées évolue dans le temps et se traduit par une fonction biologique spécifique.

2- Conservation et évolution des systèmes adhésifs

L'adhésion cellulaire est un élément central dans le fonctionnement d'organismes pluricellulaires. Les systèmes adhésifs ont particulièrement été étudiés pour les cellules du règne animal, ce qui a permis de mettre en évidence leur diversité, leur complexité, mais aussi la conservation des fonctions associées aux systèmes adhésifs. La phylogénie des eucaryotes suggère que les organismes pluricellulaires sont apparus à différentes étapes de l'évolution. Ainsi peut-on se demander si les systèmes adhésifs sont apparus et ont évolué de manière indépendante entre les différents règnes, ou bien s'ils ont une origine commune. Autrement dit, la diversité et la spécificité des systèmes adhésifs, observées dans le règne animal, sont-elles également observées dans d'autres branches d'organismes eucaryotes ?

L'adhésion cellulaire observée en dehors du règne animal est le plus souvent de type cellule-matrice (Harwood et Coates, 2004). C'est le cas chez les plantes dont les cellules sont entourées de parois. Certaines protéines membranaires, impliquées dans l'attachement de la membrane plasmique à la paroi de cellules végétales (les AGPs), présentent une succession de domaines homologues à Fas-1. Or, la Fasciclin-1, protéine prototype contenant le motif Fas-1, est une protéine de la superfamille des immunoglobulines, nécessaire à l'adhésion homophile entre cellules nerveuses. De même, des protéines contenant des domaines proches de motifs EGF, fibronectine ou thrombospondine ont été identifiées parmi les différents règnes d'eucaryotes. La conservation de ces motifs suggère qu'un ou plusieurs systèmes adhésifs auraient été conservés parmi les eucaryotes.

D'autres organismes, en dehors de la lignée des métazoaires, expriment des protéines

reliées aux cadhérines, aux immunoglobulines ou aux lectines de type C, ainsi que des protéines cytoplasmiques associées aux systèmes adhésifs observés dans le règne animal (Harwood et Coates, 2004). Le cas le plus étudié est celui de *Dictyostelium discoideum*. Cet organisme possède plusieurs protéines d'adhésion, dont les séquences présentent des homologies avec les protéines animales. CadA est une protéine possédant un site de fixation du calcium homologue à celui des cadhérines. Sa fonction dans l'adhésion cellulaire dépendante du calcium a clairement été montrée (Brar and Siu, 1993). De plus, une protéine homologue à la β -caténine, *aardvark*, est retrouvée au niveau de contacts cellulaires ayant les caractéristiques morphologiques des jonctions adhérentes. Cette protéine, comme la β -caténine dans les cellules animales, est nécessaire à l'attachement des filaments d'actine au niveau de ces jonctions cellulaires, ainsi qu'à l'activation de certaines voies de signalisation (Coates and Harwood, 2001). Ces observations suggèrent une conservation des propriétés individuelles de ces molécules et de leur rôle dans les processus adhésifs cellulaires. Toutefois, plusieurs différences notables existent. Alors que la β -caténine et les cadhérines classiques participent à la constitution des jonctions adhérentes (cf. paragraphe II), leurs homologues exprimés par *Dictyostelium* interviennent dans des processus adhésifs distincts. De plus, CadA ne possède pas de domaine cytoplasmique.

Ces observations indiquent que les éléments impliqués dans l'adhésion cellulaire ont une origine très ancienne dans l'évolution des eucaryotes. Ces multiples effecteurs interviennent non seulement dans la régulation des capacités adhésives, mais également dans le comportement (migration et différenciation, notamment) des cellules au sein d'organismes pluricellulaires. La conservation de motifs spécifiques suggère que des mécanismes moléculaires particuliers sont nécessaires pour remplir leur fonction adhésive à l'échelle cellulaire.

II- Cadhérines et adhésion cellulaire

Takeichi en 1977 met en évidence deux formes d'adhésion cellulaire en étudiant les protéines d'adhésion et leur résistance à la trypsine en fonction du calcium. L'une des formes est sensible à l'action de la trypsine, seulement à forte concentration, et n'est pas protégée de la dégradation protéolytique par le calcium. L'autre forme d'adhésion est très sensible à l'action de la trypsine mais peut être protégée de son action en présence de calcium. Celle-ci est réalisée par les cadhérines (« Ca » pour calcium et « Adherin » pour adhésion en grec). La première cadhérine isolée, à partir d'embryon de souris au stade morula et appelée initialement uvomoruline, fut la *E-cadhérine*. Cette superfamille de molécules d'adhésion comprend aujourd'hui plus d'une centaine de membres, répartis en plusieurs familles comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant.

1- La superfamille des cadhérines

L'appartenance à cette superfamille est définie par la présence de motifs particuliers dans la séquence protéique primaire. L'ensemble des cadhérines possède un domaine extracellulaire comprenant une répétition de plusieurs « motifs cadhérines » d'environ 110 acides aminés de long, encore appelés motifs EC (Fig. 3). Chacun de ces motifs contient, à des positions bien définies, des séquences conservées de fixation des ions calcium : LDRE (Leu-Asp-Arg-Glu), DxNDN (Asp-x-Asn-Asp-Asn), et DxD (Asp-x-Asp) . Les cadhérines connues à ce jour possèdent un domaine extracellulaire contenant de 2 à 34 motifs EC, numérotés à partir du motif situé à l'extrémité N-terminale de la protéine (Nollet et al., 2000). L'organisation tridimensionnelle du motif EC1 correspond à 7 brins β parallèles organisés en deux feuillets formant un sandwich de dimension : 45Å x 25Å x 25Å (Overduin et al., 1995). Cette structure, similaire à celle d'un domaine d'immunoglobuline, est commune à tous les motifs cadhérine observés jusqu'ici.

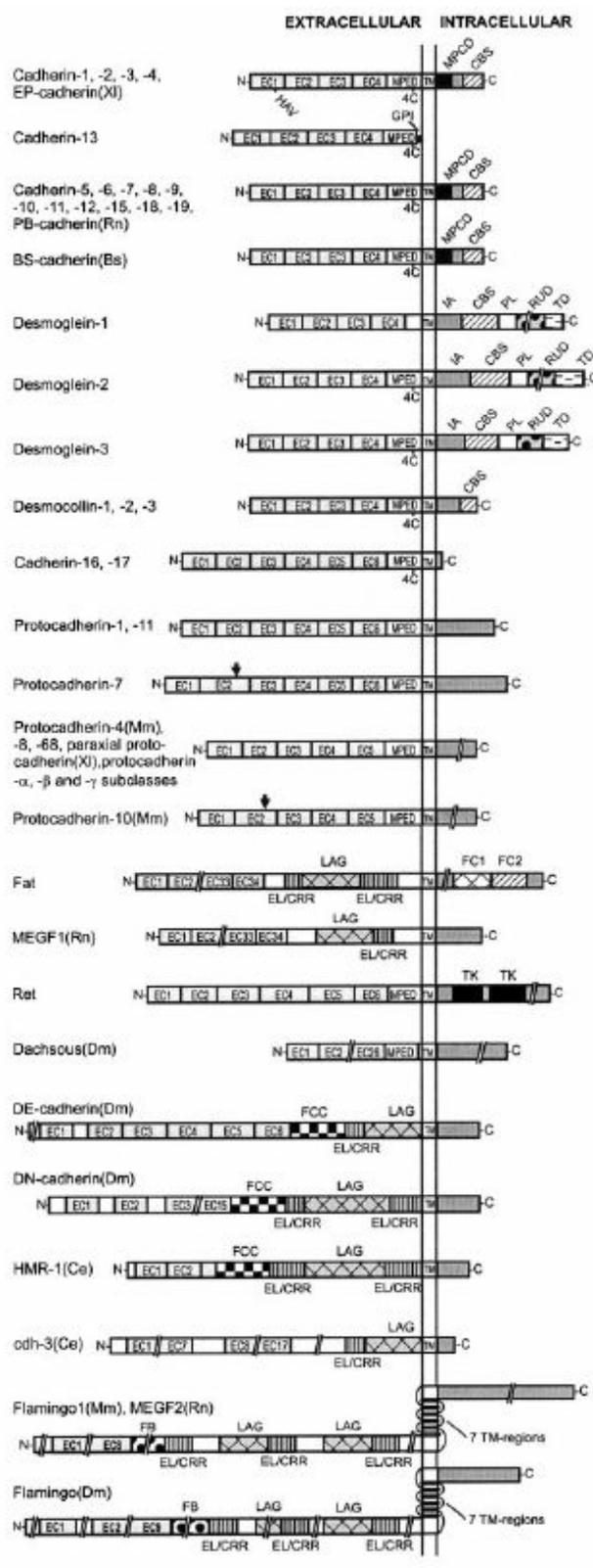


Figure 3 : Schéma montrant divers membres représentatifs des cadhérines et les motifs qui les composent. La plupart des cadhérines sont constituées d'une partie extracellulaire, transmembranaire (TM) et cytoplasmique. Les extrémités N-terminales et C-terminales sont représentées par N- et C-, respectivement.

La partie extracellulaire contient les motifs spécifiques des cadhérines (EC). Le motifs extracellulaire proche de la membrane (MPED, membrane-proximal extracellular domain) est souvent nommé EC (EC5 pour les cadhérines classiques ou desmosomales), bien que ses similitudes avec les autres motifs EC soient limitées. Ce motif peut contenir un domaine à quatre cystéines (4C). Le motif EC1 des cadhérines classiques contient la séquence His-Ala-Val (HAV), potentiellement impliquée dans l'interaction adhésive. Autres abréviations : ancre GPI (glycosyl-phosphatidylinositol), permettant l'attachement de la cadhérine 13 à la membrane plasmique ; les flèche indiquent les séquences riches en Glycine sur les protocadherine-7 et -10 ; LAG, laminin A G-repeat homology domain ; EL/CRR, EGF-like repeat/cysteine-rich region ; FCC, fly classic cadherin box ; FB, flamingo box.

La partie cytoplasmique de plusieurs cadhérines contient un domaine de liaison aux caténines (CBS) et un domaine cytoplasmique proche de la membrane conservé (MPCD, conserved membrane-proximal domain). La partie cytoplasmique des desmogléines présente un domaine particulier d'ancrage intracellulaire (IA), un linker riche en Proline (PL), ainsi que les domaines RUD (repeat unit domain et TD (terminal domain). La cadhérine Fat présente des domaines homologues aux domaines cytoplasmique de la cadhérine-1 (FC1 et FC2). La cadhérine Ret contient des motifs Tyrosine kinase (TK).

Sauf exception, les séquences des cadhérines présentées sont humaines. Les autres espèces sont : Bs, Botryllus schlosseri; Ce, Caenorhabditis elegans; Dm, Drosophila melanogaster; Mm, Mus musculus; Rn, Rattus norvegicus; XI, Xenopus laevis. Extrait de Nollet et al., 2000.

Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires, à l'exception de la T-cadhérine, et le domaine cytoplasmique est relativement divergent entre les différentes sous-familles. Les cadhérines sont classiquement décrites comme des molécules d'adhésion intercellulaire, bien que certains membres de cette superfamille n'aient pas de fonction adhésive clairement démontrée. Selon le choix de classification, on peut distinguer quatre ou six sous-familles (Fig. 4) : les cadhérines classiques – qui peuvent être subdivisées en cadhérines classiques de type I ou II –, les cadhérines desmosomales – qui regroupent les desmoglénines et les desmocollines –, les protocadhérines et les protéines reliées aux cadhérines. Cette classification repose sur des études d'organisation de sous-domaines et de phylogénie basées sur les séquences protéiques primaires, ainsi que sur l'étude de leur organisation génomique. Ses homologues de séquences au sein de chaque sous-famille semblent corrélés à des fonctions biologiques similaires, lorsque celles-ci sont connues. (Pour revue, voir Nollet et al., 2000)

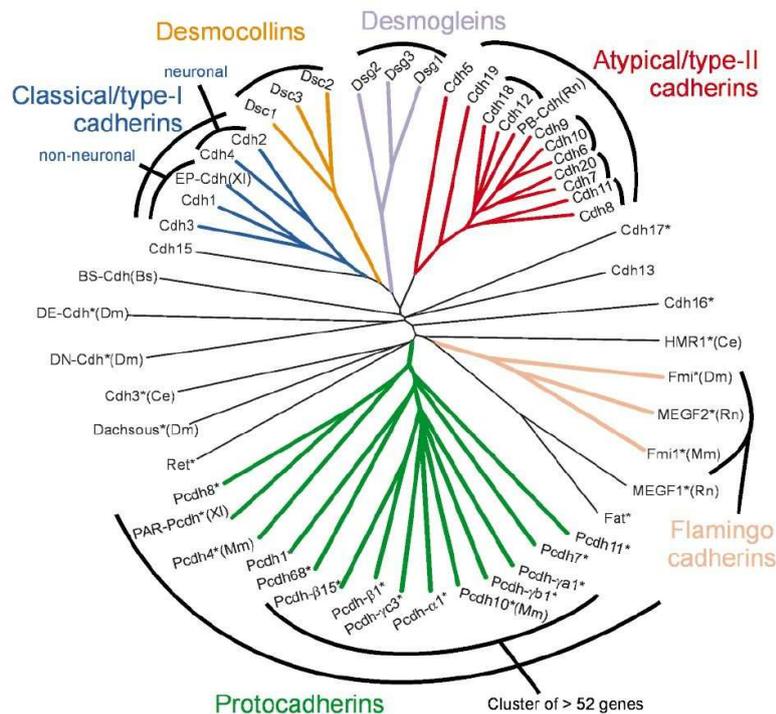


Figure 4 : Phylogénie de la superfamille des cadhérines, réalisée à partir du motif EC1. Les cadhérines ayant plus de cinq motifs EC sont repérées par (). Bien que les cadhérines de type I et de type II soient souvent considérées comme faisant partie d'un même groupe : les cadhérines classiques, cette étude montre une nette distinction au niveau des propriétés du motif EC1. Sauf exception, les séquences des cadhérines présentées sont humaines. Les autres espèces sont : Bs, Botryllus schlosseri; Ce, Caenorhabditis elegans; Dm, Drosophila melanogaster; Mm, Mus musculus; Rn, Rattus norvegicus; Xl, Xenopus laevis. Extrait de Nollet et al., 2000.*

Les cadhérines classiques

Les cadhérines classiques sont réparties en deux groupes, type I et type II, sur la base de leurs homologues de séquence. Les cadhérines classiques ont été les premières découvertes et sont les cadhérines les plus étudiées et les mieux connues. Ces cadhérines ont un domaine extracellulaire composé de cinq motifs EC (Fig. 5). Le domaine cytoplasmique permet de renforcer la capacité adhésive de la cadhérine grâce à deux séquences conservées en reliant la cadhérine plus ou moins directement au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des caténines, mais aussi d'interagir avec différentes protéines impliquées dans des voies de signalisation (Fig. 6).

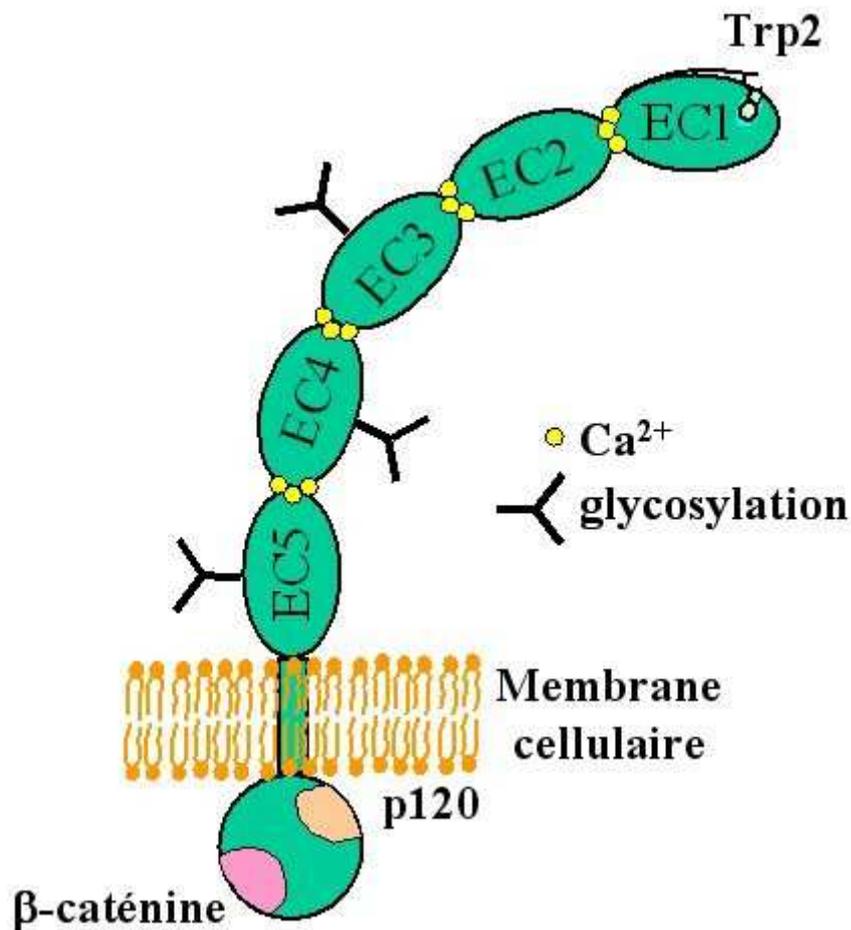


Figure 5 : Schéma d'une cadhérine classique de type I. Les cadhérines classiques sont des glycoprotéines transmembranaires. Leur segment extracellulaire est composé de cinq motifs « cadhérine », nommés EC1 à EC5 depuis l'extrémité N-terminale. Le motif EC1 contient un Tryptophane en position 2, ainsi qu'une séquence HAV, conservés et nécessaires à l'activité adhésive des cadhérines. Trois ions calcium se lient entre deux motifs successifs. Le domaine cytoplasmique permet de renforcer la capacité adhésive de la cadhérine grâce à deux séquences conservées permettant à la cadhérine d'interagir avec différentes caténines (p120 ou β -caténine, par exemple).

Les cadhérines de type I retrouvées chez l'homme sont la E-cadhérine (épithélium), la N-cadhérine (neurone), la P-cadhérine (placenta) et la R-cadhérine (rétine). Par analogie de séquence, la C-cadhérine de Xénope (encore appelée EP-cadhérine), qui n'est pas retrouvée chez l'homme, fait également partie des cadhérines classiques de type I. Le nom de ces cadhérines est donné en référence au tissu dans lequel ces protéines ont été découvertes. Notons toutefois que la P-cadhérine, découverte chez la souris (Nose et Takeichi, 1986), n'est pas retrouvée dans le placenta, dans l'espèce humaine, mais au niveau des cellules basales de l'épiderme. Chez l'homme, la principale cadhérine serait la E-cadhérine (Shimoyama et al., 1989a-b).

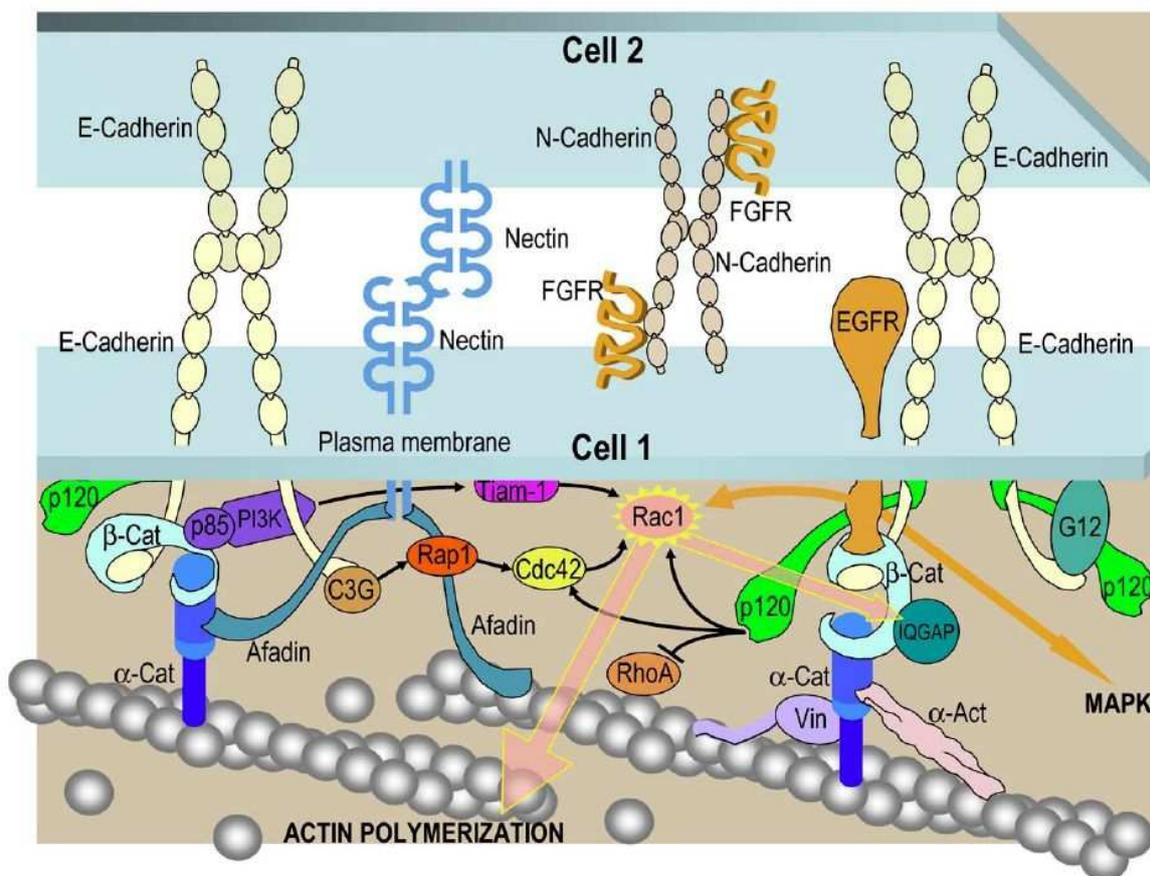


Figure 6 : Schéma représentant les principaux constituants des jonctions adhérentes, ainsi que certaines voies de signalisation. Les protéines d'adhésion (E-cadhérine, N-cadhérine et nectine) réalisent la jonction entre les cellules se faisant face, via leur partie extracellulaire. La partie cytoplasmique des cadhérines interagit avec la caténine p120 et la β-caténine (β-cat), qui elle-même interagit avec l'α-caténine (α-cat). L'α-caténine se lie aux filaments d'actine (en gris), soit directement, soit via la vinculine (vin) ou l'α-actinine (α-act). La partie cytoplasmique de la nectine se lie à l'afadine qui elle-même peut interagir avec l'actine ou l'α-caténine. Les récepteurs aux tyrosines kinases montrés dans ce schéma sont le récepteur au FGF (FGFR) qui interagit avec la partie extracellulaire de la N-cadhérine, ainsi que le récepteur à l'EGF (EGFR) dont la partie cytoplasmique s'associe à la β-caténine. Les voies de signalisation, permettant de relayer de nombreuses fonctions biologiques, sont relayées par : la PI 3-kinase, les facteurs d'échange C3G et Tiam-1, les petites protéines G

(Rap1, Cdc42, Rho, Rac1), IQGAP, les protéines G de la sous famille G12. Extrait de Erez et al., 2005

Les cadhérines de type II sont les cadhérines 5 à 12 et 18 à 20. Alors que les cadhérines de type I sont relativement ubiquitaires à l'échelle de l'organisme, celles-ci sont souvent retrouvées exprimées dans le système nerveux central. Les principales exceptions sont : la cadhérine-11 qui est exprimée au niveau du mésoderme, ou la cadhérine-6 dans le rein (Hoffmann et Balling, 1995; Kimura et al., 1995 ; Paul et al., 1997).

Le profil d'expression, le rôle, la structure et le mode d'interaction des cadhérines classiques, en particulier du type I, seront détaillés dans les paragraphes suivants.

Les cadhérines desmosomales

Il existe deux types de cadhérines desmosomales : les desmocollines et les desmogléines. Ces protéines sont impliquées dans la formation de structures adhésives particulières : les desmosomes. Comme pour les cadhérines classiques, leur domaine extracellulaire est composé de 5 motifs EC. La desmogléine-1 présente la particularité d'un motif EC5 plus court qu'un motif EC habituel. Leur domaine cytoplasmique possède un domaine de liaison à la plakoglobine. Celle-ci interagit avec la desmoplakine qui elle-même s'associe aux filaments intermédiaires (Fig. 2). A l'heure actuelle, 3 desmocollines et 3 desmogléines différentes ont été identifiées. Ces deux groupes diffèrent essentiellement par la complexité et la variation de leur partie cytoplasmique (Fig. 3)

Les protocadhérines

Cette famille réunit le plus grand nombre de cadhérines connues à ce jour (plus de 60 découvertes chez l'homme et la souris). Ces cadhérines sont essentiellement exprimées dans le système nerveux central. Leur partie extracellulaire contient généralement 6 motifs EC, bien que des protéines contenant de 4 à 11 motifs aient été associées à cette sous-famille (Frank et Kemler, 2002). Ces cadhérines présentent une adhésion homophile qui ne semble pas forcément dépendre du calcium, même si leur rôle dans l'adhésion reste encore discuté. Certaines études suggèrent que les protocadhérines réalisent aussi des interactions avec d'autres protéines que les cadhérines. Leur domaine cytoplasmique est également variable et très différent de celui des cadhérines classiques ou desmosomales. Peu d'informations sont disponibles sur la ou les fonctions de cette partie cytoplasmique.

Les CNRs (Cadherin-related Neuronal Receptor), ou protocadhérines- α , forment une sous-famille identifiée historiquement par des expériences de double hybride en utilisant comme cible la tyrosine kinase Fyn. Ces cadhérines sont composées de six domaines EC et leur domaine cytoplasmique interagit avec Fyn. Il est intéressant de remarquer que leur domaine EC1 possède le motif RGD (Arg-Gly-Asp) généralement retrouvé pour les ligands des intégrines. Ces cadhérines seraient des récepteurs d'une protéine sécrétée par des neurones, la Reeline. L'interaction entre le domaine EC1 des CNRs et la Reeline induirait l'activation enzymatique de Fyn, une tyrosine kinase de la famille Src (Kohmura et al., 1998 ; Senzaki et al., 1999).

Autres molécules rattachées à la famille des cadhérines

Ce groupe est composé entre autres des cadhérines à 7 domaines transmembranaires, des cadhérines FAT et de la T-cadhérine. Il n'existe pas vraiment d'homologie entre chacun de ces membres.

Les cadhérines à 7 domaines transmembranaires présentent une forte homologie avec les récepteurs couplés aux protéines G, et leur domaine extracellulaire est composé de 9 motifs EC suivi de motifs de type EGF (Epidermal Growth Factor) et laminine. Ces protéines sont impliquées dans l'établissement de la polarité cellulaire.

La sous-famille FAT possède le nombre le plus élevé de motifs EC (34) dans le domaine extracellulaire, également composé des motifs EGF et laminine. Leur domaine cytoplasmique présente un site de liaison à la β -caténine. Ces protéines sont fortement exprimées dans les tissus en prolifération au cours du développement et le sont beaucoup moins dans les tissus adultes. Différentes hypothèses ont été proposées sur le rôle de ces protéines. Elles pourraient avoir en particulier un rôle de répulsion pour permettre aux cellules de bouger et de migrer correctement lors de la morphogenèse. Le gène *fat* chez la drosophile est classé parmi les gènes suppresseurs de tumeur.

Enfin la T-cadhérine diffère essentiellement des autres cadhérines par le fait qu'elle est associée à la membrane plasmique par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol, et donc ne possède pas de domaine transmembranaire ni cytoplasmique. Son domaine extracellulaire, comme pour les cadhérines classiques, est composé de 5 motifs EC. Elle est retrouvée dans le cœur, les muscles, le foie, la peau et les tissus neuronaux. La surexpression de T-cadhérine dans des cellules endothéliales favorise la migration et la prolifération cellulaire. Cette cadhérine semble avoir un rôle dans l'angiogenèse (Philippova et al., 2006).

2- La E-cadhérine et autres cadhérines classiques

a- L'échafaudage moléculaire

La fonction des cadhérines au niveau cellulaire, comme celle de toutes les protéines d'adhésion, est dépendante de ses divers partenaires moléculaires. Les cadhérines classiques et leurs partenaires moléculaires constituent un échafaudage particulier appelé jonction adhérente. L'organisation générale de ces jonctions est présentée sur la Figure 6.

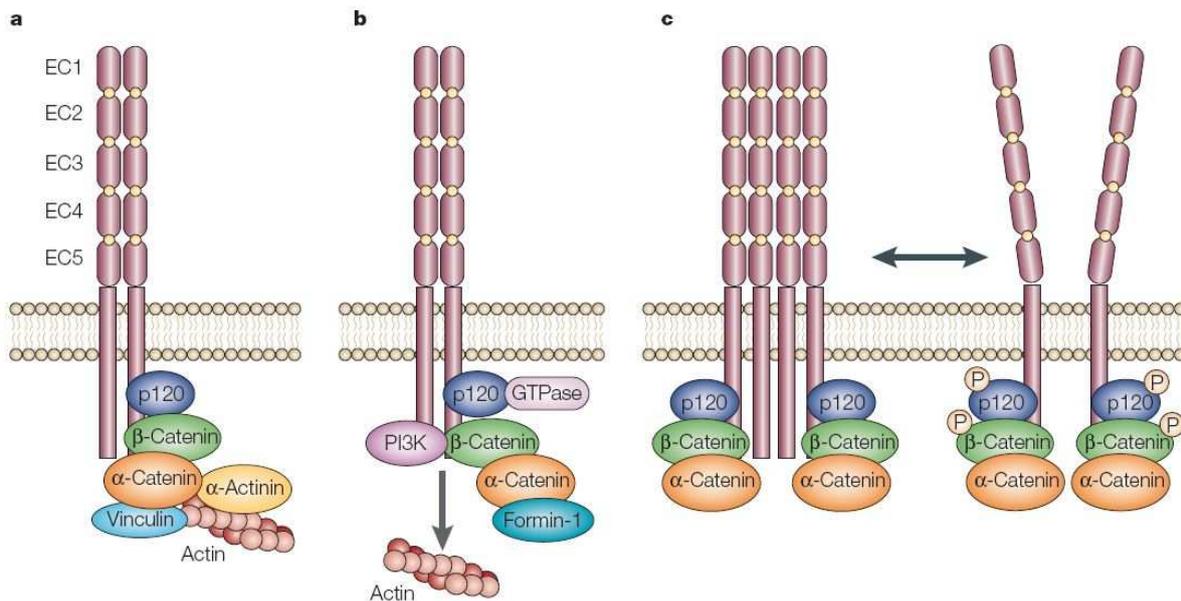


Figure 7: Régulation de l'activité adhésive des cadhérines par les caténines. (a) Cette adhésion peut être renforcée par l'interaction des caténines, directe ou indirecte (via l' α -actinine ou la vinculine), avec les filaments d'actine. (b) Elle peut également être modulée par l'action de voies de signalisation impliquant la caténine p120 ou la PI 3-kinase (PI3K), relayées par les petites protéines G. (c) Enfin, l'activité adhésive est régulée par la phosphorylation des caténines, qui peut influencer le clustering des cadhérines. Notons que la nécessité d'un dimère parallèle pour la formation d'une interaction adhésive, comme suggérée par ce schéma est de plus en plus remise en question. Extrait de Gumbiner, 2005.

Plusieurs de ces partenaires moléculaires sont capables de modifier les propriétés adhésives des jonctions adhérentes (Fig. 7). Le rôle de l'**actine** dans le renforcement du contact adhésif a été étudié en particulier par le groupe de Nelson (Angres et al., 1996 ; Adams et al., 1996). La maturation du contact adhésif s'accompagne en effet d'un réarrangement de l'actine corticale qui déforme la membrane cellulaire et facilite la mise en contact des cellules (Fig. 8). Simultanément, la répartition des cadhérines à la surface

cellulaire évolue au cours de l'établissement du contact cellule-cellule. Les molécules d'adhésion, concentrées sur les filopodes, initieraient les contacts, donnant lieu à une structure appelée « adhésion zipper ». Par la suite, une surface de contact plus ou moins homogène se met en place (Adams et al., 1998 ; Vasioukhin et al., 2000).

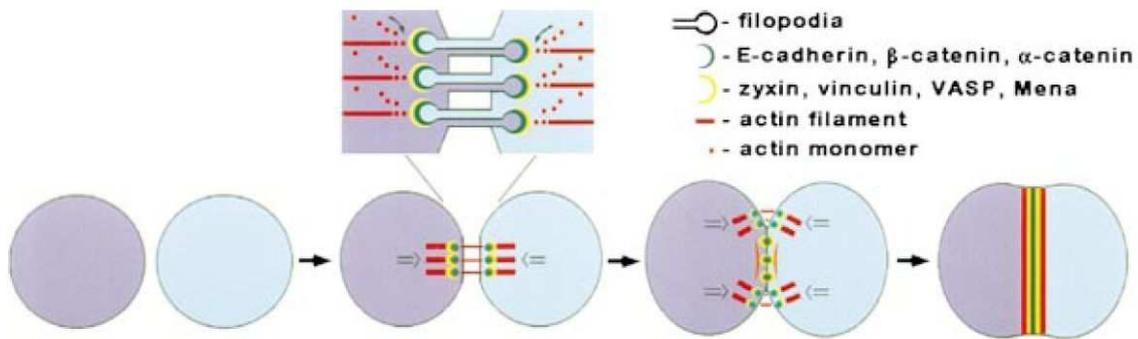


Figure 8: Modèle de maturation du contact cellulaire par les cadhérines. Lorsque deux cellules se rencontrent, elles projettent des filopodes, riches en filaments d'actine. Les filopodes issus de ces deux cellules vont « glisser » les uns le long des autres jusqu'à s'enfoncer dans la cellule opposée. Ces points d'ancrage entre les membranes sont ensuite stabilisés par diverses protéines impliquées dans les jonctions adhérentes et forment des contacts adhésifs appelés puncta. Dans un deuxième temps, les deux membranes cellulaires sont maintenues par des desmosomes. La zone de contact se réorganise notamment en initiant la polymérisation de l'actine au niveau de ces puncta stabilisés. Ces puncta migrent pour former une zone de contact cellulaire continue et qui s'étend pour former un contact intercellulaire mature. Extrait de Vasioukhin et al., 2000

Ainsi, l'activité adhésive des cadhérines est régulée par un réarrangement à grande échelle du réseau d'actine. De plus, plusieurs Rho GTPases influencent le remodelage de l'actine (Fukata et Kaibuchi, 2001). Certains partenaires cytoplasmiques, comme la p120, peuvent aussi moduler la force d'adhésion en régulant le **clustering** des cadhérines (Yap et al., 1997, 1998). En outre, l'intégrité du complexe cadhérine-caténine est régulée par la **phosphorylation** / déphosphorylation de ses différents constituants (Pour revue, voir Brunton et al., 2004). D'autres partenaires moléculaires seraient capables de modifier directement l'activité des cadhérines. En effet, une étude suggère que l'activine est capable de diminuer l'activité adhésive de la C-cadhérine sans pour autant modifier le niveau d'expression des cadhérines à la surface, ni perturber l'association du complexe cadhérine-caténines (Zhong et al., 1999). De plus, les cadhérines présentes à la surface cellulaire ne sont pas statiques. Les cinétiques d'**endocytose** et d'**exocytose** des cadhérines peuvent réguler l'activité adhésive à l'échelle cellulaire (Le et al., 1999). L'activité des cadhérines peut également être modulée par l'action de protéines appartenant à d'autres systèmes adhésifs présents sur la cellule (Pour

revue, voir Chen et Gumbiner, 2006). En effet, il a été montré que les intégrines étaient capables d'induire des forces contractiles au niveau des contacts cellule-cellule qui dissocient les jonctions réalisées par les cadhérines (de Rooij et al., 2005). Ces intégrines peuvent également moduler l'activité adhésive des cadhérines par voie de signalisation, en activant des partenaires cytoplasmiques communs ou en influençant directement le comportement cellulaire (Koenig et al., 2006 ; Avizienyte et Frame, 2005). De même, bien que les nectines (protéines d'adhésion appartenant à la superfamille des immunoglobulines) ne soient pas nécessaires à l'activité des cadhérines, celles-ci régulent le recrutement et la stabilisation des cadhérines au niveau des jonctions adhérentes (Irie et al., 2004).

Des travaux réalisés par les groupes de Nelson et de Weis ont montré que, contrairement à l'idée généralement admise, l' α -caténine ne se fixe pas simultanément au complexe cadhérine- β -caténine et aux filaments d'actine. En effet, l' α -caténine peut être libérée par le complexe cadhérine- β -caténine pour s'associer, sous forme d'un homodimère, aux filaments d'actine. Cette forme dimérique de l' α -caténine est un compétiteur du complexe Arp2/3, modulant ainsi l'organisation du réseau d'actine (Yamada et al., 2005 ; Drees et al., 2005). D'autre part, une signalisation intracellulaire, impliquant deux GTPases, Rac1 et PI-3 kinase, semble directement activée par l'interaction adhésive cadhérine-cadhérine (Noren et al., 2001). Ces voies de signalisation ont pour conséquence la formation de lamellipodes, dus à la polymérisation de l'actine, et l'adressage des cadhérines à l'extrémité des lamellipodes. Le rôle activateur de la N-cadhérine a été vérifié par l'utilisation d'une surface modèle (Gavard et al., 2004). Ainsi, les cadhérines régulent le réseau d'actine. Ces études montrent qu'au delà d'une propriété d'adhésion passive, les cadhérines peuvent ainsi activement moduler la morphologie cellulaire.

b- Des fonctions variées

i) *Développement embryonnaire, morphogenèse cellulaire et intégrité des tissus*

Différentes cadhérines sont exprimées au cours du développement embryonnaire, présentant chacune une expression spatio-temporelle finement régulée (Fig. 9 ; Pour revue, voir Takeichi, 1988). Les premières études d'expression de cadhérines ont été menées sur la E-, la N- et la P-cadhérine. Les profils d'expression de ces cadhérines sont similaires pour

l'embryon de souris et de poulet et sont corrélés à la morphogénèse des tissus (Fig. 9). La E-cadhérine est exprimée dans l'embryon de souris au stade très précoce de 2 cellules et a un rôle indispensable lors de la compaction au stade 8 et 16 cellules. Au cours de l'implantation, la E-cadhérine est exprimée par toutes les cellules de l'embryon, puis certaines d'entre elles perdent l'expression de cette cadhérine lorsque ces cellules se différencient. Par exemple, lors de la gastrulation, les cellules du *mésoderme* nouvellement formé répriment l'expression de la E-cadhérine et expriment la N-cadhérine.

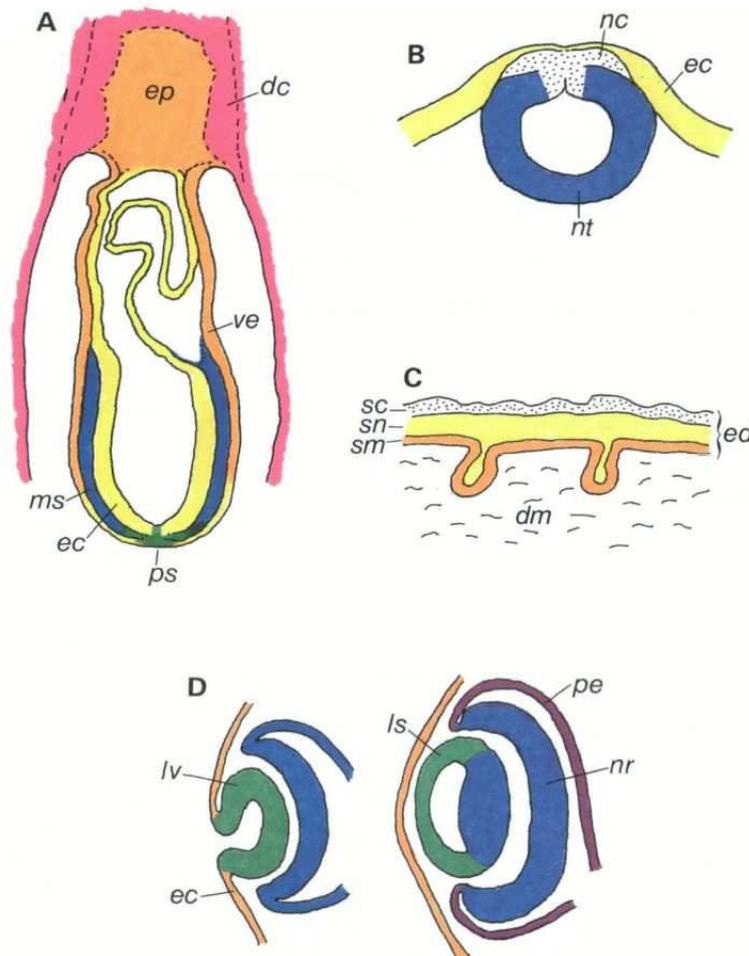


Figure 9: Expression de différentes cadhérines classiques au cours du développement embryonnaire. (A) Coupe sagittale d'un embryon de souris au stade de la formation de la ligne primitive, entouré du tissu utérin. (B) Fermeture du tube neural chez le poulet. (C) Peau embryonnaire chez la souris. (D) Deux stades du développement de l'œil. Cette observation similaire chez la souris et le poulet. Code couleur : jaune = E-cadhérine ; rose = P-cadhérine ; bleu = N-cadhérine ; orange = E- + P-cadhérine ; vert = E- + N-cadhérine ; violet = P- + N-cadhérine. Tissus : dc, membrane déciduale; dm, derme; ec, ectoderme; ed, épiderme; ep, cône ectoplacentaire; ls, cristallin; lv, cristallin vésiculaire; ms, mésoderme; nc, crête neurale; nr, rétine neurale; nt, tube neural; pe, épithélium pigmentaire; ps, ligne primitive; sc, couche cornée; sm, couche de cellules basales; sn, couche de cellules granuleuses; ve, endoderme viscéral. Extrait de Takeichi, 1998.

Le changement d'expression d'une cadhérine est souvent corrélé avec la différenciation, elle-même coordonnée avec les processus de morphogenèse (Takeichi, 1995 ; Gumbiner, 2005). Les cadhérines sont directement impliquées dans la ségrégation des tissus embryonnaires (Holtfreter, 1939 ; Townes et Holtfreter, 1955 ; Foty et Steinberg, 2005). En plus de leurs propriétés adhésives, il a notamment été montré que les cadhérines étaient capables d'influencer l'expression de gènes et de favoriser la différenciation cellulaire (Larue et al., 1996). Les cadhérines sont également impliquées dans la polarisation cellulaire (Hay et al., 1995), la réorganisation ou la migration cellulaire (Keller, 2002 ; Zhong et al., 1999 ; Geisbrecht et Montell, 2002), la compartimentation tissulaire (Dahmann et Basler, 2000) et la plasticité synaptique (Matsunaga et al., 1988 ; Togashi et al., 2002) (Fig. 10).

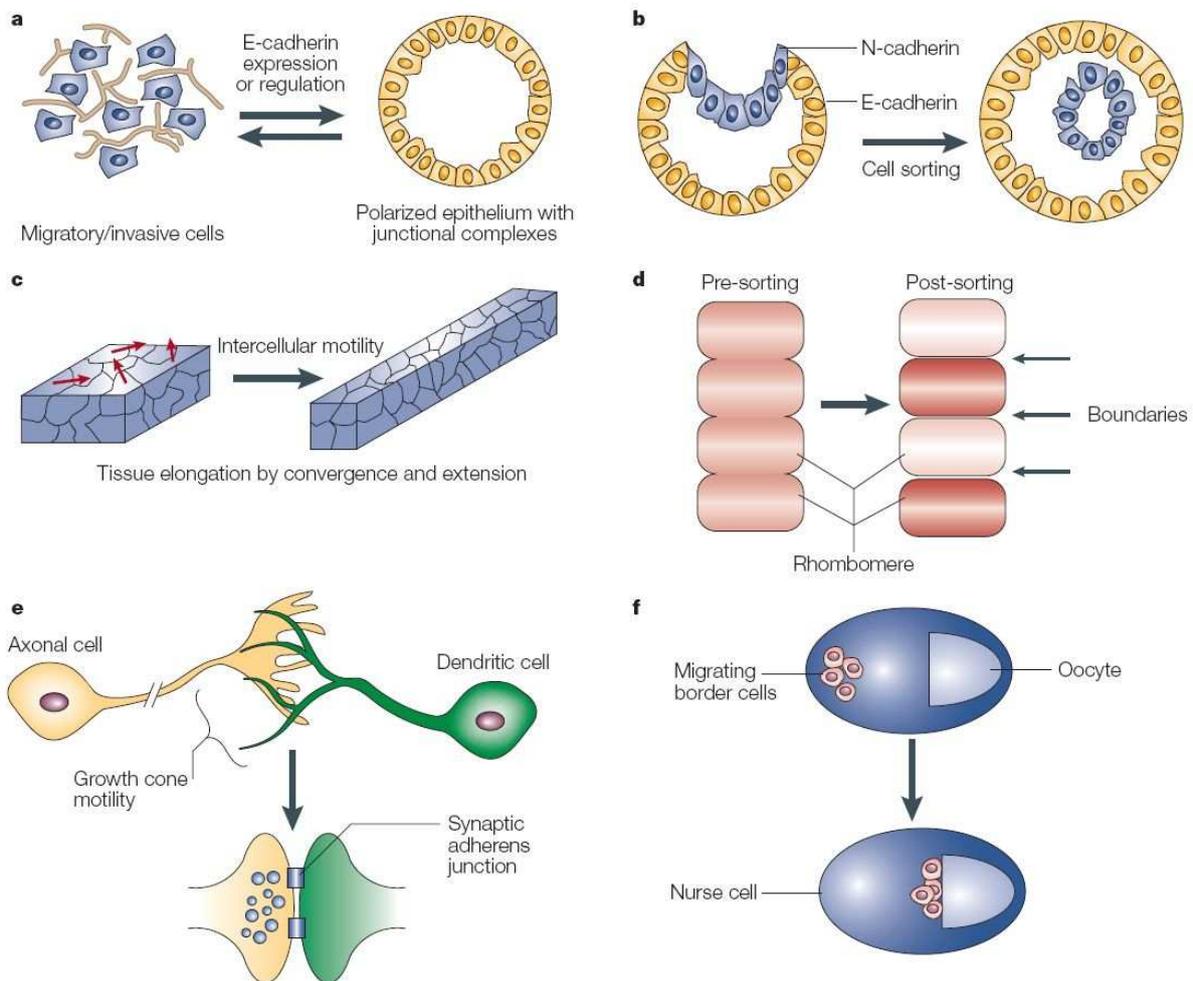


Figure 10: Régulation de la morphogenèse par les cadhérines. (a) L'activité adhésive de la E-cadhérine intervient dans la transition d'un phénotype cellulaire mésenchymateux – absence de polarité, potentiel migratoire et invasif – vers un phénotype épithélial – cellules polarisées ayant des jonctions cellulaires structurées. Les cellules jaunes correspondent à des cellules exprimant la E-cadhérine, contrairement aux cellules bleues. (b) L'expression de différentes cadhérines se traduit par un tri cellulaire qui conduit à la séparation des tissus

*durant le développement embryonnaire (cf. Fig. 9). (c) La formation et déformation dynamique des contacts adhésifs réalisés par les cadhérines permet aux cellules de se réorganiser entre elles tout en maintenant la cohésion cellulaire à l'intérieur du tissu. Dans l'exemple montré ci-dessus, ces réarrangements conduisent à la formation d'un tissu fin et allongé. (d) L'adhésion sélective réalisée par les cadhérines permet d'établir les frontières entre différents compartiments au cours du développement tissulaire. C'est le cas pour la formation des rhombomères au cours du développement du cerveau postérieur chez les vertébrés. (e) Certaines cadhérines, et en particulier la N-cadhérine, interviennent dans la motilité au niveau du cône de croissance. De plus, les cadhérines permettent d'établir des contacts cellulaires, similaires aux jonctions adhérentes, qui font partie des complexes jonctionnels au niveau des synapses et qui sont importants pour la spécificité et la plasticité synaptique, ainsi que la morphogenèse des dendrites. (f) Par opposition à sa fonction stabilisatrice des jonctions épithéliales, la E-cadhérine permet également la migration cellulaire à longue distance. C'est le cas pour la migration d'un groupe de cellules (border cells) qui traverse l'embryon de *Drosophila melanogaster* pour rejoindre l'ovocyte. Extrait de Gumbiner, 2005.*

L'expression de cadhérines modifiées peut conduire à une perturbation de ces fonctions. Par exemple, l'expression du domaine cytoplasmique de la E-cadhérine, altère certains processus durant le développement de la glande mammaire. En effet, bien que ce domaine cytoplasmique de la E-cadhérine soit suffisant pour induire la morphogenèse des alvéoles, la polarité des cellules épithéliales ainsi que l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice sont perturbés, de même que la qualité nutritive du lait produit. Cet exemple montre l'importance de la combinaison des propriétés adhésives avec les propriétés de signalisation pour permettre aux cadhérines de remplir leurs fonctions biologiques.

ii) Cadhérines et cancer

Le développement tumoral est souvent corrélé à la perturbation d'une ou de plusieurs cadhérines classiques. En particulier, une sous-expression de la E-cadhérine a été observée dans de très nombreux cancers comme celui du poumon (Bremnes et al., 2002), du sein (Berx et van Roy, 2001), de la peau (McGary et al., 2002), du pancréas (Joo et al., 2002a), du cerveau (Chen et al., 2003), de l'endomètre (Saito et al., 2003), des cancer naso-pharyngiques (Tsao et al., 2003) et gastriques (Joo et al., 2002b). Au delà du profil d'expression, d'autres perturbations de la fonction de la E-cadhérine ont été observées dans des cancers, allant des mutations sur la séquence exprimée à la perturbation de l'activité de ses partenaires cytoplasmiques (Handschuh et al., 1999 ; Hirohashi, 1998). En fait, la **E-cadhérine** est généralement considérée comme un puissant **suppresseur d'invasion**. Ceci a été mis en évidence de façon expérimentale mais aussi dans de multiples études cliniques de cancers

chez l'homme (Birchmeier et al., 1996; Christofori et Semb, 1999). Par exemple, le caractère invasif de cellules de carcinomes mammaires dédifférenciées peut être bloqué par transfection avec l'ADNc de la E-cadhérine. Par contre, l'expression de **N-cadhérine** a été corrélée à une augmentation de la motilité et du **caractère invasif** de cellules cancéreuses mammaires (Nieman et al., 1999; Hazan et al., 2000). Cet effet de la N-cadhérine s'exprime malgré la présence de E-cadhérine, normalement suppresseur de motilité. De plus, de récentes études ont mis en évidence qu'une surexpression de la E-cadhérine est généralement observée pour les cancers du sein de type IBC (inflammatory breast cancer ; Dong et al., 2006) Ainsi se pose la question de la fonction des cadhérines en général dans le caractère invasif des tumeurs.

Deux hypothèses sont généralement proposées pour relier la perturbation de la fonction des cadhérines au caractère invasif des cellules tumorales. D'une part, la **cohésion cellule-cellule** réalisée par les cadhérines pourrait être un élément déterminant. Ainsi il a été montré *in vitro* qu'une diminution de la cohésion intercellulaire pouvait favoriser la migration de ces cellules sur substrat ou à travers un Matrigel™ reconstitué, mimant ainsi la migration de cellules tumorales à travers le stroma (Foty et Steinberg, 1997 ; Ryan et al., 2001). Selon cette hypothèse, le rôle de suppresseur de tumeur réalisé par la E-cadhérine serait dû à une augmentation de la cohésion cellule-cellule. Cet effet suppresseur de tumeur dû à la cohésion cellulaire ayant également été observé pour la P- et la N-cadhérine (Foty et Steinberg, 1997 ; Dugay, 2000), il en a été déduit que cette propriété serait commune à plusieurs cadhérines, et non spécifique d'un sous-type. Toutefois, ces conclusions doivent être modulées au regard du rôle précédemment cité de la N-cadhérine dans certains cancers. La seconde hypothèse propose que l'évolution tumorale peut être induite par l'action directe d'une **signalisation intracellulaire**. En effet, la perturbation de la fonction de la E-cadhérine est couramment associée à une perturbation de la répartition cellulaire de la β -caténine. Cette protéine est impliquée dans la transcription de certains gènes, via le facteur de transcription TCF/LEF. L'accumulation de β -caténine au niveau du noyau a été observée dans des cellules de cancer colorectal, par exemple. L'incidence directe de la β -caténine dans certains cancers a pu être montrée. En effet, le phénotype de cellules polarisées, formant une monocouche similaire à l'épithélium normal, a pu être restauré par transfection d'un dominant négatif du facteur de transcription TCF4B dans des cellules de cancer colorectal (Naishiro et al., 2001).

Ainsi, la connaissance des propriétés et du mécanisme d'adhésion, notamment celle réalisée par les cadhérines, est essentielle à la compréhension du développement tumoral.

III- Mesures physiques de l'adhésion cellulaire à différentes échelles

Au delà de la description qualitative des différents systèmes adhésifs, basée sur les critères morphologiques et la détermination des éléments qui les constituent et leurs rôles, l'étude des propriétés physiques d'adhésion permet d'affiner notre compréhension de ces structures particulières. Comme nous venons de le voir, ces structures et leurs fonctions peuvent être variées et complexes. Face à cette complexité, diverses approches permettent d'accéder aux grandeurs quantitatives qui caractérisent l'adhésion cellulaire.

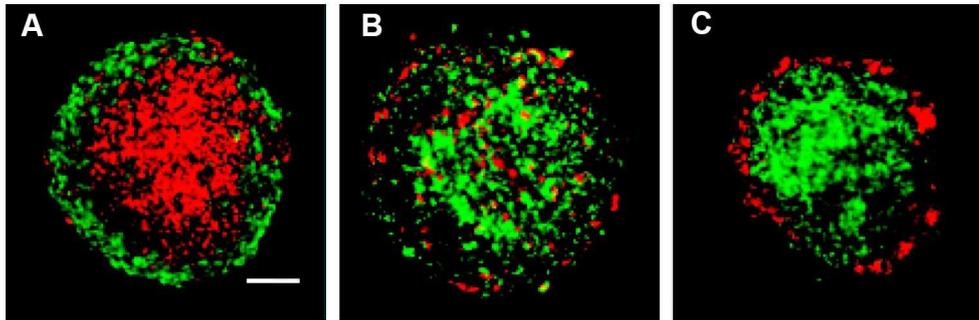
1- Mesures à l'échelle cellulaire

Une première méthode d'investigation de l'adhésion entre cellules consiste à étudier l'adhérence à l'échelle du tissu. Dans ce contexte, la définition la plus générale d'un « tissu » correspond à un ensemble de cellules cohésives. L'entité minimale est la cellule, et le comportement mécanique du tissu est dû, notamment, aux propriétés d'adhésion entre ces cellules, qui vont régir leur capacité à s'adapter aux contraintes mécaniques « macroscopiques ». Ainsi, l'étude du comportement de ce tissu revient à déterminer les propriétés du système adhésif. Plus précisément, Steinberg et coll. ont exposé les bases théoriques et différentes vérifications expérimentales permettant de caractériser les propriétés d'adhésion cellulaire selon ce type de méthode. L'ensemble de ces travaux a permis d'établir et de conforter le concept d'« adhésion différentielle » (DAH, Differential Adhesion Hypothesis) qui donne une explication physique à différents comportements cellulaires, liés à leurs capacités adhésives. La DAH consiste à prédire que l'ensemble des cellules dans un tissu, au même titre que l'ensemble des molécules dans un liquide, adoptent une configuration, une organisation, leur permettant de minimiser l'énergie libre du système. Cette minimisation de l'énergie libre dépend essentiellement des interactions cellule-cellule.

Cette théorie a vu le jour suite aux observations d'Holtfreter (Holtfreter, 1939 ; Townes et Holtfreter, 1955). Ces observations ont alors été assimilées à la séparation de deux phases liquides. Les paramètres physiques qui gouvernent ces propriétés de miscibilité sont les tensions de surface de chaque constituant et la tension interfaciale entre les deux constituants. Un tissu, ou un ensemble de cellules cohésives, est donc assimilé à un liquide, dont la sous-unité est la cellule. Ces cellules sont capables de s'associer grâce à leurs systèmes adhésifs, et ce de manière transitoire, leur permettant une certaine mobilité au sein du tissu. Ainsi, la mesure de la tension de surface d'un amas de cellules homogènes permet de

quantifier ses propriétés d'adhésion – pour un type cellulaire donné !

(a)



(b)

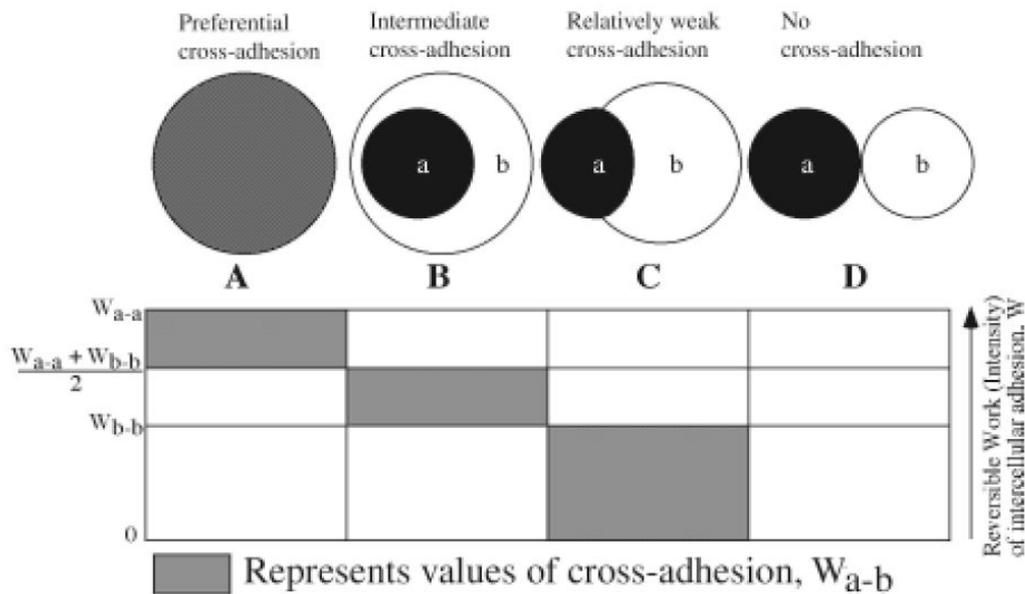


Figure 11 : Effet de la tension interfaciale sur le tri cellulaire. (a) Exemple de cellules L exprimant soit la E-cadhérine (vert), soit la P-cadhérine (rouge), à différents niveaux d'expression. Au début de l'expérience, des agrégats de cellules qui expriment une cadhérine à un niveau d'expression donné sont dissociés et mélangés avec des agrégats de cellules exprimant l'autre cadhérine. Ces amas sont alors mis en culture pendant deux jours puis observés en microscopie confocale. Dans l'image A, le niveau d'expression de la P-cadhérine est plus élevé que celui de la E-cadhérine. Dans l'image B, les deux populations de cellules expriment leur cadhérine à un niveau similaire. Dans l'image C, le niveau d'expression de la E-cadhérine est cette fois supérieur à celui de la P-cadhérine. Lorsque les deux niveaux d'expression diffèrent, les cellules ayant le plus haut niveau d'expression se retrouvent au centre de l'amas. Par contre, lorsque ce niveau est similaire pour les deux populations, les cellules restent mélangées. (b) Par analogie avec la phase observée pour deux liquides à l'équilibre la mixité entre deux populations de cellules dépend de l'énergie d'adhésion entre ces populations (W_{a-b}) et de l'énergie de cohésion de chacune de ces population (W_{a-a} et W_{b-b}). Ainsi, pour l'exemple précédent, les auteurs en ont déduit que l'énergie d'adhésion entre les populations de cellule varie plutôt en fonction du niveau d'expression que de la nature de la cadhérine exprimée. Extrait de Foty et Steinberg, 2004.

Les résultats expérimentaux ont ainsi permis de valider la DAH. En effet, la tension de surface mesurée sur des fragments de tissus embryonnaires de poulet est corrélé à la hiérarchie d'encapsulation d'un tissu par un autre. Autrement dit, comme dans le cas d'un liquide, lorsqu'un tissu tend à entourer l'autre, c'est toujours celui ayant la plus grande tension de surface qui est retrouvé au centre. Les tensions de surface et la tension interfaciale sont des paramètres thermodynamiques qui permettent de prédire la configuration à l'équilibre, vers laquelle tend le système pour minimiser l'énergie libre interfaciale. L'ensemble des configurations possibles sont données dans la Figure 11. La mesure de la tension de surface d'un tissu homogène est possible. Toutefois, il n'existe à l'heure actuelle aucun moyen de mesurer la tension interfaciale entre deux populations de cellules distinctes. Le seul moyen pour estimer cette valeur est l'observation de la configuration adoptée par les populations de cellules mises en contact. Les propriétés d'adhésion réalisées par les cadhérines ont été évaluées de cette manière (voir paragraphe V-1, ainsi que Foty et Steinberg, 2004). Ainsi, la DAH fournit un cadre théorique permettant à la fois de quantifier des grandeurs thermodynamiques qui résultent de l'adhésion cellulaire, mais aussi de prédire le comportement général d'ensembles de cellules, régis par leur système adhésif.

D'autres méthodes permettent de mesurer certains paramètres physiques de l'adhésion à l'échelle de la cellule. Celles-ci ont généralement pour but de déterminer une force de rupture du contact entre deux cellules. La manipulation de cellules par des micropipettes, par exemple, permet d'estimer cette force de rupture. Chaque cellule est maintenue par aspiration, à l'extrémité d'une micropipette. Les deux cellules sont mises en contact pendant un temps déterminé, puis l'une des micropipettes est déplacée, imposant une contrainte de dissociation sur le contact cellulaire. Du fait de leur élasticité, les cellules se déforment et la force appliquée le long de l'axe de traction croît avec le déplacement, jusqu'à la rupture. Cette rupture peut avoir lieu entre les deux cellules ou bien entre une cellule et une pipette (Fig. 12). La force de rupture du contact cellulaire est alors déterminée par :

$$F = \pi (d/2)^2 (P_{n-1} + P_n)/2$$

Où d est le diamètre de la pipette, dont l'aspiration est augmentée entre chaque essai, P_{n-1} et P_n sont les pressions d'aspiration avant et après la rupture du contact cellulaire. Cette technique a permis de mettre en évidence une stabilité des contacts adhésifs différente selon la cadhérine impliquée (Chu et al., 2006).

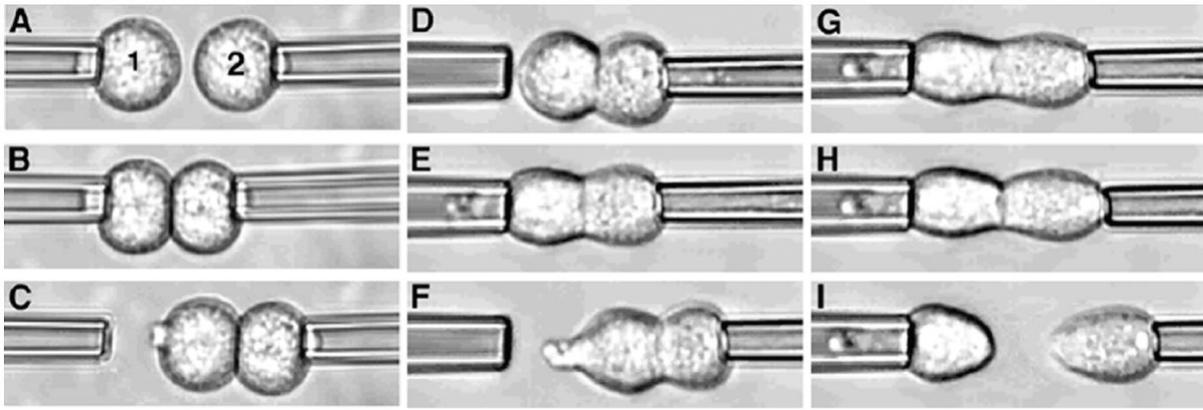


Figure 12 : Mesure de force de dissociation de deux cellules maintenue par micropipettes. (A) Deux cellules en suspension sont captées et maintenue chacune sous aspiration, par une micropipette. (B) Les deux cellules sont mises en contact, et l'adhérence entre ces deux cellules est vérifiée par déplacement d'une des deux pipettes (C). Le doublet est recapté par la deuxième pipette et la cellule maintenue par une aspiration plus forte. (D-I) Le cycle de maintien du doublet, déplacement de la pipette est renouvelé, en augmentant la pression servant à maintenir la cellule, jusqu'à observer la rupture du contact cellulaire, à une pression d'aspiration donnée. Extrait de Chu et al., 2004.

En connaissant le nombre de molécules d'adhésion impliquées dans le contact cellulaire, on peut ainsi déterminer la force moyenne de rupture par molécule, et ainsi comparer quantitativement différentes molécules adhésives. Généralement, le paramètre considéré est la densité moyenne de molécules adhésives à la surface des cellules. L'assimilation de la densité moléculaire moyenne (sur l'ensemble de la cellule) à la densité dans la zone de contact est une approximation délicate pour des expériences de dissociation entre deux cellules, puisque la répartition des molécules d'adhésion est inhomogène à la surface de ces cellules. Par contre, cette approximation est plus appropriée pour des expériences menées sur des amas cellulaires, puisque globalement, chaque cellule est en contact avec d'autres cellules sur l'ensemble de sa surface.

2- Mesures à l'échelle du système adhésif

Plusieurs systèmes adhésifs peuvent être présents pour réaliser le contact entre cellules (Fig. 2). De plus, certains systèmes adhésifs sont capables d'interagir entre eux. Ainsi, dans le cas où un système est favorisé par surexpression d'un de ces constituants, il n'est pas toujours facile de distinguer si l'activité adhésive mesurée est *réalisée* ou seulement *activée* par celui-ci. Il est alors important de déterminer l'incidence « individuelle » de chacun de ces systèmes, afin d'en mesurer l'importance relative dans le contexte biologique. Pour cela, les

expérimentateurs ont souvent recours à des surfaces modèles. En fixant des récepteurs ou des ligands purifiés sur une surface, on peut obliger la cellule à n'adhérer qu'au moyen d'un interactant spécifique. Notons que ce type d'analyse peut être utilisé afin de compléter des résultats mesurés par ailleurs pour des interactions entre cellules.

L'exemple des interactions entre leucocytes et cellules endothéliales est très probant. En effet, différentes études ont pu mettre en évidence que l'adhésion entre ces deux types cellulaires, au cours de la réponse immunitaire, était réalisé à la fois par les sélectines et par des intégrines (Pour revue, voir Simon et Green, 2005). La mesure des propriétés d'adhésion, par utilisation de surfaces modèles a contribué à établir les propriétés d'interaction de chacun de ces deux systèmes adhésifs et leur rôle respectif dans différentes étapes du processus biologique, de la capture du leucocyte par la paroi du vaisseau sanguin à la transmigration de ces cellules à travers la paroi. Plus précisément, l'utilisation de la méthode de chambre à flux laminaire (décrite au chapitre IV-6) a permis de déterminer les paramètres cinétiques de l'interaction entre un leucocyte entraîné dans un flux et les différents systèmes adhésifs présents sur les cellules endothéliales. Ces travaux ont mis en évidence l'incidence des propriétés des interactions sélectine-ligand qui activent le système adhésif associé aux intégrines. Ces interactions sélectine-ligand ralentissent les leucocytes roulant sur la paroi de cellules endothéliales, optimisant le temps de contact entre les intégrines et leurs ligands pour réaliser leurs interactions adhésives.

La mesure de l'adhésion entre une cellule et une surface modèle, couplée à l'imagerie, permet également de corréler les mesures physiques de l'adhésion à l'évolution de l'échafaudage moléculaire mis en place par la cellule pour réaliser le contact adhésif. Ainsi, Thoumine et al. (2006) ont utilisé des billes fonctionnalisées avec des fragments fonctionnels de N-cadhérine, maintenues par pinces optiques au contact de la membrane d'un cône de croissance, pour stimuler l'adhésion. Les mesures de cinétiques ont été réalisées par FRAP et par photo-activation, permettant de suivre la cinétique de recrutement ainsi que le recyclage de molécules de N-cadhérines, au niveau du contact adhésif réalisé entre une bille et une cellule. De plus, grâce à cette méthode, les auteurs ont pu mettre en évidence le rôle du couplage entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine sur ces propriétés de recrutement et de recyclage des cadhérines.

D'autres méthodes d'analyse encore plus « synthétiques » permettent de sonder les grandeurs physiques qui caractérisent un système adhésif spécifique. La cellule peut être remplacée par une vésicule fonctionnalisée ou même par une autre surface modèle. Un travail très intéressant réalisé par le groupe de Sackmann permet de caractériser l'adhésion réalisée

par une vésicule fonctionnalisée sur une bicouche lipidique elle-même fonctionnalisée (Kloboucek et al., 1999). La bicouche est recouverte de récepteurs csA (contact site A) alors que la vésicule est recouverte de récepteurs csA et d'un polymère mimant le glycocalyx (Fig. 13). L'interaction entre la vésicule et la bicouche est étudiée par microscopie de contraste de réflexion interférentiel (RICM, reflection interference contrast microscopy). Ainsi, il a été montré qu'à faible densité de récepteurs, ceux-ci se concentrent, donnant lieu à une surface de contact composée d'une zone de forte adhésion réalisée par l'interaction homophile des récepteurs, et d'une zone de faible adhésion identifiée comme une forme passive d'interaction entre les bicouches lipidiques. Par contre, à forte concentration en récepteurs, la surface de contact est uniformément constituée d'une zone d'adhésion forte. L'énergie d'adhésion par unité de surface est déterminée localement à partir de la courbure de la vésicule, près de la ligne de contact (Albersdörfer et al., 1997). Cette étude a permis de distinguer l'énergie d'adhésion due aux interactions spécifiques par les récepteurs, de l'ordre de 10^{-2} J.m^{-2} , de celle estimée dans les zones de faible adhésion (10^{-6} J.m^{-2}), essentiellement due à la gravitation et aux fluctuations membranaires. Un travail préliminaire où de telles surfaces ont été fonctionnalisées par des fragments de E-cadhérine a permis de mettre en évidence la formation de points de contact (Puech et al., 2004).

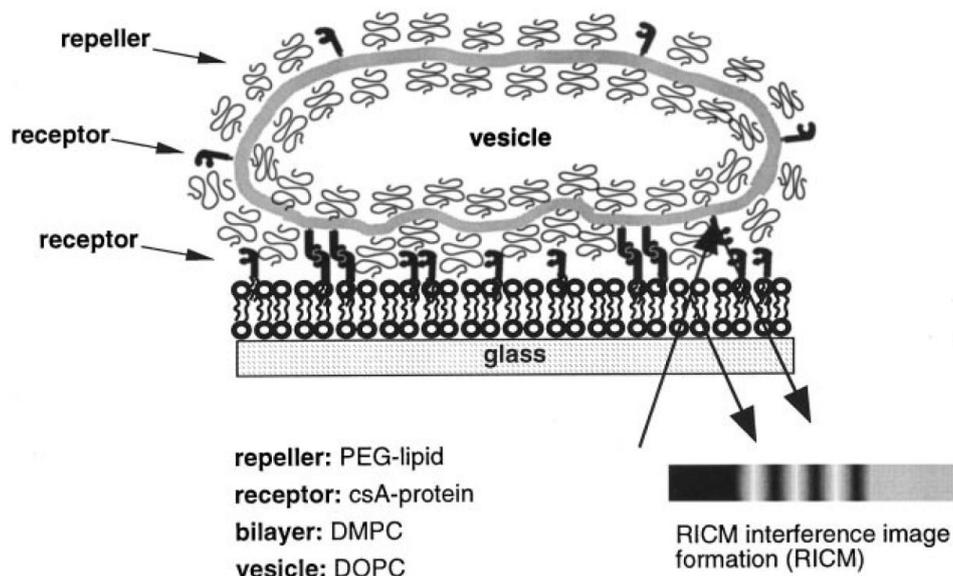


Figure 13 : Mesure des propriétés adhésives à partir d'une vésicule modèle. La surface de la vésicule est décorée par des récepteurs permettant une adhésion spécifique sur le substrat qui est elle-même une bicouche lipidique fonctionnalisée. La surface de la vésicule est également recouverte de molécules mimant le glycocalyx (repeller), et la formation du contact adhésif est mesurée par RICM. Extrait de Kloboucek et al., 1999.

La méthode de Surface Force Apparatus (SFA) permet de sonder la force simultanément à la distance de séparation entre deux surfaces fonctionnalisées. Cette méthode consiste à étudier la force de rupture entre deux bicouches lipidiques fonctionnalisées et maintenues sur des supports solides hémicylindriques (Fig. 14). Les deux surfaces sont amenées à une distance donnée, puis éloignées. La distance entre ces deux surfaces peut être finement mesurée par contraste de réflexion interférentiel. En cas d'interaction entre ces deux surfaces, une force est mesurée. Il est donc possible de déterminer à partir de quelle distance d'approche les deux surfaces peuvent interagir, mais aussi à quelle distance et à quelle force ces deux surfaces se dissocient. De plus, cette méthode permet d'évaluer si un ou plusieurs sites distincts sont présents sur chaque molécule et a notamment été utilisée pour sonder les propriétés d'interaction entre cadhérines (cf. paragraphe V-4). Connaissant la densité de récepteurs ou de ligands sur chacune de ces surfaces, il est possible d'estimer l'énergie d'adhésion moyenne par molécule. Cependant, cette méthode est peu précise pour la mesure de ce paramètre, comparativement à d'autres techniques décrites ci-dessous. En effet, il est difficile de déterminer si cette énergie par molécule correspond à l'activité de liaisons indépendantes ou bien à un effet coopératif des molécules regroupées sur une surface.

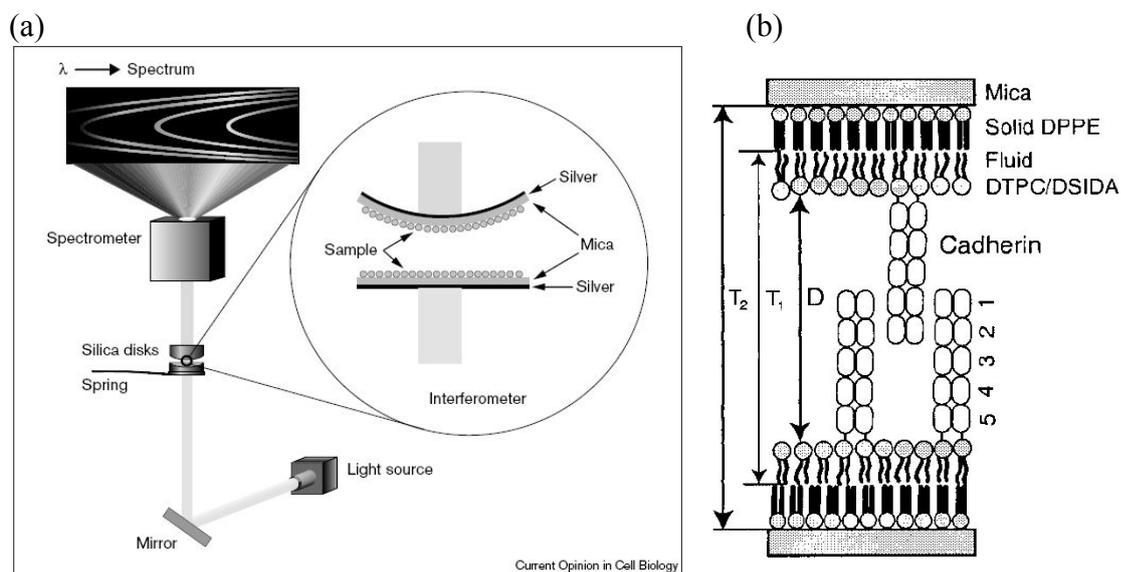


Figure 14 : Principe de mesure par SFA. (a) Le support des deux surfaces est constitué de deux lentilles. La distance séparant ces deux surfaces est mesurée par le déplacement des franges d'interférence. De plus, la lentille inférieure est montée sur un système de ressort permettant de mesurer la force d'adhésion entre ces deux surfaces, simultanément au déplacement. (b) Les surfaces sont fonctionnalisées par la protéine d'intérêt. Dans l'exemple montré ici, le fragment extracellulaire de la C-cadhérine est immobilisé, grâce à un tag polyhistidine présent à l'extrémité C-terminale de la protéine, sur une bicouche lipidique elle-même déposée sur une lame de mica qui recouvre les lentilles. Extrait de Leckband et Sivansakar 2000 et de Sivansakar et al., 1999.

3- Mesures à l'échelle de molécules isolées

Les méthodes précédentes permettent d'étudier l'adhésion cellulaire en conservant souvent l'échafaudage moléculaire qui permet de réaliser la fonction adhésive. Toutefois, il est parfois difficile de déterminer la part respective des différents constituants dans le processus global qui est mesuré. De plus, dans la majorité de ces méthodes, il est nécessaire de connaître le nombre de molécules impliquées dans l'interaction à chaque instant, ce qui est rarement possible. Dans ces conditions, seules les grandeurs thermodynamiques à l'équilibre sont mesurables. Ceci impose une limitation majeure pour l'étude de systèmes biologiques qui sont rarement à l'équilibre thermodynamique. Une autre approche pour aborder la complexité de l'adhésion cellulaire est de décomposer les systèmes adhésifs en leurs constituants élémentaires, à savoir étudier les propriétés d'interaction entre molécules isolées. Les résultats dépendent alors de conditions expérimentales contrôlées et reflètent uniquement les paramètres dynamiques d'un couple ligand-récepteur. Ces méthodologies sont relativement difficiles à mettre en œuvre du fait du niveau de sensibilité exigé, puisque les valeurs des paramètres mesurés sont souvent du même ordre de grandeur que celles du bruit de fond. Néanmoins, de nombreux exemples récents dans la littérature montrent la pertinence de cette approche.

Différentes considérations méthodologiques, ainsi qu'un exemple particulier d'étude à l'échelle de la liaison unique, seront discutés dans le paragraphe IV. Le plus souvent, ces études nécessitent que récepteurs et ligands soient distinctement isolés afin de maîtriser la formation et la dissociation de la liaison. En fixant ces différentes molécules sur des surfaces solides, on peut non seulement isoler ces molécules, mais également les manipuler et sonder leurs propriétés en mesurant le comportement d'objets « macroscopiques ». Parmi ces méthodes, on peut citer les pinces optiques ou magnétiques, l'AFM, la BFP ou la chambre à flux laminaire. Le principe de chacune de ces méthodes est schématisé sur la Figure 15. L'une des deux molécules est fixée sur une bille nano- ou micrométrique ou sur la pointe de l'AFM, l'autre sur une surface plane ou une autre bille. Ces méthodes permettent généralement de sonder la cinétique et/ou la force de rupture de l'interaction récepteur-ligand.

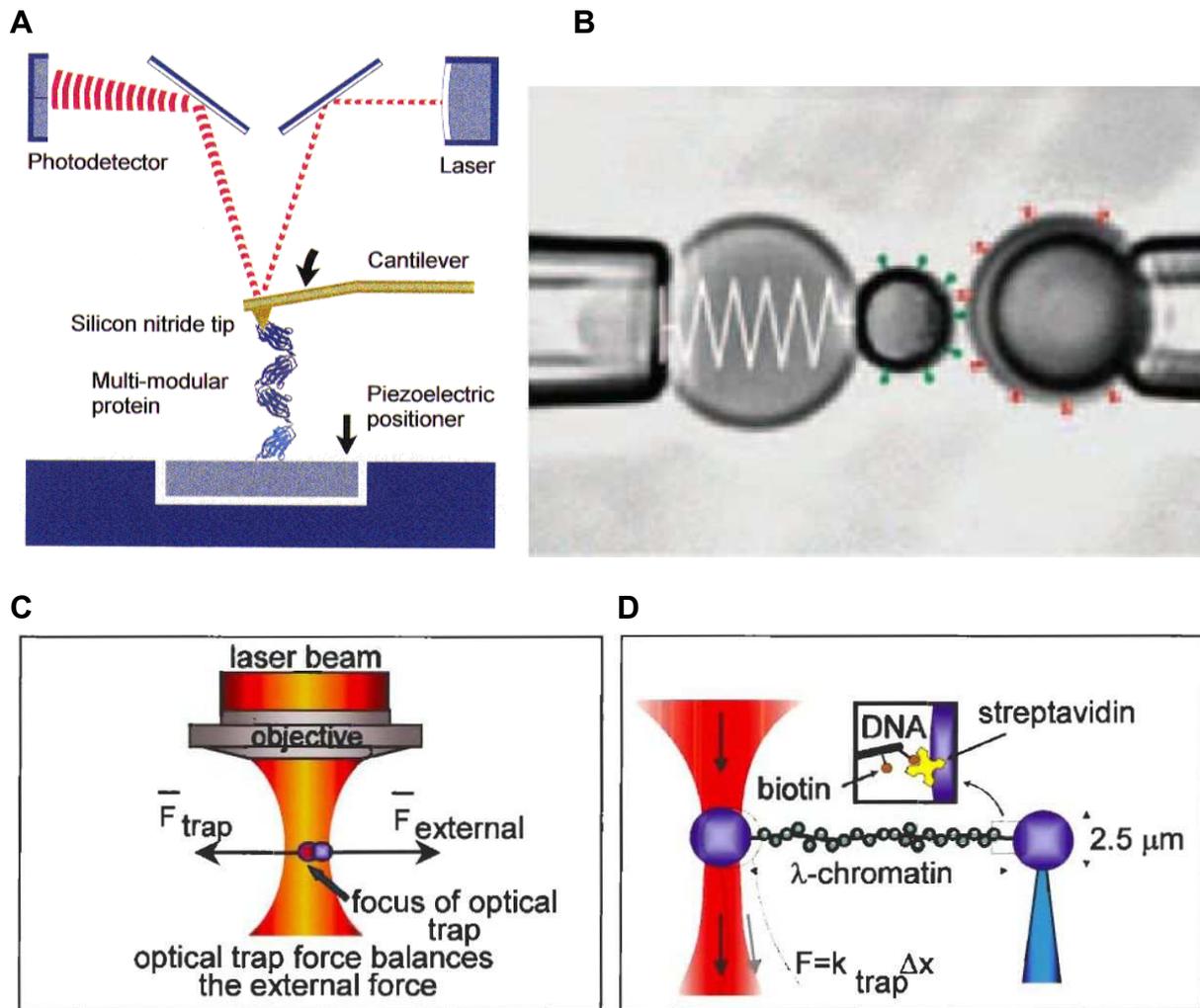
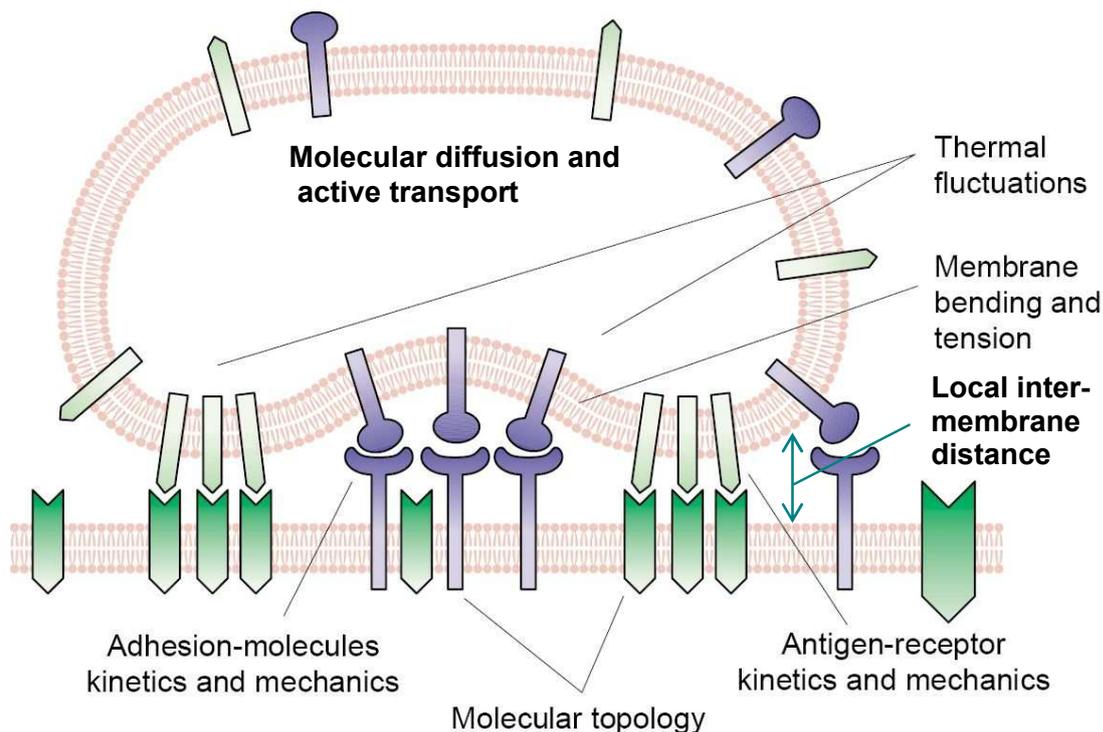


Figure 15 : Principe de mesure de force à l'échelle unimoléculaire par AFM (atomic force microscopy), BFP (biomembrane force probe), ou LOT (laser optical tweezers). Ces méthodes servent à mesurer une force de rupture entre deux molécules, mais peuvent également sonder la force de dépliage d'une molécule. (A) Dans une mesure de force par AFM, le système étudié est maintenu à chaque extrémité, entre le substrat et la pointe du cantilever. Le substrat est déplacé par l'action d'un piézoélectrique, et la force est mesurée par la déflexion du cantilever, ayant une constante de raideur connue. (B) Dans le cas de la BFP, un globule rouge sous aspiration contrôlée sert de ressort. Chaque molécule est fixée à la surface d'une bille. La déformation du globule rouge avant rupture permet de déterminer la force de rupture de la liaison moléculaire. (C-D) Dans le cas des pinces optiques, la focalisation d'un laser constitue un piège optique et permet de maintenir la bille. La force appliquée par le piège sur la bille dépend de l'intensité de faisceau et de la distance entre la position de la bille et le centre du piège.

Bien évidemment, la mesure des paramètres thermodynamiques de chacun des constituants d'un système adhésif, n'est pas une fin en soit. Afin de comprendre, voire de prédire, l'incidence de l'adhésion sur le comportement des systèmes biologiques plus complexes, comme la cellule ou le tissu, il est nécessaire d'intégrer les propriétés thermodynamiques de chacun de ces constituants. L'exemple de la formation de la synapse

immunologique, étudiée par le groupe de Dustin (Lee et al., 2002a-b) permet d'illustrer ce point. La synapse immunologique est une jonction réalisée entre une cellule T et une cellule présentatrice d'antigène. Cette jonction est constituée d'un ensemble de récepteurs spécifiques (TCR / pMHC) ainsi que de molécules d'adhésion cellulaire (LFA-1 / ICAM-1). Un modèle a été établi pour reconstituer le processus d'établissement d'une synapse mature. Celui-ci tient compte de la cinétique d'association et de dissociation de ces différents complexes, ainsi que du comportement de chacun de ces récepteurs dans la bicouche lipidique (concentration, diffusion, transport actif via l'action de l'actine,...), mais aussi des propriétés de la membrane elle-même (rigidité de la membrane, tension interfaciale,...) (Fig. 16). Ainsi, l'intégration des paramètres physiques mesurés pour chaque constituant a permis de mieux comprendre le mécanisme de mise en place de cette jonction cellulaire spécialisée, observé dans le contexte cellulaire. En effet, grâce à cette étude, les auteurs ont pu mettre en avant l'importance des cinétiques d'association et de dissociation du couple TCR-pMHC dans la mise en place de cette synapse immunologique.



TRENDS in Immunology

Figure 16: Schéma d'une synapse immunologique entre une cellule T et une cellule présentatrice d'antigène. Ce schéma regroupe les différents paramètres utilisés par le groupe de Dustin pour modéliser la formation d'une synapse immunologique. Ce modèle repose notamment sur les constantes cinétiques d'interaction des molécules d'adhésion, ainsi que de l'interaction entre les récepteurs (TCR) et leur ligand (MHC). Adapté de Lee et al., 2002.

Ainsi, ces approches à différentes échelles sont complémentaires. Si le but est de comprendre le fonctionnement et le rôle de l'adhésion à différentes échelles en biologie, connaître le comportement individuel d'un couple moléculaire d'adhésion permet de pouvoir anticiper son rôle dans le contexte cellulaire. En effet, chaque interaction entre partenaires moléculaires d'un système adhésif a une fonction propre dans le contexte cellulaire. Les études à l'échelle cellulaire reflètent un comportement moyen de l'ensemble des protagonistes, c'est-à-dire des molécules adhésives et des molécules associées ainsi que des conséquences cellulaires de la signalisation. L'approche réductionniste de la molécule unique permet un découplage des phénomènes cellulaires et par conséquent permet d'identifier plus facilement la participation et le rôle de chaque partenaire.

IV- Mesures à l'échelle de la liaison unique et conditions physiologiques

1- Généralités

Dans ce chapitre, je vais aborder différentes considérations expérimentales sur la manière de sonder les propriétés d'interactions à l'échelle de la liaison unique. Bien que la plupart de ces considérations sont généralisables à l'ensemble des biomolécules, une attention plus particulière est portée au cas particulier des protéines d'adhésion.

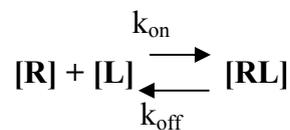
De nombreuses protéines ont une activité biologique nécessitant un cofacteur ou des ions pour être actifs. Ces cofacteurs peuvent avoir plusieurs effets au niveau moléculaire qui déterminent leur rôle dans l'activité biologique : l'interaction avec la protéine influence la structure de celle-ci, ou bien permet le pontage avec un ligand, ou encore entraîne la formation d'oligomères... Il est donc important de respecter un certain nombre de conditions expérimentales qui seront déterminantes pour la pertinence de l'étude, et dont le résultat peut alors être transposé au contexte biologique. Les conditions les plus courantes sur le milieu qui environne la protéine concernent les ions présents dans le tampon. Ces ions, en déterminant la salinité (ou force ionique) et le pH, participent au repliement et donc à l'activité protéique. Les conditions standard de pH (7 ou 8, généralement) et de salinité (150 mM NaCl, par exemple) sont bien connues des biochimistes, et doivent être respectées lors d'études biophysiques, afin d'assurer la pertinence de la mesure. Dans le cas des protéines membranaires, la présence de lipides au niveau du segment transmembranaire peut également être capitale pour la fonction biologique. Bien que ces conditions puissent paraître triviales, il est important de veiller à la compatibilité des nouvelles techniques d'investigation, permettant de sonder certaines propriétés physiques moléculaires, avec le système biologique étudié.

Au delà de ces conditions générales, il existe aussi des cas particuliers. Parmi ces cofacteurs, on peut distinguer ceux qui sont strictement nécessaires à l'activité biologique de ceux qui la modulent. Pour illustrer ce point, prenons l'exemple des intégrines. Ces protéines d'adhésion doivent former un hétérodimère, composé de deux sous-unités, α et β , pour être biologiquement actif. L'étude biophysique des intégrines, à l'échelle de la liaison unique, doit donc être réalisée à partir de l'unité minimale d'interaction, à savoir un hétérodimère $\alpha\beta$. Par ailleurs, leur activité biologique est modulée par l'action de cations divalents, tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+} . Cette modulation varie selon la nature de cet ion : le Ca^{2+} est généralement considéré comme inhibiteur de l'activité, alors que Mg^{2+} et Mn^{2+} sont considérés comme activateurs des intégrines. De plus, l'effet de ces ions dépend de la nature précise des sous-

unités α et β , et il semble même que la variation en concentration de ces ions régule l'activité biologique de ces protéines (Ross et al., 1993, Grzesiak et Pierschbacher, 1995). Ainsi, il est préférable de réaliser les mesures d'interaction des intégrines dans des conditions standards en ions divalents, lorsqu'elles sont déterminées. Néanmoins, il peut être pertinent de sonder l'influence de ces ions (nature et concentration) sur les propriétés d'interaction afin d'en comprendre les mécanismes régulateurs.

2- Adhésion cellulaire et systèmes hors équilibre

La façon la plus simple de considérer une interaction entre un récepteur (R) et un ligand (L) est la suivante :



Les propriétés moléculaires sont souvent définies à partir de **l'équilibre** qui résulte des deux processus opposés : la formation de complexes RL à partir des espèces libres et la dissociation de ces complexes. Une interaction ligand-récepteur est alors caractérisée par la constante d'affinité K_A , ou la constante de dissociation K_D . Le concept d'affinité à l'équilibre est largement utilisé pour caractériser de nombreuses réactions biochimiques, dans le but d'expliquer les processus biologiques auxquels ces réactions prennent part. Toutefois, deux raisons majeures peuvent être invoquées pour mettre en avant les limitations de ce type d'investigation. Tout d'abord, les processus biologiques approchent très rarement l'équilibre. Ensuite, ceux-ci s'appuient sur une multitude de réactions différentes, simultanées ou coordonnées dans le temps afin de donner lieu à une réponse adaptée. Ainsi, les constantes cinétiques des réactions moléculaires deviennent les paramètres pertinents pour expliquer les phénomènes biologiques.

L'exemple de la maturation de la réponse immunitaire à un haptène, l'oxasolone, (Foote et Milstein, 1991) a confirmé l'importance incontestable des mesures **cinétiques** en biologie. La nature des anticorps évolue au cours de la réponse immunitaire : un groupe d'anticorps est majoritaire lors de la réponse primaire, d'autres groupes apparaissent au moment de la réponse secondaire ou tertiaire. Foote et Milstein ont démontré que la plupart des anticorps sélectionnés lors de la réponse secondaire ont une cinétique d'association dix fois plus rapide que ceux présents lors de la réaction primaire, sans différence d'affinité à l'équilibre évidente. Ceci suggère que les anticorps sont sélectionnés sur cette cinétique d'association. De ce fait, décrire une interaction entre protéines par la seule constante

d'affinité à l'équilibre ne donne qu'un reflet partiel du comportement de ces protéines et de leur fonction biologique.

Dans le cas le plus simple, les vitesses d'**association** et de **dissociation** des complexes récepteur-ligand peuvent être définies ainsi :

* $k_{on} \times [R] \times [L]$ dépend du paramètre k_{on} qui reflète l'efficacité de formation de l'interaction pour un couple récepteur-ligand donné.

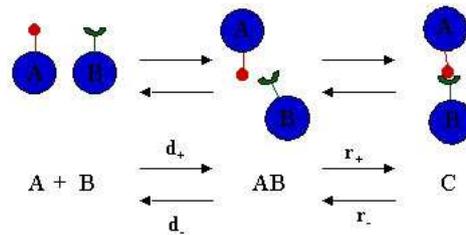
* $k_{off} \times [RL]$ dépend du paramètre k_{off} qui nous informe sur la stabilité de l'interaction. L'inverse de cette constante est parfois utilisé, car plus intuitif : $1/k_{off}$ correspond à la durée de vie caractéristique de l'interaction. Dans le cas général, les interactions adhésives peuvent être plus complexes qu'une réaction du premier ordre. En effet, la surface de contact entre protéines met en jeu différentes interactions à l'échelle nanoscopique : liaisons hydrogène, ponts salins, interactions de van der Waals, chaînes latérales hydrophobes, interactions π entre cycles aromatiques,... et ce avec une organisation spatiale spécifique. Ces couples récepteurs-ligands peuvent alors présenter des intermédiaires de réaction, des formes d'interaction multiples, un mécanisme coopératif,... Toutefois, on peut noter que, dans le cas où le chemin réactionnel entre l'état dissocié et l'état final d'interaction est dominé par une seule barrière énergétique, les vitesses d'association et de dissociation s'écrivent de manière approchée selon cette formulation simple. Ce formalisme est souvent utilisé comme première approximation lorsqu'on cherche à caractériser grossièrement un mécanisme réactionnel encore inconnu.

La formation des contacts cellulaires est un processus hors équilibre. Différentes questions essentielles doivent être posées pour comprendre la séquence des événements nécessaires à l'adhésion. Les molécules adhésives sont-elles capables d'interagir assez rapidement pour qu'*in vivo* une plaque adhésive puisse se développer ? Combien de temps doit persister l'interaction pour déclencher un signal intracellulaire et ainsi induire une réponse cellulaire ? ...

3- Protéines membranaires et géométrie de l'interaction

Les protéines d'adhésion sont des molécules membranaires. Du fait des contraintes géométriques imposées aux molécules ancrées sur des surfaces, les cinétiques d'interaction peuvent être différentes de celles mesurées en solution. Pour illustrer ce point, il semble opportun de rappeler le modèle utilisé par Bell (1978) pour décrire la cinétique de formation et de dissociation d'un couple récepteur-ligand. Que la réaction ait lieu entre molécules en

solution ou ancrées à des surfaces, il est plus simple de séparer conceptuellement la réaction en deux étapes. Cette réaction entre deux molécules isolées peut s'écrire ainsi :



La première étape correspond à la rencontre entre les deux réactifs, et la diffusion est un paramètre essentiel pour que la deuxième étape se produise. Celle-ci correspond à la réaction proprement dite. Dans le cas d'une interaction protéine-protéine, cette étape consiste à apposer les surfaces complémentaires entre lesquelles différentes liaisons attractives (van der Waals, liaison hydrogène, liaison ionique...) vont s'établir pour stabiliser le système. Dans l'équation précédente, l'état « AB » correspond donc au **complexe de rencontre** et l'état « C » au **complexe de liaison** entre les deux réactifs. De façon empirique, les constantes cinétiques d_+ et d_- caractérisent les vitesses de rencontre et d'éloignement des réactifs. Les constantes cinétiques r_+ et r_- caractérisent les vitesses d'association et de dissociation du contact intermoléculaire.

Différents éléments interviennent à chacune de ces étapes. Tout d'abord, **la diffusion** de molécules en solution ou sur des surfaces est différente. En effet, les molécules en solution diffusent librement dans toutes les directions. La diffusion dépend essentiellement de la taille de la molécule et de la viscosité du milieu. Pour des molécules ancrées à des surfaces, la diffusion est contrainte par le substrat. Dans le cas particulier de l'adhésion cellulaire, la rencontre entre les molécules devant interagir dépend de façon critique de la distance entre les deux membranes opposées. Pour une protéine intégrée dans une membrane plasmique, la diffusion latérale dépend essentiellement de la composition de la membrane, de l'association à des protéines cytoplasmiques, de la taille de la molécule et de la viscosité de la bicouche lipidique. Par contre, pour des molécules fixées sur des surfaces solides, la diffusion est limitée par le ou les points de greffage. Une fois les molécules à distance, **l'orientation et la flexibilité** de la molécule interviennent dans l'ajustement de la zone de contact intermoléculaire. L'ancrage sur une surface influence fortement leur orientation relative. Ceci peut être une contrainte défavorable pour la formation du contact entre les molécules fixées, comparativement à des molécules libres. Toutefois, il arrive que dans le contexte cellulaire, l'orientation des molécules puisse être un gain au niveau de la stabilité de la zone de contact intermoléculaire. En effet, de par l'anisotropie du système, l'ancrage des molécules sur les

membranes cellulaires favorise certaines directions de détachement. Or, la direction de la force de séparation ne coïncide pas nécessairement avec le chemin réactionnel de dissociation de moindre énergie. Cette propriété a été observée pour une interaction adhésive sélectine-ligand impliquée dans la réponse immunitaire. Ce point sera détaillé dans le paragraphe suivant.

Ainsi, les paramètres cinétiques d'interaction à l'échelle moléculaire dépendent fortement de leur **configuration**. Il est donc nécessaire d'adapter le mode opératoire permettant de sonder ces paramètres à la configuration adoptée par ces molécules dans le contexte biologique.

4- Protéines d'adhésion et contraintes de tension

Le chemin réactionnel d'une interaction peut généralement être modélisé par un **profil d'énergie** comprenant un état lié de basse énergie et un état dissocié. Le passage de l'état lié à l'état dissocié nécessite de franchir une barrière d'énergie E_b (Fig. 17a). En absence de force appliquée sur la liaison, seule l'énergie thermique permet de passer la barrière de dissociation. Dans ce cas, on observe la rupture spontanée de l'interaction dont la cinétique peut être caractérisée par la valeur du paramètre k_{off} . Toutefois, les molécules peuvent être soumises à diverses contraintes qui vont affecter leur cinétique de dissociation : contrainte mécanique, choc osmotique, champ électrique,... C'est le cas des protéines membranaires d'adhésion dont la liaison peut être soumise à des **forces séparatives** modifiant le paramètre k_{off} . Appliquer une force externe persistante sur une liaison crée un potentiel de dissociation mécanique qui déforme ce profil énergétique (Fig. 17b). La barrière d'énergie est généralement diminuée, avec pour conséquence la modification significative des constantes cinétiques. Notons, toutefois, que ce raisonnement n'est valable que si les molécules se dissocient selon le même chemin réactionnel, quelque soit la force appliquée. Le cas où cette hypothèse n'est pas vérifiée est discuté plus loin.

En considérant que la force appliquée peut se traduire par une énergie fournie au système, Bell en 1978 est le premier à avoir introduit ce concept dans le domaine des interactions biologiques.

$$k_{off}(F) \approx k_{off}(0) \exp(\gamma F / k_B T)$$

où $k_{off}(F)$ et $k_{off}(0)$ correspondent respectivement à la constante de dissociation à force F et à force nulle, γ est un paramètre de distance empirique qui reflète la structure du paysage énergétique d'interaction des molécules, k_B est la constante de Boltzmann et T la température.

Ainsi, la **vitesse de dissociation** est modulée par l'intensité de la force appliquée. D'autre part, dans le cas où la force appliquée n'est pas constante, la vitesse de dissociation dépend également de la vitesse d'augmentation de la force (appelé taux de charge). C'est la raison pour laquelle donner une valeur de force de rupture pour décrire une interaction est très limité. Néanmoins, il existe pour chaque interaction une force de rupture instantanée qui correspond au maximum du gradient du paysage énergétique entre l'état lié et l'état dissocié. Lorsqu'une telle force est appliquée, la liaison se dissocie instantanément, autrement dit, la vitesse de dissociation n'est limitée que par la diffusion moléculaire (Bell, 1978). Toutefois, cette même liaison peut se dissocier « rapidement », même à des forces plus basses que la force de rupture instantanée. En fait, il existe une **force caractéristique** de l'interaction qui tient compte de la relation entre la force appliquée (F) et la vitesse de dissociation (k_{off}).

$$k_{off}(F) \approx k_{off}(0) \exp(F/f_\beta) \text{ et } f_\beta = kT / \gamma, \text{ selon le formalisme de Bell.}$$

La résistance à la force appliquée, caractérisée par le paramètre f_β , est une propriété moléculaire essentielle pour le comportement d'un contact adhésif et notamment pour sa stabilité ou sa plasticité. Deux interactions peuvent avoir une même cinétique de détachement à force nulle et pourtant être plus ou moins sensibles à une force appliquée.

Pour mesurer cette grandeur f_β , la méthode la plus directe est de déterminer la constante cinétique de dissociation, pour différentes **forces constantes appliquées**. Toutefois, le passage d'une force nulle à une force F prend un certain temps, qui peut être comparable aux temps de dissociation mesurés. Dans ce cas, la cinétique de dissociation, obtenue à partir de la mesure des temps de ruptures, est faussée. Un autre moyen est d'appliquer un **taux de charge constant** et de mesurer la force de rupture. Les bases théoriques qui relient la force de rupture, le taux de charge et f_β ont été établies par Evans (Evans et Williams 2002). En résumé, les paramètres $k_{off}(0)$ et f_β sont déterminés par la relation suivante :

$$f^* = f_\beta \ln(r_f) - f_\beta \ln[f_\beta k_{off}(0)]$$

où f^* représente la force de rupture la plus fréquente (i.e. le maximum de la distribution des forces de ruptures pour un taux de charge donné) et r_f le taux de charge appliqué. Le graphe qui représente f^* en fonction de $\ln(r_f)$ est appelé spectre de force dynamique. La force de rupture d'une interaction f^* n'a pas de sens en soit, puisqu'elle dépend directement du taux de charge.

Ces notions restent valables lorsque le paysage énergétique menant à la dissociation est constitué d'une **succession de barrières énergétiques**. Ainsi, en examinant une interaction sur une gamme étendue de taux de charge, des barrières d'énergies ont pu être

révélées expérimentalement pour différentes interactions récepteur-ligand, par spectroscopie de force dynamique (Par exemple, voir Merkel et al., 1999). Lors de l'application de forces faibles, les barrières les plus visibles sont les barrières extérieures, et en appliquant des forces plus élevées, les barrières extérieures disparaissent et les barrières les plus internes sont détectables (Fig. 17).

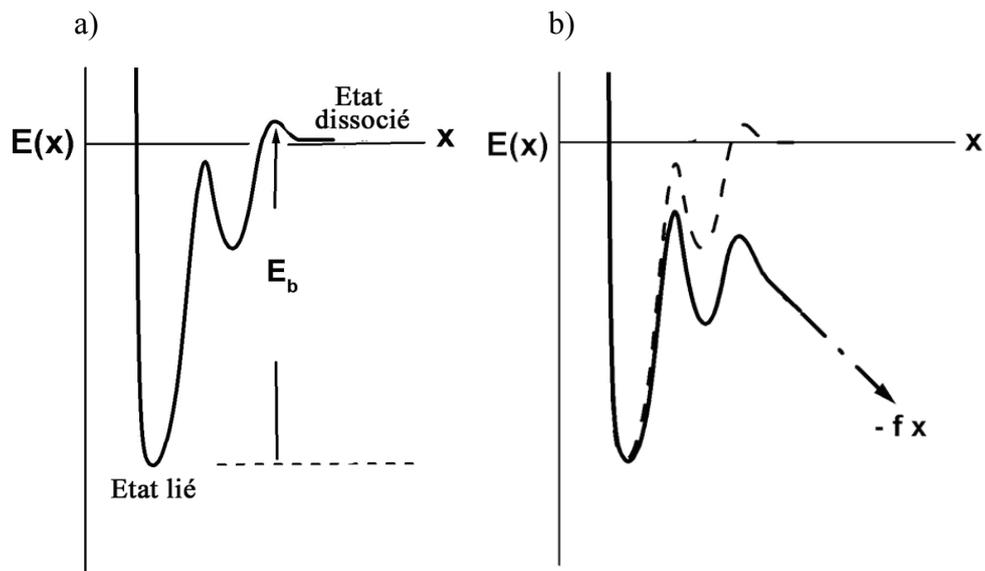


Figure 17 : Représentation schématique du paysage énergétique d'une interaction et incidence d'une force de dissociation. (a) Le paysage énergétique d'une liaison entre un récepteur et un ligand peut être simplifié à une dimension par le chemin de moindre énergie, emprunté par le ligand lors de la dissociation du complexe. Ce paysage peut contenir plusieurs barrières importantes dont la plus élevée correspond à l'énergie de liaison E_b . La cinétique de dissociation est essentiellement dominée par cette énergie. (b) L'application d'une force de séparation sur cette liaison revient à ajouter au paysage énergétique une énergie potentielle $E_f = -f x$, où f est l'intensité de la projection de la force appliquée, sur la direction de dissociation. Cette énergie potentielle se traduit par une déformation du paysage énergétique qui diminue la hauteur des barrières énergétiques et peut même modifier la « nature » de la barrière limitante. Notons que cet effet de la force n'est valable que sous certaines conditions détaillées dans le manuscrit.

Toutefois, il faut se rappeler que ces considérations ne sont valables que sous certaines conditions, notamment il faut que la dissociation emprunte le même chemin réactionnel, quelque soit la force appliquée. Cette condition est réalisée si la direction selon laquelle la force est appliquée est suffisamment proche du chemin réactionnel de dissociation à force nulle, mais rien ne permet de le garantir *a priori*. Il a même été observé expérimentalement que la dissociation d'une interaction récepteur-ligand peut prendre différents chemins en fonction de l'intensité de la force appliquée. En effet, pour l'interaction entre la P-sélectine et son ligand PSGL-1, le chemin réactionnel de moindre énergie, emprunté à force nulle ou à

force faible, est différent du chemin emprunté à des forces plus élevées (Fig. 18). Ainsi, le groupe de Cheng Zhu a pu mettre en évidence de manière expérimentale le phénomène de « catch bond » pour la L- et la P-sélectine, où la force appliquée tend à stabiliser l'interaction et non pas à la dissocier (Evans et al., 2004 ; Yago et al., 2004). Cette propriété moléculaire semble être à la base de la fonction biologique réalisée par l'interaction L-sélectine – PSGL-1 dans la réponse immunitaire.

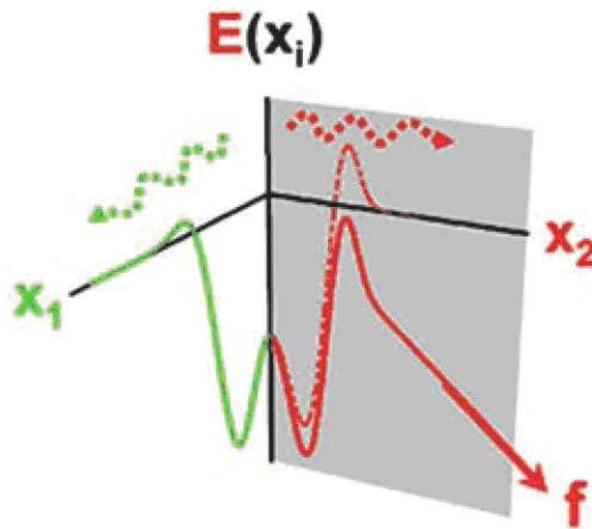


Figure 18 : Exemple de chemins de dissociation dépendants de la force appliquée. Dans le cas où la force appliquée est essentiellement orthogonale à un chemin de dissociation, cette force aura peu d'effet sur le profil énergétique le long de ce chemin (x_1). Par contre, si la direction de la force appliquée est proche de la direction du chemin de dissociation, la force aura un effet important sur le paysage énergétique (x_2). Ainsi, bien que la dissociation se fasse selon le chemin (1) à force nulle, l'application de la force f favorise la dissociation selon le chemin (2), modifiant ainsi les propriétés cinétiques de dissociation. Extrait de Evans et al., 2004.

De nombreuses précautions, aussi bien théoriques qu'expérimentales, sont nécessaires pour mener à bien l'étude d'une interaction moléculaire soumise à une contrainte. Néanmoins, les approches de spectroscopie de force dynamique nous révèlent leur comportement dans ces conditions de stress et sont donc très informatives pour mieux comprendre leurs propriétés intrinsèques et leurs fonctions. Les paramètres cinétiques des interactions entre protéines d'adhésion sont non seulement essentiels pour une compréhension précise des **mécanismes submoléculaires**, mais également pour intégrer le rôle de ces propriétés dans **les échafaudages multimoléculaires** qui réalisent le processus d'adhésion à l'échelle cellulaire. La technique d'analyse des grandeurs biophysiques doit prendre en compte différents paramètres, essentiels à la pertinence des mesures, tels que la fixation et l'orientation des molécules d'adhésion, l'incidence des contraintes mécaniques sur la stabilité de la liaison

moléculaire, ainsi que l'incidence de cofacteurs sur ces propriétés et le mécanisme d'interaction.

5- Vérification expérimentale de la liaison unique

Les mesures d'interaction par liaisons uniques présentent invariablement la question de contrôler l'unicité de la liaison. En effet, comme je l'ai abordé dans le paragraphe III-3, la **condition de liaison unique** est essentielle à une bonne interprétation des mesures physiques des propriétés moléculaires. Du fait de la taille des objets étudiés, cette condition expérimentale est difficilement vérifiable par une observation directe. Plusieurs critères peuvent servir à contrôler cette condition. Il faut noter que certains de ces arguments peuvent dépendre des approches expérimentales utilisées.

Le premier critère consiste à déterminer la densité moyenne de molécules présentes sur les surfaces devant interagir. Cette densité doit être suffisamment faible pour que le rapprochement des deux surfaces ne permette la formation que d'une seule liaison moléculaire. Notons que ce critère n'est pas très robuste. En effet, s'il est possible de mesurer une densité moyenne, celle-ci peut généralement varier localement. Seule la mesure de la densité locale permet d'assurer la condition de liaison unique, ce qui est rarement possible à des précisions de l'ordre du nm.

Une deuxième méthode est possible si le signal de détachement d'une liaison unique est clairement distinguable du signal généré par une liaison multiple. C'est le cas pour les techniques comme l'AFM, où la mesure de la force en fonction du temps est suffisamment précise pour reconnaître le profil de détachement d'un événement unique (Panorchan et al., 2006). Ainsi, seuls ces événements sont utilisés pour déterminer les propriétés mécaniques de ces liaisons moléculaires.

Un troisième moyen d'estimer la condition de liaison unique repose sur la loi de Poisson. Dans le cas d'un processus discret, comme la mise en contact répétée de deux surfaces (AFM, BFP, pinces optiques ou magnétiques), une fréquence d'interaction de 10% – c'est-à-dire que 10 approches sur 100 ont donné lieu à une interaction entre les surfaces – signifie que la probabilité de détecter une interaction due à une liaison unique est d'environ 90%. Ce critère est couramment utilisé, puisqu'il est facilement mesurable.

Enfin, dans le cas particulier des mesures de paramètres cinétiques, il est aussi possible de déterminer si les événements détectés correspondent à des interactions par liaison unique. En effet, de manière générale, la stabilité de l'interaction entre deux surfaces varie

avec le nombre de liaisons moléculaires impliquées dans cette interaction. Lorsqu'on réduit le nombre de liaisons, en diminuant la densité de molécules sur les surfaces, la stabilité globale de l'interaction mesurée diminue. A partir d'une densité moléculaire suffisamment faible, une seule liaison s'établit entre les deux surfaces, la stabilité de l'interaction reste constante, même lorsqu'on continue de diminuer la densité. En fait, dans ce cas, seule la fréquence d'interaction diminue, car les molécules ont moins de chance de se rencontrer, mais l'interaction par liaison unique reste la même.

Aucun de ces critères n'est une preuve directe de la condition de liaison unique. Il est donc préférable d'utiliser plusieurs de ces critères afin de s'assurer de la validité des mesures.

6- Exemples de techniques et considérations expérimentales

De manière générale, le k_{on} d'une interaction entre molécules fixées sur des surfaces est un paramètre délicat à mesurer, car il est nécessaire de déterminer avec précision la distance favorable à l'interaction, qui est de l'ordre du nm. Toutefois, plusieurs techniques ont tenté de déterminer cette grandeur comme l'AFM (Baumgartner et al., 2000), la chambre à flux laminaire (Pierres et al., 1998) ou une technique basée sur la manipulation de cellules par micropipettes (Chesla et al., 1998). En faisant varier la distance, le temps de « contact » et la concentration, il est alors théoriquement possible de déterminer le k_{on} à partir de la fréquence d'interaction observée entre les surfaces. Notons que dans le cas d'un greffage sur une surface solide, le k_{on} mesuré est équivalent au r_+ mentionné précédemment. En effet, l'étape de diffusion n'est pas prise en compte, on ne considère que les cas où les molécules se trouvent à une distance favorable pour l'interaction. Le k_{on} correspond alors au temps d'ajustement des molécules qui permet aux sites d'interaction de se retrouver positionnés. Par contre, lorsque les molécules d'adhésion sont insérées dans une bicouche lipidique, le k_{on} tient compte de la diffusion et de la concentration de chaque partenaire, ainsi que de l'aire de contact.

Plusieurs approches biophysiques ont pour principe d'appliquer une contrainte mécanique croissante sur une interaction, de mesurer la force à laquelle elle se rompt et d'en déduire les propriétés cinétiques de dissociation. La façon dont est évaluée la force varie selon les techniques. Pour la microscopie à force atomique (AFM), un faisceau laser mesure la déformation d'un levier (cantilever) utilisé comme ressort. Pour la biomembrane force probe (BFP), la force est reliée au déplacement axial d'une bille collée à un ressort très sensible, constitué par un globule rouge sous tension. Enfin pour les pinces optiques (LOT), la force est reliée à l'intensité d'un faisceau lumineux, créé par un laser, nécessaire pour le piégeage

d'une microsphère. La sensibilité de détection de la force dépend pour beaucoup de la raideur du ressort. En AFM, cette raideur peut varier entre 10 et 100 pN/nm, pour la BFP et les pinces optiques les constantes de raideur des ressorts sont beaucoup plus faibles, de l'ordre de 0,1 à 1 pN/nm. Ces différentes approches ont été utilisées pour explorer les profils énergétiques d'une grande variété d'interactions biologiques : biotine-(strept)avidine, sélectines et leurs ligands, l'interaction homophile entre cadhérines, les propriétés de l'ADN double brin, ou la déformation des modules Ig de la titine, etc... (Pour revue : Leckband, 2000). De même la chambre à flux laminaire permet de sonder la cinétique de dissociation et l'influence de la force appliquée sur la stabilité d'une liaison moléculaire. Cette technique est détaillée dans la suite de ce paragraphe.

Le principe consiste à mesurer l'interaction entre des cellules ou des billes micrométriques – dans la suite appelées sphères – recouvertes de récepteurs avec le fond plat de la chambre, lui-même recouvert de ligands. Le flux est maintenu constant par l'utilisation d'un pousse-seringue. Les trajectoires des objets sphériques sont suivies par vidéo-microscopie et enregistrées avant d'être analysées.

a- Principes physiques de la Chambre à Flux Laminaire

Comme l'indique le nom de cette technique, les particules sphériques sont entraînées par un **flux laminaire** (Fig. 19). Un écoulement laminaire sur une surface plane peut être vu comme un système de fines couches qui glissent les unes sur les autres, parallèlement à la paroi. Dans un tel écoulement, la vitesse du fluide est parallèle à la paroi et constante en chaque point. Dans un écoulement turbulent, la vitesse du fluide n'est plus strictement parallèle à la paroi et varie au cours du temps. Le caractère laminaire ou turbulent de l'écoulement peut être évalué par le nombre de Reynolds, R , (1883) : le régime est laminaire pour les faibles valeurs de R . Pour les fortes valeurs de R , l'écoulement est turbulent.

Ainsi, connaissant la géométrie de la chambre, on est capable de prévoir le profil d'écoulement, et notamment la vitesse à proximité de la paroi. Dans une chambre parallélépipédique, la vitesse de l'écoulement est nulle au niveau de la paroi et maximale dans l'axe central, parallèle aux parois. De plus, les paramètres géométriques permettent de déterminer le taux de cisaillement ($G = dv/dz$) à proximité de la paroi :

$$G = 6 Q / l h^2$$

Où Q est le débit du fluide qui s'écoule, l la largeur de la chambre et h sa hauteur. Ainsi, on peut estimer la vitesse du fluide en un point à proximité de la paroi, en fonction de la distance

z entre ce point et la paroi : $v(z) = G z$. De même on peut redéfinir le nombre de Reynolds dans la zone proche de la paroi par :

$$R = G a^2 \rho / \mu$$

Cette technique permet de mesurer l'interaction entre des billes ou des cellules et le fond de la chambre, et en particulier de déterminer le comportement de ces objets à proximité de la surface plane. Depuis les années 60, plusieurs études théoriques ont permis de relier la distance sphère-surface (δ) avec la vitesse de déplacement de la sphère à proximité de la paroi (U), le taux de cisaillement (G) et le rayon de la sphère (a) (Brenner, 1961 ; Goldman et al., 1967, Pierres et al., 2001). Ceci permet d'estimer de manière quantitative la position verticale de la sphère à chaque instant de l'enregistrement. Ainsi, à partir de la mesure de la vitesse, le **temps passé par les sphères à une distance proche de la paroi**, favorable à une interaction moléculaire, peut être déterminé.

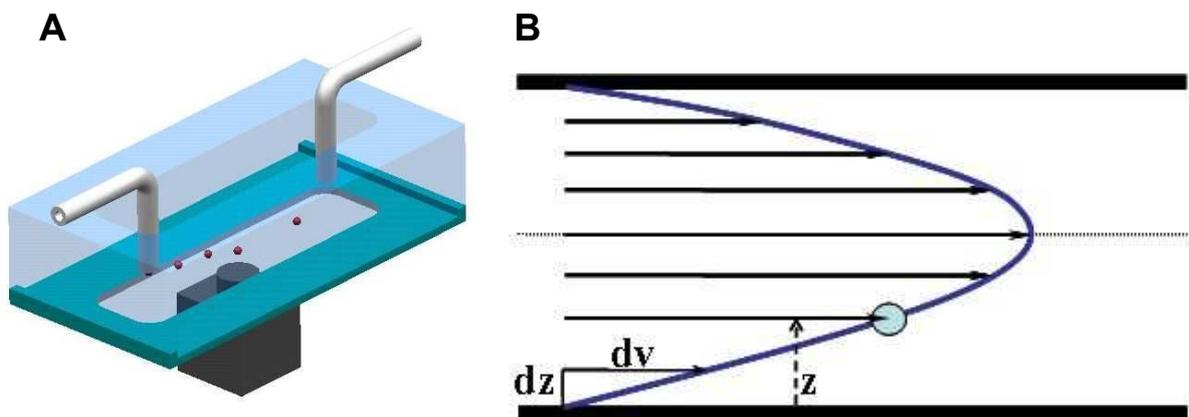


Figure 19 : Présentation de la Chambre à Flux Laminaire. (A) Les billes (sphères rouges) sont entraînées par un flux laminaire dans une cavité. Les billes, dont la surface est fonctionnalisée par la fixation d'une protéine d'intérêt, peuvent interagir avec le fond de la Chambre, lui-même fonctionnalisé. (B) Connaissant les paramètres géométriques de la cavité, on peut déterminer les propriétés de l'écoulement et du déplacement des billes à proximité de la paroi. Le profil de l'écoulement est parabolique. La vitesse du flux est nulle à la paroi, et le taux de cisaillement (dv/dz) peut être considéré comme constant à proximité de la paroi.

En mesurant le nombre d'arrêts rapporté au temps total passé par les sphères fonctionnalisées en mouvement à proximité de la paroi, on obtient la **fréquence d'arrêt**. La valeur mesurée est dépendante des conditions expérimentales qui, lorsqu'elles sont définies, permettent de déterminer la grandeur thermodynamique k_{on} de l'interaction. En effet Bongrand et al., notamment, ont posé les bases théoriques permettant de remonter de la probabilité d'interaction au k_{on} (Pierres et al., 1998, 2001). Malgré certaines difficultés

expérimentales qui doivent être surmontées (cf. paragraphe suivant), cette grandeur thermodynamique a pu être estimée grâce à cette technique pour plusieurs interactions (Pierres et al., 1998, Zhang et Neelamegham, 2002).

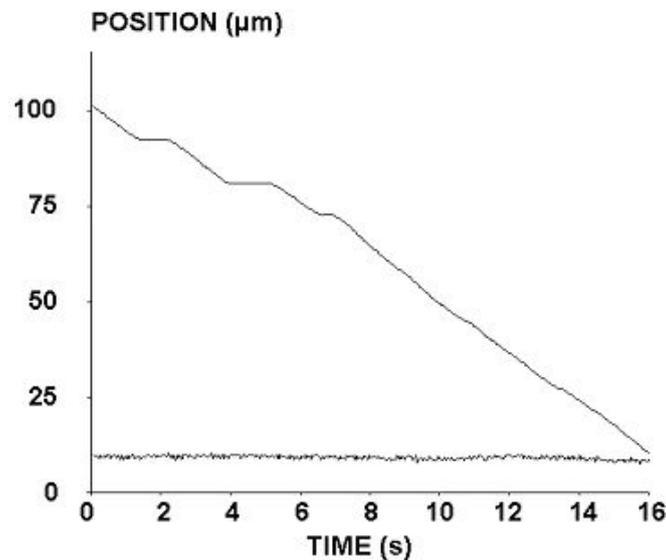


Figure 20 : Courbe de déplacement d'une bille dans une Chambre à Flux Laminaire. La position d'une bille fonctionnalis e est suivie en fonction du temps (courbe du haut). Cette bille marque trois arrêts de 0.78, 1.24 et 0.38 sec. La courbe du bas correspond à l'aire de la bille en fonction du temps et permet de s'assurer qu'aucun arrêt ne soit dû à un artéfact au cours de l'enregistrement. Extrait de Perret et al., 2002

Lorsque la sphère est arr et e, la durée de cette interaction peut être mesurée (Fig. 20). Une fois les conditions de liaison unique atteintes (cf. paragraphe III-5), l'étude statistique de la durée des arrêts permet de déterminer directement la constante **cinétique de détachement** k_{off} de l'interaction. Rappelons qu'expérimentalement, la liaison entre la sphère et la surface plane est soumise à une **contrainte mécanique** due au flux laminaire. Le flux laminaire impose une force d'entraînement hydrodynamique et une torsion sur la sphère. Celles-ci ont été caractérisées,   proximité de la paroi, par Goldman et coll. (1967). Ces forces appliquées sur la sphère se répercutent sur la liaison moléculaire. Dans le cas d'une sphère non déformable par le flux, cette tension mécanique **T** peut être déterminée à partir des propriétés du flux et de la géométrie du système (Pierres et al., 1995). Pour une liaison de longueur **L**, très inférieure au rayon **a** de la sphère, on obtient :

$$T \sim 14.3 G \mu a^{5/2} L^{-1/2}$$

Où **G** est le taux de cisaillement et **μ** la viscosité. Ainsi il est possible de modifier la force appliquée sur la liaison en modifiant le taux de cisaillement et de déterminer la variation de la stabilité de la liaison moléculaire (k_{off}) en fonction de la force appliquée.

b- Limites de la technique et solutions

La mesure de la vitesse des sphères permet donc de déterminer si la sphère est arrêtée ou en mouvement, mais aussi d'estimer la distance de cette sphère à la paroi. Cette vitesse doit être mesurée à chaque instant afin d'en déduire les constantes cinétiques de l'interaction. Or, plusieurs facteurs limitent la précision de cette mesure. Il y a la limite de résolution de l'appareillage d'acquisition, mais aussi le mouvement brownien qui s'ajoute au déplacement dû à l'entraînement hydrodynamique de la sphère par le flux. Cette diffusion brownienne se traduit par un déplacement aléatoire. Le déplacement Δx mesuré sur un intervalle de temps Δt vaut donc :

$$\Delta x = u_h(\delta) \Delta t + R$$

Où u_h est la vitesse hydrodynamique, qui dépend de δ , la distance entre la paroi et la sphère. R est le déplacement aléatoire, parallèle à la paroi, dû au mouvement brownien. La distribution de R est une gaussienne (Pierres et al., 2001) :

$$W(R) = (1 / 4\pi D_x \Delta t)^{1/2} \exp(-R^2 / 4D_x \Delta t)$$

Des études théoriques, appuyées par plusieurs études expérimentales, ont mis en avant la dépendance du coefficient de diffusion à la distance à proximité de la paroi (Goldman et al., 1967 ; Pierres et al., 2001). Ce mouvement brownien conduit à une incertitude sur la mesure de la vitesse instantanée. De même, le déplacement d'une bille en interaction avec le fond de la chambre n'est pas strictement nul, du fait de la diffusion de la sphère autour de la liaison moléculaire. Ainsi, bien que certains éléments théoriques nous permettent de prédire le comportement de la sphère à proximité de la paroi, la distinction expérimentale entre une sphère en mouvement et une **sphère arrêtée** n'est pas triviale. On choisit donc de définir que la sphère est arrêtée si son déplacement Δx , pendant un temps Δt est inférieur à une valeur **seuil** (qu'on nommera ξ). Une optimisation du choix du seuil ξ et du temps d'observation Δt est décrite dans l'article I (Résultats). Le choix de ce temps d'observation et de ce seuil sont critiques pour la détection des arrêts, notamment des arrêts courts. En effet, on peut estimer que la durée minimale des arrêts détectables est environ de $\tau - \xi / \langle v \rangle$, où $\langle v \rangle$ est la vitesse moyenne avant arrêt. La sensibilité de détection des arrêts est donc limitée par la valeur de Δt , qui devra être choisie comme la plus petite valeur permettant de distinguer les deux distributions de sphères arrêtées ou libres. Typiquement, pour une vitesse moyenne avant arrêt

de 6 $\mu\text{m/s}$ et pour un seuil ξ de 0.3 μm , la valeur de τ choisie sera 0.12 s (voir Résultats, Article I). On peut alors estimer la durée minimale détectable à 0.08 s, environ.

Une autre conséquence du mouvement brownien est la variation de la vitesse apparente avant arrêt qui conduit à une *incertitude sur la distance entre la sphère et la paroi* au moment de la formation de la liaison. Or, cette information est nécessaire à la détermination du k_{on} . A l'heure actuelle, le k_{on} a été estimé en chambre à flux laminaire pour quelques interactions et seulement en ayant recours à un certain nombre d'approximations (Pierres et al., 1998, Zhang et Neelamegham, 2002). Toutefois, il est possible de déterminer la **fréquence d'arrêts**, permettant de comparer différentes interactions observées dans des conditions identiques, sans pour autant avoir recours à ces simulations. Pour cela, il suffit de se fixer une valeur *seuil* de la distance en dessous de laquelle la sphère sera considérée comme à proximité de la surface plane. D'un point de vue expérimental, on mesure à chaque instant une vitesse de déplacement de la bille qui est rapportée au taux de cisaillement G , afin d'estimer de manière approchée la distance entre la bille et le fond de la chambre. Ainsi, la fréquence d'arrêts est déterminée en divisant le nombre total d'arrêts par le temps passé par les sphères se déplaçant à proximité de la paroi. La fréquence d'arrêt n'a pas de sens thermodynamique en soi, mais permet une étude quantitative de la vitesse de formation de l'interaction et ainsi la comparaison de diverses interactions moléculaires.

La chambre à flux laminaire est une technique de détection d'interaction moléculaire très sensible. En effet, il est possible de sonder des liaisons moléculaires uniques soumises à des contraintes mécaniques très faibles (< 1 pN). Toutefois, cette capacité n'est pas sans certains désavantages comme le fait d'être sensible à des interactions non spécifiques. Dans certains cas, il est possible que l'interaction non spécifique entre la sphère et le fond de la chambre soit suffisamment importante pour imposer un arrêt à la sphère. Il faut donc pouvoir contrôler la **spécificité de l'interaction mesurée**, et éventuellement se prémunir d'interactions non spécifiques qui vont perturber l'ensemble des mesures. Généralement, les arrêts non spécifiques sont dus à aux interactions électrostatiques à longue distance entre les surfaces elles-mêmes ou entre une des deux surfaces et la molécule présente sur la surface opposée. Dans ce cas, plusieurs techniques d'écrantage sont possibles. Tout d'abord, l'utilisation d'un tampon ayant une force ionique compatible avec l'étude de systèmes biologiques peut réduire l'intensité de telles interactions. Ensuite, l'utilisation de macromolécules en solution, comme la BSA, peut être nécessaire pour obtenir un écrantage suffisant. Enfin, un traitement de surface particulier peut également être nécessaire. Heureusement, la technique permet une grande souplesse pour adapter le mode opératoire à

l'étude qui est menée, notamment le choix du fluide et de la nature chimique des surfaces utilisées. De telles mises au point ont été nécessaires pour mener à bien l'étude présentée dans ce mémoire (voir Résultats, partie III).

On peut noter que le comportement des sphères lisses et rigides, comme les billes, peut facilement être prédit grâce au formalisme théorique décrit ci-dessus. Toutefois, l'utilisation des cellules pour mesurer les paramètres cinétiques d'interaction à l'échelle de la liaison unique est plus délicate. Bien que sphériques en première approximation, celles-ci ont une surface rugueuse et peuvent être déformées par le flux. De plus, les molécules d'adhésion peuvent diffuser à la surface cellulaire. Cette technique a permis de mesurer l'incidence de cette diffusion sur les propriétés cinétiques d'interaction d'une cellule entraînée dans un écoulement laminaire (Dwir et al., 2003).

c- Exemple de propriétés d'adhésion mises en évidence par la Chambre à Flux Laminaire

Cette méthode de chambre à flux laminaire est généralement utilisée pour mimer les conditions d'adhésion dynamique, comme la formation d'un contact adhésif. Toutefois, dans le cadre d'interaction à l'échelle de la liaison unique, cette méthode est tout à fait adaptée pour sonder les propriétés cinétiques de n'importe quelle interaction moléculaire, comme l'interaction streptavidin-biotin (Pierres et al., 2002). Ainsi, de nombreuses informations sur l'adhésion des leucocytes ont pu être obtenues par cette technique.

L'adressage des leucocytes durant une réaction inflammatoire est réalisé grâce à l'interaction des sélectines avec leurs ligands exprimés à la surface des cellules endothéliales. Cette première étape permet d'**accrocher** transitoirement les leucocytes, initialement entraînés par le flux sanguin, et de faire **rouler** ces cellules (mécanisme appelé « rolling ») sur la paroi des vaisseaux. Cette interaction sélectine-ligand permet d'activer le recrutement d'intégrines qui vont faciliter **l'arrêt du leucocyte** au niveau de la paroi et la **transmigration** à travers cette paroi vers la zone d'inflammation. Les propriétés mécaniques des interactions sélectine-ligand et intégrine-ligand sont donc à la base de la fonction cellulaire. La chambre à flux laminaire a permis de sonder les propriétés moléculaires de ces interactions, aussi bien par l'utilisation de surfaces modèles que directement entre des leucocytes entraînés par un flux, à proximité d'une monocouche de cellules endothéliales. (Simon et Green, 2005 ; Fig. 21).

Ainsi, dès les années 1990, la stabilité de diverses interactions sélectine-ligand a pu être évaluée. Par exemple, l'interaction entre le ligand PSGL-1 exprimé par les neutrophiles et le récepteur P-sélectine fixé sur une bicouche lipidique présente un k_{off} à force nulle de l'ordre de 1 s^{-1} . Simultanément, il a été montré que le k_{off} de cette interaction variait peu avec la force appliquée (Alon et al., 1995). Par la suite, les deux autres récepteurs, E- et L-sélectine, ont été sondés de la même manière, ainsi que divers ligands, mettant en évidence les propriétés spécifiques de ces différents couples récepteur-ligand.

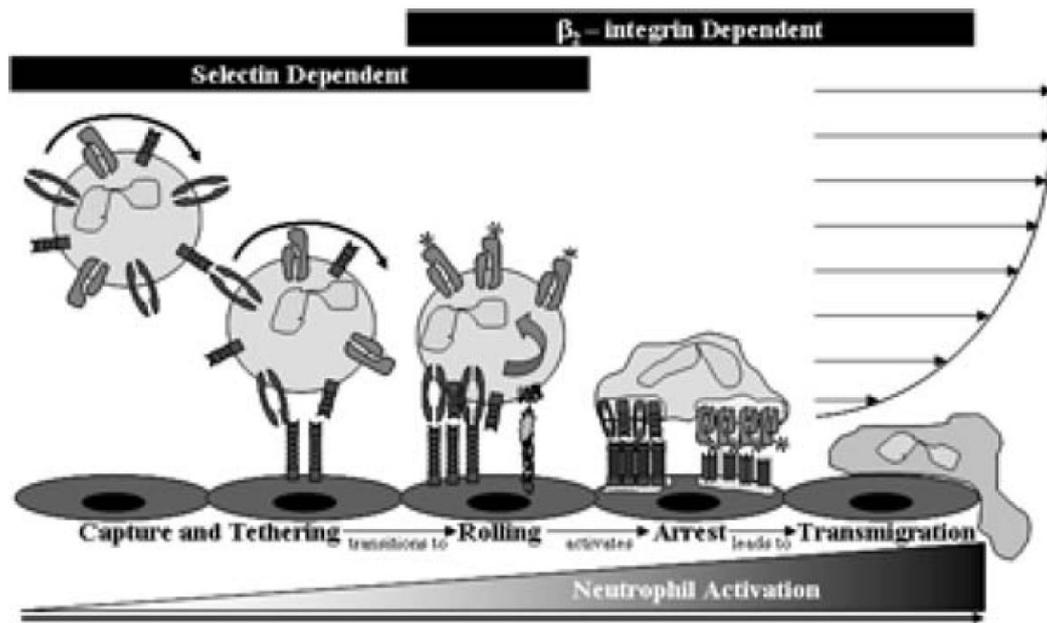


Figure 21 : Schéma des différentes étapes permettant au leucocyte d'atteindre une zone d'inflammation. La capture du leucocyte par les cellules endothéliales, ainsi que le recrutement d'autres leucocytes sont réalisés par l'interaction de sélectines avec leur ligands. Les propriétés d'interaction des sélectines conduisent au « rolling » de ces leucocytes sur les cellules endothéliales et à l'activation des intégrines β_2 (LFA-1 et Mac-1). Ces intégrines, en interagissant avec le récepteur ICAM-1 vont à leur tour permettre d'arrêter les leucocytes et d'induire la migration transendothéliale. Extrait de Simon et Green, 2005.

Très rapidement, il a été montré que la stabilité de l'interaction dépendait de la contrainte de cisaillement générée par le flux, selon un processus subtil. Le groupe de Springer (Finger et al., 1996) a remarqué qu'une valeur minimale de la contrainte de cisaillement était nécessaire pour induire le rolling des leucocytes sur la couche de cellules endothéliales. De nombreuses études, notamment par chambre à flux laminaire, ont permis de relier les propriétés des interactions réalisées par les sélectines avec ce comportement cellulaire. En effet, cette technique permet à la fois de sonder les propriétés mécaniques de l'interaction moléculaire, et d'observer le comportement général de la cellule, ou de la bille servant de surface modèle. Parmi les hypothèses testées, ces études ont permis d'observer

pour la première fois le phénomène de catch bond, qui n'avait été jusque là décrit que théoriquement (Dembo et al., 1988). Le groupe de Zhu (Marshall et al., 2003) a observé qu'une augmentation de la tension sur la liaison P-sélectine – PSGL-1 pouvait conduire à une augmentation de la stabilité, alors que celle-ci généralement diminue comme exposé au paragraphe IV-4 (Bell, 1978). Le même groupe a démontré que ce processus moléculaire de catch bond est la cause directe du rolling induit par le flux.

L'adhésion des leucocytes par l'action des sélectines permet d'activer l'expression des intégrines, en particulier de LFA-1. Les propriétés mécaniques d'interaction des intégrines impliquées dans l'adhésion des leucocytes ont également été sondées par la méthode de chambre à flux laminaire. LFA-1 présente plusieurs états d'interaction : dans l'état non activé, le k_{off} des liaisons réalisées par LFA-1 sont de l'ordre de 5 s^{-1} , c'est à dire du même ordre que les interactions sélectine-ligand ($\sim 1 \text{ s}^{-1}$). Cette donnée suggère que LFA-1, lorsqu'il n'est pas activé, peut participer au ralentissement du rolling des leucocytes. Par contre, une fois activé, LFA-1 présente un k_{off} de l'ordre de 0.03 s^{-1} (Salas et al., 2002). Une autre intégrine, Mac-1, réalise des liaisons ayant une durée de vie de l'ordre de plusieurs minutes. Ces données cinétiques d'interaction moléculaire, ainsi que des observations de capture, rolling, et adhésion de leucocytes ont été réalisées grâce à la méthode de chambre à flux laminaire dans des conditions similaires au contexte biologique, en particulier de force appliquée sur la liaison. Complétées par d'autres études biophysiques et biochimiques, ces résultats ont permis de proposer un mécanisme très complet sur l'action des molécules d'adhésion dans l'adressage de leucocytes vers les zones d'inflammation.

V- Propriétés de l'adhésion réalisée par les cadhérines

1- Spécificité d'interaction des cadhérines

Avant même la découverte des premières protéines d'adhésion, Townes et Holtfreter (1955) avaient montré que les cellules d'embryon d'amphibien totalement dissociées et mélangées étaient capables de se regrouper de façon sélective pour reformer des tissus. Ces mécanismes **d'association préférentielle** et de **ségrégation cellulaire** sont régulés en partie par les cadhérines. Cette spécificité d'adhésion observée à l'échelle cellulaire serait due à la nature homophile des interactions entre cadhérines, c'est-à-dire réalisées entre deux molécules identiques. Le caractère homophile de ces interactions est conforté par l'observation des réarrangements cellulaires au cours du développement qui sont souvent associés à un changement d'expression des cadhérines. Les cellules endothéliales sont un exemple de la pertinence de l'interaction homophile des cadhérines *in vivo*. En effet, ces cellules expriment deux cadhérines différentes, la VE-cadhérine et la N-cadhérine. La VE-cadhérine est concentrée au niveau des contacts entre cellules endothéliales et participe à des interactions homotypiques entre ces cellules. La N-cadhérine est localisée le long de la membrane plasmique et réalise des interactions hétérotypiques par ancrage des cellules endothéliales aux autres types cellulaires tels que les cellules musculaires lisses ou les pericytes exprimant la N-cadhérine (Navarro et al., 1998).

Néanmoins, des exemples de plus en plus nombreux d'**interactions hétérophiles** entre cadhérines sont apparus dans la littérature. Ainsi Shan et coll. ont montré par des expériences d'agrégation cellulaire et d'immunoprécipitation, que la N-cadhérine et la R-cadhérine, qui par ailleurs présentent de fortes homologues de séquence, pouvaient former *in vitro* des interactions hétérophiles (Shan et al., 2000). Parallèlement, aucune interaction n'a été mise en évidence entre ces deux cadhérines et la E-cadhérine. Pourtant Volk et coll. (1987) avaient montré qu'en co-culture, des cellules exprimant la A-CAM (N-cadhérine de poulet) forment des jonctions hétérotypiques avec des cellules exprimant la L-CAM (E-cadhérine de poulet). De même, Nose et coll. (1988) ont montré que la E-cadhérine et la P-cadhérine n'interagissaient pas, alors que très récemment Steinberg et coll. ont montré qu'une interaction hétérophile entre ces cadhérines est possible (Duguay et al., 2003 ; Foty et Steinberg, 2005). Leurs études suggèrent que les propriétés d'interaction homophile de différentes cadhérines ne sont pas fondamentalement distinctes, du moins pas suffisamment

pour expliquer la spécificité d'interaction observée *in vivo*. Ainsi, la ségrégation cellulaire serait essentiellement due au niveau d'expression et non à la nature de la cadhérine exprimée. Toutefois, comme le montre l'incidence de la N-cadhérine sur la motilité des cellules de cancers mammaires, le devenir cellulaire peut dépendre de la nature de la cadhérine exprimée plutôt que du niveau d'expression (Nieman et al., 1999; Hazan et al., 2000). De même, la différenciation semble elle aussi dépendre de la nature de la ou des cadhérines exprimées (Larue et al., 1996).

D'autres auteurs suggèrent que la ségrégation cellulaire impliquant les cadhérines serait due à la différence entre l'énergie d'interaction homophile et hétérophile (Chen et al., 2005). De faibles différences d'énergie d'interaction entre molécules de cadhérines classiques de type I (à l'échelle de la liaison unique) suffiraient à induire une différence importante à l'échelle cellulaire, favorable à l'adhésion homophile. Cette différence d'énergie seraient plus importante pour les cadhérines classiques de type II. En effet, malgré un mécanisme d'interaction similaire (voir paragraphe suivant), les variations de séquences sont plus nombreuses entre ces cadhérines, limitant leur ajustement au niveau de l'interface d'interaction. Plus importante encore est cette différence entre une cadhérine de type I et une de type II, ce qui expliquerait qu'aucune interaction hétérophile entre deux cadhérines de chaque sous-type n'ait pu être observée jusqu'ici (Patel et al., 2006, voir Fig. 26E). Enfin, il a été proposé que la cinétique d'interaction soit une cause possible de sélectivité, conduisant à une spécificité d'interaction (Perret et al., 2002). En fait, plusieurs paramètres peuvent expliquer la variété des résultats obtenus à l'échelle cellulaire. En effet, les propriétés d'adhésion sont très sensibles à la nature des molécules d'adhésion exprimées en surface, mais aussi au niveau d'expression de ces protéines, à la maturation des plaques d'adhésion et aux contraintes imposées aux cellules, notamment.

D'autres cas d'hétérophilie d'un type différent ont également été rapportés. La E-cadhérine à la surface des cellules épithéliales des muqueuses peut interagir avec l'intégrine $\alpha_E\beta_7$ exprimée par les lymphocytes T intra-épithéliaux. Cette interaction pourrait jouer un rôle important dans la surveillance immunologique des épithéliums muqueux (Cepek et al., 1994). Par ailleurs, l'entrée de la bactérie *Listeria monocytogenes* dans les cellules épithéliales peut se faire par l'intermédiaire d'une protéine bactérienne nommée Internaline A, dont le récepteur à la surface de la cellule hôte est la E-cadhérine. Cette bactérie pathogène est responsable d'intoxication alimentaire pouvant conduire à une méningite (Mengaud et al., 1996). La capacité d'une même cadhérine à réaliser des interactions à la fois homophiles et hétérophiles *in vivo* pourrait représenter un intérêt physiologique important. En effet, ceci

aurait pour conséquence de potentialiser les ressources adhésives de la cellule. Toutefois, les résultats contradictoires obtenus *in vitro* ou *in vivo* mettent en évidence le fait que de nombreux points restent obscurs concernant la compréhension du mécanisme d'interaction des cadhérines.

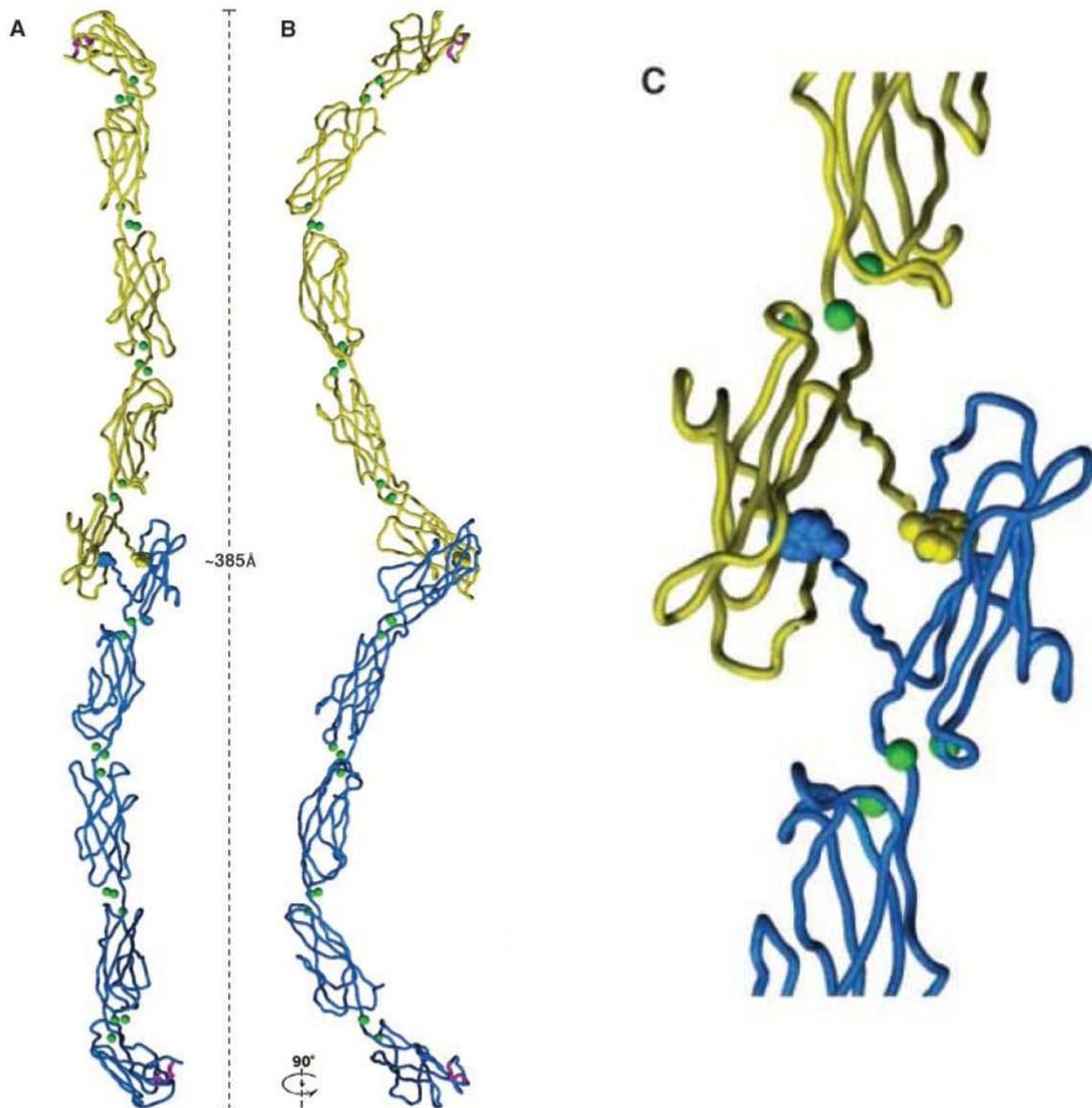


Figure 22: Structure cristallographique du fragment extracellulaire de la C-cadhérine. (A-B) Interaction entre deux chaînes polypeptidiques de la partie extracellulaire de la C-cadhérine, au niveau du motif EC1. (C) Grossissement de la zone d'interaction. Le complexe dimérique est obtenu par échange du brin N-terminal et notamment par ancrage du Tryptophane en position 2 (Trp2) qui s'ancrage dans une poche hydrophobe présente sur la molécule opposée. Ce Trp2 est représenté en CPK. Trois ions calcium (vert) se fixent entre chaque paire de motifs EC successifs. Extrait de Boggon et al., 2002.

2- Structure moléculaire du segment extracellulaire

Plusieurs études par RMN ou cristallographie par rayons X (notée RX) ont été réalisées sur des fragments du domaine extracellulaire de cadhérines classiques de type I ou de type II. Ces travaux ont mis en évidence plusieurs éléments structuraux conservés. Tout d'abord, chaque motif est constitué de 7 brins β , avec un arrangement structural en clé grecque. Les dimensions de chaque motif EC sont d'environ : 45Å x 25Å x 25Å. De plus, trois ions Ca^{2+} sont liés entre chaque paire de motifs EC successifs. Les acides aminés qui chélatent les ions Ca^{2+} sont conservés entre les différentes cadhérines étudiées. Enfin, les motifs s'alignent pour former un bâtonnet courbé (Fig. 22a-b), permettant d'exposer l'extrémité N-terminale, constituée du motif EC1, loin de la membrane.

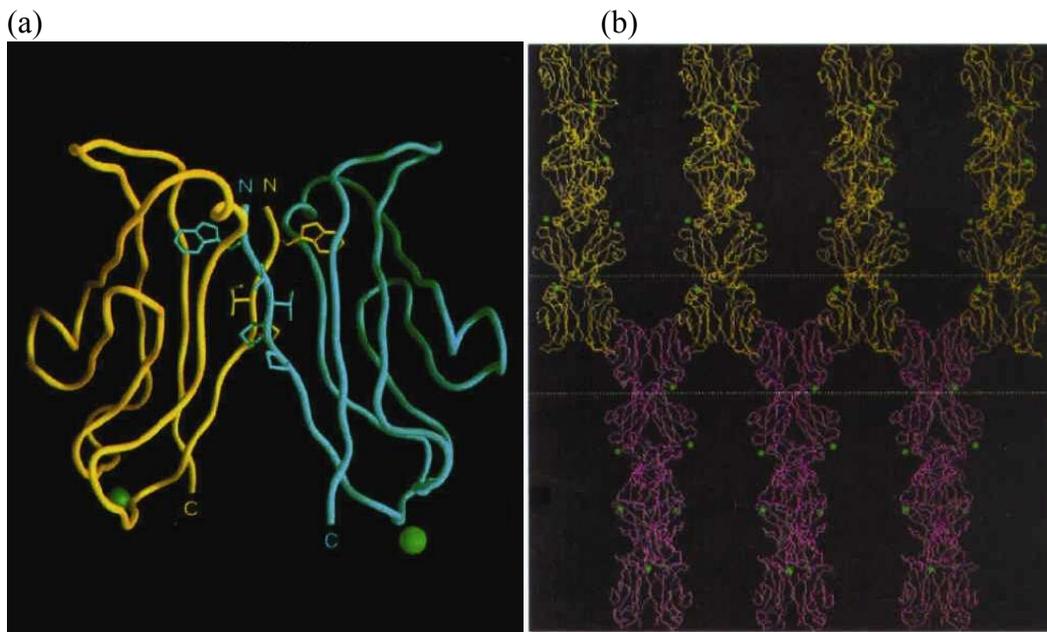
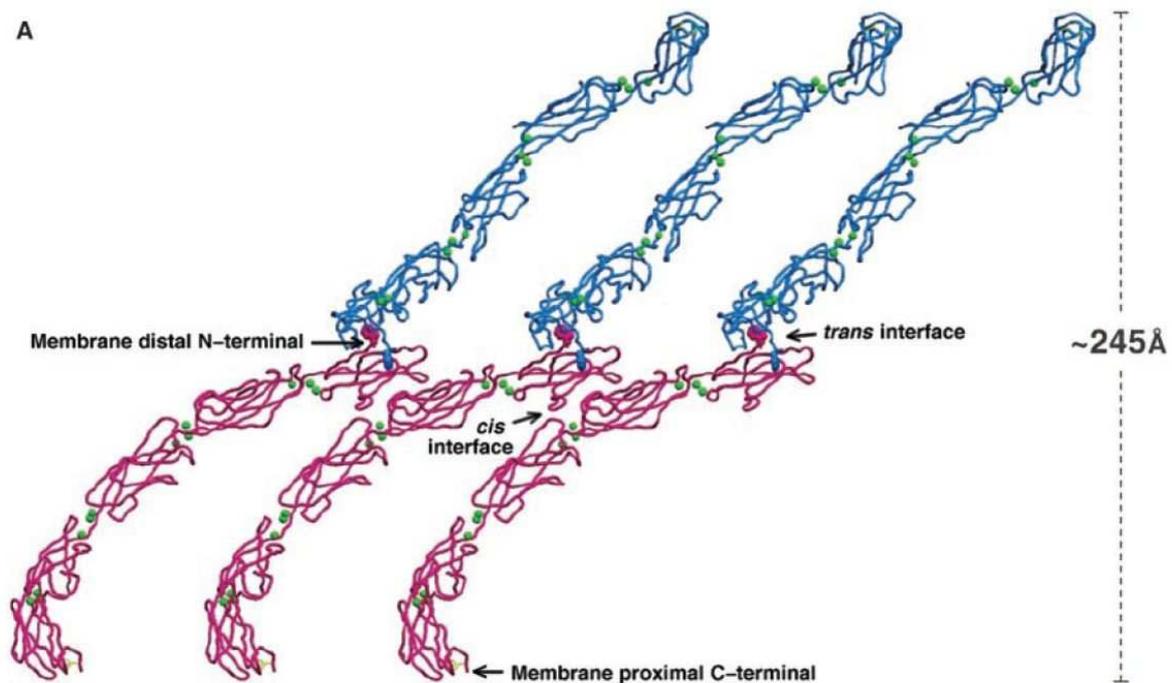


Figure 23: Structure cristallographique du motif EC1 de la N-cadhérine et modèle d'interaction en "zipper". (a) La première image cristallographique d'un motif EC de cadhérine a permis de mettre en évidence le mode de dimérisation par échange du brin N-terminal. La chaîne latérale des résidus 2 à 5, qui interviennent dans la zone de contact, sont montrés. Toutefois, les auteurs ont interprété cette interaction comme la base d'un dimère parallèle. (b) Suite à ces images, les auteurs ont proposé un modèle d'interaction adhésif où deux dimères, présents sur deux cellules opposées, interagissent pour former le complexe adhésif. La reconstruction théorique de la partie extracellulaire entière repose sur l'orientation successive des motifs EC permettant de compléter la cage de solvation de l'unique ion Ca^{2+} observé à l'époque. Extrait de Shapiro et al., 1995.

Toutefois, plusieurs différences significatives ont été observées entre ces structures, notamment au niveau des zones de contacts cadhérine-cadhérine, potentiellement responsables de l'interaction adhésive *in vivo*. Les premières images cristallographiques des cadhérines, réalisées à partir du fragment constitué du motif EC1 de la N-cadhérine, ont mis en évidence des appariements parallèles et antiparallèles de ces fragments (Fig. 23a). Ces observations ont suggéré aux auteurs le premier modèle d'interaction des cadhérines, encore appelé modèle en « fermeture éclair » dans lequel, des monomères de cadhérines à la surface d'une cellule s'organisent d'abord en dimères parallèles, ou dimères *cis*. Ce dimère implique un échange réciproque de brins β correspondants à l'extrémité N-terminale des domaines EC1. Ensuite, deux dimères à la surface de deux cellules voisines s'associent en *trans* au niveau du domaine EC1 (Fig. 23b) pour réaliser l'interaction adhésive.



*Figure 24 : Organisation des monomères de C-cadhérine. Cet arrangement de segments extracellulaires de la C-cadhérine observé dans le cristal fournit un modèle d'organisation à la surface cellulaire. En effet, la distance mesurée entre les deux extrémités C-terminales correspond à la distance moyenne inter-membrane au niveau des jonctions adhésives. Ces ectodomains de cadhérines réalisent à la fois une interaction *cis* et *trans*. Les molécules roses, respectivement bleues, correspondent à la même surface cellulaire. La chaîne latérale des Trp2 est dessinée en CPK et les ions Ca^{2+} en vert. Extrait de Boggon et al., 2002.*

Par la suite, la résolution de structures de fragments constitués des motifs EC1 et EC2 de la E- et de la N-cadhérine a partiellement modifié le modèle proposé par Shapiro.

L'échange de brins β n'est plus observé. Une zone de contact pour l'interaction parallèle se situerait autour de la zone charnière entre les deux domaines, au niveau des sites de liaison du calcium, selon Pertz et coll. (1999). Celle-ci est retrouvée par le même groupe grâce à une étude RMN (Haussinger et al., 2002). Les autres surfaces de contacts observées dans les différents cristaux ne semblent pas pertinentes pour rendre compte de l'activité biologique. De plus, l'interface antiparallèle, déterminée lors des premiers travaux, considérée comme potentiellement impliquée dans l'interaction adhésive, n'a jamais été observée dans ces structures.

Enfin, une étude cristallographique portant sur l'ensemble du domaine extracellulaire EC15 de la C-cadhérine a totalement remis en question l'interprétation du mode d'interaction entre cadhérines, au niveau du domaine EC1. L'interface adhésive (Fig. 22c) correspond à l'échange réciproque de brins β à l'extrémité N-terminale des domaines EC1. Cette interface, déjà observée entre motifs EC1 de la N-cadhérine par les mêmes auteurs, avait été attribuée à une interaction entre molécules parallèles. En effet, bien que les fragments EC15 en interaction dans ces cristaux soient globalement orientés de manière antiparallèle, les motifs EC1 sont localement parallèles entre eux, ce qui explique la confusion issue des premières observations. Cette configuration structurale de la surface d'interaction au niveau du motif EC1 a été confirmée par une étude du fragment EC12 de la E-cadhérine, par RMN et RX (Haussinger et al., 2004). Les trois dernières études (Boggon et al., 2002 ; Haussinger et al., 2004 ; Patel et al., 2006) ont remis en question la nécessité d'une association préalable en dimères parallèles pour que l'interaction adhésive puisse se produire, confirmant des observations faites par l'utilisation de la chambre à flux laminaire (Perret et al., 2002). L'organisation moléculaire de C/EC15 ne révèle pas de dimère parallèle, mais fait apparaître un empilement de monomères présentant une courbure prononcée et une torsion des différents modules les uns par rapport aux autres. Dans ces cristaux, chaque module EC1 est en contact en cis avec les modules EC2 et EC3 de la molécule voisine (Fig. 24). Une étude tomographique des desmosomes montre une organisation moléculaire compatible avec une interaction adhésive localisée sur le motif EC1 et confirme qu'un pré-assemblage en dimères parallèles des cadhérines desmosomales à la surface cellulaire n'est pas indispensable à l'interaction adhésive (Fig. 25 ; He et al., 2003). Enfin, une étude très récente a permis de déterminer la structure de fragments de trois cadhérines de type II (Patel et al., 2006). Ces protéines s'associent également selon le processus d'échange de brin β , mais présentent une interface adhésive plus grande que les cadhérines classiques de type I (Fig. 26). Ainsi,

l'ensemble des données les plus récentes indiquent que le mode d'interaction entre molécules de cadhérines classiques et desmosomales est réalisé par échange du brin β N-terminal.

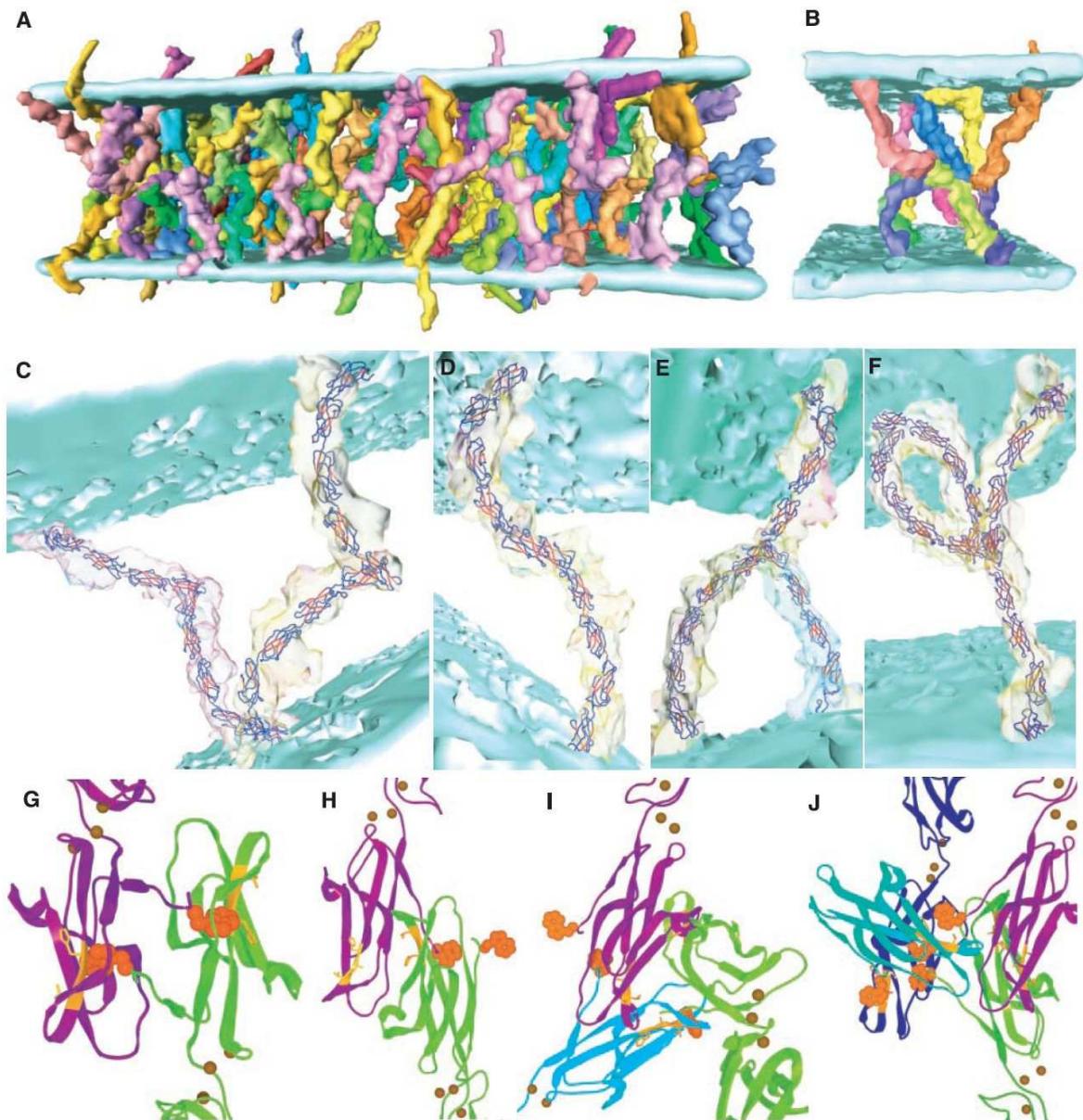


Figure 25 : Exemples d'arrangement moléculaires entre cadhérines desmosomales. (A-B) La tomographie d'un desmosome a permis aux auteurs d'observer la structure à faible résolution des segments extracellulaires des cadhérines desmosomales présentes dans cette jonction cellulaire. (C-F) Les auteurs ont ensuite estimé l'orientation relatives de ces segments en ajustant la structure du segment extracellulaire de la C-cadhérine – obtenue par cristallographie aux rayons X; Boggon et al., 2002. (G-J) Les auteurs en ont déduit différentes conformations d'interaction adhésive entre les cadhérines desmosomales. Extrait de He et al., 2003.

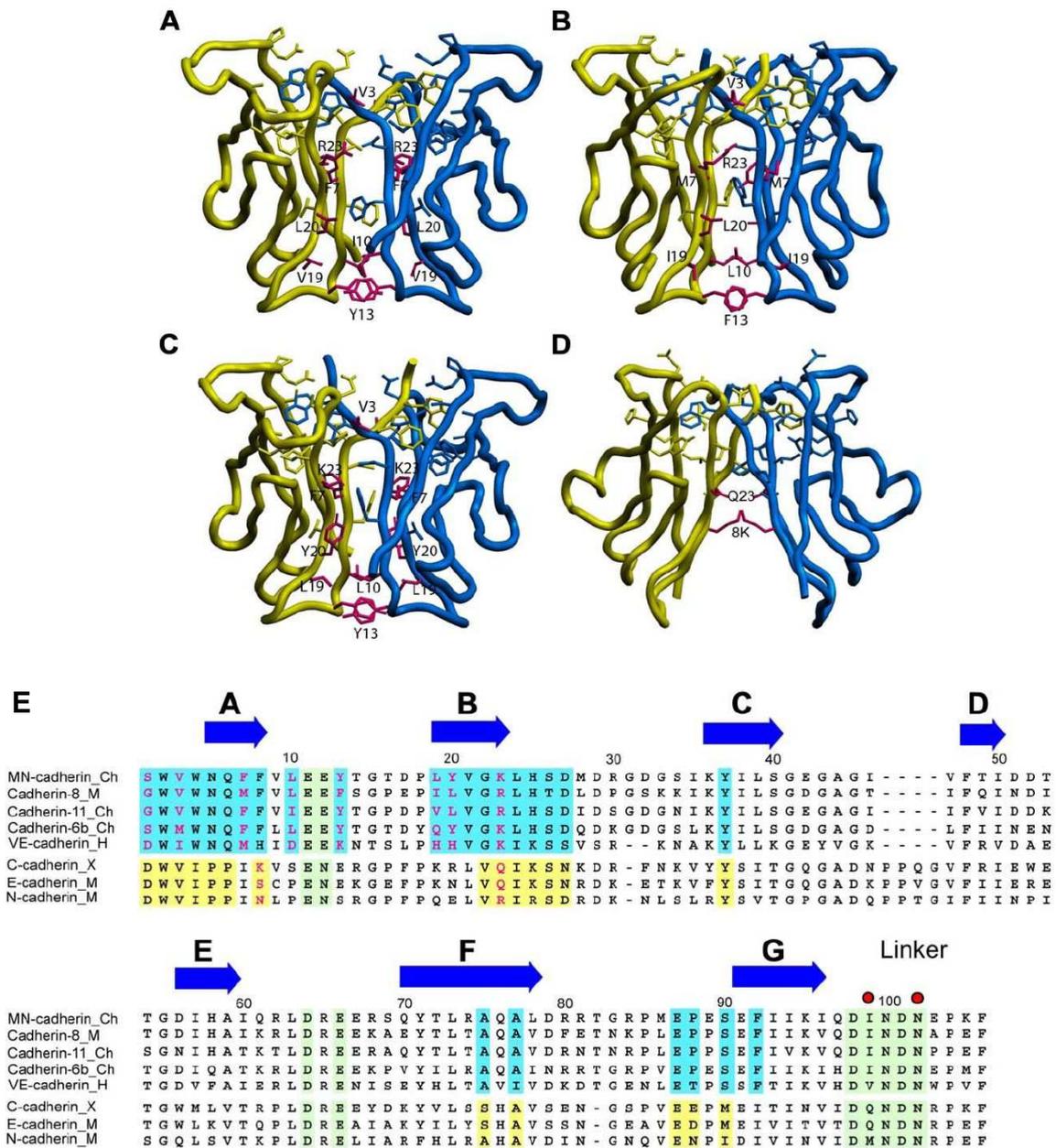


Figure 26 : Comparaison de interfaces adhésives des cadhérines de type I et de type II. La structure cristallographique du motif EC1 de la cadhérine-11 (A), de la cadhérine-8 (B) et de la MN-cadhérine (C), toutes de type II, a été comparée à celle de la C-cadhérine (D) qui est de type I. Les résidus impliqués dans l'interface adhésive des trois cadhérines de type II sont indiqués sur les figures en bleu ou jaune. Par contre, ceux qui diffèrent entre les trois molécules, potentiellement source de spécificité, sont indiqués en magenta. (E) Alignements de séquences pour plusieurs cadhérines de type II (MN-cadhérine, cadhérine-8, cadhérine-11, cadhérine-6b, VE-cadhérine) et de type I (C-, E-, N-cadhérines). Les résidus impliqués dans l'interface adhésive sont surlignés en bleu pour les cadhérines de type II et en jaune pour les cadhérines de type I. Les résidus conservés de l'interface adhésive sont écrit en noir, ceux potentiellement impliqués dans la spécificité le sont en magenta. Les acides aminés impliqués dans la fixation du calcium sont surlignés en vert. La structure secondaire indiquée par les flèches bleue correspond à la MN-cadhérine. Extrait de Patel et al., 2006.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la diversité des images structurales obtenues (Tableau 1). Premièrement, cette diversité de formes d'interactions serait due à la nature de l'extrémité N-terminale sur les fragments étudiés. Une autre raison avancée, qui est de plus en plus admise, serait que les images structurales obtenues correspondent à différents états possibles des cadhérines. Ces points seront détaillés au paragraphe suivant.

Publication (Méthode)	Molécule	Fragment	extrémité Nter	dimère parallèle	surface adhésive	Position Trp2
Shapiro et al., 1995 (RX)	N-cadhérine	EC1	<i>GS-DW</i> VIPPI...	échange du brin beta A	sommet de EC1	intermoléculaire
Overduin et al., 1995 (RMN)	E-cadhérine	EC1	<i>MR-DW</i> VIPPI...	NA	NA	intramoléculaire
Nagar et al., 1996 (RX)	E-cadhérine	EC12	<i>MR-DW</i> VIPPI...	interdomaine EC1-EC2	NA	ND
Tamura et al., 1998 (RX)	N-cadhérine	EC12	<i>DW</i> VIPPI...	NA	sommet de EC1 (*)	ND
Pertz et al., 1999 (RX)	E-cadhérine	EC12	<i>M-DW</i> VIPPI...	interdomaine EC1-EC2	NA	intramoléculaire
Haussinger et al., 2002 (RMN)	E-cadhérine	EC12	<i>M-DW</i> VIPPI...	interdomaine EC1-EC2	NA	ND
Boggon et al., 2002 (RX)	C-cadhérine	EC15	<i>DW</i> VIPPI...	EC1 sur EC2-EC3	échange du brin beta A	intermoléculaire
Haussinger et al., 2004 (RMN et RX)	E-cadhérine	EC12	<i>DW</i> VIPPI...	NA	échange du brin beta A	intermoléculaire
Patel et al., 2006 (RX)	<i>MN-cadhérine</i>	EC1	<i>S-G-WV</i> WNQ...	NA	échange du brin beta A	intermoléculaire
Patel et al., 2006 (RX)	<i>cadhérine-8</i>	EC1	<i>S--WV</i> WNQ...	NA	échange du brin beta A	intermoléculaire
Patel et al., 2006 (RX)	<i>cadhérine-11</i>	EC1	<i>S-GWV</i> WNQ...	NA	échange du brin beta A	intermoléculaire
Patel et al., 2006 (RX)	<i>cadhérine-8</i>	EC13	<i>S--WV</i> WNQ...	NA	échange du brin beta A	intermoléculaire
Patel et al., 2006 (RX)	<i>cadhérine-11</i>	EC12	<i>S-GWV</i> WNQ...	NA	échange du brin beta A	intermoléculaire

Tableau 1 : Bilan des études structurales de fragments de cadhérines classiques. Différentes interfaces de contact ont été observées par ces études structurales. L'échange du brin A, correspondant à l'extrémité N-terminale, a initialement été interprétée comme participant à la formation du dimère parallèle. Les dernières études montrent que ce mécanisme intervient dans la formation de dimère adhésif, c'est à dire entre deux molécules potentiellement ancrées sur deux cellules adjacentes. De plus, ces études ont montré différents dockings du tryptophane en position 2, intra- ou intermoléculaire. Cette observation semblerait correspondre à deux états de la molécule : monomérique ou dimérique, respectivement. Plusieurs auteurs suggèrent que la diversité des images structurales obtenues serait liée à la nature des acides aminés présents à l'extrémité N-terminale. Plus précisément des acides aminés supplémentaires, par rapport à la séquence biologiquement active (notés en italique) serait défavorable à la formation du dimère adhésif. Or, cette hypothèse n'est pas vérifiée au vu de l'ensemble des études réalisées.

3- Rôle du motif EC1 et du tryptophane-2

Ces données structurales ont conduit à considérer le **motif EC1** comme le principal domaine impliqué dans l'interface adhésive. De nombreuses autres études ont étayé ces observations, en voici quelques exemples. En utilisant la protéine chimérique E-cadhérine-COMP, Engel et coll. ont observé, par microscopie électronique, uniquement des interactions impliquant les extrémités N-terminales des cadhérines (Tomschy et al., 1996 ; Pertz et al., 1999). Le motif COMP (Cartilage Oligomerization domain of Matrix Protein) est un domaine de pentamérisation qui, placé en C-terminal du domaine extracellulaire de la E-cadhérine, permet leur oligomérisation. Par ailleurs, il a été montré que la délétion du domaine EC1 conduit à la perte de l'activité adhésive de la N-cadhérine (Shan et al., 1999).

A l'échelle submoléculaire, les dernières études convergent vers un mécanisme où **l'échange des brins β N-terminaux** constitue le cœur de l'interaction adhésive entre cadhérines, au niveau du motif EC1. L'étude du fragment E/EC12 par RMN, menée par Engel et coll., a permis d'observer l'équilibre entre la forme monomérique et dimérique en solution et d'identifier expérimentalement les interactions réalisées le long du brin β N-terminal pour chacun de ces états (Haussinger et al., 2004). La nature de ces interactions est similaire entre les deux états, c'est à dire lorsque le brin β s'associe de manière intramoléculaire (monomère) ou intermoléculaire (dimère). Les acides aminés directement impliqués dans l'interaction adhésive correspondent à des résidus conservés au sein de chaque sous-type – I ou II – de cadhérines classiques (Fig. 26 ; Boggon et al., 2002, Patel et al., 2006). Ceci suggère que le mécanisme d'interaction est, au moins en partie, conservé pour l'ensemble des cadhérines appartenant à ces sous-familles.

D'autres travaux ont permis de mettre en évidence les éléments de ce motif directement impliqués dans la fonction adhésive. Des mutations ponctuelles, en particulier la mutation du **tryptophane 2** (Trp2) en alanine, abolissent les propriétés adhésives de plusieurs cadhérines (Chitaev et Troyanovsky, 1998 ; Tamura et al., 1998). Cet acide aminé conservé au sein des cadhérines classiques et desmosomales interagit avec une poche hydrophobe présente sur la molécule opposée. Bien que variable entre chacune de ces sous-familles, l'étude des séquences primaires montre que cette poche hydrophobe est toujours présente parmi les cadhérines classiques et desmosomales.

Par ailleurs, le domaine EC1 est également considéré comme le siège de la **spécificité de l'adhésion**. Le fait d'échanger le domaine EC1 de la E-cadhérine avec celui de la P-cadhérine modifie la spécificité de l'interaction. Il a été montré, par des tests d'agrégation cellulaire, que cette cadhérine chimérique interagit avec la P-cadhérine et non plus avec la E-cadhérine (Nose et al., 1990). Toutefois, il faut rappeler que plusieurs études ont rendu cette propriété de spécificité d'interaction homophile très controversée. Il semblerait, en fait, que les études *in vitro* couramment utilisées pour sonder cette homophilie ne permettent pas de rendre compte de la spécificité clairement observée *in vivo*.

Enfin, l'activité adhésive des cadhérines est très sensible à la nature des acides aminés présents à **l'extrémité N-terminale**. En effet, il a été montré que le clivage d'un propeptide situé à l'extrémité N-terminale, avant le motif EC1, est nécessaire pour la fonction adhésive de la E-cadhérine à l'échelle cellulaire. L'ajout de quelques acides aminés, voire d'une seule méthionine en position N-terminale semble avoir des conséquences sur les propriétés

d'interaction à l'échelle moléculaire. De plus, certains auteurs avancent que la variation entre les structures obtenues par cristallographie aux rayons X ou par RMN serait due à la présence de cet ou ces acides aminés supplémentaires (Haussinger et al., 2004 ; Harrison et al., 2005). Toutefois, si cette extrémité N-terminale influence l'échange de brins β responsable de l'interaction adhésive, aucune relation directe entre la structure observée et la nature de cette extrémité ne peut être déduite de ces structures (Tableau 1).

4- Rôle des autres motifs EC

Peu d'informations ont été obtenues pour comprendre le rôle des 4 autres motifs (EC2 à EC5), mais plusieurs hypothèses ont été avancées. Une fonction, qui leur est communément attribuée, est de favoriser l'exposition du domaine EC1, plaçant ainsi le domaine adhésif à une distance appropriée par rapport à la membrane plasmique.

D'autre part, un certain nombre de données expérimentales suggèrent que les autres domaines soient aussi directement impliqués dans l'interaction des cadhérines. Tout d'abord, l'anticorps DECMA-1, dirigé contre le domaine EC5 de la E-cadhérine peut avoir d'importants effets inhibiteurs sur l'activité de la cadhérine (Vestweber et Kemler, 1985). Néanmoins l'effet observé est peut-être dû à un encombrement stérique de l'anticorps, gênant le recrutement d'autres molécules de cadhérine, qui normalement le renforcement de la plaque adhésive, plutôt qu'à un véritable blocage de la fonctionnalité du motif EC5.

Par ailleurs, en utilisant différents fragments du domaine extracellulaire de la C-cadhérine lors de tests d'agrégation billes-billes et de tests d'adhésion billes-cellules, Chappuis-Flament et coll. ont montré l'implication des domaines EC3, EC4 et EC5 dans l'adhésion (2001). De plus, l'utilisation des mêmes fragments dans des expériences de « Surface Force Apparatus », menées par Leckband et coll. (Sivasankar et al., 1999 ; Sivasankar et al., 2001 ; Zhu et al., 2003), montre que des contacts adhésifs multiples existent le long du domaine extracellulaire (Fig. 27). Trois décrochages successifs sont observés lors de la séparation du fragment EC15 de la C-cadhérine, ce qui a été interprété comme reflétant des interactions multiples entre les différents domaines EC. En particulier le domaine EC3 serait responsable de l'adhésion la plus forte. Enfin, une étude récente a permis de mettre en évidence le rôle des différents motifs dans les propriétés *dynamiques* d'interaction entre fragments extracellulaires de cadhérine (Perret et al., 2004). Cette étude menée sur des fragments de différentes longueurs montre que quatre interactions distinctes sont réalisables sur le domaine extracellulaire de la E-cadhérine. Ces quatre interactions présentent des

stabilités différentes, et suggèrent une régulation possible de la stabilité adhésive à l'échelle de la liaison unique.

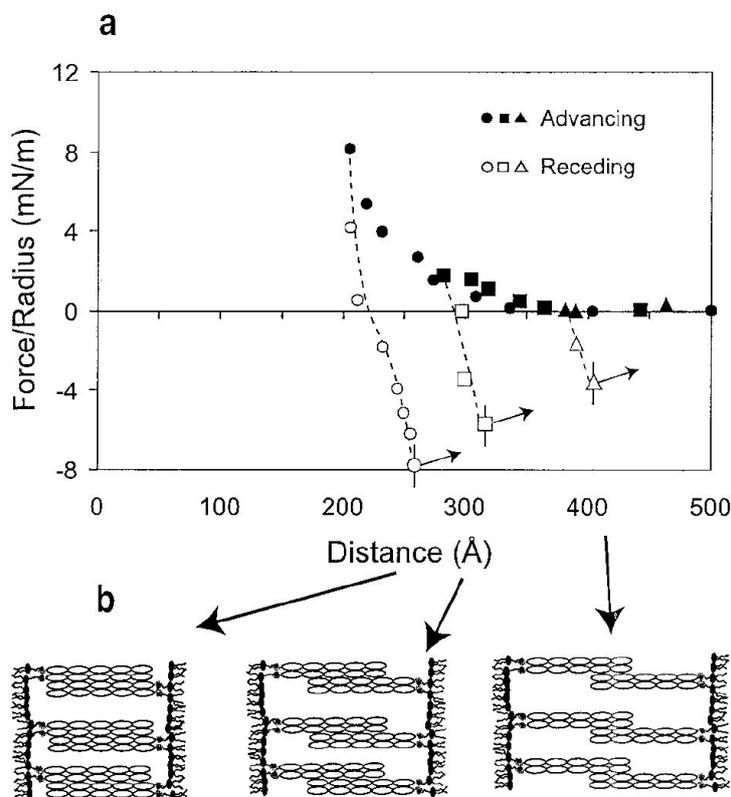


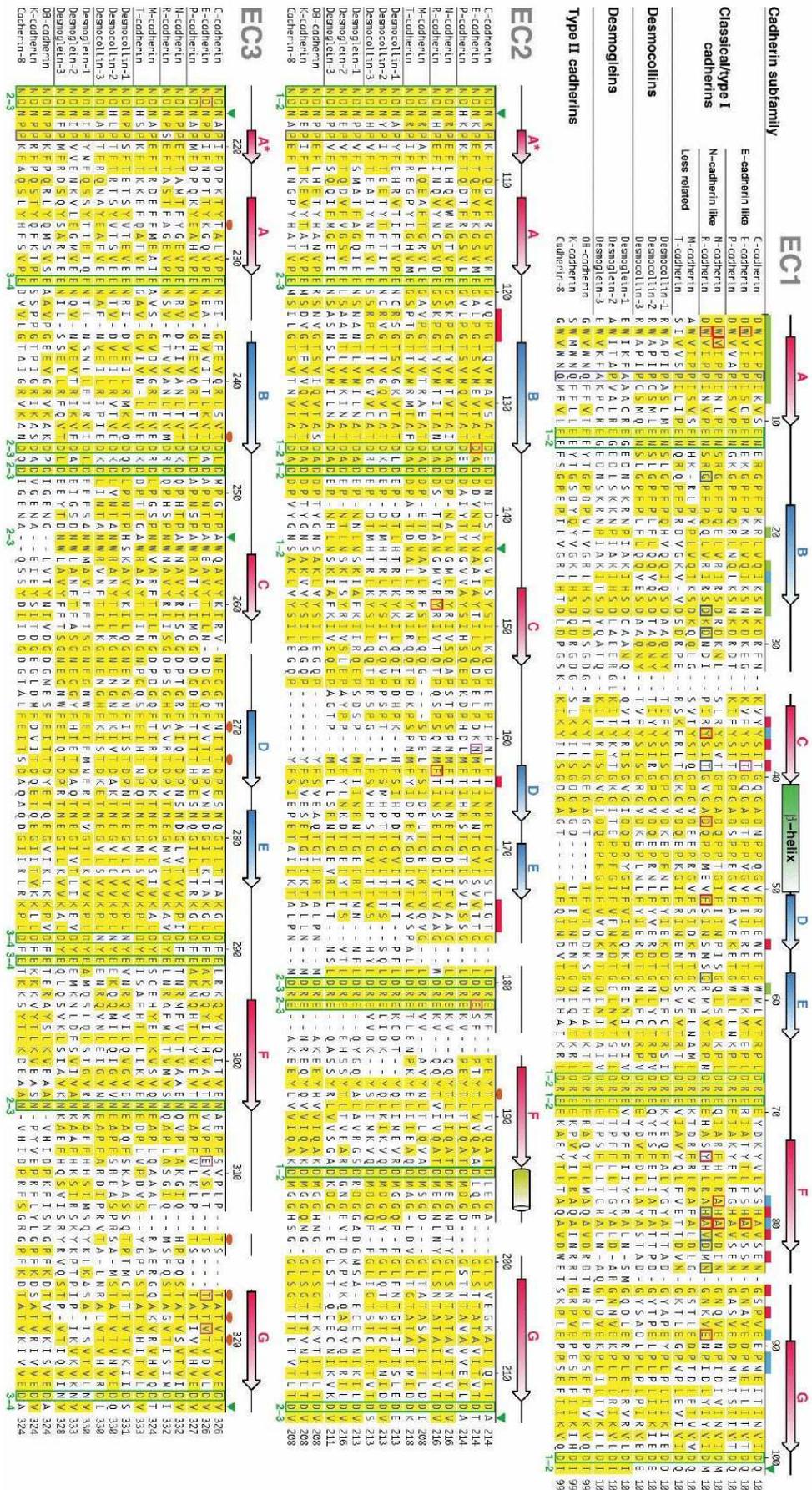
Figure 27 : Profil de dissociation entre fragments extracellulaires de C-cadhérine, mesuré par SFA. (a) Le profil de force mesuré en fonction de la distance montre trois distances d'interaction distinctes. (b) Ces distances suggèrent l'existence de différents alignements, et donc différentes interfaces adhésives entre les molécules de cadhérines, permettant de rendre compte de ces données expérimentales. Extrait de Sivasankar et al., 2001.

5- Rôle du calcium

L'activité biologique des cadhérines est dépendante du calcium, tant à l'échelle cellulaire que moléculaire. Les expériences de Takeichi, en 1977, montrent que le calcium permet à ces molécules de résister à l'action protéolytique de la trypsine, suggérant que la présence de ces ions induit un changement conformationnel de la protéine qui masque les sites de coupure spécifiques. L'ensemble des images de structures observées jusqu'ici montre que ces molécules fixent **trois ions calcium** (Fig. 22 et 28). Plus précisément, ces acides aminés, qui constituent ces « poches » de fixation inter-domaines, occupent des places bien particulières dans la séquence primaire et définissent l'appartenance à la superfamille des cadhérines. Ces données suggèrent fortement que les propriétés moléculaires liées au calcium soient conservées parmi les cadhérines.

Différents résultats concernant **l'affinité des complexes cadhérine-calcium** ont été publiés. Une première série d'études de la fixation du calcium sur le domaine extracellulaire entier, menée par Engel et coll., a permis de déterminer un K_D moyen estimé à 24, 30, 45 ou 150 μM , selon le mode opératoire (protéolyse par la trypsine, dialyse à l'équilibre, dichroïsme circulaire ou fluorescence du tryptophane ; Pokutta et al., 1994, Koch et al., 1997). Une étude plus précise par dialyse à l'équilibre a été entreprise sur un fragment protéique ne contenant que les deux premiers motifs EC1 et EC2 (Koch et al., 1997). Cette molécule ne contient donc qu'une seule « poche » de fixation complète. Les résultats ont conduit à un K_D moyen de 460 μM , suggérant une hétérogénéité de fixation entre les différentes poches, malgré la forte homologie de séquence. De plus, une simulation sur la courbe de titration suggère que deux des trois sites de fixation de cette poche ont un K_D de l'ordre de 330 μM , et le troisième site un K_D de l'ordre de 2 mM. Notons que la concentration extracellulaire est de l'ordre de 1 mM. Ainsi, ces résultats suggèrent un rôle régulateur de l'activité des cadhérines par le calcium *in vivo*, au niveau de cette poche. Une autre étude, réalisée par « flow dialysis », sur un fragment protéique également constitué des deux premiers motifs EC, a conduit à l'estimation d'un K_D moyen de l'ordre de 20 μM (Alattia et al., 1997). Ce résultat, rarement repris dans la littérature, est très différent du premier. De plus, cette valeur, proche de celle observée pour le fragment extracellulaire entier, semble cohérente avec la forte homologie de séquence observée entre les différents sites de fixation du calcium. Ces résultats différents sont – étrangement – rarement discutés, alors que leur implication dans un potentiel mécanisme régulateur de l'activité des cadhérines par le calcium est de première importance. L'ensemble de ces observations a été réalisé en utilisant des méthodes de détection globale de la fixation du calcium. Afin d'obtenir des informations plus précises, nous avons réalisé une étude par détection directe de chaque complexe cadhérine+0, +1, +2... ions Ca^{2+} . Celle-ci est présentée dans la section Résultats (Article II).

Néanmoins, toutes les observations concordent sur le fait que le calcium agit sur la **conformation des cadhérines**. Le repliement en feuillets β de chaque motif est observé indépendamment de la présence de calcium. L'ajout de calcium induit une modification du spectre obtenu par dichroïsme circulaire, traduisant une modification de la structure (Ozawa et al., 2000). La fixation du calcium modifie la structure ternaire des cadhérines en modifiant localement et en pontant chaque paire de motifs EC, ce qui a pour effet d'orienter ces motifs les uns par rapport aux autres et de rigidifier le domaine extracellulaire (Haussinger et al., 2002, Boggon et al., 2002).



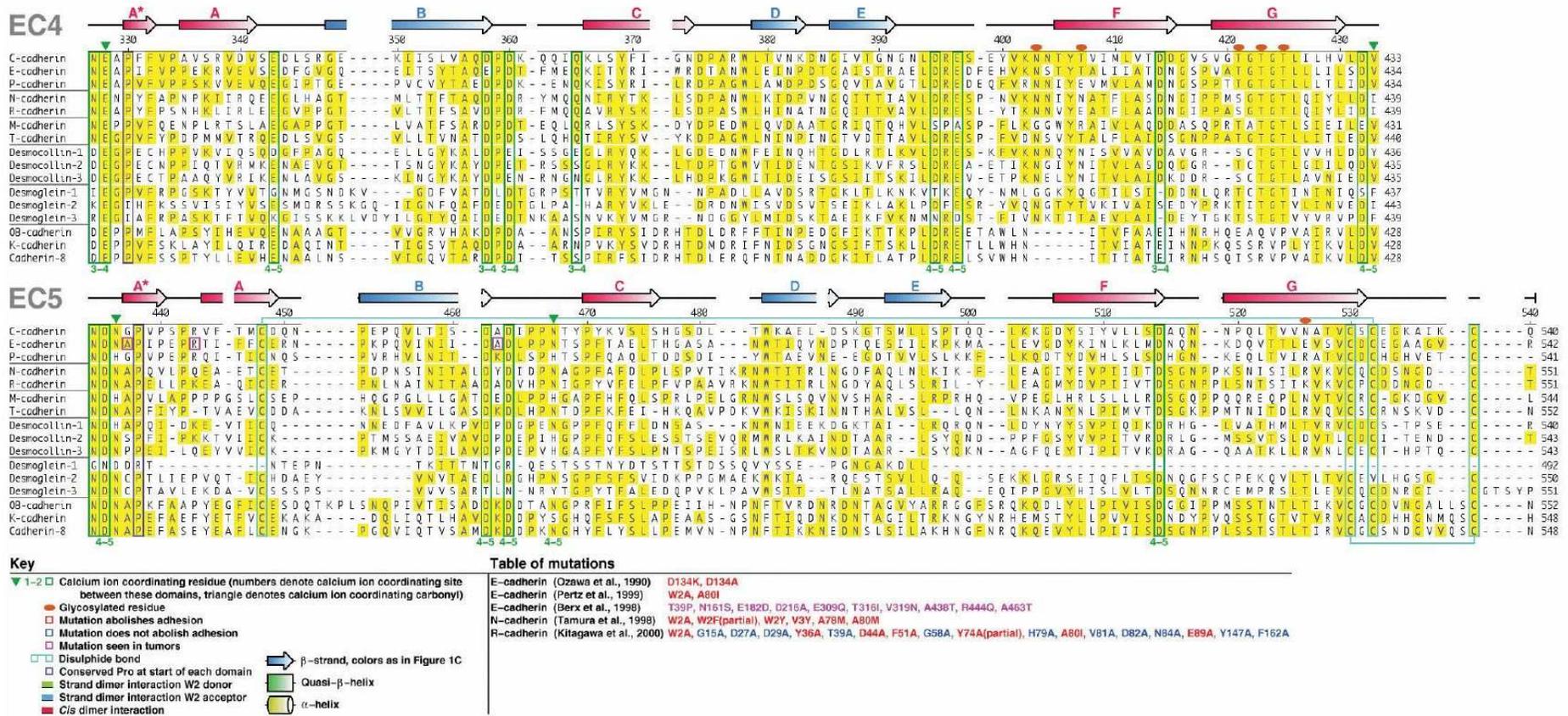


Figure 28 : Alignement de séquence et éléments conservés parmi plusieurs cadhérines.

Extrait de Boggon et al., 2002.

Le calcium, au-delà de participer au repliement de la partie extracellulaire de ces molécules, peut être un acteur de la **régulation de leur activité** adhésive. Un effet immédiat est observé lorsqu'on enlève le calcium du milieu de culture. Les contacts cellulaires impliquant les cadhérines sont dissociés et on constate ensuite une redistribution des cadhérines à la surface cellulaire. A l'échelle moléculaire, de faibles changements de concentration en calcium semblent capables de moduler les interactions entre cadhérines (Tomschy et al., 1996 ; Pertz et al., 1999). Une basse concentration en calcium (à partir de $50\mu\text{M}$ en Ca^{2+}) stabiliserait la structure en bâtonnet, puis entre 500 et $1000\mu\text{M}$ de calcium, un dimère parallèle pourrait se former. Enfin, pour une concentration supérieure à 1mM , les interactions interprétées comme adhésives pourraient s'établir entre deux dimères (Fig. 29). Ces observations sont renforcées par le fait que des mutations dans les sites de fixation du calcium peuvent modifier l'adhésion et la mobilité cellulaire, mais aussi la localisation subcellulaire de la cadhérine (Handschuh et al., 2001).

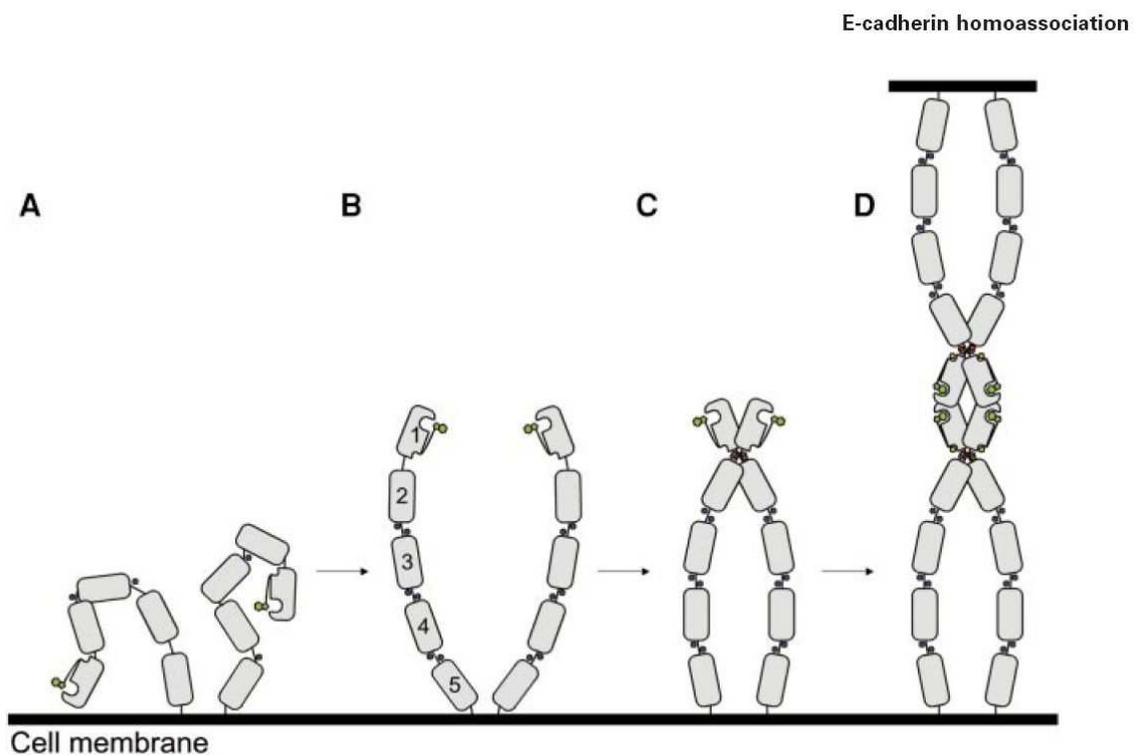


Figure 29: Modèle montrant l'incidence du calcium sur la structure globale du fragment extracellulaire de la E-cadhérine. (A) A faible concentration en calcium, le segment extracellulaire adopte une conformation repliée. (B) A partir de $50\mu\text{M}$ de calcium, la partie extracellulaire se stabilise dans une conformation allongée. (C) Deux monomères de cadhérines s'associent en dimère parallèle à des concentrations en calcium supérieures à $500\mu\text{M}$. (D) Une concentration supérieure à 1mM est nécessaire à la formation d'une oligomérisation supérieure, considérée comme le complexe adhésif. Extrait de Pertz et al., 1999.

Ainsi, le calcium joue un rôle essentiel au niveau des propriétés des cadhérines, en leur permettant d'adopter une conformation biologiquement active. En outre, le calcium joue également un rôle dans l'adhésion réalisée par les cadhérines, mais à l'échelle de l'échafaudage moléculaire qu'est la jonction adhérente, et notamment sur la réorganisation de réseau de filaments d'actine (Chan et al., 2004). Ainsi, le mécanisme permettant au calcium de rendre les cadhérines fonctionnelles et son potentiel rôle régulateur, *in vivo*, reste à définir.

6- Propriétés thermodynamiques de l'interaction entre cadhérines

L'ensemble de ces observations, à la fois structurales et fonctionnelles, ont conduit à proposer différents modèles d'interaction des cadhérines au cours des dix dernières années. Bien que parfois très différents, ces modèles ne sont pas pour autant exclusifs. Toutefois, notre compréhension des mécanismes d'interaction des cadhérines et de leur incidence sur les diverses fonctions biologiques réalisées par ces protéines reste limitée sans une étude quantitative de leur propriétés d'adhésion. C'est pourquoi, la détermination des paramètres thermodynamiques de l'interaction entre cadhérines a été entreprise par diverses équipes ces dernières années.

La constante d'équilibre de dimérisation des cadhérines en solution a été la première grandeur mesurée. Les diverses études successives ont été menées sur le fragment protéique minimal, impliqué dans l'activité adhésive : E/EC12. Ces travaux ont permis d'estimer la valeur du K_D entre 80 μM (Koch et al., 1997) et 720 μM (Haussinger et al., 2004). Bien que cette grandeur ait une pertinence limitée (cf. paragraphes IV-2,3), elle révèle néanmoins que l'affinité de ces molécules était faible, malgré le rôle central de ces molécules dans le maintien de l'intégrité tissulaire.

Une deuxième étape a été de déterminer les paramètres cinétiques de l'interaction entre molécules de cadhérines, fixées sur des surfaces. Une première estimation du taux de formation de liaison, pour des fragments constitués des deux premiers motifs EC de la cadhérine 11 (type II) a été publiée dès 1998 (Pierres et al., 1998). Ce taux, de 10^{-3} s^{-1} , est également très faible. Ce résultat suggère que le système doit surmonter une importante barrière d'énergie d'activation pour passer de l'état dissocié vers l'état lié. Un k_{off} de $0,5 \text{ s}^{-1}$ a été mesuré pour l'interaction entre fragments constitués des deux premiers motifs de la E-cadhérine, grâce à la technique de chambre à flux laminaire (Perret et al., 2002). Ce résultat a mis en avant la nature très labile des interactions réalisées au niveau de l'extrémité N-

terminale des cadhérines. Différentes études ont depuis conforté ces résultats. Baumgartner et al. ont déterminé par la technique d'AFM des constantes cinétiques de dissociation de 1.8 s^{-1} pour la VE-cadhérine (type II), et de 0.9 s^{-1} pour la N-cadhérine (Baumgartner et al., 2000, Baumgartner et al., 2003). Ces mesures quantitatives permettent de justifier et de compléter le modèle d'interaction par échange des brins β N-terminaux, qui implique le passage par un état transitoire de haute énergie entre les états monomériques et dimériques. Par ailleurs, notre groupe, en collaboration avec E. Evans, a mis en évidence l'existence de plusieurs interactions le long du fragment extracellulaire de plusieurs cadhérines. Les quatre interactions présentes sur le domaine extracellulaire de la E-cadhérine ont des k_{off} de l'ordre de 8-11, 0.5-1, 10^{-2} et 10^{-5} - 10^{-6} s^{-1} respectivement (Perret et al., 2004). Une étude similaire réalisée sur la C-cadhérine a donné des k_{off} de 4, 0.02, 4×10^{-4} et 10^{-5} s^{-1} pour les 4 interactions (Bayas et al., 2006). Ces résultats renforcent l'idée que les différences de stabilités des complexes réalisés par ces deux cadhérines classiques de type I puissent conduire à une spécificité moléculaire d'interaction.

Enfin, plusieurs travaux ont servi à quantifier la résistance aux contraintes mécaniques de l'interaction des cadhérines. Celle-ci est définie à l'échelle de la liaison unique par le paramètre f_{β} défini précédemment au paragraphe IV-4. Ces études ont conduit aux valeurs suivantes : 6-7, 6-7, 5 et 3-4 pN pour les quatre interactions mesurées sur la E-cadhérine, respectivement (Perret et al., 2004) et 5, 5, 4 et 4 pN pour celles mesurées sur la C-cadhérine (Bayas et al., 2006). Ces valeurs, très faibles, indiquent que les interactions entre cadhérines sont très sensibles à la force appliquée. Par comparaison, des valeurs f_{β} de 8 et 34 pN ont été déterminées pour les deux barrières d'activations successives de l'interaction streptavidine-biotine (Merkel et al., 1999), alors que pour l'interaction L-sélectine-PSGL-1, des valeurs f_{β} de 10 et 70 pN ont été déterminées (Evans et al., 2001). Des mesures ont également été réalisées par AFM pour sonder l'interaction de liaison unique entre cadhérines sur des cellules. Ces mesures pour la E-, la N- et la VE-cadhérine ont mis en évidence des cinétiques d'interaction similaires. Néanmoins la résistance mécanique semble différente entre ces trois protéines (Panorchan et al., 2006a-b). Ce paramètre, bien que faiblement différent entre la E- et la C-cadhérine, pourrait être une source supplémentaire de spécificité fonctionnelle entre les différentes cadhérines.

VI- Objectifs du travail

De nombreuses fonctions cellulaires sont associées aux cadhérines : cohésion, différenciation, polarité, morphogenèse, ségrégation, migration,... L'altération de la fonction des cadhérines est associée à diverses perturbations survenant au cours du développement embryonnaire, ou à des pathologies telles que le cancer. Bien que ces fonctions soient de mieux en mieux décrites, la détermination des propriétés moléculaires qui permettent de réaliser ces fonctions reste difficile. En particulier, le mode d'interaction entre molécules de cadhérines, qui est à la base de ses fonctions et notamment de ses propriétés adhésives, est encore aujourd'hui partiellement incompris. Les différentes études biochimiques et structurales ont conduit à de multiples interprétations, parfois contradictoires. Les questions les plus débattues dans la communauté scientifique, à propos des propriétés d'interaction de ces cadhérines, sont : la détermination de la (ou des) surface(s) d'interaction, la nature de l'unité minimale fonctionnelle (monomère ou dimère parallèle), le rôle du calcium, la spécificité/homophilie d'interaction,... Mon travail de thèse se situe dans ce cadre général et a pour but de comprendre les mécanismes permettant aux molécules de cadhérines de réaliser leurs fonctions adhésives.

Pour répondre à cet objectif, le groupe dans lequel j'ai réalisé mes travaux de thèse cherche à déterminer les propriétés thermodynamiques des interactions réalisées par les cadhérines (Pierres et al., 1998 ; Perret et al., 2002 ; Perret et al., 2004). Comme je l'ai décrit dans l'introduction, plusieurs approches et notamment plusieurs échelles de mesure sont possibles. Afin de s'extraire de la complexité des systèmes adhésifs, nous avons choisi de mener ces études biophysiques sur des fragments isolés du segment extracellulaire de la E-cadhérine, prototype des cadhérines classiques. Plus précisément, après avoir vérifié le repliement natif de ces protéines, nous avons déterminé les propriétés cinétiques d'interaction à l'échelle de la liaison unique, par la technique de Chambre à Flux Laminaire. Pour compléter cette étude, nous avons cherché à déterminer l'incidence d'éléments considérés comme étant essentiels à l'activité adhésive des cadhérines, à savoir le tryptophane conservé en position 2 et la fixation du calcium.

Pour notre première étude, nous nous sommes focalisés sur une détermination fine des paramètres cinétiques de l'interaction réalisée au niveau de l'extrémité N-terminale de la E-cadhérine. Les études structurales suggèrent que le tryptophane en position 2 joue un rôle

central dans cette interaction. Nous avons donc étudié son incidence sur les propriétés cinétiques d'interaction. Cette étude, en plus d'avoir déterminé les paramètres cinétiques d'interaction, nous a permis de mettre en évidence la nature dissymétrique du processus moléculaire permettant de réaliser l'interaction adhésive. Nous en avons déduit un mécanisme moléculaire, mettant en évidence l'importance du Trp2 au niveau des propriétés cinétiques d'une liaison isolée, mais aussi dans un mécanisme potentiel de stabilisation du contact adhésif à l'échelle plurimoléculaire. (Article I, en préparation).

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle du calcium dans les propriétés moléculaires des cadhérines. Différentes études ont décrit des propriétés de fixation du calcium différentes au niveau des poches interdomaines, donnant lieu à des interprétations contradictoires concernant l'incidence du calcium sur les propriétés moléculaires des cadhérines. Ces études avaient été réalisées sur des fragments de cadhérine possédant des acides aminés supplémentaires à l'extrémité N-terminale qui pouvaient interférer dans la fixation du calcium. Une étude par spectrométrie de masse en condition non-dénaturante sur différents fragments de E-cadhérine de type sauvage ou modifiés nous a permis de documenter de manière précise les propriétés de fixation du calcium. Ces mesures ont été complétées par des études structurales. L'ensemble des résultats montre clairement une fixation coopérative des ions calcium au niveau d'une poche interdomaine, nécessaire à l'ajustement des motifs EC successifs le long du segment extracellulaire. De façon intéressante, cette fixation est observée à des concentrations très faibles, ce qui va à l'encontre d'une éventuelle modulation de l'activité adhésive des cadhérines par la fixation de ces ions. (Article II, en préparation).

Enfin une étude systématique, permettant de déterminer l'incidence du calcium sur les propriétés cinétiques d'interaction entre molécules de cadhérine, est actuellement en cours. Les premiers résultats montrent que le calcium influence peu ces propriétés cinétiques à force nulle. Toutefois, le calcium semble jouer un rôle important au niveau de la capacité de la liaison à résister aux forces dissociatives. (Travail en cours).

Résultats

**Article I : Tryptophan 2: the cadherin
feeler, finding the way for the *trans*
interaction**

Tryptophan 2: the cadherin feeler, finding the way for the *trans* interaction

Olivier Courjean, Sébastien Chevalier, Emilie Perret¹, H  l  ne Feracci*

Centre de Recherche Paul Pascal, CNRS UPR 8641, 115 Avenue Albert Schweitzer, 33600 Pessac, France

¹Present address: Dept. of Ophthalmology, Weill Medical College of Cornell University, M. Dyson Vision Research Institute, 1300 York Avenue, New York, NY 10021, USA

*Corresponding author

Introduction

A wide variety of physiological processes are the reflection of interactions between macromolecules, especially between proteins. Adhesion between cells is one of such processes, essential for tissue morphogenesis and homeostasis. Classical cadherins are cell surface receptors which are involved in Ca²⁺-dependent homophilic cell-cell adhesion (Takeichi, 1988, Nollet et al., 2000). E-cadherin, the epithelial prototype, is a transmembrane glycoprotein of which the extracellular segment contains five EC modules (numbered 1 to 5 from the outermost domain) and is responsible for adhesive interactions with E-cadherins on the surface of opposing cells. Following the transmembrane segment, an intracellular domain of about 110 amino acids is important for associations with cytoplasmic proteins involved in the clustering of surface cadherins to form junctional structures. This association is the starting point of intracellular signaling (Ozawa et al., 1989; Shibamoto et al., 1995; Reynolds et al., 1994; Yap et al., 2003).

Cadherins biological properties must rely at least in part on the extracellular segment where the first events of protein interactions take place. Structural studies of extracellular cadherin segments as well as sequence alignments indicate that each individual repeat EC is composed of seven anti-parallel β -strands arranged as two opposing sheets. However, it is in the interactions between cadherin domains where much controversy has emerged. Crystal

structure analyses of classical cadherins show that these proteins interact at the most distal of five extracellular domains, called EC1 (Shapiro et al., 1995, Boggon et al., 2002, Haussinger et al., 2004). Other studies suggest that strong adhesion could only be produced by more extensive interactions along the extracellular arms (Perret et al., 2004, Bayas et al., 2006).

Much effort has been spent to reveal the atomic details of cadherins adhesive interactions. Despite numerous structural data, the adhesive interface corresponding to the cadherin trans interaction was still recently under debate. The first model for cadherin-mediated interactions proposed that cadherin cis-dimers on opposing cells form a zipper-like superstructure (Shapiro et al., 1995). However, the crystal assemblies of the pair EC12 domains of both N- and E-cadherins did not fully confirm this picture (Nagar et al., 1995; Pertz et al., 1999). Recently, a novel model for cadherin-mediated adhesion has been proposed based on the crystal structure of the entire ectodomain EC15 of C-cadherin (Boggon et al., 2002). Trans interactions between the ectodomains were proposed to imply the β -strand exchange assigned to the cis interaction in earlier work. This β -strand exchange was observed more recently between E-cadherin two EC12 fragments by x-ray crystallography and NMR (Haussinger et al., 2004; Fig. 1a). A definitive biological interpretation is difficult because crystal-packing forces are of similar size or even larger than the weak physiological interactions.

Nonetheless numerous lines of evidence support the idea that the outermost cadherin module is essential in mediating the adhesion between cadherin molecules (Shan et al., 1999; Chappuis-Flament et al., 2002, Tomchy et al., 1996, Harrison et al., 2005a). Trp2 as well as the Histidine-Alanine-Valine (HAV) sequence are highly conserved elements shared by the EC1 modules of classical cadherins (Fig 1b). These residues are essential for adhesive function. In particular, replacement of Trp2 with Ala (W2A) or Ala80 with Ile abrogates the cadherin adhesive capacity at the cell surface (Tamura et al., 1998; Pertz et al, 1999; Noe et al., 1999). More precisely, the HAV sequence located at the C-terminal region of domain EC1 and conserved residues surrounding it contribute to the formation of a hydrophobic pocket (Blaschuk et al. 1990; Tamura et al., 1998) where the highly conserved residue Trp2 docks into (Fig. 1a). Divergent interpretations have been proposed from the successive structural studies. However, various recent studies suggested that the different images obtained by x-ray crystallography correspond to different steps of the β -strand exchange process leading to cadherin-cadherin interaction: intramolecular docking of Trp2 corresponds to the monomeric conformation, while the trans dimer is achieved by β -strand exchange (Chen et al., 2005; Harrison et al., 2005b; Troyanovsky et al., 2005). As show by NMR experiments, the

presence of additional amino acids at the N-terminal end seems to modify the Trp2 docking (Haussinger et al., 2004). Furthermore the propeptide cleavage is necessary for expression of cadherin biological activity in vivo (Ozawa and Kemler, 1990). Finally, NMR studies indicate that this docking is obviously dynamic (Haussinger et al., 2002; Haussinger et al., 2004).

Flow chamber measurements have proven to be valuable tools for resolving dynamic parameters of receptor-ligand interactions (Pierres et al., 1998; Pierres et al., 2002). In an attempt to dissect the cadherin-based adhesive interactions, we have recently used this methodology to determine the overall adhesive properties of the two outermost domains EC12 of E-cadherin (Perret et al., 2002). The interest of this methodology is: i) to study the association of surface-attached molecules rather than the soluble form thus achieving a molecular orientation relevant to physiological conditions, ii) to allow very sensitive detection of molecular interactions, iii) to allow confinement of molecules on surfaces making possible probing of individual asymmetric molecular interactions. Finally the use of model particles coated with recombinant molecules allowed to investigate intrinsic receptor properties, thus avoiding the difficulty of defining post-receptor events that are particularly important with cadherins. Here we used the flow chamber *operated under very low shear rate and enhanced detection sensitivity* as a powerful molecular approach to probe the contribution of the Trp2 in this dynamics at the single molecule level. By comparison, we also probed the role of an additional N-terminal Met on the kinetics of the trans interaction. We were thus able to demonstrate the occurrence of a Trp2 docking with a fast kinetics that precedes a previously described longer interaction step of the two outermost domains. Our observations provide a mechanism for the involvement of Trp2, which acts as a feeler, in the cadherin trans interaction. Our results also provide new detailed insights into the dynamics involved in regulating epithelial cell-cell adhesion.

Materials and Methods

Plasmid constructs

All cadherin fragments are displayed on Figure 2. The plasmid constructs coding for the first two extracellular domains M-E/EC12 fused with the histidine tag in C-terminal position were previously described (Perret et al., 2002). The obtained fragments were cloned in the pET24a expression vector (Novagen) using the XhoI / NdeI site. Due to the cDNA construct, the corresponding protein contains an additional methionine in first position.

The constructs coding for the cleavable proteins MIEGR-E/EC12 and MIEGR-E/W2A, which corresponds to MMIEGR-E/EC12 mutated in W2A, were realised in two steps. First, intermediate constructs were obtained by cloning the first part of the sequence coding for HisXa-ECAD12 and HisXa-ECAD12W2A, kindly provided by Thomas Ahrens/J. Engel (Haussinger et al. 2004). DNA fragments were cloned from pET19b(HisXa-ECAD12) or pET19b(HisXa-ECAD12W2A) plasmids into the pET24a(M-E/EC12) plasmid, using the BglII / EcorI sites and resulting in sequences coding for HisXa-E/EC12 and HisXa-E/W2A respectively, fused with the histidine tag in C-terminal position. Then the fragments coding for MIEGR-E/EC12 and MIEGR-E/W2A were cloned from the previous plasmids in a pET24a plasmid using the XhoI / NdeI site.

Prior to the expression of the proteins, the cDNA constructs were sequenced to verify that mutations had not arisen during polymerase chain reaction.

Protein expression and purification

For M-E/EC12, MIEGR-E/EC12 and MIEGR-E/W2A chimeric proteins purification, Terrific Broth media cultures of 500 ml containing 50 µg/ml kanamycin were inoculated with transformed colonies picked up from agar plates. Expression was induced by the addition of IPTG. After 2h, cells were harvested and stored at -70°C. Cell pellets were resuspended in lysis buffer (4M urea; 50mM Na₂HPO₄ pH 7.8; 20mM Imidazole and 20mM β-mercaptoethanol). The lysate was clarified by centrifugation at 10,000 g for 20 min and the supernatant incubated for 2h with Ni²⁺-NTA Superflow (Qiagen). The beads were extensively washed with lysis buffer and then subjected to stepwise dialysis against PBS. Cadherin fragments were eluted with 0.25M imidazole. Factor Xa protease digestion of 1mg of MXa-E/EC12-His or MXa-E/W2A-His chimeric proteins was performed in 1mL Tris 20mM, NaCl 50mM, CaCl₂ 1mM, pH6,5 with 50U (Qiagen), during 60h at 16°C. The reaction was stopped by addition of leupeptin and removing the Factor Xa enzyme using Xa Removal Resin

(Qiagen) and then dialysed against Tris 20mM, NaCl 150mM pH8 using Amicon Ultra 15, cut off 10kDa (Millipore) in order to remove Ca^{2+} ions and the cleaved peptide. The cleaved proteins were named E/EC12 and E/W2A respectively, and the protein with additional Met-1 M-E/EC12.

Protein concentration was determined spectrophotometrically by absorbance measurements at 280nm. The absorbance coefficient was evaluated on the basis of amino acid composition using ProtParam tool, provided by ExPaSy web site (<http://expasy.ch>). Following purification, proteins purity was checked by SDS-PAGE, western blotting (Perret et al., 2002) and by mass spectroscopy.

Preparation of substrates for the flow chamber experiments

Streptavidin coated beads (2,8 μm diameter, 1,3 g/l density, Dynabeads M280, Dynal) were incubated ($\sim 8.10^8$ beads/ml) at room temperature for 30 min with 10 μg of biotinylated rat anti-mouse Ig mAb (Pharmingen) then with 10 μg of mouse anti-histidine mAb (clone His-1, Sigma). Finally beads were incubated with the recombinant E/EC12, E/W2A or M-E/EC12 fragments, for at least 1h. Prior using in adhesion experiments, beads were washed in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH7.

Freshly cleaved mica surfaces (Muskovite mica, Metafix, Montdidier, France) were incubated with 1mM NiCl_2 (Sigma) for 1 min. E/EC12, E/W2A or M-E/EC12 fragments were diluted to the desired coating concentration in binding buffer (Hepes-NaCl) and deposited on each mica surfaces for 1h at room temperature. Surfaces were then washed with Hepes-NaCl. Before use in laminar flow assays, beads and slides were incubated for 15min with 1mM CaCl_2 in Hepes-NaCl. Experiments were performed in Hepes-NaCl, with 1mM CaCl_2 , BSA 0.2%.

Interaction lifetime measurements were carried out with saturated beads (6900 molecules/ μm^2) and with a binding site density on mica of 50-100 molecules/ μm^2 , as described in a previous work (Perret et al., 2002). Such conditions allowed optimal attachment frequency and unimolecular measurements.

Laminar flow adhesion assays

Flow chamber: Chambers were assembled as previously described by applying molecularly smooth mica sheets against a plexiglas block with a cavity of 0.1 x 6 x 20 mm^3 (Satim, Evenos, France). The chamber was set on the stage of an inverted microscope (Axiovert 135, Zeiss, Germany) bearing a long-distance 40X dry objective (n.a. 0.55) and a CCD camera

(WV-BP 310/G, Panasonic) connected to a Time Lapse Video Recorder (AG 6730, Panasonic) and a videotape recorder for delayed analysis. Typically, 1 mL of bead suspension (10 million/ml) was driven through the chamber with a 5ml syringe mounted on a syringe holder (Rasel, Stamford CT, supplied by Bioblock, Illkirch, France).

Particle tracking: Videotapes were digitized using a Pinnacle's DV500 PCI card (Pinnacle Systems, Inc, Chatillon, France). The movies were exported in sequences of numbered files. Then, a 20 millisecond time resolution was obtained by separating the interlaced fields forming each image. Bead trajectories were recorded using the Metamorph tracking option (Universal Imaging Corp.). Pixel size was 0.37 μm . On each field, the sphere centre of gravity was determined with 0.040 μm accuracy. Also, the trajectories were checked to detect artefactual events such as sphere collisions or doublet formation. In a typical experiment, about 1500-2500 particle trajectories were recorded, amounting to about 500000-1000000 events, defined as sets of three parameters: time, x and y coordinates of the sphere centre.

Data analysis.

Arrest definition: A custom-made software was used to analyse particle trajectories and to detect arrests. A sphere was defined as arrested when it moved by a distance lower than a threshold ξ during the following time period τ . Due to the occurrence of Brownian motion of flowing spheres, it cannot be ensured that a particle arrest represents an actual binding event rather than a random velocity fluctuation (Pierres et al., 2001). More precisely, particle motion depends on its bound/unbound state and displacement of a moving particle, during a time Δt , can be defined as following:

$$\Delta x_{moving} = u_h(z) \cdot \Delta t + B + C$$

Where $u_h(z)$ is the local hydrodynamic velocity of a sphere, in absence of diffusion. This velocity depends on the wall shear rate and the distance z between the particle and the floor of the flow chamber. B is a random displacement along the flow direction due to Brownian motion. C is a random apparent displacement due to error in determining the centre of the particle (originating from tracking device). When the particle is arrested, due to a molecular interaction, its displacement is reduced to:

$$\Delta x_{arrested} = B' + C$$

B' corresponds to a confined Brownian motion of the bead around the anchoring position on the mica sheet. Since the component C is due to the uncertainty in optical/video detection of the particle position, this variable does not depend on Δt . It can be assumed that the distribution function of $\Delta x_{\text{arrested}}$ is limited in a range tighter than the dimension of the particle. This assumption was verified experimentally (Fig. 3). The component B correspond to a random diffusive displacement, varying as $\pm \sqrt{D_x \cdot \Delta t}$. D_x is the diffusive coefficient along the flow direction. Consequently, it is possible to discriminate between arrested and moving particles by measuring displacement during a sufficient time Δt from which it is mainly observed that: $\Delta x_{\text{arrested}} < \Delta x_{\text{moving}}$.

We determined experimental distributions of particles displacement for various values of Δt (20, 40, 80, 120, 160, 200, 240ms) in order to choose acceptable values for τ and ξ (Fig. 3). This distribution was determined for all our experiments, showing a good homogeneity of our data. In particular, we verified experimentally that the minimal period of time τ , allowing separating the part of arrested particles from the moving ones, only depends on the wall shear rate, but not on the nature of proteins covering the beads and mica surfaces. The choice of τ and ξ is also critical because these parameters define the average minimal duration of detectable arrest (d_m) and the average shift between apparent (d_a) and true (d_t) arrest duration, introduced by this way of detecting arrests.

$$d_m = \tau - \frac{\xi}{v}$$

$$d_a = d_t + \tau - \frac{2\xi}{v}$$

v is the mean velocity of sphere flowing close to the chamber floor. Since one of our goals is to detect short arrests, we need to choose the shortest acceptable τ that is to say the minimal Δt allowing to discriminate between arrests due to a cadherin interaction and random fluctuation of velocity. The ξ parameter was chosen to be the maximal displacement of arrested particles (Fig. 3). When the wall shear rate was of order of $8\text{-}10 \text{ s}^{-1}$, optimal results were obtained by using $\xi = 0.31 \text{ }\mu\text{m}$ and $\tau = 0.12 \text{ s}$, resulting in: $d_m = 68 \text{ ms}$ and $d_t = d_a + 17 \text{ ms}$.

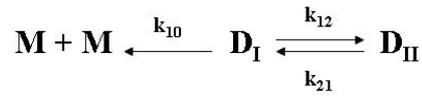
Although we can observe arrests with apparent duration (d_a) of 20ms, many of them are not detected. We chose to only retain arrests $d_a \geq 40\text{ms}$. By doing so, we obtained a very limited underestimation of the number of short arrests.

Binding frequency: The binding frequency was used to reflect the binding efficiency as previously described (Perret et al., 2002). It was thus determined by dividing the number of arrests $N_s(t=0)$, obtained by extrapolation using the best fit of the detachment curve, by the total duration of motion of particles meeting the aforementioned velocity limitation.

Detachment curves and simulations: By plotting the number of particles remaining bound versus time, we could determine characteristic durations of interactions. To fit the experimental data, we built $P(t)$, the probability for a complex to be still bound. $P(t)$ is the sum of the probability for the different bound states D_I and D_{II} ; $P(t=0) = 1$. To adjust the function $P(t)$ with the experimental data, we constructed a theoretical function displaying the number of arrests versus time:

$$N_s(t) = P(t) \times N_{\text{exp}} / P(t = 57 \text{ ms})$$

Where N_{exp} is the number of experimental arrests detected, which corresponds to $d_t \geq 57 \text{ ms}$. Numerical simulations were used to fit with our experimental data with the following mechanism:



With initial conditions: $D_I(t=0) = 1$ and $D_{II}(t=0) = 0$. The constants k_{10} , k_{12} and k_{21} were varied to obtain the best fit. Theoretical curves were fitted to experimental data with χ^2 test. Arrest durations were grouped in eleven. Parameters k_{ij} were systematically varied with a step of 1 s^{-1} in order to determine the values yielding minimal χ^2 . This procedure was repeated with a step of 0.1 s^{-1} to refine the minimization. Note that the threshold χ^2 for a 0.05 significance level is 14 when the number of degrees of freedom is 7.

RESULTS

An optimised Flow Chamber device to detect short arrests

We previously showed using a flow chamber device that the E-cadherin first two ectodomains (M-E/EC12) exhibit transient tethers with first-order kinetics. The unstressed lifetime of individual E-cadherin interactions is as brief as 1-2 seconds (Perret et al., 2002). This interaction and an additional one of 0.1 second were characterized with the biomembrane force probe (Perret et al., 2004). In order to specifically assess the influence of the Trp2 and of the additional N-terminal Met in the homophilic E-cadherin interaction, we improved the sensitivity of the technique by modifying the arrest definition resulting in an improved detection of short arrests.

In order to improve our knowledge of the mechanism of cadherin trans interaction, we needed to be able to detect a possible slight effect on kinetics, due to one point mutation. More precisely, our goal was to detect arrests as brief as possible. With this perspective, the main difficulty was then to discriminate between arrests due to true cadherin interactions and random fluctuations originating mainly from Brownian motion. Usually, a particle is considered as arrested at some point when the displacement during the previous period of time τ is lower than the threshold distance ξ . An optimal discrimination could be obtained by studying the distributions of particle displacements, observed during different intervals of time Δt (For more details, see Materials and Methods).

Typical plots of these distributions, exemplified in Figure 3, showed both moving and arrested particle distributions, which were more distinguishable when we increased Δt . Consequently, we observed that the minimal duration to separate these two components was 120 ms, when both surfaces were coated with EC12 fragments. As detailed in figure 3b, we could easily distinguish arrested particles due to a cadherin interaction with the mica surface, which displacement is limited, from free particles. This observation was similar for other configurations using beads and mica surfaces coated with different cadherin fragments. It was also checked that the part of the distribution corresponding to arrested particles was negligible when the mica surface was coated with BSA, a negative control for adhesion (Fig. 3b). Consequently, we are able to determine the optimal set of parameters necessary to define an arrest due to a cadherin interaction. We verified experimentally that the choice of these parameters depends only on the wall shear rate of the laminar flow, as expected (Data not

shown). The optimal values chosen in this study were for $\tau = 120\text{ms}$ and $\xi = 0.31\mu\text{m}$ and by doing so, the minimal duration of detectable arrests was about 0.068s.

Kinetics of cadherin homophilic interaction

Binding formation

The laminar flow chamber method allowed us to probe the formation and the stability of individual trans interaction between cadherin fragments. By measuring the arrest frequency of coated beads flowing near coated mica surfaces, we were able to quantify the formation kinetics of this interaction. Although this is not a direct measurement of binding rate (also called on-rate), theory shows that binding frequency is proportional to on-rate (Pierres et al., 1998). Then it is possible, by using our different fragments probed in identical conditions, to consider binding frequency as a quantitative effect of their on-rate.

As shown in Figure 4, binding frequency between beads and mica both coated with E/EC12, was $0.26 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$. By comparison, binding frequency using E/W2A was $0.11 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$. These frequencies showed that Trp2 is directly involved in binding formation, at the molecular level. Control experiments, where the mica surface was coated by an irrelevant protein such as BSA, displayed a binding frequency of $0.04 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ (not shown). The binding frequency of E/W2A was significantly above the background level. These results indicated that the Trp2 was not necessary for cadherin trans interaction, but clearly enhanced its formation. This is in agreement with structural images showing that Trp2 is directly involved in the binding interface, achieved by the β -strand exchange.

The binding frequency measured for M-E/EC12 trans interaction is $0.23 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$. Although the additional Met-1 is thought to modify the equilibrium of cadherin dimerization, our measurements did not reveal any significant difference in binding formation, compared with E/EC12 interaction.

Binding stability

Binding stability could be quantified from the duration of individual arrests, by plotting the proportion of detected interactions as a function of time (see Materials and Methods). As shown in Figure 5, trans interaction between E/EC12 fragments appeared to be more stable than between E/W2A. These data revealed that the Trp2 is directly involved in

the stability of cadherin interaction, which is consistent with structural images of cadherin β -strand exchange. The additional Met-1 also destabilized cadherin interaction.

These experimental distributions of arrest durations were fitted according to several theoretical models. In a first series of calculations (not shown), it was checked that experimental data displayed on Figure 5 could not correspond to a first order kinetics, with an adjustable off-rate. Indeed, in this case, the experimental curves should be straight lines. These results were different from those obtained by Perret et coll. (2002). Indeed, due to the enhanced method, we were able to detect short arrests more efficiently, then inlighthening the complexity of the bound state. The simplest way to fit these experimental data was by using a two states model. More precisely, we considered a three-parameter model involving an intermediate binding state (see Materiel and Methods). The arguments which guided our choice are given in the Discussion section. It was possible to obtain theoretical curves fairly similar to experimental data, and the fits are shown on Figure 5. On Table 1 are shown numerical values of fitted parameters, as well as minimal χ^2 values.

According to this model, cadherin trans interaction begins by an intermediate state which can dissociate with a rate (k_{10}) of about 4 s^{-1} or stabilized in a second state with a rate (k_{12}) of about 2 s^{-1} . The off-rate of this second state (k_{21}) is about 1 s^{-1} . Due to the statistical test, these values have to be considered as ranges, rather than absolute values. Nonetheless, there are comparable with dissociation rates obtained by independent studies and can be related to the β -strand exchange mechanism (Perret et al., 2002; Perret et al., 2004; Haussinger et al., 2004). Surprisingly, while E/W2A or M-E/EC12 overall interactions were clearly less stable than the wild-type protein E/EC12, the fitted parameters were not so different. In fact, the difference in stability between these three proteins seemed to be due to the dissociation rate of the intermediate state. Indeed, χ^2 tests were performed by fitting only k_{10} (with $k_{12} = 2 \text{ s}^{-1}$ and $k_{21} = 1 \text{ s}^{-1}$), or by fitting k_{12} and k_{21} (with $k_{10} = 4$ or 5 s^{-1}), with all three experimental curves. In all these χ^2 tests, only the k_{10} fitting gave χ^2 values under the threshold (data not shown). This observation suggested that the effect of W2A mutation or additional Met-1 on global stability could be mainly due to destabilisation of the intermediate state, without affecting other transitions.

Mechanism of interaction between cadherin extracellular fragments

According to recent published works, cadherin trans interaction is achieved by a β -strand exchange mechanism, but only few details are currently available. This mechanism is simply described as a domain swapping process: the N-terminal strand is able to break its intramolecular bonds to interact with the EC1 motif of the opposing molecule. The “closed” monomeric conformation acts as a competitive inhibitor of dimer formation, thus lowering affinities even though the dimer interface has the characteristics of high-affinity complexes, and the transition from the monomeric to the dimeric conformation is limited by high activation energy (Chen et al., 2005). Our measurements provided qualitative and quantitative information about trans interaction between cadherin fragments. Trp2 appeared to play an important kinetic role in this process by facilitating binding formation and increasing bond stability. Moreover, we showed that a (at least) two-state process was necessary to account for the dissociation curves. The question was then to know whether one of the two opposite cadherin molecules is able to initiate the trans interaction or whether this process needs a symmetrical coordination of both molecules. By using the flow chamber method, we were able to probe the symmetry or dissymmetry of the molecular process leading to the β -strand exchange.

As illustrated on Figure 6, the formation of a heterodimer by a symmetrical process is characterized by a unique k_{on} . By contrast, the formation of a heterodimer by an asymmetrical process is characterized by the combination of two k_{on} , depending on the reaction pathway followed by the interacting molecules. According to this process, it is possible to favour one of both pathways by favouring one molecule of this heterodimer to initiate the interaction. It was possible by using a protein density on the beads (6900 molecules/ μm^2) much higher than on the mica (50-100 molecule/ μm^2) and two opposite configurations that is the wild-type protein E/EC12 on the beads and the mutant protein E/W2A on the mica surface, or the opposite. If the molecular process is symmetrical, this approach will lead to the same kinetics for both configurations. By contrast if the molecular process is asymmetrical, the two configurations should lead to different kinetics. A more detailed and formalized explanation is given in annexe I.

Experimental measurements presented in figure 7 clearly showed that the cadherin interaction is an asymmetrical process. More precisely, binding formation measured for homodimers and heterodimers configurations clearly depended on which protein was coated on the beads. The stability of heterodimers also appeared to depend on the densest protein. This was consistent with the fact that W2A mutation did not significantly influence the stabilization rate of the intermediate state neither the dissociation rate of the second state. Taken together, our results

provided new insights for a detailed mechanism of cadherin trans interaction. When two molecules from two opposite cells are close enough, one molecule has to be in an active state in order to initiate adhesive binding. The Trp2 as well as other yet undefined amino acids are directly involved in this binding initiation. Then, this pair of molecules, associated in an intermediate binding state, can dissociate with a kinetic rate of about 4 s^{-1} , or stabilize in a second state with a rate of about 2 s^{-1} . Our data suggest that Trp2 plays a major role in the dissociation of the intermediate state, rather in the stabilisation transition. In the same way, the additional Met-1 destabilizes this intermediate complex, but would not significantly influence the stabilization transition. The second state, slightly more stable than the intermediate state, dissociates with a rate of 1 s^{-1} , independently on the Trp2 or the Met-1.

DISCUSSION

The purpose of this study was to clarify the molecular mechanism of cadherin interaction. This adhesive binding is achieved by a N-terminal β -strand exchange, but little information is available concerning the detailed mechanism at a molecular scale and the dynamic of this N-terminal strand. The Trp2, a conserved amino acid among classical and desmosomal cadherins, is essential for cadherin adhesive interaction. This is demonstrated by cellular adhesion and molecular interaction experiments (Trojanovsky et al., 2003; Harisson et al., 2005a-b), and its central role in binding interface is suggested by x-ray crystallography and NMR studies (Boggon et al., 2002, Haussinger et al., 2004). It should be noticed that these data raise the question of specificity of cadherin interactions if the adhesive surface is based on structural elements conserved between classical and desmosomal cadherins. The cadherin N-terminal end seems to influence the dynamic of β -strand exchange. Indeed additional residues result in disturbed equilibrium between monomeric and dimeric conformations (Harisson et al., 2005b). In order to understand this process, we measured the kinetic properties of interaction between minimal functional E-cadherin fragment: E/EC12. The roles of Trp2 and N-terminal end were probed, resulting in qualitative and quantitative information on the molecular mechanism.

Enhanced arrest detection sensitivity

A previous study, using the Flow Chamber method, clearly showed the ability to probe single-molecule binding kinetics between cadherin fragments (Perret et al., 2002). This work determined an off-rate (0.5 s^{-1}) that has been validated by other experiments (Haussinger et al., 2004; Perret et al., 2004). Nonetheless, it was necessary to enhance the sensitivity in order to detect possible effect of Trp2 or Met-1 on fast kinetic components. The optimization described in this work reduced the minimal duration of detectable arrest (d_m) from 137 ms – according to the previous work – to 68 ms, for the same shear rate (8 s^{-1}). This resulted in a better detection of short arrests. The detachment curves revealed the complexity of the dissociation which could not be described by a first order reaction. This complexity of cadherin dissociation could already be suspected by considering Biomembrane Force Probe data (Perret et al., 2004). This enhancement in detecting short arrests allowed us the quantification of dissociation rates, in good agreement with those found by BFP

measurements, and to describe how Trp2 and an additional N-terminal amino acid influence the cadherin β -strand exchange.

A relevant mechanism

According to cadherin structure and binding affinity, Chen et al. (2005) suggested a mechanism pointing out general domain swapping properties of the cadherin interaction. Briefly, intramolecular binding of N-terminal β -strand and in particular Trp2 docking in a hydrophobic pocket stabilize the monomeric state in a “close” conformation. This conformation acts as a competitor of dimer formation, resulting in a weak binding affinity ($K_D = 0.72$ mM; Haussinger et al., 2004). The dimer formation is limited by a high energy transient state which is probably due to a destabilized N-terminal β -strand, supporting dimerization process by β -strand exchange. By approximating cadherin interaction as a first order reaction, the authors estimated free energies between monomeric, dimeric and transient states.

Experimental detachment curves presented in this study clearly showed that cadherin dissociation could not occur through a first order reaction, but by a more complex process. Then, the simplest way to fit these experimental data was by using a two states model. This assumption is in agreement with previous studies using biomembrane force probe that revealed two distinct binding states on the first two EC motifs of E- and C-cadherin (Perret et al., 2004, Bayas et al., 2006). The two corresponding off-rates for E-cadherin were about 10 s⁻¹ and 1 s⁻¹. Unfortunately, it was not possible, from experimental curves, to determine if this process is related to two independent or two successive binding states on the same reaction pathway. Other data, using different approaches, suggest that cadherin trans interaction between N-terminal motifs is achieved by a unique binding interface that involves the Trp2 (Boggon et al., 2002; Haussinger et al., 2002; Troyanovsky et al., 2003). Another interface, involving the calcium-binding region between EC1 and EC2 motifs, leads to a parallel conformation of both interacting molecules, without Trp2 involvement. Recent experiments suggest that this interface, with a dissociation rate (10^3 s⁻¹) too fast to be related to our experimental data (Haussinger et al., 2002), is most probably due to crystal artefact (Haussinger et al., 2004). On the contrary, β -strand exchange stability was estimated about 0.7 s⁻¹, which is in good agreement with our data (Haussinger et al., 2004). Then, if cadherin

interaction involves at least two states, they should correspond to two conformations of the same binding interface, suggesting that both bound states are on the same reaction pathway.

Trp2 and N-terminal end in the molecular mechanism of cadherin interaction

This β -strand exchange model was used as a frame to quantify the kinetic rates of cadherin interaction. An energy diagram was estimated from the E/EC12 affinity measured in solution ($K_D = 0.72$ mM; Haussinger et al., 2004) and our fitted kinetic rates. Due to the low force applied on the molecular bond (about 1-1.5 pN), we considered in first approximation these fitted rates as spontaneous dissociation rates (Fig. 8).

First, our measurements suggest that binding formation is limited by a high activation barrier. Moreover, our results showed that, the conserved Trp2 is directly involved in this process. Its mutation increased this activation barrier. By contrast, an additional Met-1 does not influence the activation energy. This suggests that the activation of the N-terminal β -strand from the monomeric conformation is partly regulated by the amino acid in position 2, but not by additional amino acids at the N-terminal end. Second, the energy difference between monomeric and both bound states is weak. As previously discussed by Chen et al. (2005), this should be due to the similar N-terminal strand interactions in both monomeric and β -strand exchange conformations, and our results suggest that both bound states share this property. In particular, according to the direct involvement of Trp2 in the first bound state formation and stability and the intermediate energy level, this intermediate state could be viewed as an incomplete β -strand exchange, which is related to an asymmetrical binding process. Both W2A mutation and additional Met-1 destabilize this intermediate complex, preventing a correct fitting of the contact interface (Harisson et al., 2005b). Surprisingly, transition from this intermediate state to the second one, as well as its stability, is weakly influenced by these molecular modifications. A potential explanation of this observation is that molecular adjustment involves other amino acids on the N-terminal strand.

Potential roles of asymmetrical intermediate complex in cadherin adhesive function

To our knowledge, the kinetic data presented in this study are the first experimental evidence of an asymmetrical process in the cadherin trans interaction. One advantage of this mechanism is that the asymmetrical intermediate state favours the formation of a second state,

more stable, as only one activated molecule is necessary to initiate this binding (see figure 8). This complexity in the interactions between cadherin extracellular segments was suggested by a tomography study of desmosomal plaques (He et al., 2003). The main structural properties of desmosomal cadherins ectodomain are similar to classical cadherins: five EC motifs, a conserved Trp2 and a potential hydrophobic pocket on EC1. The relative orientation of desmosomal cadherins was estimated by fitting their electron microscopy images with the x-ray C-cadherin ectodomain structure (Boggon et al., 2002). By doing so, an orientation where only one Trp2 seemed favourably oriented to the opposite hydrophobic pocket was found, suggesting an asymmetrical trans interaction. Even though these data are hypothetical, they suggest the occurrence of an asymmetrical complex at the cell surface.

Interestingly such asymmetrical trans dimer could be the basis for the initiation of adhesive plaques organisation. Indeed, the data presented in figure 8 strongly suggest that only one molecule is sufficient for the trans interaction, giving the other molecule the capability of interacting with a third one, then followed by the formation of a more complex oligomer. This hypothesis is reinforced by experimental data on desmosomes where trimers have been described as an asymmetrical dimer interacting with a third molecule (He et al., 2003). This observation is in agreement with the fact that cis and trans dimers are realized by the same interface (Trojanovsky et al., 2003). Taken together, such asymmetrical cadherin trans interaction mechanism is a potential molecular basis for multimolecular oligomerisation between cadherins ectodomains coming from opposite cell surfaces and leading to the formation of adhesive plaques.

ANNEXE I

The flow Chamber method allowed to measure unimolecular interaction by detecting beads arrests. Only one molecule in the contact area, on each surface, had to be active to achieve a molecular bond. If $p(i)$ is the probability that the molecule i is active and if N is the number of molecule in the contact area, then, the probability that at least one molecule is active in this contact area is given by:

$$P = 1 - (1 - p(i))^N$$

On the bead surface, the following approximations were verified: $N \gg 1$, $p(i) \ll 1$ and $N \cdot p(i) \ll 1$, then: $P_b \sim N \cdot p(i)$. On the mica surface, we had $N \cong 1$, then $P_m \sim p(i)$.

If the beads are coated with the molecule i and the mica surface with the molecule j , then the binding frequency vary as:

$$F(i,j) \sim N \cdot p(i) \cdot k^*_{on}(i) + p(j) \cdot k^*_{on}(j)$$

where $k^*_{on}(i)$ is the on-rate of an active molecule i interacting with a molecule j , and $k^*_{on}(j)$ the on-rate of an active molecule j interacting with a molecule i , respectively.

Considering the interaction between two E/EC12 molecules or between two E/W2A molecules, we have respectively:

$$\begin{aligned} F(E,E) &\sim (N+1) \cdot p(E) \cdot k^*_{on}(E) \sim N \cdot p(E) \cdot k^*_{on}(E) \\ F(W,W) &\sim (N+1) \cdot p(W) \cdot k^*_{on}(W) \sim N \cdot p(W) \cdot k^*_{on}(W) \end{aligned}$$

As $F(E,E) / F(W,W) \cong 2$, we could deduce that:

$$\begin{aligned} F(E,W) &\sim (N+1/2) \cdot p(E) \cdot k^*_{on}(E) \sim F(E,E) \\ F(W,E) &\sim (N+2) \cdot p(W) \cdot k^*_{on}(W) \sim F(W,W) \end{aligned}$$

References

Bayas MV, Leung A, Evans E, Leckband D. Lifetime measurements reveal kinetic differences between homophilic cadherin bonds.

Biophys J. 2006 Feb 15;90(4):1385-95.

Blaschuk OW, Sullivan R, David S, Pouliot Y. Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence.

Dev Biol. 1990 May;139(1):227-9.

Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms.

Science. 2002 May 17;296(5571):1308-13.

Chappuis-Flament S, Wong E, Hicks LD, Kay CM, Gumbiner BM. Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion.

J Cell Biol. 2001 Jul 9;154(1):231-43.

Chen CP, Posy S, Ben-Shaul A, Shapiro L, Honig BH. Specificity of cell-cell adhesion by classical cadherins: Critical role for low-affinity dimerization through beta-strand swapping.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 14;102(24):8531-6.

Harrison OJ, Corps EM, Berge T, Kilshaw PJ. The mechanism of cell adhesion by classical cadherins: the role of domain 1.

J Cell Sci. 2005 Feb 15;118(Pt 4):711-21. Epub 2005 Jan 25.

Harrison OJ, Corps EM, Kilshaw PJ. Cadherin adhesion depends on a salt bridge at the N-terminus.

J Cell Sci. 2005 Sep 15;118(Pt 18):4123-30.

Haussinger D, Ahrens T, Sass HJ, Pertz O, Engel J, Grzesiek S. Calcium-dependent homoassociation of E-cadherin by NMR spectroscopy: changes in mobility, conformation and mapping of contact regions.

J Mol Biol. 2002 Dec 6;324(4):823-39.

Haussinger D, Ahrens T, Aberle T, Engel J, Stetefeld J, Grzesiek S. Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography.

EMBO J. 2004 Apr 21;23(8):1699-708.

He W, Cowin P, Stokes DL. Untangling desmosomal knots with electron tomography.

Science. 2003 Oct 3;302(5642):109-13.

Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization.

Nature. 1996 Mar 28;380(6572):360-4.

Noe V, Willems J, Vandekerckhove J, Roy FV, Bruyneel E, Mareel M. Inhibition of adhesion and induction of epithelial cell invasion by HAV-containing E-cadherin-specific peptides.

J Cell Sci. 1999 Jan;112 (Pt 1):127-35.

Nollet F, Kools P, van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members.

J Mol Biol. 2000 Jun 9;299(3):551-72.

Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species.

EMBO J. 1989 Jun;8(6):1711-7.

Ozawa M, Kemler R. Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin.

J Cell Biol. 1990 Oct;111(4):1645-50.

Perret E, Benoliel AM, Nassoy P, Pierres A, Delmas V, Thiery JP, Bongrand P, Feracci H. Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis.

EMBO J. 2002 Jun 3;21(11):2537-46.

Perret E, Leung A, Feracci H, Evans E. Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Nov 23;101(47):16472-7.

Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J. A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation.

EMBO J. 1999 Apr 1;18(7):1738-47.

Pierres A, Feracci H, Delmas V, Benoliel AM, Thiery JP, Bongrand P. Experimental study of the interaction range and association rate of surface-attached cadherin 11.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Aug 4;95(16):9256-61.

Pierres A, Benoliel AM, Zhu C, Bongrand P. Diffusion of microspheres in shear flow near a wall: use to measure binding rates between attached molecules.

Biophys J. 2001 Jul;81(1):25-42.

Pierres A, Touchard D, Benoliel AM, Bongrand P. Dissecting streptavidin-biotin interaction with a laminar flow chamber.

Biophys J. 2002 Jun;82(6):3214-23.

Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes.

Mol Cell Biol. 1994 Dec;14(12):8333-42.

Shan WS, Koch A, Murray J, Colman DR, Shapiro L. The adhesive binding site of cadherins revisited.

Biophys Chem. 1999 Dec 13;82(2-3):157-63.

Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins.

Nature. 1995 Mar 23;374(6520):327-37.

Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M, et al. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes.

J Cell Biol. 1995 Mar;128(5):949-57.

Sivasankar S, Gumbiner B, Leckband D. Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains.

Biophys J. 2001 Apr;80(4):1758-68.

Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis.

Development. 1988 Apr;102(4):639-55.

Tamura K, Shan WS, Hendrickson WA, Colman DR, Shapiro L. Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin.

Neuron. 1998 Jun;20(6):1153-63.

Tomschy A, Fauser C, Landwehr R, Engel J. Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains.

EMBO J. 1996 Jul 15;15(14):3507-14.

Troyanovsky RB, Sokolov E, Troyanovsky SM. Adhesive and lateral E-cadherin dimers are mediated by the same interface.

Mol Cell Biol. 2003 Nov;23(22):7965-72.

Troyanovsky S. Cadherin dimers in cell-cell adhesion.

Eur J Cell Biol. 2005 Mar;84(2-3):225-33.

Yap AS, Kovacs EM. Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane.

J Cell Biol. 2003 Jan 6;160(1):11-6.

	E/EC12	E/W2A	M-E/EC12
k_{10}	3,9 s ⁻¹	5,2 s ⁻¹	5,6 s ⁻¹
k_{12}	2,2 s ⁻¹	1,5 s ⁻¹	2,0 s ⁻¹
k_{21}	0,9 s ⁻¹	0,8 s ⁻¹	1,1 s ⁻¹
χ^2	11,40	5,61	9,09

Table 1: Fitted kinetics for the three cadherin fragments.

The experimental distributions of bead arrest durations were fitted to a theoretical model (Materials and Methods) using χ^2 minimization. Fitted values of the dissociation rate of the intermediate state (k_{10}) as well as the formation (k_{12}) and dissociation (k_{21}) of the second state are shown. Minimum χ^2 values are also shown.

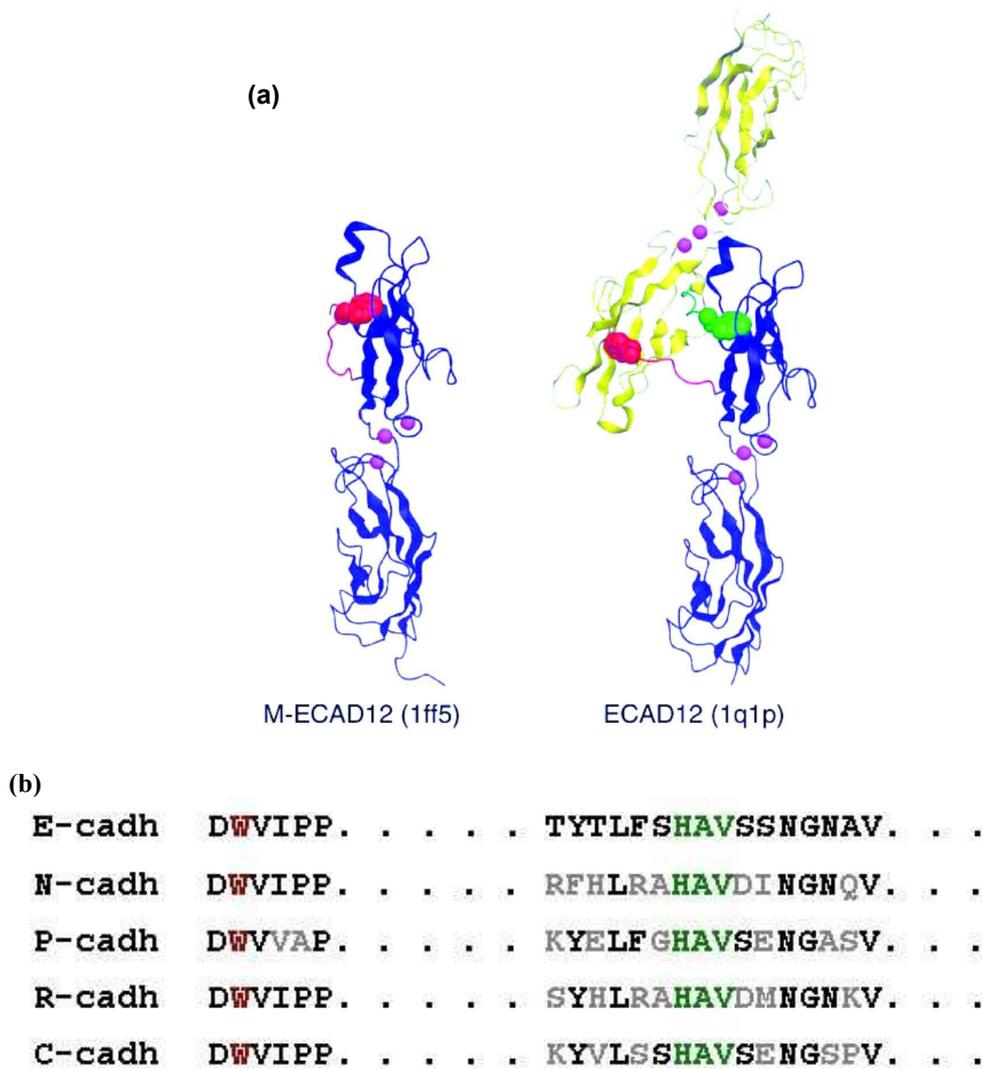


Figure 1: (a) Cristallographic data of Trp2 docking in hydrophobic pocket.

An intramolecular docking was observed in the monomeric conformation of M-ECAD12 (Pertz et al., 1999), while intermolecular docking observed in the dimeric conformation of ECAD12 (Haussinger et al., 2004). (b) Sequence alignments of classical/type I cadherins (E-, N-, P-, R-, C-cadherins). All sequences are human, except for C-cadherin, which is from *Xenopus Laevis*. Trp in position 2 and HAV sequence that is part of the hydrophobic pocket are coloured in red. All amino acids different from E-cadherin sequence are coloured in grey.

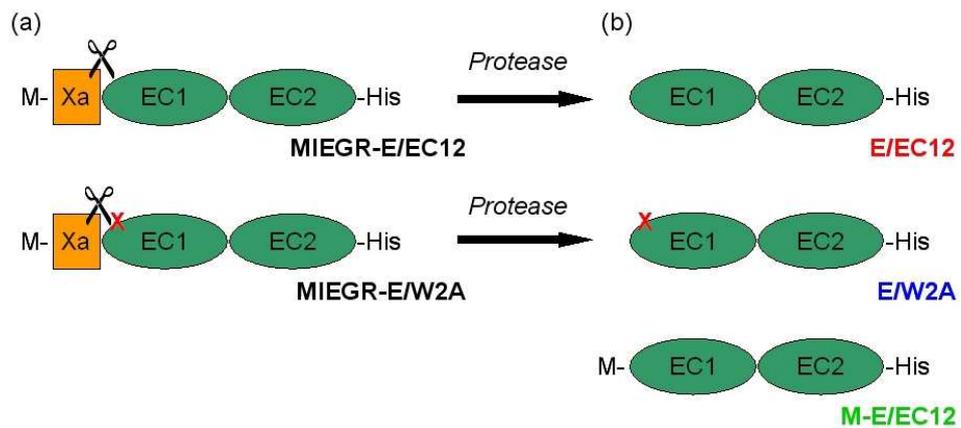
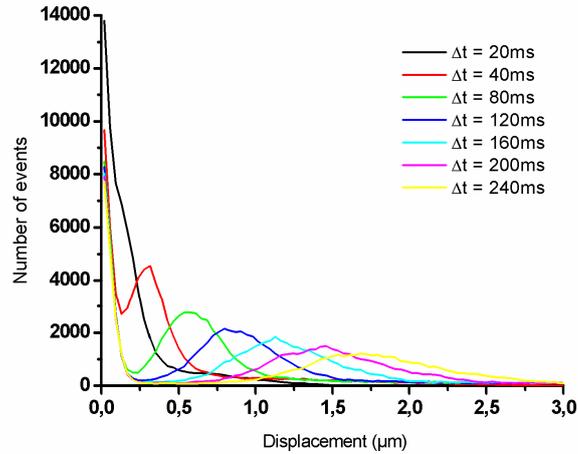


Figure 2: Cadherin fragments.

(a) Schematic representation of murine E-cadherin constructs used in this study. All chimeric proteins comprise the two outermost EC motifs and a polyhistidine tag at the C-terminal end. A specific sequence allowing cleavage by the Factor Xa protease was introduced at the N-terminal end, giving rise to the native cadherin N-terminal end following proteolytic digestion. A point mutation changed the conserved Trp2 into Ala (W2A). M-E/EC12 did not contain the cleavage site and bore an additional Met at the N-terminal end (b) Purified cadherin fragments used for kinetic studies.

(a)



(b)

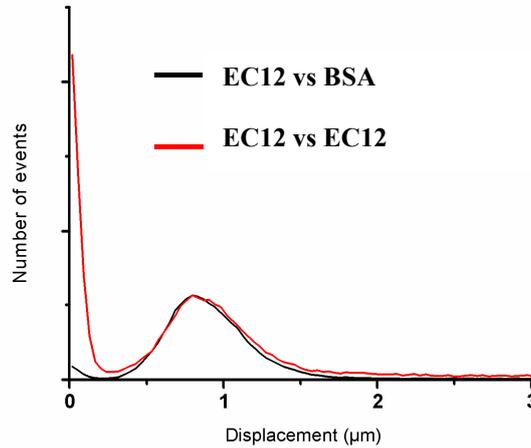


Figure 3: Distributions of particle displacements

a) Distributions of particle displacements (μm) measured over different periods of time Δt . Example of beads covered by EC12 driven over mica surfaces covered by EC12, with $G = 7 \text{ s}^{-1}$. The left part, near zero, did not vary when Δt increased and represented the arrested beads. $\xi = 0.31 \mu\text{m}$ was chosen as the upper limit of interacting particles displacement. The right part, which is distributed around an average value that globally varies linearly with Δt , represented the moving beads. This observation indicated that the free particle motion is mainly driven by hydrodynamic flow. $\tau = 120 \text{ ms}$ was chosen as the minimal duration to separate these two parts.

b) These displacement distributions were obtained for beads covered by EC12 and driven over a surface covered by EC12 or BSA ($G = 7 \text{ s}^{-1}$). These displacements were measured for a period of time of 120 ms and the distributions were composed by more than 120000 events for each configuration. The two experimental plots were readjusted to display the same number of moving particles. By doing so, it was obvious that the distribution related to moving particles was similar for both configurations. For beads driven over a BSA coated mica surface, the portion of distribution related to interacting particles was negligible.

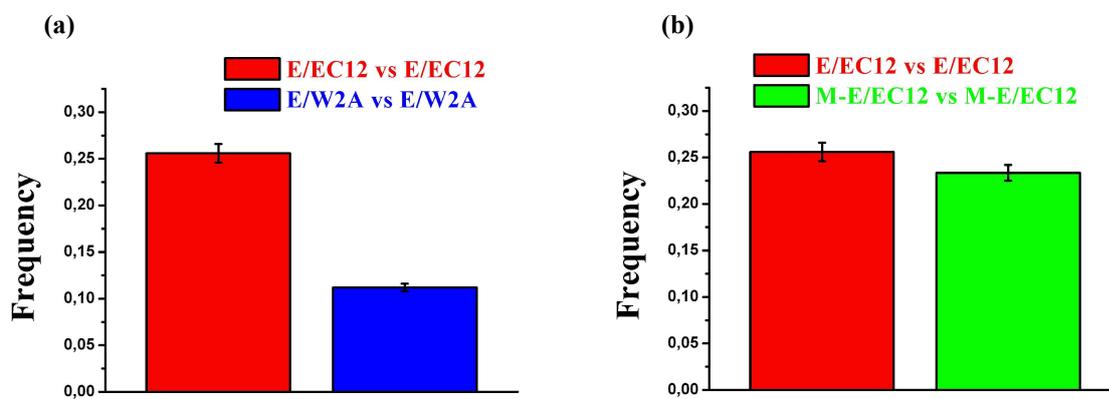


Figure 4: Binding frequency of trans interaction between E-cadherin fragments.

(a) Binding frequency of E/EC12 beads driven along a E/EC12-coated surface, obtained by recording the number of interactions divided by the total duration of flowing beads near the coated mica surface, in s^{-1} . Comparison with E/W2A strongly suggested that Trp2 was directly involved in bond formation, while (b) additional Met-1 did not significantly modify binding frequency. Errors are given by standard deviation.

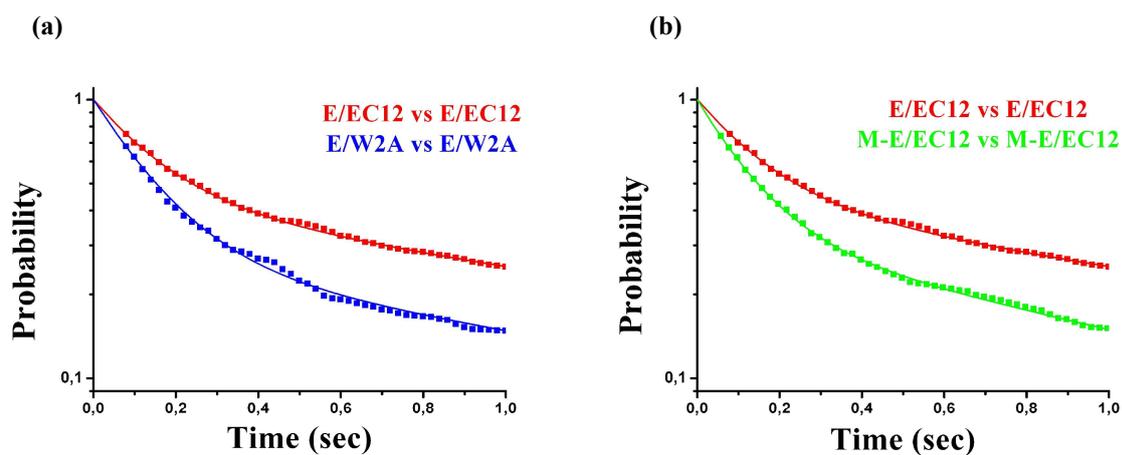


Figure 5: Stability of trans interaction between E-cadherin fragments.

Probability of surviving bonds was given as a function of time. These semi-log graphs clearly showed that dissociation did not occur as a first order reaction. Experimental data (squares) were fitted with a two successive bound states model (lines). E/EC12 compared with E/W2A interactions (a) showed that Trp2 is directly involved in bond stability. The comparison with M-E/EC12 (b) indicated a destabilisation due to the additional N-terminal Met-1.

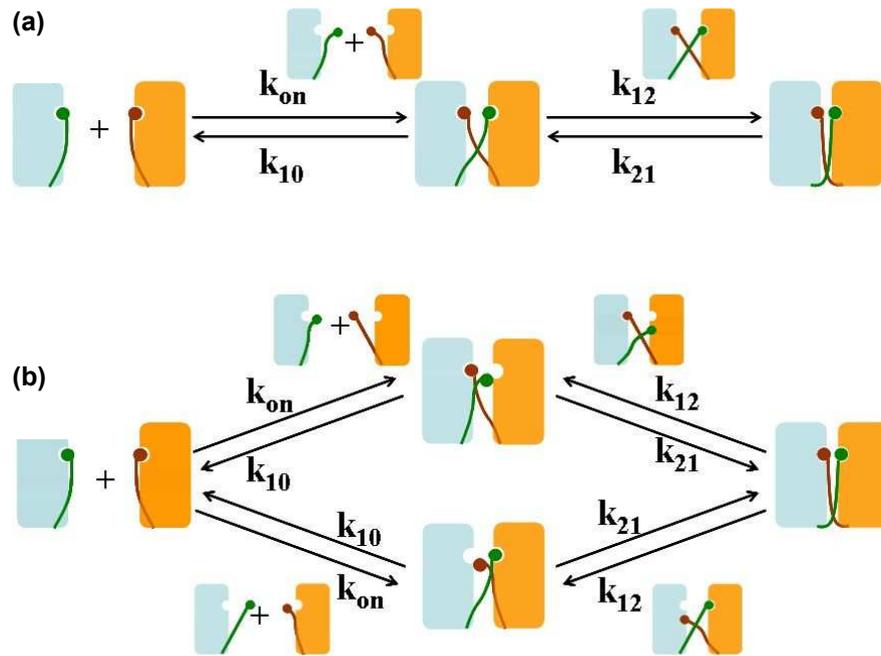


Figure 6: Two putative molecular mechanisms of trans interaction between EC1 motifs of E-cadherin.

In this schematic representation, the Trp2 (●, a ball at the N-terminal end) flips in or out of a cavity drawn in the core of the EC1 motif. While two molecules interact through a single pathway in the symmetrical process (a), two distinct pathways are possible in an asymmetrical process (b). These two mechanisms could be distinguishable by using surfaces made of two slightly different molecules, thus favouring one of those pathways. By contrast, this protocol should not result in any kinetic difference in the case of a symmetrical molecular process.

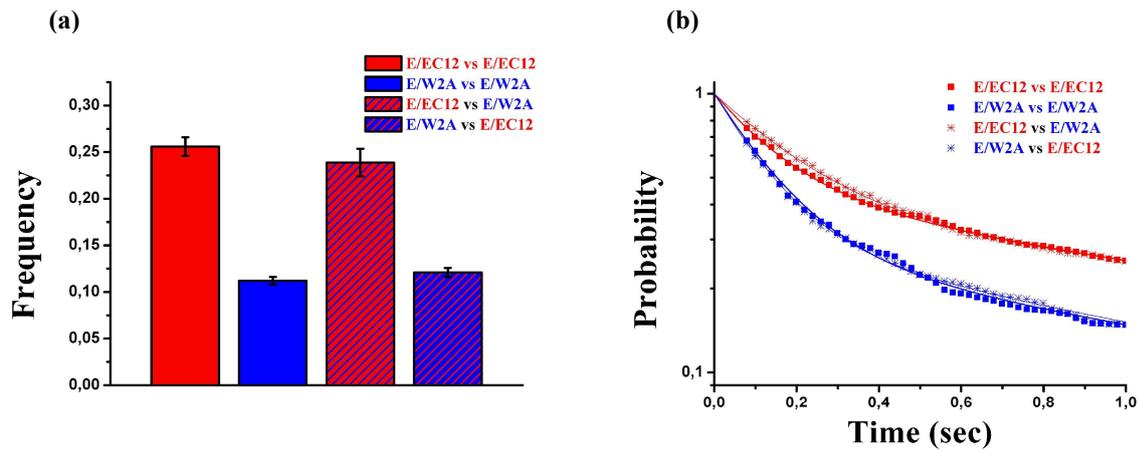


Figure 7: Experimental evidence of molecular asymmetrical process of cadherin trans interaction.

(a) Trans interactions between E/EC12 and E/W2A (hetero-interaction) displayed two distinct binding frequencies, depending on surface coating. This clearly showed that molecular binding was achieved by a asymmetrical process. Moreover, compared with the trans interaction between two E/EC12 molecules, or between two E/W2A molecules, these data suggested that hetero-interaction was driven by the densest molecule, that is the protein on the beads . (b) Stability of hetero-interaction also depended on the densest protein.

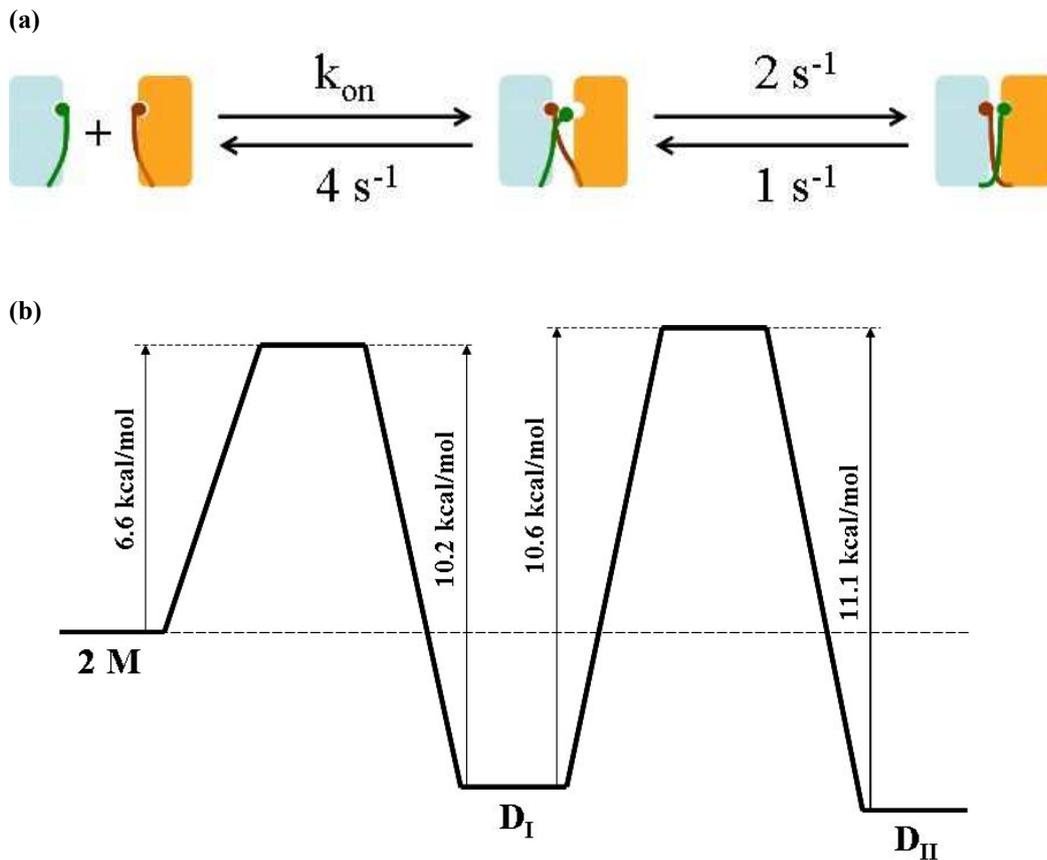


Figure 8: Molecular mechanism of the E/EC12 trans interaction.

(a) In this picture, a potential conformation of N-terminal β -strand is drawn as a dark line. Trp2 docking in the EC1 hydrophobic pocket is represented by the disc at the N-terminal end, in or out of a cavity drawn in the core of EC1. The β -strand exchange between two EC1 motifs is achieved by an asymmetrical process, and the Trp2 is directly involved in this trans interaction. According to a two states mechanism, this Trp2 is also involved in the global stability, and in particular in the intermediate state dissociation rate. (b) Free energy diagram estimated from equilibrium affinity in solution and kinetic measurements.

Article II : Folding maturation of the E-cadherin monomer modulated by cooperative binding of calcium ions

Folding maturation of the E-cadherin monomer modulated by cooperative binding of calcium ions

*Olivier Courjean, ‡Guillaume Chevreux, *§Emilie Perret, *#Anne Morel, ‡Sarah Sanglier, ‡Noelle Potier, ¶Jürgen Engel, ‡Alain van Dorsselaer, *•Hélène Feracci

*Morphogenèse cellulaire et progression tumorale, Institut Curie Section de Recherche, CNRS UMR 144, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 5, France

‡Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, ECPM - Université Louis Pasteur - UMR CNRS 7512, 25 rue Becquerel 67087 Strasbourg Cedex 2, France

¶Department of Biophysical Chemistry Biozentrum Universitaet Basel Klingelbergstrasse 70 CH 4056 Basel, Switzerland

§Present address: Dept. of Ophthalmology, Weill Medical College of Cornell University, M. Dyson Vision Research Institute, 1300 York Avenue, New York, NY 10021, USA

#Present address: Université Montpellier II, CNRS UMR 5539 CC107 Bat 24, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

• corresponding author

Running title: Cadherin folding and Ca²⁺ cooperative binding

Key words: E-Cadherin; calcium binding; cooperativity; folding

Word count: 8850

Summary

Classical cadherins comprise transmembrane glycoproteins involved in calcium-dependent cell-cell adhesion. Calcium ions are coordinated at the interface between successive modules of the ectodomain. Whereas it is widely accepted that calcium plays a critical role in cadherin mediated cell-cell adhesion, controversial data still exist about cadherin-calcium binding affinities. In order to investigate further the parameters of non-covalent calcium-cadherin binding, we used the N-terminal two modules of epithelial cadherin (E/EC12) and electrospray ionization mass spectrometry. We demonstrated that three calcium ions exhibit a high binding affinity ($K_D=23 \mu\text{M}$), and we also showed that these properties are not modified by an additional N-terminal methionine. We provided the first evidence that this binding occurs cooperatively on E/EC12 in its monomeric state, then inducing specific structural changes assessed by protease sensitivity and circular dichroism. Our findings were supported further by the D103A mutation (a residue involved in E-cadherin adhesive function), which led to modified calcium binding properties, loss of cooperativity and no structural changes despite calcium binding. Since the amino acids involved in calcium binding are sequence features of the cadherin motif, our findings might be relevant to other members of the cadherin family.

Introduction

Cell-cell interactions play crucial roles in cell differentiation, tissue morphogenesis as well as signal transduction (Takeichi, 1995; Pla et al., 2001). These interactions appear to be mediated by the specific contacts of adhesion receptors on opposing cell membranes (Gumbiner, 1996). These receptors comprise different classes of molecules that are responsible for various mechanisms of cellular adhesion. Amongst them, cadherins are unique in that they are responsible for Ca^{2+} -dependent adhesion between cells (Kemler, 1992; Steinberg and McNutt, 1999; Nagafuchi et al., 2001). Classical cadherins include about twenty single-pass transmembrane glycoproteins that have been identified as major receptors involved in homophilic intercellular adhesion (Nollet et al., 2000). Their extracellular segment is made of 5 similar tandemly arranged cadherin domains (EC^1) named EC1 to EC5 starting from the N-terminal end. These domains share sequence homologies and exhibit an Ig-like structure consisting of seven antiparallel β -strands organized in two opposing sheets (Overduin et al., 1995; Shapiro et al., 1995; Patel et al., 2003). The cytoplasmic part of cadherins interacts with the actin network via soluble proteins that could be involved in different signalling pathways. At the cellular level, the adhesive activity of cadherins is regulated by several mechanisms including activation by cleavage, levels of protein expression at the plasma membrane, recruitment to cell contact zones, internalization, cadherin calcium binding and interactions with the cytoskeletal network (Ozawa and Kemler, 1990; Koch et al., 1999; Duguay et al., 2003; Häussinger et al., 2004; Gumbiner, 2005).

Questions underlying most, if not all, attempts in understanding cadherin-mediated adhesion at a molecular level are related to determinants of cadherin specificity and to the role of

¹ Abbreviations: EC: extracellular domain of cadherins; EC12: the two outermost extracellular domains of cadherins; EC15: the five extracellular domains of cadherins; E/EC12 and E/EC15: the E-cadherin EC12 and EC15 fragments, respectively; MR-E/EC12 or M-E/EC12: E-cadherin EC12 fragments containing additional Met-Arg- or Met- amino acids at the N-terminal end compared to the native sequence.

calcium in cadherin-mediated interactions (Nose et al., 1990; Koch et al., 1999; Trojanovsky, 2005). Historically, the study of calcium-dependent cell adhesion allowed the discovery and characterization of the first cadherin, namely the E(epithelial)-cadherin formerly known as uvomorulin. These early studies show the essential involvement of E-cadherin during compaction of embryonic cells, together with calcium ions. From cell aggregation studies, it has been confirmed that calcium is essential for E-cadherin-mediated adhesion, which is reversibly inactivated by EDTA (Nose et al., 1988). All members of the classical cadherins share a number of conserved features, namely a very similar domain organization and certain key residues, many of them involved in Ca^{2+} binding (Nollet et al., 2000). Mutations in these Ca^{2+} binding sites modify the adhesive function of E-cadherin. Mutation of Asp134 to Ala or Lys in the DXD motif of EC2 changed trypsin sensitivity and abolished the adhesive function of murine E-cadherin (Ozawa et al., 1990). Mutations of the DXXD motif to DXXA in EC1 (Asp103 to Ala) or in EC2 of E-cadherin also result in markedly reduced homophilic adhesion (Handschuh et al., 2001).

It is currently accepted that cadherin-mediated cell adhesion is dependent on the presence of millimolar calcium ion concentrations as found in the extracellular milieu (Hofer, 2005). This calcium binding is thought to be a putative regulator of cadherin adhesive efficiency (Alattia et al., 1997; Koch et al., 1999). EM studies suggest that to fulfil this function, cadherins have first to undergo cis-interactions in order to be able to subsequently form trans-interactions and Ca^{2+} concentration seems to regulate this two-step process (Tomschy et al., 1996; Pertz et al., 1999). Calcium is indeed required for cadherin structure and, in the presence of millimolar Ca^{2+} concentration, the extracellular E-cadherin segment (E/EC15) adopts a 22-nm long protease-resistant rod-like shape (Pokutta et al., 1994; Boggon et al., 2002). The high-resolution structure of the two-domain fragment of E- and N-cadherin (EC12) and of the EC15 extracellular fragment of C-cadherin reveals that each binding pocket has a similar

organization and that twelve Ca^{2+} ions are bound in the complete structure (Patel et al., 2003; Trojanovsky, 2005 for reviews). Each Ca^{2+} binding pocket is made of structural elements from two successive domains and the amino acids involved in this binding have been identified. In the presence of calcium, the secondary structure of a cadherin module exhibits a large fraction of β -barrel structure, as revealed by circular dichroism spectroscopy. In EDTA, changes in spectra suggested modifications in the secondary structure (Koch et al., 1997).

Calcium binding properties to the extracellular E-cadherin domain have been evaluated by using different methodologies. The mean K_D of the whole extracellular domain (E/EC15) comprising four calcium-binding pockets were from 30 μM to 150 μM (Pokutta et al., 1994; Koch et al., 1997) depending on the methodology. Calcium binding affinities to MR-E/EC12 displayed an average K_D of about 25 μM for the 3 Ca^{2+} binding sites (Alattia et al., 1997), which is in contrast to an average K_D of 460 μM obtained for M-E/EC12 (Koch et al., 1997). This latter study pointed out that a low affinity calcium-binding site (K_D of 2 mM) could provide a putative physiological regulation of adhesive function by external calcium. These controversial data about cadherin-calcium binding affinities led us to investigate precise mechanisms of this calcium-induced regulation.

In the present work, we chose to focus on the outermost binding pocket where a low affinity binding site is thought to be the key regulation site of E-cadherin adhesive activity. We used electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) as a powerful approach to study non-covalent interactions formed in solution (Hu et al., 1994; Doherty-Kirby and Lajoie, 2002) between Ca^{2+} and cadherin fragments and we followed the structural rearrangements as a consequence of the binding of these ions. Numerous studies convincingly showed that under carefully controlled conditions, non-covalent complexes can survive the ionization/desorption process and the technique has proved an evident ability to provide precious information concerning stability and stoichiometry of the associations formed in solution (Loo, 1997; Loo,

2000; Heck and van Den Heuvel, 2004). Because of its unique advantage to detect all species co-existing in solution, ESI-MS has been often used to follow protein-protein association/dissociation pattern upon ligand addition or to probe cooperativity effects (Hu et al., 1994; Rogniaux et al., 2001; Chevreux et al., 2005). Our findings demonstrated that three calcium ions exhibit a mean high binding affinity (23 μ M) to the EC12 interdomain pocket. This argues against a physiological regulative role of extracellular calcium, which is in the millimolar range (Caroppo et al., 2001), in cadherin-mediated cell interactions, considering this interdomain calcium-binding pocket. We also investigated the consequences of an additional N-terminal methionine and/or a point mutation in this calcium-binding pocket (D103A). Our studies revealed that additional Met does not significantly influence Ca^{2+} binding, despite potentially modifying cadherin interaction (Haussinger et al., 2004). By contrast, the Asp 103 plays an essential role in this binding. Our data indicated for the first time that calcium binding occurs cooperatively on the E/EC12 cadherin fragment in its monomeric state, then inducing specific changes in the structural arrangement. Our data complement structural and biochemical studies (Alattia et al., 1997; Koch et al., 1997; Pertz et al., 1999; Haussinger et al., 2002; Harrison et al., 2005) and provide a new perspective in our understanding of calcium-dependent adhesion mediated by cadherins.

Experimental Procedures

Plasmid constructions

The plasmid constructs coding for the first two extracellular domains M-E/EC12 fused with the histidine tag in C-terminal position were previously described (Perret et al., 2002). The obtained sequences were cloned in the pET24a expression vector (Novagen) using the XhoI /

NdeI site. Due to the cDNA construct, the corresponding protein contains an additional methionine in first position. A point mutation was introduced in the M-E/EC12 sequence and the M-E/D103A fragment was generated by using the QuickChangeTM site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and the following primers: D103A 5'-GTG ACA GAT CAG AAT GCC AAC AGG CCA-3' and 5'-TGG CCT GTT GGC ATT CTG ATC TGT CAC-3'. The constructs coding for the cleavable proteins MIEGR-E/EC12 and MIEGR-E/D103A were realised in two steps. First, intermediate constructs were obtained by cloning the first part of the sequence coding for HisXa-ECAD12, kindly provided by Thomas Ahrens/J. Engel (Haussinger et al. 2004). DNA fragments were cloned from pET19b(HisXa-ECAD12) plasmid into the pET24a(M-E/EC12) or pET24a(M-E/D103A) plasmids respectively, using the BglIII / EcorI sites and resulting in sequences coding for HisXa-E/EC12 and HisXa-E/D103A respectively. Then the fragments coding for MIEGR-E/EC12 and MIEGR-E/D103A were cloned from the previous plasmids in a pET24a plasmid using the XhoI / NdeI site. Prior to proteins expression, the cDNA constructs were sequenced to verify that undesirable mutations had not arisen during cloning.

Protein expression and purification

In order to produce the following chimeric proteins: M-E/EC12, M-E/D103A, MIEGR-E/EC12 or MIEGR-E/D103, Terrific Broth cultures media of 500 ml containing 50 µg/ml kanamycin were inoculated with transformed colonies picked up from agar plates. Cultures were grown at 37°C until an optical density at 600 nm of 0.6-0.8 was reached. Expression was induced by the addition of 1.7 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside. After 2 hours, cells were harvested and stored at -80°C. Cell pellets were resuspended in lysis buffer (4 M urea; 50 mM Na₂HPO₄ pH 7.8; 20 mM imidazole and 20 mM β-mercaptoethanol). The lysates were clarified by centrifugation at 10,000 g for 20 minutes and the supernatant incubated for 2

hours with Ni-NTA agarose resin beads (Qiagen). The beads were extensively washed with lysis buffer and then subjected to stepwise dialysis against PBS. Cadherin fragments were eluted with 0.25 M imidazole.

Factor Xa protease digestion of 1mg of MIEGR-E/EC12 or MIEGR-E/D103A chimeric proteins (in 1mL Tris 20mM, NaCl 50mM, CaCl₂ 1mM, pH6,5 with 50U (Qiagen), during 60h at 16°C) was stopped by removing Factor Xa enzyme using Xa Removal Resin (Qiagen) and then dialysed against Tris 20mM, NaCl 150mM pH8 using Amicon Ultra 15, cut off 10kDa (Millipore) in order to remove Ca²⁺ ions and cleaved peptide. The cleaved proteins are noted E/EC12 and E/D103A respectively.

Protein concentration was determined spectrophotometrically by absorbance measurements at 280 nm, after dialysis in order to remove imidazole. The molecular mass and the absorbance coefficient of each protein were evaluated on the basis of amino acid composition using ProtParam tool, provided by ExPaSy web site (<http://expasy.ch>).

SDS PAGE and Western Blot

After purification and quantification, the cadherin fragments were first analyzed by 15% SDS-PAGE, followed by Coomassie blue staining. Moreover, all proteins were characterized by western blot, after transfer onto a PVDF membrane (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore) using a tank system. Two different primary antibodies were used: one directed against the EC1 module of E-cadherin (ECCD2, Takara), one against the C-terminal histidine tag (His Probe H-15, Santa Cruz Biotechnology). The respective secondary antibodies were HRP-linked whole antibodies (Amersham Biosciences), allowing a photochemical revelation using the ECL system (Amersham Biosciences).

Mass spectrometry

Prior to mass spectrometry experiments, non volatile salts were removed by exchanging the purification buffer of samples against ammonium acetate buffer (purity >99%, Fluka Biochemica) 50 mM, pH 7.0. Ammonium acetate enables native structure of proteins to be preserved and is compatible with ESI-MS analysis (Ganem et al., 1991). For doing so, proteins were dialysed by several runs at 10,000 rpm using 10 kDa PES Vivaspin microconcentrator (Vivascience, Hannover, Germany) at 4°C. Each run reduced the protein solution in volume and the sample then was diluted with ammonium acetate buffer to the initial volume. With these conditions, each run corresponded to a dilution factor of 5 of the initial buffer in ammonium acetate buffer. A series of 5 runs was repeated twice, using a new microconcentrator membrane. It must be noticed that during this concentration process, the protein concentration was always kept lower than the protein dimerization K_D . Deionized water (18.2 M Ω) used in all buffers was generated from a water filtering device (Millipore, Bedford, USA).

Mass analyses were performed using an ESI-TOF mass spectrometer (LCT, Micromass, Manchester, UK) calibrated with horse heart myoglobin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Samples were continuously infused into the ESI ion source at a flow rate of 3 μ l/minute. Both gas and source temperature were set at 353 K. Spectra were deconvoluted using the “transform” function provided by the MassLynx software.

For analysis in denaturing conditions, samples were diluted to 2 pmol/ μ l in a 1:1 water-acetonitrile mixture (v/v) acidified with 1% formic acid and standard interface parameters were used to obtain best mass accuracy.

For analysis in non-denaturing conditions, samples were directly infused in AcNH₄ 50 mM, pH 7.0, interface parameters were optimized to obtain the best sensitivity and spectrum quality without affecting the non-covalent complexes stability. The accelerating voltage applied on the sample cone (V_c) ranged from 30 to 80 V and pressure in the interface was set at 5 mbar. Pressure and V_c are parameters controlling the energy given to ions in the interface of the mass spectrometer and must be optimized in each cases.

Ca²⁺ titration monitored by mass spectrometry: the E/EC12, E/D103A, M-E/EC12 and M-E/D103A samples were incubated with several Ca²⁺ concentrations (added in solution from a 10 mM Ca(Ac)₂ solution) and stoichiometry deduced using mass spectrometry in non-denaturing conditions. These experiments were performed at two different protein concentrations (5 μM and 15 μM) and at a Ca²⁺ concentration ranging from 0 to 300 μM. For each measurement, the protein was previously incubated 20 minutes with the corresponding Ca²⁺ concentration.

The free Ca²⁺ concentration in solution was calculated by subtraction of bound Ca²⁺ ions to the total amount of Ca²⁺ ions in solution. The quantity of bound Ca²⁺ ions was obtained by considering Ca²⁺ binding stoichiometries and assuming that Ca²⁺-free and Ca²⁺-saturated cadherin fragments display the same mass spectrometry response factor.

Binding specificity was tested by incubating 15 μM EC12 fragment with several divalent metal ions (135 μM, 9 eq) and the binding stoichiometries were deduced using mass spectrometry in non-denaturing conditions. The divalent metal ions used were the following: Ca²⁺ (calcium acetate, >99%, Sigma), Cd²⁺ (cadmium acetate-2-hydrate, >99%, Riedel-de Haën), Mn²⁺ (manganese (II) acetate tetrahydrate, >99%, Fluka Chemica) and Mg²⁺ (magnesium acetate tetrahydrate, >99%, Fluka Chemica). For each measurement, the protein was previously incubated 20 minutes with the corresponding metal ions.

Trypsin sensitivity

About 5 μg of purified cadherin fragments were incubated with 10 mM Tris, pH 8.0 with CaCl₂ concentrations varying from 0.02 mM to 20 mM, or with 5 mM EDTA for 20 minutes. The protein solutions were then incubated in a final volume of 40 ml with 90 U of trypsin-agarose beads (Sigma), during 1 hour, at 37°C, under shaking (400 rpm, Thermomixer Comfort, Eppendorf). Proteolysis was stopped by adding a trypsin inhibitor (leupeptin

hemisulfate, ICN Biomedicals Inc). Samples were then analysed by 15% SDS-PAGE and Coomassie blue staining.

CD measurements

Circular dichroism (CD) spectra at 20°C in a solution containing 20 mM HEPES, 150 mM NaCl (pH 7) were determined by using a Jasco 810 spectropolarimeter with quartz cells of 1 mm path length. Protein concentration was 0.2 mg/ml. Spectroscopic studies of structural modifications were performed by adding aliquots of Ca²⁺ stock solutions to the Ca²⁺ depleted protein, up to 1 mM final Ca²⁺ concentration. The reversibility of the Ca²⁺-induced modifications was studied by measuring CD signal after addition of EDTA in the previous protein solution, up to 2 mM final EDTA concentration. The spectra were determined by subtracting the background due to the buffer signal.

Results

Expression and characterization of recombinant E-cadherin fragments

In order to study Ca²⁺ binding properties of the outermost E-cadherin interdomain pocket, we used a pair domain fragment EC12 consisting of the two outermost E-cadherin domains that comprised the first Ca²⁺ binding pocket (Fig. 1A). Structural data have identified the amino acids involved in calcium binding and we knew from these studies that Asp103 is involved in the coordination of the two outermost calcium ions (Fig. 1B; Nagar et al., 1996). One specific point mutation, Asp103 changed in Ala, was introduced with the goal of precisely addressing the influence of Ca²⁺ binding. This fragment was designed in the present work to exhibit modified properties for Ca²⁺ binding (see below). According to the relationship observed between Ca²⁺ binding, additional amino acids at the N-terminal end and EC1 domain stability, we decided to determine the influence of an additional Met, at this N-terminal end, on the

Ca²⁺ binding. In order to address these questions four chimeric proteins: E/EC12, E/D103A, M-E/EC12 and M-E/D103A, were studied (Fig. 1C).

Figure 1

In order to obtain relevant quantitative results on Ca²⁺ binding and to evaluate the structural consequences of this binding, we needed sufficient amounts of cadherin fragments with a high level of purity. All four recombinant proteins were overexpressed in *E. coli* as they do not contain glycosylation motifs, then extracted from inclusion bodies and affinity purified on nickel-NTA-Sepharose beads using their hexahistidine tag. Furthermore, we used SDS-PAGE (Fig. 2A), Western blotting (data not shown) and ESI-MS (Fig. 2B-E) to characterize these protein fragments and assess their purity.

Figure 2

As shown in Fig. 2A, only one protein band was detected by Coomassie staining. The apparent molecular masses on SDS-PAGE were about 33 kDa (Figs. 2A, 7), which is higher than the theoretical masses calculated from their primary structures (about 25 kDa, see below).

The homogeneity of our fragments was also checked using ESI-MS. Figures 2B-E show typical multiply-charged ESI-mass spectra. Charge state distributions observed under denaturing and non-denaturing conditions are completely different and related to the conformation adopted by the protein (Felitsyn et al., 2002). Indeed, it has been described that unfolded proteins display more solvent exposed amino acids available for protonation than folded ones, yielding ESI-ions displaying a higher number of charges (lower m/z). Such a variation in charge state distribution could be exploited to reveal conformational changes occurring upon experimental modifications (Chowdhury et al., 1990; Konermann and

Douglas, 1998). Deduced from these spectra, one main species was found in denaturing and non-denaturing conditions for E/EC12, E/D103A (Fig. 2B-E), M-E/EC12 and M-E/D103A (data not shown), corresponding to masses of 25178.0 ± 1.0 , 25133.0 ± 1.0 , 25308.7 ± 1.0 and 25263.3 ± 1.0 Da, respectively. These experimental values were consistent with theoretical masses, i.e. 25177.0, 25133.0, 25308.2 and 25264.2 Da respectively. Uncleaved proteins MIEGR-E/EC12 and MIEGR-E/D103A were detectable on ESI-mass spectra, but at a negligible level. A very small fraction of our protein samples exhibited an adduct of 76 Da corresponding to the formation of a disulfide bridge with the β -mercaptoethanol group present in the lysis buffer. This modification, localized on the Cys9, does not interfere with Ca^{2+} binding (Nagar et al., 1996; Pertz et al., 1999). Thus these cadherin fragments were relevant for being used in quantitative Ca^{2+} binding studies.

Characteristics of Calcium binding to Cadherin fragments

Ca²⁺ binding occurs cooperatively. Series of experiments consisting in stepwise Ca^{2+} additions to cadherin fragments were carried out. The Ca^{2+} binding stoichiometries were determined by using mass spectrometry in non-denaturing conditions (see Experimental Procedures section). To guarantee that the observed Ca^{2+} stoichiometries reveal the different populations of complexes in solution, several acceleration voltages (V_c) were used (from 30 to 80 V, data not shown). The corresponding stoichiometries appeared to be insensitive to the accelerating voltage, indicating that the dissociation of Ca^{2+} ions in the gas phase of the mass spectrometer could be ruled out and that the relative abundance of the species deduced from ESI-mass spectra effectively reflected their relative abundance in solution.

Figure 3

Fig. 3 shows typical mass spectra obtained for E/EC12, E/D103A, M-E/EC12 and M-E/D103A, in different Ca^{2+} conditions. Considering that the binding of one equivalent (eq) of Ca^{2+} increases the mass of the protein by 38 Da, as two H^+ are removed following this binding, all distinct ligation states as well as the free state of the cadherin fragments were directly visualised by ESI-MS. The measured molecular masses revealed that all proteins were Ca^{2+} -free in the desalting buffer (Fig. 3A, B, G, H). However already at very low Ca^{2+} , it appeared that E/EC12 and E/D103A behaved differently versus Ca^{2+} binding. Mass spectra of E/EC12 revealed the binding of Ca^{2+} at relative low Ca^{2+} concentration. Indeed, for a total Ca^{2+} concentration of 45 μM (3 eq), the mass spectrum indicated two main molecular species, displaying a mass of 25178.0 ± 1 Da corresponding to the apoprotein and a mass of 25292 ± 1 Da corresponding to the E/EC12(Ca^{2+})₃ complex (Fig. 3C). A striking observation was that during the titration, the E/EC12(Ca^{2+})₁ and E/EC12(Ca^{2+})₂ species were under represented compared to the apoprotein and E/EC12(Ca^{2+})₃, strongly suggesting a cooperative binding (Chazin and Veenstra, 1999; Rogniaux et al., 2001). Interestingly, Ca^{2+} binding to E/D103A appeared statistical with a continuous addition of Ca^{2+} ions, and stoichiometries of 1, 2, 3 etc... were observed as shown on Fig. 3I, suggesting that the cooperative binding was lost for E/D103A. Ca^{2+} binding titration of M-E/EC12 and M-E/D103A compared with E/EC12 and E/D103A respectively showed that additional Met did not significantly modify the Ca^{2+} binding properties. Therefore, we could consider that both wild-type cadherin fragments, respectively both D103A mutated fragments, have similar Ca^{2+} binding properties with or without additional methionine. Finally, stoichiometries greater than 3 were observed for all fragments, revealing the presence of other Ca^{2+} binding sites of lower affinities which could correspond, at least in part, to the half binding pocket at the C-terminal side of the EC2 domain.

The cooperative binding was confirmed by plotting the bound Ca^{2+} ions per mole of protein

against the free Ca^{2+} concentration (see Fig. 4). It was then possible to calculate the Hill constants (from a non-linear fit) and the apparent dissociation constants (Ca^{2+} free concentration at half saturation).

Figure 4

The sigmoidal shape of the calcium binding curve indicated, for both wild-type proteins, a high cooperativity (Fig. 4) which was confirmed by the best fit of the data that gave rise to a Hill constant of 2.3, corresponding to an high cooperativity for three calcium ions. An apparent dissociation constant of 23 μM for calcium binding was obtained from this fit. This result strongly suggested that physiological conditions are sufficient to saturate this cadherin binding pocket. On the other hand, calcium binding to the mutated proteins exhibited a hyperbolic binding curve with a Hill constant of 1.0, thus testifying a non-cooperative binding with an apparent dissociation constant of approximately 230 μM .

The binding of other divalent ions (Cd^{2+} , Mn^{2+} and Mg^{2+}) to the wild-type protein was checked, by analysing the formation of the corresponding complexes in non-denaturing conditions. In order to do that, a large excess of these ions was added (9 eq). While the calcium binding pocket was almost saturated in excess of Ca^{2+} , a very low binding was observed following incubation with Cd^{2+} , Mn^{2+} or Mg^{2+} (data not shown). More precisely, no fixation of Cd^{2+} and only a small amount of metal-bound protein was observed for Mn^{2+} and Mg^{2+} (10% and 30% respectively). The divalent metal ions tested have the closest reactivity to Ca^{2+} but did not bind efficiently to the EC12 fragment. Altogether, our data argued against the formation of complexes due to experimental artefacts during the ionization process but provided evidence for the high binding specificity of the EC12 fragment versus Ca^{2+} ions.

Charge state modifications following Ca^{2+} binding. Two specific pieces of information can be

deduced from an ESI-mass spectrum: the molecular masses of the various species co-existing in solution and the charge state distribution of the corresponding ions. As the molecular mass directly yields the binding stoichiometries, the charge state distribution is often interpreted as being related to the protein conformation (Craig et al., 1997; Veenstra et al., 1998; Venters et al., 2003). The number of charges of the observed protein ions would depend on the number of basic sites available for protonation and so, on protein folding. In our case, both E/EC12 and E/D103A exhibited similar charge state distributions in Ca^{2+} -free conditions (Fig. 5A, B). Interestingly, a different charge state distribution was observed for the wild-type fragment consecutive to 3 Ca^{2+} binding compared to the E/D103A fragment, whose distribution remained barely unchanged (Fig. 5C, D) even though Ca^{2+} ions were bound in these experimental conditions. Similar results were obtained with M-E/EC12 and M-E/D103A.

Figure 5

Thus, under identical experimental conditions (in particular pH and interface voltages), the main charge states of -E/EC12 shifted from 10^+ - 11^+ to 11^+ - 12^+ after Ca^{2+} binding whereas the main peak for -E/D103A remained unchanged. These data suggested that the observed shift for -E/EC12 charge state distribution was rather related to a conformational change than to the number of Ca^{2+} ions bound to the protein. However, no more detail regarding this structural change can be deduced from MS data alone.

Structural rearrangements require a cooperative calcium binding

To address the question of how calcium binding modulates cadherin structure, we analysed structural modifications of E/EC12, E/D103A, M-E/EC12 and M-E/D103A by protease sensitivity and circular dichroism. Indeed one of the fundamental features of cadherins is their

resistance to proteolytic degradation in the presence of Ca^{2+} (Nose et al., 1990). Although many trypsin cleavage sites are present in the primary structure, cadherin extracellular segments are known to resist to proteolysis in the presence of Ca^{2+} but not in the presence of EDTA: trypsin cleavage sites must be buried only in the fully folded protein. To determine whether the recombinant fragments were correctly folded, and moreover to evaluate how Ca^{2+} modulates both their folding and trypsin sensitivity, wild-type and mutated proteins were submitted to trypsin digestion under different Ca^{2+} conditions. It is important to point out that the protease resistance of these fragments relies not only on calcium concentrations but also on trypsin specific activity and protease-cadherin ratios. These data should thus be considered only by comparing the protein fragments under the same experimental conditions without any significance for calcium concentrations per se. As shown in Fig. 6, E/EC12 was totally protected from trypsin proteolysis with 2 mM Ca^{2+} and down to 0.2 mM. This protection diminished when Ca^{2+} concentration was decreased by addition of 5 mM EDTA. Within the same experimental conditions, E/D103A was sensitive to proteolysis, even in the presence of 20 mM Ca^{2+} . Similar proteolysis profiles, as a function of Ca^{2+} concentration, were observed for M-E/EC12 and M-E/D103A fragments, respectively, showing that additional Met did not influence calcium-dependent folding probed by trypsin sensitivity (data not shown). Altogether, these observations pointed out that calcium binding is not sufficient to protect cadherin fragments from proteolysis and underlined the importance of ions specifically and cooperatively bound.

Figure 6

Circular dichroism was also used to further investigate structural modifications of wild-type and mutated proteins as a function of Ca^{2+} concentration (Fig. 7). We observed that the mean

molar residue ellipticity of E/EC12 changed when Ca^{2+} (1 mM) was added to the protein solution. Interestingly, similar spectra were observed with only 0.1 mM Ca^{2+} . Moreover, the spectrum obtained after addition of EDTA (2 mM) evidenced that this structural modification was reversible. Besides, we observed that the E/D103A circular dichroism signals were unchanged, following either Ca^{2+} or EDTA addition. Moreover, E/D103A spectra were similar to the Ca^{2+} -depleted E/EC12 solution or E/EC12 + EDTA. Once more, these observations suggested that both Ca^{2+} -depleted E/EC12 and E/D103A have similar secondary structures. Again, similar results were obtained using M-E/EC12 and M-E/D103A (data not shown). Nevertheless, the point mutation localized on E/D103A did not modify the structure of our cadherin apoprotein fragments, but impaired the native conformation allowed by cooperative Ca^{2+} binding.

Figure 7

Discussion

Three calcium ions bind cooperatively to the outermost binding pocket of the cadherin monomer

In the present study we have used four different cadherin fragments (E/EC12, E/D103A, M-E/EC12 and M-E/D103A) to investigate Ca^{2+} binding properties in relation to E-cadherin folding. By ESI-MS analysis, we observed the specific binding of three calcium ions to the E/EC12 fragment. These measurements fully agreed with X-ray crystallographic studies (Nagar et al., 1996; Pertz et al., 1999), which visualized the binding of these ions at the interface between the EC1 and EC2 domains.

Cadherin-calcium interactions have been previously studied via different methodologies that gave rise to controversial information. By fluorescence spectroscopy and flow dialysis, an apparent K_D of about 25 μM was obtained for Ca^{2+} binding to MR-E/EC12 (Alattia et al., 1997), in contrast to 460 μM estimated from circular dichroism measurements with M-E/EC12 (Koch et al., 1997). On the other hand, two Ca^{2+} binding sites with a K_D of 330 μM and a third binding site with a much higher K_D of 2 mM were calculated from equilibrium dialysis of the same M-E/EC12 fragment (Koch et al., 1997). All the different methodologies used for titration rely on indirect or overall measurements, which could therefore explain this discrepancy, and these data were obtained on proteins bearing additional N-terminal amino acids. Moreover, as shown in a recent M-E/EC12 NMR study, residues located at the C-terminal end of EC2 and constituting the half binding pocket between EC2 and EC3 could bind calcium ions with lower affinity (Haussinger et al., 2002). Interestingly, ESI-MS provides a direct visualisation of distinct species at equilibrium in solution. In the present study, the mean K_D value measured for the outermost binding pocket ($\sim 23 \mu\text{M}$) agrees with fluorescence spectroscopy and flow dialysis measurements (Alattia et al., 1997) and strongly suggests that in physiological conditions this binding pocket is saturated, arguing against a physiological regulation of cadherin activity by Ca^{2+} binding in this pocket.

In the present work, the detection of different stoichiometries coexisting in solution clearly showed that the binding of three Ca^{2+} ions occurred in a cooperative manner. This cooperativity, which was already suggested by structural data on EC1-EC2 interdomain binding pocket (Nagar et al., 1996; Tamura et al., 1998; Pertz et al., 1999), was thought to be conditioned by the association of cadherin molecules in dimers (Alattia et al., 1997). By directly visualizing the molecular complexes, our ESI-MS data revealed that this binding takes place on E/EC12 in its monomeric form.

Mutations of any amino acids involved in Ca^{2+} binding profoundly modify the properties of the whole binding pocket. We chose to perform site-directed mutagenesis in changing Asp103 to Ala, an amino acid involved in the binding of Ca1 and Ca2 (Nagar et al., 1996) and which has, in cell aggregation assays, a major role in the adhesive function of the full-length E-cadherin (Handschuh et al., 2001). Our data indicated that this mutation not only diminished the mean binding affinity (K_D from 23 μM for E/EC12 to about 230 μM for E/D103A) but also abrogated the cooperative properties of calcium fixation (Hill coefficient from 2.3 for E/EC12 to 1.0 for E/D103A). Several studies suggested that N-terminal β -strand dynamics could interfere with Ca^{2+} binding properties (Harrison et al., 2005). Indeed, point mutations, in particular on a Ca^{2+} binding site, and/or additional N-terminal amino acids induces N-terminal β -strand destabilisation. To probe the putative effect of N-terminal β -strand destabilisation on Ca^{2+} binding properties, we used M-E/EC12 and M-E/D103A proteins. Our results did not show any significant influence of this additional Met on Ca^{2+} binding. Finally, comparison between wild-type and D103A mutated proteins strongly suggests that these binding properties participate to cadherin motif conservation, possibly by exerting a selective pressure through evolution.

How does this cooperative binding influence the structural properties ?

Calcium binding participates to the cadherin structure (Koch et al., 1999; Boggon et al., 2002). It has been suggested that Ca^{2+} ions, which are bound between two consecutive domains, stabilize the otherwise flexible hinge region between domains (Nagar et al., 1996; Tamura et al., 1998). This binding then imposes a shape to the molecule, favouring an elongated, rigid rod-like configuration, which turns into a collapse structure below 50 μM Ca^{2+} (Pokutta et al., 1994; Pertz et al., 1999; Haussinger et al., 2002). These structural modifications provide one of the fundamental features of cadherins, which is their resistance

to proteolytic degradation in the presence of Ca^{2+} (Nose et al., 1990; Ozawa et al., 1990).

As expected, calcium binding to E/EC12 stabilized the functional, wild-type, cadherin structure, which is then protected from proteolytic degradation in a calcium-dependent manner (Perret et al., 2002; this study Fig. 6). It is interesting to note that calcium ions also bound to the E/D103A fragment (this study, Fig. 3). Thus, at millimolar calcium concentrations, a non negligible fraction of both protein populations had 3 or more ions bound in the experimental conditions we used. However no effective calcium protection of E/D103A from proteolysis was observed, even though many calcium ions were bound. These data showed that calcium binding *per se* is not sufficient to protect cadherin from trypsin degradation, indicating that these ions have to be bound in a specific manner, i.e. cooperatively, to induce a very precise protein configuration.

All four E/EC12, E/D103A, M-E/EC12 and M-E/D103A apoproteins have similar structural properties. Individual cadherin domains still displayed a β -barrel structure as indicated by circular dichroism spectroscopy analysis secondary structure. Reversible calcium binding markedly affected only E/EC12 and M-E/EC12, while E/D103A and M-E/D103A were not significantly modified. These changes were localised to the interdomain region of M-E/EC12 (Haussinger et al., 2002). Moreover ESI-MS measurements provided a direct observation that this structural modification was not induced by the number of bound calcium ions, but by the cooperative properties of this binding. Following Ca^{2+} addition, the charge state distribution was modified for both E/EC12(Ca)₃ and M-E/EC12(Ca)₃ complexes. Interestingly, E/D103A and M-E/D103A charge state distributions were not modified by Ca^{2+} binding (Fig. 5). This evidenced that the observed shift for E/EC12 and M-E/EC12 charge state distributions were due to a conformational change but not to the number of Ca^{2+} ions bound to the protein.

Together with previous structural data, this cooperative Ca^{2+} binding and folding modifications could be easily explained. In absence of Ca^{2+} , it has been shown that the hinge

region between EC1 and EC2 is highly flexible. Therefore, the binding of calcium ions probably begins on an “open site”, on the surface of one module. The complementary surface of the Ca²⁺ binding site brought by the adjacent module, owing to the flexibility of the hinge region, could complete this Ca²⁺ binding. Then, the fixation of a first calcium ion could facilitate the formation of more efficient second and third Ca²⁺ binding sites, by reducing the relative mobility of the two cadherin modules, thus allowing the formation of a mean cooperative binding site. Altogether, these data clearly showed that only the wild-type cadherin, which binds Ca²⁺ in a cooperative manner, is able to display the “mature” structural arrangement, which is characterized by trypsin resistance, exhibits a very precise spatial organization of cadherin modules, giving rise to a functional full-length protein.

How does calcium binding regulate cadherin function?

A number of studies have addressed the important physiological question of how calcium binding contributes to the cadherin-mediated control of cell adhesion. It is well established that calcium is of crucial importance for the functioning of E-cadherin in that its depletion from the extracellular medium gives rise to a rapid dissociation of cell-cell contacts. Interestingly, the mean calcium binding parameter measured in the present study for the E/EC12 binding pocket (~23 μ M) is similar to the global value obtained by Koch et al. for the four binding pockets of the full-length E-cadherin extracellular segment (~30 μ M). Since the amino acids involved in calcium binding are sequence features of the cadherin motif (Nollet et al., 2000), our findings might be relevant to other members of the cadherin family.

Our data suggest that even at low calcium concentrations (between 0.05 and 1 mM), all E-cadherin four calcium-binding pockets are filled, which leads to the rigidification of the ectodomain, as visualized by electron microscopy (Pokutta et al., 1994; Pertz et al., 1999). On

the cell surface, this rigidification most probably provides a better exposure of adhesive sites, thus favouring trans-interactions between cadherins. Such a phenomenon has already been observed for other adhesive molecules such as selectins (Hanley et al., 2004; Huang et al., 2004). Correlatively, it is known that calcium binding sites are functionally important in the repeated domains of the molecule. Some single amino acid substitutions in these sites are known to inactivate the adhesive properties of E-cadherin (Ozawa et al., 1990; Handschuh et al., 2001). In particular, the Asp103 is essential for the entire molecule functioning, as other amino acids being part of this outermost calcium-binding pocket such as Asp134. Surprisingly, these substitutions created a change in the ectodomain that had a much stronger effect on the adhesive function compared to the rather moderate effect on protein structure. Indeed, the D103A mutation had minor structural modifications (this work) compared to the loss of adhesion activity as shown in cell aggregation assays (Handschuh et al., 2001). We have recently revealed that four interactions take place along the entire E-cadherin extracellular segment, of very different stabilities. Two of them, localized on the two outermost domains are very dynamic. The two most stable interactions require the 3 other domains (Perret et al., 2004). These interactions must be achieved through the adjustment of the corresponding adhesive interfaces and this most probably requires a very precise geometry of the whole segment. Calcium binding could be involved not only in the positioning of each module with respect to the next ones but could also be directly implicated in the activation of the adhesive interface(s). Indeed, as recently suggested by molecular dynamics, calcium could also be involved in β -strand arrangement and stability of the cadherin modules (Sotomayor et al., 2005).

The question still remains of how Ca^{2+} regulates cadherin activity at the cell surface. Calcium-dependent interactions were underscored in vitro by experiments with recombinant E-cadherin fragments, which could dimerize at high protein concentration (Nagar et al., 1996;

Tomschy et al., 1996; Koch et al., 1997; Pertz et al., 1999; Haussinger et al., 2002). More precisely, recent studies suggest that calcium ions could influence the docking of Trp2 in a hydrophobic pocket then modulating the strand exchange between EC1 domains of opposing cadherins, leading to the adhesive interface (Koch et al., 1999; Harrison et al., 2005). A two-step model was proposed in which lateral (or cis-) dimers form first (> 0.5 mM) and are a prerequisite for adhesive (or trans-) dimers (> 1 mM) (Pertz et al., 1999). Takeda used chemical cross-linking studies to show that calcium ions promote cis-dimer formation of E-cadherin molecules in vivo (Takeda et al., 1999). These results conflict with the study of Chitaev and Troyanovsky suggesting that only trans-dimer but not cis-dimer formation requires calcium (Chitaev and Troyanovsky, 1998). Calcium could in fact be directly involved in the trans interaction between molecules from neighbouring cells (Ringwald et al., 1987). Obviously an interaction of this type would also be abolished by a mutation that abolished calcium binding. These observations do not exclude the possibility that there are other sites involving calcium regulation of comparable importance in the scaffolding of adhesive plaques (Chan et al., 2004).

The calcium concentration in the blood is maintained stably at 1.4 mM. However, the local extracellular Ca^{2+} concentrations measured in the microenvironment near the plasma membrane can fluctuate, according to particular tissue and stress conditions (Hofer, 2005 for a review). For example, while changes occur in polarized gastric epithelial cells upon stimulation, basolateral calcium concentration can go from 1.5 mM down to 1.2 mM (Carroppo et al., 2001). The results presented here together with previous studies strongly suggest that calcium binding to the interdomain sites of the cadherin ectodomain should only weakly be affected by such extracellular changes in calcium concentration, due to the high affinity of calcium binding to the cadherin monomer. This does not exclude that extracellular calcium fluctuations could regulate cadherin-mediated cell adhesion. Indeed measurable and

sometimes dramatic reductions of extracellular calcium concentration down to 50 μM have been observed in excitable cells as in the central nervous system or in muscles (Hofer, 2005). Notably, transient decrease in the extracellular calcium concentration in the synaptic cleft might weaken cadherin mediated synaptic plasticity (Tang et al., 1998). Moreover, most functional studies of cadherins have been performed at millimolar calcium concentrations (Pertz et al., 1999, Harrison et al., 2005) and, strikingly, in vitro, a large number of trans interactions could only be observed at physiological (or higher) calcium concentrations (Koch et al., 1999). While trans-dimers of cadherin are detectable at 0.1 mM Ca^{2+} at the cellular level, the number of these dimers increases at 1 mM Ca^{2+} (Klingelhofer et al., 2002). We showed in this study that more than three Ca^{2+} can bind to the E/EC12 fragments (Fig.3). In addition, a recent E/EC12 NMR study reveals that chemical shift changes are found for many amino acids besides the interdomain pocket following calcium addition (Fig. 5, Häussinger et al., 2002). Hence, changes in calcium concentration might be able to regulate cadherin interactions. Altogether, these observations support the assumption that the calcium sensitivity of cadherin-dependent adhesion is based on mechanisms other than simple dissociation of the adhesion cadherin complexes in the absence of calcium (Shapiro et al., 1995; Citi et al., 1994). Adhesion in biology is based on protein-protein recognition, so a detailed knowledge of how calcium is involved in cadherin adhesive interaction in vitro will be of major interest in order to understand cadherin-mediated adhesion at the cellular level.

Acknowledgements

The authors are indebted to Alexander Koch and Olivier Pertz (from J. Engel laboratory) for their assistance in circular dichroism experiments, and Jean-Paul Thiery and Damaris Loew (Institut Curie) for helpful discussions at the initiation of this work.

This work was supported by CNRS institutional funding and through the Protéomique et Génie des Protéines program (to H.F.), the Institut Curie (PIC Physique Biologie) and grants from the Gefluc, the Fondation pour la Recherche Médicale and the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC). O. C. was a recipient of a BDI fellowship from the CNRS and from ARC.

References.

Alattia, J. R., Ames, J. B., Porumb, T., Tong, K. I., Heng, Y. M., Ottensmeyer, P., Kay, C. M. and Ikura, M. (1997). Lateral self-assembly of E-cadherin directed by cooperative calcium binding. *FEBS Lett.* **417**, 405-408.

Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B. M. and Shapiro, L. (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* **296**, 1308-1313.

Caroppo, R., Gerbino, A., Debellis, L., Kifor, O., Soybel, D.I., Brown, E.M. Hofer, A.M., Curci, S. (2001). Asymmetrical, agonist-induced fluctuations in local extracellular Ca²⁺ in intact polarized epithelia. *EMBO J.* **20**, 6316-6326.

Chan, M. W., El Sayegh, T. Y., Arora, P. D., Laschinger, C. A., Overall, C. M., Morrison, C. and McCulloch, C.A. (2004). Regulation of intercellular adhesion strength in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **279**, 41047-41057.

Chazin, W. and Veenstra, T. D. (1999). Determination of the Metal-binding Cooperativity of Wild-type and Mutant Calbindin D9K by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 548-555.

Chitaev, N. A. and Troyanovsky, S. M. (1998). Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *J. Cell Biol.* **142**, 837-846.

Chevreux, G., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Bahloul, A., Houdusse, A., Wells, A. and Sweeney, H. L. (2005). Electrospray Ionization Mass Spectrometry Studies of Noncovalent Myosin VI Complexes Reveal a New Specific Calmodulin Binding Site. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8**, 1367-1376.

Chowdhury, S. K., Katta, V. and Chait, B. T. (1990). Probing Conformational Changes in Proteins by Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9012-9013.

Citi, S., Volberg, T., Bershadsky, A. D., Denisenko, N. and Geiger, B. (1994). Cytoskeletal involvement in the modulation of cell-cell junctions by the protein kinase inhibitor H-7. *J. Cell Sci.* **107**, 683-692.

Craig, T. A., Veenstra, T. D., Naylor, S., Tomlinson, A. J., Johnson, K. L., Macura, S., Juranic, N. and Kumar, R. (1997). Zinc binding properties of the DNA binding domain of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. *Biochemistry* **36**, 10482-10491.

Doherty-Kirby, A. L. and Lajoie, G. A. (2002). Investigation of calcium-binding proteins using electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* **173**, 161-174.

Duguay, D., Foty, R. A. and Steinberg, M. S. (2003). Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Dev. Biol.* **253**, 309-323.

Felitsyn, N., Peschke, M. and Kebarle, P. (2002). Origin and number of charges observed on multiply-protonated native proteins produced by ESI. *Int. J. Mass Spectrom.* **219**, 39-62.

Fuchs, M., Hutzler, P., Handschuh, G., Hermannstadter, C., Brunner, I., Hofler, H. and Lubner, B. (2004). Dynamics of cell adhesion and motility in living cells is altered by a single amino acid change in E-cadherin fused to enhanced green fluorescent protein. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **59**, 50-61.

Ganem, B., Li, Y. and Henion, J. D. (1991). Detection of noncovalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6294-6296.

Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-357.

Gumbiner, B. M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 622-634.

Handschuh, G., Candidus, S., Lubner, B., Reich, U., Schott, C., Oswald, S., Becke, H., Hutzler, P., Birchmeier, W., Hofler, H. and Becker, K. F. (1999). Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* **18**, 4301-4312.

Handschuh, G., Lubner, B., Hutzler, P., Hofler, H. and Becker, K. F. (2001). Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences. *J. Mol. Biol.* **314**, 445-454.

Hanley WD, Wirtz D, Konstantopoulos K. (2004). Distinct kinetic and mechanical properties govern selectin-leukocyte interactions. *J Cell Sci.* **117**, 2503-2511.

Harrison, O. J., Corps, E. M., Berge, T. and Kilshaw, P. J. (2005). The mechanism of cell adhesion by classical cadherins: the role of domain 1. *J. Cell Sci.* **118**, 711-721.

Haussinger, D., Ahrens, T., Sass, H. J., Pertz, O., Engel, J. and Grzesiek, S. (2002). Calcium-dependent homoassociation of E-cadherin by NMR spectroscopy: changes in mobility, conformation and mapping of contact regions. *J. Mol. Biol.* **324**, 823-839.

Haussinger, D., Ahrens, T., Aberle, T., Engel, J. Stetefeld, J. and Grzesiek, S. (2004). Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *EMBO J.* **23**, 1699-1708.

Heck, A. J. and Van Den Heuvel, R. H. (2004). Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **23**, 368-389.

Hofer, A. M. (2005). Another dimension to calcium signaling: a look at extracellular calcium. *J. Cell Sci.* **118**, 855-862.

Hu, P., Ye, Q. Z. and Loo, J. A. (1994). Calcium stoichiometry determination for calcium binding proteins by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **66**, 4190-4194.

Huang J, Chen J, Chesla SE, Yago T, Mehta P, McEver RP, Zhu C, Long M. (2004) Quantifying the effects of molecular orientation and length on two-dimensional receptor-ligand binding kinetics. *J Biol Chem.* **279**, 44915-44923.a

Kemler, R. (1992). Classical cadherins. *Semin. Cell Biol.* **3**, 149-155.

Klingelhofer, J., Laur, O. Y., Troyanovsky, R. B. and Troyanovsky, S. M. (2002).

Dynamic interplay between adhesive and lateral E-cadherin dimers. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7449-7458.

Koch, A. W., Bozic, D., Pertz, O. and Engel, J. (1999). Homophilic adhesion by cadherins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 275-281.

Koch, A. W., Pokutta, S., Lustig, A. and Engel, J. (1997). Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains. *Biochemistry* **36**, 7697-7705.

Konermann, L. and Douglas, D. J. (1998). Unfolding of proteins monitored by electrospray ionization mass spectrometry: a comparison of positive and negative ion modes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, 1248-1254.

Larue, L., Antos, C., Butz, S., Huber, O., Delmas, V., Dominis, M. and Kemler, R. (1996). A role for cadherins in tissue formation. *Development* **122**, 3185-3194.

Loo, J. A. (1997). Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **16**, 1-23.

Loo, J. A. (2000). Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *Int. J. Mass Spectrom.* **200**, 175-186.

Nagafuchi, A. Molecular architecture of adherens junctions. (2001). *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 600-603.

Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M. and Rini, J. M. (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* **380**, 360-364.

Nollet, F., Kools, P. and van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* **299**, 551-572.

Nose, A., Nagafuchi, A. and Takeichi, M. (1988). Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* **54**, 993-1001.

Nose, A., Tsuji, K. and Takeichi, M. (1990). Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* **61**, 147-155.

Overduin, M., Harvey, T. S., Bagby, S., Tong, K. I., Yau, P., Takeichi, M. and Ikura, M. (1995). Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* **67**, 386-389.

Ozawa, M. and Kemler, R. (1990). Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin. *J. Cell Biol.* **111**, 1645-1650.

Ozawa, M., Engel, J. and Kemler, R. (1990). Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. *Cell* **63**, 1033-1038.

Patel, S. D., Chen, C. P., Bahna, F., Honig, B. and Shapiro, L. (2003). Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 690-698.

Perret, E, Benoliel, A. M, Nassoy, P., Pierres, A., Delmas, V., Thiery, J. P., Bongrand, P. and Feracci, H. (2002). Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *EMBO J.* **21**, 2537-2546.

Perret, E., Leung, A., Feracci, H. and Evans, E. (2004). Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**, 16472-16477.

Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A. and Engel, J. (1999). A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J.* **18**, 1738-1747.

Pla, P., Moore, R., Morali, O. G., Grille, S., Martinozzi, S., Delmas, V. and Larue, L. (2001). Cadherins in neural crest cell development and transformation. *J. Cell Physiol.* **189**, 121-132.

Pokutta, S., Herrenknecht, K., Kemler, R. and Engel, J. (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur. J. Biochem.* **223**, 1019-1026.

Ringwald, M., Schuh, R., Vestweber, D., Eistetter, H., Lottspeich, F., Engel, J., Dolz, R., Jahnig F., Epplen J., Mayer S., Müller C. and Kemler, R. (1987). The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *EMBO J.* **6**, 3647-3653.

Rogniaux, H., Sanglier, S., Strupat, K., Azza, S., Roitel, O., Ball, V., Tritsch, D., Branlant, G. and Van Dorsselaer, A. (2001). Mass spectrometry as a novel approach to probe cooperativity in multimeric enzymatic systems. *Anal. Biochem.* **291**, 48-61.

Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grubel, G., Legrand, J. F., Als-Nielsen, J., Colman, D. R. and Hendrickson, W. A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**, 327-337.

Sotomayor, M., Corey, D. P. and Schulten, K. (2005). In search of the hair-cell gating spring elastic properties of ankyrin and cadherin repeats. *Structure* **13**, 669-682.

Steinberg, M. S. and McNutt, P. M. (1999). Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**, 554-560.

Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**, 619-627.

Takeda, H., Shimoyama, Y., Nagafuchi, A. and Hirohashi, S. (1999). E-cadherin functions as a cis-dimer at the cell-cell adhesive interface in vivo. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 310-312.

Tamura, K, Shan, W. S. and Hendrickson, W. A., Colman, D. R. and Shapiro, L. (1998). Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* **20**, 1153-1163.

Tang, L., Hung, C. P. and Schuman, E. M. (1998). A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* **20**, 1165-1175.

Tomschy, A., Fauser, C., Landwehr, R. and Engel, J. (1996). Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains. *EMBO J.* **15**, 3507-3514.

Troyanovsky, R. B., Klingelhofer, J. and Troyanovsky, S. M. (1999). Removal of calcium ions triggers a novel type of intercadherin interaction. *J. Cell Sci.* **112**, 4379-4387.

Troyanovsky, S. (2005). Cadherin dimers in cell-cell adhesion. *Eur. J. Cell Biol.* **84**, 225-233.

Troyanovsky, R. B., Sokolov, E. and Troyanovsky, S. M. (2003). Adhesive and lateral E-cadherin dimers are mediated by the same interface. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7965-7972.

Veenstra, T. D., Johnson, K. L., Tomlinson, A. J., Kumar, R. and Naylor, S. (1998). Correlation of Fluorescence and Circular Dichroism Spectroscopy with Electrospray Ionization Mass Spectrometry in the Determination of Tertiary Conformational Changes in Calcium-binding Proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **12**, 613-619.

Venters, R. A., Benson, L. M., Craig, T. A., Paul, K. H., Kordys, D. R., Thompson, R., Naylor, S., Kumar, R. and Cavanagh, J. (2003). The effects of Ca(2+) binding on the conformation of calbindin D(28K): a nuclear magnetic resonance and microelectrospray mass spectrometry study. *Anal. Biochem.* **317**, 59-66.

Legends:

Figure 1:

(A) Structure of the E-cadherin outermost calcium binding pocket, inclosed between EC1 and EC2, PDB 1EDH (Nagar et al., 1996). The EC modules are represented in blue ribbons, calcium ions in green and binding residues in red balls and sticks. (B) The enlargement of the binding site helped to visualize the different amino acids involved in calcium binding and the Asp103 which was changed in Ala in the E/D103A fragment is in yellow. (C) The expressed cadherin fragments before and after N-terminal end cleavage by Factor Xa protease and cadherin fragments with additional N-terminal Met are displayed with their full name. The yellow cross represents the D103A point mutation.

Figure 2:

Characterization of the purified cadherin fragments. (A) The purity of the cadherin fragments M-E/EC12, M-E/D103A, E/EC12 and E/D103A was analyzed by migration on 15% SDS-PAGE followed by Coomassie Blue staining. (B-E) ESI-MS analysis of E/EC12 and E/D103A. Spectra in denaturing (B-C) and non-denaturing (D-E) conditions display different charge state distributions for each protein, according to their folding. Typical charge values are indicated above each distribution. Spectra analysis revealed a unique and homogeneous compound of 25178.0 ± 1 Da which corresponded to the E/EC12 fragment ($M_{r_{theo}} = 25177.0$ Da) and a unique compound of 25133.0 ± 1 Da which corresponded to the E/D103A fragment ($M_{r_{theo}} = 25133.0$ Da). A small peak corresponding to one β -mercaptoethanol adduct was also visible ($\Delta M_r = 76$ Da), and residual uncleaved proteins were detected (*).

Figure 3:

Ca²⁺ binding stoichiometries for E/EC12, E/D103A, M-E/EC12 and M-E/D103A using ESI-MS in non-denaturing conditions. The experiments presented in this panel were performed at 15 μM protein incubated with 0, 45 and 90 μM Ca²⁺ for E/EC12 and M-E/EC12 (A-F) and 0 and 90 μM Ca²⁺ for E/D103A and M-E/D103A (G-J) respectively. Three Ca²⁺ ions, rather than one or two, bind preferentially to both E/EC12 and M-E/EC12. This preferential Ca²⁺ binding stoichiometry suggests a cooperative binding. By contrast, Ca²⁺ binding seems statistical for both E/D103A and M-E/D103A, suggesting a loss of cooperative binding following the D103A point mutation. A small peak (black arrow head) corresponding to one β-mercaptoethanol adduct was also visible.

Figure 4:

Graphic representation of the bound Ca²⁺ ions per mole of protein of E/EC12 (filled square), M-E/EC12 (filled circle), E/D103A (empty square) and M-E/D103A (empty circle) against free Ca²⁺ concentration. Ca²⁺ titration was monitored by ESI-MS in non-denaturing conditions. The best fit of the data gave rise to a Hill constant of 2.3 and an apparent dissociation constant of 23 μM for M-E/EC12. M-E/D103A exhibited a Hill constant of 1.0 with an apparent dissociation constant of approximately 230 μM. Similar results were obtained for E/EC12 and E/D103A respectively.

Figure 5:

ESI-MS spectra of calcium dependency of E/EC12 and E/D103A charge state distribution in non-denaturing conditions. The experiments were performed at 15 μM protein: (A) Ca²⁺-free E/EC12, (B) Ca²⁺-free E/D103A, (C) E/EC12 + 90 μM Ca²⁺ (6 eq), and (D) E/D103A + 360 μM Ca²⁺ (24 eq). Ca²⁺-depleted E/EC12 and E/D103A fragments exhibited the same charge state distribution (main peaks charged 10⁺ and 11⁺): indicating that the D103A point mutation

did not disturb the protein charge state distribution compared to the wild type protein. The charge state distribution of E/EC12(Ca^{2+})₃ species (C) shifted by one charge (main peaks charged 11⁺ and 12⁺) whereas no change was observed for E/D103A(Ca^{2+})₃ (D). Residual uncleaved proteins were also visible (*).

Figure 6:

Influence of Ca^{2+} on biochemical properties of E/EC12 (A), and E/D103A (B) measured by trypsin sensitivity. Proteins were incubated with different Ca^{2+} concentrations, 1 hour at 37°C, in the presence of trypsin, and then analyzed by 15% SDS-PAGE. Lane (C) corresponds to the protein incubated without trypsin addition. Ca^{2+} concentrations (mM) are mentioned under each following lane. The positive control of trypsin digestion corresponded to condition where proteins were digested in presence of EDTA (E). Thus E/EC12 was protected from proteolysis when calcium concentration was higher than 0.05 mM, while E/D103A was never protected, even in 20 mM Ca^{2+} . Similar results were obtained with M-E/EC12 and M-E/D103A respectively.

Figure 7:

Influence of Ca^{2+} on the folding of E/EC12 (A) and E/D103A (B) probed by circular dichroism. The mean molar residue ellipticity spectra were plotted for each following conditions: Ca^{2+} depleted solution, 100 μM Ca^{2+} solution, 1 mM Ca^{2+} solution and after addition of 2 mM EDTA. E/EC12 structure was reversibly modulated by Ca^{2+} , while E/D103A structure was not influenced by Ca^{2+} . Similar results were obtained with M-E/EC12 and M-E/D103A respectively.

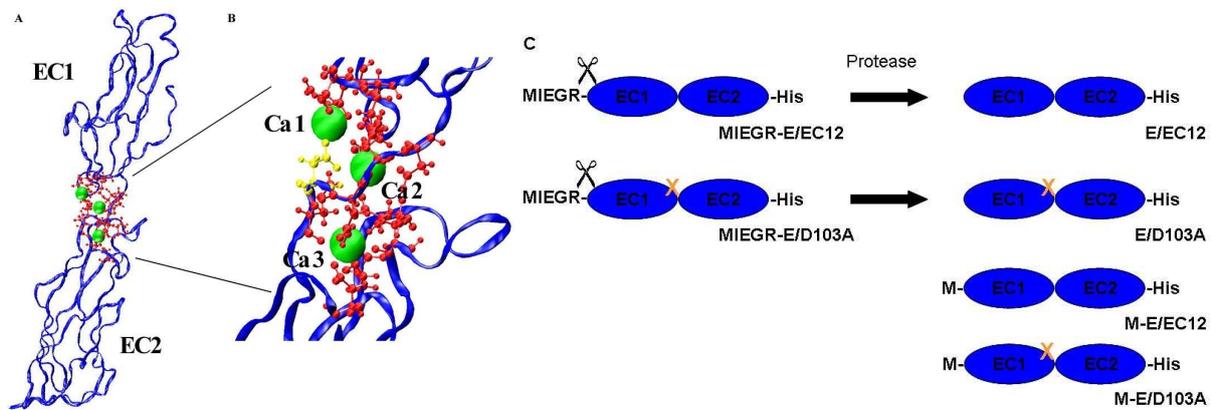


Figure 1

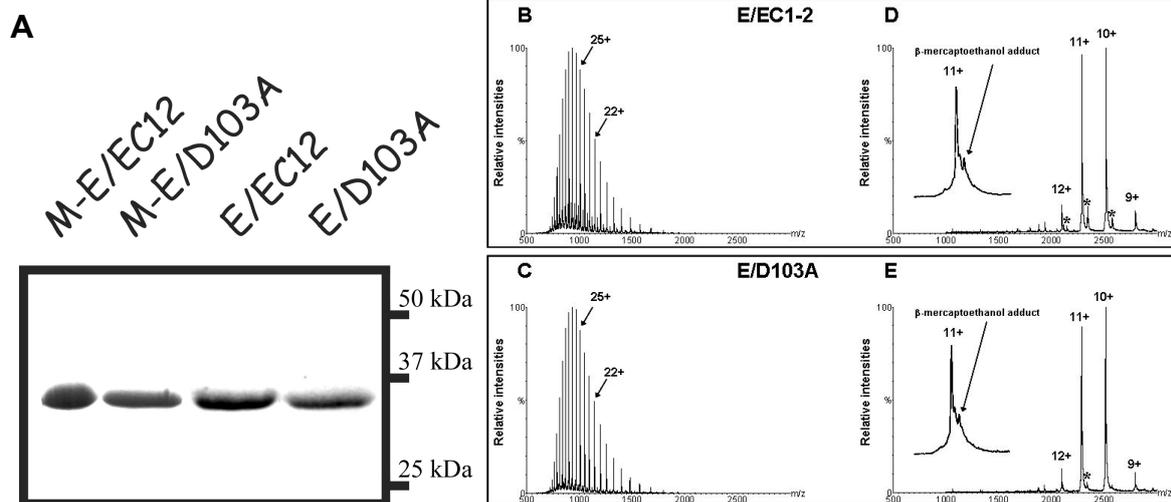


Figure 2

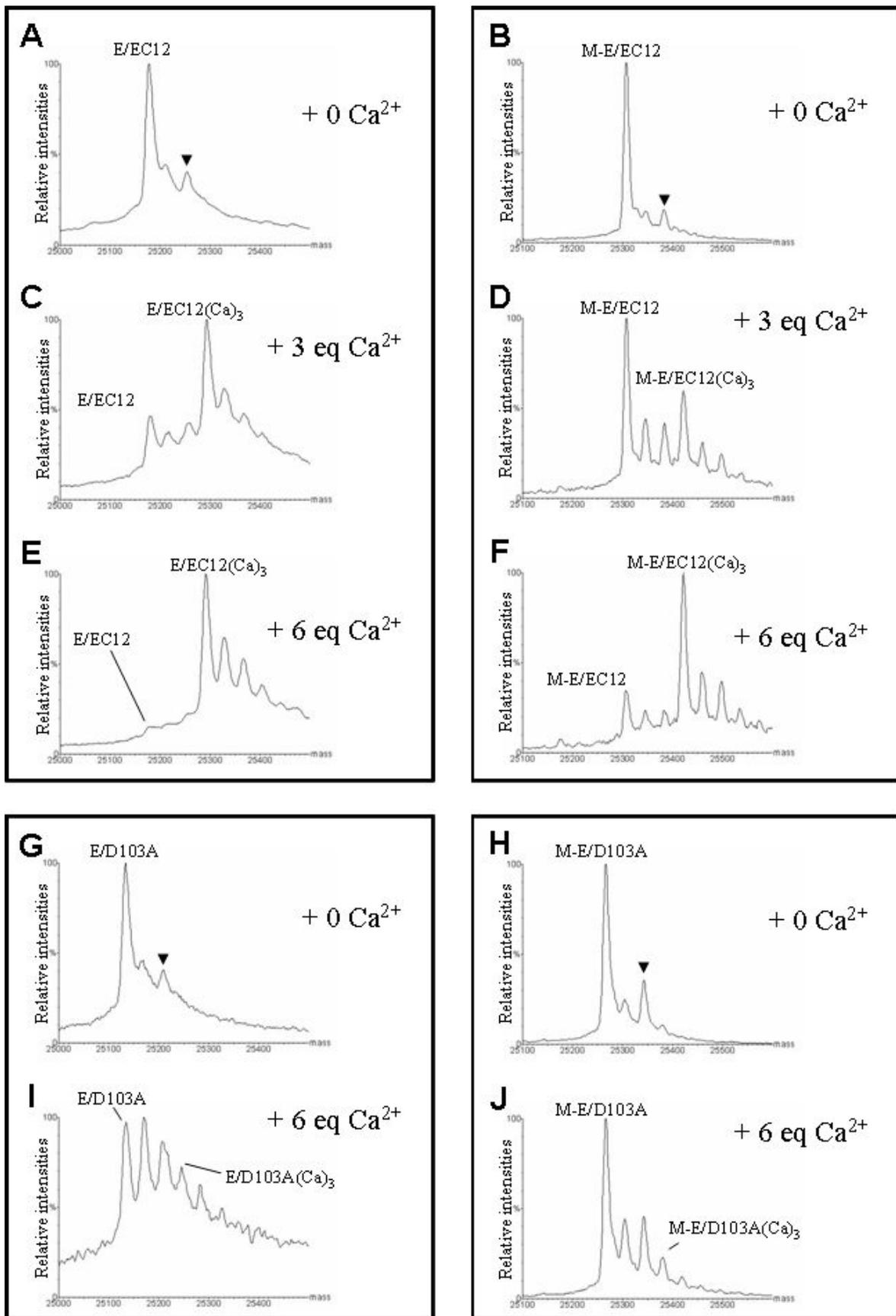


Figure 3

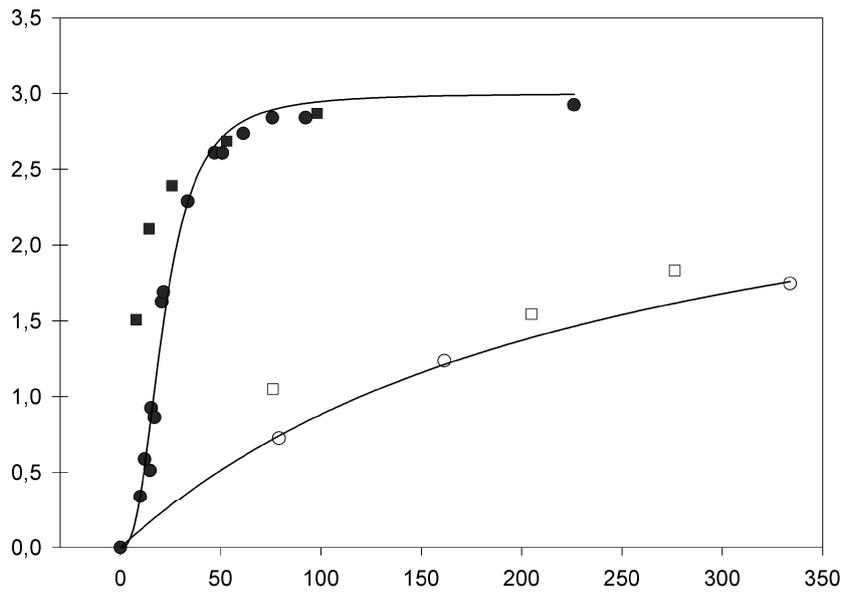


Figure 4

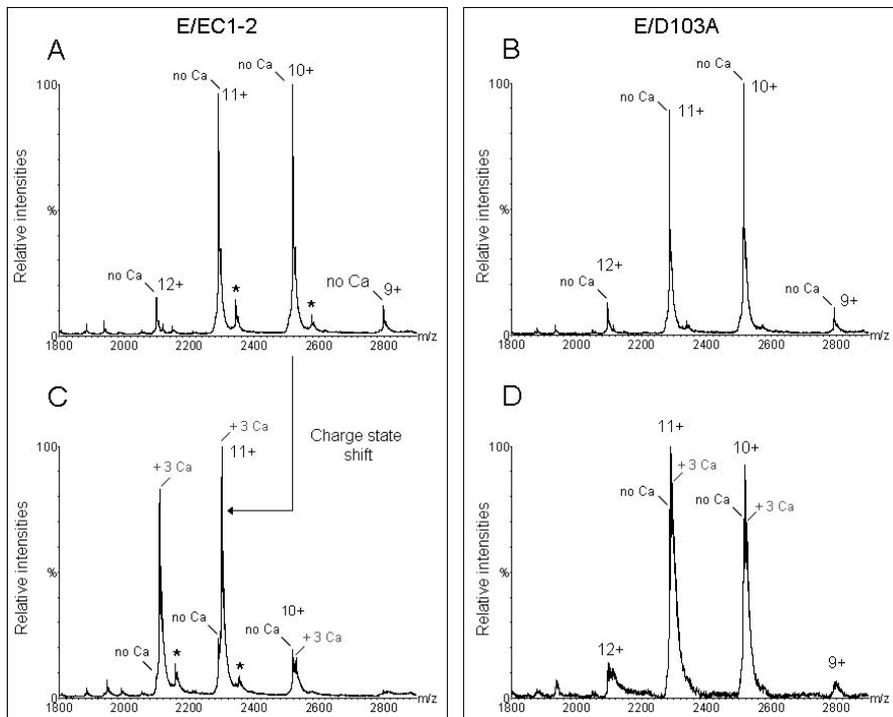


Figure 5

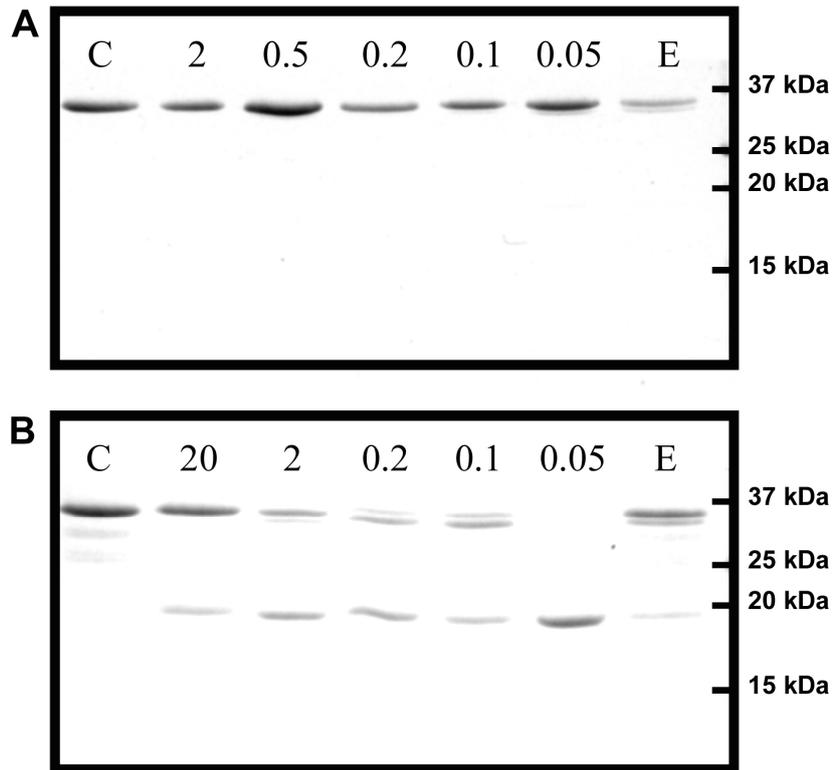


Figure 6

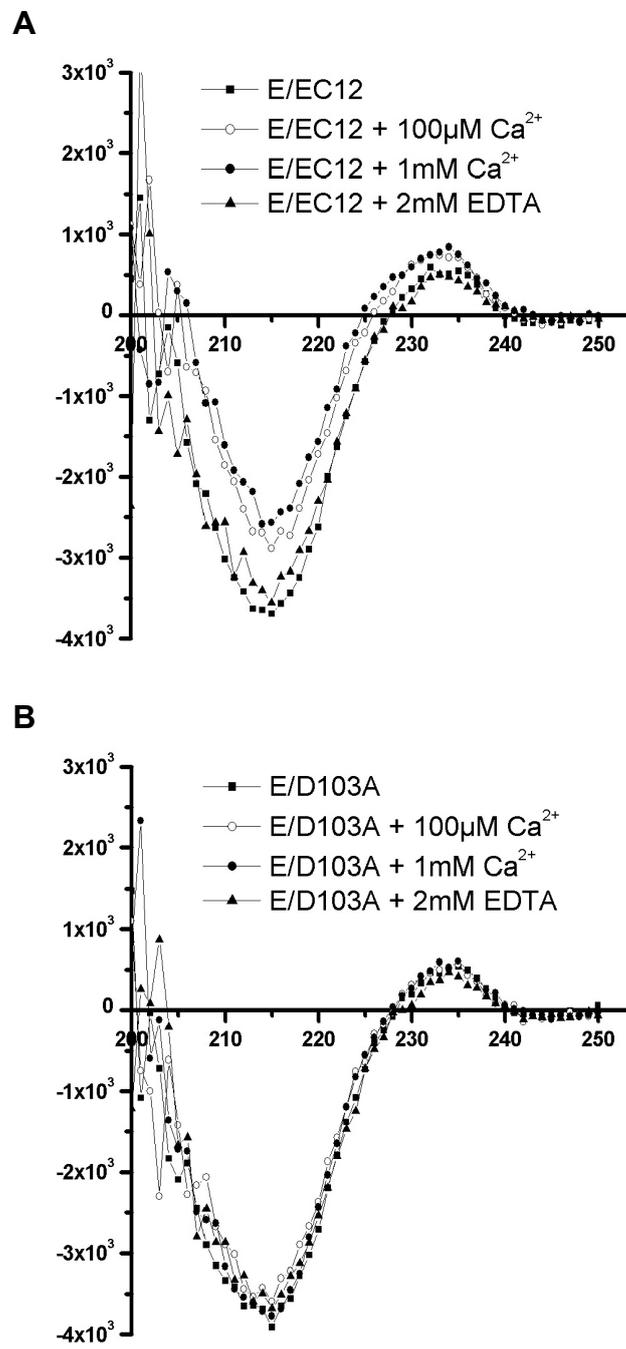


Figure 7

**Travail en cours : Régulation de l'activité
adhésive des cadhérines par le calcium :
Mesures à l'échelle de la liaison unique**

Régulation de l'activité adhésive de la E-cadhérine par le calcium à l'échelle de la liaison unique.

Résultats préliminaires.

Introduction

Une des caractéristiques fondamentales des cadhérines est leur activité adhésive dépendante du calcium. Le travail présenté dans l'article II de cette thèse a permis de préciser les propriétés et l'incidence de la fixation des trois ions calcium au niveau de la poche la plus externe du segment extracellulaire des cadhérines. Nous avons notamment mis en évidence une fixation coopérative de ces ions, induisant une réorganisation localisée entre les deux motifs EC1 et EC2. La mutation d'un acide aminé conservé et impliqué dans la fixation du calcium (D103A) conduit à une diminution de l'affinité pour le calcium, ainsi qu'à la perte de la coopérativité de fixation et du réarrangement structural. Des études à l'échelle cellulaire ont montré que cette mutation sur la E-cadhérine conduit à une nette diminution des propriétés adhésives (Handschuh et al., 2001). De plus, ces travaux ont également montré que la même mutation au niveau des autres poches de fixation du calcium produit des effets différents sur le comportement cellulaire. La mutation au niveau de la deuxième poche, entre les motifs EC2 et EC3, conduit à une perte des capacités adhésives, mais aussi à une augmentation de la motilité cellulaire. La mutation sur la poche située entre les motifs EC3 et EC4 ne diminue que très faiblement les capacités adhésives, alors que la mutation entre les motifs EC4 et EC5 est sans effet significatif. Ces observations sont d'autant plus surprenantes que les sites de fixation du calcium sont très conservés entre les différentes poches, et même entre les différentes cadhérines.

Il existe peu d'informations permettant de comprendre l'incidence particulière de chacune de ces poches de fixation du calcium sur les propriétés d'adhésion observées à l'échelle cellulaire. Ainsi peut-on se demander si ces différentes mutations ont un effet spécifique se traduisant par une perturbation de l'adressage des cadhérines, une perturbation de l'organisation de ces molécules à la surface cellulaire et/ou à une perturbation des propriétés d'interaction adhésives des molécules individuelles. Conjointement à la diminution des capacités adhésives, les mutations sur les deux poches les plus externes conduisent à une perturbation de la morphologie cellulaire et de l'adressage des cadhérines. Ces protéines

mutées sont retrouvées localisées dans le cytoplasme, plutôt qu'à la membrane. Ce défaut d'adressage est sans doute une des causes de la diminution des capacités adhésives observée à l'échelle cellulaire (Handschuh et al., 2001). Toutefois, ces mesures ne permettent pas de déterminer si ce défaut d'adressage est dû ou non à une perturbation des capacités adhésives à l'échelle moléculaire. En effet, plusieurs interactions distinctes sont réalisables entre segments extracellulaires de cadhérines. Chacune de ces interactions présente une stabilité particulière et surtout implique un nombre différent de motifs EC (Perret et al., 2004 ; Sivasankar et al., 2001). Plus précisément, un fragment contenant les motifs EC1 et EC2 suffit à réaliser deux interactions labiles, caractérisées par un k_{off} de l'ordre de 10 s^{-1} et 1 s^{-1} pour la E-cadhérine. L'ajout du motif EC3 permet de réaliser une troisième interaction ayant un k_{off} d'environ 10^{-2} s^{-1} . Enfin, le fragment extracellulaire entier permet de réaliser une interaction supplémentaire ayant un k_{off} d'environ 10^{-5} s^{-1} . Ainsi se pose la question d'une relation entre ces interactions distinctes et l'incidence de la fixation du calcium au niveau de chacune des poches interdomaines.

Pour y répondre, nous avons choisi de mesurer, à l'échelle de la liaison unique, le rôle de chaque poche de fixation du calcium sur la fonction adhésive. Nous avons donc conçu et purifié différentes protéines chimériques correspondant à des fragments du segment extracellulaire de la E-cadhérine. De plus, la mutation ponctuelle présentée ci-dessus a été introduite dans les différentes poches interdomaines. Après avoir caractérisé et notamment vérifié la pureté et le repliement de ces différents fragments de la E-cadhérine, nous avons quantifié leurs propriétés cinétiques d'interaction en utilisant la technique de chambre à flux laminaire. Cette étude, encore en cours, a permis d'obtenir des premiers résultats mettant effectivement en évidence un effet du calcium sur la fonction adhésive à l'échelle de la liaison unique. Il semble que la résistance de la liaison à une force appliquée soit dépendante du calcium.

Matériels et méthodes

Construction des plasmides, production et purification des protéines.

Des constructions plasmidiques ont été réalisées afin de produire des fragments de différentes longueurs du segment extracellulaire de la E-cadhérine : E/EC12, E/EC13, E/EC14 et E/EC15. Ces protéines possèdent toutes un tag polyhistidine du côté C-terminal. De plus, des

GCT-CCC-ATC-CCA-G-3' et 5'-CTG-GGA-TGG-GAG-CGT-TGG-CAT-TGA-CGT-C-3' (D436A). Les différentes constructions ont toutes été vérifiées par séquençage.

Ces plasmides ont ensuite été introduits dans des cellules eucaryotes HEK 293, afin de respecter l'ensemble des modifications post-traductionnelles comme le clivage du propeptide et la glycosylation des motifs EC3, EC4 et EC5. Le milieu de culture des HEK est constitué de DMEM (Gibco), SVF 10%, G418 à 0.6 mg/ml (Calbiochem). Après sélection des clones pour chaque construction, les cellules sont mises en culture pour produire les différentes protéines. Les protéines sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Afin de faciliter la récupération de ces protéines, les cellules sont mises en culture avec un milieu similaire à celui décrit ci-dessus, mais privé de SVF. Au bout de deux jours, ce milieu est récupéré et les cellules remises en culture avec du milieu complet pendant un à deux jours. Ce cycle est répété trois à quatre fois. Les protéines sont purifiées via leur tag polyhistidine, en mettant le milieu récupéré en présence de billes NiNTA Superflow (Qiagen). Ces billes sont ensuite lavées avec du tampon PBS puis stockées à 4°C jusqu'à utilisation. Les protéines sont éluées des billes dans une solution contenant de l'imidazole à 250 mM.

Caractérisation des protéines.

Les clones de cellules eucaryotes servant à la production de fragments de E-cadhérine sont sélectionnés par Dot Blot. 200 µl de milieu extracellulaire sans SVF sont adsorbés sur une membrane de nitrocellulose (Pall Corporation). La présence de protéine est détectée par réaction photochimique (ECL, Amersham), en utilisant un anticorps primaire dirigé contre le tag polyhistidine (H15, Sigma), puis un anticorps secondaire anti-Ig de lapin couplé à la HRP (Amersham).

Après fixation sur les billes NiNTA Superflow (Qiagen), la pureté de toutes les protéines est vérifiée par SDS-PAGE, en utilisant des gels de 15% ou 7% en acrylamide, en fonction de la taille attendue des protéines testées. Ces gels sont soit directement colorés par bleu de Coomassie, soit utilisés pour un Western Blot. Après transfert sur membrane de nitrocellulose (Pall Corporation) ou PVDF (Millipore), les protéines sont détectées de la même manière que pour les Dot Blot. Les anticorps primaires utilisés sont l'anti polyhistidine H15 (Sigma) ou un anti-EC1 de la E-cadhérine (ECCD2, Takara).

Le repliement des protéines sauvages (E/EC12, E/EC13, E/EC14 et E/EC15) a été vérifié en utilisant la propriété de résistance à la protéolyse par la trypsine en présence de calcium. Le protocole suivi est identique à celui présenté dans le travail précédent (Article II) : 5µg de

protéine sont mis en présence de 90 U de trypsine fixée sur des billes d'agarose (Sigma), pendant 1 heure à 37°C. Le tampon de protéolyse est constitué de 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH8, complété par 1 mM CaCl₂ ou 5 mM EDTA. La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout d'un inhibiteur (leupeptin hemisulfate, ICN Biomedicals Inc). Le résultat de la digestion est observé par SDS-PAGE.

Etude des propriétés cinétiques par la méthode de chambre à flux laminaire.

La préparation des billes a été réalisée selon le protocole décrit dans le premier travail (Article I), pour l'ensemble des fragments étudiés. Des billes fonctionnalisées par la streptavidine (Dynabeads M280, Dynal) sont incubées avec 10 µg d'anticorps biotinylé anti-IgG_{2a} (Pharmingen), puis 10 µg anticorps monoclonal anti-polyhistidine (clone His-1, Sigma), pendant 30 minutes chacun. Ces billes sont ensuite incubées en présence d'un des fragments de E-cadhérine.

Comme pour le travail précédent (Article I), les lames de mica (Muskovite mica, Metafix, Montdidier, France) fraîchement clivées sont incubées 1 minute dans une solution à 1 mM NiCl₂ (Sigma), puis rincées dans de l'eau milliQ (Millipore) et séchées à l'air libre, avant d'être incubées 1 heure avec 800 µl de la solution de protéine étudiée. Toutefois, l'étude des fragments plus longs que E/EC12, notamment E/EC13 et E/EC15, a nécessité une mise au point du traitement de la surface de mica. Ces lames ont été incubées 1 heure avec une solution de polymère polyLysine-g-PEG, puis rincées à l'eau milliQ, juste avant d'être mises en présence de NiCl₂.

Au cours de l'expérience, les billes sont entraînées dans un tampon constitué de 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.2% BSA, pH 7, auquel est ajouté 1 mM CaCl₂. Un tampon similaire, sans CaCl₂ ajouté, a été utilisé pour mesurer les propriétés cinétiques d'interaction de E/EC15 en absence de calcium. La concentration mesurée de calcium résiduel est alors inférieure à 1 µM. L'acquisition vidéo et l'analyse des trajectoires est totalement identique à celle décrite dans le travail précédent (Article I).

Synthèse du polymère PolyLysine-g-PEG

Pour la synthèse de ce polymère, nous nous sommes basés sur les travaux publiés par Kenausis et al. (2000). Lors d'une première synthèse, de la poly-L-Lysine hydrobromide d'environ 20 kDa (Sigma) a été dissoute dans du tampon de 50 mM tetraborate de sodium, pH

8.5, à une concentration finale de 40 mg/ml de polylysine. Puis le NHS-PEG(3,4 kDa)-Maléimide (Shearwaters) est dissout dans la solution précédente de polylysine, en utilisant un rapport molaire de 3.5. La solution est homogénéisée par vortex, puis incubée 3 heures à 25°C. La solution est ensuite filtrée (0,22 µm), aliquotée, puis stockée à -20°C. Ce polymère est noté PLL(20)-g-PEG(3.4). Le taux de greffage, g, n'a pas été vérifié expérimentalement, mais les conditions utilisées, similaires à celles décrites par Kenausis et al. (2000), suggèrent une valeur comprise autour 4 ou 5.

Cette première synthèse, dont le produit a été utilisé au cours de nos mesures préliminaires, a donc été réalisée avec un PEG bi-fonctionnel. Le polymère obtenu s'est modifié au cours du stockage, se traduisant par une réticulation de notre solution de polymère. Une autre synthèse a été réalisée avec un PEG mono-fonctionnel (SMB-PEGm, Nektar), présentant une meilleure stabilité. Deux tailles de PEG ont été utilisées : 2 et 5 kDa. Les polymères obtenus sont notés PLL(20)-g-PEG(2) et PLL(20)-g-PEG(5).

Résultats

Caractérisation des fragments de E-cadhérine

Différents fragments du segment extracellulaire de la E-cadhérine ont été synthétisés, dans le but de caractériser l'influence du calcium sur les propriétés adhésives de cette molécule (Fig. 1a). Ainsi, il est essentiel de vérifier la pureté et le bon repliement de nos fragments avant d'entreprendre ces mesures à l'échelle de la liaison unique. La pureté de nos solutions de protéines a pu être vérifiée par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie (Fig. 1b). On peut constater que la migration sur SDS-PAGE de ces fragments nous donne une masse apparente supérieure à la masse théorique de la chaîne polypeptidique. Toutefois, cette différence est liée à la nature biochimique de la chaîne polypeptidique qui perturbe la migration, et éventuellement à la présence de groupes glycosylés. Pour les protéines E/EC12 et E/D103A, une étude supplémentaire par spectrométrie de masse nous a permis de valider la pureté de nos échantillons et une masse moléculaire identique à la masse théorique (Article II). L'intégrité de l'extrémité C-terminale a été vérifiée par Western Blot (data not shown), en utilisant un anticorps primaire dirigé contre le tag polyhistidine (H15, Sigma), alors que l'intégrité de l'extrémité N-terminale est vérifiée grâce à un anticorps dirigé contre le motif EC1 de la E-cadhérine (ECCD2, Takara). Nos différents échantillons sont donc utilisables pour réaliser des mesures de cinétique d'interaction en Chambre à Flux Laminaire.

Influence du Ca^{2+} sur les paramètres cinétiques de E/EC12

Le fragment E/EC12, considéré comme la partie fonctionnelle minimale du segment extracellulaire de la E-cadhérine, comporte la poche calcium la plus externe. Des études récentes suggèrent que le calcium influence la stabilité du brin N-terminal qui, par échange des brins entre deux molécules, réalise l'interaction adhésive (Harrison et al., 2005). Pour déterminer l'incidence du calcium sur ces propriétés cinétiques d'interaction, nous avons également utilisé le fragment E/D103A. Ce fragment, qui ne diffère du premier que par la mutation ponctuelle du Asp103 changé en Ala, présente une plus faible affinité pour la fixation du calcium ($K_D \sim 230 \mu M$, contre $K_D \sim 23 \mu M$ pour E/EC12), et surtout une perte de la coopérativité de fixation qui se traduit par une incapacité à se structurer au niveau de la région protéique située entre les motifs EC1 et EC2 (Article II). La comparaison des paramètres cinétiques de ces deux fragments nous permet de mesurer l'incidence de ces perturbations moléculaires sur la fonction adhésive. Ces mesures ont été réalisées en présence d'une concentration en calcium de 1 mM pour ces deux protéines.

L'évaluation quantitative de la cinétique de formation de la liaison est estimée par la mesure de la fréquence d'arrêt des billes. Nos mesures, présentées sur la Fig. 2a, indiquent que la vitesse de formation semble légèrement plus rapide pour E/D103A que pour E/EC12. Par contre, l'étude de la stabilité, mesurée à partir de la durée des arrêts détectés, montre une légère déstabilisation de l'interaction due à la mutation D103A (Fig. 2b). Ces deux effets se compensent lorsqu'on regarde le paramètre empirique d'efficacité globale (i.e., la formation des arrêts qui durent au moins une seconde ; Fig. 2c).

De façon très inattendue, ces résultats suggèrent que le calcium influence peu les interactions réalisées au niveau des deux motifs EC les plus externes. Il est notamment difficile, à partir de ces mesures, de concilier d'une part la forte perturbation des capacités adhésives due à la mutation ponctuelle D103A de la E-cadhérine, observées à l'échelle cellulaire, et l'absence d'influence de cette même mutation sur le fragment E/EC12. Toutefois, ce travail doit être complété par la mesure de l'incidence du calcium sur la capacité de ces liaisons à résister aux contraintes mécaniques. En effet, les mesures présentées ci-dessus ont été réalisées à une faible force (~ 1 pN).

Passivation de surface et mesures d'interactions à l'échelle de la liaison unique

L'étape suivante de notre étude a été de mesurer les cinétiques d'interaction pour des fragments de cadhérine plus longs. Une première série de mesures a été réalisée pour E/EC13 et E/EC15 dans des conditions de fonctionnalisation des surfaces similaires à celles utilisées

pour les protéines E/EC12. La dilution des protéines déposées sur les lames de mica a été adaptée à la taille des molécules. Toutefois, ces mesures ont mis en évidence un important bruit de fond correspondant à des arrêts non spécifiques entre les protéines fixées sur les billes et la lame de mica. Ces arrêts, très probablement causés par l'interaction entre les motifs glycosylés présents sur les modules EC3 à 5 et le mica recouvert d'ions nickel, ont nécessité une adaptation des conditions de traitement de la surface de mica. La passivation de la surface a été réalisée par l'utilisation d'un polymère de polylysine greffé par des PEG, au niveau des groupements NH₂ de la chaîne latérale des lysines. La synthèse de ce polymère ainsi que la méthode de traitement de surface sont basées sur les travaux publiés par Kenausis et al. (2000).

Plusieurs polymères ont été testés à différentes concentrations pour déterminer les conditions de passivation. Ces conditions ont été établies en fixant les protéines E/EC13 ou E/EC15 sur les billes, sans ajouter de fragment de cadhérine sur la lame de mica. La passivation du fond de la chambre a été caractérisée par la mesure de la fréquence d'arrêts de billes fonctionnalisées sur la lame traitée avec le polymère. Nos résultats montrent que le polymère PLL(20)-g3.5-PEG(1) permet de passiver la surface lorsque E/EC13 est présent sur les billes (Fig. 3a), mais pas E/EC15. Par contre, les polymères PLL(20)-g-PEG(3.4) et PLL(20)-g-PEG(2) permettent de passiver le mica vis-à-vis de E/EC15 (Fig. 3b). Ainsi, nos mesures montrent que la taille du PEG est déterminante pour éviter les interactions non spécifiques entre les protéines présentes sur les billes et la lame de mica.

Une fois ces conditions de passivation de surfaces établies, nous avons cherché à déterminer les conditions de densité en protéine sur la lame permettant d'observer des interactions à l'échelle de la liaison unique. Comme ceci avait déjà été mis au point pour E/EC12 (Perret et al., 2002), nous avons non seulement déterminé l'évolution de la fréquence de formation de liaisons en fonction de la densité en protéine, mais aussi la durée de vie des liaisons en fonction de la densité en protéine sur la lame. En effet, la condition de liaison unique est considérée comme atteinte lorsque la cinétique de détachement est indépendante de la densité de surface (voir paragraphe IV-5 de l'introduction de thèse). Ces conditions ont été déterminées pour E/EC13 et E/EC15.

Effet du Ca²⁺ sur l'interaction réalisée par E/EC15

Les conditions de mesures à l'échelle de la liaison unique étant établies, nous nous sommes intéressés aux propriétés cinétiques d'interaction entre molécules E/EC15. Les interactions formées entre ces molécules, observées en Chambre à Flux Laminaire, sont très labiles. Ainsi,

bien que quatre interactions soient possibles le long de E/EC15, il semble que dans les conditions expérimentales la liaison formée soit très similaire à celle réalisée entre fragments E/EC12 (Fig. 4). Toutefois une étude plus poussée sera nécessaire pour déterminer si ces propriétés d'interaction obtenues pour E/EC15 correspondent à des cinétiques de formation plus favorables aux interactions labiles ou bien à un effet d'encombrement du PEG qui masquerait l'accès aux interactions plus profondes impliquant les motifs EC3 à EC5. Néanmoins, l'étude menée par BFP par Perret et al., (2004) avec ces mêmes fragments de E-cadhérine a montré que la proportion d'interactions longues augmentait avec le temps de pause. Ce temps de contact entre les surfaces fonctionnalisées était de l'ordre de la seconde dans les expériences de BFP, alors que dans les expériences en Chambre à Flux Laminaire, celui-ci est plutôt de l'ordre de la milliseconde. Ceci suggère qu'une limitation à la formation de ces interactions longues peut être d'ordre purement cinétique.

Bien que cette hypothèse reste à confirmer, nous avons entrepris de mesurer l'effet du calcium sur les propriétés cinétiques d'interaction entre molécules de E/EC15. Nous avons donc comparé la stabilité des interactions entre molécules de E/EC15 en présence de 1 mM CaCl_2 ou en absence de calcium (voir Matériels et Méthodes). Cette étude a été réalisée à différents flux, afin de mesurer l'incidence de la force sur la stabilité de la liaison moléculaire. Les résultats (Fig. 5) mettent en évidence un effet du calcium sur la stabilité de la liaison entre molécules E/EC15. Plus précisément, cette influence du calcium est observée lorsque la liaison est soumise à une force de dissociation suffisamment importante. Ainsi, le calcium semble avoir un rôle mécanique en augmentant la résistance de la liaison. Cet effet est observé entre les deux conditions extrêmes où la molécule fixe le calcium au niveau de chacune des poches interdomaines, ou bien ne fixe pas de calcium. La suite de ce travail consistera à mesurer l'effet de chacune de ces poches sur les propriétés d'interactions entre molécules de cadhérine.

Conclusions et Perspectives

L'importance du calcium sur l'activité adhésive des cadhérines est clairement établie. Les connaissances actuelles concernent essentiellement l'incidence du calcium sur la structure des cadhérines. Ces ions semblent impliqués dans l'orientation relative des motifs EC et la rigidification globale de la molécule, et ceci influencerait ses propriétés d'interaction (Pertz et al., 1999 ; Haussinger et al., 2002). De plus, malgré la très forte homologie de séquence, plusieurs études ont montré une incidence particulière de la fixation de ces ions au niveau de

chacune des poches interdomaines (Koch et al., 1997 ; Handschuh et al., 2001). Toutefois, le rôle de ces ions dans le mécanisme moléculaire d'interaction reste peu compris. Notre étude a pour but d'évaluer l'influence du calcium, et plus précisément de sa fixation au niveau de chaque poche, sur les paramètres cinétiques de formation et de stabilité d'interaction.

Notre étude expérimentale, encore actuellement en cours, nous a permis de constater que la fixation du calcium avait une incidence négligeable sur la formation et la stabilité de l'interaction à force nulle. En effet, la comparaison de E/EC12 et E/D103A en présence de 1 mM Ca^{2+} , ainsi que de E/EC15 en présence ou en absence de calcium, montre des fréquences de formation et des stabilités d'interaction similaires lorsque la force appliquée sur la liaison est faible (~ 1 pN). Ceci peut être dû au fait que la structure des motifs EC est peu modifiée par la fixation du calcium, le réarrangement structural étant essentiellement localisé dans la zone interdomaine (Haussinger et al., 2002). De plus, il a été montré que des fragments constitués du seul motif EC1 sont capables d'interagir même en absence de calcium (Shapiro et al., 1995). Bien que les trois ions se fixent au niveau des poches interdomaines, à des concentrations faibles (K_D moyen ~ 30 μM sur E/EC15, Koch et al., 1997 ; Article II de cette thèse), il semble que, dans une gamme de concentration supérieure à 1 mM, le calcium puisse influencer l'interaction adhésive. En effet, les mesures de dimérisation réalisées par RMN en solution ont montré que le calcium, à une concentration de 10 mM, favoriserait l'interaction entre fragments de cadhérine (Haussinger et al., 2004). De même, Pertz et coll. (1999) ont montré que, à une concentration supérieure à 1 mM, le calcium favorise un mode d'interaction interprété comme étant l'interaction adhésive. Ce point pourra facilement être testé avec notre méthode.

Selon nos premières mesures, le calcium fixé au niveau des poches interdomaines modifierait la sensibilité de la liaison moléculaire aux contraintes mécaniques. En effet, l'interaction entre fragments de cadhérines semble plus résistante à la force appliquée en présence de calcium. Cette propriété est cohérente avec le rôle mécanique des ions calcium qui permettent de rigidifier le segment extracellulaire. De plus, une étude récente de simulation de dynamique moléculaire a montré l'incidence directe de la fixation des ions calcium aux extrémités d'un motif EC sur le maintien du repliement de ce motif lorsqu'il est soumis à une force de dépliage (Sotomayor et al., 2005). De par leur rôle dans le maintien la cohésion cellulaire, on peut aisément supposer que la capacité des molécules de cadhérines à résister aux forces de dissociation soit une propriété essentielle à sa fonction biologique.

Un autre rôle potentiel du calcium serait de réguler les propriétés d'interaction le long du segment extracellulaire. En effet, bien que quatre interactions soient possibles le long de

E/EC15 (Perret et al., 2004), nos premières mesures en Chambre à Flux Laminaire ne révèlent que les interactions les plus labiles. Le calcium pourrait moduler la formation des interactions les plus stables, impliquant plusieurs motifs EC. De plus cette forme de régulation permettrait d'expliquer comment des mutations sur des sites très similaires conduisent à des effets si différents sur les capacités adhésives au niveau cellulaire. Cette propriété ne serait plus due à la nature biochimique de la mutation, mais uniquement à l'effet sur la géométrie de la molécule ainsi qu'à la localisation de cette mutation par rapport aux différentes interfaces adhésives présentes le long du segment extracellulaire. La pertinence de cette hypothèse est confortée par une étude très récente par SFA (Prakasam et al., 2006). Cette méthode a permis de déterminer des distances et les forces de rupture entre deux surfaces fonctionnalisées, soit avec le fragment E/EC15, soit avec des fragments mutés au niveau des différentes poches de fixation du calcium. Les mutations sur les deux poches les plus externes (D103A, D216A et D134A) semblent abolir non seulement les interactions réalisées au niveau de l'extrémité N-terminale de E/EC15, mais semblent également affecter les interactions les plus profondes, alors que les mutations sur les autres poches (D325A et D436A) semblent peu affecter les propriétés d'interaction. La suite de notre propre travail permettra d'étudier ce phénomène à l'échelle de la liaison unique et de déterminer les propriétés cinétiques et de résistance aux contraintes appliquées, avec pour objectif d'en extraire différentes informations sur le mécanisme moléculaire d'interaction entre molécules de cadhérines.

Références

Handschuh G, Lubert B, Hutzler P, Hofler H, Becker KF. Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences.

J Mol Biol. 2001 Nov 30;314(3):445-54.

Harrison, O. J., Corps, E. M., Berge, T. and Kilshaw, P. J. (2005). The mechanism of cell adhesion by classical cadherins: the role of domain 1.

J. Cell Sci. 118, 711-721.

Haussinger, D., Ahrens, T., Sass, H. J., Pertz, O., Engel, J. and Grzesiek, S. (2002). Calcium-dependent homoassociation of E-cadherin by NMR spectroscopy: changes in mobility, conformation and mapping of contact regions.

J. Mol. Biol. 324, 823-839.

Haussinger, D., Ahrens, T., Aberle, T., Engel, J. Stetefeld, J. and Grzesiek, S. (2004). Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography.

EMBO J. 23, 1699-1708.

Kenausis, G.L., J. Voros, D.L. Elbert, N.P. Huang, R. Hofer, L. Ruiz-Taylor, M. Textor, J.A. Hubbell, and N.D. Spencer. Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) layers on metal oxide surfaces: Attachment mechanism and effects of polymer architecture on resistance to protein adsorption.

Journal of Physical Chemistry B, 2000. 104(14): p. 3298-3309.

Koch, A. W., Pokutta, S., Lustig, A. and Engel, J. (1997). Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains.

Biochemistry 36, 7697-7705.

Perret E, Leung A, Feracci H, Evans E. Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Nov 23;101(47):16472-7.

Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A. and Engel, J. (1999). A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation.

EMBO J. 18, 1738-1747.

Prakasam AK, Maruthamuthu V, Leckband DE. Similarities between heterophilic and homophilic cadherin adhesion.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Oct 5.

Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grubel, G., Legrand, J. F., Als-Nielsen, J., Colman, D. R. and Hendrickson, W. A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins.

Nature 374, 327-337.

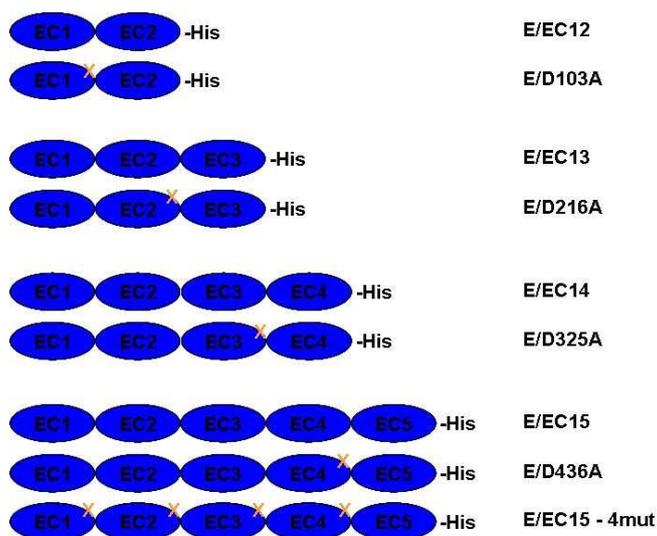
Sivasankar S, Gumbiner B, Leckband D. Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains.

Biophys J. 2001 Apr;80(4):1758-68.

Sotomayor, M., Corey, D. P. and Schulten, K. (2005). In search of the hair-cell gating spring elastic properties of ankyrin and cadherin repeats.

Structure 13, 669-682.

a)



b)

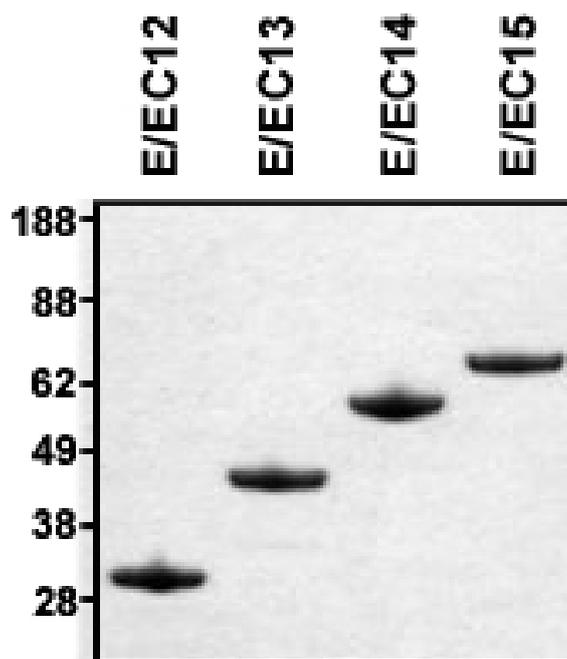
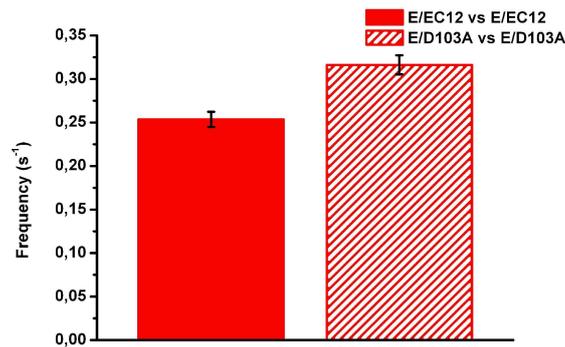
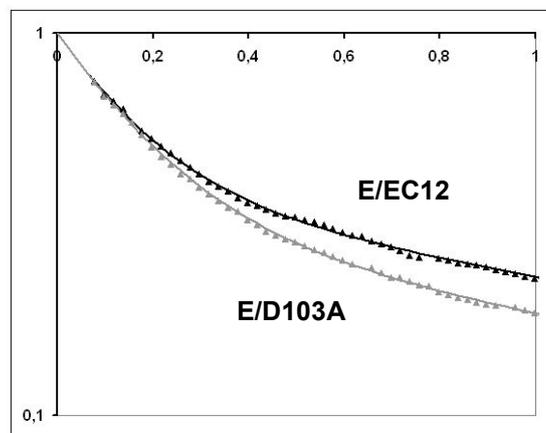


Figure 1 : (a) Liste des différents fragments de E-cadhérine, produits et purifiés. Les croix jaunes indiquent la localisation des mutations ponctuelles. (b) Caractérisation de certains fragments de E-cadhérine par SDS-PAGE (Gel gradient 3%-12%, Invitrogen).

a)



b)



c)

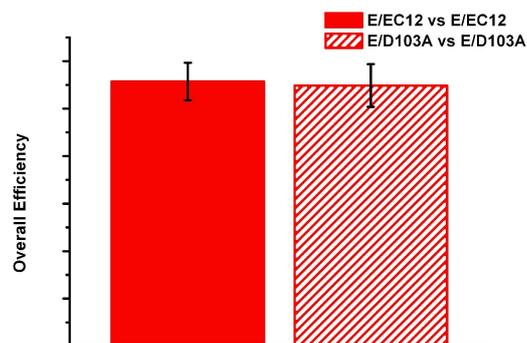
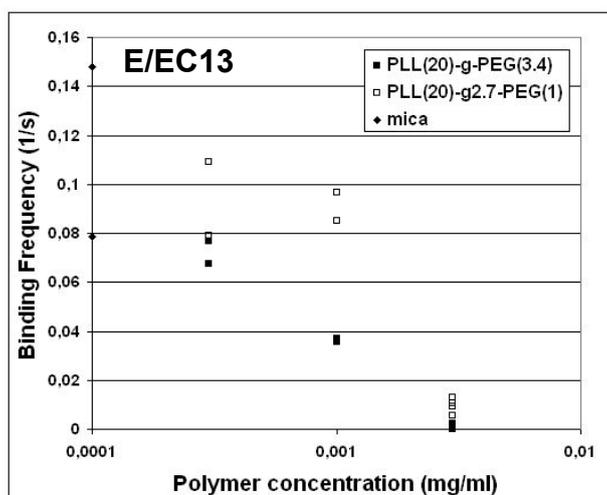


Figure 2 : Etude des paramètres cinétiques de l'interaction entre fragments E/EC12 comparée à E/D103A. (a) La fréquence de formation est légèrement supérieure pour E/D103A. (b) L'interaction réalisée par la protéine sauvage E/EC12 est un peu plus stable. (c) Aucune différence significative n'est observée pour l'efficacité globale (fréquence de formation d'arrêts d'au moins une seconde).

a)



b)

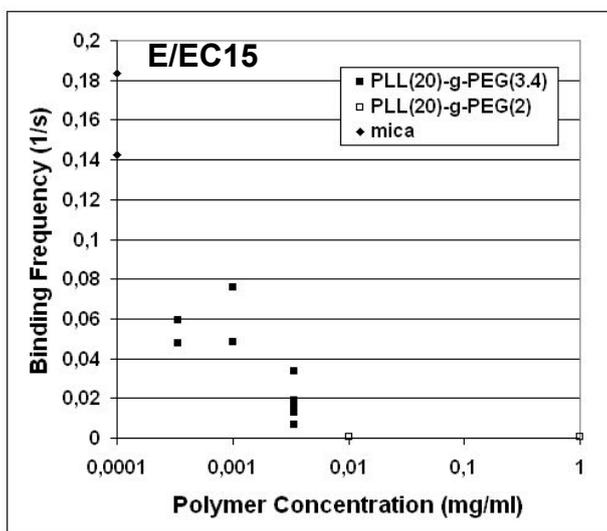


Figure 3 : Passivation des lames de mica, testées face à des billes décorées de fragments E/EC13 et E/EC15. La fréquence d'interaction entre billes fonctionnalisées et lames traitées avec un polymère est utilisée comme indicateur de l'efficacité de passivation, par comparaison avec la fréquence mesurée pour des lames non traitées (notées « mica » et référencées sur l'axe des ordonnées). (a) La passivation pour E/EC13 est acceptable pour les deux polymères PLL(20)-g-PEG(3.4) et PLL(20)-g2.7-PEG(1) (ce polymère nous a été offert par Textor et coll., ETH Zurich, en vue de ces essais), à une concentration de solution déposée sur la lame de 3 $\mu\text{g/ml}$. (b) La passivation pour E/EC15 est acceptable avec les polymères PLL(20)-g-PEG(3.4) et PLL(20)-g-PEG(2) à des concentrations supérieures ou égales à 3 $\mu\text{g/ml}$.

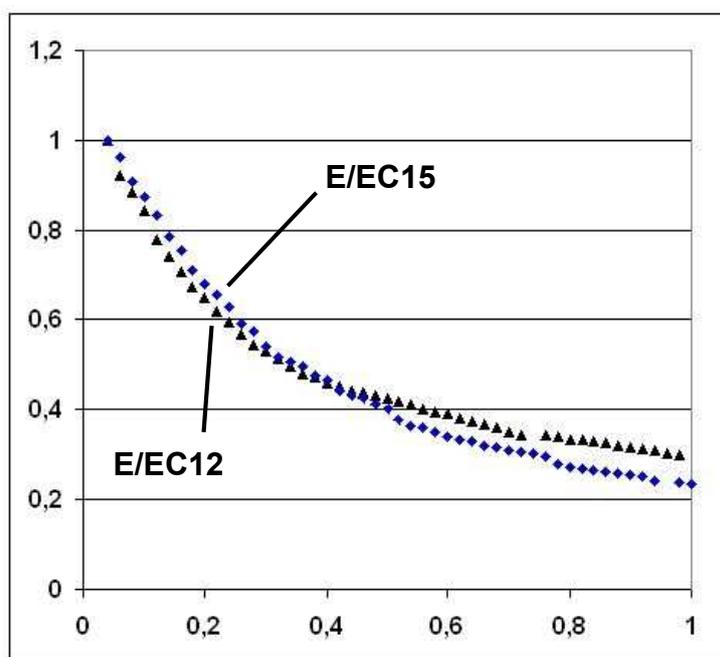


Figure 4 : Stabilité des interactions réalisées par E/EC12 et E/EC15, en présence de 1 mM Ca^{2+} . La cinétique de détachement pour E/EC12 a été réalisée dans les conditions classiques de préparation des lames, alors que la mesure pour E/EC15 a été réalisée en passivant la surface avec le polymère PLL(20)-g-PEG(3.4), à 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ces deux courbes de détachement sont similaires. NB : Les résultats présentés correspondent aux données brutes, i.e. sans extrapolation à $t = 0$.

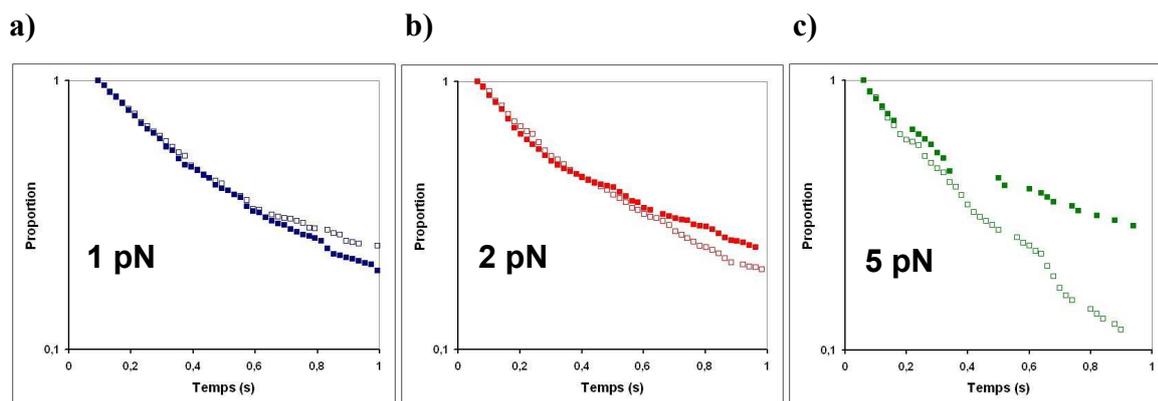


Figure 5 : Influence du calcium et de la force appliquée sur la stabilité de l'interaction entre molécules E/EC15, mesurée en Chambre à Flux Laminaire. Les résultats présentés correspondent aux données brutes, i.e. sans extrapolation à $t = 0$. Les courbes en carrés pleins représentent l'interaction mesurée en présence de 1 mM Ca^{2+} , les carrés vides les mesures réalisées en absence de calcium. On constate que l'interaction soumise à une faible force (1 ou 2 pN) présente une stabilité similaire avec ou sans calcium. Par contre, une nette différence est observée lorsque la force appliquée sur la liaison augmente. Dans ce cas, l'interaction est fragilisée en absence de calcium.

Discussion

Les molécules de cadhérines sont impliquées dans des fonctions biologiques variées, comme la cohésion, la ségrégation, la migration, la morphogenèse ou la différenciation cellulaire, ainsi que la plasticité synaptique. Celles-ci peuvent être directement liées aux propriétés d'interaction adhésive et/ou à la coopération avec différents partenaires moléculaires. Si le rôle des cadhérines dans ces activités biologiques est clairement établi, les mécanismes moléculaires qui permettent de réaliser ces fonctions est encore mal connu. L'une de ces inconnues, pourtant essentielle à la compréhension de ces phénomènes, est le mécanisme d'interaction entre molécules de cadhérines à la surface de deux cellules en contact. Plusieurs études ont pu mettre en évidence les éléments moléculaires impliqués dans l'interface adhésive. Ce n'est que très récemment que certains résultats, ayant initialement donné lieu à différentes conclusions, ont été réinterprétés (Chen et al., 2005 ; Toyanovsky 2005). L'interaction adhésive, entre deux molécules de cadhérines, serait réalisée par l'échange de leur brin N-terminal. Toutefois, le processus moléculaire permettant de passer de la conformation monomérique au complexe adhésif est encore inconnu. Afin de progresser dans notre compréhension, il nous semblait important de considérer les caractéristiques physico-chimiques de l'interaction. C'est pourquoi nous avons cherché à quantifier l'incidence de certains éléments moléculaires, connus pour être essentiels à la fonction des cadhérines.

Le mécanisme d'interaction entre molécules de cadhérines est complexe. Quatre interactions peuvent avoir lieu le long du segment extracellulaire, dont deux sont clairement réalisées au niveau de l'extrémité N-terminale de la molécule (Perret et al., 2006 ; Bayas et al., 2006). Notre première étude, centrée sur l'interface adhésive proprement dite, a permis de déterminer le rôle du Trp2, qui favorise aussi bien la formation que la stabilité de la liaison. Plus précisément, cet acide aminé conservé semble essentiellement jouer sur la première étape d'un processus en deux temps. Le Trp2 est un acide aminé conservé parmi les cadhérines classiques et desmosomales. On peut donc supposer que l'initiation de l'interaction entre molécules de cadhérines est un processus conservé. Par contre, comme l'ont suggéré plusieurs auteurs, la spécificité d'interaction (homophilie, voir paragraphe V-1) pourrait intervenir dans l'ajustement de l'interface adhésive et donc jouer sur la cinétique de formation et/ou la stabilité du second état (Perret et al., 2002 ; Chen et al., 2005).

Notre étude a également permis pour la première fois de mettre en évidence, grâce à l'utilisation de la Chambre à Flux Laminaire, que le processus moléculaire est dissymétrique : l'interaction est initiée par l'une des deux molécules. En effet, les mesures à l'équilibre, réalisées jusqu'ici, n'ont pu observer que l'état le plus stable, à savoir l'échange des deux

brins dans une conformation symétrique. Or, l'approche que nous avons choisie permet non seulement de sonder les cinétiques de formation et de dissociation d'une interaction à l'échelle de la liaison unique, mais également de choisir la nature de chacune des deux molécules en interaction. De plus, l'existence d'un état dissymétrique, n'impliquant qu'un seul Trp2, peut être à la base d'un renforcement de l'adhésion grâce à une coopération plurimoléculaire (voir discussion article I, He et al., 2003). Ainsi, la même interface adhésive permettrait aux molécules de cadhérine de former des liaisons individuelles et/ou de s'oligomériser à la surface des cellules. Cette capacité fournit une base moléculaire pour la régulation de l'adhésion à la surface cellulaire et permet de rendre compte à la fois de la plasticité et de la stabilité des jonctions adhérentes. En effet, une interaction individuelle labile est favorable au remodelage des jonctions entre cellules, alors que l'oligomérisation se traduit par une coopération moléculaire qui permet de propager un contact adhésif, malgré la faible stabilité des liaisons individuelles.

Un autre mode de régulation peut avoir lieu dépendant de la nature des interactions réalisées le long d'une même molécule (Perret et al., 2004). La fixation du calcium, au niveau des poches interdomaines, semble jouer un rôle prépondérant dans les capacités des molécules à réaliser ces différentes interactions (Prakasam et al., 2006). La fixation coopérative des trois ions calcium au niveau de ces poches est nécessaire à la structuration du segment extracellulaire. Une étude de l'incidence du calcium sur les propriétés d'interaction des cadhérines, à l'échelle de la liaison unique, est actuellement en cours. Les premiers résultats ne permettent pas d'observer d'influence significative du calcium sur les cinétiques d'interactions réalisées au niveau de l'extrémité N-terminale de la molécule. Cet effet a été observé aussi bien sur le fragment E/EC12 que sur le segment extracellulaire entier (E/EC15). Un des paramètres critiques pouvant influencer la formation des interactions les plus stables est le temps de contact entre molécules (Perret et al., 2004). En effet, les interactions stables ont pu être observées lorsque ce temps de contact était de l'ordre de la seconde, alors que celui-ci est de l'ordre de la milliseconde dans nos expériences de Chambre à flux laminaire. Ces observations nous suggèrent que lorsque les premières molécules de cadhérines se rencontrent, celles-ci réalisent préférentiellement des interactions labiles. D'après les mesures de cinétiques que nous avons réalisées, les premières liaisons peuvent maintenir un contact entre les deux cellules de l'ordre de la seconde, temps suffisant pour la formation des interactions plus stables, comme observé en biomembrane force probe. La suite de notre étude consistera à approfondir cette hypothèse en étudiant plus précisément l'incidence des ions calcium sur les propriétés cinétiques d'interactions entre molécules individuelles.

Néanmoins, nos premiers résultats ont permis de mettre en évidence le rôle du calcium sur la résistance de l'interaction aux forces de dissociation. En effet, bien que le calcium influence peu les cinétiques interactions lorsque la liaison est soumise à une faible force (1-2 pN), ces interactions sont nettement fragilisées en absence de calcium, lorsqu'elles sont soumises à des forces plus importantes (5 pN). Cette propriété de résistance aux contraintes est capitale pour la fonction mécanique des cadhérines classiques, qui jouent un rôle clé dans le maintien de la cohésion cellulaire au sein des tissus. On peut supposer que cette propriété est également importante dans le contexte cellulaire, pour la signalisation et la coopération des cadhérines avec ses différents partenaires moléculaires. Ainsi, cette résistance pourrait intervenir dans l'homéostasie des jonctions cellulaires en permettant le maintien des cadhérines en interaction, malgré les contraintes appliquées sur la liaison.

L'ensemble de ce travail a consisté à étudier l'incidence d'éléments conservés dans le fonctionnement des cadhérines, et ce en utilisant une des cadhérines les plus étudiée, la E-cadhérine. Une étude complémentaire serait de mesurer les propriétés d'autres cadhérines afin de mettre en évidence l'incidence des spécificités moléculaires sur le mécanisme d'interaction. Ce type d'étude serait très informatif pour comprendre les propriétés d'homophilie des cadhérines appartenant à une même famille, mais aussi d'appréhender les différences fonctionnelles entre les divers familles de cadhérines. En effet, peu de travaux ont été réalisés sur les molécules n'appartenant pas aux cadhérines classiques.

Dans le contexte cellulaire, les propriétés des molécules de cadhérines sont modulées par l'action des divers partenaires cytoplasmiques. Le niveau d'expression à la surface cellulaire, le recrutement dans la zone de contact, le renforcement par l'actine sont essentiels à la mise en place des jonctions adhérentes. Ainsi, la suite à plus long terme sera de mettre en relation les propriétés des divers constituants de ces jonctions, la finalité de ce travail étant de comprendre le fonctionnement des cadhérines dans le contexte cellulaire et notamment la relation entre les propriétés moléculaires et le comportement cellulaire.

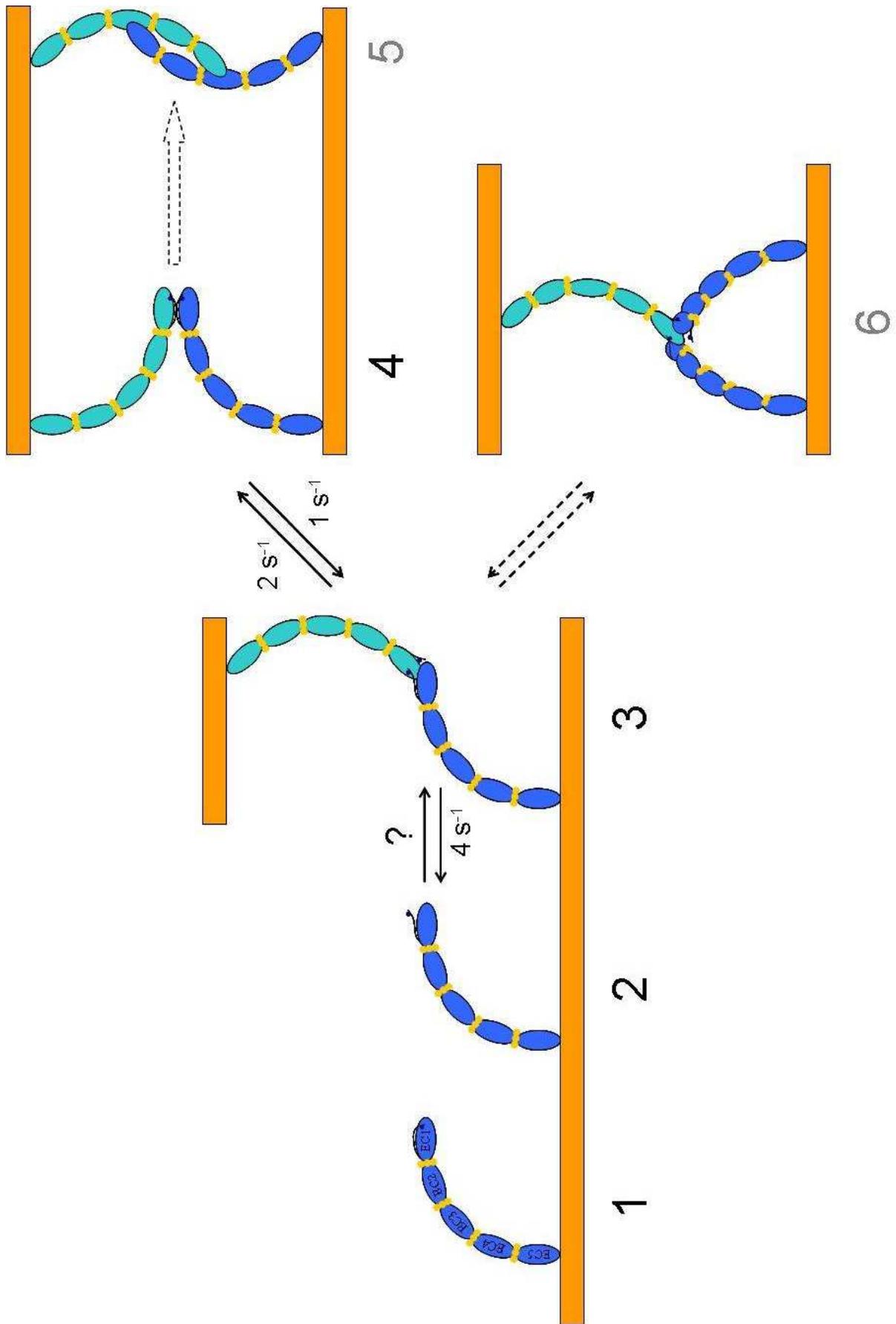


Figure 30

Figure 30 : Mécanisme moléculaire des cadhérines classiques - Bilan de ce travail de thèse

(1) La fixation coopérative de trois ions calcium au niveau des poches interdomaines permet de rigidifier la conformation du segment extracellulaire des cadhérines. Nos données suggèrent que cette conformation ne varie pas dans le contexte cellulaire. **(2)** La transition du monomère au dimère adhésif est réalisée par le passage par un état transitoire « activé », de haute énergie. **(3)** Le processus d'interaction entre molécules de cadhérines est dissymétrique : l'une des deux molécules initie l'interaction en faisant intervenir, notamment, le Trp2. Ce complexe intermédiaire peut soit se dissocier avec une vitesse de 4 s^{-1} ou se renforcer vers un état plus stable à une vitesse de 2 s^{-1} . **(4)** Les données cinétiques (stabilité de 1 s^{-1}) suggèrent que cet état plus stable corresponde au dimère symétrique réalisé par l'échange des deux brins N-terminaux (Haussinger et al., 2004). **(5)** Un des rôles potentiels de ce dimère serait de favoriser la formation d'interactions plus stables, impliquant d'autres motifs que EC1. **(6)** Le complexe intermédiaire dissymétrique (3) pourrait être à la base d'un mécanisme de renforcement du contact adhésif par oligomérisation.

Références Bibliographiques

- Adams CL, Nelson WJ, Smith SJ. Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion.
J Cell Biol. 1996 Dec;135(6 Pt 2):1899-911.
- Adams CL, Chen YT, Smith SJ, Nelson WJ. Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein.
J Cell Biol. 1998 Aug 24;142(4):1105-19.
- Alattia JR, Ames JB, Porumb T, Tong KI, Heng YM, Ottensmeyer P, Kay CM, Ikura M. Lateral self-assembly of E-cadherin directed by cooperative calcium binding.
FEBS Lett. 1997 Nov 17;417(3):405-8.
- Albersdorfer A, Feder T, Sackmann E. Adhesion-induced domain formation by interplay of long-range repulsion and short-range attraction force: a model membrane study.
Biophys J. 1997 Jul;73(1):245-57.
- Alon R, Hammer DA, Springer TA. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow.
Nature. 1995 Apr 6;374(6522):539-42.
- Angres B, Barth A, Nelson WJ. Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: kinetic analysis of E-cadherin-mediated adhesion using a quantitative adhesion assay.
J Cell Biol. 1996 Jul;134(2):549-57.
- Avizienyte E, Frame MC. Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition.
Curr Opin Cell Biol. 2005 Oct;17(5):542-7.
- Baumgartner W, Hinterdorfer P, Ness W, Raab A, Vestweber D, Schindler H, Drenckhahn D. Cadherin interaction probed by atomic force microscopy.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 11;97(8):4005-10.
- Baumgartner W, Hinterdorfer P, Ness W, Raab A, Vestweber D, Schindler H, Drenckhahn D. Cadherin interaction probed by atomic force microscopy.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 11;97(8):4005-10.
- Baumgartner W, Schutz GJ, Wiegand J, Golenhofen N, Drenckhahn D. Cadherin function probed by laser tweezer and single molecule fluorescence in vascular endothelial cells.
J Cell Sci. 2003 Mar 15;116(Pt 6):1001-11.
- Bayas MV, Leung A, Evans E, Leckband D. Lifetime measurements reveal kinetic differences between homophilic cadherin bonds.
Biophys J. 2006 Feb 15;90(4):1385-95.
- Bell GI. Models for the specific adhesion of cells to cells.
Science. 1978 May 12;200(4342):618-27.
- Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression.
Breast Cancer Res. 2001;3(5):289-93.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Brand-Saberi B. Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression.
Acta Anat (Basel). 1996;156(3):217-26.

- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science*. 2002 May 17;296(5571):1308-13.
- Brar SK, Siu CH. Characterization of the cell adhesion molecule gp24 in *Dictyostelium discoideum*. Mediation of cell-cell adhesion via a Ca(2+)-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 1993 Nov 25;268(33):24902-9.
- Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer*. 2002 May;36(2):115-24.
- Brenner, H. The slow motion of a sphere through a viscous fluid towards a plane surface. *Chem. Engn. Sci*. 1961. 16:242–251.
- Brunton VG, MacPherson IR, Frame MC. Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jul 5;1692(2-3):121-44.
- Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL, Brenner MB. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature*. 1994 Nov 10;372(6502):190-3.
- Chan MW, El Sayegh TY, Arora PD, Laschinger CA, Overall CM, Morrison C, McCulloch CA. Regulation of intercellular adhesion strength in fibroblasts. *J Biol Chem*. 2004 Sep 24;279(39):41047-57.
- Chen CL, Liu SS, Ip SM, Wong LC, Ng TY, Ngan HY. E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur J Cancer*. 2003 Mar;39(4):517-23.
- Chen CP, Posy S, Ben-Shaul A, Shapiro L, Honig BH. Specificity of cell-cell adhesion by classical cadherins: Critical role for low-affinity dimerization through beta-strand swapping. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 14;102(24):8531-6.
- Chen X, Gumbiner BM. Crosstalk between different adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Oct;18(5):572-8.
- Chesla SE, Selvaraj P, Zhu C. Measuring two-dimensional receptor-ligand binding kinetics by micropipette. *Biophys J*. 1998 Sep;75(3):1553-72.
- Chitaev NA, Troyanovsky SM. Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *J Cell Biol*. 1998 Aug 10;142(3):837-46.
- Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*. 1999 Feb;24(2):73-6.
- Chu YS, Thomas WA, Eder O, Pincet F, Perez E, Thiery JP, Dufour S. Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *J Cell Biol*. 2004 Dec 20;167(6):1183-94.

Chu YS, Eder O, Thomas WA, Simcha I, Pincet F, Ben-Ze'ev A, Perez E, Thiery JP, Dufour S. Prototypical type I E-cadherin and type II cadherin-7 mediate very distinct adhesiveness through their extracellular domains.

J Biol Chem. 2006 Feb 3;281(5):2901-10.

Coates JC, Harwood AJ. Cell-cell adhesion and signal transduction during Dictyostelium development.

J Cell Sci. 2001 Dec;114(Pt 24):4349-58.

Dahmann C, Basler K. Opposing transcriptional outputs of Hedgehog signaling and engrailed control compartmental cell sorting at the Drosophila A/P boundary.

Cell. 2000 Feb 18;100(4):411-22.

de Rooij J, Kerstens A, Danuser G, Schwartz MA, Waterman-Storer CM. Integrin-dependent actomyosin contraction regulates epithelial cell scattering.

J Cell Biol. 2005 Oct 10;171(1):153-64.

Dembo M, Torney DC, Saxman K, Hammer D. The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment.

Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1988 Jun 22;234(1274):55-83.

Dong HM, Liu G, Hou YF, Wu J, Lu JS, Luo JM, Shen ZZ, Shao ZM. Dominant-negative E-cadherin inhibits the invasiveness of inflammatory breast cancer cells in vitro.

J Cancer Res Clin Oncol. 2006 Aug 24

Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly.

Cell. 2005 Dec 2;123(5):903-15.

Duguay D. Cross adhesion between different cadherins and the basis for cadherin function in tumor invasion-suppression. Ph.D. thesis. (2000). 117 pp. Department of Molecular Biology. Princeton University, Princeton.

Duguay D, Foty RA, Steinberg MS. Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants.

Dev Biol. 2003 Jan 15;253(2):309-23.

Dwir O, Solomon A, Mangan S, Kansas GS, Schwarz US, Alon R. Avidity enhancement of L-selectin bonds by flow: shear-promoted rotation of leukocytes turn labile bonds into functional tethers.

J Cell Biol. 2003 Nov 10;163(3):649-59.

Evans E, Leung A, Heinrich V, Zhu C. Mechanical switching and coupling between two dissociation pathways in a P-selectin adhesion bond.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Aug 3;101(31):11281-6.

Evans E, Leung A, Hammer D, Simon S. Chemically distinct transition states govern rapid dissociation of single L-selectin bonds under force.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 27;98(7):3784-9.

Finger EB, Puri KD, Alon R, Lawrence MB, von Andrian UH, Springer TA. Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear.

Nature. 1996 Jan 18;379(6562):266-9.

Foote J, Milstein C. Kinetic maturation of an immune response.

Nature. 1991 Aug 8;352(6335):530-2.

- Foty RA, Steinberg MS. Measurement of tumor cell cohesion and suppression of invasion by E- or P-cadherin.
Cancer Res. 1997 Nov 15;57(22):5033-6.
- Foty RA, Steinberg MS. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy.
Int J Dev Biol. 2004;48(5-6):397-409.
- Foty RA, Steinberg MS. The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation.
Dev Biol. 2005 Feb 1;278(1):255-63.
- Foty RA, Steinberg MS. The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation.
Dev Biol. 2005 Feb 1;278(1):255-63
- Frank M, Kemler R. Protocadherins.
Curr Opin Cell Biol. 2002 Oct;14(5):557-62.
- Fukata M, Kaibuchi K. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Dec;2(12):887-97.
- Gavard J, Marthiens V, Monnet C, Lambert M, Mege RM. N-cadherin activation substitutes for the cell contact control in cell cycle arrest and myogenic differentiation: involvement of p120 and beta-catenin.
J Biol Chem. 2004 Aug 27;279(35):36795-802.
- Geisbrecht ER, Montell DJ. Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration.
Nat Cell Biol. 2002 Aug;4(8):616-20.
- Goldman, A. J., R. G. Cox, and H. Brenner. Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall. II. Couette flow.
Chem. Engn. Sci. 1967b. 22:653– 660.
- Grzesiak JJ, Pierschbacher MD. Changes in the concentrations of extracellular Mg⁺⁺ and Ca⁺⁺ down-regulate E-cadherin and up-regulate alpha 2 beta 1 integrin function, activating keratinocyte migration on type I collagen.
J Invest Dermatol. 1995 May;104(5):768-74.
- Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Aug;6(8):622-34.
- Handschuh G, Candidus S, Lubber B, Reich U, Schott C, Oswald S, Becke H, Hutzler P, Birchmeier W, Hofler H, Becker KF. Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility.
Oncogene. 1999 Jul 29;18(30):4301-12.
- Handschuh G, Lubber B, Hutzler P, Hofler H, Becker KF. Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences.
J Mol Biol. 2001 Nov 30;314(3):445-54.
- Harrison OJ, Corps EM, Kilshaw PJ. Cadherin adhesion depends on a salt bridge at the N-terminus.
J Cell Sci. 2005 Sep 15;118(Pt 18):4123-30.
- Harwood A, Coates JC. A prehistory of cell adhesion.
Curr Opin Cell Biol. 2004 Oct;16(5):470-6.

Haussinger D, Ahrens T, Sass HJ, Pertz O, Engel J, Grzesiek S. Calcium-dependent homoassociation of E-cadherin by NMR spectroscopy: changes in mobility, conformation and mapping of contact regions.

J Mol Biol. 2002 Dec 6;324(4):823-39.

Haussinger D, Ahrens T, Aberle T, Engel J, Stetefeld J, Grzesiek S. Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography.

EMBO J. 2004 Apr 21;23(8):1699-708.

Hay ED, Zuk A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced.

Am J Kidney Dis. 1995 Oct;26(4):678-90.

Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis.

J Cell Biol. 2000 Feb 21;148(4):779-90.

He W, Cowin P, Stokes DL. Untangling desmosomal knots with electron tomography.

Science. 2003 Oct 3;302(5642):109-13.

Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers.

Am J Pathol. 1998 Aug;153(2):333-9.

Hoffmann I, Balling R. Cloning and expression analysis of a novel mesodermally expressed cadherin.

Dev Biol. 1995 May;169(1):337-46.

Holtfreter J. (1939). Gewebeaffinität, ein Mittel der embryonal Formbildung.

Arch. Exptl. Zellforsch. Gewebezücht. 23: 169-209.

Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W, Takai Y. Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion.

Semin Cell Dev Biol. 2004 Dec;15(6):643-56.

Joo YE, Rew JS, Choi SK, Bom HS, Park CS, Kim SJ. Expression of e-cadherin and catenins in early gastric cancer.

J Clin Gastroenterol. 2002 Jul;35(1):35-42.

Joo YE, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Expression of E-cadherin, alpha- and beta-catenins in patients with pancreatic adenocarcinoma.

Pancreatology. 2002;2(2):129-37.

Keller G. Hereditary aspects of gastric cancer.

Pathologica. 2002 Oct;94(5):229-33.

Kimura Y, Matsunami H, Inoue T, Shimamura K, Uchida N, Ueno T, Miyazaki T, Takeichi M. Cadherin-11 expressed in association with mesenchymal morphogenesis in the head, somite, and limb bud of early mouse embryos.

Dev Biol. 1995 May;169(1):347-58.

Kloboucek A, Behrisch A, Faix J, Sackmann E. Adhesion-induced receptor segregation and adhesion plaque formation: A model membrane study.

Biophys J. 1999 Oct;77(4):2311-28.

- Koch AW, Pokutta S, Lustig A, Engel J. Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains.
Biochemistry. 1997 Jun 24;36(25):7697-705.
- Koenig A, Mueller C, Hasel C, Adler G, Menke A. Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells.
Cancer Res. 2006 May 1;66(9):4662-71.
- Kohmura N, Senzaki K, Hamada S, Kai N, Yasuda R, Watanabe M, Ishii H, Yasuda M, Mishina M, Yagi T. Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex.
Neuron. 1998 Jun;20(6):1137-51.
- Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V, Dominis M, Kemler R. A role for cadherins in tissue formation.
Development. 1996 Oct;122(10):3185-94.
- Le TL, Yap AS, Stow JL. Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics.
J Cell Biol. 1999 Jul 12;146(1):219-32.
- Leckband D. Measuring the forces that control protein interactions.
Annu Rev Biophys Biomol Struct. 2000;29:1-26.
- Lee SJ, Hori Y, Groves JT, Dustin ML, Chakraborty AK. Correlation of a dynamic model for immunological synapse formation with effector functions: two pathways to synapse formation.
Trends Immunol. 2002 Oct;23(10):492-9.
- Lee SJ, Hori Y, Groves JT, Dustin ML, Chakraborty AK. The synapse assembly model.
Trends Immunol. 2002 Oct;23(10):500-2.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. Molecular Cell Biology. 4th Ed. New York.: W.H. Freeman and Company, 2000. ISBN 0-7167-3136-3.
- Marshall BT, Long M, Piper JW, Yago T, McEver RP, Zhu C. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules.
Nature. 2003 May 8;423(6936):190-3.
- Matsunaga M, Hatta K, Nagafuchi A, Takeichi M. Guidance of optic nerve fibres by N-cadherin adhesion molecules.
Nature. 1988 Jul 7;334(6177):62-4.
- McGary EC, Lev DC, Bar-Eli M. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma.
Cancer Biol Ther. 2002 Sep-Oct;1(5):459-65.
- Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege R-M, Cossart P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of L. monocytogenes into epithelial cells.
Cell. 1996 Mar 22;84(6):923-32.
- Merkel R, Nassoy P, Leung A, Ritchie K, Evans E. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy.
Nature. 1999 Jan 7;397(6714):50-3.

- Naishiro Y, Yamada T, Takaoka AS, Hayashi R, Hasegawa F, Imai K, Hirohashi S. Restoration of epithelial cell polarity in a colorectal cancer cell line by suppression of beta-catenin/T-cell factor 4-mediated gene transactivation.
Cancer Res. 2001 Mar 15;61(6):2751-8.
- Navarro P, Ruco L, Dejana E. Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization.
J Cell Biol. 1998 Mar 23;140(6):1475-84.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression.
J Cell Biol. 1999 Nov 1;147(3):631-44.
- Nollet F, Kools P, van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members.
J Mol Biol. 2000 Jun 9;299(3):551-72.
- Noren NK, Niessen CM, Gumbiner BM, BurrIDGE K. Cadherin engagement regulates Rho family GTPases.
J Biol Chem. 2001 Sep 7;276(36):33305-8.
- Nose A, Takeichi M. A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos.
J Cell Biol. 1986 Dec;103(6 Pt 2):2649-58.
- Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems.
Cell. 1988 Sep 23;54(7):993-1001.
- Nose A, Tsuji K, Takeichi M. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules.
Cell. 1990 Apr 6;61(1):147-55
- Overduin, M., Harvey, T. S., Bagby, S., Tong, K. I., Yau, P., Takeichi, M. and Ikura, M. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion.
Science 1995; 67:386-389.
- Ozawa M, Engel J, Kemler R. Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function.
Cell. 1990 Nov 30;63(5):1033-8.
- Panorchan P, Thompson MS, Davis KJ, Tseng Y, Konstantopoulos K, Wirtz D. Single-molecule analysis of cadherin-mediated cell-cell adhesion.
J Cell Sci. 2006 Jan 1;119(Pt 1):66-74.
- Panorchan P, Thompson MS, Davis KJ, Tseng Y, Konstantopoulos K, Wirtz D. Single-molecule analysis of cadherin-mediated cell-cell adhesion.
J Cell Sci. 2006 Jan 1;119(Pt 1):66-74.
- Panorchan P, George JP, Wirtz D. Probing intercellular interactions between vascular endothelial cadherin pairs at single-molecule resolution and in living cells.
J Mol Biol. 2006 May 5;358(3):665-74.

- Patel SD, Ciatto C, Chen CP, Bahna F, Rajebhosale M, Arkus N, Schieren I, Jessell TM, Honig B, Price SR, Shapiro L. Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell*. 2006 Mar 24;124(6):1255-68.
- Paul R, Ewing CM, Robinson JC, Marshall FF, Johnson KR, Wheelock MJ, Isaacs WB. Cadherin-6, a cell adhesion molecule specifically expressed in the proximal renal tubule and renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1997 Jul 1;57(13):2741-8.
- Perret E, Benoliel AM, Nassoy P, Pierres A, Delmas V, Thiery JP, Bongrand P, Feracci H. Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *EMBO J*. 2002 Jun 3;21(11):2537-46.
- Perret E, Leung A, Feracci H, Evans E. Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 23;101(47):16472-7.
- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J. A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J*. 1999 Apr 1;18(7):1738-47.
- Philippova M, Banfi A, Ivanov D, Gianni-Barrera R, Allenspach R, Erne P, Resink T. Atypical GPI-anchored T-cadherin stimulates angiogenesis in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Oct;26(10):2222-30.
- Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Measuring the lifetime of bonds made between surface-linked molecules. *J Biol Chem*. 1995 Nov 3;270(44):26586-92.
- Pierres A, Feracci H, Delmas V, Benoliel AM, Thiery JP, Bongrand P. Experimental study of the interaction range and association rate of surface-attached cadherin 11. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 4;95(16):9256-61.
- Pierres A, Feracci H, Delmas V, Benoliel AM, Thiery JP, Bongrand P. Experimental study of the interaction range and association rate of surface-attached cadherin 11. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 4;95(16):9256-61.
- Pierres A, Benoliel AM, Zhu C, Bongrand P. Diffusion of microspheres in shear flow near a wall: use to measure binding rates between attached molecules. *Biophys J*. 2001 Jul;81(1):25-42.
- Pierres A, Touchard D, Benoliel AM, Bongrand P. Dissecting streptavidin-biotin interaction with a laminar flow chamber. *Biophys J*. 2002 Jun;82(6):3214-23.
- Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R, Engel J. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem*. 1994 Aug 1;223(3):1019-26.
- Puech PH, Feracci H, Brochard-Wyart F. Adhesion between giant vesicles and supported bilayers decorated with chelated E-cadherin fragments. *Langmuir*. 2004 Oct 26;20(22):9763-8.

Reynolds O. An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels. Royal Society, Phil. Trans. 1883; p. 52-105

Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, Mintz KA, Robey PG, Teitelbaum SL, Cheresch DA. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. J Biol Chem. 1993 May 5;268(13):9901-7.

Ryan PL, Foty RA, Kohn J, Steinberg MS. Tissue spreading on implantable substrates is a competitive outcome of cell-cell vs. cell-substratum adhesivity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 10;98(8):4323-7.

Saito T, Nishimura M, Yamasaki H, Kudo R. Hypermethylation in promoter region of E-cadherin gene is associated with tumor dedifferentiation and myometrial invasion in endometrial carcinoma. Cancer. 2003 Feb 15;97(4):1002-9.

Salas A, Shimaoka M, Chen S, Carman CV, Springer T. Transition from rolling to firm adhesion is regulated by the conformation of the I domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen-1. J Biol Chem. 2002 Dec 27;277(52):50255-62.

Senzaki K, Ogawa M, Yagi T. Abstract Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. Cell. 1999 Dec 10;99(6):635-47.

Shan WS, Koch A, Murray J, Colman DR, Shapiro L. The adhesive binding site of cadherins revisited. Biophys Chem. 1999 Dec 13;82(2-3):157-63.

Shan WS, Tanaka H, Phillips GR, Arndt K, Yoshida M, Colman DR, Shapiro L. Functional cis-heterodimers of N- and R-cadherins. J Cell Biol. 2000 Feb 7;148(3):579-90.

Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. Nature. 1995 Mar 23;374(6520):327-37.

Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, Abe O. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. Cancer Res. 1989 Apr 15;49(8):2128-33.

Shimoyama Y, Yoshida T, Terada M, Shimosato Y, Abe O, Hirohashi S. Molecular cloning of a human Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule homologous to mouse placental cadherin: its low expression in human placental tissues. J Cell Biol. 1989 Oct;109(4 Pt 1):1787-94.

Simon SI, Green CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. Annu Rev Biomed Eng. 2005;7:151-85.

Sivasankar S, Briehar W, Lavrik N, Gumbiner B, Leckband D. Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Oct 12;96(21):11820-4.

Sivasankar S, Briehar W, Lavrik N, Gumbiner B, Leckband D. Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Oct 12;96(21):11820-4.

Sivasankar S, Gumbiner B, Leckband D. Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains.

Biophys J. 2001 Apr;80(4):1758-68.

Takeichi M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins.

J Cell Biol. 1977 Nov;75(2 Pt 1):464-74.

Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis.

Development. 1988 Apr;102(4):639-55.

Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins.

Curr Opin Cell Biol. 1995 Oct;7(5):619-27.

Tamura K, Shan WS, Hendrickson WA, Colman DR, Shapiro L. Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin.

Neuron. 1998 Jun;20(6):1153-63.

Togashi H, Abe K, Mizoguchi A, Takaoka K, Chisaka O, Takeichi M. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis.

Neuron. 2002 Jul 3;35(1):77-89.

Tomschy A, Fauser C, Landwehr R, Engel J. Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a cooperative two-step interaction of N-terminal domains.

EMBO J. 1996 Jul 15;15(14):3507-14.

Thoumine O, Lambert M, Mege RM, Choquet D. Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling.

Mol Biol Cell. 2006 Feb;17(2):862-75.

Townes L, Holtfreter J. (1955). Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. J. Exptl. Zool. 128: 53-120.

Tsao SW, Liu Y, Wang X, Yuen PW, Leung SY, Yuen ST, Pan J, Nicholls JM, Cheung AL, Wong YC. The association of E-cadherin expression and the methylation status of the E-cadherin gene in nasopharyngeal carcinoma cells.

Eur J Cancer. 2003 Mar;39(4):524-31.

Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion.

Cell. 2000 Jan 21;100(2):209-19.

Vestweber D, Kemler R. Identification of a putative cell adhesion domain of uvomorulin.

EMBO J. 1985 Dec 16;4(13A):3393-8.

Volk T, Volberg T, Sabanay I, Geiger B. Cleavage of A-CAM by endogenous proteinases in cultured lens cells and in developing chick embryos.

Dev Biol. 1990 Jun;139(2):314-26.

Williams, P. & Evans, E. (2002) in *Physics of Bio-Molecules and Cells*, Les Houches: Ecole d'Ete de Physique Theorique, eds. Flyvberg, H., Ju'licher, F., Ormos, P. & David, F. (EDP Sciences–Springer, Paris), Vol. 75, pp. 186–203.

- Yago T, Wu J, Wey CD, Klopocki AG, Zhu C, McEver RP. Catch bonds govern adhesion through L-selectin at threshold shear.
J Cell Biol. 2004 Sep 13;166(6):913-23.
- Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex.
Cell. 2005 Dec 2;123(5):889-901.
- Yap AS, Briehner WM, Pruschy M, Gumbiner BM. Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function.
Curr Biol. 1997 May 1;7(5):308-15.
- Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn.
J Cell Biol. 1998 May 4;141(3):779-89.
- Zhang Y, Neelamegham S. Estimating the efficiency of cell capture and arrest in flow chambers: study of neutrophil binding via E-selectin and ICAM-1.
Biophys J. 2002 Oct;83(4):1934-52.
- Zhong Y, Briehner WM, Gumbiner BM. Analysis of C-cadherin regulation during tissue morphogenesis with an activating antibody.
J Cell Biol. 1999 Jan 25;144(2):351-9.
- Zhu B, Chappuis-Flament S, Wong E, Jensen IE, Gumbiner BM, Leckband D. Functional analysis of the structural basis of homophilic cadherin adhesion.
Biophys J. 2003 Jun;84(6):4033-42.