



HAL
open science

Etude de l'assemblage supramoléculaire des cadhérines, et dynamique d'adhésion

Sébastien Chevalier

► **To cite this version:**

Sébastien Chevalier. Etude de l'assemblage supramoléculaire des cadhérines, et dynamique d'adhésion. Biochimie [q-bio.BM]. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2009. Français. NNT: . tel-00752404

HAL Id: tel-00752404

<https://theses.hal.science/tel-00752404>

Submitted on 15 Nov 2012

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.

N° d'ordre : 3970

THÈSE
PRÉSENTÉE A
L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Par M. CHEVALIER, Sébastien Vincent

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR
SPÉCIALITÉ : Biochimie

Etude de l'assemblage supramoléculaire des cadhérines, et
dynamique d'adhésion

Thèse dirigée par Dr. FERACCI, Hélène

Soutenue le : 15 décembre 2009

Devant la commission d'examen formée de :

M. DE LA FUENTE, Jesus, Université de Saragosse
M. MEGE, René-Marc, Université Pierre et Marie Curie
Mme ODA, Reiko, Université de Bordeaux
M. RICHETTI, Philippe, Université de Bordeaux
M. SILBERZAN, Pascal, Université Pierre et Marie Curie
Mme FERACCI, Hélène, Université de Bordeaux

Sommaire

Avant-Propos	1
Exposé Bibliographique	7
I. Les jonctions intercellulaires	9
1. Les jonctions serrées (zonulae occludentes)	10
2. Les jonctions adhérentes (zonulae adherentes)	10
3. Les desmosomes (maculae adherentes)	12
4. Les jonctions communicantes (gap junctions)	14
II. La Superfamille des cadhérines	14
1. Description	14
2. Les cadhérines classiques de type I	17
a. Interface adhésive et échange de brin β	17
b. Modification de conformation lors de l'interaction : le Domain Swapping	24
c. Implication des modules EC dans l'interaction cadhérine	29
3. Les cadhérines classiques de type II	32
4. Les cadhérines desmosomales	34
5. La T-cadhérine	37
6. La spécificité d'interaction des cadhérines	39
a. Tests d'agrégation cellulaire	39
b. Modèle théorique de l'adhésion spécifique	41
c. Comparaison entre cadhérines de type I et cadhérines de type II	43
III. Régulation des cadhérines	44
1. Assemblage des cadhérines et formation des jonctions	44
2. Régulations de l'adhésion	46
3. Cadhérines et développement	47
a. Un peu d'embryologie	47
b. Cadherin Switching et transition épithélio-mésenchymateuse	49
IV. Biofonctionnalisation	51
1. Modification de surface	51
2. Méthodes d'immobilisation des biomolécules	55
a. Fixation des protéines non orientée	55
i. Attachement non covalent par adsorption	55
ii. Attachement covalent	55
b. Fixation orientée des protéines	57
3. Chimie et géométrie	59
Objectif du travail	65
Article I : Tryptophan 2: the cadherin feeler, finding the way for the trans interaction	67
Article II: Type I vs Type II Cadherins	99
Article III: Surfaces Covalently Covered with E-Cadherin to Improve Cell Adhesion Events	125
Article IV: Beyond Structure, to survival: Activation of Stat3 by cadherin engagement	151
Conclusion	165
Références Bibliographiques	171

Résumé:

Les mécanismes adhésifs jouent un rôle crucial en biologie. Les cadhérines classiques constituent une des principales familles de molécules d'adhésion cellulaire dépendante du calcium. Ces glycoprotéines transmembranaires sont impliquées dans des interactions principalement homophiles. Ces interactions régulent des voies de signalisation impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques. Cette thèse porte sur l'étude comparative des dynamiques d'interactions des cadhérines E- et -11, prototypes respectivement des cadhérines classiques de type I et II. Le ciblage d'acides aminés particuliers de l'interface adhésive nous a permis de montrer que pour les cadhérines de type I, l'échange de brin β avec le Trp2 ont un rôle clé ; pour les types II un mécanisme différent intervient. Nous avons aussi développé une chimie innovante pour contrôler l'immobilisation orientée et covalente de protéines. Enfin une revue décrit une étude de l'activation de voies de signalisation par engagement des cadhérines.

Mots clés : Cadhérines, Dynamique d'interaction, Molécule unique, Chambre de flux, biofonctionnalisation, structure-fonction, signalisation

Summary:

Cell adhesion receptors of the classical cadherin family are involved in Ca^{2+} -dependent homophilic interactions. In order to dissect the molecular mechanisms of cadherin-based cell-cell adhesion, this Ph.D. thesis describes a comparative dynamic study of interactions between cadherins E- & -11, chosen as classical type I and II cadherins prototypes respectively. Modifications of particular residues in the E-cadherin adhesive interface showed that the β -strand exchange with its Trp2 had a prominent feature; for type II cadherins, a different mechanism was described involving a larger domain swapping. We then developed a new protocol for immobilizing proteins in an orientated and covalent manner on surfaces. These interactions regulate signalization pathways in various biological processes. Studies describing Stat3 activation through direct cadherin engagement are reviewed.

Key words: Cadherins, interaction dynamics, single molecule, flow chamber, biofunctionalization, structure-function relationships, signalling pathways

AVANT-PROPOS

L'adhérence cellulaire est un phénomène ubiquitaire essentiel pour le développement et le fonctionnement en harmonie des organismes pluricellulaires. Elle intervient dans des phénomènes physiologiques très divers comme la survie, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. Une dérégulation de cette adhérence cellulaire peut conduire à de nombreuses pathologies comme l'inflammation, l'invasion d'un tissu par un agent pathogène, la réaction de l'organisme vis-à-vis des biomatériaux, et en particulier à la formation de métastases. L'adhérence participe de façon importante à l'organisation et la structuration des tissus, et est ainsi nécessaire à la cohésion et au bon fonctionnement des organismes multicellulaires. Ainsi, les mécanismes adhésifs jouent un rôle crucial en biologie.

Les cellules adhèrent sélectivement entre elles et à des molécules de la matrice extracellulaire qui assure le soutien mécanique de l'ensemble. Il est maintenant clair que les conséquences de l'engagement de récepteurs adhésifs sont bien plus larges qu'un simple ancrage mécanique des cellules à un endroit donné dans l'organisme. Outre leur rôle d'attachement, les molécules adhésives ont souvent un rôle de senseur pour les cellules. En effet l'adhérence informe la cellule sur environnement, et affecte plusieurs éléments structuraux et fonctionnels comme l'organisation du cytosquelette, la polarité ou la prolifération cellulaire, et l'expression de gènes. Les interactions adhésives sont assurées majoritairement par des protéines transmembranaires et parfois par des sucres ou des peptides.

Les protéines d'adhésion peuvent être classées en 4 familles structurales : les protéines apparentées aux immunoglobulines, les intégrines, les sélectines et enfin les cadhérines. Ces dernières forment une des principales familles de molécules assurant l'adhésion intercellulaire dépendante du calcium. Ces glycoprotéines transmembranaires se lient par interaction homophile de leurs segments extracellulaires, et ainsi connectent les cellules entre elles. Le domaine intracytoplasmique de ces molécules se lie aux filaments d'actine et participe à différentes voies de signalisation. La majorité des cellules expriment plusieurs types de cadhérines à leur surface, suggérant une coopération complexe entre adhésion et signalisation cellulaire.

Durant ma thèse, je me suis intéressé à l'adhésion cellule-cellule par les cadhérines classiques de type I et de type II. La E-cadhérine et la cadhérine-11 ont été choisies comme

prototypes de ces 2 familles de cadhérines pour leurs patrons d'expression qui suggère des rôles biologiques distincts. En effet la E-cadhérine est exprimée à la surface des cellules épithéliales, au niveau des jonctions adhérentes qui forment une ceinture adhésive entre les cellules épithéliales. La cadhérine-11 est quant à elle exprimée en particulier à la surface de cellules ayant un phénotype mésenchymateux (comme les synoviocytes ou les myofibroblastes) ou encore des neurones et des ostéoblastes. La cadhérine-11 s'organise en points de contacts jonctionnels à la surface de ces cellules (Hinz et al, 2004; Kiener et al, 2009).

L'exposé bibliographique présenté dans ce manuscrit fait tout d'abord le point sur l'état de l'art de la superfamille des cadhérines. Nous décrivons d'abord les 5 familles de cadhérines, en nous intéressant plus particulièrement aux cadhérines classiques de type I et de type II. Nous détaillerons les propriétés structurales de leurs interactions. Puis nous étudierons comment les cadhérines participent à l'organisation du cytosquelette, contribuent à la formation des jonctions adhérentes, et interviennent dans la ségrégation cellulaire au cours du développement embryonnaire. Nous nous sommes enfin intéressés à différentes méthodes de chimie de surface permettant l'immobilisation de molécules. L'objectif est de réaliser des surfaces biomimétiques permettant de progresser dans la compréhension des phénomènes adhésifs.

C'est dans ce contexte que nous avons comparé les interactions homophiles réalisées par la E-cadhérine et la cadhérine-11, en conditions dynamiques. Notre approche a pour but de caractériser la nanomécanique de ces protéines à l'échelle de la molécule unique, pour mieux comprendre les relations structure fonction et faire le lien avec le fonctionnement des cadhérines dans leur contexte cellulaire. Un tel projet exige la mise au point de nouveaux outils biochimiques et chimiques, que nous avons commencé à développer en particulier au cours de cette thèse.

La première partie des résultats définit le rôle de certains éléments structuraux très conservés parmi les cadhérines de type I et de type II dans la dynamique d'adhésion. L'influence de ces éléments structuraux a été mise en évidence en combinant les techniques de biologie moléculaire et de mesures d'interactions en chambre à flux laminaire.

La deuxième partie de ce travail décrit le développement d'une nouvelle stratégie de fixation covalente et orientée des fragments protéiques via leur motif hexahistidine. Ce nouveau procédé, développé pour les cadhérines, peut être très facilement transposable à d'autres molécules possédant le motif hexahistidine, et fait l'objet d'un dépôt de brevet.

Enfin, le dernier volet de ce travail consiste en une synthèse des travaux montrant que l'engagement direct de la E-cadhérine intervient sur l'activation et la régulation d'un facteur de transcription, Stat3, et sur la survie cellulaire.

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les jonctions intercellulaires

Au sein d'un organisme multicellulaire, les contacts intercellulaires jouent des rôles essentiels dans de nombreux processus cellulaires dont la morphogenèse, la différenciation, la prolifération et la migration (Gumbiner, 1996; Takeichi, 1991). Lorsque l'on évoque l'adhérence cellulaire et en particulier l'adhérence intercellulaire, il est utile de préciser quels sont les éléments subcellulaires qui la structurent.

L'arrivée de la microscopie électronique à transmission, dans les années 1960, a permis d'identifier et de décrire morphologiquement une succession de structures jonctionnelles (complexe jonctionnel $\leq 1\mu\text{m}$) qui n'étaient pas détectables par microscopie photonique (Farquhar & Palade, 1963). Ces points d'attachement apparaissent très complexes d'un point de vue morphologique (Figure 1), avec une structuration spécifique de l'espace intercellulaire et du cytoplasme sous-jacent. Cette complexité a été confirmée par l'identification des différentes protéines transmembranaires et intracytoplasmiques qui constituent ces jonctions. Ces sites de contact possèdent une architecture globale commune et, de façon générale, sont constitués de deux catégories de protéines :

- des protéines de liaison transmembranaires, dont les domaines extracellulaires interagissent avec ceux de leurs partenaires exprimés sur la cellule voisine. Leurs domaines cytoplasmiques participent à la connexion de ces structures au réseau cytosquelettique, par leurs interactions avec une ou plusieurs protéines d'attachement intracellulaire,
- des protéines intracellulaires qui forment une plaque dense aux électrons du côté cytoplasmique et régulent la connexion du complexe jonctionnel au réseau d'actine ou aux filaments intermédiaires.

Il existe quatre types de jonctions intercellulaires: les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes (Figure 1). Ces jonctions sont particulièrement bien organisées dans les structures tissulaires de type épithélial, mais sont aussi présentes dans d'autres tissus (muscle cardiaque, tissus nerveux...).

Nous décrirons ces 4 types de jonctions, en nous intéressant plus particulièrement aux jonctions adhérentes et aux desmosomes, les cadhérines étant les récepteurs adhésifs de ces plaques adhésives.

1. Les jonctions serrées (*zonulae occludentes*)

Les jonctions serrées constituent une barrière de perméabilité sélective au niveau des feuilletts cellulaires épithéliaux et une barrière de diffusion des lipides et des protéines membranaires délimitant les domaines apicaux et basolatéraux de la membrane plasmique. Ces jonctions sont présentes principalement dans les cellules épithéliales et endothéliales.

Les jonctions serrées se situent au niveau de la portion apicale de la membrane latérale des cellules et apparaissent comme une succession de points de contact discrets, récemment appelés « kissing points », où les membranes semblent fusionnées (espace intercellulaire indétectable), formant une ceinture perméable autour de la cellule. Au sein d'une cellule, il existe plusieurs chaînes de « kissing points ». Ces chaînes sont formées par l'association de protéines transmembranaires spécifiques au niveau de deux membranes plasmiques adjacentes. L'occludine, première protéine transmembranaire des jonctions serrées, a été identifiée il y a qu'une quinzaine d'années (Furuse et al, 1993).

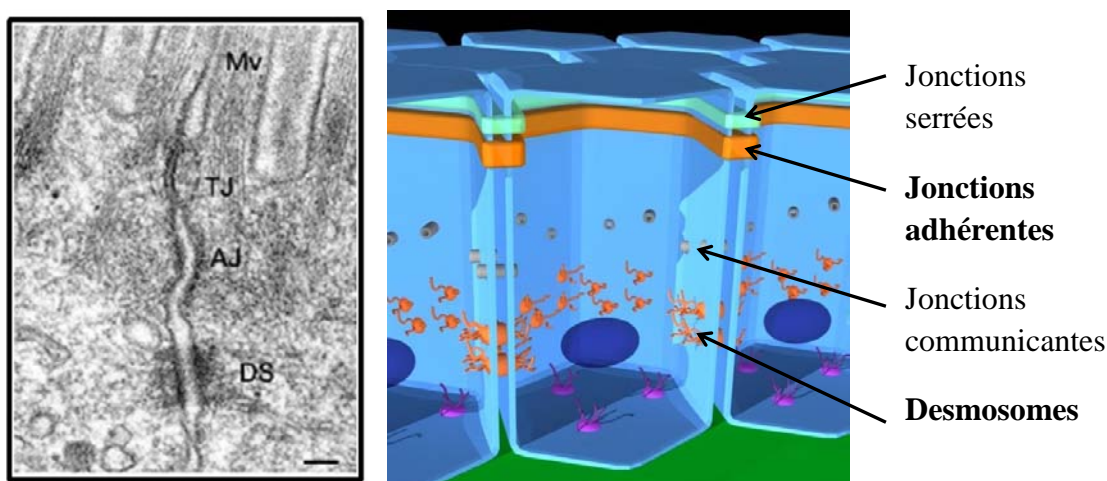


Figure 1: Morphologie des jonctions intercellulaires. (a) Cliché de microscopie électronique à transmission représentant 3 des jonctions intercellulaires (Tsukita et al, 2001). (b) Schéma de cellules épithéliales polarisées avec positionnement des différentes jonctions.

2. Les jonctions adhérentes (*zonulae adherentes*)

Ces jonctions, situées en position basale des jonctions serrées, forment des connexions entre cellules voisines et présentent un espace intercellulaire d'environ 20 nm, observable par microscopie électronique (Farquhar & Palade, 1963). Les ponts transmembranaires sont constitués dans ces structures par les cadhérines. Ces molécules ont une spécificité tissulaire, par exemple la E-cadhérine est exprimée dans les cellules épithéliales, la N-cadhérine dans les cellules nerveuses et le muscle cardiaque, la P-cadhérine dans le placenta. Le segment

intracellulaire des cadhérines se lie, au niveau du réticulum endoplasmique, à la β ou à la γ -caténine aussi appelée plakoglobine (Hinck et al, 1994). L' α -caténine vient ensuite s'associer à la β (ou γ)-caténine et fait le lien avec le réseau d'actine. Bien que le complexe cadhérines-caténines inclue l' α -caténine (protéine de liaison au cytosquelette), il n'a jamais été démontré que ce complexe se lie directement au réseau d'actine, comme il est généralement assumé. Dans le modèle proposé par W.J. Nelson, l'interaction entre le complexe cadhérines-caténines et l'actine est réalisée par les monomères d' α -caténines liés à la β (ou γ)-caténine, en équilibre avec les dimères d' α -caténines liés au cytosquelette d'actine (Nelson, 2008). En effet, des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ont montré que bien que les éléments du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine aient une fraction mobile similaire, l' α -caténine immédiatement adjacente au contact cellule-cellule était beaucoup plus dynamique (Yamada et al, 2005). Différentes protéines de liaison à l'actine viennent compléter cet échafaudage moléculaire : la vinculine, l' α -actinine et aussi ZO-1 et ZO-2 mais uniquement dans les cellules non épithéliales qui ne possèdent pas de jonctions serrées, comme les fibroblastes ou les cellules de muscle cardiaque (Nagafuchi et al, 1994). Une autre protéine intracellulaire, appelée p120, semble être très importante pour réguler le niveau de E-cadhérine à la surface cellulaire (Peifer & Yap, 2003; van Hengel & van Roy, 2007). Plus récemment, les nectines ont été découvertes comme constituants des jonctions adhérentes (Morrison & Racaniello, 1992). Les nectines, actuellement au nombre de 4, font partie de la superfamille des immunoglobulines et se lient à l'afadine par leur l'extrémité C-terminale. Deux isoformes de l'afadine résultant d'épissage alternatif ont été identifiées, mais seule la 1-afadine se lie à l'actine (Mandai et al, 1997). Le complexe nectine-afadine semble jouer un rôle important dans l'organisation des jonctions cellulaires. De nombreuses autres protéines ont été identifiées au niveau des jonctions adhérentes, comme ceci est représenté sur la Figure 2 soulignant à nouveau la complexité moléculaire de ces jonctions et suggérant une régulation importante.

Les jonctions intercellulaires assurent la cohésion de tissus tels que les épithéliums ou le tissu cardiaque. Cette homéostasie peut subir des dérèglements au cours de la progression tumorale et les cadhérines, éléments structuraux de ces jonctions, sont souvent impliquées. Dans les tumeurs humaines, la perte de l'adhésion via les cadhérines est corrélée à l'acquisition du pouvoir métastatique des carcinomes. Parmi les phénomènes responsables de cette perte d'adhésion, on peut trouver des mutations du gène de la E-cadhérine, une diminution ou une inhibition totale d'expression de la E-cadhérine. En effet, la E-cadhérine est classée parmi les gènes supresseurs de tumeurs ; 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 & 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. De plus, l'expression de N-cadhérine a aussi été corrélée à une augmentation de la motilité et du caractère invasif de cellules cancéreuses mammaires (Hazan et al, 2000; Nieman et al, 1999). Cet effet de la N-cadhérine s'exprime malgré la présence de E-cadhérine, normalement suppresseur de motilité. Enfin, une expression réduite de la E-cadhérine est observée dans des carcinomes squameux de la peau et dans la maladie de Paget. D'autres maladies comme le *bullous pemphigoid* ou le *psoriasis* sont caractérisées par une forte quantité de E-cadhérine soluble dans le sérum des patients (Furukawa et al, 1994).

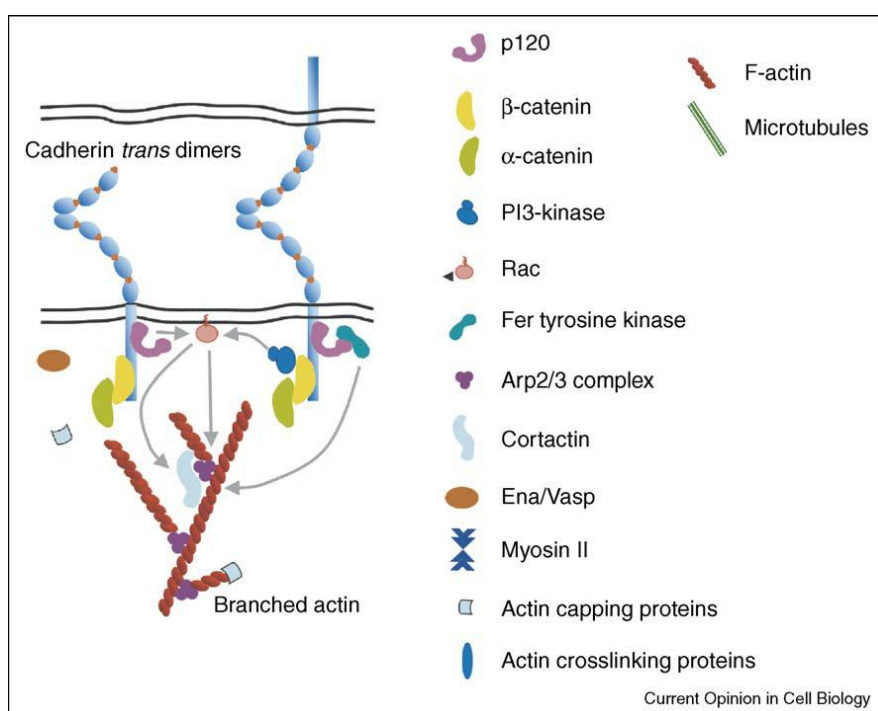


Figure 2 : Représentation schématique de l'échafaudage moléculaire des jonctions adhérentes (Mege et al, 2006). La E-cadhérine, au niveau des jonctions adhérentes, se lie directement à la β -caténine. La β -caténine interagit avec l' α -caténine qui contribue à la polymérisation des filaments d'actine.

3. Les desmosomes (*maculae adherentes*)

Les desmosomes sont observés principalement dans les tissus soumis à des contraintes mécaniques (épithéliums et muscle cardiaque). Ils sont distribués le long de la membrane latérale sans localisation spécifique, souvent en alternance avec les jonctions adhérentes (Vasioukhin et al, 2000). L'espace intercellulaire est de 30 nm environ (Farquhar & Palade, 1963). Ces jonctions sont également constituées de membres de la superfamille des cadhérines, les desmocollines et desmoglénines (Figure 3). La plaque intracytoplasmique,

composée de plakoglobines et desmoplakines, réalise un support d'ancrage pour les filaments intermédiaires de cytokératine. La plakoglobine s'associe au segment cytoplasmique des desmocollines et desmogléines. Elle est homologue à la β -caténine et est d'ailleurs parfois retrouvée associée aux cadhérines au niveau des jonctions adhérentes (Gumbiner, 1996).

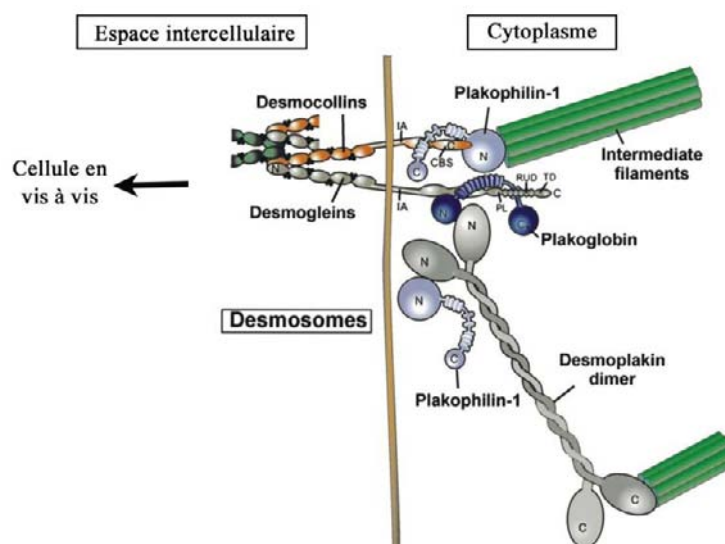


Figure 3 : Modèle d'interaction des complexes protéiques au niveau des desmosomes. (D'après Nollet et al., 2000). Des hétérodimères cis de desmocolline-desmogléine s'associent par leur domaine extracellulaire. Le domaine intracellulaire s'associe à un complexe multiprotéique : plakoglobine, plakofiline-1 et desmoplakine. Ces protéines font le lien avec les filaments intermédiaires.

Deux maladies auto-immunes de la peau et des muqueuses, *pemphigus foliaceus* et *pemphigus vulgaris*, ont pour cause la production d'anticorps dirigés respectivement contre les desmogléines Dsg1 et Dsg3 (Lin et al, 1997). D'autres *pemphigus* à IgA ont pour cible la desmocolline Dsc1 (Hashimoto et al, 1997). Ces divers pemphigus sont caractérisés par une perturbation des desmosomes au niveau des cellules épithéliales, à l'origine d'un détachement cellulaire provoquant l'apparition de cloques au sein des différentes couches de l'épiderme (Lin et al, 1997). Des souris transgéniques synthétisant la Dsg3 tronquée de son domaine amino-terminal présentent des symptômes proches de ceux du *pemphigus vulgaris* (Allen et al, 1996). Les desmogléines sont également impliquées dans une variante de la keratodermie palmoplantaire striée, correspondant à une hyperkératination des mains et des pieds. Cette pathologie proviendrait d'une mutation ponctuelle conduisant à un épissage aberrant de l'ARNm ayant pour conséquence la perte du domaine EC1 et du début de EC2 de la desmogléine Dsg1 (Rickman et al, 1999).

4. Les jonctions communicantes (gap junctions)

Les jonctions communicantes correspondent à la concentration de canaux intercellulaires au niveau des contacts entre deux cellules. L'unité de base de ces canaux est une protéine transmembranaire, la connexine. Six connexines s'assemblent pour former un connexon et l'association de deux connexons de deux cellules voisines forme un canal intercellulaire. Ce canal permet à des ions et à d'autres molécules hydrosolubles (oses, acides aminés, nucléotides et vitamines) d'une taille $\sim \leq 1$ kDa de passer directement d'une cellule à l'autre. L'espace intercellulaire est d'environ 3 nm.

En conclusion, les cellules sont capables, pour rester cohésives, d'organiser des assemblages relativement complexes : les jonctions intercellulaires. La complexité morphologique de ces structures se retrouve au niveau moléculaire. Ces jonctions sont constituées de protéines d'adhésion et de protéines intracellulaires spécifiques qui peuvent aussi servir de liens entre différents types de jonctions et intervenir dans la plasticité des contacts. L'ensemble de ces protéines constitue un échafaudage supramoléculaire très régulé qui participe à la transmission du signal entre le milieu extra- et intra-cellulaire et réciproquement, et, également d'une cellule à l'autre au sein d'une structure tissulaire.

Les jonctions adhérentes et les desmosomes sont structurés au niveau transmembranaire par les membres de la superfamille des cadhérines. Ces molécules ont des structures très voisines et semblent remplir des fonctions différentes, dans des processus normaux et pathologiques. La E-cadhérine, constituant principal des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales, semble intervenir dans les premières étapes de l'assemblage du complexe jonctionnel apical et ainsi être un élément essentiel dans leur organisation. C'est la raison pour laquelle notre intérêt s'est particulièrement porté sur les cadhérines.

II. La Superfamille des cadhérines

1. Description

Les cadhérines constituent une superfamille de glycoprotéines transmembranaires qui lient le calcium, dont la plupart ont des propriétés adhésives. Dans cette superfamille, c'est la E-cadhérine qui a d'abord été décrite, isolée à partir d'embryon de souris au stade morula et appelée uvomoruline (Hyafil et al, 1981) ou L-CAM chez le poulet (Gallin et al, 1983). Peu

après la découverte de la E-cadhérine, la P- puis la N-cadhérine ont été décrites (Miyatani et al, 1989; Nose & Takeichi, 1986). L'utilisation de RT-PCR a permis ensuite de découvrir d'autres cadhérines (cadhérines 4 à 11) dans les tissus nerveux de rat (Suzuki et al, 1991). Depuis, la superfamille des cadhérines n'a cessé de croître grâce aux programmes de séquençage du génome, avec aujourd'hui plus de 350 cadhérines identifiées si l'on inclut les isoformes caractéristiques des différentes espèces animales (Hulpiau & van Roy, 2009).

Tous les membres de la superfamille des cadhérines ont un domaine extracellulaire multimodulaire avec la présence de « motifs cadhérines » d'environ 110 acides aminés de long (Figure 2). Ces motifs cadhérines ont des sites très conservés qui permettent de les identifier, comme les séquences: LDRE (Leu-Asp-Arg-Glu), DxNDN (Asp-x-Asn-Asp-Asn) et DxD (Asp-x-Asp) (Hatta et al, 1988) (Figure 6). Ces acides aminés constituent les éléments structuraux des poches de fixation du calcium qui sont situés entre 2 modules extracellulaires consécutifs. En effet, les cadhérines (Ca pour calcium et Adherin pour adhésion en grec) sont des molécules dont l'activité biologique est dépendante du calcium (Takeichi, 1977).

La E-cadhérine reste sans conteste la cadhérine la plus étudiée, et est souvent considérée comme la cadhérine de référence. Outre sa fonction de "colle moléculaire", elle est impliquée dans un grand nombre de régulations au cours du développement embryonnaire, et est capable d'influencer la différenciation cellulaire et la morphogénèse des tissus (Larue et al, 1996a; van Roy & Berx, 2008). De plus le gène de la E-cadhérine est aussi considéré comme suppresseur de tumeur (Jeanes et al, 2008). Cette molécule possède un ectodomaine comprenant 5 modules extracellulaires de ~110 acides aminés chacun, un domaine transmembranaire, et une queue cytoplasmique en interaction avec le cytosquelette d'actine via les caténines. Nollet et al. ont proposé une classification basée sur les similarités de séquences de l'ensemble des cadhérines en 5 familles (Nollet et al, 2000) (Figure 4) :

1. les cadhérines classiques de type I ont de nombreuses homologies de séquence avec la E-cadhérine (68% à 78% pour le module EC1), et présentent des éléments conservés comme un tryptophane en 2^{ème} position (Trp2) ou la séquence HAV (His79, Ala80, Val81). On en dénombre 5 différentes : les E-, N-, P-, R- et C-cadhérines ;
2. les cadhérines classiques de type II ne présentent, au niveau du module EC1, que 40 à 50% d'homologie de séquence avec le module EC1 de la E-cadhérine. Le motif HAV, est ici remplacé par le motif QAV (Gln76, Ala77, Val78). Ces cadhérines présentent de fortes similarités entre elles, et en particulier 2 tryptophanes en 2^{ème} et 4^{ème} position (Trp2 et 4). Elles sont au nombre de 12 (cadhérine-5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -18, -19, -20 et la PB-) ;

3. les desmocollines et les desmoglénines sont les cadhérines présentes au niveau des desmosomes, comme ceci a déjà été mentionné. Leur module EC1 présente ~50% de similarité avec celui de la E-cadhérine. Les cadhérines desmosomales possèdent aussi un Trp2 et la séquence HAV. Cependant, leur segment cytoplasmique interagit avec les filaments intermédiaires et non pas avec les filaments d'actine, à la différence des cadhérines classiques de type I et II. Il existe 3 desmocollines et 4 desmoglénines différentes ;
4. les protocadhérines possèdent 1 ou 2 modules extracellulaires supplémentaires par rapport aux cadhérines décrites précédemment. Les modules extracellulaires sont semblables au sein de cette même famille, mais différents de ceux de la E-cadhérine (Nollet et al, 2000). En particulier, le Trp2 et la séquence HAV ne sont pas présents au sein de cette famille. Leur queue cytoplasmique diffère aussi de celles des autres cadhérines ; elle interagit à la fois avec l'actine, mais aussi avec les neurofilaments et les microtubules (Yagi, 2008). Le domaine EC1 de certaines protocadhérines possède un motif RGD (Arg-Gly-Asp) (Morishita & Yagi, 2007). Ainsi, ces molécules peuvent interagir avec les intégrines (Mutoh et al, 2004). Avec plus de 50 membres différents, elles constituent par le nombre la plus importante famille de cadhérines ;
5. les autres cadhérines sont répertoriées dans cette dernière famille, dite des protéines apparentées aux cadhérines. Ces cadhérines ne possèdent ni Trp2, ni séquence HAV et ne présentent pas vraiment d'homologies entre elles. Dans cette famille, la T-cadhérine est remarquable par le fait qu'elle est la seule cadhérine dépourvue de domaine intracytoplasmique et est insérée dans la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). Les Fat-cadhérines ou encore les cadhérines flamingo à 7 domaines transmembranaires ont de multiples modules EC (respectivement 33 et 9) ; elles ont de plus des motifs EGF et laminine, ainsi qu'une boîte Flamingo pour la cadhérine homonyme (Nollet et al, 2000). Il existe une quinzaine de protéines apparentées aux cadhérines.

L'ensemble des données structurelles et fonctionnelles montrent que 3 ions calcium se fixent dans chaque poche entre 2 modules cadhérines consécutifs, soit 12 ions sur l'ensemble du fragment extracellulaire des cadhérines classiques, rigidifiant ainsi l'ensemble de l'ectodomaine (Boggon et al, 2002; Pertz et al, 1999b). Cette fixation ($K_D \sim 25 \mu M$), qui s'opère de manière coopérative, induit de légers changements de conformation et participe à la maturité structurale de la protéine fonctionnelle (Courjean et al, 2008). Les expériences de RMN de même que les simulations numériques suggèrent

que cette fixation de calcium favoriserait la dimérisation des cadhérines (Haussinger et al, 2004; Haussinger et al, 2002; Sotomayor & Schulten, 2008). Une étude très récente sur le segment extracellulaire EC15 de la E-cadhérine par FRET (fluorescence résonance energy transfer) confirme que, en solution, la dimérisation est dépendante de la présence de calcium et est observée à 0.1 mM de calcium (Sivasankar et al, 2009; Zhang et al, 2009).

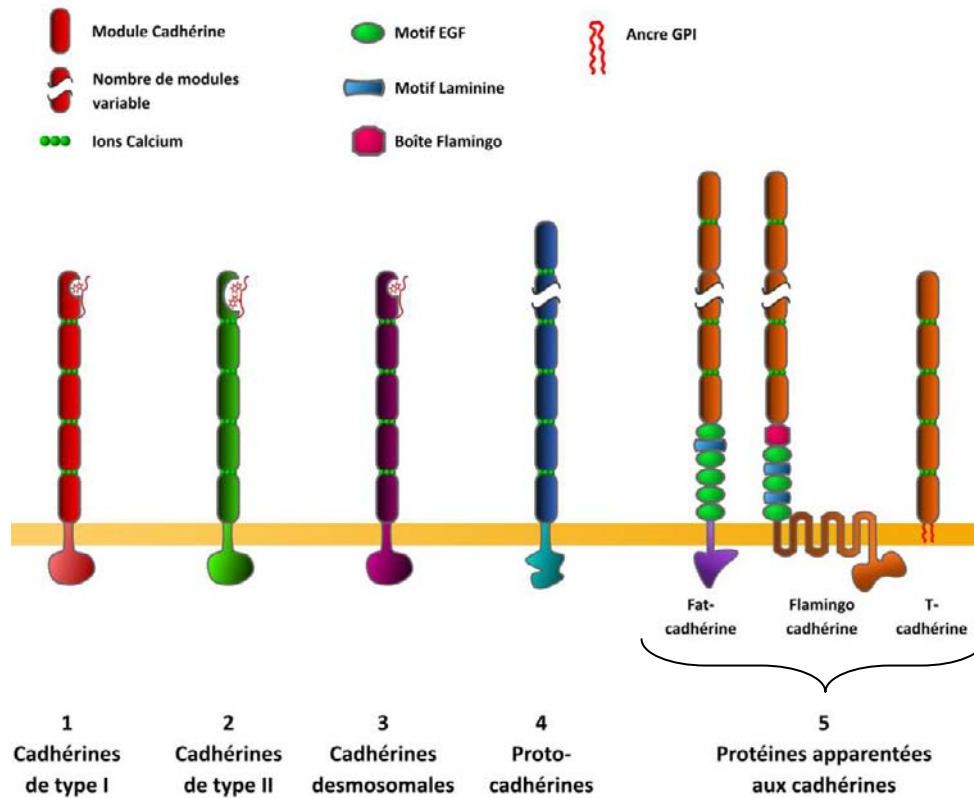


Figure 4 : Représentation schématique des différentes familles de cadhérines.

2. Les cadhérines classiques de type I

a. Interface adhésive et échange de brin β

L'organisation tridimensionnelle du domaine le plus externe, EC1, de la E-cadhérine correspond à 7 brins β organisés en 2 feuillets, avec une topographie en « Y » et formant un sandwich (ou tonneau- β), de dimensions : 45Å x 25 Å x 25 Å (Overduin et al., 1995). Cette structure, similaire à celle d'un domaine d'immunoglobuline, est commune à tous les modules cadhérine (Boggon et al., 2002). Les premières images de cristallographie ont été obtenues avec le module EC1 de la N-cadhérine (type I) (Shapiro et al, 1995). Les cristaux présentent 2 interfaces d'association : i) l'une impliquant deux molécules orientées de manière parallèle, avec l'échange réciproque du premier brin β N-terminal et l'insertion de la chaîne latérale du Trp2 dans une poche hydrophobe de la molécule partenaire, ii) l'autre impliquant deux molécules orientées de manières antiparallèle. L'interprétation de ces observations a conduit

les auteurs à proposer un premier modèle d'interaction des cadhérines dit en « fermeture éclair » (Figure 5), dans lequel les protéines s'associent d'abord en dimères parallèles sur la même surface cellulaire (interaction *cis* ou « Strand dimer ») puis ces dimères parallèles, présents sur les surfaces cellulaires voisines s'associent de manière antiparallèle (interaction *trans*).

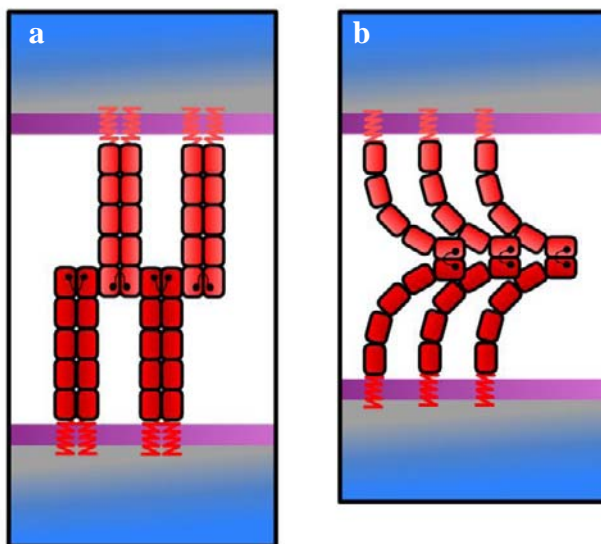


Figure 5 : Modèles d'interaction des cadhérines proposés à partir d'analyses structurales, (a) du domaine EC1 de la N-cadhérine (en « fermeture éclair », Shapiro et al., 1995) , puis (b) du fragment EC15 de la C-cadhérine (Boggon et al., 2002).

Ce modèle a été partiellement modifié par le même groupe après l'étude structurale de la totalité du segment EC1-5 de la C-cadhérine (Boggon et al, 2002). L'interface *trans*, d'abord identifiée comme adhésive dans la première étude structurale (Shapiro et al, 1995), n'a plus été retrouvée. Dans cette étude, le module EC1 s'associe parallèlement au module EC1 de la molécule partenaire par échange réciproque de brin β pour former la surface adhésive, sans nécessité d'organisation préalable en dimère parallèle (Figure 5 et Figure 6). Il est important de souligner que cette interface avait initialement été considérée comme une interaction entre *cis* dimères. L'organisation moléculaire dans ces cristaux ne révèle pas de dimères parallèles, mais fait apparaître un empilement de monomères en *cis* présentant une courbure prononcée et une torsion des différents modules les uns par rapport aux autres. Des contacts ont été visualisés entre modules EC1 d'une molécule et EC2-3 d'une cadhérine voisine.

L'ensemble des structures disponibles pour les cadhérines classiques est résumé dans le Tableau 1. Les cadhérines de type I y sont majoritairement représentées, et toutes les

études, à l'exception de celle de Boggon et al., portent sur les fragments N-terminaux EC1 ou EC12.

Famille	Prot.	Modules	Code PDB	Longueur de chaîne	Tech.	Echange de brin	AA Nter	Notes	Références	
Type I	E-cadh	EC1	1SUH	1-99	RMN	NE		monomérique	Overduin & al., Science 95	
		EC12	1EDH	3-212	RX	NE		2 résidus N-ter désordonnés	Nagar & al., Nature 96	
		EC12	1FF5	1-212	RX	NE	M		Pertz & al., EMBO J. 99	
		EC12	1O6S	1-99	RX	NE	GPLG	complexé à l'internaline, mutation D1S	Schubert & al., Cell 02	
		EC12			RMN	NE	M		Haussinger & al., J.Mol.Biol. 02	
		EC12	1Q1P	2-212	RMN	E		résidus N-ter désordonnés	Haussinger & al., EMBO J. 04	
		EC12	2O72	1-212	RX	E			Parisini & al., J. Mol. Biol. 07	
		EC15	1L3W	1-540	RX	E			Boggon & al., Science 02	
		N-cadh	EC1	1NCI	2-99	RX	E	GS	mutation D27G	Shapiro & al., Nature 95
			EC1	1NCG	1-99	RX	E		mutation D27G	Shapiro & al., Nature 95
EC1	1NCH		1-99	RX	E	GS	mutation D27G	Shapiro & al., Nature 95		
EC12	1NCJ		2-214	RX	E		monomérique	Tamura & al., Neuron 98		
Apparentée	T-cadh	EC1	2V37	1-105	RMN	NE		monomérique	Dames & al., J. Biol. Chem. 08	
Type II	MN-cadh	EC1	1ZVN	1-97	RX	E	S		Patel & al., Cell 06	
		EC1	2A4C	1-97	RX	E		mutation G1S	Patel & al., Cell 06	
	cadh-11	EC12	2A4E	1-206	RX	E		mutation G1S	Patel & al., Cell 06	
		EC1	1ZXK	1-97	RX	E		mutation G1S	Patel & al., Cell 06	
	cadh-8	EC12	2A62	1-206	RX	E		mutation G1S	Patel & al., Cell 06	
		EC1	-	-	RMN	E		mutation G1S	Miloushev & al., Structure 08	

Tableau 1 : Liste des différentes études structurales publiées sur les cadhérines. Les fragments utilisés ont, pour certains, leur extrémité N-ter modifiée par des acides aminés additionnels, (AA Nter). Certains cristaux ne permettent pas de visualiser les acides aminés N terminaux, et les longueurs de chaînes correspondent aux résidus identifiables dans les cristaux. Les surfaces adhésives entre dimères, lorsqu'elles sont observables, incluent (E) ou non (NE) l'échange de brin β .

Comme ceci a déjà été mentionné, chaque module cadhérine est organisé en 2 feuillets β (Figure 5), l'un des feuillets composé des brins β D, E et B, et l'autre des brins G, F et C. Le brin A quant à lui est divisé en 2 segments : A* et A, qui n'interagissent pas avec le même feuillet (Posy et al, 2008) (Figure 6). Le segment N-terminal A* possède 3 résidus qui forment des liaisons hydrogènes avec le brin B du premier feuillet, alors que le segment A est lié par des liaisons hydrogènes au brin C du second feuillet. Ces 2 segments sont séparés par 2 ou 3 résidus (dont les Pro 5 et 6) qui connectent les 2 feuillets. Ces 2 ou 3 résidus peuvent être considérés comme une charnière ; en effet leur changement de conformation lors de la dimérisation par échange de brins permet et facilite le mouvement du brin A* (Parisini et al, 2007).

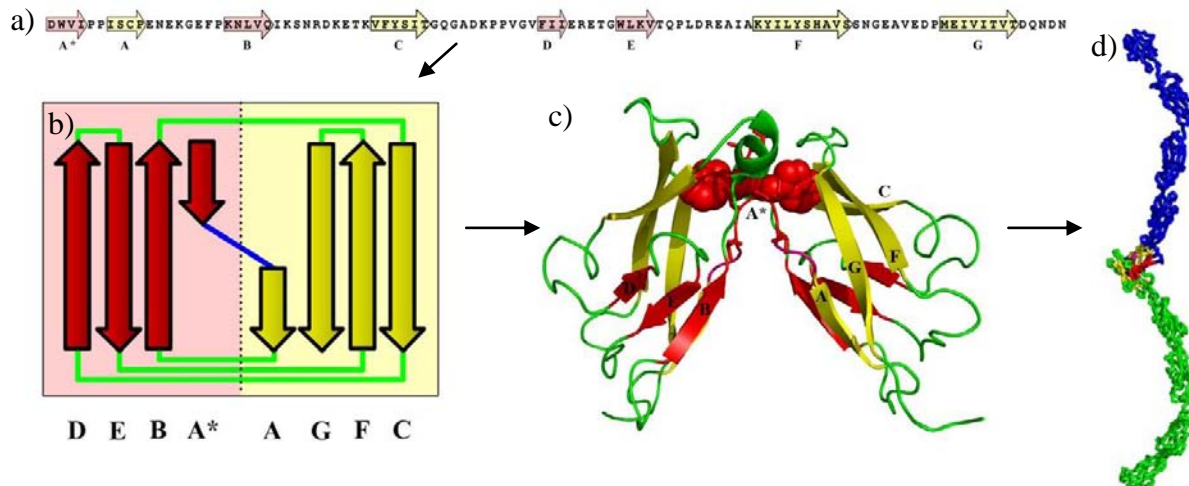


Figure 6 : Topologie et architecture des domaines cadhérine. (a) Séquence en acides aminés du module EC1 de la E-cadhérine et positionnement des brins dans la séquence. (b) Structure en feuillets β d'un module EC de cadhérine de type I. (c) Détails de l'interface adhésive entre modules EC1 avec échange de brin β (Parisini et al, 2007). (d) Structure de 2 cadhérines en interaction (Boggon et al, 2002).

Ces segments A et A* ont un rôle primordial dans l'interface adhésive. En effet pour les cadhérines classiques de type I, l'interface adhésive est essentiellement formée par les résidus intervenant dans cet échange de brin (Boggon et al, 2002; Shapiro et al, 1995). Les 2 modules EC1, en se positionnant de manière parallèle, échangent le brin A* et permettent à la chaîne latérale du Trp2 de s'insérer dans la poche hydrophobe de la molécule partenaire (Figure 6c). Il n'est donc pas étonnant que des acides aminés supplémentaires à l'extrémité N-terminale, souvent présents dans les protéines recombinantes produites dans les bactéries, puissent perturber l'interaction adhésive des cadhérines en interférant avec l'échange de brin β (Harrison et al, 2005b). De même des mutations (notamment celle du Trp2 en Ala) qui modifient cette interface perturbent l'efficacité adhésive de ces protéines (Harrison et al, 2005a; Harrison et al, 2005b; Perret et al, 2002a; Tamura et al, 1998a; Troyanovsky et al, 2003). Enfin, ces éléments structuraux pourraient aussi être essentiels pour la formation de dimères parallèles en *cis*, entre molécules insérées dans la même surface cellulaire. En effet il a été montré, par cross-linking, que la formation de tels dimères impliquait l'échange de brin β (Troyanovsky et al, 2003).

En résumé, les cadhérines classiques de type I présentent, au niveau de leur domaine EC1, trois éléments structuraux principaux très conservés, qui contribuent à l'échange du brin β et à la formation de l'interface adhésive (Figure 7):

1. un **Trp en deuxième position dans la séquence de la protéine fonctionnelle**. La chaîne latérale de cet acide aminé s'insère dans une poche hydrophobe composée des

résidus Ile24, Tyr36, Ser/Ala78, et Ala80, soit dans la forme monomérique en intramoléculaire, soit de façon intermoléculaire conduisant à la formation d'un dimère. *In vivo*, la mutation sur la N-cadhérine de ce tryptophane en glycine affecte le développement de certains organes où cette molécule est présente, tels que la rétine ou le cœur (Malicki et al, 2003), ce qui confirme l'importance de cet acide aminé pour la fonctionnalité adhésive des cadhérines ;

2. une **contrainte dans la boucle charnière**, du brin A* qui se relaxe lors de la dimérisation, et favorise ainsi l'échange de brin β . Cette charnière est plus courte sur le domaine EC1 que sur les autres domaines, de même que sur les cadhérines n'interagissant pas par échange de brin β . Les contraintes intramoléculaires sont augmentées avec les prolines 5 et 6 très conservées à l'état monomérique (Parisini et al, 2007). Lors de l'échange du brin β , la boucle charnière change de conformation et le dimère est énergétiquement plus stable ;
3. enfin, **le résidu Glutamine 89** est très conservé. La chaîne latérale de cet acide aminé forme un pont salin avec le résidu chargé N-terminal ; ce pont salin participe pleinement à l'interface adhésive. Le rajout d'acides aminés en N-ter ou la mutation de Glu89 qui empêchent la formation de ce pont salin perturbent l'interaction entre cadhérines.

Ces 3 éléments structuraux se retrouvent aussi chez les cadhérines de type II et desmosomales. L'échange de brin β , observé aussi dans les cristaux de cadhérines de type II, pourrait donc être un mode d'interaction commun à différentes familles de cadhérines.

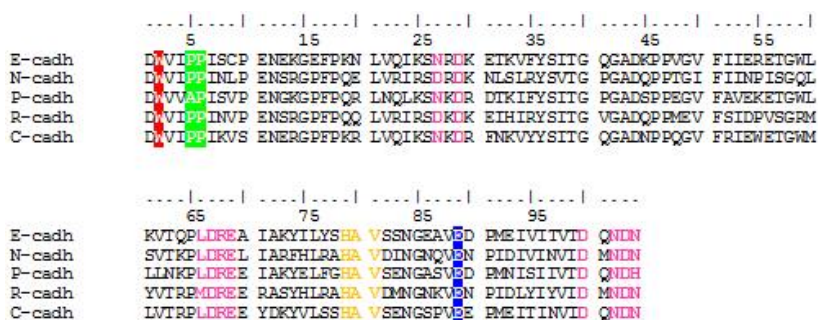


Figure 7 : Alignements de séquences de cadhérines de type I. Les acides aminés surlignés participent à l'échange de brin β ; en jaune le site HAV très conservé ; en rose, les acides aminés formant le motif cadhérine.

Une belle étude de bioinformatique publiée récemment par le groupe de B. Honig a examiné les éléments de séquence et de structure communs aux modules EC de cadhérines

(Posy et al, 2008). L'alignement de séquences des modules EC1 à EC5 des cadhérines de type I et de type II disponibles dans les bases de données a permis d'identifier 14 acides aminés conservés, outre ceux des motifs cadhérines, dont 13 sont hydrophobes. 11 de ces résidus hydrophobes sont particulièrement conservés, dans plus de 70% des séquences étudiées. En se basant sur leur localisation sur les brins β , ces positions ont été étiquetées A*2, B6, C1, C3, D1, D3, F2, F4, F6, F8, G5 et G7. Les 2 acides aminés conservés restants, A8 et C5, ne sont retrouvés que dans 50% des séquences étudiées. Toutes les chaînes latérales de ces résidus hydrophobes sont orientées vers l'intérieur de leur module EC, et ainsi non exposées au solvant. Le seul acide aminé polaire conservé est en position A8 dans la boucle AB (Figure 8), qui appartient à la jonction entre modules consécutifs et aux 4 sites de liaison au calcium. Cependant, cette Glu est aussi présente sur le module EC5, même s'il ne fixe pas le calcium.

Les résidus hydrophobes conservés s'organisent en un réseau de contacts qui forment des noyaux hydrophobes à l'intérieur des modules cadhérines. Ces noyaux hydrophobes délimitent 2 groupes indépendants qui séparent le module EC en 2, séparés par un pont formés des résidus G5 et C5. Le premier noyau hydrophobe (A*2, B6, D3, C1, C3, F6 et F8) est retrouvé dans plus de 70% des séquences, alors que les 5 résidus du deuxième noyau (D1, F2, F4, et G7) forment des contacts très conservés. Il est intéressant de remarquer que la plupart de ces contacts sont présents à l'interface entre les 2 feuillets β qui composent le module cadhérine, et sont très proches de ceux retrouvés dans les domaines immunoglobulines.

L'ensemble des structures disponibles pour les cadhérines a aussi été analysé. Les auteurs ont montré que les modules EC se superposent à 3 Å près, voire 2 Å si l'on ne considère uniquement les éléments des feuillets β . De plus, ces structures révèlent que les modules correspondants de 2 familles différentes sont plus similaires entre eux que les modules différents de la même famille c'est-à-dire que les modules EC1 des cadhérines de type I et de type II se superposent mieux que les modules EC1 et EC2 des cadhérines de type I.

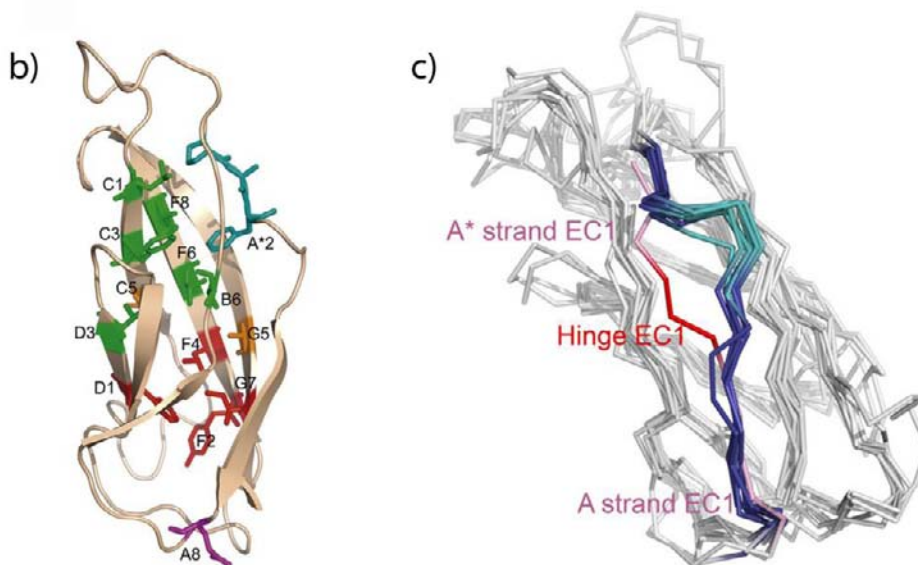
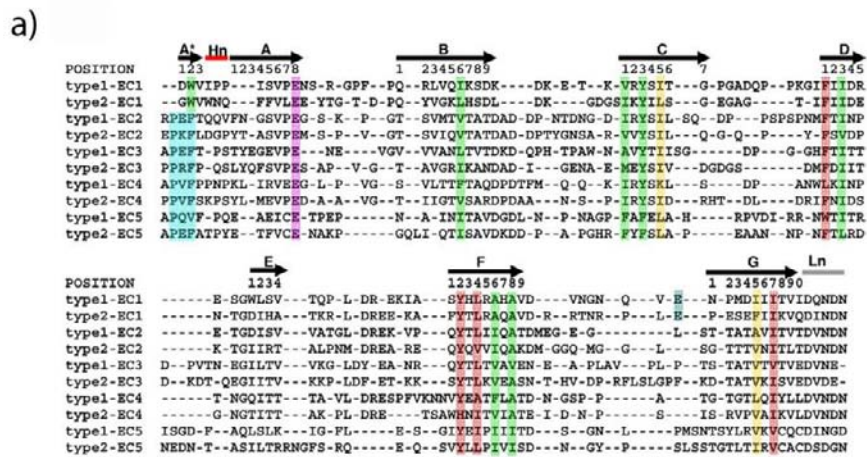


Figure 8 : Alignements de séquences et de structures des modules EC1 à EC5 des cadhérines de type I et II. (a) Alignement de séquences des modules EC1 à EC5 des cadhérines de type I et type II. Les résidus conservés sont surlignés, avec en vert les résidus du premier noyau hydrophobe et en rouge ceux du deuxième noyau hydrophobe. Les deux résidus formant le pont entre les noyaux sont surlignés en orange. (b) Les résidus conservés sur la structure du module EC2 de la C-cadherine (PDB 1L3W) sont montrés en représentation « stick » et colorés comme en (a). (c) Alignement de structure des modules EC1 à EC4. L'alignement inclut le module de E-cadherine EC1 (PDB 1O6S), N-cadherine EC2 (1NCJ), E-cadherine EC2 (2O72), C-cadherine EC2 (1L3W), cadherine-11 EC2 (2A4E), cadherine-8 EC2 (2A62), C-cadherine EC3 (1L3W), cadherine-8 EC3 (2A62), C-cadherine EC4 (1L3W) (voir Tableau 1 pour références). Le segments A*, la boucle charnière et le segment A sont colorés (Les segments A* et A du domaine EC1 sont en rose et la boucle charnière en rouge ; Les segments A* et A des modules EC2 à EC4 sont en bleu et la boucle charnière en cyan). Pour plus de clareté, le domaine EC5 de la C-cadherine a été exclu ; son brin A a une orientation légèrement différente.

Ces alignements de séquences et de structures permettent de définir des éléments structuraux présents uniquement sur les modules EC1 et qui confèrent à ce module la propriété particulière d'échange de brin β , et indispensable pour l'activité adhésive. Le **Trp2**, que l'on retrouve sur tous les domaines EC1 des cadhérines classiques, est remplacé sur les autres modules EC par un autre résidu hydrophobe sur cette position 2 (généralement une Phe). La poche hydrophobe dans laquelle s'insère la chaîne latérale du Trp2 est retrouvée sur les modules EC2-5 et est en partie composée de l'un des noyaux hydrophobes décrits

précédemment avec les résidus B6, C3, F6 et F8. **La longueur de la boucle charnière** entre les segments A* et A est, sur les modules EC1, plus courte de 2 acides aminés que sur les autres modules (Figure 8b). La conséquence d'un brin A plus long sur les domaines EC2-5 est que la boucle charnière est placée plus haut sur la structure de ces domaines, et qu'elle forme un renflement (Figure 8c). Il est probable que le rétrécissement de cette boucle sur domaine EC1 induise des tensions qui déstabiliseraient la forme monomérique, en plus des tensions créées par les Pro5 et 6. **Les modules EC2-5 ont une Pro2 conservée**, et absente du module EC1. Cette Pro2 inhibe l'échange de brin β . Dans les domaines EC2-5, les résidus des brins B et G forment une poche dans laquelle s'insère la Pro2, qui permet l'ancrage des segments A* et A au reste du module. Cette « ancre Pro » est remplacée par la Val88 de la boucle FG dans les modules EC1. **Le résidu Glu89** est très conservé sur les domaines EC1 et absent sur les autres. Comme déjà mentionné, la chaîne latérale forme un pont salin avec l'acide aminé chargé de l'extrémité N-terminale, qui fait partie de l'échange de domaine. La mutation de Glu89 par une Ala ou l'allongement de l'extrémité N-terminale interfèrent avec l'adhésion (Harrison et al, 2005b).

b. Modification de conformation lors de l'interaction : le Domain Swapping

Les informations que nous venons de synthétiser sur la structure des cadhérines sont extrêmement utiles pour la compréhension de leurs propriétés fonctionnelles. En effet, ces protéines participent à la transmission de signaux au niveau inter et intracellulaire. La connaissance de ces voies de communication a été incrémentée ces dernières années grâce à l'apport de la génétique et de la biochimie avec la cartographie des interactions à l'échelle du protéome. Cependant, notre compréhension est souvent très limitée pour ce qui concerne la façon dont les signaux sont transmis d'un composant à l'autre au sein d'une voie de signalisation. Il est de plus en plus évident que cette signalisation repose sur les propriétés dynamiques intrinsèques des protéines qui transmettent des signaux par basculement d'un état d'énergie à un autre en réponse à différents stimuli. La structure native, repliée, d'une protéine déterminée par sa structure primaire est souvent considérée comme correspondant à son état d'énergie le plus faible. Le repliement tridimensionnel de la protéine est contraint par la compétition entre forces entropiques (coût énergétique pour la maintenir repliée) et enthalpiques (interactions favorables formées favorisant ce repliement). Ces forces déterminent les mouvements intrinsèques de la protéine. Les différents états que peut adopter la protéine peuvent être décrits par son « paysage énergétique ». Les états de conformations de la protéine sont peuplés en fonction de ses états d'énergie, et le passage d'un état

énergétique à l'autre est gouverné par la hauteur des barrières d'énergie qui les séparent (Smock & Gierasch, 2009).

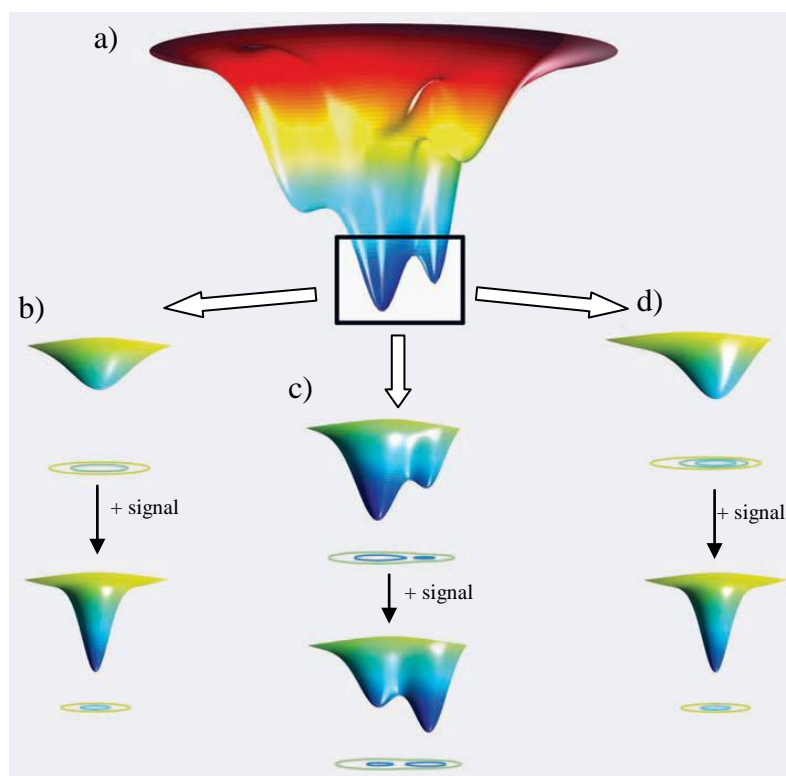


Figure 9: Les paysages énergétiques peuvent, par leurs modifications, changer les propriétés intrinsèques d'une protéine. (a) Illustration schématique d'un paysage énergétique d'une protéine, représentant les énergies hautes en rouge, et basses en bleu. La région délimitée représente les états conformationnels accessibles énergétiquement, qui pourront être testés dans les conditions physiologiques, aux fluctuations thermiques près. (b) Une des façons pour un signal de remodeler le paysage énergétique est de rétrécir la taille de l'ensemble des états à un seul puits d'énergie.. Ceci réduit la dynamique intrinsèque de la protéine, amenant à la rigidification structurale de la même conformation. (c) Une protéine peut exister en équilibre entre 2 états conformationnels différents. Des signaux extérieurs peuvent redistribuer l'occupation relative de chacun des états. (d) Une légère modification de (c) peut survenir si, en absence de ligand, le niveau d'énergie le plus élevé conduit par une voie parallèle avec modification du profil à la conformation induite par le signal (d'après Smock et Gierasch, 2009).

La topographie du paysage énergétique est modulée par l'interaction de la protéine avec d'autres protéines, des peptides ou des ligands plus petits, mais aussi par des modifications covalentes, comme la phosphorylation de certains acides aminés. L'étude des images statiques de la protéine, comme les celles issues de cristallographie par rayon X, sont un bon point de départ pour sonder l'ensemble des états de la protéine. Par exemple, la fixation ou le relargage de l'oxygène par l'hémoglobine requiert un changement de conformation, qui a été immédiatement reconnu par les biophysiciens dès qu'ils ont étudié sa structure (Perutz & Mathews, 1966).

L'oligomérisation des protéines induit un changement dans le paysage énergétique des protéines. Plusieurs mécanismes d'assemblage des protéines sont décrits dans la littérature, parmi lesquels l'empilement de structures « beta-plissées » comme pour les fibrilles d'amyloïde, d'empilement « tête à queue » retrouvée dans l'oligomérisation de l'actine, ou le *domain swapping* comme pour les cadhérines.

Le terme *domain swapping* a été utilisé la première fois par Bennett et al. pour décrire la structure dimérique de la toxine diphtérique (Bennett et al, 1994b). Cependant, le concept d'échange de domaine a été décrit pour la première fois il y a plus de 40 ans avec la description de la dimérisation de la ribonucléase pancréatique de bœuf (Crestfield et al, 1962).

Le *domain swapping* décrit un mécanisme d'oligomérisation dans lequel 2 ou plusieurs chaînes polypeptidiques échangent des éléments structuraux identiques. Si cet échange est réciproque entre 2 monomères, il y a formation d'un dimère. Mais le nombre de chaînes polypeptidiques échangées peut être supérieur à 2 et conduire à la formation d'oligomères. La description plus complète des éléments du *domain swapping* fait intervenir (Figure 10) :

1. **le domaine échangé** : il peut référer à différents unités structurales, comme des brins β , des hélices α et des structures au repliement plus complexe. En principe, le domaine échangé peut se trouver n'importe où dans la séquence, mais il est le plus souvent retrouvé aux extrémités N- ou C-terminales des chaînes polypeptidiques. Dans de rares cas comme celui de la cyanovirine-N, la moitié de la structure peut être impliquée (Barrientos et al, 2002). Les sous-unités échangées sont identiques ; elles ne possèdent pas de différences dans leur conformation. Elles ont aussi un environnement semblable dans les 2 conformations monomérique ou dimérique ;
2. **la boucle charnière** : c'est un segment de la chaîne polypeptidique qui lie le domaine échangé au reste de la protéine. Elle a une conformation différente entre la forme monomérique et dimérique ;
3. **l'interface C (closed)** : qui correspond à l'interface entre le domaine échangé et le reste de la protéine ; on la retrouve à la fois dans les formes monomériques et dimériques ;
4. **le dimère domain-swapped** : un dimère avec une interface C entre 2 monomères « ouverts » est un dimère *domain-swapped* ;

5. **l'interface O (open)** : elle se trouve entre le domaine échangé et le reste protéine partenaire ; elle n'est présente que dans la forme oligomérique et pas dans la forme monomérique.

La recherche des signaux moléculaires qui pourraient être à l'origine du *domain swapping* s'est surtout focalisée sur la boucle charnière. En effet, c'est la seule partie qui possède une conformation différente entre l'état monomérique et l'état oligomérique avec domaines échangés. Dans plusieurs structures, on retrouve des prolines dans cette boucle (Bergdoll et al, 1998; Boggon et al, 2002; Rousseau et al, 2001). Rousseau et al. ont suggéré que ces prolines créent une contrainte dans la boucle et ainsi influencent l'échange de domaines. En effet, la mutation d'une proline en alanine stabilise la forme monomérique de la protéine p13suc1, alors que la mutation d'une 2^{ème} proline stabilise la forme dimérique. Cette boucle jouerait donc le rôle de ressort moléculaire, et la tension serait relâchée lors de la formation du dimère. De même, l'ajout d'une proline chez la cyanovirine-N (Barrientos et al, 2002) ou le raccourcissement de la boucle pour l'inhibiteur de la chymotrypsine (Chen et al, 1999) peuvent aussi influencer sur l'équilibre monomère-dimère en favorisant l'échange de domaine.

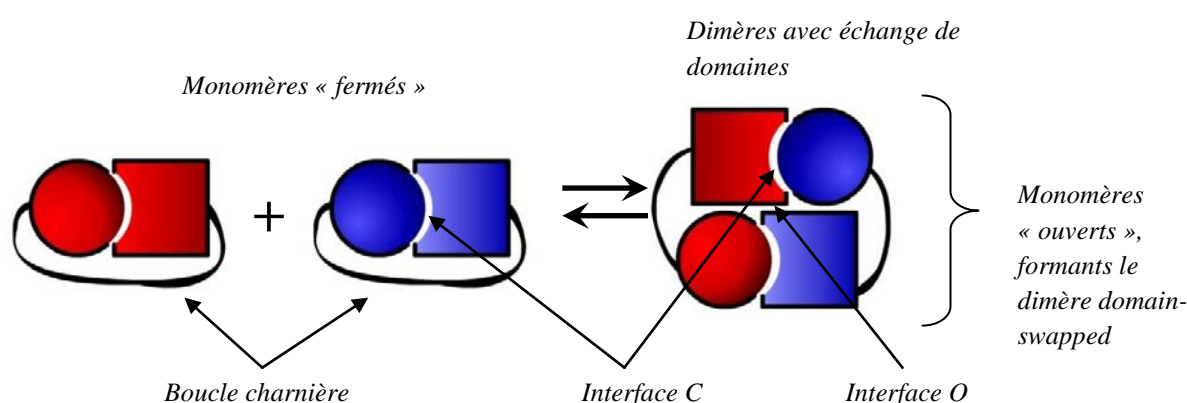


Figure 10 : Définitions des éléments de l'échange de domaine.

Mais la modification de la boucle charnière n'est pas la seule modification susceptible d'influencer l'échange de domaine. L'étude de la toxine diphtérique révèle que cette protéine, qui dimérise par échange de domaine à pH 4, ne forme pas de dimères à pH neutre, suggérant qu'une haute barrière énergétique doit être franchie pour conduire à la dimérisation. Il faut donc apporter de l'énergie pour déstabiliser l'interface primaire du monomère. En effet, à faible pH, les ponts salins qui stabilisent cette interface sont détruits, favorisant ainsi l'ouverture du monomère (Bennett et al, 1994a). Les interactions nouvellement créées sur l'interface O stabilisent la forme dimérique et abaissent ainsi l'énergie libre de dimérisation.

Les auteurs ont donc proposé un modèle énergétique où, par diminution de pH, l'abaissement des énergies d'activation favorise la dimérisation (Figure 11).

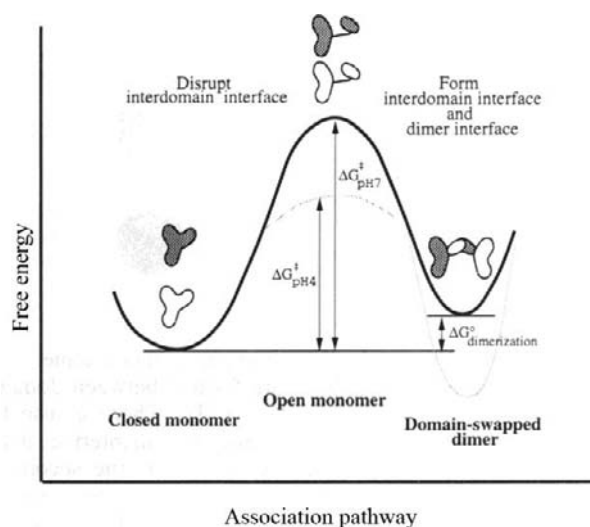


Figure 11 : Relations entre énergies libres des dimères de la toxine diphtérique par échange de domaines, et de leurs monomères (Bennett et al, 1994a).

Ce schéma, caractéristique de l'échange de domaine, n'est pas sans rappeler celui proposé par Chen et al. pour l'interaction des cadhérines et que nous aborderons plus loin (Figure 20). Dans ce cas précis, la variation de pH influe sur les énergies libres, facilitant la dimérisation. Plus généralement, 3 facteurs peuvent affecter les différences d'énergie libre entre le monomère et le dimère :

1. une entropie plus grande pour le monomère, qui favorise thermodynamiquement l'ouverture de son interface ;
2. la flexibilité de la boucle charnière qui positionne de nouvelles interactions après l'échange de domaine. Le changement de conformation de cette boucle peut aussi contribuer aux différences d'énergie libre ;
3. La nature de l'interface O, nouvellement créée par l'échange de domaine et qui n'existe pas dans la forme monomérique. Ces nouvelles interactions peuvent favoriser la formation du dimère.

Ainsi, *in vitro*, l'échange de domaine peut être dû aux conditions de préparation des échantillons en modifiant les 3 critères précités. Par exemple, la protéine Barnase (ribonucléase bactérienne) dimérise par échange de domaines à pH 4,5, mais pas dans les conditions physiologiques (Zegers et al, 1999). D'autres exemples comme Spo0A, les

récepteurs Trk ou encore les récepteurs neutrophin (Lewis et al, 2000; Ultsch et al, 1999; Urfer et al, 1995) montrent que l'échange de domaines peut être la cause d'artefacts dus à la préparation des échantillons. Une attention toute particulière doit donc être prise quant à l'interprétation des résultats, et notamment en prenant en compte les conditions expérimentales d'obtention d'échange de domaine.

Il est intéressant de remarquer que ces caractéristiques structurales sont retrouvées dans l'échange du brin β des cadhérines de type I. Les interfaces primaires monomérique et dimérique sont quasiment identiques. Nous avons déjà vu que leur boucle charnière possède 2 prolines très conservées par l'ensemble des cadhérines de type I (Pro5 et 6) et que la modification de leur surface d'interaction favorise la forme monomérique (Harrison et al, 2005b; Prakasam et al, 2006a). En revanche, il faut souligner que les cadhérines de type II n'ont pas de prolines dans leur boucle charnière, qu'une interface O nouvelle non présente dans la forme monomérique est créée par la formation du dimère. Les 2 études structurales qui décrivent l'interface d'interaction entre cadhérines de type II montrent un échange de brin β (Miloushev et al, 2008; Patel et al, 2006) mais les conditions expérimentales ne respectent pas les conditions physiologiques de pH ou de salinité. D'autres études sont donc à mener pour confirmer ou infirmer l'interaction par échange de brin β des cadhérines de type II.

c. Implication des modules EC dans l'interaction cadhérine

Les études de structures décrites précédemment mettent l'accent sur l'importance du module EC1 et l'échange du premier brin β dans l'interaction cadhérine.

Les premières données cinétiques ont été obtenues sur la E-cadhérine par la méthode de chambre à flux laminaire (Figure 12). Des billes recouvertes des 2 premiers modules EC1-2 (E/EC12) sont injectées dans la chambre sous un flux constant et contrôlé, et peuvent interagir avec les cadhérines fixées sur le fond de la chambre. Les variations du flux permettent de moduler la force appliquée sur la bille, et donc la contrainte mécanique appliquée sur l'interaction. La durée de vie courte de ces interactions, de l'ordre de 2s à force nulle, permet de rendre compte des fonctions de haute sélectivité et de plasticité des interactions entre les cadhérines (Perret et al, 2002a).

Ces résultats ont ensuite été confirmés par d'autres approches, par RMN (Haussinger et al, 2004), AFM (du Roure et al., 2006) ou très récemment par résonance de plasmons de surface (Katsamba et al, 2009). En RMN, des conformations différentes sont observées pour le monomère avec ou sans Ca^{2+} , ou le dimère dont la formation nécessite la complexation du

Ca^{2+} . La liaison du Ca^{2+} entre les modules EC1 et EC2 déplace l'équilibre vers l'état dimérique ; la constante de dissociation à l'équilibre K_D du fragment E/EC12 varie de 10mM en absence de Ca^{2+} à 0.7mM en présence de Ca^{2+} . La constante d'association K_{on} caractérisant la formation du dimère en solution ($\sim 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) est plusieurs ordres de grandeurs inférieure à celle d'un processus limité par la diffusion ($\sim 10^8 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), indiquant que la dimérisation est très limitée par une barrière d'activation (Haussinger et al, 2004). Ainsi, ces données suggèrent que la cohésion cellulaire serait assurée par des molécules aux faibles affinités d'interaction, ce qui peut sembler surprenant.

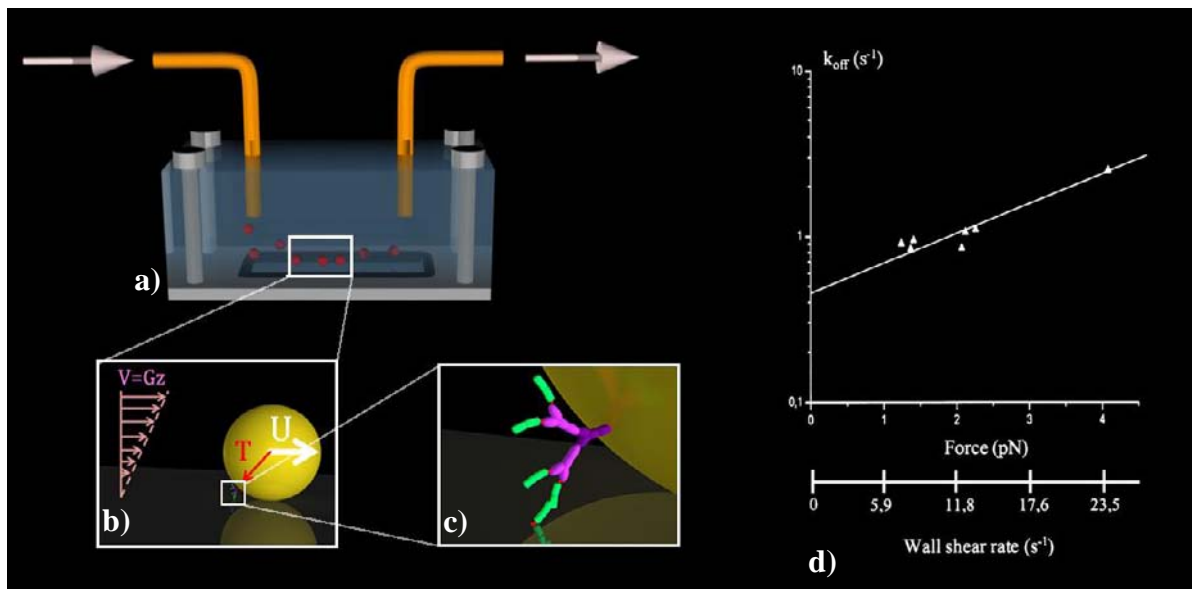


Figure 12 : Schéma de la chambre à flux laminaire (a) ; les billes sont soumises à un gradient de vitesse contrôlé, qui permet de corréler la tension T qui leur est appliquée à la vitesse V (b). Les protéines sont fixées par 2 couches d'Ig sur la bille et par affinité au nickel Ni^{2+} sur le mica via leur motif C-terminal hexa-histidine (c). Cette technique a permis la première caractérisation dynamique du fragment EC12 de la E-cadhérine (d) (Perret et al, 2002a).

Les travaux pionniers du groupe de D. Leckband ont révélé par *Surface Force Apparatus* (ou SFA) que les différents modules pouvaient établir des interactions multiples, comme nous le verrons plus loin. Les modules EC2 et EC3 sont aussi impliqués, respectivement en favorisant la fixation du calcium et en permettant l'interaction *cis* (Boggon et al, 2002; Haussinger et al, 2004).

L'implication directe des modules profonds (EC4-5) dans les contacts adhésifs n'ont pas été confirmés par les études structurales, puisque dans l'état actuel des connaissances, seuls les modules EC1-3 ont été visualisés en interaction (Boggon et al, 2002). Différentes questions restent posées pour savoir quelle est la part des différents modules dans la

fonctionnalité des cadhérines : est-ce que ces modules profonds maintiennent les modules EC1-3 à bonne distance de la membrane avec laquelle ils pourraient interagir de manière non spécifique, et pour optimiser l'accessibilité et la formation des interactions adhésives ? Sont-ils tous directement impliqués dans le processus adhésif dans certaines conditions physiologiques ?

L'utilisation des fragments de C-cadhérine dans des expériences de SFA montre que des contacts adhésifs multiples existent le long du domaine extracellulaire (Sivasankar et al, 1999). Cette approche permet de mesurer simultanément la distance entre deux surfaces et la force requise pour séparer les fragments en interaction. Trois décrochages successifs sont observés lors de la séparation du fragment EC1-5 de la C-cadhérine, ce qui a été interprété comme reflétant des interactions multiples entre les différents modules EC.

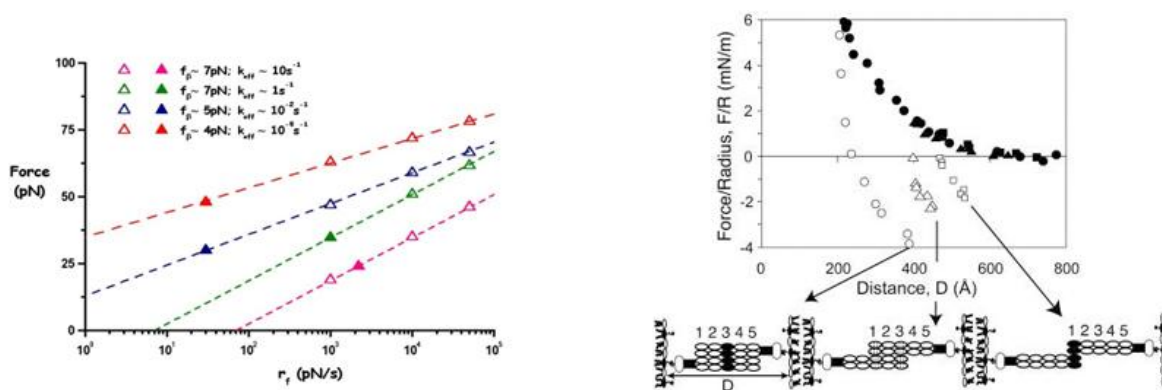


Figure 13 : La technique de BFP a permis d'établir le spectre de force dynamique et de caractériser 4 interactions différentes entre fragments E/EC15 (Perret et al, 2004), tandis que la SFA met en évidence le rôle du module EC3 (Zhu et al, 2003) dans les contacts adhésifs entre fragments EC1-5 des cadhérines.

La technique de Biomembrane Force Probe (BFP) développée par E. Evans (Merkel et al, 1999) a permis de sonder l'influence des modules plus profonds sur la dynamique (Perret et al, 2004). Ces travaux ont confirmé la présence d'interactions multiples révélées par D. Leckband et mis en évidence une hiérarchie de résistance au stress mécanique le long du fragment extracellulaire de la E-cadhérine et 4 interactions ont été caractérisées: les modules EC1-2 établissent des interactions labiles de 0,1s et 1s, tandis que les modules plus profonds permettent des interactions beaucoup plus stables de 10^2 s et 10^5 s (Figure 13). Les modules EC1-2 sembleraient donc être impliqués dans la reconnaissance et la spécificité des interactions ; ce résultat confirma donc ceux obtenus par la méthode de chambre à flux laminaire. Les modules plus profonds EC3-5 participeraient au renforcement et à la stabilité des interactions. Ces propriétés ont ensuite été confirmées par cette même technique sur la C-

cadhérine (Bayas et al, 2006). Des données obtenues par SFA mettent en évidence un rôle très important du module EC3 dans ce renforcement (Zhu et al, 2003). En effet, la délétion de ce module empêche les cadhérines recombinantes ainsi modifiées de former les interactions longues et stables (Figure 13).

Une étude réalisée dans le groupe de B. Gumbiner permet de replacer ces résultats dans le contexte cellulaire (Chappuis-Flament et al, 2001). Les auteurs ont fonctionnalisé des surfaces avec différents fragments recombinants d'ectodomains de C-cadhérines (Figure 14a), où certains modules EC ont été supprimés ou substitués. Des cellules CHO exprimant la C-cadhérine ont ensuite été mises en contact avec ces surfaces pour en tester les propriétés. L'efficacité adhésive est évaluée par la résistance au détachement des cellules ensemencées sur les surfaces recouvertes de diverses protéines recombinantes (Figure 14b-c). En accord avec les données obtenues par BFP, ces expériences mettent en évidence 2 types d'adhésion conduisant à : i) une faible résistance au stress mécanique sur les surfaces recouvertes de fragments EC12 ; ii) une plus forte résistance lorsque les modules plus profonds EC35 sont présents. L'importance du module EC3 déjà révélée par D. Leckband par SFA semble confirmée (Figure 14b). Néanmoins l'implication des modules EC4 et EC5 reste à éclaircir.

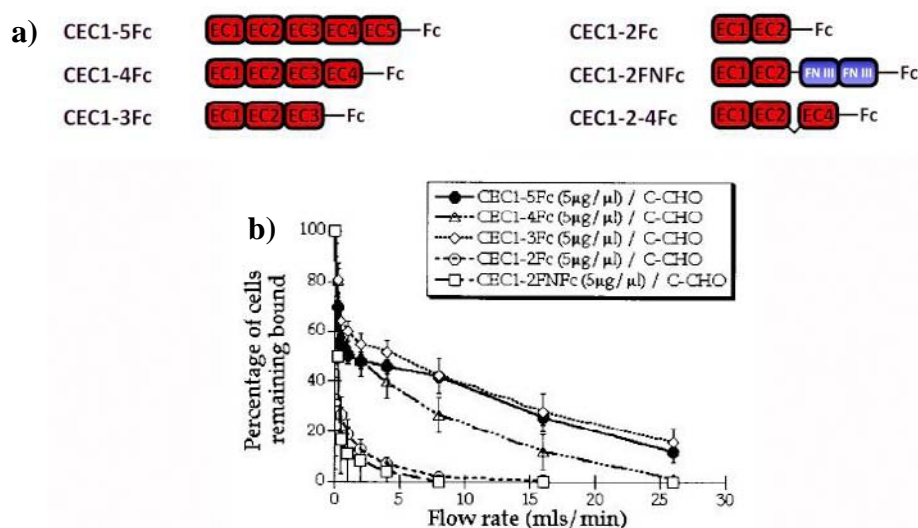


Figure 14 : Evaluation de la participation des différents modules de C-cadhérine dans l'efficacité adhésive

3. Les cadhérines classiques de type II

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les cadhérines de type I et II présentent de fortes homologies de séquences. Cependant il a fallu attendre 2006 pour que les premières images structurales de cadhérines de type II soient disponibles (les cadhérines-8, -11 et MN-,

tableau 1) (Patel et al, 2006). Les domaines EC des cadhérines de type II ont une structure globale très proche de celles de type I, à savoir un repliement en 7 brins β organisés en 2 feuillets (domaines Ig-like). Dans cette étude, les auteurs ont observé que l'échange de brin β ici inclut les chaînes latérales des Trp2 et 4, conservés chez les cadhérines de type II, et insérées dans une large poche hydrophobe de la molécule partenaire (Figure 15). Les auteurs retrouvent un pont salin entre Glu 87 et l'extrémité N-ter, ainsi que la fixation de 3 ions Ca^{2+} entre 2 modules EC consécutifs. Il faut cependant noter que les cadhérines de type II ne possèdent pas le motif (Pro5-Pro6) qui favorise la dimérisation des cadhérines de type I.

Les données structurales attribuent une surface adhésive de $\sim 1600 \text{ \AA}$ pour les cadhérines de type I (Parisini et al, 2007), et de $2700\text{-}3300 \text{ \AA}$ pour les cadhérines de type II (Patel et al, 2006). Une surface d'interaction plus étendue suggère que les cadhérines de type II forment des interactions beaucoup plus fortes que les cadhérines de type I. Ceci est difficile à corrélérer avec le phénotype des cellules qui expriment ces 2 types de cadhérines. En effet par exemple, la E-cadhérine (de type I) est exprimée à la surface de la plupart des épithéliums, et forme des interactions très stables et cohésives alors que la cadhérine-11 (type II) est surtout présente sur des cellules de phénotype mésenchymateux, dans des contextes de plasticité cellulaire, de migration pendant le développement et la progression tumorale. Des expériences utilisant des micropipettes ont permis de mesurer les forces d'adhésion à l'échelle cellulaire de l'ordre de 100 pN pour les E- et N-cadherines (type I) et plus faibles, $\sim 10 \text{ pN}$ pour les cadhérines-11 et -7 (type II) (Chu et al, 2006). Il apparaît donc que le mode d'interaction des cadhérines de type II reste encore mal compris, et nécessite d'être documenté.



Figure 15 : Interface adhésive entre modules 11/EC1 en interaction, avec échange du brin β A*. Les Tryptophanes (Trp2 et 4) sont représentés en rouge ; sur la zone d'interaction hydrophobe les chaînes latérales de la phénylalanine 8 (F8) et et l'Isoleucine 10 (I10) sont mises en évidence sur le brin A.

Récemment, B. Honig et L. Shapiro ont complété ces études structurales de cristallographie en RX par l'étude en RMN du domaine EC1 d'une cadhérine de type II, la cadhérine-8 (Miloushev et al, 2008). La constante d'équilibre monomère-dimère K_D de cette

interaction est de 0.84 mM en absence de calcium, et 0.11mM en présence de 15 mM Ca^{2+} . Plus précisément, les auteurs distinguent 2 types d'association possibles : i) un mécanisme *inducted-fit*, et ii) un mécanisme *selected-fit* (Figure 16) :

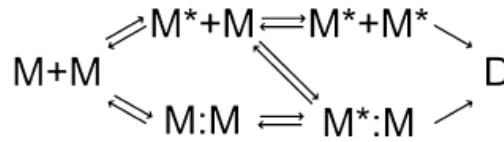


Figure 16 : Deux mécanismes différents sont décrits pour obtenir le dimère de cadhérine de type II (Miloushev et al, 2008) : une voie *inducted fit* (bas) où les monomères s'associent sans activation préalable ; une voie *selected fit* où les monomères doivent exposer leur brin β avant de pouvoir s'associer (haut).

Dans le mécanisme *selected-fit*, la collision entre molécules actives avec leurs brins β Nter exposés donnent lieu à la formation de dimères ; dans le mécanisme *inducted-fit*, 2 molécules avec les brins β en conformation intramoléculaire forment un complexe initial, puis dans un deuxième temps les brins β s'échangent pour finalement former le dimère adhésif. Même si la détermination des énergies d'activation obtenues par RMN sur le module EC1 est en faveur d'un mécanisme *selected-fit* pour la formation des dimères, des études complémentaires sont à prendre en compte. En effet, nous l'avons vu plus haut, des différences notables existent entre cadhérines de type I et II au niveau de l'échange de brin β . De plus, le fragment extracellulaire complet EC15 peut se comporter de manière différente, car la poche de fixation de calcium sur le module isolé EC1 est incomplète. Cette poche calcium est en effet essentielle à l'interaction des cadhérines de type I (Harrison et al, 2005a; Prakasam et al, 2006a). Les études dynamiques devraient aussi nous renseigner sur le rôle des acides aminés clés de l'interaction des cadhérines de type II, et sur l'importance relative de l'échange du brin β par rapport à la zone d'interaction hydrophobe, dans les conditions plus proches de la physiologie (voir l'article 2 de ce travail de thèse).

4. Les cadhérines desmosomales

Il existe deux types de cadhérines desmosomales : les desmocollines et les desmogléines (Marcozzi et al, 1998). Les cadhérines desmosomales, bien que proches des cadhérines classiques par leur séquence et leur structure (PDB 2YQG), forment une famille distincte. Ces molécules ont la même architecture que les cadhérines classiques : leurs segments extracellulaires avec 5 domaines présentent 30 à 35% d'identité de séquence et le

5^{ème} domaine est le moins bien conservé (Patel et al, 2003b). Leur segment cytoplasmique, bien que relativement divergent, possède un domaine de liaison à la plakoglobine. Celle-ci interagit avec la desmoplakine qui elle-même s'associe aux filaments intermédiaires (Figure 3). A l'heure actuelle, 3 desmocollines et 4 desmoglénines ont été identifiées. Ces cadhérines s'organisent en hétérodimères, c'est-à-dire qu'une desmoglénine s'associe avec une desmocolline en *cis* (Chitaev & Troyanovsky, 1997). De tels dimères, à la surface de deux cellules adjacentes, interagissent ensuite en *trans* pour participer la structuration des structures jonctionnelles appelées desmosomes. L'adhésion cellulaire forte des desmosomes viendrait d'interactions hétérophiles entre ces 2 différentes cadhérines, et de leur ancrage aux filaments de cytokératine au niveau de leur plaque intracytoplasmique.

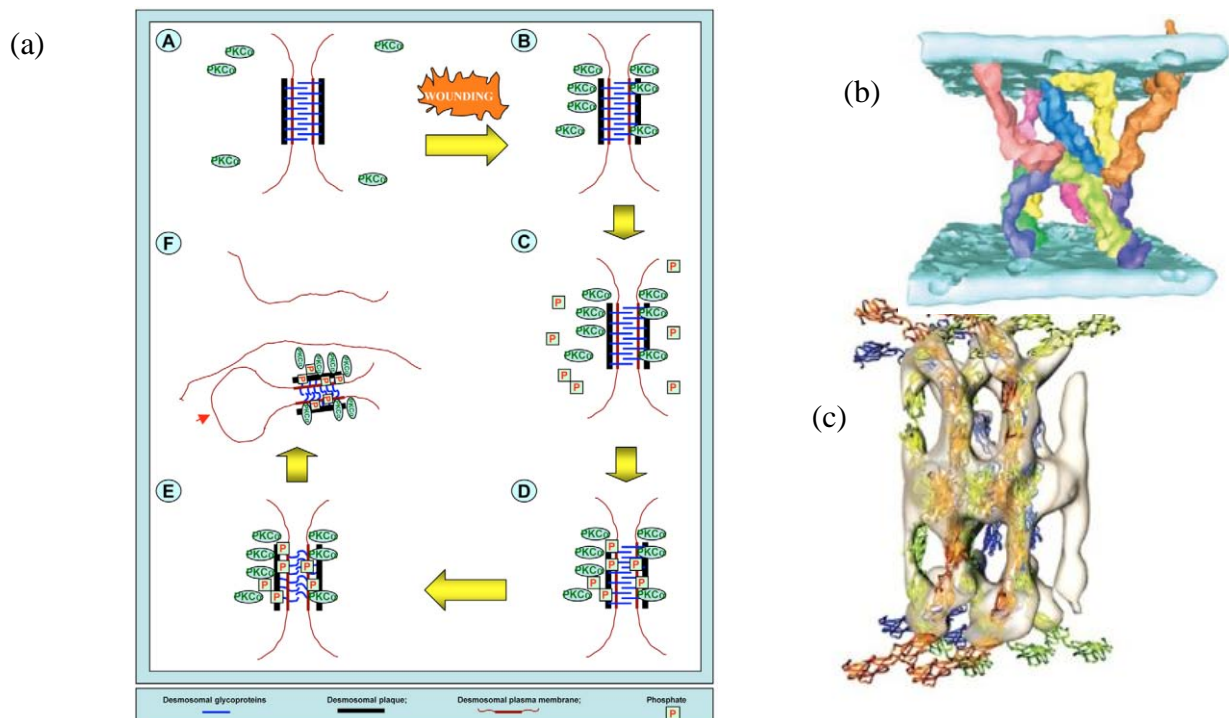


Figure 17 : Organisation des cadhérines au sein des desmosomes. (a) Hypothèse pour la perte d'adhésivité des desmosomes au cours de la réparation tissulaire (Garrod et al, 2005). [A] Dans l'épiderme normal, la PKCα diffuse librement, les desmosomes sont structurés et leur organisation est indépendante du calcium. [B] Après blessure, les PKCα s'associent à la plaque desmosomale. [C-D] Les éléments de la plaque desmosomale sont phosphorylés par la PKCα. [E] Un signal transmembranaire désorganise les cadhérines desmosomales ; l'adhésion devient dépendante du calcium. [F] Finalement, le desmosome est internalisé. (b) Images obtenues sur des échantillons déshydratés par tomographie des desmosomes et révélant des cadhérines désorganisées (He et al, 2003) et (c) échantillons vitrifiés et montrant des arrangements moléculaires ordonnés (Al-Amoudi et al, 2007).

Malgré les homologies de structure entre cadhérines classiques et desmosomales, les jonctions adhérentes et les desmosomes sont aisément identifiables morphologiquement en microscopie électronique à transmission, par leur espacement intermembranaire et la densité

de la plaque cytoplasmique (Farquhar & Palade, 1963; Miyaguchi, 2000). Les jonctions adhérentes, où sont présentes les cadhérines classiques, ont un espace intercellulaire de 25 nm et sont relativement peu organisées. L'espace intercellulaire au niveau des desmosomes est plutôt de l'ordre de 30 nm, avec une ligne dense aux électrons au milieu de l'espace intercellulaire (Al-Amoudi et al, 2007; Farquhar & Palade, 1963). Cette ligne pourrait être indicative d'un arrangement très organisé des domaines extracellulaires des cadhérines desmosomales dans ces structures.

Ces différences morphologiques entre desmosomes et jonctions adhérentes pourraient être explicables en partie par une flexibilité différente des domaines extracellulaires des cadhérines qui les constituent. De plus, les cadhérines desmosomales présentent des comportements distincts vis-à-vis du calcium et réalisent 2 types d'adhésion : i) une adhésion indépendante du calcium, dite « hyper-adhésive » et caractérisée par une organisation quasi cristalline (Garrod et al, 2005) ; ii) une adhésion dépendante du calcium, caractérisée en partie par la perte de la ligne dense au milieu de l'espace intercellulaire, et se rapprochant davantage des jonctions adhérentes par leur morphologie en microscopie électronique (Wallis et al, 2000).

La structure classique des desmosomes est observée dans les tissus au repos. Dans certaines situations physiologiques, en particulier lors de processus de remodelage tissulaire après blessure, il y a par recrutement de Protéine Kinase C α (PKC α) au niveau de la plaque desmosomale, phosphorylation de constituants de cette plaque. Un signal transmembranaire est généré et suivi d'une modification de l'organisation du desmosome qui devient sensible au calcium (Garrod and Kimura, 2008) (**Figure 17a**). Ces observations, qui peuvent paraître contre-intuitives, présentent l'intérêt de révéler différents niveaux d'organisations macromoléculaires de ces plaques adhésives, généralement considérées comme très figées, très stables, de même que leur plasticité et leur adaptation aux conditions physiologiques.

Si les jonctions intercellulaires sont bien caractérisées en microscopie électronique conventionnelle, seules 2 études par tomographie sont actuellement disponibles et portent sur l'organisation spatiale des cadhérines dans les desmosomes. La difficulté vient très probablement de la plasticité de ces plaques adhésives, même si elles apparaissent très structurées. La première étude, obtenue sur des échantillons tissulaires déshydratés, confirme que le module EC1 est le principal module impliqué dans l'interface adhésive (He et al, 2003). En effet la modélisation de la structure cristalline du domaine extracellulaire de la C-cadhérine dans la cartographie tomographique a révélé des interactions stochastiques entre les cadhérines, avec 3 arrangements principaux des segments extracellulaires qui ressemblent aux

lettres W, S et λ , où les molécules interagissent par leur domaine N-terminaux (Figure 17a). Ces interactions moléculaires suggèrent une grande flexibilité des dimères. Une étude plus récente, réalisée sur des échantillons vitrifiés, révèle quant à elle un arrangement moléculaire périodique dans les desmosomes (Al-Amoudi et al, 2007) (Figure 17b). Les cadhérines y sont organisées en intervalles de $\sim 7\text{nm}$ le long de la ligne dense intercellulaire, présentent une forme courbée proche de la structure cristalline de la C-cadhérine (Boggon et al, 2002), mais surtout on y distingue des dimères *cis* et *trans* évoquant ceux déjà décrits dans la littérature dans le modèle de « fermeture éclair » (Shapiro et al, 1995). Il faut cependant garder à l'esprit que les modes d'interaction *cis* et *trans* des cadhérines ne sont pas encore complètement élucidés et restent ouverts à débats. Une différence essentielle entre ces 2 études est la méthode de préparation des échantillons. La déshydratation pourrait être à l'origine de la désorganisation des desmosomes observée par He et al. (par la méthode de freeze-substitution). En revanche, la seconde approche, utilisant la vitrification des structures par refroidissement rapide, préserverait mieux les structures natives des échafaudages moléculaires.

La visualisation des desmosomes par tomographie offre une formidable perspective pour la compréhension du fonctionnement des cadhérines classiques au niveau des jonctions adhérentes, tant la similitude entre les cadhérines classiques et desmosomales est grande. Cependant l'organisation des cadhérines classiques n'a jamais été observée par tomographie dans le contexte cellulaire malgré les tentatives infructueuses pour l'instant d'imager les jonctions adhérentes (Frangakis, communication personnelle). Cette analyse est très probablement rendue difficile par les propriétés intrinsèques différentes dues à la composition biochimique et aux comportements dynamiques de ces jonctions. En effet, les jonctions adhérentes apparaissent moins organisées que les desmosomes ; par ailleurs, les desmosomes sont principalement présents dans des tissus soumis à des contraintes mécaniques (épithéliums, et muscle cardiaque) et sont impliqués dans diverses pathologies cutanées. Ces disparités d'observations entre les travaux de He et al. et ceux de Al-Amoudi et al. sont peut-être aussi le reflet de différents états d'organisation de ces structures et de leurs adaptations aux conditions physiologiques.

5. La T-cadhérine

La T-cadhérine est une cadhérine atypique. En effet, alors qu'elle possède la structure extracellulaire générale des cadhérines classiques (5 modules EC), elle n'a ni domaine transmembranaire, ni domaine intracellulaire et est insérée à la membrane plasmique par une

ancres glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Ranscht & Dours-Zimmermann, 1991) (Figure 4). Le domaine EC1 de la T-cadhérine présente ~38% d'homologie avec celui de la E-cadhérine, et 30% avec les domaines EC1 des autres cadhérines classiques (Dames et al, 2008; Ranscht & Dours-Zimmermann, 1991). Elle conserve les sites de fixation au calcium entre ses modules EC. Cependant, la T-cadhérine ne possède ni Trp2 (remplacé par une Ile en position 2) ni séquence HAV (très conservée chez les cadhérines classiques). Ces différences structurales laissent penser que la T-cadhérine n'interagit pas par échange de brin β comme c'est le cas pour les cadhérines classiques. Cette hypothèse a été renforcée récemment par l'étude RMN de son domaine EC1 (Dames et al, 2008). La T-cadhérine semblerait interagir en formant d'une interface en X (résultats non publiés, voir (Posy et al, 2008)), analogue aux structures observées avec des fragments de E-cadhérine présentant des extrémités N-ter modifiées par Nagar & al. et Pertz & al. (Nagar et al, 1996; Pertz et al, 1999b).

Les interactions que cette cadhérine établit *in vivo* ne sont pas encore clairement définies, mais de nombreuses études suggèrent que cette protéine serait impliquée dans la motilité cellulaire plutôt que dans des phénomènes adhésifs (Lee et al, 2008; Philippova et al, 2003; Philippova et al, 2009; Resink et al, 1999).

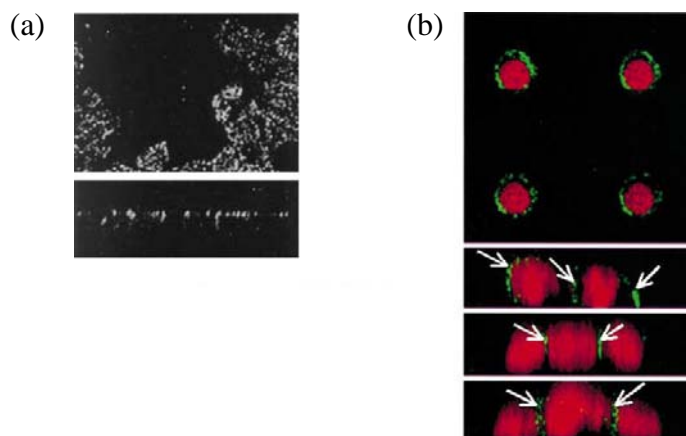


Figure 18 : Images par microscopie confocale montrant les différentes distributions de la T-cadhérine sur des cellules polarisées soit (a) à la membrane apicale (Koller & Ranscht, 1996), soit sur les surfaces basolatérales (Zhou et al, 2002). Les images du haut montrent des vues de dessus (coupes xy) et celles du bas des tranches (coupes xz).

La T-cadhérine n'est pas concentrée spécifiquement au niveau des jonctions intercellulaires, et son insertion membranaire via une ancre GPI favoriserait sa localisation dans les radeaux lipidiques, lui procurant un rôle dans la migration directionnelle plutôt que dans l'adhésion cellulaire. Il est intéressant de remarquer que l'ancre GPI résiste peu à la

force mécanique (Cross et al, 2005), et peut facilement être extraite d'une bicouche lipidique, ce qui est en accord avec des fonctions autres qu'adhésives de la T-cadhérine.

Sur différents types cellulaires polarisés (épithélium intestinal de poulet *in vivo*, MDCK) la T-cadhérine est localisée à la surface apicale (Koller & Ranscht, 1996). Cependant dans les cellules basales de la peau, la T-cadhérine est localisée au pôle basolatéral (Zhou et al, 2002). Ces observations montrent que la T-cadhérine peut présenter différentes distributions en fonction du type cellulaire suggérant que cette protéine pourrait avoir différents effets sur le comportement cellulaire (Figure 18).

L'étude de la T-cadhérine prend de plus en plus d'essor, en particulier parce que sa dérégulation est corrélée à l'apparition de nombreux types de cancers (Hebbard et al, 2008; Lee, 1996; Ogama et al, 2004).

6. La spécificité d'interaction des cadhérines

De très nombreuses observations, allant des patrons d'expression des cadhérines au cours du développement embryonnaire à l'analyse comparative de l'adhérence au niveau moléculaire et cellulaire, ont été faites pour caractériser les propriétés adhésives des cadhérines (Gumbiner, 2005; Mege et al, 2006; Takeichi, 1995). La majorité des données est en faveur d'interactions homophiles. Ceci peut être difficile à concilier avec les caractéristiques structurales décrites précédemment, (Trp2 et échange de brin β qui forment l'interface adhésive) partagées par l'ensemble des cadhérines de type I (voir Tableau 1), et qui n'expliquent pas comment celles-ci réalisent des interactions spécifiques. Quelques différences structurales existant à la périphérie de l'interface pourraient affecter la spécificité intrinsèque des cadhérines. Les différences d'énergie entre les interactions homophiles et hétérophiles sont faibles, de l'ordre de quelques kcal/mol (Prakasam et al, 2006b; Shi et al, 2008). Nous verrons avec quelques exemples, que les mécanismes moléculaires conduisant à la sélectivité de l'adhésion des cadhérines ne sont encore que partiellement compris.

a. Tests d'agrégation cellulaire

Les tests d'agrégation cellulaire furent parmi les premiers essais utilisés pour étudier l'adhérence cellulaire. Ils ont permis d'évaluer le caractère adhésif de différentes molécules de surface et particulièrement des cadhérines.

Les cellules sont mises en contact par agitation et leur capacité adhésive est évaluée par la formation d'agrégats. Roth et Weston en 1967 ont obtenu des mesures qu'ils ont définies comme « quantitatives » en comparant la vitesse à laquelle des cellules embryonnaires dérivées du cartilage, du foie ou des muscles pectoraux de poulet forment des agrégats homogènes. Ils ont constaté une préférence pour la formation d'interactions homotypiques par rapport aux interactions hétérotypiques (Roth, 1968). Plus tard Moyer et Steinberg ont mesuré la vitesse à laquelle des agrégats sphériques de même taille, de foie (F), de cœur (C) ou de rétine (R) d'embryons de poulet étaient capables de s'associer dans des conditions standardisées (Moyer & Steinberg, 1976). Une hiérarchie d'association a été observée : $F-F \geq C-C > F-C > R-R > C-R > F-R$. Même si les interactions homotypiques semblent être favorisées par rapport aux interactions hétérotypiques, une interprétation moléculaire est délicate. En effet, les agrégats sont partiellement homogènes au niveau cellulaire et de plus le niveau d'expression des cadhérines n'est pas maîtrisé.

Plus tard, Steinberg et collaborateurs ont testé l'hypothèse d'adhésion différentielle (DAH, Differential Adhesion Hypothesis) sur les cadhérines. Cette théorie propose que l'ensemble des cellules dans un tissu, au même titre que l'ensemble des molécules dans un liquide, adopte une organisation permettant de minimiser l'énergie libre du système ; cette minimisation de l'énergie libre dépend essentiellement des interactions cellule-cellule (Foty & Steinberg, 2005). Dans leurs expériences, des cellules exprimant des niveaux comparables de P- ou de E-cadhérine s'intermangent, tandis que des cellules exprimant la R- ou la B-cadhérine se démixent et s'organisent de façon hétérogène (Duguay et al, 2003). Ces observations suggèrent que l'énergie d'adhésion hétérophile entre la R- et la B-cadhérine est plus faible que leurs interactions homophiles respectives, alors que l'interaction hétérophile P- vs E-cadhérine est équivalente aux interactions homophiles respectives. Dans cette même étude, les auteurs soulignent que le niveau d'expression des cadhérines est primordial pour pouvoir interpréter leur comportement cellulaire collectif.

Plus récemment, des tests d'agrégation cellulaires similaires ont été menés sur des cellules exprimant la E-cadhérine et la N-cadhérine (type I), ainsi que la cadhérine 6b (type II) (Figure 19) (Katsamba et al, 2009). Comme dans les expériences de Duguay et al., les cellules forment des agrégats homogènes pour les interactions homophiles et des agrégats mixtes pour les interactions hétérophiles entre cadhérines de type I. Les cellules exprimant les cadhérines de type I et II n'agrègent pas entre elles (montrant que les cadhérines de type I et de type II n'interagissent pas les unes avec les autres). Les auteurs ont mesuré par centrifugation analytique et résonance plasmonique de surface les constantes d'interaction des interactions homophiles et hétérophiles entre ces 3 cadhérines. Ils ont ensuite relié le comportement

cellulaire observé dans les tests d'agrégation à ces constantes de dissociation moléculaires par un modèle que nous allons décrire maintenant.

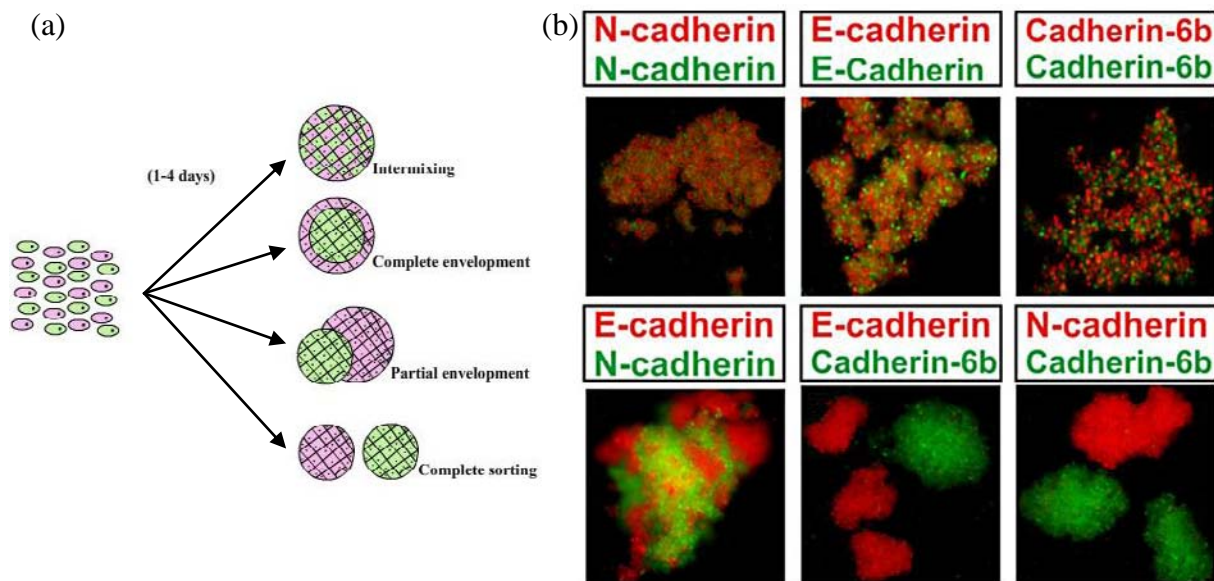


Figure 19 : Expériences d'agrégation cellulaire ; (a) différents cas de figures prévus par la DAH pour le tri cellulaire ; (b) exemples de tests d'agrégation avec des cellules exprimant des cadhérines différentes (Katsamba et al, 2009) où on retrouve l'intermixité (photos du haut), l'enveloppement partiel (en bas à gauche) et de tri complet. Les cellules sont marquées avec des sondes fluorescentes différentes en fonction des cadhérines qu'elles expriment, afin de différencier la nature des agrégats.

b. Modèle théorique de l'adhésion spécifique

L'expression de différentes cadhérines est souvent corrélée au phénomène de ségrégation cellulaire. La sélectivité d'expression est souvent considérée comme la manifestation directe au niveau cellulaire des interactions homophiles des cadhérines, comme ceci a été décrit au cours du développement embryonnaire (Takeichi, 1988b). Cependant, des cellules peuvent exprimer plusieurs types de cadhérines *in vivo*, même si ceci ne signifie pas que des interactions hétérophiles soient présentes (Agarwal et al, 2008; Lampugnani et al, 2006). . En complément de ces observations *in vivo*, les tests d'agrégation cellulaire montrent que *in vitro* dans certaines conditions des cellules exprimant différentes cadhérines adhèrent entre elles comme nous l'avons vu précédemment (Duguay et al, 2003; Niessen & Gumbiner, 2002). De plus, l'analyse des séquences et des structures n'explique pas clairement pourquoi la formation d'homodimères serait favorisée par rapport à la formation d'hétérodimères. La spécificité de l'adhésion cellule-cellule ne serait donc pas simplement corrélée à la spécificité d'interaction des molécules de cadhérines. En effet, les niveaux d'expression à la surface

cellulaire plutôt que la nature des cadhérines pourraient régir les interactions cellulaires (Duguay et al, 2003; Steinberg & Takeichi, 1994).

Chen et al. ont développé un modèle basé sur les affinités de liaison des cadhérines, qui décrit comment de faibles différences d'affinité d'interactions moléculaires peuvent conduire à des différences significatives d'adhésion cellulaire (Chen et al, 2005). Ce modèle montre que le comportement cellulaire est très dépendant de la concentration surfacique en cadhérines, et fournit une explication rationnelle aux résultats précédents à priori contradictoires.

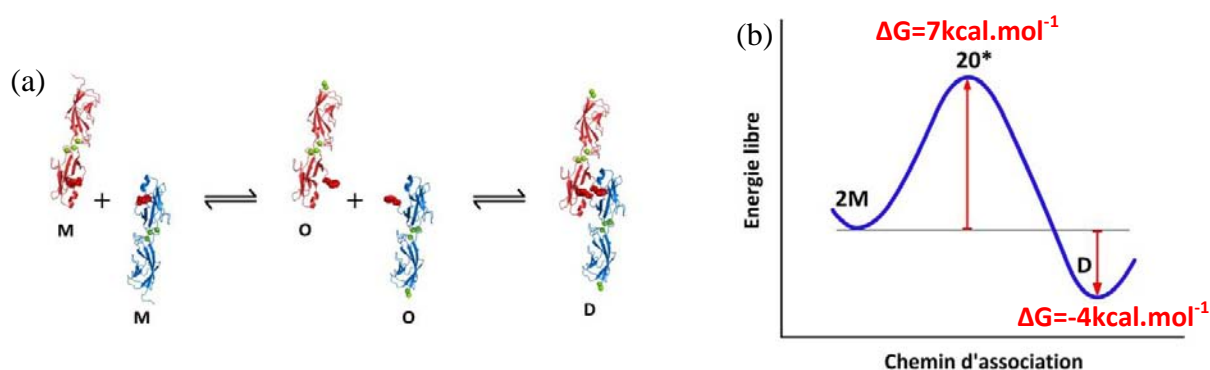


Figure 20 : Modèle proposé par Chen et al. pour l'interaction des cadhérines, et son diagramme d'énergie (A) Les 2 monomères [M] avec leur Trp en conformation intramoléculaire, exposent leur brin au solvant [O] pour s'associer en dimère adhésif [D] (B) Diagramme d'énergie libre associé aux étapes de l'interaction montrée en (A).

La surface d'interaction des cadhérines de type I, de l'ordre de 1600 Å a les propriétés structurales de complexes protéiques de haute affinité. Le mode d'interaction par échange de domaine, ici échange de brin, modifie ces propriétés. De fait, les cadhérines ont de faibles affinités d'interaction à l'équilibre, de l'ordre de la millimole (Haussinger et al, 2004; Perret et al, 2002a). En effet, les interactions établies entre le brin β et le domaine EC1 sont similaires, que ce soit en intramoléculaire dans la forme monomérique ou en intermoléculaire dans la forme dimérique. De ce fait, le monomère se comporte comme un inhibiteur compétitif de la formation du dimère, diminuant les affinités d'interaction (Figure 20). De plus, les monomères doivent surmonter une barrière énergétique et passer par un état activé instable pour interagir. Cet état hypothétique, décrit figure 20, n'a encore jamais été observé. Pour le cas le plus simple, si la concentration en monomères est plus faible que le K_D , seules quelques molécules associées en dimères sont présentes. Dans ce régime, il est intéressant de souligner que de petites différences dans les affinités intrinsèques des molécules de cadhérine produisent des différences significatives dans le nombre de dimères formés. L'énergie

d'adhésion cellulaire, directement proportionnel au nombre de dimères à la surface entre deux cellules, se trouve ainsi modifiée.

Les contacts cellule-cellule initiaux sont établis par les cadhérines présentes à la surface d'extensions membranaires très dynamiques. Ces contacts, s'ils durent suffisamment longtemps, vont permettre à d'autres molécules de cadhérines de diffuser vers la zone de contact et de renforcer l'adhésion. Ainsi, les interactions faibles mais multiples peuvent produire des interactions cellule-cellule homophiles et spécifiques. Des contacts plus labiles entre hétérodimères se dissocieront avant que l'adhésion cellulaire n'ait le temps de se renforcer. En revanche, si ces interactions entre cadhérines de différents types ont intrinsèquement de fortes affinités, elles maintiendront les contacts hétérophiles suffisamment longtemps pour établir des interactions hétérophiles. Ce modèle a été utilisé avec succès par Katsamba et al. (Figure 19) entre N- et E-cadhérines (Katsamba et al, 2009).

c. Comparaison entre cadhérines de type I et cadhérines de type II

La majorité des études décrivant les interactions adhésives porte sur les cadhérines de type I, un nombre croissant de travaux documente les cadhérines de type II. A cause de leurs homologies de séquences, les cadhérines de type II sont souvent considérées comme interagissant au niveau du segment extracellulaire de façon similaire aux cadhérines de type I. Cependant, les différences séquentielles et structurales suggèrent très fortement que leur mécanisme d'interaction présente des singularités.

L'adhérence entre cellules exprimant les cadhérines de type I et II a été quantifiée en particulier dans une étude très intéressante utilisant des micropipettes (Chu et al, 2006). Les forces d'adhésion ont été mesurées à l'échelle cellulaire, et ont permis de déterminer pour les N- et E- cadhérines (type I) des forces de détachement de 75 et 195 nN respectivement, contre 4 et 10nN pour les cadhérines -11 et -7 (type II). Par remplacement du domaine extracellulaire de la cadhérine-7 par celui de la E-cadhérine, et réciproquement, les auteurs ont montré que ces différences d'adhésion cellulaire étaient dues à la capacité adhésive des domaines extracellulaires de ces protéines.

D'autres études indiquent à l'inverse que des cadhérines de type II peuvent établir des interactions plus fortes que celles de type I. Notamment par mesures d'AFM, sur molécules isolées vs molécules isolées, molécules isolées vs cellules, ou cellules vs cellules, il apparaît que les interactions établies par la cadhérine-11 sont plus stables que celles entre N-cadhérines (Pittet et al, 2008). Des mesures de constantes de dissociation à l'équilibre

obtenues par ultracentrifugation analytique indiquent un K_D moyen de 3 μM pour la cadhérine-6, contre 100 μM et 25 μM pour la E- et la N-cadhérine respectivement (Katsamba et al, 2009).

Ces différences entre la nanomécanique des cadhérines de type II et les comportements cellulaires qu'elles engendrent restent encore incomprises et sujettes à débat. Les résultats contradictoires sur les cadhérines de type II montrent que leur mécanisme d'interaction n'est pas encore appréhendé complètement, et que leurs implications dans le contexte physiologique ou pathologique n'est pas encore élucidé.

III. Régulation post-traductionnelle des cadhérines

Les « colles moléculaires » que sont les cadhérines interviennent très tôt dans le développement, et jouent un rôle crucial dans la reconnaissance, mais aussi la différenciation cellulaire (Larue et al, 1996a). Les caractéristiques très spécifiques de leurs interactions ainsi que leurs fortes homologies de séquences donnent aux cadhérines classiques toute la complexité et donc tout l'intérêt de leur étude. Une littérature très abondante concerne l'implication des cadhérines dans diverses voies de signalisation. Nous avons choisi quelques exemples non exhaustifs pour en illustrer la complexité.

1. Assemblage des cadhérines et formation des jonctions

Les cadhérines sont synthétisées dans le réticulum, avec un peptide signal pour leur adressage membranaire, ainsi qu'un prodomaine N-terminal qui empêche les cadhérines d'interagir et de former des agrégats trop précocement. Durant le transport du réticulum à la membrane plasmique, différentes modifications post-traductionnelles vont contribuer à la maturation de la protéine : au niveau de l'appareil de Golgi le prodomaine N-terminal est clivé, et des groupements glycosylés importants pour les propriétés adhésive sont greffés (Guo et al, 2009).

La notion d'adhésion suggère la résistance aux contraintes mécaniques. La cellule, pour résister efficacement à ces forces, doit avoir un minimum de rigidité. Les récepteurs adhésifs soient ancrés au cytosquelette, dont le rôle est de maintenir la forme des cellules. Comme pour les intégrines, les interactions entre cadhérines et cytosquelette, doivent donc être hautement contrôlées pour pouvoir réguler l'adhésion cellulaire (Figure 21).

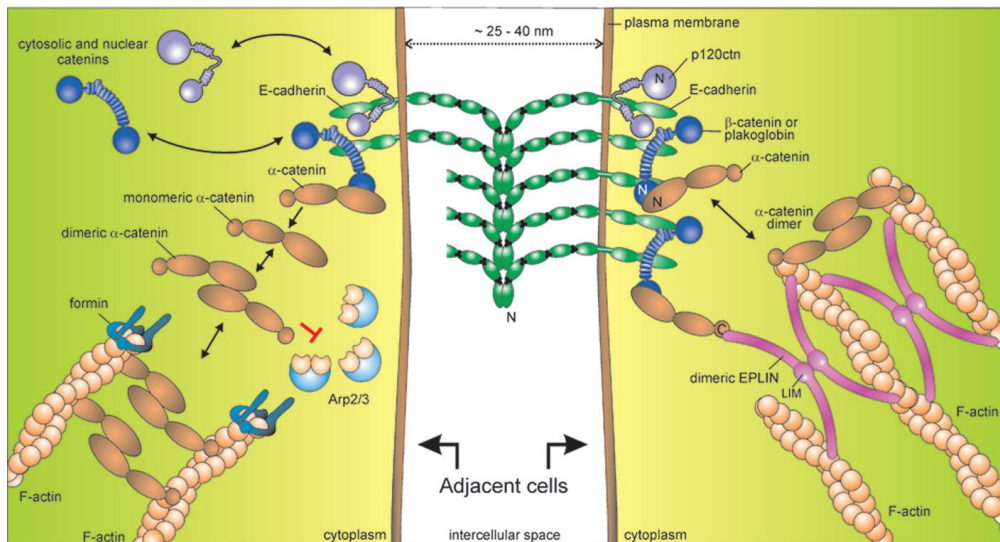


Figure 21 : Représentation schématique du complexe E-adhérines/caténines à la jonction entre deux cellules épithéliales voisines (van Roy & Berx, 2008).

Les caténines ainsi que d'autres protéines cytoplasmiques concentrées au niveau des jonctions adhérentes (small GTPases & récepteur Tyrosine Kinase) forment un échafaudage moléculaire et contribuent à la structuration des jonctions, modulent leur stabilité et leur renouvellement. Cet échafaudage est impliqué dans la transduction du signal. Pour assurer leur fonction et leur stabilité à la surface, les cadhérines doivent être liées à la β -caténine ou à la γ -caténine. Cette association s'effectue très tôt, dès le réticulum endoplasmique. La connexion entre le cytosquelette et le complexe cadhérine/ β -caténine est sujette à débat. Certaines études suggèrent que l' α -caténine relie directement le complexe cadhérine/ β -caténine, d'autres concluent que l' α -caténine ne peut pas être liée simultanément au complexe et aux filaments d'actine (Weis & Nelson, 2006). Un mécanisme alternatif pour l'ancrage des cadhérines au cytosquelette d'actine suggère l'existence d'un lien encore inconnu entre l' α -caténine et l'actine (Halbleib & Nelson, 2006). Ce lien pourrait être établi par l'intermédiaire de la protéine EPLIN (epithelial protein lost in neoplasms), dont la liaison à l' α -caténine associée au complexe a été montrée récemment (Abe & Takeichi, 2008). Il est intéressant de noter que la β -caténine a un double rôle dans la cellule ; elle participe à l'échafaudage intracellulaire des jonctions adhérentes, mais aussi à la transduction de signaux dans la voie de signalisation Wnt en tant que cofacteur de transcription (Cadigan & Nusse, 1997; Clevers, 2006; Hoppler & Kavanagh, 2007). Chaque membre de ce complexe est essentiel. Des mutations affectant l'expression ou la liaison de l'une de ces protéines réduit dramatiquement l'adhésion cellulaire (Nagafuchi et al, 1994; Ozawa et al, 1990b; Vasioukhin et al, 2001).

Une autre protéine se lie aux domaines intracellulaires des cadhérines de type I et II, la p120-caténine (Figure 21). Elle se lie de manière indépendante aux α - et β -caténines. Son rôle

précis reste encore indéterminé. Contrairement à la β -caténine, la p120-caténine ne se lie pas aux cadhérines au cours du trafic intracellulaire, mais au niveau de la membrane plasmique (Miranda et al, 2003). En fonction du contexte cellulaire, la p120-caténine peut être une protéine d'échafaudage et réguler la force d'adhésion en groupant les cadhérines en sites spécifiques à la surface cellulaire (Thoreson et al, 2000; Yap et al, 1998). De plus, elle participe au renouvellement des cadhérines en adaptant le niveau d'expression des cadhérines disponibles à la surface (Davis et al, 2003; Ireton et al, 2002; Xiao et al, 2003). L'importance de la p120-caténine a aussi été démontrée chez la souris où sa délétion dans le génome de l'épithélium des glandes salivaires ou de la peau réduit le taux d'expression de la E-cadhérine dans ces tissus (Davis & Reynolds, 2006; Perez-Moreno et al, 2006).

2. Régulations de l'adhésion

Comme nous venons de voir, différents paramètres comme le niveau d'expression des cadhérines à la surface cellulaire, leur renouvellement, les interactions avec le cytosquelette sont très importantes pour la régulation des phénomènes adhésifs. Un changement de ces protéines d'échafaudage (physiologique ou pathologique) peut entraîner une perturbation de l'adhérence, sans que pour autant les cadhérines ne perdent leur capacité adhésive intrinsèque. Les cadhérines, au delà de leurs capacités de « colles moléculaires », sont aussi des transducteurs de signaux. Elles renseignent la cellule sur son environnement, et ainsi la cellule, grâce à ce mécano-senseur, peut réagir et s'adapter à certaines conditions extérieures. Comme décrit ci-dessous, les cadhérines agissent de concert avec d'autres molécules pour moduler la réponse cellulaire.

Les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) jouent un rôle très important dans le développement. Après fixation de leur ligand, les RTK s'oligomérisent et s'autophosphorylent, et passent d'une forme inactive à une forme active ; ils peuvent alors phosphoryler leurs protéines cibles. Les RTK peuvent interagir avec les cadhérines, et ces interactions modulent les voies de signalisation en modifiant l'affinité entre les RTK et leurs protéines cibles (Hoschuetzky et al, 1994; Pece & Gutkind, 2000; Qian et al, 2004). Par exemple, le récepteur au facteur de croissance épidermal (EGFR) intervient dans différents phénomènes comme la croissance, la différenciation, la migration ou la transformation (Fedor-Chaiken et al, 2003). La E-cadhérine interagit spécifiquement avec l'EGFR via le domaine extracellulaire. Il a été observé que l'engagement adhésif de la E-cadhérine active la phosphorylation de l'EGFR, ce qui entraîne de rapides altérations de la morphologie

cellulaire, des réarrangements du cytosquelette d'actine et une redistribution des récepteurs (Fedor-Chaiken et al, 2003).

Un autre groupe de RTK, les récepteurs au facteur de croissance fibroblastique (FGFR) sont impliqués dans de nombreux processus au cours du développement, comme la différenciation musculaire, l'induction et la migration du mésoderme, l'angiogénèse et l'induction neurale (Bottcher & Niehrs, 2005). Très récemment, il a été montré que l'engagement adhésif de la cadhérine-11 au niveau du cône de croissance des neurones permet le recrutement du FGFR. L'interaction du domaine extracellulaire de la cadhérine-11 avec celui du FGFR active des voies de signalisation intracytoplasmiques, et stimule ainsi l'extension des axones (Boscher & Mege, 2008). Ce mécanisme impliquant le FGFR et la cadhérine-11 (exprimée à la surface de cellules au phénotype mésenchymateux) pourrait être impliqué dans d'autres phénomènes migratoires, physiologiques ou pathologiques.

Les cadhérines classiques ont aussi été identifiées comme substrat potentiel de metalloprotéases (comme ADAM10) ou de γ -sécrétases (Marambaud et al, 2002). Le clivage du domaine extracellulaire de la N-cadhérine par ADAM10 produit un fragment carboxy-terminal (CTF1), ancré à la membrane. Ce fragment est rapidement dégradé par une γ -sécrétase qui relargue dans le cytoplasme un deuxième fragment carboxy-terminal (CFT2). Le CFT2 se lie au complexe CBP (CREB binding protein) et est alors rapidement dégradé par le protéasome. La quantité de CBP, après translocation et dégradation, diminue drastiquement dans le cytoplasme et le noyau, et l'expression des gènes régulée par CBP s'en trouve modulée (Uemura et al, 2007).

Enfin, comme ceci est décrit dans l'article 4 dans cette thèse, les cadhérines peuvent aussi, par leur engagement, réguler l'activation de certaines voies de signalisation, et l'expression de gènes par activation du facteur de transcription Stat3 (Arulanandam et al, 2009). Cet équilibre dynamique permet aux cadhérines de jouer un rôle dans des processus complexes et primordiaux, comme le développement embryonnaire.

3. Cadhérines et développement

a. Un peu d'embryologie

Au cours du développement embryonnaire, chaque cadhérine possède une expression spatio-temporelle particulière (Figure 22; (Takeichi, 1988a). La E-cadhérine est exprimée dans l'embryon de souris au stade très précoce de 2 cellules (Ogou et al, 1982). Elle joue un rôle indispensable lors de la compaction au stade 8 et 16 cellules (Damsky et al, 1983; Hyafil

et al, 1980; Shirayoshi et al, 1983). Au cours de l'implantation, la E-cadhérine est exprimée dans toutes les cellules de l'embryon, puis lorsque ces cellules se différencient, certaines d'entre elles perdent l'expression de cette cadhérine. Ainsi, lors de la gastrulation, moment clé correspondant à la mise en place des trois feuillets embryonnaires, les cellules du mésoderme nouvellement formé répriment l'expression de la E-cadhérine et expriment la N-cadhérine (Hatta & Takeichi, 1986). Ce même changement d'expression entre la E- et la N- cadhérine est observé au moment de la neurulation, au niveau des cellules du tube neural nouvellement formé. Par contre d'autres régions de l'ectoderme et toutes les cellules de l'endoderme gardent l'expression de la E-cadhérine et cette expression persiste aussi longtemps qu'elles se différencient en cellules épithéliales. Plus tard, pratiquement toutes les cellules épithéliales dérivées de l'ectoderme et de l'endoderme, qui prolifèrent, expriment la E-cadhérine. A de rares exceptions près, les tissus neural et mésodermique n'expriment pas de E-cadhérine (Takeichi, 1988a). Les composants épithéliaux du système urogénital dérivé du mésoderme, tels que les tubules mésonephriques et métanephriques expriment la E-cadhérine après différenciation. Enfin certains tissus mésothéliaux expriment également cette cadhérine (Damjanov et al, 1986). Ainsi le changement d'expression d'une cadhérine est souvent corrélé avec la différenciation, elle-même coordonnée avec les processus de morphogénèse.

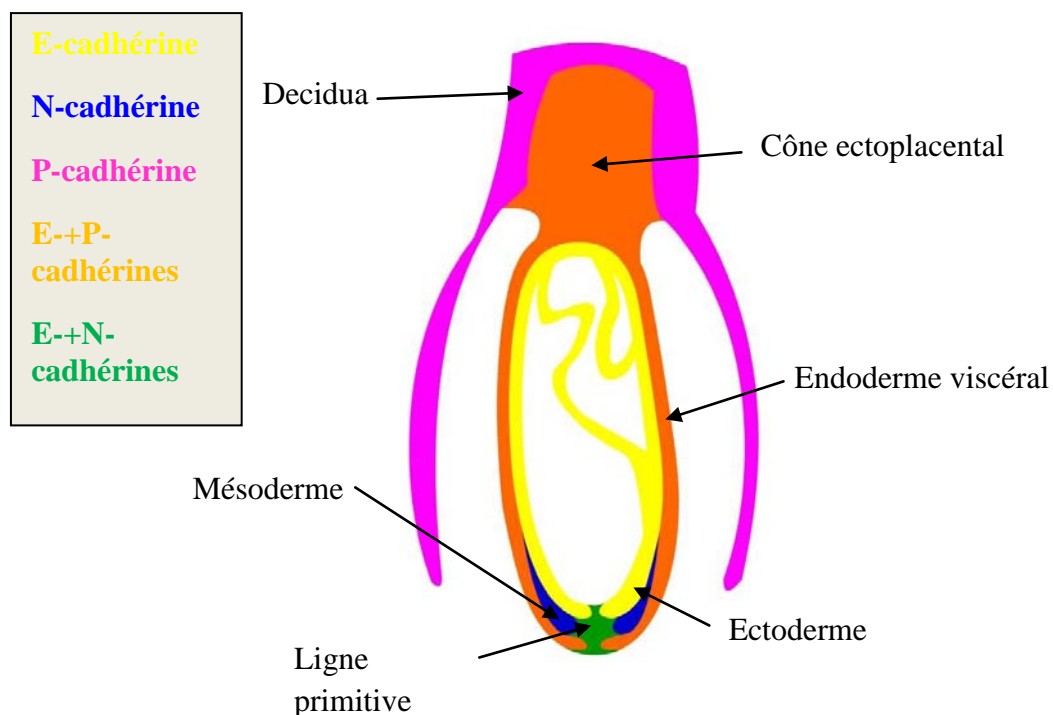


Figure 22 : Coupe sagittale de l'embryon de souris montrant l'expression différentielle de diverses cadhérines de type I (reproduit de (Takeichi, 1988b)).

La réalisation de souris transgéniques présentant une invalidation des gènes de certaines cadhérines a confirmé le rôle primordial de ces molécules au cours du développement. L'absence d'expression de E-cadhérine aboutit à une mort précoce de l'embryon, liée à une absence de formation de l'épithélium du trophoctoderme (Larue et al, 1994; Riethmacher et al, 1995). De même, les embryons n'exprimant pas de N-cadhérine meurent au cours du dixième jour de gestation avec des malformations du tube neural et du cœur (Radice et al, 1997). Le rôle morphogénétique de ces cadhérines a également été mis en évidence *in vitro*. L'expression de E-cadhérine dans les cellules L qui n'expriment pas habituellement de cadhérines conduit à un changement morphologique de ces cellules (Nagafuchi et al, 1987). Plus tard la même observation a été faite avec la P- ou la N-cadhérine (Takeichi, 1988a).

Il apparaît évident que les cadhérines, en participant à l'adhésion cellule-cellule, jouent un rôle décisif dans la morphogenèse cellulaire et dans l'homéostasie des tissus sains de l'adulte. Une étude très élégante a démontré que des cadhérines spécifiques jouent un rôle plus direct dans la différenciation de certains tissus et qu'elles sont capables d'influencer l'activité de certains gènes (Larue et al, 1996b). Les auteurs ont utilisé des cellules ES (embryonic stem cells) invalidées pour le gène de la E-cadhérine et ont regardé quel était le devenir de la cellule si, au cours de la différenciation, elle exprime une cadhérine différente. Tout d'abord ces cellules ayant perdu l'expression de la E-cadhérine présentent un phénotype désagrégé et expriment le facteur de transcription T-brachyury : les cadhérines peuvent donc influencer l'expression de gènes. Lorsque l'expression de la E-cadhérine est induite dans ces cellules, il se forme uniquement des épithéliums. Si l'expression constitutive de la N-cadhérine est induite, les tissus formés sont de type neuro-épithélial et cartilagineux.

Les cadhérines participent au maintien des contacts intercellulaires. En exécutant cette fonction, elles participent à des événements morphogénétiques importants, mais elles sont aussi capables de propager d'autres informations influençant la différenciation cellulaire et l'expression de gènes.

b. "Cadherin switching" et transition épithélio-mésenchymateuse

La régulation spatio-temporelle d'expression des cadhérines participe de façon cruciale à la reconnaissance cellulaire et la ségrégation tissulaire. Cette régulation se traduit par un changement d'expression des cadhérines appelé "*cadherin switching*".

Au cours du développement, ainsi que dans certaines pathologies comme le cancer, on observe le phénomène de « cadherin switching », parfois corrélé avec la ségrégation cellulaire (Thiery & Sleeman, 2006). L'exemple le plus connu et le mieux étudié de "cadherin switching" est la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).

La transition épithélio-mésenchymateuse est un mécanisme indispensable au cours de la morphogénèse ; sans cellules mésenchymateuses, les tissus et les organes ne peuvent pas se former. Cependant, la plasticité des cellules épithéliales, couplée à la formation permanente ou transitoire du mésenchyme, va bien au-delà du problème de ségrégation des tissus embryonnaires. Comprendre comment les cellules mésenchymateuses se forment à partir d'une perturbation au niveau d'un tissu épithélial aura un fort impact dans le décryptage des mécanismes qui contrôlent de nombreuses pathologies, et en particulier la progression des cancers.

Au cours de la EMT, une cellule épithéliale perd ses caractéristiques de polarité, désassemble ses jonctions cellule-cellule et devient plus motile. La EMT est déclenchée par des signaux extérieurs, comme ceux transmis par les composants de la matrice extracellulaire (le collagène et l'acide hyaluronique par exemple), ou des facteurs de croissance solubles comme le transforming growth factor β 2 (TGF β 2) ou le facteur de croissance épidermal (EGF).

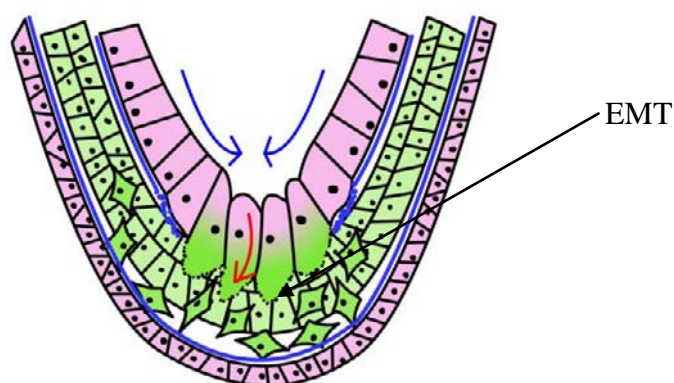


Figure 23 : Expression de la E- et N-cadhérine (en rose et en vert respectivement) durant la gastrulation. Les cellules de l'épiblaste (rose) subissent une EMT, migrent et colonisent le mesoderme (vert). Pendant ce processus, l'expression de E-cadhérine est réprimée et remplacée par celle de la N-cadhérine.

La plupart des cellules épithéliales expriment la E-cadhérine et sont très cohésives ; les cellules de phénotype mésenchymateux sont plus motiles, moins polarisées, et expriment souvent la N-cadhérine. Au cours de la gastrulation, les cellules de l'épiblaste exprimant la

E-cadhérine subissent une EMT et migrent pour coloniser le mésoderme ; ce phénomène est concomitant au remplacement de l'expression de la E-cadhérine par celle de la N-cadhérine (Butz & Larue, 1995) (Figure 23).

Certaines cellules cancéreuses qui dérivent d'épithéliums expriment aussi de manière inappropriée la N-cadhérine, dont la surexpression déclenche la motilité et l'apparition du phénomène métastatique (Hazan et al, 2000; Islam et al, 1996; Nieman et al, 1999). Le terme de "cadherin switching" réfère le plus souvent au changement d'expression entre E- et N-cadhérine, mais comprend aussi des situations où le patron d'expression est modifié ; ainsi le niveau d'expression de la E-cadhérine peut ne pas changer significativement, mais les cellules se mettent à coexprimer la N-cadhérine ou augmentent son expression. Des situations ont été décrites où d'autres cadhérines remplacent ou sont coexprimées avec la E-cadhérine (comme les -11, T-, P- ou R- cadhérine, (Derycke & Bracke, 2004; Paredes et al, 2005; Patel et al, 2003a; Riou et al, 2006; Taniuchi et al, 2005; Tomita et al, 2000). Par exemple dans le cancer de la prostate, il a été observé que les cellules saines exprimant initialement la E-cadhérine surexpriment la N- ou la -11 cadhérines avec la pathologie (Tomita et al, 2000). Très récemment dans une étude intéressante, cette corrélation a été établie entre surexpression de cadhérine-11 par les cellules tumorales et la formation de métastases osseuses; en effet, la cadhérine-11 (ou OB-cadhérine) est exprimée par les ostéoblastes (Chu et al, 2008). Lorsque l'expression de la cadhérine-11 a été désactivée dans les cellules tumorales, aucune métastase osseuse n'a pu être détectée chez la souris, mettant en évidence l'importance de ce système adhésif dans la pathologie.

IV. Biofonctionnalisation

1. Modification de surface

L'étude de l'adhésion cellulaire ainsi que le développement croissant des biotechnologies requiert la mise au point de matériaux innovants aux propriétés adhésives, et le développement de nouvelles stratégies pour la fonctionnalisation de ces matériaux avec des biomolécules. L'utilisation des puces à ADN ou des puces à protéines a permis un formidable progrès de ces technologies. Leurs impacts dans les sciences médicales et biologiques est de plus en plus grand.

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'organisation des molécules de cadhérines à la surface cellulaire reste encore un sujet à débat, voire très peu connu en ce qui concerne les cadhérines de type I et II. Le développement des différentes voies de fonctionnalisation/modification de surface devrait permettre la modélisation de ces systèmes adhésifs : l'objectif est d'organiser sur les surfaces modèles des molécules de cadhérines et de contrôler la géométrie des ligands, et de comparer les réactions cellulaires *in vitro* avec les comportements *in vivo*.

Il existe toute une zoologie de chemins pour arriver à la fonctionnalisation de surface par des biomolécules, allant de la fixation non covalente orientée à la fixation covalente aléatoire. La bibliographie sur ces techniques est très vaste et les techniques très diverses. L'engouement pour les biotechnologies semble débrider les chimistes qui n'ont comme limite que leur créativité pour développer de nouveaux procédés de fonctionnalisation de surface et d'organisation de biomolécules sur ces substrats. Nous verrons d'abord les voies classiques de fixation de protéines à un substrat, avec leurs différents avantages et inconvénients, puis quelques méthodes mises en œuvre pour les organiser.

La fonctionnalisation de surface passe par deux étapes obligatoires : i) l'activation de la surface et ii) l'immobilisation de la biomolécule.

L'activation doit prendre en compte le type de surface, et doit aussi être compatible avec la stratégie d'immobilisation. Les performances finales du matériau vont dépendre de paramètres en relation avec cette stratégie d'immobilisation : i) les propriétés physiques et chimiques de la surface, qui influencent à la fois les liaisons spécifiques et non spécifiques des protéines ; ii) la distance entre les protéines immobilisées et la surface ; iii) l'orientation de la protéine immobilisée, qui peut détériorer la surface d'interaction ou la protéine elle-même ; iv) la densité de surface en protéines.

Le choix de la surface va dépendre de son utilisation et de ses applications. Les propriétés de conductivité électrique des surfaces d'or vont être préférentiellement utilisées pour le développement de détecteurs électrochimiques ou de Résonance Plasmons de Surface (SPR) (Lee et al, 2005). Des surfaces de verre seront quant à elles préférées pour des détecteurs optiques pour leurs capacités de transparence. En général, ces 2 surfaces sont choisies pour leurs caractéristiques d'homogénéité et de stabilité chimiques, pour le contrôle de leurs propriétés de surface (polarité, mouillabilité), leurs capacités à être modifiées par une large gamme de fonctions chimiques, et la reproductibilité de leur modification de surface (Cheung et al, 1999; Holloway et al, 2002; Southern et al, 1999).

La principale méthode pour fonctionnaliser les surfaces de verre est d'utiliser les fonctions silanol Si-OH de la surface du verre (Figure 24). Les groupes silanols peuvent être générés par exemple par traitement à la solution piranha (H₂O₂/H₂SO₄) ou par plasma d'oxygène. Des silanes aux fonctions organiques de structure générale (RO)₃Si(CH₂)_nX peuvent ensuite être utilisés pour introduire de nouveaux groupes fonctionnels à la surface. Une large gamme de silanes sont disponibles commercialement, avec des fonctions aussi variées que des amines, des thiols, des carboxyles, des époxy, ou encore d'autres fonctions pour des étapes de modifications ultérieures (von Nickisch-Rosenegk et al, 2005). Les étapes de réaction se font tout d'abord par l'hydrolyse du silane puis sa condensation à la surface du verre.

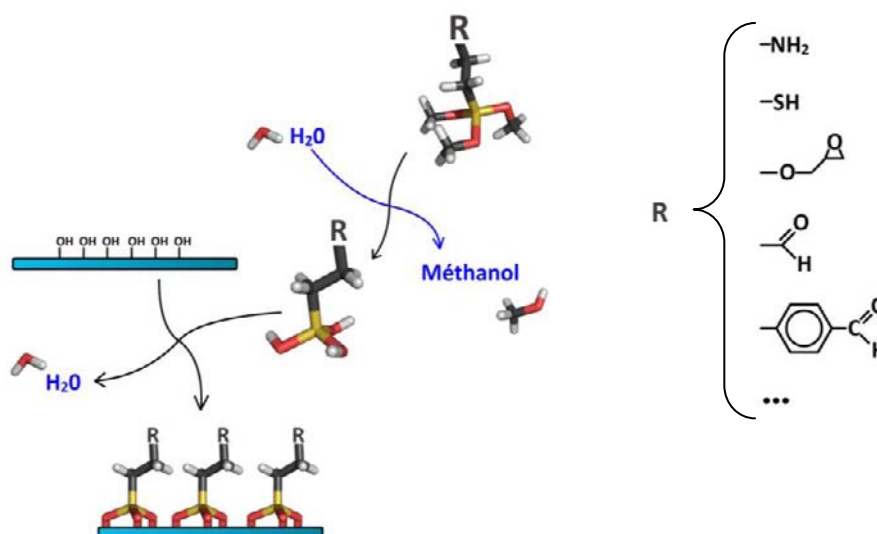


Figure 24 : Voie chimique pour fonctionnaliser une surface de verre activée par un tri-éthoxy-silane.

Les surfaces d'or, outre leurs propriétés de conductivité électrique, sont généralement utilisées pour leur fonctionnalisation par les fonctions thiols (Figure 25) (Love et al, 2005). La chimie de l'interface or/thiol est très bien connue et beaucoup plus facile à contrôler que la chimie des organosilanes. Les thiols sont dissouts dans un solvant pur (en général de l'eau ou de l'éthanol) et appliqués sur la surface d'or propre. Les thiols forment très facilement des monocouches auto-assemblées (Self-Assembled Monolayers ou SAM) (Hodneland et al, 2002) ; cet auto-assemblage dépend fortement de la structure cristalline de la couche de métal sous-jacente.

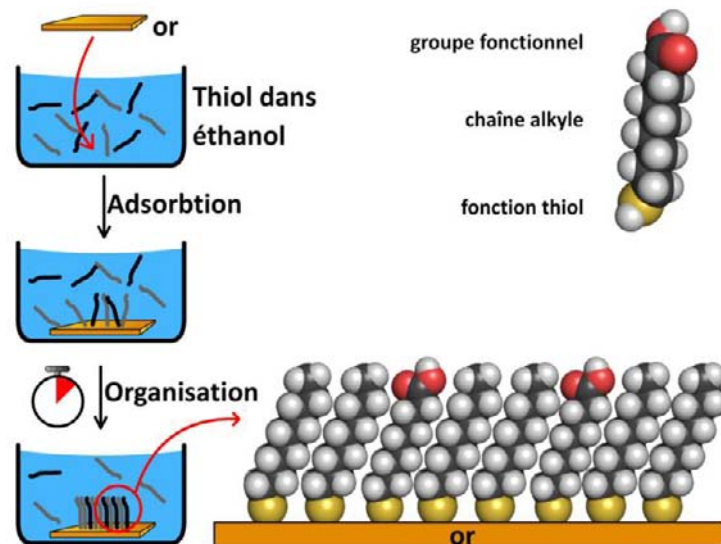


Figure 25 : Auto-assemblage d'une monocouche de molécules (SAM) possédant une fonction thiol sur une surface d'or.

Ces 2 voies de fonctionnalisation sont de loin les plus utilisées, mais ne sont pas les seules. En effet, certaines études décrivent la fonctionnalisation de polymères comme le polydiméthylsiloxane (PDMS) ou le polyacrylamide par exemple (Delamarche et al, 1997; Fixe et al, 2004). Les polymères permettent l'élaboration de matrices 3D fonctionnalisables, avec des modules élastiques variables en fonction du degré de polymérisation. La chimie du PDMS est assez proche de celle du verre, car ce polymère est composé de dérivés du silane.

Une fois les surfaces activées, il convient d'y fixer la protéine d'intérêt. Un des principaux challenges est de fixer de manière spécifique et contrôlée la protéine d'intérêt. En effet, lors de l'application de la solution de protéine sur la surface activée, celle-ci peut s'adsorber de manière non spécifique et aléatoire sur la surface. Cette adsorption est fonction des charges de surfaces, des interactions de type électrostatique et de Van Der Waals, ou par établissement de forces acide-base de Lewis, d'interactions hydrophobes simultanées ou induisant des changements de conformation (Hlady & Buijs, 1996). Ce type de liaisons non spécifiques peut altérer l'efficacité de la fonctionnalisation « active ». Cependant, la sélection du matériel déposé en surface peut réduire cette adsorption non spécifique, notamment en utilisant de l'élastine, de l'agarose, de la cellulose, du polyéthylène glycol, polyvinyle alcool et bien d'autres molécules (Carter, 1965; Lee et al, 2004; Ponten & Stolt, 1980). Une attention particulière doit être prise quant à la stabilité de tels matériels ; par exemple, le polyéthylène glycol a tendance à s'autooxyder avec le temps.

L'attachement direct des protéines à la surface peut aussi créer un encombrement stérique, et ainsi limiter la réactivité de la protéine ou sa capacité d'interagir avec d'autres

molécules. La proximité de la surface peut en plus induire la dénaturation partielle ou totale de la protéine. L'insertion d'espaceur entre la protéine et le groupe réactif peut permettre d'éviter ce biais. Il est maintenant possible de trouver une grande variété d'espaceurs, qui peuvent avoir la longueur que l'on désire, et des propriétés physiques variées : ils peuvent être rigides ou souples, hydrophiles ou hydrophobes, chargés ou neutres... (Rusin et al, 1992)

2. Méthodes d'immobilisation des biomolécules

Les stratégies d'attachement des protéines peuvent largement déterminer les propriétés du matériau final. La fixation peut être orientée ou non orientée, covalente ou non covalente. Nous verrons que le choix de stratégie n'est pas toujours trivial. En effet, la fixation covalente des protéines implique généralement qu'elles soient aléatoirement orientées sur la surface, alors que la fixation non covalente permet souvent d'orienter les protéines. La combinaison des deux (protéine fixée de manière covalente et orientée) requiert la modification des protéines et la mise en œuvre lourde de différentes étapes de chimie, biologie moléculaire et biochimie.

a. Fixation des protéines non orientée

i. Attachement non covalent par adsorption

Les protéines peuvent s'adsorber sur les surfaces par interactions électrostatiques, liaisons ioniques, interactions polaires ou hydrophobes. Les interactions qui vont prédominer dépendront de la protéine et de la surface sur laquelle elle va s'adsorber. Une telle fonctionnalisation aboutira à la formation d'une couche de protéines aléatoirement orientées ; en effet chaque protéine va former individuellement de nouveaux contacts pour minimiser ses interactions répulsives avec la surface et les protéines déjà adsorbées. L'adsorption est surtout utilisée pour les matrices 3D, lesquelles sont imprégnées de solution de protéines. Sur les surfaces d'or, l'adsorption de protéines peut se faire via les résidus cystéines qui possèdent une fonction thiol (Lee et al, 2003; Wilson et al, 2001). Mais une étape supplémentaire de passivation de surface doit être mise en jeu pour recouvrir l'or resté à nu.

ii. Attachement covalent

L'attachement covalent peut se faire par l'intermédiaire des nombreuses fonctions chimiques présentes dans une protéine, au niveau de la chaîne latérale des acides aminés ou des extrémités N- et C-ter de la molécule. Les réactions utilisées pour ces attachements covalents sont aussi variées que le nombre de fonctions des chaînes latérales. Il faut cependant porter attention au fait que l'attachement covalent par ce type de méthode peut

créer des liens à plusieurs endroits dans la même protéine, et ainsi réduire le degré de liberté des conformations de la protéine.

Les 2 principales méthodes d'attachement de protéines par liaisons covalentes non orientées tirent parti de l'abondance des fonctions amines et carboxyles des protéines. Les fonctions amines représentent plus de 10% des groupes présents sur les protéines, et peuvent donc induire, par l'attachement en plusieurs points à la surface de la protéine, une augmentation de la fixation aléatoire de la protéine et une réduction de la flexibilité conformationnelle. La réaction la plus utilisée pour la fonctionnalisation par les fonctions amines est la formation de liaisons peptidiques stables à des fonctions carboxyles activées par le N-hydroxysuccinimide (NHS). L'efficacité de fixation va dépendre de plusieurs paramètres, comme par exemple le pH, la force ionique, la concentration, le temps de réaction, etc. qui doivent être optimisés pour chaque protéine. Cependant, cette réaction est suffisamment stable et réactive pour se faire dans un tampon phosphate standard à pH=7,4 et température ambiante. Une autre réaction très utilisée consiste à utiliser des surfaces recouvertes de groupes aldéhydes, qui réagissent très fortement avec les amines, formant des liaisons imines stabilisées par réduction (Johnsson et al, 1991; Rao et al, 1999; Yam et al, 2006).

Le greffage sur les fonctions carboxyles intrinsèques des protéines peut servir d'alternative à celui sur les fonctions amines. Seuls l'acide aspartique et l'acide glutamique possèdent de telles fonctions parmi l'ensemble des acides aminés, ce qui permet d'éviter l'attachement en de multiples points comme c'est le cas en utilisant les fonctions amines. La même réaction utilisant le NHS peut être utilisée pour fixer les protéines sur des surfaces fonctionnalisées par des NH_2 , mais la fonction carboxyle activée par le NHS, très réactive, présente l'inconvénient de pouvoir réagir avec les lysines très représentées à la surface des protéines et créer ainsi des ponts intra- et intermoléculaires (Fernandez-Lafuente et al, 1993).

Bien que ces 2 voies soient les plus utilisées et les plus simples à mettre en œuvre au laboratoire, il existe d'autres voies de fonctionnalisation, comme le greffage via les résidus cystéines à des surfaces activées par un groupe maléimide, la liaison de résidus aux groupes nucléophiles (NH ou SH) à des surfaces recouvertes de fonctions époxy, ou encore de nombreuses voies chimiques beaucoup plus complexes.

b. Fixation orientée des protéines

La fixation orientée de protéines peut avoir des avantages en facilitant leur activité biologique. Les stratégies développées pour la purification de protéines et la mise au point de colonnes de chromatographie, en particulier pour la rétention de protéines de fusion, ont été adaptées pour immobiliser de manière orientées les protéines sur des surfaces. Pour ce faire, plusieurs caractéristiques des protéines de fusion ont été mises à profit, avec les motifs comme la glutathionne S-transférase (Martzen et al, 1999), l'hexahistidine (Schmitt et al, 1993), l'hexacystéine (Ichihara et al, 2006). Les avantages de telles adsorptions résident dans le contrôle de la spécificité et de la directionnalité de la fixation des protéines sur les substrats.

De nombreuses protéines recombinantes ont un motif hexahistidine introduit par biologie moléculaire à leurs extrémités C-ter ou N-ter, ce qui permet leur purification par immobilisation de manière non covalente sur des surfaces Ni-NTA (Acide NitriloTriAcétique couplé au nickel) (Figure 26) (Gizeli & Glad, 2004; Kato et al, 2005; Schmitt et al, 1993). Le NTA forme un complexe hexagonal avec un ion métallique divalent (le plus souvent, le nickel Ni^{2+}), laissant libre 2 positions au nickel pour interagir avec le motif hexahistidine. La protéine sélectivement fixée sur de telles surfaces est facilement éluée par addition d'éthylènediaminetétraacétate (EDTA) qui complexe les ions Ni^{2+} ou d'imidazole qui vient se substituer aux histidines par compétition. La fixation via la technologie Ni-NTA peut dans certains cas présenter des inconvénients, comme l'adsorption non spécifique de certaines protéines induite par leur affinité aux ions divalents, ou la faible affinité relative du motif hexahistidine au NTA ($K_D=10\mu M$), pouvant parfois engendrer une dissociation non contrôlée (Mammen & al, 1998).

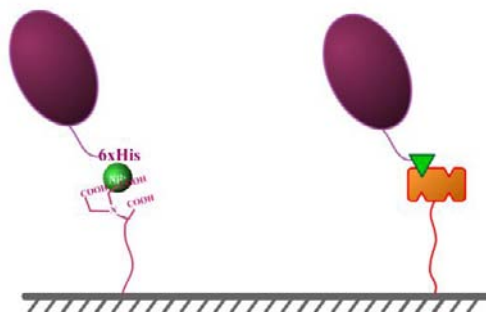


Figure 26 : Deux manières très utilisées pour orienter les protéines sur une surface ; en utilisant un motif hexahistidine permettant l'élué aisée de la protéine ou le couple streptavidine-biotine permettant une liaison très solide de la protéine.

Le motif hexacystéine, introduit grâce aux techniques de biologie moléculaire, peut aussi être utilisé pour fixer de manière orientée et covalente des protéines à des fonctions maléimide ou directement à des surfaces d'or, comme nous l'avons mentionné précédemment. Mais si la protéine exprime à sa surface d'autres cystéines, la liaison peut se faire de manière non spécifique, ce qui restreint donc la méthodologie.

Une autre stratégie très utilisée pour la fixation non covalente est l'utilisation du couple streptavidine (ou avidine) / biotine (PDB 1STP) (Figure 26). La streptavidine est composé de 4 sous unités et chacune peut se lier à une seule biotine. L'affinité de ce couple ligand-récepteur, est très élevée ($K_D=10^{-13}$ - 10^{-15} M) (Green, 1975). Cette fixation, une des plus forte en biologie, est considérée comme presque covalente (durée de vie de plusieurs semaines). Elle est résistante aux conditions extrêmes de pH, de chaleur, de dénaturants et de certaines protéolyses, et est souvent utilisée comme alternative à la fixation orientée et covalente. La fixation de la biotine à une protéine peut se faire par voie chimique, de façon non spécifique avec une biotine-NHS par exemple. Mais la protéine peut aussi être exprimée en C-ter ou N-ter avec la séquence GLNDIFEAQKIEWHE reconnue par biotine ligase (enzyme d'E. Coli qui, en présence d'ATP, reconnaît et lie la biotine sur l'acide aminé souligné) (de Boer et al, 2003).

Nous avons donc vu qu'il est difficile de concilier à la fois liaison orientée et liaison covalente. Pourtant, les protéines, et spécialement les protéines membranaires, sont orientées pour accomplir leurs fonctions biologiques. L'adhésion cellulaire nécessite la résistance à des forces, ainsi que le contrôle du nombre de protéines actives. L'étude de l'adhésion cellulaire a donc besoin d'une méthodologie simple pour fonctionnaliser les surfaces de manière orientée et covalente.

Les systèmes adhésifs cellulaires ne sont pas des surfaces homogènes en protéines, mais celles-ci s'organisent en amas de protéines d'adhésion reliées au cytosquelette. Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules peuvent réagir à un stimulus interne ou externe, et notamment sonder la topographie de leur substrat, leur rigidité, leur anisotropie et bien d'autres caractéristiques. Cette perception de l'environnement peut exercer des effets mesurables sur la dynamique et la fonction cellulaire. Les réponses engendrées par ces signaux physiques peuvent être locales et affecter directement le site d'adhésion, ou globales et activer des voies de signalisation qui régulent des processus cellulaires comme la croissance, la différenciation ou la mort cellulaire programmée. Les mécanismes à la base des signaux engendrés par l'adhésion cellulaire suscitent des questions intéressantes comme : à quelles échelles temporelles et spatiales se produisent ces événements de signalisation ?

Comment les interactions moléculaires diverses sur les sites d'adhésion sont régulées ? Comment les caractéristiques physiques des surfaces adhésives activent des voies de signalisation spécifiques ? Les voies de la physico-chimie décrite précédemment nous donnant de formidables outils pour répondre en partie à ces questions, généralement en les combinant entre elles. Et le contrôle de plus en plus précis de la biofonctionnalisation de surface nous aide à mieux comprendre la perception du micro et nano-environnement des cellules.

Les études combinant la chimie de surface et la biologie cellulaire ou moléculaire ont révélé une très grande sensibilité des cellules aux caractéristiques de leur environnement. Ces caractéristiques incluent à la fois la nature chimique des surfaces adhésives, la distribution spatiale précise et contrôlée du micron au nanomètre des molécules d'adhésion, ainsi que les propriétés physiques des surfaces comme la topographie, la rigidité ou la dimensionnalité.

3. *Chimie et géométrie*

Comme nous l'avons vu précédemment, il est essentiel, dans l'élaboration de surfaces bio-adhésives d'optimiser la spécificité des contacts cellulaires par la passivation des espaces non fonctionnalisés. Les polyéthylènes glycols (PEG) sont les molécules les plus utilisées aujourd'hui. La concentration surfacique moyenne et la densité spatiale des ligands adhésifs sur des surfaces recouvertes de PEG doivent être contrôlées pour promouvoir l'adhésion spécifique de ces ligands. La fixation chimique des ligands adhésifs sur les PEG a aussi été utilisée pour créer des plateformes adhésives (Massia & Hubbell, 1991). Dans ce travail, l'augmentation de densité en surface de peptides Gly-Arg-Gly-Asp-Tyr (GRGDY) est corrélée à la formation de point focaux d'adhésion, au déclenchement de l'étalement cellulaire et à l'activation de signaux de survie. L'utilisation dans cette étude de molécules de PEG fonctionnalisées avec les peptides GRGDY peut présenter l'avantage de la flexibilité des liens permettant l'enrichissement local de ligands. Cette biofonctionnalisation peut cependant être parfois trop flexible, pas assez ordonnée pour permettre l'arrangement adéquat des ligands nécessaire à la structuration de points focaux.

L'organisation des ligands à l'échelle du micromètre peut être réalisée par *micropatterning*. Cette approche consiste à créer des zones couvertes de molécules présentant un espacement régulier de dimensions micrométriques (0,5 μ m à plusieurs dizaines de μ m). Les principales techniques de micropatterning sont le *microcontact printing*, la *photolithographie*, et la *lithographie dip-pen*.

Le microcontact printing (Figure 27) (de la Fuente et al, 2006) est un processus de transfert de matériel d'un tampon en élastomère souple ayant des motifs en reliefs vers un substrat. La zone transférée sera la zone de contact entre le tampon et le substrat. Dans un masque creusé avec les motifs (a) est créé le négatif 3D de ce masque par moulage avec une solution de polydiméthylsiloxane (PDMS) (b) : c'est le tampon. Ce tampon est ensuite incubé avec le matériel d'intérêt (c-d) puis appliqué sur la surface d'intérêt (e). Par un contact très précis et contrôlé, le matériel du tampon est transféré sur la surface (f) et le motif est créé. Le matériel et le substrat peuvent être de différentes natures. La plupart des combinaisons surfaces activées – molécule de fonctionnalisation décrites précédemment peuvent être utilisées pour créer des motifs à toutes les étapes de la biofonctionnalisation. Une attention toute particulière doit cependant être prise durant la stratégie de création de motifs sur les zones de la surface où aucun motif n'a été transféré : elles restent en effet actives et peuvent réagir avec les différents produits que l'on incubera dans la suite de l'expérimentation.

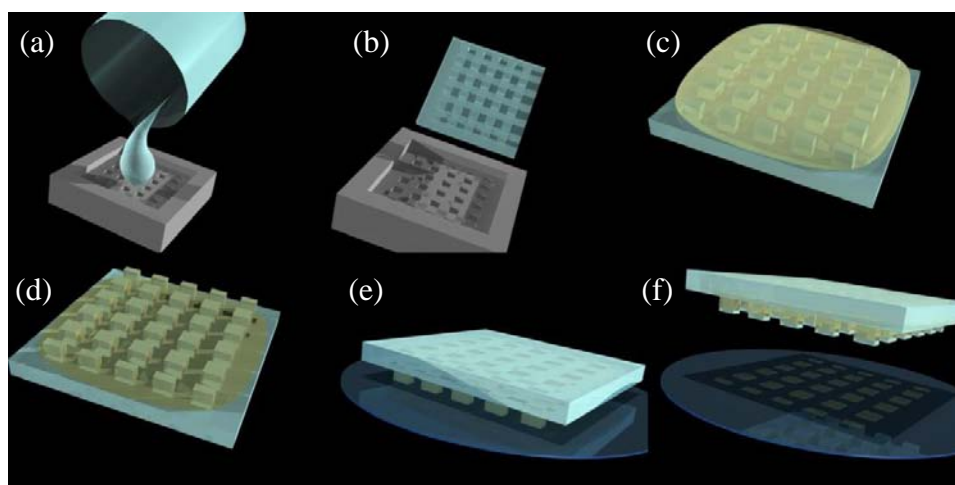


Figure 27 : microcontact printing.

La photolithographie (Figure 28), développée à l'origine pour les matériaux semi-conducteurs, est un procédé pour transférer des motifs géométriques d'un photomasque sur un substrat par irradiation UV. Le substrat est recouvert d'une couche photosensible (a) puis irradié par une lampe UV à travers un photomasque (b).

La couche photosensible, après exposition aux radiations, peut voir sa composition chimique modifiée ; elle peut devenir alors soluble et être éliminée. On obtient ainsi le transfert des motifs du masque (c) sur le substrat. Le substrat peut ensuite être activé et le matériel d'intérêt greffé (d-e). L'élimination du reste de la couche photosensible conduit à la création de motifs du matériel d'intérêt sur le substrat (f).

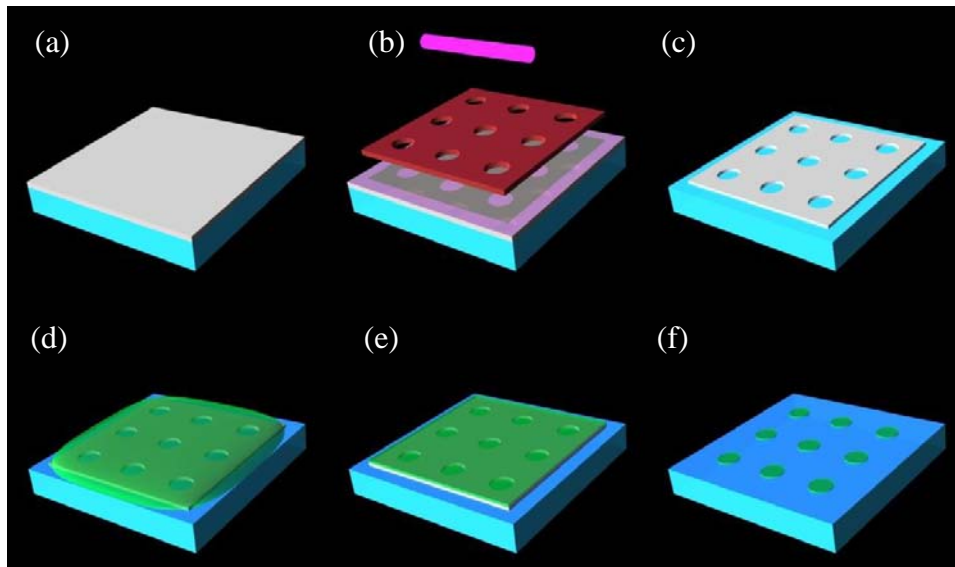


Figure 28 : photolithographie.

La lithographie dip-pen (Figure 29) est une technique dérivée de la microscopie à force atomique (AFM). En effet, la pointe de l'AFM (plume), d'abord immergée dans la solution d'intérêt (encre), est ensuite mise en contact avec le substrat (papier). Cette technique permet, par le contrôle du mouvement de la pointe d'AFM, de « dessiner » le motif géométrique désiré. Elle met à profit la formation du ménisque entre la pointe de l'AFM et le substrat lors de l'écriture, qui a pour effet de concentrer la molécule d'intérêt et d'accélérer son transfert.

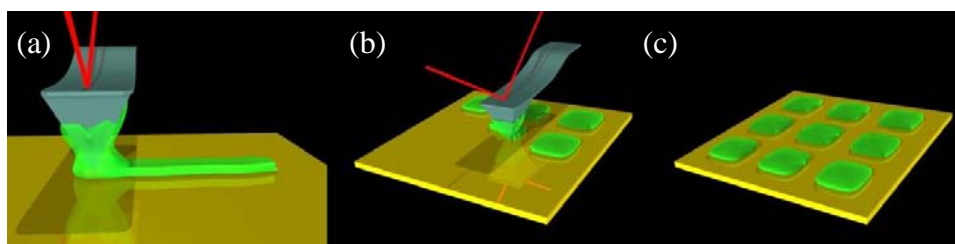


Figure 29 : lithographie dip-pen.

Les travaux très élégants développés depuis de nombreuses années dans le groupe de G. M. Whitesides sur le greffage de protéines de la MEC ont permis, en collaboration avec D. Ingber des avancées importantes dans la compréhension des relations cellule-MEC. Dans une étude récente, le greffage de la fibronectine a été réalisé par microcontact printing sous forme d'îlots de tailles et d'espacements différents (Xia et al, 2008). Ces îlots, circulaires ou ellipsoïdaux, ont des tailles allant de 1µm à 8µm, et des espacements de 1µm, 3µm ou 4,5µm. Cet arrangement a été conçu pour tester si le positionnement spatial des points focaux

gouverne la directionnalité d'étalement et de migration cellulaire. Des fibroblastes de souris (NIH 3T3) ont ensuite été ensemencés sur les différents substrats : l'alignement cellulaire est contrôlé par l'arrangement des filaments d'actine et la vinculine suit aussi la forme et la répétition de ces îlots (Figure 30). L'alignement des cellules a été observé dès 50 min, alors que les effets sur l'élongation proprement dite ne sont observables qu'après 8 h d'incubation. Ces travaux suggèrent que le mouvement cellulaire directionnel peut être contrôlé par un mécanisme qui implique des interactions physiques locales et globales entre cellule et MEC. La composition chimique des points focaux est différente dans les différents endroits à travers la cellule : la vinculine est distribuée de façon relativement uniforme tandis que d'autres molécules comme Rac activé ne sont présentes que dans les points focaux périphériques.

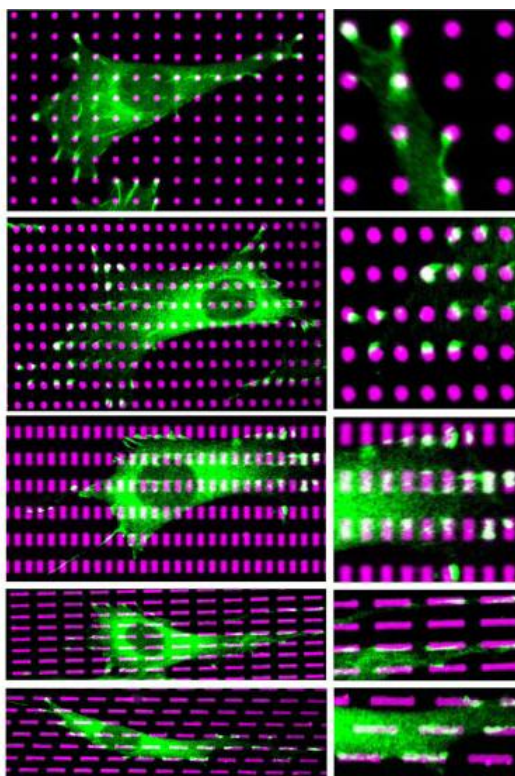


Figure 30: Epifluorescence de fibroblastes de souris NIH 3T3 cultivés 8 heures sur différents îlots de fibronectine-rhodamine (magenta). Les interactions entre le cytosquelette et intégrines sont marquées par des anticorps anti-vinculine fluorescents (vert). Inserts : agrandissements montrant la colocalisation de la vinculine et de la fibronectine-rhodamine (en blanc), et correspondant aux images de gauche.

Même si le micropatterning fournit de précieuses informations pour rendre compte de l'importance de la géométrie de la MEC, un contrôle plus précis des distances inter ligands dans une gamme de 20 à 200 nm est nécessaire pour mimer les échelles de longueurs retrouvées dans les structures adhésives. Un tel contrôle est désormais possible grâce au développement incessant ces dernières années des nanoparticules.

Pour obtenir une résolution nanométrique, Spatz et ses collaborateurs ont mis au point une méthode de nanolithographie utilisant des micelles de copolymères diblocs avec un coeur de nanoparticules métalliques (généralement de l'or) de 1 à 15 nm de diamètre. Ce procédé permet l'organisation très régulière, contrôlée, des nanoparticules avec des distances inter-particules ajustables entre 30 et 160 nm imposées par la longueur des copolymères. Ces surfaces ont été préparées avec l'objectif d'évaluer l'importance de l'organisation 2D des ancrages entre cellule et MEC. Les nanoparticules ont été fonctionnalisées avec des peptides adhésifs (RGDFK-thiols, par exemple). La culture de fibroblastes sur de telles surfaces indique que les cellules sont sensibles à la variation de distance. Les cellules s'étalent, se multiplient et adoptent un phénotype faiblement migratoire lorsque la densité de ligands est élevée et ce jusqu'à des distances entre nanoparticules $< 58\text{nm}$; elles ne s'étalent que faiblement, migrent rapidement et aléatoirement, et éventuellement entrent en apoptose pour des distances interparticulaires $> 73\text{nm}$. Ceci suggère qu'une organisation spatiale du réseau de molécules de MEC et d'intégrines est essentielle pour la structuration du cytosquelette et des molécules associées à la signalisation via les intégrines. Les réponses cellulaires sont différentes sur des surfaces fonctionnalisées par des cadhérines, pour lesquelles l'adhésion linéairement décroissante a été corrélée avec un espacement croissant des molécules de N-cadhérine, ce qui suggère des mécanismes de transduction de signaux distincts pour ces différents systèmes adhésifs (Wolfram et al, 2008).

OBJECTIF DU TRAVAIL

L'adhérence cellulaire gouverne la morphogenèse et l'intégrité des tissus biologiques, ainsi que la communication entre les cellules et leur environnement. Une dérégulation de cette adhérence peut avoir de lourdes conséquences pour l'organisme et conduire à de nombreuses pathologies, et en particulier à l'apparition de cellules cancéreuses. L'adhérence nécessite donc une régulation fine, très précise. Les premiers acteurs de cette régulation sont les récepteurs adhésifs qui, comme nous l'avons vu, sont constitués de 4 familles principales. Dans ce travail, nous avons centré notre intérêt sur les cadhérines.

Les cadhérines ont été découvertes, il y a une trentaine d'années. De nombreuses études utilisant des approches diverses (invalidation de gènes, patrons d'expression *in vivo*, biologie moléculaire, biochimie, immunologie, biophysique, études structurales, étude cellulaire de l'adhésion, suivi par vidéo-microscopie de protéines fluorescentes,...) ont permis des avancées notables dans le domaine. Leurs rôles essentiels en biologie et notamment leur importance dans le développement embryonnaire et la signalisation intracellulaire sont maintenant bien reconnus. Néanmoins de très nombreux points restent à éclaircir comme la façon dont elles établissent des interactions spécifiques, dont ces interactions participent à la mécanotransduction de signaux, ou enfin la nature de la signification biologique de la diversité des membres de cette famille de protéines.

Pour étudier les cadhérines et leur mode d'association et de fonctionnement, nous avons fait le choix de nous focaliser sur la E-cadhérine et la cadhérine-11, utilisées respectivement comme prototypes des cadhérines classiques de type I et II. La E-cadhérine joue un rôle pivot dans la formation et le maintien des structures épithéliales ; la cadhérine-11, considérée comme un récepteur adhésif mésenchymateux, est retrouvée sur les cellules dérivées du mésoderme (ostéoblastes, neurones,..) et son expression est corrélée avec la migration cellulaire et la formation de nouvelles structures.

Mon travail de thèse a pour objectif premier d'étudier, à l'échelle **unimoléculaire**, la **dynamique** de l'échange de brin β entre cadhérines ; plus précisément j'ai cherché à identifier les éléments clés structuraux qui différencient l'établissement de l'interface adhésive des cadhérines de type I et II. Pour mieux appréhender le rôle de ces molécules dans la mécanotransduction du signal et la dynamique de formation des points de contacts, le deuxième objectif a été de réaliser des surfaces biomimétiques.

Ce travail a été centré sur les deux modules les plus externes dans le segment extracellulaire des cadhérines, qui sont le siège du premier contact physique lors de l'interaction entre ces molécules. Nous avons utilisé des fragments extracellulaires de la E-cadhérine (E/EC1-2) et de la cadhérine-11 (11/EC12) pour étudier les paramètres physico-chimiques de l'interaction par l'utilisation d'une **chambre à flux laminaire**.

Dans une première partie, sont d'abord présentés les résultats obtenus sur le fragment E/EC1-2, ainsi que sur un fragment présentant une mutation ponctuelle sur le Tryptophane2 (E/W2A) et sur la T-cadhérine (T/EC12). La très grande sensibilité de cette méthode a permis de mettre en évidence à l'échelle unimoléculaire la complexité de l'échange de brin β au niveau cinétique. Le rôle de catalyseur joué par le Tryptophane2 a été mis en avant, à la fois dans la formation et dans la stabilité de cette interface adhésive. Nous avons caractérisé pour la première fois un intermédiaire réactionnel de cette interaction qui nous a conduit à proposer un mécanisme moléculaire pour rendre compte de la dynamique de formation des jonctions (Article I). L'analyse du comportement de la cadhérine-11 par cette même approche a permis de révéler que les processus de formation de l'échange de domaine sont fondamentalement différents entre cadhérines de type I et II (Article II). Ces différences dans les mécanismes adhésifs sont très probablement à relier aux fonctionnalités biologiques différentes de ces molécules.

Dans une deuxième partie, je présenterai le travail concernant le greffage des fragments de protéines sur des surfaces de verre pour répondre aux exigences d'une biomimétisation optimisée. Ce travail de chimie de surface a conduit à la mise au point d'un protocole de greffage des protéines portant une étiquette hexahistidine de façon orientée **et** covalente (Article III). L'intérêt de l'utilisation de surfaces modèle dans le décryptage des voies de signalisation initiées en surface par les cadhérines est relaté dans une synthèse bibliographique avec la mise en évidence de l'activation de Stat3 par des surfaces décorées par des fragments EC12 de cadhérines.

**ARTICLE I : TRYPTOPHAN 2: THE CADHERIN FEELER,
FINDING THE WAY FOR THE *TRANS* INTERACTION**

Pour progresser dans la compréhension des mécanismes moléculaires de l'adhésion des cadhérines, nous avons choisi d'étudier les paramètres cinétiques de cette interaction à l'échelle de la molécule unique.

Nous avons dans ce travail concentré notre intérêt sur un acide aminé situé à l'extrémité N-ter du domaine EC1, le Trp2. Ce résidu est conservé au niveau de toutes les cadhérines classiques de type I et II ainsi que les cadhérines desmosomales. Son rôle dans l'activité adhésive semble être particulièrement important. En effet, la mutation du Trp2 en Ala abolit l'activité adhésive des cadhérines au niveau cellulaire (Tamura et al, 1998b) ainsi que sur les protéines isolées (Perret et al, 2002b; Pertz et al, 1999a). De plus, l'ajout d'un analogue de la chaîne latérale du Trp, l'I3A, inhibe l'adhésion à la fois au niveau cellulaire (Tamura et al, 1998b) et sur des protéines purifiées (Perret et al, 2002b). Enfin, *in vivo*, la mutation du Trp2 sur la N-cadhérine conduit, chez le poisson zèbre, à un développement anormal de l'embryon (Malicki et al, 2003).

Les données structurales mettent en évidence l'importance de cet acide aminé dans le fonctionnement moléculaire des cadhérines. Dans ces études, la chaîne latérale du Trp2 vient se loger dans une poche hydrophobe formée en particulier par l'alanine 80 du motif HAV (Histidine - Alanine - Valine) au niveau du domaine EC1. Cependant deux types de positionnement ont été observés : soit un ancrage intramoléculaire, soit un ancrage réciproque dans la cavité hydrophobe de la molécule partenaire. Le Trp2 participe ici directement à l'interaction adhésive et à l'échange de brin β . La façon dont cet acide aminé est impliqué dans l'interaction adhésive reste donc encore imprécise, et c'est ce point que nous avons essayé de clarifier dans le travail qui suit.

Pour ce faire, nous avons utilisé la chambre à flux laminaire qui s'est déjà révélée comme un outil puissant pour étudier les interactions dynamiques des cadhérines (Perret et al, 2002a; Pierres et al, 1998b). En chambre de flux, méthode développée indépendamment par T. Springer et P. Bongrand, les protéines nécessitent d'être fixées sur des surfaces modèles : des billes et la surface constituant le fond de la chambre (Pierres et al, 1998a). Cette condition présentait un double avantage dans le cas particulier des cadhérines. D'une part, le fait d'avoir des protéines fixées sur des surfaces permet de contourner la difficulté posée par l'éventualité d'homoassociation en solution. D'autre part, ces protéines sont transmembranaires, nous nous

plaçons donc dans des conditions similaires à celles du contexte biologique. Les deux surfaces sont ensuite amenées en contact à l'aide d'un faible écoulement laminaire. Ce système minimaliste recrée l'approche de deux cellules exprimant des cadhérines à leur surface, tout en éliminant pour le moment les paramètres non contrôlables (tels que le nombre de molécules impliquées, la formation de plaque, le cytosquelette d'actine, les mouvements membranaires, ...).

Ces billes sont ensuite injectées dans la chambre aux dimensions millimétriques. Le flux est laminaire et l'on peut donc corréler la vitesse des billes avec leur hauteur dans la chambre. A proximité du fond de la chambre seront les billes les moins rapides, c'est à dire celles susceptibles d'interagir avec la paroi. L'analyse des trajectoires de ces billes nous renseigne sur les propriétés dynamiques de l'interaction cadhérines. En effet, la fréquence d'arrêt est directement proportionnelle à l'association (k_{on}) de l'interaction (Pierres et al, 1998b). La durée des arrêts des billes nous permet de caractériser la dissociation (k_{off}) de l'interaction; enfin la variation de la vitesse du flux permet de faire varier la tension appliquée sur la liaison et ainsi la détermination du spectre de force de l'interaction (Perret et al., 2002). De plus, en diminuant suffisamment la densité de protéine sur la lame de mica, il est possible de mesurer des interactions à l'échelle de la molécule unique.

Nous verrons dans le travail suivant que cette méthode est suffisamment performante pour sonder l'influence d'un seul acide aminé. Dans ce manuscrit, nous avons comparé les dynamiques d'adhésion des fragments sauvages de E-cadhérine (E/EC12) avec les mêmes fragments dont le Trp2 a été muté en Ala (E/W2A). Nous montrons ainsi que le Trp2 favorise non seulement la stabilité mais aussi l'initiation de l'interaction entre cadhérines, en agissant sur la formation des contacts. Le confinement de ces deux protéines recombinantes sur l'une ou l'autre surface dans la chambre a permis l'analyse d'interactions hétérophiles : ici le Trp2 et la poche hydrophobe sont présents sur une surface et la surface opposée ne possède que la poche hydrophobe. Nous avons mis en évidence, par ces expériences, un intermédiaire réactionnel dont les propriétés dépendent de la molécule initiatrice de l'échange de brin. Enfin, cette interaction asymétrique analysée sur des contacts bille-cellule renforce cette observation : ces mêmes billes recouvertes du fragment E/EC12 sont rapidement internalisées par des cellules exprimant la E-cadhérine, alors que le fragment E/W2A, par la seule différence sur le Trp2, permet une immobilisation mais n'induit aucun recrutement membranaire.

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

**Sébastien Chevalier[§], Olivier Courjean[§], Emilie Perret¹, Pierre Bongrand²,
Hélène Feracci***

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

¹Present address: INSERM U854, Hôpital Bicêtre, 80 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-
Bicêtre, France

²INSERM UMR 600-CNRS UMR 6212, 163, avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09, France

*Corresponding author

[§]These authors contributed equally to this work

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 maintenance of adult structures. Classical cadherins are plasma membrane receptors that mediate cell-cell adhesion through homophilic Ca^{2+} -dependent interactions (Nollet et al, 2000; Takeichi, 1988b). 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) separated by interdomain Ca^{2+} binding sites (Courjean et al, 2008) 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 anchoring to the actin cytoskeleton via α , β and p120 catenins and in the clustering of surface cadherins to form junctional structures. This association is the starting point of intracellular signalling (Gumbiner, 2005; Ozawa et al, 1989; Raptis et al, 2009; Reynolds et al, 1994; Shibamoto et al, 1995; Takeichi, 1990; Yap & Kovacs, 2003).

Cadherins biological properties rely at least in part on the extracellular segment where the first events of protein interactions take place. Structural studies of the extracellular cadherin segment as well as sequence alignments indicate that each individual repeat EC is composed of seven anti-parallel β -strands arranged as two opposing sheets (Patel et al, 2003a). 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 (Boggon et al, 2002; Haussinger et al, 2004; Shapiro et al, 1995). Other studies suggest that strong adhesion could only be produced by more extensive interactions along the extracellular arms (Bayas et al, 2006; Perret et al, 2004).

Much effort has been spent to reveal the atomic details of cadherins adhesive interactions. But despite numerous structural data, the adhesive interface corresponding to the cadherin trans interaction was for long 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, 1996; Pertz et al, 1999b). More 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 then observed between E-cadherin two EC12 fragments by x-ray crystallography and NMR (Haussinger et al, 2004) (Figure 1a). A definitive biological interpretation is difficult because crystal-packing forces are of similar size or even larger than the weak physiological interactions.

Numerous lines of evidence support the idea that the outermost cadherin module is essential in mediating the adhesion between cadherin molecules (Chappuis-Flament et al, 2001; Harrison et al, 2005a; Shan et al, 1999; Tomschy et al, 1996; Zhang et al, 2009). Some highly conserved residues of the EC1 modules of classical cadherins are essential for adhesive function (Fig 2). In particular, replacement of Trp2 with Ala (W2A) or Ala80 with Ile abrogates the cadherin adhesive capacity at the cell surface (Noe et al, 1999; Pertz et al, 1999b; Tamura et al, 1998a). 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, 1998a) where the Trp2 docks into. 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, 2005).

Flow chamber measurements have proven to be valuable tools for resolving dynamic parameters of receptor-ligand interactions (Pierres et al, 2002; Robert et al, 2007). In an attempt to dissect the cadherin-based adhesive interactions, we have recently used this methodology to determine the overall adhesive properties of the extracellular cadherin segment (Perret et al, 2002a; Pierres et al, 1998b; Pierres et al, 2007). 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 the dynamics of the β -strand exchange of the E/EC12 fragment at the single molecule level. By comparison, we also probed the behaviour of a recombinant protein bearing a Trp2 to Ala2 point mutation as well as of a T/EC12 where the Trp2 is not conserved on the wild-type protein. 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 i) provide a mechanism for the involvement of Trp2, which acts as a feeler, in the cadherin trans interaction, ii) suggest that we have for the first time revealed a reaction intermediate involving only the strand of one molecule, iii) the strand of the second molecule appears to be necessary to fully accomplish the adhesive contacts, as documented by cell-beads

interactions. Our results also provide new detailed insights into the dynamics involved in regulating epithelial cell-cell adhesion.

Materials and Methods

Plasmid constructs

Cloning of the MIEGR-E/EC12 has been already described (Courjean et al., 2008). The construct coding for the cleavable protein MIEGR-E/W2A, which corresponds to MIEGR-E/EC12 mutated in W2A, was realized using the same strategy. First, an intermediate construct was obtained by cloning the first part of the sequence coding for HisXa-ECAD12W2A, kindly provided by Thomas Ahrens and J. Engel (Haussinger et al. 2004). DNA fragments were cloned from pET19b (HisXa-ECAD12W2A) plasmid into the pET24a (M-E/W2A) plasmid (Perret et al., 2002), using the BglII / EcorI sites and resulting in sequences coding for HisXa-E/W2A, fused with the histidine tag in C-terminal position. Then the fragments coding MIEGR-E/W2A was cloned from the previous plasmid 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

The E-cadherin fragments used in this study are displayed on Figure 2a. For MIEGR-E/EC12 and MIEGR-E/W2A chimeric proteins purification, Terrific Broth media cultures of 500 ml containing 50µg/ml kanamycin were inoculated with transformed colonies picked up from agar plates. Expression was induced by the addition of IPTG, then 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 fusion proteins were purified by affinity chromatography of crude bacterial lysates on Ni²⁺-NTA Superflow (Qiagen), followed by extensive dialysis to remove imidazole. Cadherin fragments were eluted with 0.25M imidazole. These constructs produced two proteins with a factor Xa protease site (Ile-Glu-Gly-Arg) directly before the N-terminus sequence. Cleavage of these fusion proteins with the Factor Xa protease yielded proteins with the correct N terminus. Factor Xa protease digestion of 1mg of MIEGR-E/EC12-His or MIEGR-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). The cleaved fragments were then dialysed against Tris 20mM, NaCl 150mM pH8 using Amicon Ultra 15, cut off 10kDa (Millipore) in order to remove Ca²⁺ ions and the cleaved peptide. The resultant proteins were named E/EC12 and E/W2A respectively. A Cter hexahistidine tagged recombinant protein corresponding to the outermost T-cadherin domains T/EC12 was kindly provided by L. Shapiro and B. Honig (Posy et al, 2008).

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 as described (Perret et al, 2002a), and mass spectrometry.

Circular Dichroism

Circular dichroism spectra were recorded at 20 °C in a solution containing 20 mM Hepes and 150 mM NaCl (pH 7), using a Jasco 810 spectropolarimeter with quartz cells with a path length of 0.2 mm. The protein concentration was 1.2 mg/mL. Spectroscopic studies of structural modifications were performed by adding aliquots of a Ca²⁺ stock solution to the Ca²⁺-depleted protein, to a final Ca²⁺ concentration of 1 mM. Spectra were recorded by subtracting the background due to the buffer signal.

Mass Spectrometry

ESI-ToF mass spectrometry was performed on a Waters LCT Premier instrument in the positive mode. 20µL of a 20µM cadherin solution was extensively washed in a Trifluoroacetic acid (TFA) 0.1% in water and then directly injected in the mass spectrometer.

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 (~ 8.10⁸ beads/ml) at 37°C for 30 min with 10 µg of biotinylated rat anti-mouse Ig mAb (Pharmingen) then with 10µg of mouse anti-histidine mAb (clone His-1, Sigma). Finally

beads were incubated with the recombinant E/EC12, E/W2A or T/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 NiCl₂ (Sigma) for 1 min. Cadherin fragments were diluted to the desired coating concentration in binding buffer (Hepes-NaCl) and deposited on each mica surfaces for 1h at RT. Surfaces were then washed with Hepes-NaCl. Before use in laminar flow assays, beads and slides were incubated for 15min with 1mM CaCl₂ in Hepes-NaCl. Experiments were performed in Hepes-NaCl, with 1mM CaCl₂, BSA 0.2% at RT.

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 previously (Perret et al, 2002a). 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 mm³ (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 $\Delta x_{arrested}$ is limited in a range tighter than the dimension of the particle. This assumption was verified experimentally (Figure 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: $\Delta x_{arrested} < \Delta x_{moving}$.

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 (Figure 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 (Figure 3). When the wall shear rate was of order of $8-10 \text{ s}^{-1}$, 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 $d_t = d_a + 17 \text{ ms}$.

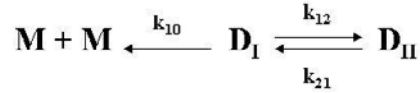
Although we can observe arrests with apparent duration (d_a) of 20ms, many of them are not detected. We chose to only retain arrests $d_a \geq 40\text{ms}$. By doing so, we obtained a very limited underestimation of the number of short arrests.

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 $d_t \geq 57$ 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 classes. 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.

Cell-bead adhesion assays

The normal mouse mammary epithelial cell line HC11 has been described (Wojcik et al, 2006) and was kindly provided by Dr. L. Raptis (Kingston, ON Canada). These cells were used to assay the cadherin-coated beads adhesion with cells. Beads were coated with either E/EC12 cadherin fragment or E/W2A cadherin fragment, as described in the previous section. Cells were seeded on glass coverslips in 24-well tissue-culture test plates (10^5 cells/well) overnight, in RPMI (Gibco) supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin G, and 100 mg/ml streptomycin, insulin, EGF. Cell culture was conducted at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air.

To perform beads/cells adhesion assays, $\sim 5 \cdot 10^5$ beads were added on cells in $800 \mu\text{L}$ in RPMI and incubated for 40 min at 37°C under 5% CO_2 . Cells were then gently washed with 0.1 M Na cacodylate pH 7.4 under pipette outflow and fixed with 2.5% glutaraldehyde (Sigma) in cacodylate buffer for 90 min at 4°C . Samples were then treated with 1% osmium tetroxide, 1% tannic acid then dehydrated with a series of graded methanol/water baths, stained in 2% uranyl acetate in 70% methanol before critical-point drying with HMDS. The samples were sputter coated with gold and observed with a Jeol JSM 6700F Field Emission Scanning Electron Microscope operated at 5 kV.

Results

We previously showed using a flow chamber device that the E-cadherin two outermost modules (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, 2002a). The cadherin fragments used in this study were expressed in E.Coli, thus had an additional Met residue at the N-ter end. However cadherin homophilic interaction strongly depends on a salt bridge between Glu89 and the N-ter end (Harrison et al, 2005b; Posy et al, 2008). This 1-2 second interaction and an additional one of 0.1 second were characterized using the biomembrane force probe (Perret et al, 2004). To specifically assess the influence of the Trp2 in the formation of the β -strand exchange, our approach was to probe cadherin fragments with a native Nter end, and modify the arrest definition resulting in a better detection of short arrests.

Characterisation of the cadherin fragments

In order to remove the additional Nter methionine that potentially perturbs the establishment of the β -strand exchange, we introduced the sequence IEGR (Factor Xa) at the N-terminal end (figure 2a). This sequence is specifically recognized and cleaved by the Factor Xa Protease, providing cadherin fragments with no spare amino acid. The correct processing was checked by mass spectrometry (figure 2b). Theoretical masses for both E/EC12 and E/W2A fragments were calculated using the ProtParam tool from the ExPaSy web site (www.expasy.ch) and found to be respectively 25177,0 Da and 25061,9 Da. The experimental mass values obtained for E/EC12 and for E/W2A fragments were 25176 Da and 25061 Da, respectively indicating that the amino acid sequence was correct and that the Nter end was similar to the wild type proteins.

Circular dichroism was used to probe the folding of cadherin fragments. As shown in figure 2c, E/EC12 as well as E/W2A exhibited spectra characteristics of correct cadherin folding. The mean molar residue ellipticity of both apoproteins changed when 1mM Ca^{2+} was added to the protein solutions (Courjean et al, 2008). These data indicated that the W2A point mutation did not modify the folding of the E/W2A fragment.

An optimised Flow Chamber device to detect short arrests

The interest of the flow chamber 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. 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 the fact that our interest was on a single residue, i.e Trp2. More precisely, our goal was to detect arrests as brief as possible. With this perspective, the main difficulty was 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 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 cadherin fragments. We could easily distinguish arrested particles due to a cadherin interaction with the mica surface, which displacement is limited, from free particles. 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, 1998b). 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 3, binding frequency between beads and mica both coated with E/EC12 was higher than between E/W2A or T/EC12, two proteins that do not bear a Trp2 even though binding frequencies of E/W2A and T/EC12 were significantly above the background level at low (2pN) force. These frequencies were sensitive to force, as expected. When force on the interaction increased, binding frequency decreased from $0.023 \mu\text{m}^{-1}$ at 2pN to $0.001 \mu\text{m}^{-1}$ at 13pN. By comparison, binding frequency of E/W2A was $0.011 \mu\text{m}^{-1}$ at 2pN and $0.001 \mu\text{m}^{-1}$ à 6-7pN; binding frequency of T/EC12 was $0.01 \mu\text{m}^{-1}$ at 2pN and $0.0015 \mu\text{m}^{-1}$ à 4pN . These data showed that Trp2 is directly involved in binding formation, at the molecular level. These results indicated that the Trp2 clearly enhanced the formation of cadherin trans 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 3b, trans interaction between E/EC12 fragments appeared to be more stable than between E/W2A and T/EC12. These data revealed that the Trp2 is directly involved in the stability of cadherin interaction, which is consistent with structural and biological data.

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 3b 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 and coll. (2002). Indeed, due to the improvement of sensitivity of detection used in the present work, 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), and the arguments are given in the Discussion section.

Mechanism of interaction between cadherin extracellular fragments

According to recent structural studies, 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-ter strand is able to exchange 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 bound states process was necessary to account for the dissociation of the dimer.

The question was then to know whether the establishment of the adhesive interface between two cadherin molecules is sequential (that is initiated by only one molecule) or whether this process needs a simultaneous coordination of both molecules (both in an active, “open” conformation, with the Trp2 exposed to the solvent). We made use of the flow chamber method to probe these hypotheses by confining the recombinant proteins, E/EC12 or E/W2A, in one surface or the other and then analyzed the heterophilic interaction under both configurations. Because the protein density is 50-100 times much higher on the beads (6900 molecules/ μm^2) than on the mica (50-100 molecule/ μm^2) surfaces (Perret et al, 2002a), the occurrence of proteins exhibiting an “active configuration” will be higher on the beads than on the mica (Chen et al, 2005).

As illustrated on Figure 4a, the formation of a heterodimer by a simultaneous process requires active monomers on both surfaces, and would be characterized by a unique binding frequency; this frequency should likely be intermediate between frequencies obtained for homophilic configurations (E/EC12 vs E/EC12 and E/W2A vs E/W2A). By contrast, a sequential process will rely on the reaction pathway followed by the interacting molecules, that is on the cadherin fragment that will initiate the interaction; due to the experimental setup, the protein on the bead will much likely initiate the interaction. Nonetheless either simultaneous or sequential pathway leads to the same heterodimer adhesive interface, which obviously will exhibit the same stability.

Experimental measurements presented in figure 4b clearly showed that the cadherin interaction is a sequential process. More precisely, binding frequencies measured for homodimers and heterodimers configurations clearly depended on which protein was on the beads. Unexpectedly stability of heterodimers (figure 4c) was not the same but also depended on the protein present on the bead, which most probably initiates the interaction. Taken together, our results provided new insights for a detailed mechanism of cadherin trans interaction. When molecules from two opposite surfaces are close enough, one molecule in an

active state, initiates the β -strand exchange following a sequential mechanism. The Trp2 together with other amino acids such as the residues forming the hydrophobic pocket are directly involved in this binding initiation. Moreover, these data characterized for the first time an intermediate state involving the β -strand of *only one* cadherin along the energy landscape described by Chen (Chen et al, 2005) from monomers to dimer formation.

To further probe the role of the Trp2 in this interaction, these beads decorated with E/EC12 or E/W2A fragments were incubated with HC11 cells expressing E-cadherin on the plasma membrane and assayed for binding activity by scanning electron microscopy (figure 5). After 40 min of incubation, both types of beads appeared associated with cell membranes. Interestingly, 90% of E/EC12 beads appeared internalized by HC11 cells (figure 5a-c), while 90% of E/W2A decorated beads were associated with cell surface through membrane protrusions with no internalization (figure 5d-e).

Discussion

The purpose of this study was to clarify the molecular mechanism of cadherin interaction. As described by structural data, the adhesive interface is achieved by domain swapping and more precisely the N-terminal β -strand exchange. However little information is available concerning the molecular mechanism of the dynamic of this swapping. The Trp2, a conserved residue among classical and desmosomal cadherins, is essential for cadherin adhesive interaction. This is illustrated by cellular adhesion and molecular interaction experiments (Harrison et al, 2005a; Harrison et al, 2005b; Malicki et al, 2003; Perret et al, 2002a; Prakasam et al, 2006a; Troyanovsky et al, 2003), and its central role in binding interface is suggested by x-ray crystallography and NMR studies (Boggon et al, 2002; Haussinger et al, 2004; Parisini et al, 2007; Tamura et al, 1998a). Other residues of the EC1 domain that are conserved amongst classical type I cadherins, have also been identified as key elements of the β -strand exchange (Posy et al, 2008). Altogether these observations raise the question of how cadherin interactions are preferentially homophilic. In order to investigate further this process, we focused on the involvement of the Trp2 in the kinetic properties of the E-cadherin interaction. Three recombinant proteins: i) the wild-type E/EC12 fragment, ii) its domain pair including the point mutation W2A (E/W2A), iii) the T/EC12 fragment, corresponding to the T-cadherin outermost modules of which the wild-type sequence does not have Trp2 (Posy et al, 2008), were probed, resulting in qualitative and quantitative information on the molecular mechanism.

A relevant mechanism

Previous studies, using the flow chamber technique, clearly show the ability to probe single-molecule binding kinetics between cadherin-11 (Pierres et al, 1998b), C-cadherin (Pierres et al, 2007) and E-cadherin fragments (Perret et al, 2002a). In this work, the off-rate of E/EC12 interaction is determined (0.5 s^{-1}), further validated by NMR data (Haussinger et al, 2004). However, biomembrane force probe studies reveal an additional interaction (off-rate 10 s^{-1}) on this fragment (Perret et al, 2004). Thanks to 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, as already suspected by considering biomembrane force probe data (Perret et al, 2004).

Numerous studies have been performed in order to describe the adhesive cadherin interaction (Patel et al, 2003b; van Roy & Berx, 2008). Most data using different approaches suggest that cadherin trans interaction between EC1 domains is achieved by a unique binding interface that involves the Trp2 (Boggon et al, 2002; Haussinger et al, 2004; Parisini et al, 2007; Troyanovsky et al, 2003; Zhang et al, 2009). According to structural and kinetics parameters data, Chen et al. (2005) suggested a mechanism describing general domain swapping properties for the cadherin interaction (Chen et al, 2005). Briefly, intramolecular configuration of the N-ter β -strand, including the Trp2 docking in a hydrophobic pocket, stabilizes the monomeric state in a “close” conformation. This conformation acts as a competitor of dimer formation, resulting in weak binding affinity ($K_D = 0.72 \text{ mM}$) (Haussinger et al, 2004). The dimer formation is limited by a high energy transient state which may need the destabilization of the N-terminal β -strand. By approximating cadherin interaction as a first order reaction, the authors estimated free energies between monomeric, dimeric and transient states. The transient state has never been characterized until now.

Experimental detachment curves presented in this study clearly showed that cadherin dissociation occurs through a more complex process than a first order reaction. The β -strand exchange model was used as a frame to analyse the kinetic rates of cadherin interaction. Due to the low force applied on the molecular bond (about 2 pN), we considered in first approximation these fitted rates as spontaneous dissociation rates. Then, the simplest way to fit the experimental data was by using a two states model, which is in good agreement with previous biomembrane force probe studies that revealed two distinct binding states on the first two EC motifs of E- and C-cadherin (Bayas et al, 2006; Perret et al, 2004). 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 resulted from two independent or two successive binding states on the same reaction pathway. Altogether our results reveal for the first time the involvement of Trp2 in the formation and not only on the stability of the β -strand exchange.

Structural studies on E/EC12 fragments with additional Nter residues describe another adhesive interface involving the hinge region between EC1 and EC2 motifs (Pertz et al, 1999b). Interacting molecules in these crystals exhibit a parallel arrangement, without Trp2 involvement or β -strand exchange. Very recently, a similar arrangement was described between T-cadherin molecules, which do not have Trp2 and do not appear to interact via β -strand exchange (Dames et al, 2008; Posy et al, 2008). Altogether these data strongly argue for an involvement of the Trp2 in the dynamic of the Nter β -strand exchange for classical type I cadherins.

Finally, as cadherin interaction involves at least two bound states, they should be part of the adhesive interface described by the β -strand exchange and involve Trp2,

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

First, our measurements suggest that the binding formation is limited by a high activation barrier. Indeed, our results showed that the conserved Trp2 is directly involved in this process. Its mutation increased this activation barrier. 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-ter strand interactions in both monomeric and β -strand exchange conformations (Chen et al, 2005). 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. 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. This complexity in the interactions between cadherin extracellular segments was suggested by electron tomography of desmosomal plaques. Indeed the main structural properties of cadherins ectodomain are shared with classical and desmosomal cadherins: five EC motifs, a conserved Trp2 and a putative hydrophobic pocket on EC1 (Posy et al, 2008). A first study, using a freeze-substituted desmosomes from neonatal mouse epidermis, revealed a desorganized three-dimensional array of cadherin molecules (He et al, 2003). Modeling of the crystal structure of C-cadherin ectodomain (Boggon et al, 2002) onto the tomographic maps revealed a stochastic interaction of the cadherins, which was described as three prominent arrangements that resemble the letters W, S, and λ in which the molecules interact at their Nter tips. The S shape implies the interaction between Trp2 of one molecule and the non-active site of the neighbouring molecule without inserting Trp2 into the hydrophobic pocket of the neighbouring molecule. Another study, using freeze-vitrified samples showed a highly organized structure of the desmosomes (Al-Amoudi et al, 2007) as in the *in vivo* hyper-adhesive Ca^{2+} -independent state (Garrod et al, 2005; Kimura et al, 2007). However upon wounding in epidermis and confluent epithelial sheets, desmosomes adopt another state characterized by Ca^{2+} -dependence and loss of the midline suggesting a less-organized structure (Garrod et al, 2005; Kimura et al, 2007). This state was shown to mimic the characteristic of adherens junctions, which are sensitive to Ca^{2+} ions. Hence it was hypothesized that the extracellular regions of adherens junctions are naturally disorganized. Even though these data are hypothetical they suggest the occurrence of asymmetrical complexes at the cell surface.

Interestingly such asymmetrical, incomplete trans dimer could be the basis for the initiation of adhesive plaques organisation. Indeed, He et al. data showed trans interactions involving both cadherin monomers and cis dimers. Other studies using protein cross-linking and coimmunoprecipitation demonstrated that cis cadherin dimers were formed only in cells grown at low calcium concentrations, and that cis and trans interactions shared the same adhesive interface (Trojanovsky et al, 2007; Trojanovsky et al, 2003; Trojanovsky et al, 2006). Data presented in this work 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. The strand of the second molecule appears to be necessary to fully accomplish the adhesive contacts, as documented by cell-beads interactions (this work) or cells grown on cadherin-decorated surfaces where only E/EC12 and not E/W2A is able to initiate signalling pathways (Arulanandam et al, 2009). 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.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by institutional funding from CNRS, as well as by grants from ARC (subvention libre), Région Aquitaine, Fondation pour la Recherche Médicale, la Ligue Contre le Cancer (Dordogne). During this work, S.C. received a doctoral fellowship from Région Aquitaine and O. C. held a BDI fellowship from the CNRS, the ARC and from *la Ligue Contre le Cancer-Oise*. We are grateful to Pr L. Raptis (Queens University, Kingston, Canada) and to Drs L. Shapiro and B. Honig (Cornell University, New York, USA) for providing the HC11 cells and the T-cadherin fragments, respectively. We thank Elisabeth Sellier (CREMEM, Université Bordeaux 1) for scanning electron microscopy, Katell Bathany (IECB, Bordeaux, France) for performing mass spectrometry measurements and I. Lascu (IBGC, Bordeaux, France) for his assistance with circular dichroism experiments.

References:

- Al-Amoudi A, Diez DC, Betts MJ, Frangakis AS (2007) The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature* **450**: 832-837
- Arulanandam R, Vultur A, Cao J, Carefoot E, Elliott BE, Truesdell PF, Larue L, Feracci H, Raptis L (2009) Cadherin-cadherin engagement promotes cell survival via Rac1/Cdc42 and signal transducer and activator of transcription-3. *Mol Cancer Res* **7**: 1310-1327
- Bayas MV, Leung A, Evans E, Leckband D (2006) Lifetime measurements reveal kinetic differences between homophilic cadherin bonds. *Biophys J* **90**: 1385-1395
- Blaschuk OW, Sullivan R, David S, Pouliot Y (1990) Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol* **139**: 227-229
- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L (2002) C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* **296**: 1308-1313
- Chappuis-Flament S, Wong E, Hicks LD, Kay CM, Gumbiner BM (2001) Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol* **154**: 231-243
- Chen CP, Posy S, Ben-Shaul A, Shapiro L, Honig BH (2005) 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* **102**: 8531-8536

- Courjean O, Chevreux G, Perret E, Morel A, Sanglier S, Potier N, Engel J, van Dorsselaer A, Feracci H (2008) Modulation of E-cadherin monomer folding by cooperative binding of calcium ions. *Biochemistry* **47**: 2339-2349
- Dames SA, Bang E, Haussinger D, Ahrens T, Engel J, Grzesiek S (2008) Insights into the low adhesive capacity of human T-cadherin from the NMR structure of Its N-terminal extracellular domain. *J Biol Chem* **283**: 23485-23495
- Garrod DR, Berika MY, Bardsley WF, Holmes D, Taberner L (2005) Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *J Cell Sci* **118**: 5743-5754
- Gumbiner BM (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 622-634
- Harrison OJ, Corps EM, Berge T, Kilshaw PJ (2005a) The mechanism of cell adhesion by classical cadherins: the role of domain 1. *J Cell Sci* **118**: 711-721
- Harrison OJ, Corps EM, Kilshaw PJ (2005b) Cadherin adhesion depends on a salt bridge at the N-terminus. *J Cell Sci* **118**: 4123-4130
- Haussinger D, Ahrens T, Aberle T, Engel J, Stetefeld J, Grzesiek S (2004) Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *Embo J* **23**: 1699-1708
- He W, Cowin P, Stokes DL (2003) Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science* **302**: 109-113
- Kimura TE, Merritt AJ, Garrod DR (2007) Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive. *J Invest Dermatol* **127**: 775-781
- Malicki J, Jo H, Pujic Z (2003) Zebrafish N-cadherin, encoded by the glass onion locus, plays an essential role in retinal patterning. *Dev Biol* **259**: 95-108
- Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM (1996) Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* **380**: 360-364
- Noe V, Willems J, Vandekerckhove J, Roy FV, Bruyneel E, Mareel M (1999) Inhibition of adhesion and induction of epithelial cell invasion by HAV-containing E-cadherin-specific peptides. *J Cell Sci* **112** (Pt 1): 127-135
- Nollet F, Kools P, 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
- Ozawa M, Baribault H, Kemler R (1989) The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* **8**: 1711-1717
- Parisini E, Higgins JM, Liu JH, Brenner MB, Wang JH (2007) The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. *J Mol Biol* **373**: 401-411

- Patel IS, Madan P, Getsios S, Bertrand MA, MacCalman CD (2003a) Cadherin switching in ovarian cancer progression. *Int J Cancer* **106**: 172-177
- Patel SD, Chen CP, Bahna F, Honig B, Shapiro L (2003b) Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 690-698
- Perret E, Benoliel AM, Nassoy P, Pierres A, Delmas V, Thiery JP, Bongrand P, 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, 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 AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J (1999) A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J* **18**: 1738-1747
- Pierres A, Feracci H, Delmas V, Benoliel AM, Thiery JP, Bongrand P (1998) Experimental study of the interaction range and association rate of surface-attached cadherin 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9256-9261
- Pierres A, Prakasam A, Touchard D, Benoliel AM, Bongrand P, Leckband D (2007) Dissecting subsecond cadherin bound states reveals an efficient way for cells to achieve ultrafast probing of their environment. *FEBS Lett* **581**: 1841-1846
- Pierres A, Touchard D, Benoliel AM, Bongrand P (2002) Dissecting streptavidin-biotin interaction with a laminar flow chamber. *Biophys J* **82**: 3214-3223
- Posy S, Shapiro L, Honig B (2008) Sequence and structural determinants of strand swapping in cadherin domains: do all cadherins bind through the same adhesive interface? *J Mol Biol* **378**: 952-966
- Prakasam A, Chien YH, Maruthamuthu V, Leckband DE (2006) Calcium site mutations in cadherin: impact on adhesion and evidence of cooperativity. *Biochemistry* **45**: 6930-6939
- Raptis L, Arulanandam R, Vultur A, Geletu M, Chevalier S, Feracci H (2009) Beyond Structure, to survival: activation of Stat3 by cadherin engagement. *Biochemistry and Cell Biology* **manuscript accepted**: see article IV of this Ph.D. thesis
- Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z (1994) Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* **14**: 8333-8342
- Robert P, Benoliel AM, Pierres A, Bongrand P (2007) What is the biological relevance of the specific bond properties revealed by single-molecule studies? *J Mol Recognit* **20**: 432-447
- Shan WS, Koch A, Murray J, Colman DR, Shapiro L (1999) The adhesive binding site of cadherins revisited. *Biophys Chem* **82**: 157-163
- Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA (1995) Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**: 327-337

Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M, et al. (1995) Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol* **128**: 949-957

Takeichi M (1988) The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* **102**: 639-655

Takeichi M (1990) Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* **59**: 237-252

Tamura K, Shan WS, Hendrickson WA, Colman DR, Shapiro L (1998) Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* **20**: 1153-1163

Tomschy A, Fauser C, Landwehr R, 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

Trojanovsky RB, Laur O, Trojanovsky SM (2007) Stable and unstable cadherin dimers: mechanisms of formation and roles in cell adhesion. *Mol Biol Cell* **18**: 4343-4352

Trojanovsky RB, Sokolov E, Trojanovsky SM (2003) Adhesive and lateral E-cadherin dimers are mediated by the same interface. *Mol Cell Biol* **23**: 7965-7972

Trojanovsky RB, Sokolov EP, Trojanovsky SM (2006) Endocytosis of cadherin from intracellular junctions is the driving force for cadherin adhesive dimer disassembly. *Mol Biol Cell* **17**: 3484-3493

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

van Roy F, Berx G (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* **65**: 3756-3788

Wojcik EJ, Sharifpoor S, Miller NA, Wright TG, Watering R, Tremblay EA, Swan K, Mueller CR, Elliott BE (2006) A novel activating function of c-Src and Stat3 on HGF transcription in mammary carcinoma cells. *Oncogene* **25**: 2773-2784

Yap AS, Kovacs EM (2003) Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J Cell Biol* **160**: 11-16

Zhang Y, Sivasankar S, Nelson WJ, Chu S (2009) Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 109-114

FIGURES LEGENDS:

Figure 1: Structural and sequence determinants of the β -strand exchange (a) Crystallographic structure of the binding interface of the human E-cadherin (PDB 2O72) (Parisini et al, 2007). β -strand exchange and docking of Trp2 in the partner hydrophobic pocket are required for trans-interaction. (b) Sequence alignments of classical type I cadherins

and T-cadherin. Trp2 and amino acids surrounding the hydrophobic pocket are conserved (highlighted).

Figures 2: Characterization of the cadherins fragments (a) Schematic representation of murine E-cadherin constructs used in this study. All chimeric proteins comprise the two outermost EC motifs, a polyhistidine tag at the C-terminal end, and a specific sequence (MIEGR) at the N-terminal end allowing cleavage by the factor Xa protease. (b) Mass spectrometry of the cleaved E/EC12-6xHis and E/W2A-6xHis fragments. Theoretical mass calculated using ProtParam were 25177 Da for E/EC12-6xHis and 25061,9 Da for E/W2A-6xHis. Our measurements are in good agreement with these values. (c) Circular dichroism of both fragments. Spectra are characteristics of β -sheet folding, and the modification of mean molar residue ellipticity by addition of calcium is typical of cadherin folded fragments (Courjean et al, 2008).

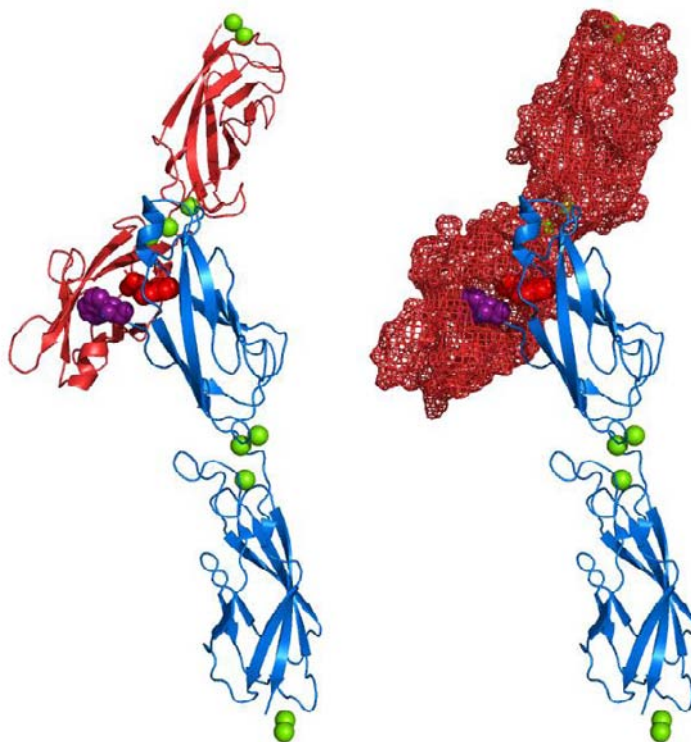
Figure 3: Kinetics of cadherin homophilic interaction (a) E/EC12 fragment exhibits four fold higher binding frequencies than E/W2A. Decrease of the binding frequency of E/EC12 and E/W2A is linear when shear rate increases. Binding of the T/EC12 does not resist to force. (b) Detachment curves at 2 pN: E/EC12 interaction is more stable than E/W2A, specifically on the early steps of interaction. T/EC12 stability is very similar to E/W2A in the early steps of interaction.

Figure 4: Characterization of an intermediate state (a) Schematic pathways for two monomers achieving the trans interaction; the top pathway describes a simultaneous process, the bottom one a sequential mechanism, driven by different kinetics parameters. (b-c) Experimental data showing binding frequencies (b) and detachment curves (c) of homophilic and heterophilic E/EC12 and E/W2A fragments.

Figure 5: Scanning electron microscopy of beads/cells interactions (a) 90% of beads coated with E/EC12 are internalized by HC11 cells. (b,c) Higher magnification showing beads overlaid by cell membrane. (d) 90% of E/W2A decorated beads were associated with cell surface through membrane protrusions (e) with no internalization. (f) Isolated beads decorated by cadherin fragments.

Figure 1

(a)



(b)

	5	75	85
E-cadh	• DWVI•PP	IAKYILYSHA	VSSNGEAVED
N-cadh	• DWVI•PP	IARFHLRAHA	VDINGNQVEN
P-cadh	• DWV•VAP	IAKYELFGHA	VSENGASVED
R-cadh	• DWVI•PP	RASYHLRAHA	VDMNGNKVEN
C-cadh	• DWVI•PP	YDKYVLS SHA	VSENGSPVEE
T-cadh	• SIVVSP	IATYQLYVET	TDASGKILEG

Figure 2

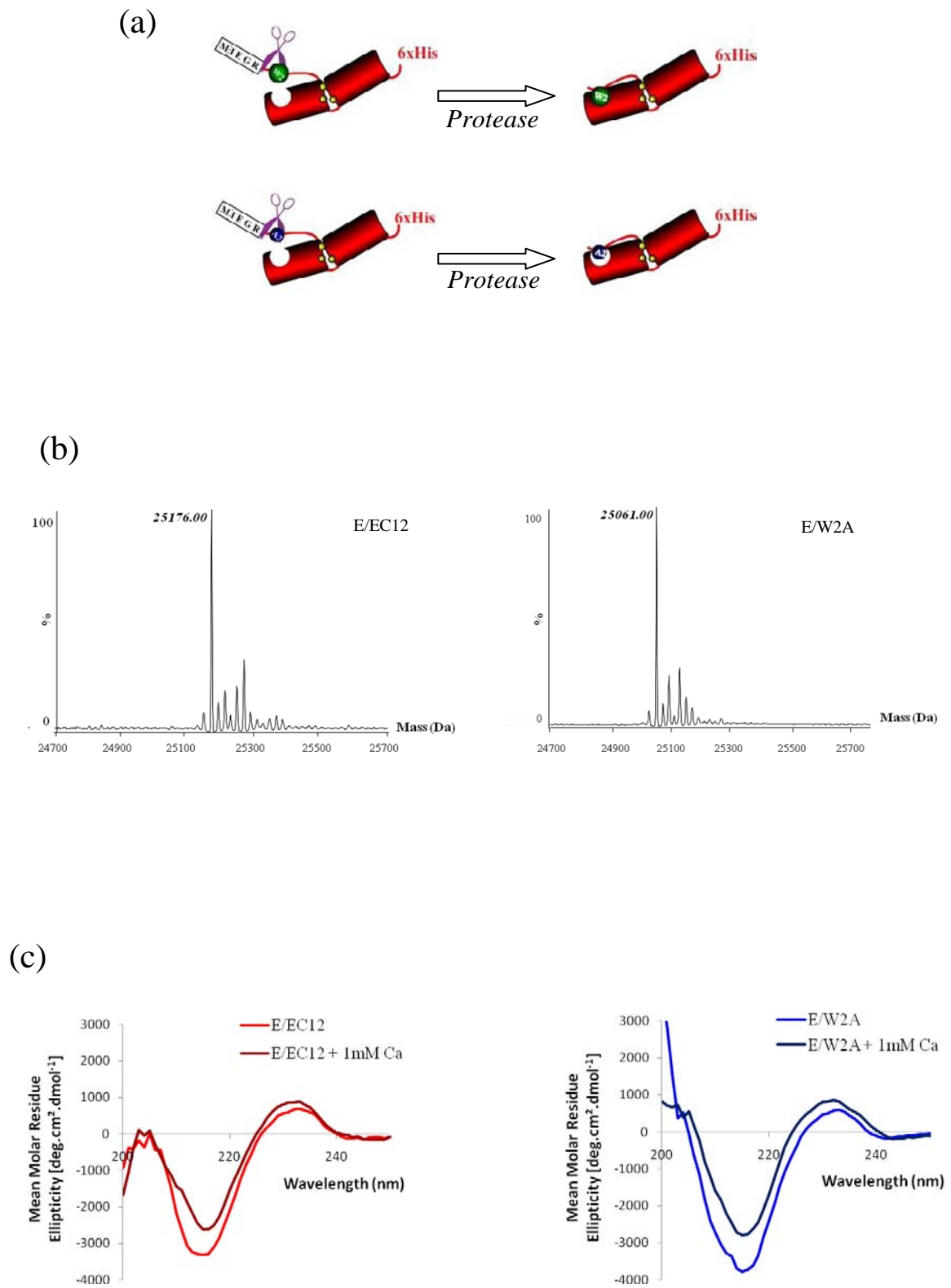
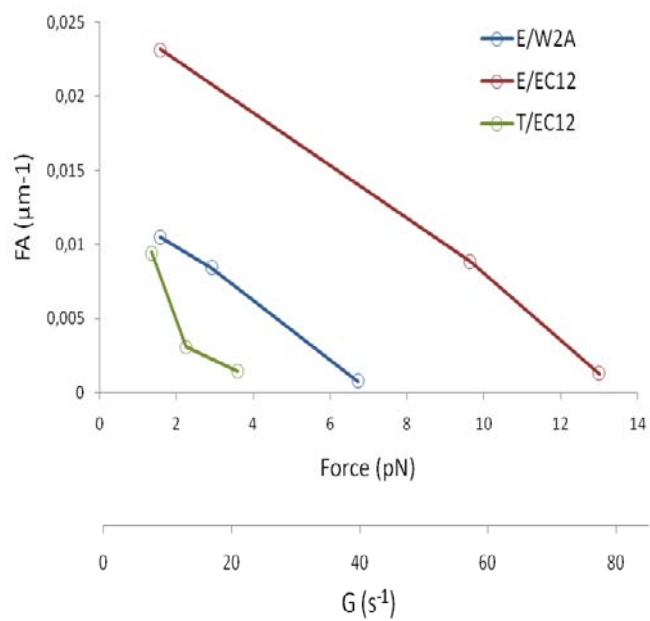


Figure 3

(a)



(b)

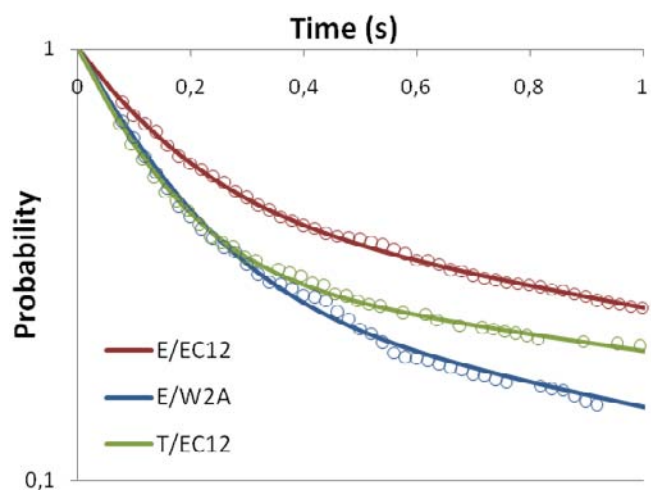
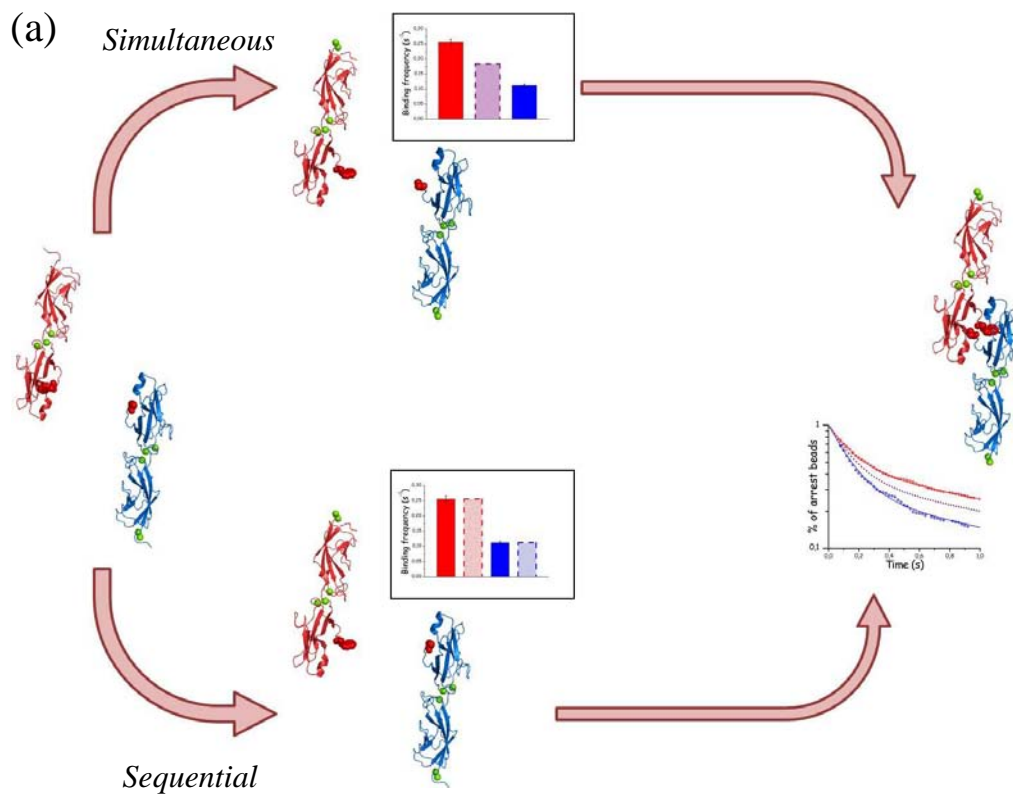
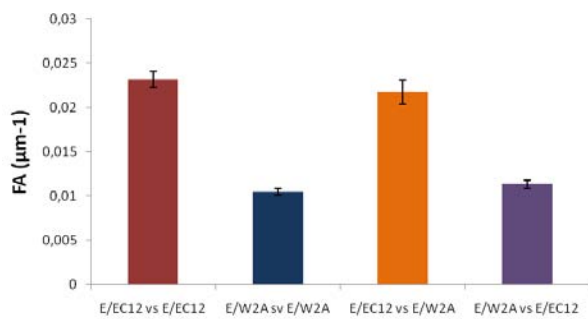


Figure 4



(b)



(c)

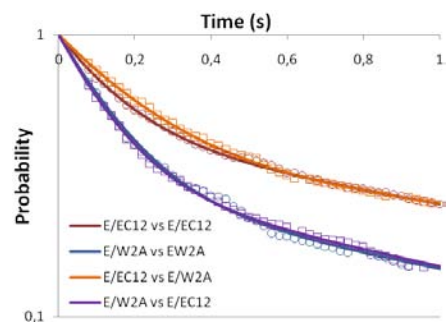
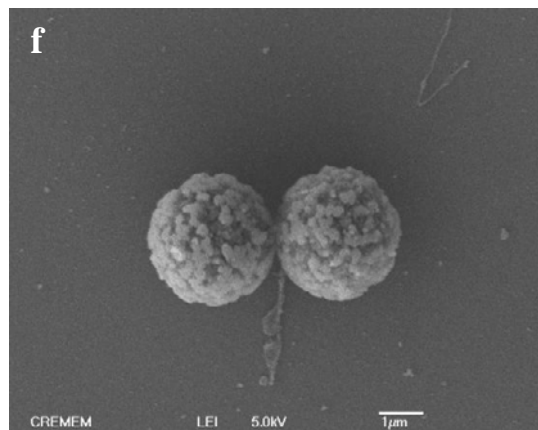
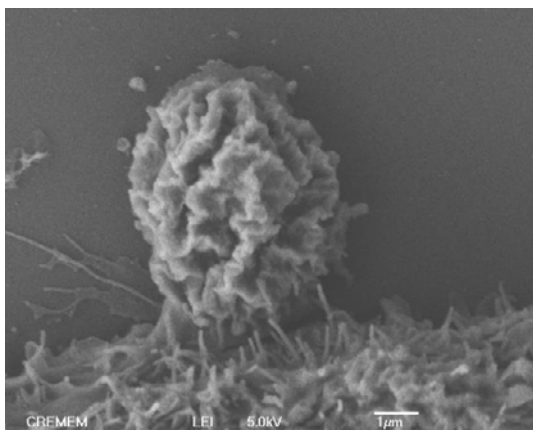
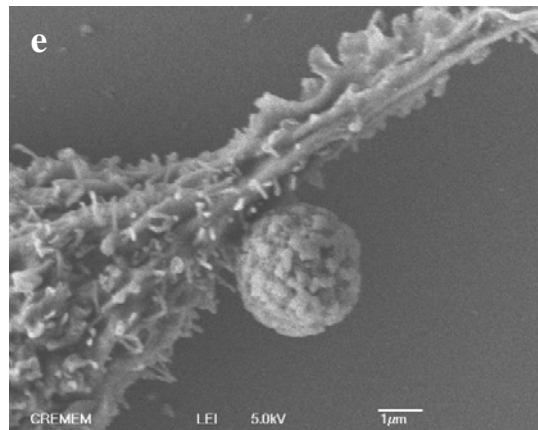
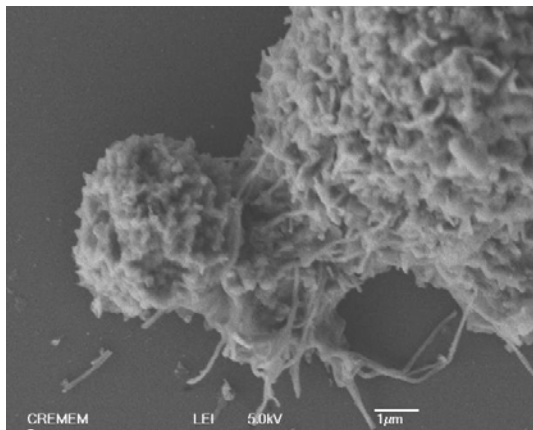
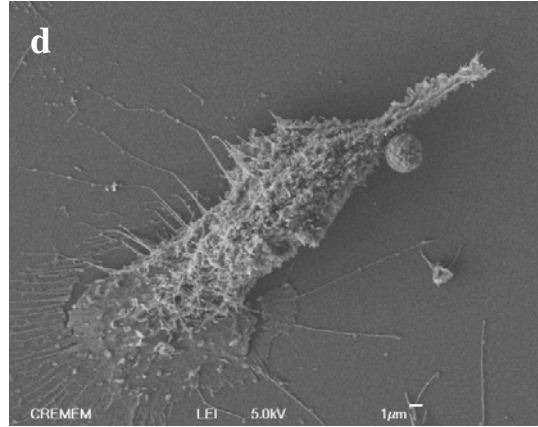
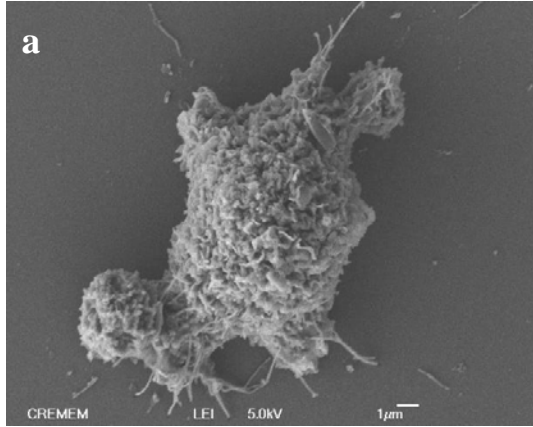


Figure 5



ARTICLE II: TYPE I VS TYPE II CADHERINS
all cadherins do not bind through the same adhesive
interface

L'adhésion cellule-cellule par les cadhérines joue un rôle primordial dès les premiers stades du développement embryonnaire, puis plus tard dans le maintien de l'architecture tissulaire. En effet, les cadhérines établissent des contacts sélectifs conduisant à la ségrégation cellulaire ; dans certaines pathologies comme le cancer, les changements de leur expression ("cadherin switching") sont corrélés à des modifications de phénotype (transition épithélio-mésenchymateuse). Le changement d'expression de la E-cadhérine en faveur de la N-cadhérine ou de la cadhérine-11 joue un rôle très important dans le caractère invasif des métastases de nombreux cancers épithéliaux, comme ceux de la prostate, du sein ou de l'estomac (Chu et al, 2008; Shibata et al, 1996; Tamura et al, 2008). Les cellules utilisent alors ces nouveaux systèmes adhésifs pour coloniser d'autres tissus. Ceci a été très récemment décrit dans le cancer de la prostate, où les cellules épithéliales, qui expriment initialement la E-cadhérine, migrent vers les os avec l'expression de la cadhérine-11 (Chu et al, 2008).

Les cadhérines de type I sont les mieux connues. De nombreuses informations sont maintenant disponibles sur leur mécanisme d'interaction. Nous avons vu précédemment le rôle primordial du Trp2, impliqué à la fois dans l'initiation et dans la stabilité de l'échange de brin β conduisant au contact adhésif entre cadhérines.

Les cadhérines de type II sont beaucoup moins étudiées. Elles possèdent des homologies de séquences avec les cadhérines de type I, notamment le Trp2 et d'autres résidus nécessaires à l'échange de brin β (Posy et al, 2008). La cristallographie par RX de trois cadhérines de type II ainsi que l'étude par RMN de la cadhérine-8 suggèrent que la dimérisation des cadhérines de type II se fait de façon similaire par échange de brin β avec insertion des chaînes latérales des Trp2 et 4 dans la poche hydrophobe de la molécule partenaire (Miloushev et al, 2008; Patel et al, 2006). Cependant, des études comparatives sur les différences d'énergie d'adhésion entre cadhérines de type I et de type II donnent des résultats controversés, peut-être dus aux différentes techniques et aux divers couples de cadhérines testés (Chu et al, 2006; Katsamba et al, 2009).

Il n'y a néanmoins aucune étude qui, à ma connaissance, ait identifié les éléments structuraux importants dans la dynamique de l'échange de brin β , à l'échelle de la molécule

unique, pour les cadhérines de type II. Dans cette étude, nous avons, par chambre à flux laminaire, comparé la E-cadhérine et la cadhérine-11.

Cette étude comparative, faite avec la même approche expérimentale, nous a permis de mettre en évidence que la différence réside essentiellement dans la capacité à initier les interactions. Nous avons ensuite recherché les éléments structuraux qui participent à l'interface adhésive de la cadhérine-11, décrite par la cristallographie (Patel et al, 2006). Ces auteurs ont attribué aux Trp2 et 4 le rôle majeur dans la dynamique d'échange de brin β , comme pour les cadhérines de type I. Grâce à la biologie moléculaire qui nous a permis d'introduire des modifications ponctuelles dans la séquence protéique, nous avons montré que les Trp2 et 4 n'ont pas l'influence attendue ; leur mutation en Ala ne modifie pas de manière significative la cinétique d'adhésion de la cadhérine-11. En revanche, les études structurales décrivent une surface adhésive plus étendue pour les cadhérines de type II, impliquant des résidus majoritairement hydrophobes. Nos données mettent en évidence le rôle majeur de cette partie de l'interface adhésive : la mutation de 2 résidus dans cette zone réduit considérablement l'efficacité de liaison, à l'échelle de la molécule unique et dans les interactions bille-cellule. Les cadhérines de type I et de type II ne semblent donc pas partager le même mécanisme d'interaction.

***Type I vs Type II Cadherins:
all cadherins do not bind through the same adhesive interface***

Sébastien Chevalier and Hélène Feracci[ ]

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

[ ]Corresponding author: feracci@crpp-bordeaux.cnrs.fr

Article en préparation

Introduction

Classical cadherins participate in cell-cell contacts, especially in specific cell adhesion mechanisms mediated by highly homophilic interactions which define cell-cell selectivity.

These cell surface receptors are crucial for tissue morphogenesis, and they participate in the maintenance of tissue architecture (Gumbiner, 2005; Takeichi, 1991). E(epithelial)-cadherin (type I), localized on the basolateral membrane of polarized epithelial cells, is highly concentrated to adherens junctions (AJ) and its gene is amongst the tumor suppressors (Jeanes et al, 2008). Most human cancers are of epithelial origin, and the loss of E-cadherin is often correlated to invasive phenotype. Cadherin-11 (type II) is expressed on cellular's of motile phenotype such as myofibroblasts (Hinz et al, 2004), or neurons during neurite outgrowth (Boscher & Mege, 2008). Recently, cadherin-11 has been also shown to promote invasiveness of tumoral cell lines through epithelial-mesenchymal transition, and is involved in metastasis progression towards bones in prostate cancer (Chu et al, 2008).

Classical type I and type II cadherins are transmembrane glycoproteins. They comprise an extracellular domain, a single-pass transmembrane domain and an intracellular domain which interacts with the cytoskeleton via β - and γ -catenins respectively (Patel et al, 2003b). Their ectodomains consist of five modules (EC1 to EC5) of ~100 amino acids each with internal sequence homology. Cadherins are known to achieve their biological functions in the presence of calcium (Ozawa et al, 1990a; Takeichi, 1991). Indeed, 3 calcium ions Ca^{2+} bind between two successive EC modules and rigidify the entire ectodomain for achieving its complete mature folding (Courjean et al, 2008; Pertz et al, 1999b).

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 the extracellular cadherin segment as well as sequence alignments indicate that each individual repeat EC is composed of seven anti-parallel β -strands (labelled A to G) arranged as two opposing sheets (Patel et al, 2003b).

Crystal structure analyses of classical type I cadherins show that these proteins interact through their most distal extracellular domain, called EC1 (Boggon et al, 2002; Haussinger et al, 2004; Shapiro et al, 1995). Trans interactions between the ectodomains were proposed to imply a domain swapping through the exchange of their Nter β -strand. This β -strand exchange was observed between E-cadherin two EC12 fragments by x-ray crystallography and NMR (Haussinger et al, 2004; Parisini et al, 2007) and depends mainly on four conserved structural features (Posy et al, 2008): i) the Trp2 side chain docks into an hydrophobic pocket intramolecularly or into the partner molecule, in a parallel fashion. The Histidine-Alanine-Valine (HAV) conserved sequence located at the C-terminal region of domain EC1 and

conserved residues surrounding it contribute to the formation of this hydrophobic pocket (Blaschuk et al, 1990; Tamura et al, 1998a). The mutation of Trp2 into Ala (W2A) or Ala80 into Ile abrogate the adhesive capacity of the protein (Noe et al, 1999; Pertz et al, 1999b) ; ii) two prolines (Pro5-Pro6) are part of the hinge region between the exchanged strand and the rest of the protein. Generally, Pro residues are known to induce strain in hinge loops (Bergdoll et al, 1998; Rousseau et al, 2001). The Pro5-Pro6 motif in type I cadherin releases strain when the β -strand is exchanged, which favours dimerization (Parisini et al, 2007); iii) the Gu89 side chain forms a salt bridge with the charged Nter residue as part of the swapping interface. Mutations of EC1 that destroy the salt bridge either by replacing Glu89 with Ala or by extending the N terminus interfere with adhesion (Harrison et al, 2005b) ; iv) the β -strand exchanged in the EC1 domain is shorter than in other domains. Compared to EC1, EC1-4 have two extra residues in their A strand that form additional hydrogen bonds with the G strand. EC5 domains appear to have only one extra residue. As a consequence of the longer A strand, the hinge region in EC2-5 is positioned higher in the structure than in EC1, and forms a bungle. It is possible that the shorter strand in EC1 destabilized the monomer by inducing strain in closed conformations, when Trp2 tucks into a pocket into its own monomer (Posy et al, 2008).

Classical type II cadherins share sequence homologies with type I cadherins but have two Trp conserved in second and fourth position (Trp2 et 4). Crystal structure reveal that type II cadherins also interact through a β -strand exchange (Patel et al, 2006). Trp 2 and 4 dock into a large hydrophobic pocket, into the own monomer as well as into the partner molecule. While in type I cadherins almost the entire adhesive interface is formed from strand swapped residues, type II cadherins form a larger interface that includes additional hydrophobic contacts. Moreover, it should be underlined that some of the structural features that allow the β -strand exchange in type I cadherins are not conserved in type II cadherins. Specifically, type II cadherins have no Pro residue in their hinge loop to favour the dimerization.

In a recent study, we probed the role of Trp2 in type I cadherins dynamics (Chevalier et al., in preparation). We have shown that this residue acts like a feeler, enhancing both the formation and the stability of the E-cadherin interaction.

Yet, the molecular mechanisms of type II cadherin ectodomain interactions are still unclear. Here, we chose cadherin-11 as a prototype of classical type II cadherin with the goal of relying structural features to adhesive functions. We used the flow chamber combined with molecular biology as a powerful molecular approach to probe the dynamics of their β -strand exchange, at the single molecule level. Our observations reveal that differences in dynamics between type I and type II cadherins stand essentially in the ability to initiate the interaction.

Moreover, the large hydrophobic adhesive surface is predominant on Trp2 and 4 for the adhesive trans interaction of type II cadherins, which suggests for the first time that type I and type II cadherins do not interact through the same mechanism.

Materials and Methods

Protein expression and purification

For 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 (4 M urea; 50 mM Na₂HPO₄ pH 7.8; 20 mM Imidazole). The lysate was clarified by centrifugation at 10,000 g for 20 min and the supernatant incubated for 2 h 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 0.25 M imidazole, then dialysed against Hepes 20 mM, NaCl 150 mM pH 7 using Amicon Ultra 15, cut off 10 kDa (Millipore) in order to remove Ca²⁺ ions.

Protein concentration was determined spectrophotometrically by absorbance measurements at 280 nm. 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 and by mass spectroscopy.

Trypsin sensitivity

We incubated purified cadherin fragments (~5 µg) with CaCl₂ solutions ranging in concentration from 0.02 to 2 mM in 10 mM Tris (pH 8.0) or with 5 mM EDTA. The protein solutions were then incubated with 90 units of trypsin-agarose beads (Sigma) in a final volume of 40 µL for 1 h, at 37 °C, with shaking (400 rpm, Thermomixer Comfort, Eppendorf). A trypsin inhibitor was added to stop proteolysis (leupeptin hemisulfate, ICN Biomedicals Inc.). Samples were then analyzed by SDS-PAGE in 15% polyacrylamide gels and Coomassie blue staining.

Circular Dichroism

Circular dichroism spectra were recorded at 20 °C in a solution containing 20 mM Hepes and 150 mM NaCl (pH 7), using a Jasco 810 spectropolarimeter with quartz cells with a path length of 1 mm. The protein concentration was 0.3 mg/mL. Spectroscopic studies of structural modifications were performed by adding aliquots of a Ca²⁺ stock solution to the Ca²⁺-depleted protein, to a final Ca²⁺ concentration of 1 mM, 5 mM or 10 mM. Spectra were recorded by subtracting the background due to the buffer signal.

Mass Spectrometry

ESI-ToF mass spectrometry was performed on a Waters LCT Premier instrument in the positive mode. 20 µL of a 20 µM cadherin solution was extensively washed in a Trifluoroacetic acid (TFA) 0.1% in water and then directly injected in the mass spectrometer.

Preparation of substrates for the flow chamber experiments

As described previously, streptavidin coated beads (2,8µm diameter, 1,3 g/l density, Dynabeads M280, Dyal) were incubated (~ 8.10⁸ beads/ml) at 37°C 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 cadherin fragments, for at least 1h. Prior using in adhesion experiments, beads were washed in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7 at room temperature.

Freshly cleaved mica surfaces (Muskovite mica, Metafix, Montdidier, France) were incubated with 1mM NiCl₂ (Sigma) for 1 min. Cadherin fragments were diluted to the desired coating concentration in binding buffer (Hepes-NaCl) and deposited on each mica surfaces for 1 h at room temperature. Surfaces were then washed with Hepes-NaCl. Before use in laminar flow assays, beads and slides were incubated for 15 min with 1 mM CaCl₂ in Hepes-NaCl. Experiments were performed in Hepes-NaCl, with 1 mM CaCl₂, BSA 0.2% at room temperature.

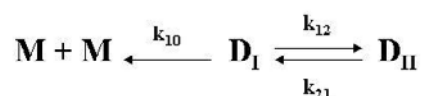
Interaction lifetime measurements were carried out with saturated beads (6900 molecules/µm²) and with a binding site density on mica of 50-100 molecules/µm², as described in a previous work (Perret et al., 2002). Such conditions allowed optimal attachment frequency and unimolecular measurements, as discussed in the results section.

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 mm³ (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 5 ml 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.

Analysis: As described previously, particle trajectories and arrests were analyzed by custom made software (Chevalier et al., in preparation). Detachment curves were obtained by plotting the number of particles remaining bound versus time. We were thus able to determine the characteristic duration of interactions. Experimental unbinding plots were then fitted to theoretical curves according to the following two-step model of bond formation with a χ^2 test:



Binding frequency was used to reflect the binding efficiency; it was thus determined by dividing the number of arrest à time t=0s (obtained by extrapolation using the best fit of the detachment curves) by the total duration of motion of particles.

The global efficiency was used to reflect both initiation and stability of interactions. It was determined by dividing the number of stable arrests (arbitrary chosen > 1s) by the total duration of motion of particles.

Cell/Beads aggregation essays

Neutravidin coated fluorescent beads (1 μm diameter, 10 g/L density, FluoSphere, Molecular Probes) were incubated ($\sim 2 \cdot 10^7$ beads/mL) at 37°C 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 cadherin fragments, for 1 h. Prior using in adhesion experiments, beads were washed three times in DMEM.

The albino mouse fibroblastic cell line Balb/c 3T3 was kindly provided by Dr. L. Raptis (Kingston, ON Canada). Cells were grown in DMEM culture medium completed with SVF. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air. $50 \cdot 10^6$ beads were incubated on cells during 1 h, then washed with PBS and fixed in 4% formaldehyde in PBS for 20 minutes and washed with PBS. Cells were then photographed then beads and cells were scored. The results of this bead-cell adhesion assay were evaluated as the relative number of each type of bound beads.

Results

Characterization of the cadherin fragments

Type II cadherin trans interaction strongly depends on a salt bridge between Glu 87 and the end terminal end (Patel et al, 2006). As suggested by Harrison and al. (Harrison et al, 2005b), an additional residue at the N-terminal is sufficient, by disruption of this salt bridge, to perturb the β -strand exchange and disturb the adhesive interaction. Protein expression in *E. Coli* usually introduces a additional Met at the N-ter end. In some proteins, when the penultimate amino acid is a Gly, the N-ter Met is excised in the bacteria, by the methionyl-aminopeptidase (Bradshaw et al, 1998; Frotin et al, 2006; Hirel et al, 1989). In our case, the cadherin-11 fragment has indeed a Gly in this position of the sequence, and *E. Coli* expression of this fragment should occur with the correct native terminal end. We checked the correct processing of the recombinant proteins by mass spectrometry and indeed as shown in Figure 2a & 2b, our fragments had the correct expected mass (calculating from the native sequence, using the ProtParam tool from the ExPaSy web site, www.expasy.ch).

Cadherins are known to resist to trypsin digestion in the presence of calcium, and as recently shown the E/EC12 fragment is protected up to 0.05 mM Ca^{2+} concentration (Courjean et al, 2008). Type II cadherins behave slightly differently, and not surprisingly cadherin-11 11/EC12 and 11/W24A fragments resisted, but appeared to be more sensitive to trypsin digestion (figure 2c & 2d). Cadherin-11 fragments seemed to be protected at 2 mM Ca^{2+} , but

cleaved from 1 mM Ca^{2+} and were completely degraded at 0.2 mM Ca^{2+} (as they were in control with 5 mM EDTA).

Circular dichroism was used to probe conformational changes of proteins. Type I cadherins have typical β sheet spectra, and shift of these spectra are observed when calcium is added (Courjean et al, 2008). Circular dichroism spectra of 11/EC12, 11/W24A and E/EC12 fragments were very similar in shape, displaying a typical cadherin spectrum. We also observed a slight change in the conformational state upon addition of 1 mM or 5 mM Ca^{2+} ; addition of 10 mM Ca^{2+} led to upper changes.

Altogether, the different recombinant 11/EC12 fragments were correctly cleaved, and folded according to the criteria defined for type II cadherins. Indeed, type II cadherin folding is known to be less sensitive to calcium fixation than type I cadherins (Heupel et al, 2008).

Flow Chamber experiments

Determination of cadherin surface density

As previously described for E-cadherin (Perret et al, 2002a), unimolecular interactions can be probed by the flow chamber. We needed to setup the experimental conditions for measuring cadherin-11 single molecule interactions. We tuned cadherin surface density from 1000 molecules/ μm^2 up to 20 molecules/ μm^2 . For 100 molecules/ μm^2 , detachment rates did not increase with decreasing surface density of binding site on the flow chamber. This was an evidence that the arrest were mediated mostly by individual bonds. Due to the high sequence and structure homologies between 11/EC12 and E/EC12, it was not surprising that the surface density of both fragments was the same for probing single molecule interactions.

Comparison of cadherin-11 with E-cadherin

Binding frequency:

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, 1998b). 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. E/EC12 flow chamber

parameters have been already described (courjean & al.). Briefly, binding frequencies decrease from $0.023 \mu\text{m}^{-1}$ at 2 pN to $0.001 \mu\text{m}^{-1}$ at 13 pN.

11/EC12 had 4 fold smaller binding frequencies. At 2 pN, 11/EC12 bound with a frequency of $0.006 \mu\text{m}^{-1}$ and fall down until $0.001 \mu\text{m}^{-1}$ at 6 pN. The increasing shear rate G seemed to influence arrest frequencies of both 11/EC12 and E/EC12 in a similar way.

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). 11/EC12 detachment curves are not straight lines, showing that the interaction is more complex than a single state interaction. Detachment curves of the 11/EC12 showed that this interaction is slightly less stable than for E/EC12. Figure 4b showed the detachment curves at 2 pN, but similar behaviour can be observed for higher forces applied on the beads (not shown). From 0.5 s to 1 s, detachment curves of the 2 proteins are similar; slight differences were in the early steps of interactions.

The global efficiency reflects both differences in the initiation and stability of interactions. As binding frequency differences are more important than stability differences, evolution of the global efficiencies of the 11/EC12 and E/EC12 fragments were very similar to the evolution of their binding frequencies. These results all together showed that the main differences between 11/EC12 and E/EC12 were the initiation of the interaction.

Probing the cadherin-11 trans-interactions

Dissecting cadherin-11 molecular details of interaction

By using 11/W24A fragments, we could probe the role of these amino acids in the cadherin-11 interaction. As suggested by Patel & al. (Patel et al, 2006), these two amino acids involved in the beta strand exchange are essential for achieving type II cadherin trans interaction. W24A mutation increased very slightly the initiation of the interaction and didn't change the stability of interaction. As a results global efficiency were very similar between these both fragments (figure 5). Contrary to type I cadherin, Trp2 and 4 didn't seem to play a key role in cadherin-11 interactions. We then probed a third cadherin fragment, with 2 other points mutations, Phe8 and Ile10 that participate to the extended hydrophobic adhesive surface of type II cadherin, mutated in Ala (2 mut). These mutations almost prevented the formation of interactions as shown in figure 5a; the binding frequency of $0.0003 \mu\text{m}^{-1}$ at 2 pN was 20 fold smaller than for the wild type 11/EC12 fragment. And the global efficiency is also 15 fold

weaker for this fragment than for the WT. So these amino acids Phe8 and Ile10 are essential for the trans interactions of type II cadherins.

Beads/Cells aggregation essays

Specific recognition of cadherin fragments by cells expressing cadherin-11 molecules was also investigated. Green fluorescent polystyrene beads decorated with 11/EC12 fragments were incubated with Balb/c 3T3 cell lines expressing cadherin-11 at their surface, together with red fluorescent polystyrene beads decorated with either 11/W24A or either 11/2mut fragments (figure 6). Beads coated with the wild type fragment adhered on cells, as did beads decorated with 11/W24A. However, beads coated with 11/2mut were not sticking to cells. Cells recognized the recombinant cadherin-11 fragments that remained their biological activity. And cells experimental results were in good agreement with flow chamber experiment assays.

Discussion

The main purpose of this work was to compare type II to type I cadherins binding activities, and to improve important structural features in cadherin type II dynamics. We choose cadherin-11 and E-cadherin as prototype of type II and type I cadherins. The laminar low chamber has already been used as a powerful tool to probe molecular aspect of type I cadherins interactions. Crystallographic structure as well as RMN measurement strongly suggest that type II cadherins bind through domain swapping mechanism (Miloushev et al, 2008; Patel et al, 2006). Force measurement spectroscopy combine with molecular biology allowed us to determine the structural component of type II cadherins interactions.

Cadherin-11 fragment are correctly expressed

For probing the molecular components of type II cadherin interaction, we chose to focus on the two outermost modules of cadherin-11. As it has already been validated for E-cadherin (Courjean et al, 2008; Perret et al, 2002a), 11/EC12 is the minimal segment to obtain a direct determination of lifetime of the initial homophilic interaction. Due to the properties of the adhesive interface, and the importance of Nter processing, it was essential to verify that the cadherin fragments we were using were correctly expressed and folded. As already mentioned, a correct native N ter end is required for achieving proper cadherin adhesion

(Harrison et al, 2005b). We used both mass spectrometry and circular dichroism to show that we obtained cadherin-11 fragments exhibiting identity with the wild-type sequence as well as a correct folding. This was also confirmed by trypsin sensitivity depending on calcium concentrations.

Cadherin-11 EC12 fragments were expressed with a hexahistidine tag at the C ter end. This tag, which is used to purify the recombinant proteins, is also very conveniently used to immobilize these fragments in an orientated fashion on substrates for the flow chamber experiments. We chose to study the association of surface-attached molecules rather than between soluble molecules thus achieving the molecular configuration occurring in physiological conditions. Experimental conditions have then be determined in order to probe unimolecular measurements, as it has already been described for E-cadherin (Perret et al, 2002a).

E-cadherin and cadherin-11 have different dynamics parameters

To our knowledge, no direct comparison between cadherin-11 and E-cadherin dynamics at the molecular level has been described yet. It appears indeed that differences may arise from the technical approach used, as well as cell types, cadherin members and numbers of cadherin molecules involved in the adhesion plaque. Indeed, data coming from AFM measurements suggest that cadherin-11 bonds are stronger than N-cadherin bonds (Pittet et al, 2008); on the other hand, dual micropipette experiments show that E-cadherin adheres much strongly than cadherin-7 (Chu et al, 2008).

For probing 11/EC12 recombinant fragment, we use the laminar flow chamber, in the same experimental conditions as to probe E/EC12 (Chevalier et al., in preparation). We could therefore directly compare the behaviour of these two proteins. As shown in figure 3c, binding efficiency is much lower for the 11/EC12 fragment than for E/EC12; this difference is mostly due to differences in binding frequencies. This result is coherent with the phenotype of cells expressing these cadherins. Indeed, epithelial cells expressing E-cadherin exhibit a strong adhesion ability and are very cohesive; whereas cells expressing cadherin-11 are more motile and may have an invasive phenotype.

The β -strand exchange is not involved in cadherin-11 binding activity

In a previous work, mutation of Trp with Ala was used to probe the role of Trp2 into cadherin type I interaction, (Chevalier et al., in preparation). These studies described the Trp2 acting as a molecular hook, enhancing both the initiation and the stability of the interaction.

In order to decipher the contribution of the two Trp2&4 in the β -strand exchange of type II cadherins, we expressed the 11/EC12 fragment with these two Trp mutated into Ala (11/W24A). Surprisingly, no differences were observed (figure 4). Indeed, binding frequency is a little bit higher without Trp, and the stability is exactly the same for 11/EC12 and 11/W24A. The flow chamber analysis was indeed sensitive enough to reveal differences for the W2A mutation of E-cadherin, but did not show difference with type II cadherins. These observations strongly suggested that the involvement of β -strand exchange in the establishment of the adhesive interface may be different in type I and type II cadherins.

Type I and type II cadherins do not share the same adhesive interface

In order to identify the key residues driving the adhesive interaction in type II cadherins, we performed other structural modifications in the protein sequence using point mutation changes. Indeed, structural images of type II cadherins reveal an extended hydrophobic region in the adhesive interface involving the entire Nter β -strand (Patel et al, 2006). In this adhesive interface, Phe8 occupies a pocket formed partially by Gly22 and Tyr20 in the partner molecule; similarly Ile10 fills a pocket formed by Tyr13 and Leu19. Such interactions have not been described in type I cadherin structures. So we decided to mutate Phe8 and Ile10 with Ala into the 11/EC12 fragment (11/2mut) then probed its behaviour in flow chamber assays. As shown in figure 5, these two mutations fully abolished the adhesive interaction. Cell-beads adhesion assays validated the observations made at the molecular level.

This extended interaction zone appeared to be essential for cadherin-11 dimerization and not the β -strand exchange. This difference may come from the dynamics of the Nter β -strand: the presence of only one Trp (type I) vs 2 Trp (type II) could provide a higher mobility of this strand in type I cadherins, and a better ability for solvent exposure when only one Trp2 is present. Altogether these results suggested a new mechanism for interaction for type II cadherins.

Altogether, these structure-function study strongly suggests a different mechanism of interaction between type I and type II cadherins. We found that the β -strand exchange does

not seem to participate in the dynamics of homophilic type II cadherins interactions, but an extended region of hydrophobic interactions described by Patel et al. (Patel et al, 2006) seemed to be the main structure involved.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by institutional funding from CNRS, as well as by grants from ARC (subvention libre), Région Aquitaine, Fondation pour la Recherche Médicale, la Ligue Contre le Cancer (Dordogne). During this work, S.C. received a doctoral fellowship from Région Aquitaine. We are grateful to Pr L. Raptis (Queens University, Kingston, Canada) for providing the BalbC 3T3 cells. We thank Elisabeth Sellier (CREMEM, Université Bordeaux 1) for scanning electron microscopy, Katell Bathany (IECB, Bordeaux, France) for performing mass spectrometry measurements and I. Lascu (IBGC, Bordeaux, France) for their assistance with circular dichroism experiments.

References:

- Bergdoll M, Eltis LD, Cameron AD, Dumas P, Bolin JT (1998) All in the family: structural and evolutionary relationships among three modular proteins with diverse functions and variable assembly. *Protein Sci* **7**: 1661-1670
- Blaschuk OW, Sullivan R, David S, Pouliot Y (1990) Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol* **139**: 227-229
- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L (2002) C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* **296**: 1308-1313
- Boscher C, Mege RM (2008) Cadherin-11 interacts with the FGF receptor and induces neurite outgrowth through associated downstream signalling. *Cell Signal* **20**: 1061-1072
- Bradshaw RA, Brickey WW, Walker KW (1998) N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families. *Trends Biochem Sci* **23**: 263-267
- Chu K, Cheng CJ, Ye X, Lee YC, Zurita AJ, Chen DT, Yu-Lee LY, Zhang S, Yeh ET, Hu MC, Logothetis CJ, Lin SH (2008) Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol Cancer Res* **6**: 1259-1267
- Courjean O, Chevreux G, Perret E, Morel A, Sanglier S, Potier N, Engel J, van Dorsselaer A, Feracci H (2008) Modulation of E-cadherin monomer folding by cooperative binding of calcium ions. *Biochemistry* **47**: 2339-2349
- Frottin F, Martinez A, Peynot P, Mitra S, Holz RC, Giglione C, Meinnel T (2006) The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Mol Cell Proteomics* **5**: 2336-2349

- Gumbiner BM (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 622-634
- Harrison OJ, Corps EM, Kilshaw PJ (2005) Cadherin adhesion depends on a salt bridge at the N-terminus. *J Cell Sci* **118**: 4123-4130
- Haussinger D, Ahrens T, Aberle T, Engel J, Stetefeld J, Grzesiek S (2004) Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *Embo J* **23**: 1699-1708
- Heupel WM, Baumgartner W, Laymann B, Drenckhahn D, Golenhofen N (2008) Different Ca²⁺ affinities and functional implications of the two synaptic adhesion molecules cadherin-11 and N-cadherin. *Mol Cell Neurosci* **37**: 548-558
- Hinz B, Pittet P, Smith-Clerc J, Chaponnier C, Meister JJ (2004) Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. *Mol Biol Cell* **15**: 4310-4320
- Hirel PH, Schmitter MJ, Dessen P, Fayat G, Blanquet S (1989) Extent of N-terminal methionine excision from Escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 8247-8251
- Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS (2008) Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* **27**: 6920-6929
- Miloushev VZ, Bahna F, Ciatto C, Ahlsen G, Honig B, Shapiro L, Palmer AG, 3rd (2008) Dynamic properties of a type II cadherin adhesive domain: implications for the mechanism of strand-swapping of classical cadherins. *Structure* **16**: 1195-1205
- Noe V, Willems J, Vandekerckhove J, Roy FV, Bruyneel E, Mareel M (1999) Inhibition of adhesion and induction of epithelial cell invasion by HAV-containing E-cadherin-specific peptides. *J Cell Sci* **112** (Pt 1): 127-135
- Ozawa M, Engel J, Kemler R (1990) Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. *Cell* **63**: 1033-1038
- Parisini E, Higgins JM, Liu JH, Brenner MB, Wang JH (2007) The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. *J Mol Biol* **373**: 401-411
- Patel SD, Chen CP, Bahna F, Honig B, Shapiro L (2003) Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 690-698
- Patel SD, Ciatto C, Chen CP, Bahna F, Rajebhosale M, Arkus N, Schieren I, Jessell TM, Honig B, Price SR, Shapiro L (2006) Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell* **124**: 1255-1268
- Perret E, Benoliel AM, Nassoy P, Pierres A, Delmas V, Thiery JP, Bongrand P, Feracci H (2002) Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *EMBO J* **21**: 2537-2546
- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J (1999) A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J* **18**: 1738-1747

Pierres A, Feracci H, Delmas V, Benoliel AM, Thiery JP, Bongrand P (1998) Experimental study of the interaction range and association rate of surface-attached cadherin 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9256-9261

Pittet P, Lee K, Kulik AJ, Meister JJ, Hinz B (2008) Fibrogenic fibroblasts increase intercellular adhesion strength by reinforcing individual OB-cadherin bonds. *J Cell Sci* **121**: 877-886

Posy S, Shapiro L, Honig B (2008) Sequence and structural determinants of strand swapping in cadherin domains: do all cadherins bind through the same adhesive interface? *J Mol Biol* **378**: 952-966

Rousseau F, Schymkowitz JW, Wilkinson HR, Itzhaki LS (2001) Three-dimensional domain swapping in p13suc1 occurs in the unfolded state and is controlled by conserved proline residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5596-5601

Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA (1995) Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**: 327-337

Takeichi M (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**: 1451-1455

Tamura K, Shan WS, Hendrickson WA, Colman DR, Shapiro L (1998) Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* **20**: 1153-1163

FIGURES LEGENDS:

Figure 1: Structures of type I and type II cadherin (a,b) (a) Crystallographic structure of the binding interface of the E-cadherin (PDB 2O72) (Parisini et al, 2007). (b) Magnification of EC1 domains suggest that β -strand exchange and docking of Trp2 in the partner hydrophobic pocket are required for trans-interaction of type I cadherins. (c,d) (c) Crystallographic structure of the binding interface of the cadherin-11 (PDB 2A4E) (Patel et al, 2006). (d) Magnification of EC1 domains suggest that β -strand exchange and docking of Trp2 and 4 in the large hydrophobic pocket of the partner molecule, as well as additional hydrophobic contacts, are required for trans-interaction of type II cadherins.

Figures 2: Characterization of the cadherins fragments (a,b) Mass spectrometry of the 11/EC12 (a) and 11/W24A (b) fragments. Theoretical mass calculated using ProtParam were 25348 Da for 11/EC12 and 25232,9 Da for 11/W24A. Our measurements are in good agreement with these values. (c,d) Influence of Ca^{2+} on the biochemical properties of 11/EC12 (c) and 11/W24A (d), as assessed by assays of trypsin sensitivity. Proteins were incubated

with trypsin in the presence of various concentrations of Ca^{2+} for 1 h at 37 °C. They were then analyzed by SDS–PAGE in 15% acrylamide gels. Lane T corresponds to the protein incubated without trypsin. (e,f) Circular dichroism of 11/EC12 (e) and 11/W24A (f) fragments. Spectra are characteristics of β -sheet folding, and the modification of mean molar residue ellipticity by addition of calcium is typical of cadherin folded fragments (Courjean et al, 2008).

Figure 3: Unimolecular experimental condition. Mica surfaces were coated with various density of 11/EC12 fragment, and used for dynamic study of interaction. (a) Binding frequencies decreased when cadherin site density decrease. (b) At high density (1000 cadherins/ μm^2), stable arrests were observed, corresponding to multiple binding interactions. At cadherin site density of 100 cadherins/ μm^2 or less, dissociation rate was constant, indicating measurements of interactions between single 11/EC12 fragments.

Figure 4: Comparison of the kinetics between E-cadherin and cadherin-11 (a) E/EC12 fragment exhibits four fold higher binding frequencies than E/W2A. Decrease of the binding frequency of E/EC12 and E/W2A is linear when shear rate increases. Binding of the T/EC12 does not resist to force. (b) Detachment curves at 2 pN: E/EC12 interaction is more stable than 11/EC12. (c) Global efficiency, that reflects both the initiation and the stability of interaction, displays the same evolution that binding frequency ; the main difference between E/EC12 and 11/EC12 is the ability to initiate the interaction.

Figure 5: Structural determinants of the adhesive interface of cadherin-11 (a) Binding frequency of 11/EC12 fragments compare to 11/W24A fragments suggests that Trp2 and 4 do not interfere in the initiation of the adhesive interactions. Mutation of Phe8 and Ile10 into Ala almost prevent the initiation of interaction. (b) 11/EC12 fragment and 11/W24A fragment have the same stability. (c) Global efficiencies suggest that Trp2 and 4 point mutation into Ala have no significant influence on cadherin-11 adhesive activity. Phe8 and Ile10 are important for this interaction.

Figure 6: Aggregation beads assay on BalbC 3T3 cells (a,c) Brightfield microscopy of BalbC 3T3 cells, expressing cadherin-11 at the plasma membrane. Cells were incubated with green-fluorescent beads, coated with 11/EC12 fragments, and with red-fluorescent beads, coated with 11/W24A fragments (b) or 11/2mut fragments (d). 11/W24A coated beads remain adherent as 11/2mut beads do not, confirming the flow chamber experimental results.

Figure 1

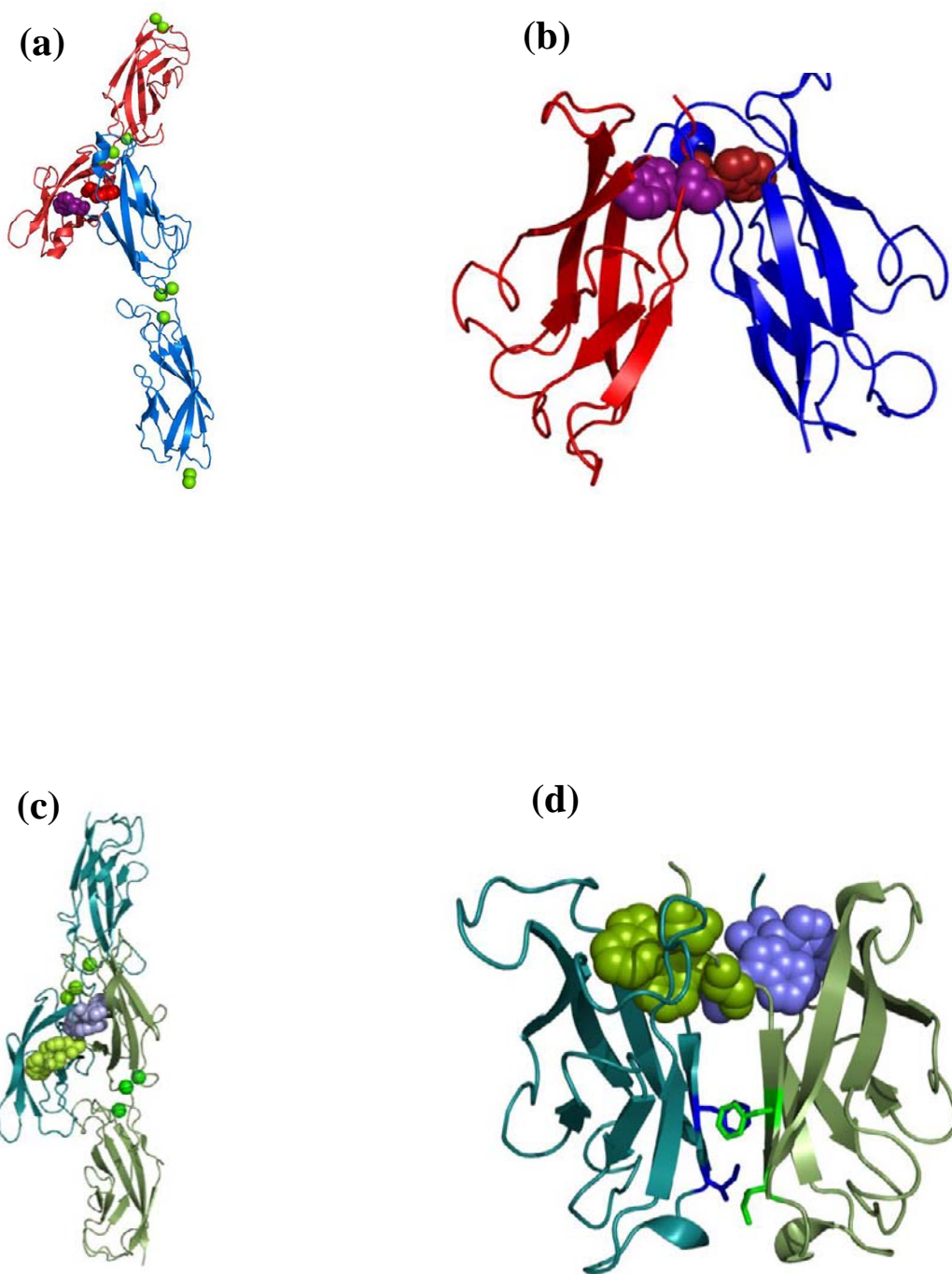


Figure 2

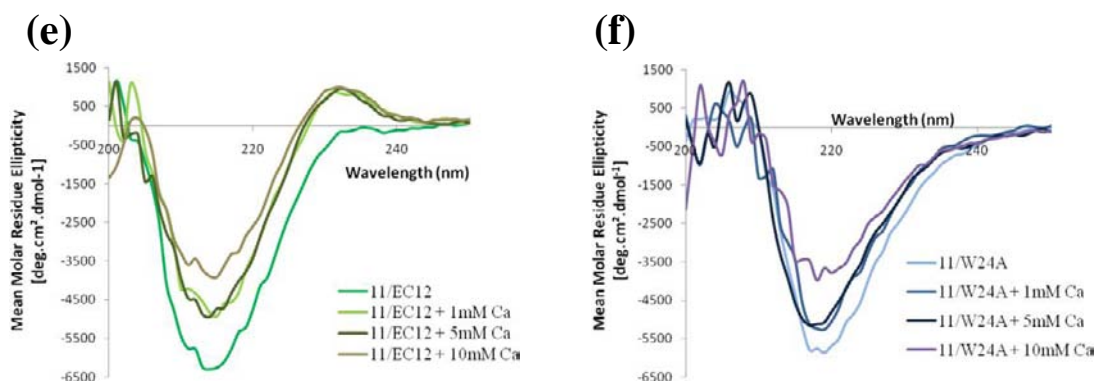
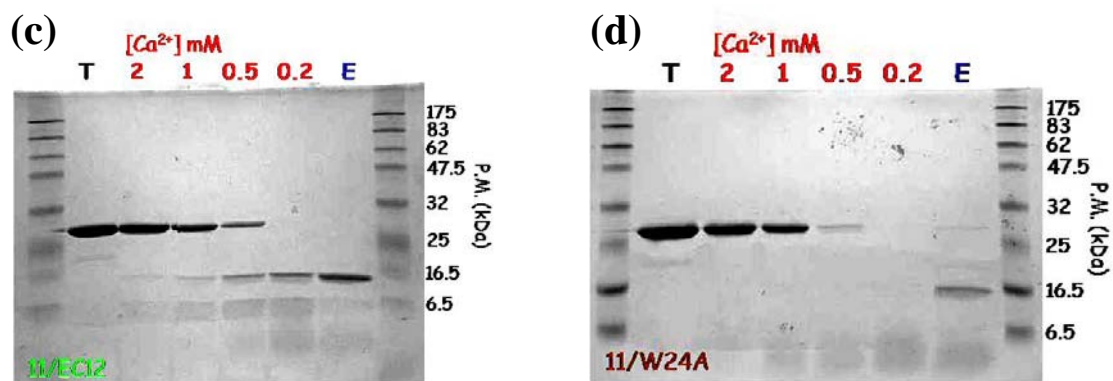
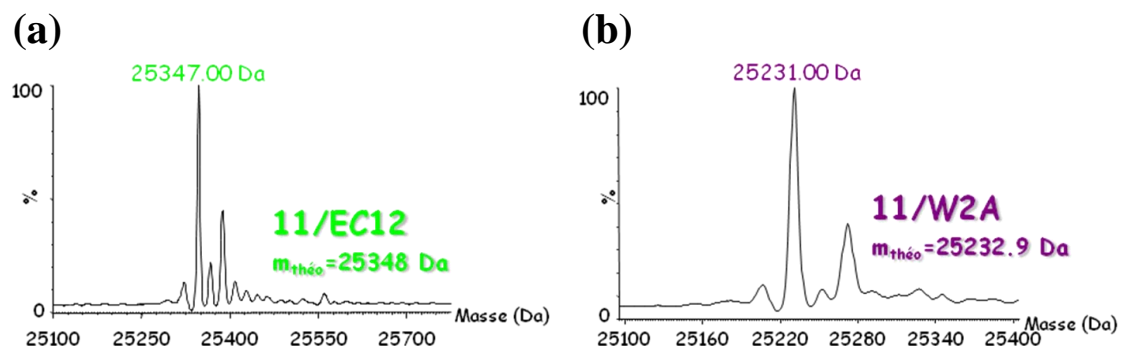


Figure 3

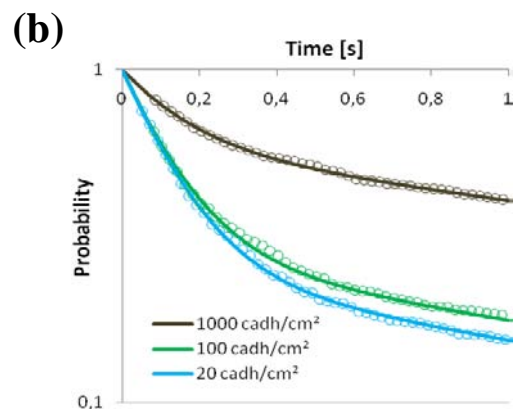
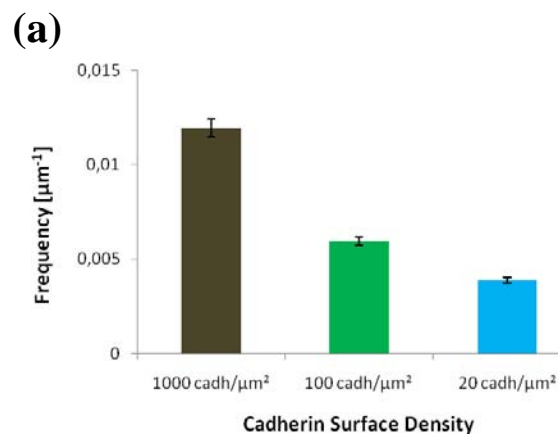


Figure 4

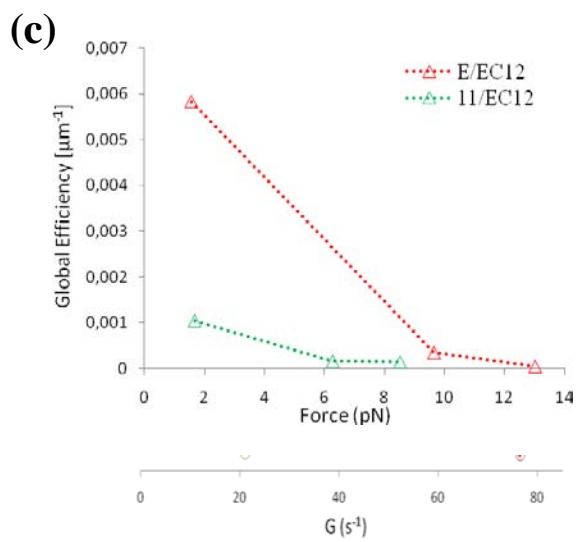
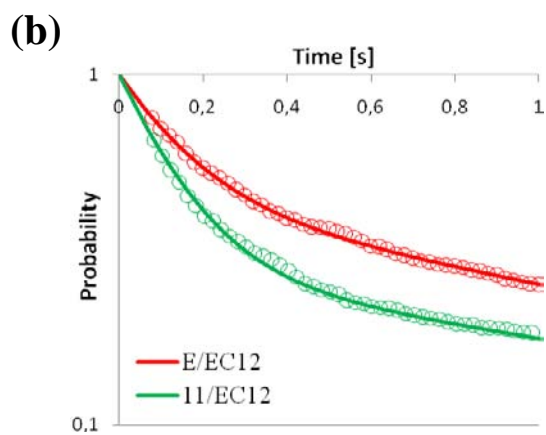
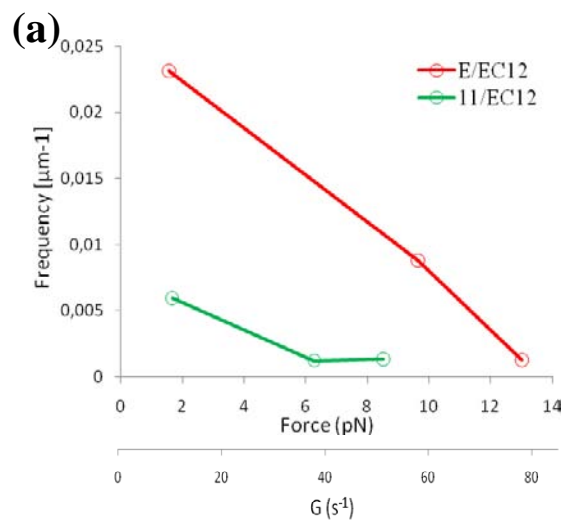
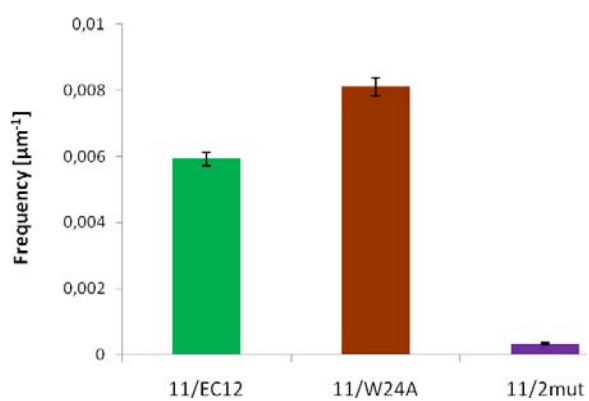
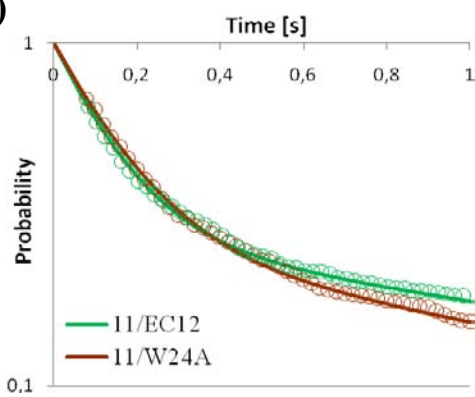


Figure 5

(a)



(b)



(c)

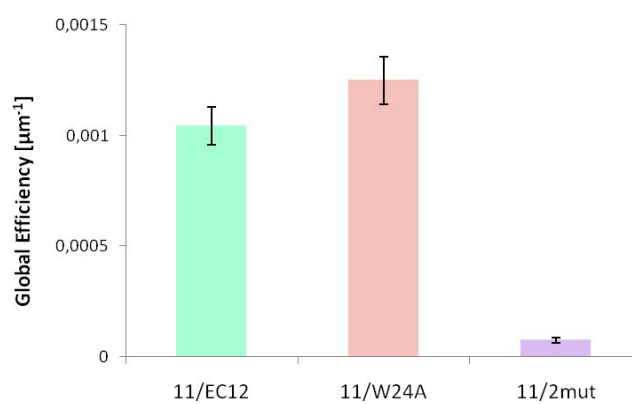
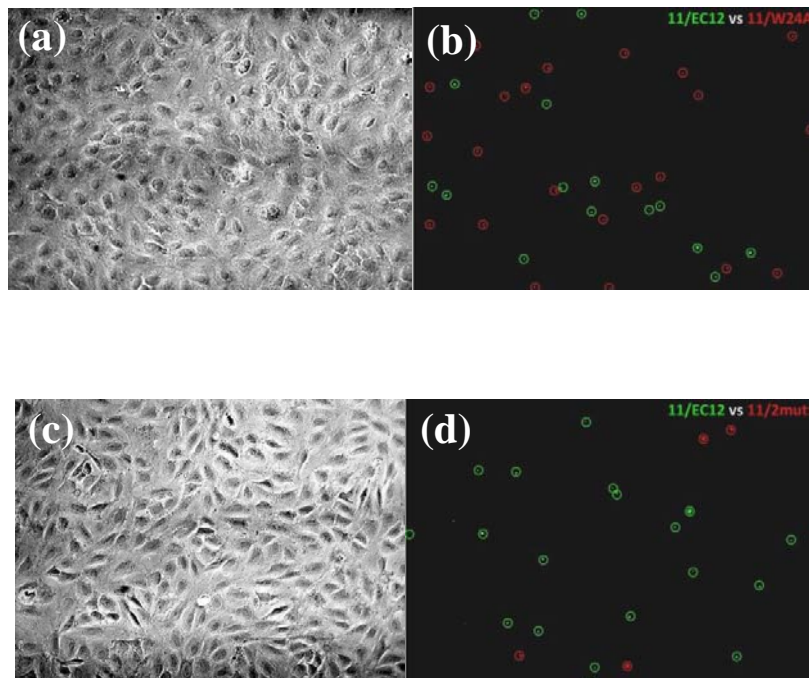


Figure 6



**ARTICLE III: SURFACES COVALENTLY COVERED WITH
E-CADHERIN TO IMPROVE CELL ADHESION EVENTS**

L'assemblage des jonctions adhérentes, l'activation de diverses voies de signalisation et le comportement cellulaire qui en résulte sont dépendants de l'organisation des récepteurs adhésifs à la membrane. Ceci a été extrêmement documenté pour les interactions cellule-matrice extracellulaire. En particulier, de très élégants travaux des groupes de Ingber et Withesides il y a une quinzaine d'années ont révélé les relations entre dimensions et nature de la surface d'attachement avec la différenciation cellulaire des hépatocytes. La fonctionnalisation des surfaces par la fibronectine a permis de décrypter la complexité des interactions cellule-matrice extracellulaire (MEC) et des échafaudages moléculaires qui sont mis en place (Xia et al, 2008). L'organisation des protéines de la MEC en îlots de tailles variables réorganise le cytosquelette, et la cellule adapte sa morphologie selon la nature des contacts. De même, sur des surfaces décorées de N-cadhérine, la cellule répond par la réorganisation des complexes cadhérines-caténines, la polymérisation de l'actine par activation de la voie PI3-kinase-Rac1, et l'extension de lamellipodes (Gavard et al, 2004). Plus récemment, des surfaces décorées de fragments de E-cadhérine (E/EC12) ont permis de montrer l'activation d'un facteur de transcription, Stat3, sensible à la présence du Trp2 (Arulanandam et al., 2009). Cette dernière étude souligne la complexité de la réponse cellulaire, et décrit les modulations de ces voies de signalisation en fonction de la maturation des jonctions.

Dans le but de mieux comprendre les processus de maturation des jonctions adhérentes, notre objectif est de préparer des surfaces biomimétiques avec un espacement contrôlé des molécules sur ces surfaces. La première étape pour la confection de substrats modèles a été de mettre au point un protocole simple, rapide, et bon marché pour immobiliser de manière orientée et covalente les protéines sur des surfaces. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire du Dr J. de la Fuente (INA, Saragosse, Espagne) où j'ai eu l'opportunité de passer 2 mois (octobre et novembre 2008) pour mettre au point cette chimie de surface.

Chaque étape du processus a été contrôlée par XPS (X-ray Photoelectron Spectrometry). L'efficacité de fixation a été montrée par microscopie confocale à fluorescence. Enfin par microscopie à force atomique (collaboration avec Dr M. Luna,

Madrid), nous avons imagé les surfaces fonctionnalisées, quantifié le recouvrement de 80% de la surface par les cadhérines et confirmé la nature covalente de la liaison.

Les fragments protéiques, après ce greffage, restent biologiquement actifs ; en effet, le comportement de cellules sur ces surfaces a été analysé. L'étude de la morphologie de ces cellules en microscopie électronique à balayage montre que leur étalement dépend de la nature de la surface. Les images par microscopie confocale révèlent une organisation du cytosquelette typique de l'interaction cadhérine.

Cette méthode de greffage pourra être exploitée pour différentes protéines. Par ailleurs la nécessité d'immobiliser les protéines de manière covalente et orientée est intéressante pour étudier l'adhésion, mais aussi pour le développement de biomatériaux stables, de biopuces, de biopiles, etc... C'est dans ce contexte que cette étude fait l'objet d'un dépôt de brevet actuellement en cours d'étude. Le manuscrit sera soumis pour publication dès que les démarches en cours pour dépôt de brevet déposées auprès des services de valorisation du CNRS et de l'Université de Saragosse le permettront.

Surfaces Covalently Covered with E-Cadherin

to Improve Cell Adhesion Events

Sébastien Chevalier¹, Carlos Cuestas-Ayllon², Valeria Grazu², Monica Luna³, Helene Feracci^{1} and Jesus M. de la Fuente^{2*}*

¹Université Bordeaux 1, CNRS UPR 8641, Centre de Recherche Paul Pascal, 115 Avenue Dr Schweitzer, 33600 Pessac (France)

²Instituto de Nanociencia de Aragon-ARAID, University of Zaragoza, Campus Rio Ebro, Edif. I+D, C/ Mariano Esquillor s/n, Zaragoza 50018 (Spain)

³Instituto de Microelectrónica de Madrid (IMM-CSIC), C/ Isaac Newton 8, PTM 28760 Tres Cantos, Madrid (Spain)

E-mail: feracci@crpp-bordeaux.cnrs.fr & jmfuente@unizar.es

ABSTRACT : This paper describes a novel method for the biofunctionalization of glass surfaces with polyhistidine tagged proteins. The innovation of this methodology consists in the covalent binding between the nitrilotriacetic acid (NTA) moiety and the proteins, ensuring the orientation and stability of the recombinant proteins on NTA-covered surfaces. In this work, as C-terminal poly-histidine tagged cadherin extracellular fragments have been used, this methodology guarantees the right orientation of the proteins for mimicking cell plasma membranes. These biofunctionalized surfaces have been characterized by confocal microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, contact angle and atomic force microscopy, showing a high density of the cadherins on the glass surface and the stability of the linkage. The so prepared materials exhibited a high tendency to promote cell spreading, demonstrating the functionality of the protein and the high utility of these biomaterials to promote cell adhesion events. This method, which allows the robust immobilization of polyhistidine tagged proteins with a defined orientation, may find particular usefulness in the making of protein biochips, for analysis of protein-protein interactions as well as structural and single-molecule studies.

KEYWORDS: Cadherin, Surface Modification, Biofunctionalization, Protein, Cell Adhesion

Introduction

Biofunctional surfaces are extensively used in therapeutics and diagnostics for cell-based assays (Falconnet et al, 2006; Geiger et al, 2009), tissue-engineering applications (Curtis & Riehle, 2001; Lutolf & Hubbell, 2005), biosensor developments (Jonkheijm et al, 2008; Wong et al, 2009), bioelectronics, and, more generally, for medical devices (Bettinger et al, 2009; Jonkheijm et al, 2008; Wong et al, 2009). The ideal biofunctional surface should be easy to prepare, characterize, amenable to design, biocompatible and efficient. In this regard, the incorporation of relevant biomolecules have been already reported going from proteins (They et al, 2005), peptides (Perret et al, 2002c), carbohydrates (Fuss et al, 2008; Schatz et al, 2009), oligonucleotides (Weisbrod & Marx, 2008), and others (de la Fuente et al, 2006; Song et al, 2009). Several strategies have been followed for the chemical modification of these biomaterials. Different approaches can be used to immobilize biomolecules, using covalent or noncovalent chemistry. However, both approaches have advantages and disadvantages. Covalent binding ensures a strong linkage between the biomolecules and the surface, however it requires the surface modification and it does not generally guarantee the right orientation of the biomolecules for complex molecules such as proteins. Such chemical binding of unmodified proteins most often leads to random orientation of the proteins onto reactive surfaces. On the other hand, unspecific adsorption constitutes a simple strategy for the biofunctionalization of surfaces, but it constitutes a binding very dependent of the media conditions (pH, ionic strength, temperature, etc.). Moreover, such uncontrolled interactions often induce protein unfolding and thus a decrease in activity.

The study of cell adhesion to biomaterials is a very important topic in tissue engineering. The interactions of cells with materials modulate the cellular response to implanted devices as well as cell culture supports (Chen et al, 1998; Stevens & George, 2005). Controlling cell adhesion on polymeric materials is a key issue for biomaterials. Biochemical data highlight the necessity of extracellular matrix (ECM) proteins in promoting cell adhesion through specific interactions. Cells, via integrins, bind to specific amino acid sequences on ECM proteins (RGD) present in fibronectin, vitronectin, and thrombospondin. These proteins provide an attachment network for the adhesion and growth of specific cells in vivo. Furthermore, cadherins are also involved in cell-cell adhesion events. Classical cadherins are transmembrane glycoproteins involved in controlling the specificity, organization and dynamics of cell adhesion, which is crucial for the development and maintenance of tissue architecture and function (Hartsock & Nelson, 2008; Larue et al, 1996a; Nishimura & Takeichi, 2009). Cadherins interact with other cell surface cadherins on neighbouring cells through their extracellular subdomain repeats (EC1 to EC5) (Patel et al, 2003b; Perret et al,

2002a; Perret et al, 2004). Their adhesive engagement initiates intracellular signals ranging from cytoskeletal organization to cell polarity, proliferation, or apoptosis that are communicated through the conserved cadherin tail domain to cytoplasmic pathways (Charrasse et al, 2002; Hartsock & Nelson, 2008; van Roy & Berx, 2008). The role of adhesion forces in the signalling process is yet to be understood due to the difficulty in the interpretation of biological responses involving dynamic and complex multi-molecular organizations (Thiery, 2003). On the biomaterial surfaces *in vitro*, the same mechanisms also apply. When foreign materials come into contact with body fluid or cell culture medium, the initial response is protein adsorption at the materials' surfaces. Thus, the materials interact with the cells through the adsorbed protein layer. The composition and structure of this protein layer play critical roles in determining subsequent cell behaviors (Arulanandam et al, 2009; Dupin et al, 2009; Ganz et al, 2006; Ostuni et al, 2009).

We describe in this paper an efficient, simple and straightforward procedure to prepare as a model system functionalized surfaces with cadherins. The developed protocol uses modified cadherin fragments with a poly-histidine tail at the C-terminal end of the proteins and silanized surfaces incorporating a metal chelator complex such as nitrilotriacetic acid (NTA) molecules. A two steps protocol has been developed. First, the chelation of the polyhistidine tails to the Ni^{2+} -NTA residues located at the surfaces through its high binding affinity will ensure a right orientation of the proteins incorporated to the surface. However, the poly-histidine-NTA interaction is highly dependent on pH, ionic strength and other media condition (Crowe et al, 1994; Schmitt et al, 1993). To guarantee a stable linkage to the surface, a second step has been proposed by an amide formation between amino groups from the histidine lateral chains and the carboxylated groups presented in the NTA. The so prepared biofunctional surfaces have been characterized by fluorescent microscopy, contact angle measurements and XPS. In AFM studies the stability of the protein immobilization process was visualized at the single-molecule level in height of the covering layer. These surfaces have also been proven as excellent adhesive platforms for cells presenting cadherins on their surfaces, confirming their potential capabilities as biomaterials to study cadherin-cadherin interactions using cellular models. Indeed, the total control over the orientation of the immobilized proteins on such surfaces without affecting their conformation and function optimizes the accessibility of proteins' active site. Because the polyhistidine tag is one of the most generically used affinity tag for ease of purification, this method provides the basis for numerous further applications for studies focusing on research targets at single-molecule levels and for nanobiotechnology. The homogeneous orientation and distribution of

immobilized proteins demonstrates the high quality of the designed surface and qualify its application in nano-scaled protein chip architectures.

Experimental section

Materials

Water used in the described reactions and for cleaning was obtained from a water purification system, MILLI-Q A10 from Millipore.

For the activation of glass supports, sulfuric acid (ACS reagent, 95-98%) and hydrogen peroxide (30%) were purchased from Sigma-Aldrich.

For the functionalization of glass supports with NTA-NH₂, (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane ($\geq 98\%$), N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid ($\geq 97\%$, TLC), dry toluene (99,8%), sodium carbonate ($\geq 99\%$) and sodium bicarbonate (99,7%) were purchased from Sigma-Aldrich.

For protein immobilization, nickel II chloride hexahydrate, Hepes ($\geq 99,5\%$), N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride crystalline, imidazole (ACS reagent, $\geq 99\%$) were purchased from Sigma-Aldrich. N-Hydroxysuccinimide ($\geq 97\%$) was purchased from Fluka. Sodium chloride (ultrapure, 5M) was purchased from Gibco. Ethylenediaminetetraacetic (EDTA, $\geq 99\%$) was purchased from Panreac.

For scanning electron microscopy, glutaraldehyde (25% in water) and hexamethyldisilazane (HDMS, $\geq 99\%$) were purchased from Sigma-Aldrich. Sodium cacodylate and osmium tetroxyde were purchased from Agar Scientific. Tannic acid was purchased from Fluka. Methanol (Spectralanal, $\geq 99,9\%$) was purchased from Riedel-de Haën. Uranyl acetate was purchased from Eloïse SARL.

For immunocytochemistry, formaldehyde, Triton X-100 and bovin serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich. Monoclonal anti-E-cadherin antibodies were purchased from BD Biosciences. Mouse anti-beta-catenin was purchased from Interchim.

All the chemicals were used as received.

Activation of Glass Supports

Glass supports were cleaned with piranha solution (H_2SO_4 and 30% H_2O_2 , 3:1) for 30 min at room temperature (RT). The slides were then rinsed several times with milli-Q water and dried under nitrogen.

Functionalization of Glass Supports with N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid (NTA-NH₂)

A 2% solution of 3-(2,3-epoxypropoxy) propyltrimethoxysilane in dry toluene was added overnight (ON) at RT onto the activated glass supports. After washing extensively with toluene and 10mM carbonate buffer pH 10.8, glass supports were incubated ON at RT with 25 mM NTA-NH₂ in carbonate buffer pH 10.8. The supports were then washed and dried.

Expression and Purification of the Hexahistidine Tagged cadherin fragments (E/EC12)

The mouse E-Cadherin extracellular fragment (MIEGR-E/EC12) corresponding to the two outermost cadherin modules bearing a C-terminal hexahistidine tag was produced as already described (Courjean et al, 2008). Briefly, the IEGR sequence was introduced in the plasmid construct of the cadherin fragment, in order to obtain the correctly cleaved cadherin fragment at the N-ter end. For production of this chimeric protein, 500 mL of Terrific Broth supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin was inoculated with a transformed colony and protein synthesis induced by IPTG. Cell pellet was resuspended in lysis buffer [4 M urea, 50 mM Na_2HPO_4 (pH 7.8), 20 mM imidazole, and 20 mM beta-mercaptoethanol]. The resulting lysate was cleared by centrifugation, and the supernatant was incubated for 2 h with Ni-NTA Superflow agarose resin beads (Qiagen). The beads were then thoroughly washed and subjected to stepwise dialysis against PBS. Factor Xa protease (Qiagen) digestion of MIEGR-E/EC12 was performed for 60 h at 16 °C and stopped by removing the enzyme with Xa Removal Resin (Qiagen). Finally the resulting E/EC12 fragments was then dialyzed against 20 mM Hepes and 150 mM NaCl (pH 7.0) in order to remove Ca^{2+} ions and the cleaved peptide. Protein purity was checked by SDS-PAGE, Western blotting and mass spectrometry (not shown).

Protein immobilization

The NTA-surfaces were then loaded with 100 mM NiCl₂ in aqueous solution to form the complexation environment for the hexahistidine motif. The cadherin fragment (0.1 mg/ml) was incubated at RT for 1 h and the surfaces were then extensively washed with 150mM NaCl, 20mM Hepes (pH 7.0).

Cadherin fragments were conjugated to the glass supports by cross-linking carboxyl groups of NTA to amino groups of the proteins, mediated by 50mM EDC, 75mM NHS, 20mM Hepes, (pH 7.0) solution, for 45 min at RT.

Non-covalently linked proteins were eluted by 1M Imidazole, 10mM EDTA in 150mM NaCl Hepes 20mM (pH 7.5). Samples were extensively rinsed with 150mM NaCl, 20mM Hepes (pH 7.0).

Contact Angle Measurements

The contact angle measurements were carried out using an easy drop commercial instrument (Krüss, Germany). MilliQ water (3 µL) was added onto each surfaces using a Hamilton syringe at 25°C. Three measurements were done per sample and the contact angle was calculated using the Sessile Drop Fitting Method.

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

XPS measurements were made using an ESCALAB 220-iXL spectrometer (Thermo-Electron, VG Company). Photoemission was stimulated by monochromatized Al K α radiation (1486.6eV). An area of about 150µm diameter was analyzed for each sample. Surveys and high-resolution spectra were recorded and then fitted with the Avantage processing program provided by ThermoFisher Scientific.

AFM characterization

The Atomic Force Microscopy analysis was performed using a commercial instrument (www.nanotec.es) operated in dynamic mode in liquid (PBS+Ca²⁺ or milli-Q H₂O). To characterize the samples with covalently bound cadherins we used cantilevers with a nominal force constant of 2.8 N/m (www.nanosensors.com). To be able to image the proteins in the

samples that cadherins were not covalently bound to the surface we needed softer cantilevers with a force constant of 0.03 N/m (BioLevers, www.olympus.com).

Cell culture

The normal mouse mammary epithelial cell line HC11 has been described (Wojcik et al, 2006) and was kindly provided by Dr. L. Raptis (Kingston, ON Canada). These cells were used to assay the cell attachment onto cadherin-coated surfaces. Cells were grown in RPMI (Gibco) supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin G, and 100 mg/ml streptomycin, insulin, EGF. Cell culture was conducted at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

For cell attachment assay, the cadherin-coated samples were cultured in 24-well tissue-culture test plates. Cells were seeded on the coated surfaces at a density of 1.2×10^6 cells/ml and cultured for up to 2h30. At each culture period (0.5, 1, 1.5 and 2.5 h), samples were taken out to new tissue-culture plates.

Scanning electron microscopy

Cells were cultured on treated glass coverslips for the indicated periods of time before cells were washed with cacodylate buffer and fixed with 2.5% glutaraldehyde (Sigma) in 0.1 M Na cacodylate pH 7.4 for 90 min at 4°C. Samples were then treated with 1% osmium tetroxide, 1% tannic acid then dehydrated with a series of graded methanol/water baths, stained in 2% uranyl acetate in 70% methanol before critical-point drying with HMDS. The samples were sputter coated with gold and observed with a Jeol JSM 6700F Field Emission Scanning Electron Microscope operated at 5 kV.

Immunocytochemistry

HC11 cells were seeded on coverslips at a subconfluent density and incubated for different periods of time. Cells were fixed in 4% formaldehyde in PBS for 20 minutes, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 minutes, washed in PBS, blocked for 10 minutes in PBS containing 0.2% BSA, and stained with the appropriate antibodies. The cells were incubated for 1 h with primary antibodies, washed and incubated with secondary antibodies for 1 h. Monoclonal anti-E-cadherin antibody against the cytoplasmic tail (BD Biosciences) and

mouse anti- β -catenin (clone 14, Transduction Laboratories, Interchim) were used at a 1:25 and 1:100 dilution respectively made with PBS containing 0,2% BSA. Images were obtained with a laser-scanning confocal microscope (Leica DMR upright TCS SP2 AOBS).

Results and Discussion

Surface bio-functionalization is a very important and competitive field in biochemistry. Several routes have been designed for modifying different types of materials and/or linking bio-macromolecules to these surfaces. However, most of them fail to link these molecules covalently and in an oriented manner. Here we present a simple glass surface modification, using the well-known Ni-NTA technology, which for the first time fulfils these double criteria, and furthermore could be extended to a broad type of different materials.

Glass support modifications with Nitrilotriacetic Acid (NTA)

Glass has been used as model material due to extensive use for cell culture. The first step of this functionalization was to remove all the organics residues from the glass supports, in order to correctly graft the epoxysilane on the surface, as described in the Experimental section. As shown in **Scheme 1**, a two step method has been used: i) first, coating of the glass support with 3-(2,3-epoxypropoxy) propyltrimethoxysilane; ii) then linkage, through the epoxy group, of the (*S*)-*N*-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid (NTA-NH₂). The grafting of the epoxysilane was performed with dry toluene to avoid gel formation of the silanes. The epoxy groups on the surface guarantee an efficient reaction with the amine group of the NTA at basic pH (10.8). At this pH, the amine of the NTA easily opens the epoxy group in a high molar ratio. Finally, samples were incubated with a 100mM NiCl₂ solution to chelate the metal ion into the NTA moiety.

Contact angle measurements have been carried out to monitorize the functionalization process. These data can provide useful information about the structure and composition of a surface by examining their wettability after the different chemical treatments. After cleaning the glass samples with piranha solution, contact angle changed from 62° to near 0° due to the appearance of hydroxyl groups on the glass surface using these oxidative conditions. After the silanization using 3-(2,3-epoxypropoxy) propyltrimethoxysilane, the contact angle changed to 54°. Finally, incorporation of NTA moieties originated the decreasing of the contact angle to

36° due to the appearance of carboxylic groups on the glass surface, and therefore the increase of the hydrophilicity of the surface.

Hexahistidine tagged proteins immobilization

A very convenient and common way for purifying recombinant proteins is to modify their terminal end with a polyhistidine tag, and immobilize them to a Ni-NTA support. We developed the same strategy for attaching 6xHis cadherins recombinant fragments to glass supports (**figure 1**). The orientation of the proteins on the supports will be driven by the position of the histidine tag in the protein sequence. Cadherins amino groups in the polyHistidine tag proximity were then crosslinked to the NTA carboxyl groups mediated by the EDC/NHS, resulting in a simple and novel method for binding 6xHis tagged proteins in an oriented and covalent manner. An EDTA/Imidazole mixture was used to remove Ni²⁺ ions, and subsequently eliminate the non-covalently linked proteins (**figure 2a and b**).

In order to check the efficiency of the cadherin binding, we hid half of the glass support with a fresh and clean piece of polydimethylsiloxane (PDMS). Cadherins fragments were incubated on the non-hidden part of the supports then the non-covalently linked proteins eliminated as it was previously described. The protein remaining on the surface was visualized by immunofluorescence using a fluorescently labelled anti-cadherin antibody and confocal microscopy. As shown in **figure 2c**, cadherin fragments were indeed detected only on half of the glass supports.

XPS analysis was performed to determine the surface elemental composition for each of the modification steps used in this study. The analysis confirmed the coupling of NTA to the glass surface (addition of carbon and nitrogen) and the cadherin incorporation (addition of carbon and nitrogen) (**table 1**).

Atomic Force Microscopy (AFM) has confirmed the formation of covalent bonds using this strategy, at the single-molecule level in height of the protein covering layer. **Figure 3a** shows an image of the covalently bound cadherins. The surface protein coverage is high (about 80 % of the surface area) and shows the expected height with respect the Ni²⁺-NTA surface (8-9 nm) as can be observed in the profile. However, when we tried to image the non-covalently bound protein sample we always wiped out the protein from the surface even for operation conditions in which we tip exerted minimum interaction force. We were not able to observe the protein in the non-covalently bound surface (**Figure 3b**) until we used a cantilever about 100 times softer than the ones used for the covalent sample. The surface coverage is low

(about 15%) but the protein height is the expected one (8-9 nm), as it is shown in the profile. Still, if we increased the tip-sample interaction by just a few percent of the amplitude reduction we managed to sweep away the protein from the scanning area (dashed square marked in fig. 3d) as can be observed when a larger zoomed out image is taken (**figure 3d**). Images of control samples NTA+Ni (**figure 3c**) and bare glass slide surface in purified H₂O showed the expected roughness and no agglomerates adsorbed.

Adhesion of cells to bio functionalized glass supports

Cadherins participate in cell-cell contacts, especially in the specific cell adhesion mechanisms mediated by the highly homophilic interactions they establish and which define cell-cell selectivity. We choose E-cadherin fragment E/EC12 to cover our glass surfaces and promote the adhesion of HC11 cells, which also express E-cadherin (Arulanandam et al, 2009).

For this purpose, we seeded HC11 cells, a mouse mammary epithelial cell line, on glass slides modified or not with our mouse E-cadherin fragments and followed their kinetics of attachment from 30 min up to 2h30. We observed by phase contrast microscopy that after 30 minutes, cells seem to gently adhere to the surfaces. Cell density was low at early time points and increased with time. The attachment of HC11 cells was similar of both surfaces (not shown), which is most probably due to the dynamic properties of cadherin trans interaction. Indeed E/EC12 adhesive interactions that last for 0.1s to 1 sec (Perret et al., 2002; 2004) do not appear to have a major influence on attachment efficiency.

We then investigated the influence of cadherin surfaces on cell spreading. By phase contrast microscopy we observed that cells plated onto cadherin-decorated glass slides, were mostly round at early time points then developed membrane extensions with time. These extensions were clearly less numerous on control NTA-surfaces (not shown). To gain information about these cell-surface contacts, cell morphology was analyzed using Scanning Electron Microscopy (SEM). After different incubation times, cells were fixed with glutaraldehyde and treated with contrast agents. As shown in figure 4, analysis at higher magnification revealed that after 30 min plating on cadherin-coated surfaces, cells begin to establish contacts with some membrane extensions. After 1 hour incubation, although most cells were still round, we could also observe that some adhere in a stronger manner on the surfaces. After 1h30 and 2h30 plating, many cells were well spread even though some still exhibited a round shape. As shown in **figure 4**, cells responded to our cadherin-decorated surfaces as large membrane extensions were visible after 2h30, indicating that cells interact strongly with the substrate.

Cells on control supports without cadherins behave on a different manner. After 2h30, few cells begin to spread, and most of them showed a round shape. Zoom at higher magnification shows that cells did not engage significant membrane extension to enhance their adhesiveness to the surface.

To further analyze the impact of surface functionalization, we used confocal microscopy. We compared E-cadherin and actin distribution in HC11 cells adherent on surfaces covalently decorated by cadherin fragments or NTA- surfaces (**figure 5**). We observed after 1h30 similar topography as described in the SEM experiments: when the cells are cultured on cadherin substrates, many HC11 cells were well spread and few still adopt a round shape. On these spread cells, the distribution of actin cytoskeleton was most dense at the cell periphery whereas cadherins were more uniformly distributed on the cell surface. On cells attached to cadherin surfaces and exhibiting a round shape (**figure 5b**), fluorescent labeling highlighted that the actin cytoskeleton was characterized by a circular network of filaments surrounding the nucleus, together with radial fibers directed towards and ending in the edge of the cell, as already described (Gavard et al, 2004). In the X-Z and Y-Z plans, cadherins were distributed on the contact area on spread cells, and form clusters on round cells.

As observed by SEM, cells did not spread on substrates with no cadherin functionalization. Nearly all cells were round with uniform cadherin distribution (**figure 5d, e, f**). Actin did not form typical cytoskeleton patterns controlled by cadherins as in **figure 5b**. Finally, X-Z and Y-Z sections showed that cadherins have no preferential localization and that actin distribution is uniform around the cells, delimiting their profiles.

Conclusions

Covalent and oriented attachment of proteins on surfaces is a very challenging field of biochemistry and cell biology. We have designed a fast and inexpensive method for the immobilization of oligohistidine tagged proteins by exploiting the high recognition of this motif to the metal chelator nitrilotriacetic acid (NTA). Our technology could also be adapted to a broad type of different materials. The use of NTA technology may be extended to any type of 6xHis tagged proteins, and could be a great development for biochips, biosensors, substrates for cell adhesion, etc...Most importantly, this method is compatible with a large set of fusion proteins while maintaining their integrity, native conformation and biological function. The protein immobilization on the surface is controlled with respect to selectivity:

indeed the orientation of the biomolecule on the surface is preferentially driven by the position of the histidine tag.

ACKNOWLEDGMENTS : This work was supported by institutional funding from CNRS, as well as by grants from ARC (subvention libre), Région Aquitaine, Fondation pour la Recherche Médicale, la Ligue Contre le Cancer (Dordogne) (HF), MITYC (Spain) through the projects CTQ2005-07993-C0202/BQU, NAN2004-09125-C07-02 and PET2007_0315. M. L. acknowledges financial support from CSIC. During this work, S.C. received a doctoral fellowship from Région Aquitaine. JMF thanks ARAID and CCA thanks MITYC for financial support. We thank L. Malicieux, C. Poujol and P. Legros (PICIN, Université Bordeaux 2) and R. Vallée (CRPP) for their help with the confocal microscopy, C. Labrugère (ICMCB, Bordeaux) and JP Salvetat (CRPP) for XPS measurements and Elisabeth Sellier (CREMEM, Université Bordeaux 1) for scanning electron microscopy.

References:

- Arulanandam R, Vultur A, Cao J, Carefoot E, Elliott BE, Truesdell PF, Larue L, Feracci H, Raptis L (2009) Cadherin-cadherin engagement promotes cell survival via Rac1/Cdc42 and signal transducer and activator of transcription-3. *Mol Cancer Res* **7**(8): 1310-1327
- Bettinger CJ, Langer R, Borenstein JT (2009) Engineering substrate topography at the micro- and nanoscale to control cell function. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**(30): 5406-5415
- Charrasse S, Meriane M, Comunale F, Blangy A, Gauthier-Rouviere C (2002) N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *J Cell Biol* **158**(5): 953-965
- Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE (1998) Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnol Prog* **14**(3): 356-363
- Courjean O, Chevreaux G, Perret E, Morel A, Sanglier S, Potier N, Engel J, van Dorsselaer A, Feracci H (2008) Modulation of E-cadherin monomer folding by cooperative binding of calcium ions. *Biochemistry* **47**(8): 2339-2349
- Crowe J, Dobeli H, Gentz R, Hochuli E, Stuber D, Henco K (1994) 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* **31**: 371-387

- Curtis A, Riehle M (2001) Tissue engineering: the biophysical background. *Phys Med Biol* **46**(4): R47-65
- de la Fuente JM, Andar A, Gadegaard N, Berry CC, Kingshott P, Riehle MO (2006) Fluorescent aromatic platforms for cell patterning. *Langmuir* **22**(13): 5528-5532
- Dupin I, Camand E, Etienne-Manneville S (2009) Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity. *J Cell Biol* **185**(5): 779-786
- Falconnet D, Csucs G, Grandin HM, Textor M (2006) Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials* **27**(16): 3044-3063
- Fuss M, Luna M, Alcantara D, Fuente JM, Penades S, Briones F (2008) Supramolecular self-assembled arrangements of maltose glyconanoparticles. *Langmuir* **24**(9): 5124-5128
- Ganz A, Lambert M, Saez A, Silberzan P, Buguin A, Mege RM, Ladoux B (2006) Traction forces exerted through N-cadherin contacts. *Biol Cell* **98**(12): 721-730
- Gavard J, Lambert M, Grosheva I, Marthiens V, Irinopoulou T, Riou JF, Bershadsky A, Mege RM (2004) Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. *J Cell Sci* **117**(Pt 2): 257-270
- Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(1): 21-33
- Hartsock A, Nelson WJ (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* **1778**(3): 660-669
- Jonkheijm P, Weinrich D, Schroder H, Niemeyer CM, Waldmann H (2008) Chemical strategies for generating protein biochips. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**(50): 9618-9647
- Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V, Dominis M, Kemler R (1996) A role for cadherins in tissue formation. *Development* **122**(10): 3185-3194
- Lutolf MP, Hubbell JA (2005) Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* **23**(1): 47-55
- Nishimura T, Takeichi M (2009) Remodeling of the adherens junctions during morphogenesis. *Curr Top Dev Biol* **89**: 33-54
- Ostuni E, Whitesides GM, Ingber DE, Chen CS (2009) Using self-assembled monolayers to pattern ECM proteins and cells on substrates. *Methods Mol Biol* **522**: 183-194
- Patel SD, Chen CP, Bahna F, Honig B, Shapiro L (2003) Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol* **13**(6): 690-698

Perret E, Benoliel AM, Nassoy P, Pierres A, Delmas V, Thiery JP, Bongrand P, Feracci H (2002a) Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *EMBO J* **21**(11): 2537-2546

Perret E, Leung A, Feracci H, Evans E (2004) Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16472-16477

Perret E, Leung A, Morel A, Feracci H, Nassoy P (2002b) Versatile Decoration of Glass Surfaces To Probe Individual Protein-Protein Interactions and Cellular Adhesion. *Langmuir* **18**(3): 846-854

Schatz C, Louguet S, Le Meins JF, Lecommandoux S (2009) Polysaccharide-block-polypeptide copolymer vesicles: towards synthetic viral capsids. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**(14): 2572-2575

Schmitt J, Hess H, Stunnenberg HG (1993) Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol Biol Rep* **18**(3): 223-230

Song YF, McMillan N, Long DL, Kane S, Malm J, Riehle MO, Pradeep CP, Gadegaard N, Cronin L (2009) Micropatterned surfaces with covalently grafted unsymmetrical polyoxometalate-hybrid clusters lead to selective cell adhesion. *J Am Chem Soc* **131**(4): 1340-1341

Stevens MM, George JH (2005) Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* **310**(5751): 1135-1138

They M, Racine V, Pepin A, Piel M, Chen Y, Sibarita JB, Bornens M (2005) The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol* **7**(10): 947-953

Thiery JP (2003) Cell adhesion in development: a complex signaling network. *Curr Opin Genet Dev* **13**(4): 365-371

van Roy F, Berx G (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* **65**(23): 3756-3788

Weisbrod SH, Marx A (2008) Novel strategies for the site-specific covalent labelling of nucleic acids. *Chem Commun (Camb)*(44): 5675-5685

Wojcik EJ, Sharifpoor S, Miller NA, Wright TG, Watering R, Tremblay EA, Swan K, Mueller CR, Elliott BE (2006) A novel activating function of c-Src and Stat3 on HGF transcription in mammary carcinoma cells. *Oncogene* **25**(19): 2773-2784

	C	O	N
Glass Slide	12,4	60,3	0,4
Glass- NTA-NH₂	18,9	52,95	1,9
Glass-NTA-EC12 covalent link	36,9	36,95	4,85

Table 1: Average of XPS results. Slides were cleaned, silanized and covered with NTA-NH₂. These surfaces were then biofunctionalized with hexahistidine-tagged E/EC12 fragments that were or not covalently linked. Following E/EC12 incubation, surfaces were extensively washed with [Imidazole 1M/EDTA 10mM], in order to eliminate non-covalently bound proteins.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Covalent and oriented crosslinking of Histidine-tagged cadherin fragments onto NTA surfaces. The C-ter hexaHis-tagged cadherin fragments were first immobilized using the well known Ni-NTA technology in an orientated manner. Then the proteins were crosslinked to the carboxylic groups of the NTA moiety, mediated by EDC and NHS.

Figure 2: Immunodetection of covalently linked cadherin fragments onto NTA surfaces. Confocal microscopy of glass supports either covalently (a) or non-covalently (b) coated with hexaHistidine-cadherin fragments. Both types of surfaces were treated with imidazole/EDTA to eliminate non covalently bound proteins. Only covalently immobilized cadherin fragments remained bound. Finally, glass support covered half with (+) and half without (-) cadherins (mask was made with polymerized PDMS) indicating the labeling specificity (c). Scale bare = 50µm.

Figure 3: Dynamic Atomic Force Microscopy analysis of surfaces. Images of the functionalized surfaces were taken under the same buffer conditions (PBS+Ca+Mg). (a) The coverage of the covalent bound protein is around 80%, with a coverage height of a single protein (~9 nm), as it is shown in the profile. The coverage of non-covalently bound protein (b) is about 15%, with a height corresponding also to the one of a single protein. By slightly increasing the interaction force between tip and sample on the of non-covalently bound protein sample, the protein is easily swept away, as can be observed in the dashed square marked in (d) which appears depleted from protein after just one scan under these somewhat lower amplitude operating conditions. Fig. c shows the surface of a control sample NTA+Ni. The surface exhibits a flat profile within a few Å of height.

Figure 4: Dynamic cell spreading depends on surfaces biofunctionalization. HC11 cells were plated for different periods of time onto NTA-coated glass slides covalently decorated or not with cadherin fragments, as indicated on the images. Extent of adhesive contacts was visualized by scanning electron microscopy.

Figure 5: HC11 cells were allowed to adhere on NTA-coated (d, e, f) or E-cadherin covalently coated (a, b, c) coverslips for 1h30 in the absence of serum to avoid integrins and growth factor receptors activation. Cells were then fixed, permeabilized then stained for cadherin (green, a, d), actin (red, b, e) and DNA (blue, c, f in the merge images) and observed by confocal laser scanning microscopy. On cadherin-surfaces, many cells are well spread and exhibit a large number of membrane tethers involving cadherin contacts and actin fibers exhibit the typical radial organization driven by cadherin attachments. Very few contacts are observed on NTA-surfaces (d, e, f). Corresponding orthogonal sections in the x-z and y-z axis are shown beside, clearly indicating differences in spreading and height of cells on different surfaces. Round cells and spread cells are about 13-15 and 6-8 μm height respectively. Scale bar: 15 μm .

Scheme 1

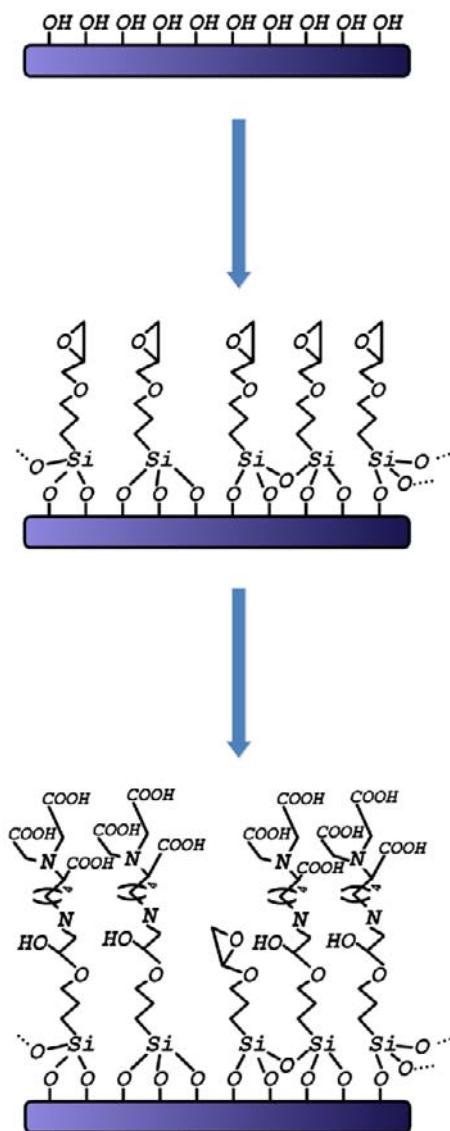


Figure 31

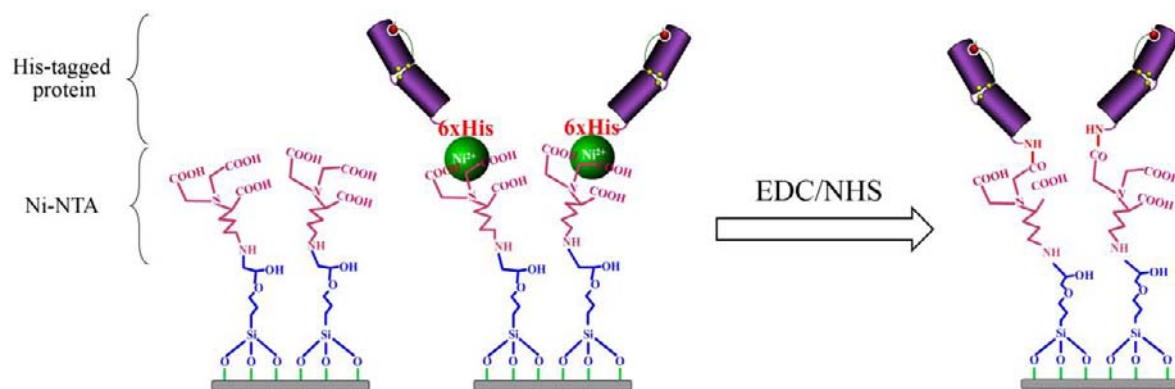


Figure 32

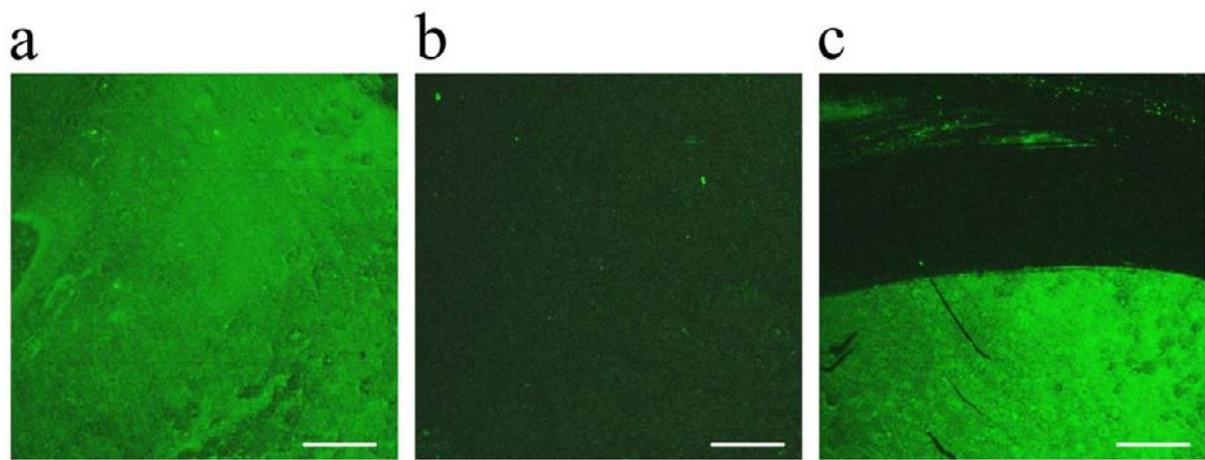


Figure 33

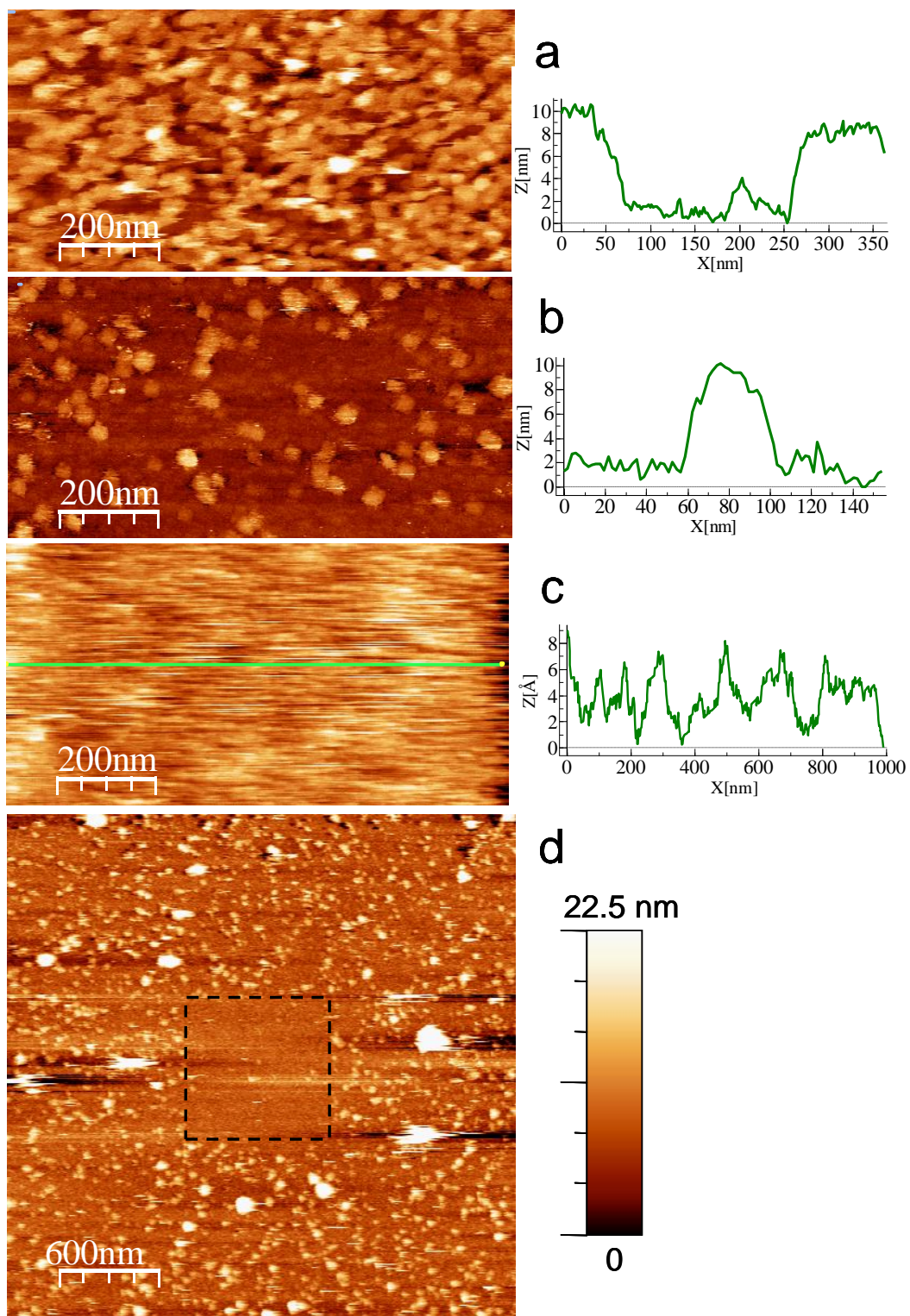


Figure 34

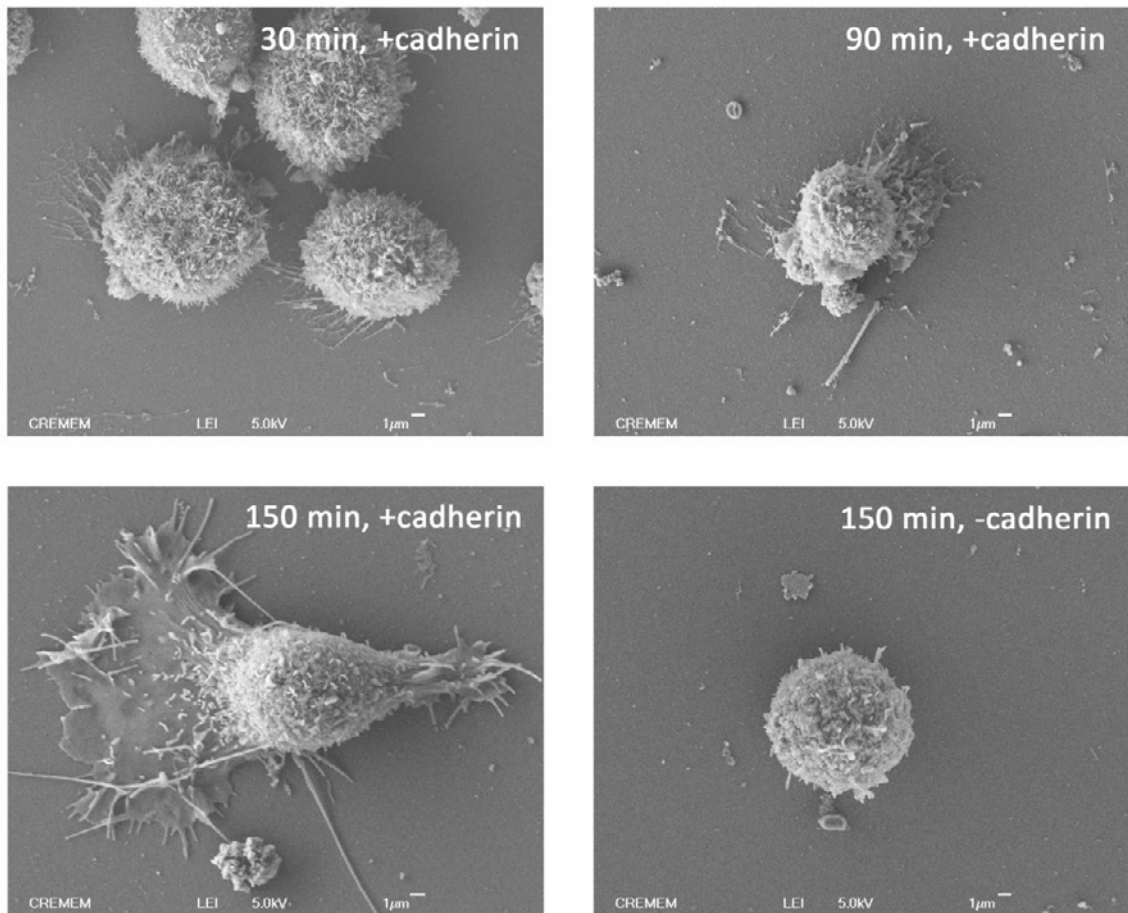
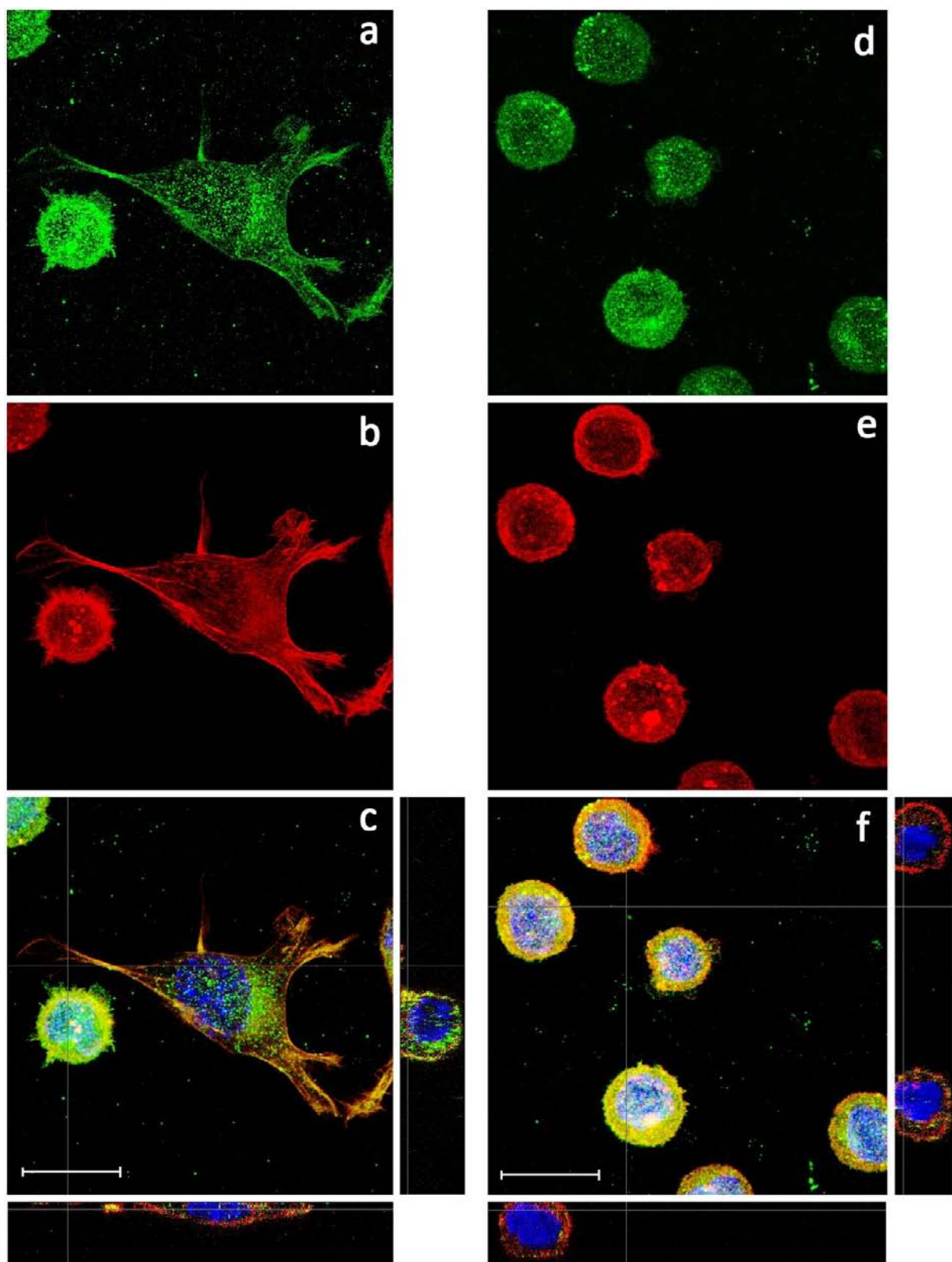


Figure 35



**ARTICLE IV: BEYOND STRUCTURE, TO SURVIVAL:
ACTIVATION OF STAT3 BY CADHERIN ENGAGEMENT**

Une très abondante littérature décrit les fonctions adhésives des cadhérines, aussi bien *in vivo* (Gumbiner, 2005; Takeichi, 1988b), que *in vitro* au niveau cellulaire (Foty & Steinberg, 2004) et au niveau moléculaire (Leckband, 2004; Patel et al, 2003b). L'engagement adhésif des cadhérines, par la mise en place de jonctions cellule-cellule, contribue à remodeler le cytosquelette d'actine, la morphologie cellulaire et à réguler différentes voies de signalisation (Arulanandam et al, 2009; Mege et al, 2006; Nelson, 2008; Philippova et al, 2009; van Roy & Berx, 2008).

Le groupe du Pr L. Raptis avec lequel nous collaborons s'intéresse tout particulièrement au transducteur du signal Stat3 (Signal transducer and activator of transduction-3) et a montré que son activation était corrélée à la formation de contacts cellule-cellule. En ensemençant des cellules épithéliales sur des surfaces fonctionnalisées par les fragments E/EC12 de façon non orientée (via la polylysine et le glutaraldéhyde), les auteurs ont montré que, même en absence de contacts cellule-cellule, l'engagement direct des cadhérines induit une très nette augmentation de l'activation de Stat3, de Rac1/Cdc42 et de la famille du récepteur de l'IL6 (Arulanandam et al., 2009). Cet effet est inhibé par l'addition de fragments de cadhérines solubles ou après ablation génétique. Cette activation de Stat3 pourrait jouer un rôle dans la survie cellulaire et contribuer à l'établissement de la polarité cellulaire.

Le travail présenté ici est une synthèse sur l'état de l'art de l'activation de Stat3 par les cadhérines.

Beyond structure to survival: activation of Stat3 by cadherin engagement

Leda Raptis, Rozanne Arulanandam, Adina Vultur, Mulu Geletu, Sebastien Chevalier, and Helene Feracci

Abstract: Cells in normal tissues or in tumors have extensive opportunities for adhesion to their neighbors and the importance of cell to cell contact in the study of fundamental cellular processes is beginning to emerge. In this review, we discuss recent evidence of dramatic changes in the activity of an important signal transducer found to be profoundly affected by cell to cell adhesion, the signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3). Direct cadherin engagement, growth of cells to postconfluence, or formation of multicellular aggregates were found to induce a striking increase in the levels of Stat3 activity, Rac1/Cdc42, and members of the IL6 receptor family in different settings. This activation was specific to Stat3, in that the levels of the extracellular signal regulated kinase (Erk1/2), a signal transducer often coordinately activated with Stat3 by a number of growth factors or oncogenes, remained unaffected by cell density. Density-dependent Stat3 activation may play a key role in survival, and could contribute to the establishment of cell polarity. It is clear that at any given time the total Stat3 activity levels in a cell are the sum of the effects of both cell to cell adhesion and the conventional Stat3 activating factors present.

Key words: Stat3, E-cadherin, Rac1/Cdc42, signal transduction, cell survival.

Résumé : Les cellules des tissus normaux ou tumoraux ont de multiples occasions d'adhérer à leurs voisins et l'importance des contacts cellulaires dans l'étude des processus cellulaires fondamentaux commence à émerger. Dans cet article de synthèse, nous discutons des preuves des changements dramatiques qui surviennent dans l'activité d'un important transducteur de signaux profondément affecté par l'adhésion cellulaire, Stat3 (« signal transducer and activator of transcription-3 »). L'engagement direct des cadhérines, la croissance des cellules post-confluentes ou la formation d'agrégats multicellulaires induisent une augmentation remarquable des niveaux de l'activité de Stat3, de Rac1/Cdc42 et de la famille du récepteur de l'IL-6, dans différentes conditions. Cette activation était spécifique à Stat3, car les niveaux de la kinase Erk1/2 (« extracellular signal regulated kinase »), un transducteur de signaux souvent activé de façon coordonnée avec Stat3 par plusieurs facteurs de croissance ou oncogènes, n'étaient pas affectés par la densité cellulaire. Cette activation de Stat3 dépendante de la densité pourrait jouer un rôle clé dans la survie et elle pourrait contribuer à l'établissement de la polarité cellulaire. De toute façon, il est clair qu'à n'importe quel moment donné, les niveaux totaux d'activité de Stat3 dans une cellule sont la somme des effets de l'adhésion cellule-cellule et de ceux des facteurs conventionnels d'activation de Stat3 présents.

Mots-clés : Stat3, E-cadhérine, Rac1/Cdc42, signaux de transduction, survie cellulaire.

Introduction

Cells in both normal tissues and tumors have extensive

opportunities for adhesion to their neighbors in a three-dimensional organization, and it has recently become apparent that in the study of fundamental cellular processes, such as mitogenesis, survival, or differentiation, it is important to take into account the effect of surrounding cells. Adhesion is mediated by specific receptors, which regulate cell architecture as well as intracellular signalling. Dense cell cultures, albeit only two dimensional, may in part mimic some of the physiological stress signals that occur in fast-growing tumors. Indeed, many of the cells in tumor nests lack direct interaction with surrounding connective tissue and may depend on survival signaling generated by cell-cell contacts. Not surprisingly, the world of cells growing at high densities in two dimensions is, in some cases, dramatically different from the world of

Received 1 May 2009. Revision received 8 July 2009. Accepted 14 July 2009. Published on the NRC Research Press Web site at ccb.nrc.ca on .

L. Raptis,¹ R. Arulanandam, A. Vultur, and M. Geletu. Department of Microbiology and Immunology, Department of Pathology and Molecular Medicine, and Cancer Research Institute, Queen's University, Kingston, ON K7L 3N6. S. Chevalier and H. Feracci. Université Bordeaux 1, Centre de Recherche Paul Pascal, CNRS UPR 8641, 33600 Pessac, France.

¹Corresponding author (e-mail: raptisl@queensu.ca).

cells dividing peacefully at subconfluence, as revealed by their gene expression patterns. In this review, we aim to address this issue by focusing on one important signal transducer found to be profoundly affected by cell density, the signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3), along with some of its partners.

The STAT proteins were initially identified by their ability to mediate the effects of interferons and other cytokines, by coupling signalling events at the cell surface with direct gene regulation. Seven STAT proteins have thus far been identified, and two of them, Stat3 and Stat5, appear to play a role in cancer (reviewed in (Yu and Jove 2004)). Stat3 can be activated by cytokines of the IL6 family, as well as by a number of polypeptide growth factor receptors with intrinsic tyrosine kinase activity such as the receptors for PDGF or EGF, and non-receptor kinases such as Src family members (Fig. 1A). Like the other STAT proteins, Stat3 is present in the cytoplasm under basal conditions. Following ligand stimulation, Stat3 binds to specific phosphotyrosine sequences of the receptor through its Src homology-2 (SH2) domain, and it is phosphorylated by the receptor itself or the associated Jak or Src kinases on a single phosphotyrosine, tyr705. This phosphorylation triggers Stat3 dimerization via reciprocal phosphotyrosine – SH2 domain interactions. Translocation into the nucleus follows, where Stat3 binds to a 9 bp sequence in the regulatory region of target genes (TTCNNGGAA), thereby regulating transcription. Stat3 has been shown to upregulate genes encoding apoptosis inhibitors such as Bcl-xL, Mcl-1, and survivin (Amin et al. 2004; Gritsko et al. 2006), cell-cycle regulators such as cyclin D1 and Myc (Zhang et al. 2003), the cyclin dependent kinase inhibitor p21^{CIP1/WAF1} (Sinibaldi et al. 2000), the hepatocyte growth factor (Hung and Elliott 2001), as well as angiogenesis inducers such as VEGF (Niu et al. 2002). Although STAT proteins have been associated with transcriptional activation, as indicated by their name, Stat3 can also repress transcription, e.g., from the p53 promoter (Niu et al. 2005) (Fig. 1A).

The activation of Stat3 by growth factors or oncogenes has been recently reviewed (Yang and Stark 2008; Frank 2007; Germain and Frank 2007). In addition to these mechanisms, a novel pathway of Stat3 activation has recently emerged (Fig. 1B); work from a number of laboratories has revealed a dramatic increase in Stat3 phosphorylation and activity with cell density. Cells grown to post-confluence, or forced to form multicellular aggregates, were found to display a dramatic increase in Stat3-tyr705 phosphorylation, DNA binding, and transcriptional activity (Kreis et al. 2007; Vultur et al. 2004; Onishi et al. 2008; Su et al. 2007; Steinman et al. 2003). Given the generally accepted positive role of Stat3 in cell proliferation, the increase in Stat3 activity post-confluence, when the cells do not divide, was an unexpected observation. The peak of activation was at densities beyond 100% confluence, defined as the state where the whole plate is covered with cells, and it generally declined slightly at later times, depending on the cells' growth rate. This activation was specific to Stat3, since the levels of the extracellular signal regulated kinase (Erk1/2), a signal transducer often coordinately activated with Stat3 by a number of growth factors and oncogenes, remained unaffected by cell density in at least two distinct cellular systems

(Vultur et al. 2004; Kreis et al. 2007) (Fig. 2). This mechanism of Stat3 activation was found to operate both in normal fibroblasts (Vultur et al. 2004) or epithelial cells (Arulanandam et al. 2009), as well as in neoplastically transformed cells (Vultur et al. 2005; Steinman et al. 2003; Onishi et al. 2008; Kreis et al. 2007), both in cases where Stat3 plays a growth stimulatory (Vultur et al. 2004; Arulanandam et al. 2009; Onishi et al. 2008) or a generally inhibitory (Kreis et al. 2007) role. Certainly, a number of neoplastically transformed cells, such as mouse fibroblasts transformed by vSrc (Vultur et al. 2004) or by the large tumor antigen of simian virus 40 (Vultur et al. 2005) do have higher Stat3 activity levels at all cell densities than their normal counterparts. On the other hand, certain normal cells like the HaCaT keratinocytes have very low levels of Stat3, which increase only marginally with cell density (Kreis et al. 2007). In any event, it is clear that at any given time the total Stat3 activity levels in a cell is the sum of effects of both cell to cell adhesion and the conventional Stat3 activating factors present (Fig. 1).

Mechanism of Stat3 activation

Cadherin engagement

Classical cadherins are primary mediators of calcium-dependent cell interactions in multicellular organisms. These plasma membrane glycoproteins control the organization, specificity, and dynamics of cell adhesion, which are crucial for the development and maintenance of tissue architecture and function (Takeichi 1995; L RUE et al. 1996). In mammals, impaired cadherin-mediated adhesion has been associated with tumor progression and metastasis in certain systems. Classical cadherins comprise an extracellular domain, a single-pass transmembrane domain, and an intracellular domain that interacts with the cytoskeleton via cytoplasmic proteins (Fig. 1B). The ectodomain consists of 5 modules (EC1 to EC5) of ~100 amino acids each with internal sequence homology (Hulpiau and van Roy 2009). The extracellular segments expressed on the surface of opposing cells interact in a homophilic manner to create highly regulated patterns of attachment stabilized by cytoskeletal elements inside the cells. Their adhesive engagement initiates intracellular signals ranging from cytoskeletal organization to cell polarity, proliferation, or apoptosis that are communicated through the conserved cadherin tail domain to different cytoplasmic pathways (Gumbiner 2000; Benjamin and Nelson 2008). Five members of type I and 12 members of type II classical cadherin subfamilies have been identified. Structural aspects of the homophilic adhesive interface have been revealed by X-ray crystallography (Häussinger et al. 2004; Patel et al. 2006; Parisini et al. 2007). The adhesive interface stands exclusively on the EC1 module, and consists of the β -strand exchange of the first β -strand and the docking of the conserved Trp2 (or Trp4 for type II cadherins) lateral chain(s) into the hydrophobic pocket of the partner molecule. Such an interface is an example of three-dimensional domain swapping, an oligomerization mechanism that results in low-affinity binding (Chen et al. 2005).

It is widely accepted that calcium is essential for E-

Fig. 1. (A) Classical model of Stat3 activation: Stat3 (middle panel) is an important point of convergence for signalling pathways often activated in cancer. Binding of growth factors (a) or cytokines (b) to their receptors results in the activation of the intrinsic receptor tyrosine-kinase activity, or of receptor-associated kinases such as Jaks or cSrc, which may phosphorylate the cytoplasmic tail of the receptor. Cytoplasmic Stat3 then binds to the activated receptor with its SH2 domain, is phosphorylated by the Jak kinases, dimerized through reciprocal SH2-tyr interactions, and translocates to the nucleus where it activates transcription of a number of genes involved in cell division or survival. Stat3 also downregulates p53 by direct binding to the p53 promotor (Niu et al. 2005). (c) Mutationally activated Src, or other non-receptor tyrosine kinases such as Abl or the breast tumor kinase (Btk) autophosphorylate and activate Stat3 in a similar manner (Zhang et al. 2000). (B) Cadherin-dependent Stat3 activation. In addition to this classical pathway, engagement of E-cadherin also activates Stat3 through an increase in Rac1 and Cdc42 protein levels and activity (Arulanandam et al. 2009). Activated Rac1, in turn, can activate Stat3 through activation of cytokines of the IL6 family, which possess the common subunit gp130. Note that this pathway can be entirely independent of the action of other receptors often activated in cancer, such as the EGFR family, which could perhaps explain why drugs such as Herceptin are ineffective in a large number of ErbB2-positive breast cancers (Hynes and Lane, 2005; Vogel et al. 2002; Harries and Smith, 2002; Cobleigh et al. 1999).

cadherin-mediated adhesion, which is reversibly abolished by Calcium chelation (Nose et al. 1988). Calcium is indeed required for cadherin structure and, in the presence of $50 \mu\text{mol-L}^{-1} \text{Ca}^{2+}$, the extracellular E-cadherin segment (E/EC15) adopts a 22 nm long protease-resistant, rod-like shape (Boggon et al. 2002; Pokutta et al. 1994). In the presence of calcium, a large proportion of the cadherin module exhibits a β -barrel secondary structure, as revealed by circular dichroism spectroscopy (Koch et al. 1997). A recent study (Courjean et al. 2008) showing that 3 calcium ions exhibit a mean high binding affinity ($20 \mu\text{mol-L}^{-1}$) to the EC12 interdomain pocket reinforces previous data (Alattia et al. 1997). This calcium binding occurs with a strong cooperativity on the E/EC12 cadherin, and this induces specific changes in its structural arrangement (Courjean et al. 2008).

The binding properties of type I classical cadherins have been experimentally quantified at the single molecule level (Perret et al. 2002; Perret et al. 2004; du Roure et al. 2006; Pierres et al. 2007; Bayas et al. 2006). Two attachment sub-populations can be clearly distinguished: one group revealing short apparent lifetimes of engagement from 0.1 to 1 s, and the other revealing exceptionally long apparent lifetimes from 10^2 to 10^5 s when extrapolated to zero force. This suggests multiple functions for cadherins, perhaps providing distinct properties needed for transient-specific recognition, as well as stable tissue formation.

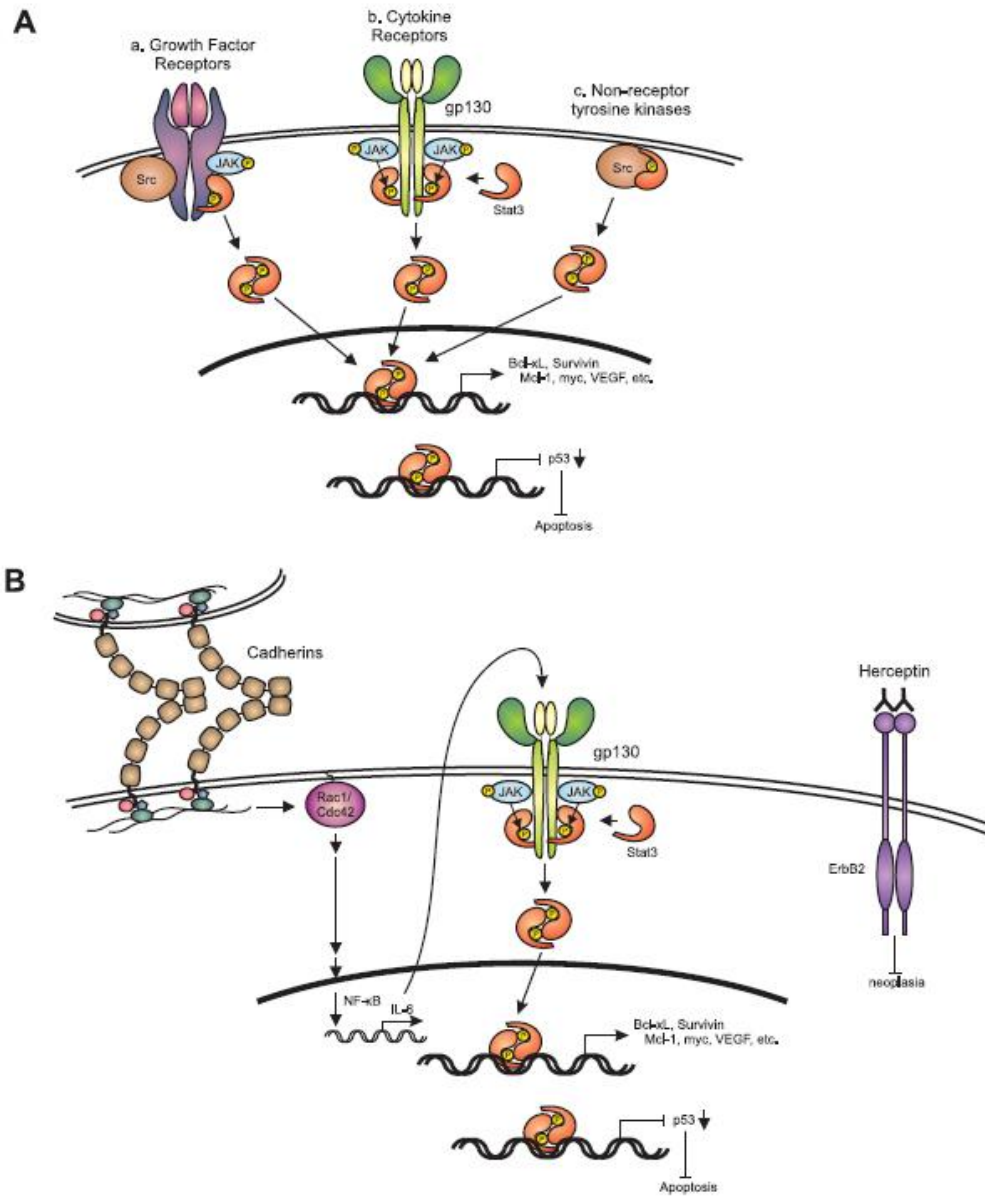
Early results indicated that disruption of cell-cell contacts by calcium chelation through EGTA treatment eliminated density-dependent Stat3 activation in normal fibroblasts or breast epithelial cells (Vultur et al. 2004). Conversely, forced aggregation of cells caused a dramatic increase in Stat3 activity, indicating that cell to cell contacts trigger Stat3 activation in these cells. These observations gave the first indication that cadherins might be responsible for the increase in Stat3 activity in densely growing cultures. Later immunolocalisation studies in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells forming aggregates in suspension revealed that Stat3-tyr705, initially present at cell junctions, was localized to the nucleus by 6 h (Onishi et al. 2008). More recently, evidence for E-cadherin involvement came from results using normal mouse breast epithelial HC11 cells, in which inhibition of E-cadherin engagement with a fragment encompassing the two outermost domains (E/EC12 fragment) (Perret et al. 2002), or a peptide that could block cadherin interactions (SHAVSA, Makagiansar

et al. 2001), inhibited cell to cell adhesion-mediated Stat3 activation. The involvement of E-cadherin was further shown through the use of E-cadherin knockout embryonic stem (ES) cells. A definitive demonstration that the Stat3 activity increase observed at high densities is a direct effect of cadherin engagement, rather than a secondary effect of cell to cell proximity, was offered by functionalizing Petri dishes with the E/EC12 fragment. Plating HC11 cells on this coated surface brought about a dramatic increase in Stat3-tyr705 levels, whereas the same fragment carrying the W2A point mutation, which reduces its ability for engagement with wild-type E-cadherin, had a less pronounced effect (Arulanandam et al. 2009). These results clearly demonstrate that E-cadherin can directly activate Stat3 in the absence of cell to cell contact.

Further examination of the mechanism of Stat3 activation by cadherin engagement in HC11 cells revealed a role for Rac1 and Cdc42, both of which are Rho family GTPases (Etienne-Manneville and Hall 2002). In fact, an increase in Rac1 and Cdc42 activity was noted as the cells approached confluence, in agreement with previous data indicating that cell to cell adhesion activates Rac1 and Cdc42 (Noren et al. 2001; Fukuyama et al. 2006; Nakagawa et al. 2001; Kim et al. 2000). Unexpectedly, we also found a dramatic increase in the total protein levels of Rac1 and Cdc42 (Arulanandam et al. 2009), apparently due to inhibition of their proteasomal degradation (Raptis et al., in preparation) (Lynch et al. 2006), and a corresponding increase in Rac1 and Cdc42 activity. Mutationally activated Rac1 and Cdc42, on the other hand, have been independently demonstrated to activate Stat3 (Debidia et al. 2005; Faruqi et al. 2001). Moreover, Rac1 and Cdc42 were found to be required for Stat3 activation following cadherin engagement, as shown by Rac1 and Cdc42 downregulation through siRNA expression or pharmacological inhibition (Arulanandam et al. 2009). The above data taken together indicate that Rac1 and Cdc42 are integral components of the pathway leading to Stat3 activation by cadherin engagement.

Autocrine secretion of interleukin-6 family cytokines

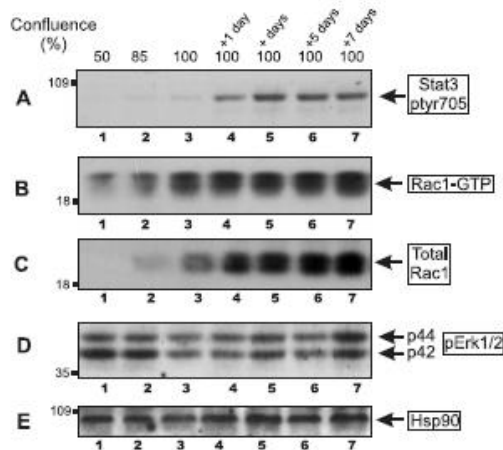
Early results have demonstrated that Stat3 can be activated by a number of growth factor and cytokine receptors. The question therefore arose as to the nature of the receptor(s) responsible for Stat3-tyr705 activation following cadherin engagement. In fact, examination of gene expression levels for 86 cytokines by quantitative RT-PCR in HC11



cells revealed that high density per se induces a dramatic increase in the mRNA levels of a number of cytokines of the interleukin-6 (IL6) family, such as IL6, IL27, and the leukemia inhibitory factor (Arulanandam et al. 2009). Furthermore, downregulation of gp130, the common subunit of cytokines of this family, prevented density-mediated Stat3

activation, indicating that the cell to cell adhesion-dependent activation of the IL6-receptor family is responsible for the increase in Stat3 activity. It is certainly possible that receptors other than the IL6 family may also be activated, and might also contribute to the increase in Stat3 activity increase, but the demonstration of the important role of gp130

Fig. 2. Cell to cell adhesion causes a dramatic increase in the levels and activity of Rac1, followed by Stat3 phosphorylation. HC11 normal mouse breast epithelial cells were grown to different densities as indicated. Levels of active Rac1-GTP were measured by assessing Rac1 binding to its effector, p21 (B). Detergent lysates were also probed for total Rac1 (C), Stat3-tyr705 (A), phospho-Erk1/2 (D), and Hsp90 (E) as a loading control, as indicated. Note the dramatic increase in Stat3-tyr705 (A, lanes 4-5), which is preceded by an increase in total as well as active Rac1 protein (B, lanes 2-3).



explains earlier findings indicating that inhibition of EGFR, IGFR, Fer, or the Src family in mouse epithelial cells or fibroblasts does not affect density-dependent Stat3 activation (Vultur et al. 2004; Steinman et al. 2003). It is interesting to note that the EGFR independence could perhaps explain why inhibition of members of this family of receptors (e.g., ErbB2) has been ineffective in a large number of ErbB2-positive cancers (Hynes and Lane 2005; Vogel et al. 2002; Harries and Smith 2002; Cobleigh et al. 1999). On the other hand, E-cadherin turns on IL6 transcription, therefore it activates JAK through IL6-R autocrine signalling (Fischer and Hilfiker-Kleiner 2008).

Although cadherin engagement is necessary to induce the expression of cytokine genes in HC11 cells, a number of cell types, such as a panel of HNSCC lines, secrete IL6 irrespective of cell density (Sriuranpong et al. 2003). This could contribute to the increase in Stat3 activity observed in dense cultures, simply due to the greater cellular proximity and higher IL6 concentration. Still, in HNSCC cells, cadherin engagement also plays a role, perhaps by facilitating autocrine/paracrine effects (Onishi et al. 2008). Similarly, the late-stage melanoma line Wm9 showed a pronounced cell-density dependent Stat3 activation caused by IL6 secretion (Kreis et al. 2007). In other melanoma lines, however (Kreis et al. 2007), or in the Madin-Darby canine kidney line (Su et al. 2007), although cell density did induce a potent Stat3 activation, no autocrine effects were noted. The nature of

the kinase(s) responsible for Stat3, tyr705 phosphorylation in these cases remains to be investigated.

The autocrine model of Stat3 activation leaves one remaining mystery: the IL6 receptor family invariably activates a number of other pathways, such as Erk1/2 (Fischer and Hilfiker-Kleiner 2008). It therefore came as a surprise that cadherin engagement did not cause any increase in Erk1/2 activity in either epithelial cells, fibroblasts, or melanoma lines (Vultur et al. 2004; Arulanandam et al. 2009; Kreis et al. 2007). To solve this apparent paradox, HC11 cells were grown to different densities and stimulated with IL6. Indeed, IL6, although able to activate Erk in subconfluent cultures, was found unable to do so once cells reach confluence, despite Stat3 still being activated (Arulanandam et al. 2009). This could not have been due to a general inability of the cells to activate Erk in this setting, since confluent cells did respond to EGF with Erk activation (Arulanandam et al.).² It is possible that IL6-associated phosphatases that are specific for Erk are activated at high cell densities, or that other adaptors required for Erk activation by IL6, or phosphorylation of IL6-R sites, are downregulated after cadherin engagement. In any event, these results further demonstrate that, despite these two pathways often both being activated by growth factors or oncogenes, they are not coordinately regulated by cadherin engagement.

Functional consequences of Stat3 activation

Survival vs. proliferation

The biological consequences of Stat3 activation in confluent vs. sparsely growing, mouse epithelial or fibroblast cultures were examined by downregulating Stat3 activity using a variety of methods, such as electroporation of peptides or peptidomimetics to block the Stat3 SH2 domain, or through treatment with two platinum compound inhibitors (Turkson et al. 2004; Turkson et al. 2004). The results demonstrated a profound difference in the effect of Stat3 inhibition in sparsely growing vs. confluent cells. Although Stat3 levels are very low in normal mouse NIH 3T3 fibroblasts grown to a low confluence, Stat3 inhibition does cause growth retardation, indicating a role for Stat3 in cell proliferation in this setting. In contrast, in densely growing normal cells, Stat3 inhibition induced apoptosis. Similarly, although Stat3 inhibition in vSrc-transformed or breast carcinoma cells caused apoptosis even at subconfluence, the degree of apoptosis was much greater in post-confluent cultures (Anagnostopoulou et al. 2006). In the same vein, inhibition of E-cadherin engagement using the E/EC12 fragment, the SHAVSA peptide, or genetic ablation, which abolished density-mediated Stat3 activation, induced apoptosis in HC11 or ES cells, respectively (Arulanandam et al. 2009). The observation that Stat3 inhibition in densely growing, normal cells promotes apoptosis points to the possibility that the increased Stat3 activity may reflect a protective survival mechanism that is engaged as cells reach confluence. Indeed, this increase, which peaks after confluence when cells are growth arrested and entering apoptosis, may represent a futile attempt by the cell to overcome apoptotic death. The fact that cadherins can perform this function by activat-

²X. Arulanandam, XXXXXXXXXXXX. Manuscript in preparation.

ing two distinct Rho family GTPases in an apparently redundant fashion, in both epithelial cells and fibroblasts and in at least two mammalian species, points to a potentially important role of this pathway in survival signalling.

A critical role for IL6 signalling in activating Stat3 and promoting malignancy has been demonstrated in a number of cancers (Catlett-Falcone et al. 1999; Lou et al. 2000; Berishaj et al. 2007). However, the IL6 effect on melanoma cells is more complex. In normal melanocytes and early stage melanoma cells, such as A375 (Kortylewski et al. 1999; Schick et al. 2004), IL6 and other members of this family, such as oncostatin M, inhibit proliferation. In contrast, IL6 signalling serves as an autocrine growth-promoting factor for advanced, metastatic stages of melanoma *in vivo* and in cell lines derived from advanced stage lesions (Lázár-Molnár et al. 2000; Lu et al. 1996). Stat3 seems to be implicated in both pathways (Kortylewski et al. 1999; Niu et al. 2002). Examination of a panel of melanoma lines revealed the presence of significant levels of Stat3 activity in most but not all lines examined, which increased with cell density, while primary melanocytes (NHEM), primary dermal fibroblasts (NHDF212) or the keratinocyte line HaCaT displayed very low levels at all densities. It is interesting to note in this context that the late-stage metastatic melanoma line Wm9 shows pronounced, density-dependent Stat3 activation, at least in part caused by autocrine secretion of IL6, whereas Wm35 cells, an early-stage line derived from the same patient, has little Stat3 activity. However, despite the elevated Stat3-tyr705 levels, which further increased with density, Stat3 activation was not sufficient to provide critical growth and survival signals to the melanoma cell lines (Kreis et al. 2007), indicating a profound difference in the signalling involved, compared with mouse or human epithelial cells, fibroblasts, or breast carcinoma lines (Vultur et al. 2004; Arulanandam et al. 2009).

Epithelial cell differentiation

Cultured Madin–Darby canine kidney (MDCK) cells constitute a widely used model of epithelial cell differentiation. These cells are able to form domes, that is multicellular hemicyclic structures unique to cultured, polarized epithelia. These occur in small areas at confluence and mimic the onset of differentiation of an epithelial monolayer (Valentich et al. 1979; Shlyonsky et al. 2005). The dome is formed as a result of liquid accumulation between the cell and the underlying support, due to the coordinated development of cell–cell contacts and of transepithelial transport systems in morphologically polarized cells (Shlyonsky et al. 2005; Missett et al. 1976; Cerejido et al. 1978). Examination of Stat3 activity levels in MDCK cells revealed a dramatic increase with density and dome formation. Moreover, dome formation was promoted by expression of the constitutively active form, Stat3C, and inhibited by the dominant-negative mutant, Stat3D. Further examination of the role of Stat3 revealed that the expression of the transepithelial transporter, sodium–hydrogen exchanger-3 (NHE3) increased during dome formation and was specifically upregulated by Stat3C and inhibited by Stat3D (Su et al. 2007). It was further shown that, although the NHE3 promoter does not possess

conventional Stat3 binding sites, the Stat3 activation induced by confluence regulates NHE3 transcription by recruiting sp1 and sp3 transcription factors to the proximal NHE3 promoter region during dome formation (Su et al. 2009). These results indicate that although Stat3 has proliferation and survival capabilities, under conditions of confluence it can also promote cell polarity and differentiation of epithelial cells.

In conclusion, the importance of the examination of protein interactions at high cell densities is just beginning to emerge. Since the increase in Stat3 activity with cell density was first reported, a number of other genes besides Jak1, Rac1/Cdc42, p27, and p21^{CIP/WAF} (Steinman et al. 2003) were found to be upregulated under conditions of extensive cell to cell adhesion, such as connexin-43 (Geletu et al. 2009) and others (Raptis et al.³). It is especially interesting in this context that Stat3 levels in normal mouse breast luminal epithelial cells where E-cadherin is engaged were found to be high, thus revealing a distinct correlation in the state of these molecular markers in HC11 cells growing to high, but not low, densities with the same type of cell *in vivo* (Arulanandam et al. 2009). The relevance of cell interactions observed in densely growing cultured cells to the *in vivo* situation is further stressed by findings demonstrating a close correspondence of genes expressed specifically in the prostate carcinoma line, LNCaP, cultured to high densities with genes associated with prostate cancer *in vivo* (Chen et al. 2006). The fact that these genes were different from genes identified in LNCaP cells grown under log-phase conditions further stresses the importance of the examination of signalling pathways in densely growing cells. It is interesting to note that maintenance of cadherin-mediated cell–cell interaction not only promotes cell survival, but enhances resistance to chemotherapeutic agents as well (Nakamura et al. 2003), a finding that could have significant therapeutic implications.

Acknowledgements

Special thanks are due to Dr. Richard Jove and Dr. James Turkson for valuable advice. The financial assistance of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Canadian Breast Cancer Foundation (Ontario Chapter), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Ontario Centers of Excellence, Breast Cancer Action Kingston, the Clare Nelson bequest fund, and the Canadian Breast Cancer Research Alliance (to L.R.); as well as that of the Fondation pour la Recherche Médicale, Région Aquitaine, the Association pour la Recherche contre le Cancer, and the Ligue Contre le Cancer Comité de Dordogne (to H.F.) is gratefully acknowledged. R.A. was supported by a Canada Graduate Scholarships Doctoral award from CIHR, the Ontario Women's Health Scholars Award from the Ontario Council on Graduate Studies, and a Queen's University Graduate Award (QGA). A.V. was supported by studentships and a postdoctoral fellowship from NSERC, the Ontario Graduate Studentship Program and QGA. M.G. was supported by a postdoctoral fellowship from the United States Army Breast Cancer Program. S.C. was supported by a fellowship from the Région Aquitaine.

³L. Raptis, X. Arulanandam, and X. Geletu. XXXXXXXXX. Manuscript in preparation.

References

- Alattia, J.R., Ames, J.B., Porumb, T., Tong, K.I., Heng, Y.M., Ottensmeyer, P., et al. 1997. Lateral self-assembly of E-cadherin directed by cooperative calcium binding. *FEBS Lett.* **417**(3): 405–408. doi:10.1016/S0014-5793(97)01333-1. PMID:9409761.
- Amin, H.M., McDonnell, T.J., Ma, Y., Lin, Q., Fujio, Y., Kuni-sada, K., et al. 2004. Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene*, **23**(32): 5426–5434. doi:10.1038/sj.onc.1207703. PMID:15184887.
- Anagnostopoulou, A., Vultur, A., Arulanandam, R., Cao, J., Turkson, J., Jove, R., et al. 2006. Differential effects of Stat3 inhibition in sparse vs confluent normal and breast cancer cells. *Cancer Lett.* **242**(1): 120–132. doi:10.1016/j.canlet.2005.10.047. PMID:16377083.
- Arulanandam, R., Vultur, A., Cao, J., Carefoot, E., Elliott, B.E., Truesdell, P.F., et al. 2009. Cadherin-cadherin engagement promotes cell survival via Rac1/Cdc42 and signal transducer and activator of transcription-3. *Mol. Cancer Res.* **7**(8): 1310–1327. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0469. PMID:19671682.
- Bayas, M.V., Leung, A., Evans, E., and Leckband, D. 2006. Lifetime measurements reveal kinetic differences between homophilic cadherin bonds. *Biophys. J.* **90**(4): 1385–1395. doi:10.1529/biophysj.105.069583. PMID:16326909.
- Benjamin, J.M., and Nelson, W.J. 2008. Bench to bedside and back again: molecular mechanisms of alpha-catenin function and roles in tumorigenesis. *Semin. Cancer Biol.* **18**(1): 53–64. doi:10.1016/j.semcancer.2007.08.003. PMID:17945508.
- Berishaj, M., Gao, S.P., Ahmed, S., Leslie, K., Al-Ahmadie, H., Gerald, W.L., et al. 2007. Stat3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/Janus kinase pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **9**(3): R32. doi:10.1186/bcr1680. PMID:17531096.
- 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**(5571): 1308–1313. doi:10.1126/science.1071559. PMID:11964443.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., et al. 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, **10**(1): 105–115. doi:10.1016/S1074-7613(00)80011-4. PMID:10023775.
- Cereijido, M., Robbins, E.S., Dolan, W.J., Rotunno, C.A., and Sabatini, D.D. 1978. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J. Cell Biol.* **77**(3): 853–880. doi:10.1083/jcb.77.3.853. PMID:567227.
- Chen, C.P., Posa, S., Ben-Shaul, A., Shapiro, L., and Honig, B.H. 2005. 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.* **102**(24): 8531–8536. doi:10.1073/pnas.0503319102. PMID:15937105.
- Chen, Q., Watson, J.T., Marengo, S.R., Decker, K.S., Coleman, L., Nelson, P.S., and Sikes, R.A. 2006. Gene expression in the LNCaP human prostate cancer progression model: progression associated expression in vitro corresponds to expression changes associated with prostate cancer progression in vivo. *Cancer Lett.* **244**(2): 274–288. doi:10.1016/j.canlet.2005.12.027. PMID:16500022.
- Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., Robert, N.J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., et al. 1999. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* **17**(9): 2639–2648. PMID:10561337.
- Courjean, O., Chevreaux, G., Perret, E., Morel, A., Sanglier, S., Potier, N., et al. 2008. Modulation of E-cadherin monomer folding by cooperative binding of calcium ions. *Biochemistry*, **47**(8): 2339–2349. doi:10.1021/bi701340d. PMID:18232713.
- Debidia, M., Wang, L., Zang, H., Poli, V., and Zheng, Y. 2005. A role of STAT3 in Rho GTPase-regulated cell migration and proliferation. *J. Biol. Chem.* **280**(17): 17275–17285. doi:10.1074/jbc.M413187200. PMID:15705584.
- du Roure, O., Buguin, A., Feracci, H., and Silberzan, P. 2006. Homophilic interactions between cadherin fragments at the single molecule level: an AFM study. *Langmuir*, **22**(10): 4680–4684. doi:10.1021/la0531852. PMID:16649782.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**(6916): 629–635. doi:10.1038/nature01148. PMID:12478284.
- Faruqi, T.R., Gomez, D., Bustelo, X.R., Bar-Sagi, D., and Reich, N.C. 2001. Rac1 mediates STAT3 activation by autocrine IL-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**(16): 9014–9019. doi:10.1073/pnas.161281298. PMID:11470914.
- Fischer, P., and Hilfiker-Kleiner, D. 2008. Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *Br. J. Pharmacol.* **153**(Suppl 1): S414–S427. doi:10.1038/bjp.2008.1. PMID:18246092.
- Frank, D.A. 2007. STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. *Cancer Lett.* **251**(2): 199–210. doi:10.1016/j.canlet.2006.10.017. PMID:17129668.
- Fukuyama, T., Ogita, H., Kawakatsu, T., Inagaki, M., and Takai, Y. 2006. Activation of Rac by cadherin through the c-Src-Rap1-phosphatidylinositol 3-kinase-Vav2 pathway. *Oncogene*, **25**(1): 8–19. PMID:16170364.
- Geletu, M., Chaize, C., Arulanandam, R., Vultur, A., Kowolik, C., Anagnostopoulou, A., et al. 2009. Stat3 activity is required for gap junctional permeability in normal epithelial cells and fibroblasts. *DNA and Cell Biology*.
- Germain, D., and Frank, D.A. 2007. Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **13**(19): 5665–5669. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2491. PMID:17908954.
- Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., et al. 2006. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **12**(1): 11–19. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1752. PMID:16397018.
- Gumbiner, B.M. 2000. Regulation of cadherin adhesive activity. *J. Cell Biol.* **148**(3): 399–404. doi:10.1083/jcb.148.3.399. PMID:10662767.
- Harries, M., and Smith, I. 2002. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocr. Relat. Cancer*, **9**(2): 75–85. doi:10.1677/erc.0.0090075. PMID:12121832.
- Hüssinger, D., Ahrens, T., Aberde, T., Engel, J., Stetefeld, J., and Grzesiek, S. 2004. Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *EMBO J.* **23**(8): 1699–1708. doi:10.1038/sj.emboj.7600192. PMID:15071499.
- Hulpiau, P., and van Roy, F. 2009. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**(2): 349–369. doi:10.1016/j.biocel.2008.09.027. PMID:18848899.
- Hung, W., and Elliott, B. 2001. Co-operative effect of c-Src tyrosine kinase and Stat3 in activation of hepatocyte growth factor expression in mammary carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **276**(15): 12395–12403. doi:10.1074/jbc.M010715200. PMID:11278729.
- Hynes, N.E., and Lane, H.A. 2005. ERBB receptors and cancer: the

- complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, 5(5): 341–354. doi:10.1038/nrc1609. PMID:15864276.
- Kim, S.H., Li, Z., and Sacks, D.B. 2000. E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. *J. Biol. Chem.* 275(47): 36999–37005. doi:10.1074/jbc.M003430200. PMID:10950951.
- Koch, A.W., Pokutta, S., Lustig, A., and Engel, J. 1997. Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains. *Biochemistry*, 36(25): 7697–7705. doi:10.1021/bi9705624. PMID:9201910.
- Kortylewski, M., Heinrich, P.C., Mackiewicz, A., Schniertshauer, U., Klingmüller, U., Nakajima, K., et al. 1999. Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene*, 18(25): 3742–3753. doi:10.1038/sj.onc.1202708. PMID:10391682.
- Kreis, S., Munz, G.A., Haan, S., Heinrich, P.C., and Behrmann, I. 2007. Cell density dependent increase of constitutive signal transducers and activators of transcription 3 activity in melanoma cells is mediated by Janus kinases. *Mol. Cancer Res.* 5(12): 1331–1341. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0317. PMID:18171991.
- 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(10): 3185–3194. PMID:8898231.
- Lázár-Molnár, E., Hegyesi, H., Tóth, S., and Falus, A. 2000. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine*, 12(6): 547–554. doi:10.1006/cyto.1999.0614. PMID:10843728.
- Lou, W., Ni, Z., Dyer, K., Twardy, D.J., and Gao, A.C. 2000. Interleukin-6 induces prostate cancer cell growth accompanied by activation of stat3 signaling pathway. *Prostate*, 42(3): 239–242. doi:10.1002/(SICI)1097-0045(20000215)42:3<239::AID-PROS10>3.0.CO;2-G. PMID:106639195.
- Lu, C., Sheehan, C., Rak, J.W., Chambers, C.A., Hozumi, N., and Kerbel, R.S. 1996. Endogenous interleukin 6 can function as an in vivo growth-stimulatory factor for advanced-stage human melanoma cells. *Clin. Cancer Res.* 2(8): 1417–1425. PMID:9816316.
- Lynch, E.A., Stall, J., Schmidt, G., Chavrier, P., and D'Souza-Schorey, C. 2006. Proteasome-mediated degradation of Rac1-GTP during epithelial cell scattering. *Mol. Biol. Cell*, 17(5): 2236–2242. doi:10.1091/mbc.E05-08-0779. PMID:16481404.
- Makgiansar, I.T., Avery, M., Hu, Y., Audus, K.L., and Siahaan, T.J. 2001. Improving the selectivity of HAV-peptides in modulating E-cadherin-E-cadherin interactions in the intercellular junction of MDCK cell monolayers. *Pharm. Res.* 18(4): 446–453. doi:10.1023/A:1011094025008. PMID:11451030.
- Misfeldt, D.S., Hamamoto, S.T., and Pitelka, D.R. 1976. Trans-epithelial transport in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73(4): 1212–1216. doi:10.1073/pnas.73.4.1212. PMID:1063404.
- Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N., and Kaibuchi, K. 2001. Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J. Cell Sci.* 114(Pt 10): 1829–1838. PMID:11329369.
- Nakamura, T., Kato, Y., Fuji, H., Honiuchi, T., Chiba, Y., and Tanaka, K. 2003. E-cadherin-dependent intercellular adhesion enhances chemoresistance. *Int. J. Mol. Med.* 12(5): 693–700. PMID:14532995.
- Niu, G., Wright, K.L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., et al. 2002a. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, 21(13): 2000–2008. doi:10.1038/sj.onc.1205260. PMID:11960372.
- Niu, G., Bowman, T., Huang, M., Shivers, S., Reintgen, D., Daud, A., et al. 2002b. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene*, 21(46): 7001–7010. doi:10.1038/sj.onc.1205859. PMID:12370822.
- Niu, G., Wright, K.L., Ma, Y., Wright, G.M., Huang, M., Irby, R., et al. 2005. Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol. Cell. Biol.* 25(17): 7432–7440. doi:10.1128/MCB.25.17.7432-7440.2005. PMID:16107692.
- Noren, N.K., Niessen, C.M., Gumbiner, B.M., and Burridge, K. 2001. Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J. Biol. Chem.* 276(36): 33305–33308. doi:10.1074/jbc.C100306200. PMID:11457821.
- Nose, A., Nagafuchi, A., and Takeichi, M. 1988. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell*, 54(7): 993–1001. doi:10.1016/0092-8674(88)90114-6. PMID:3416359.
- Onishi, A., Chen, Q., Humtsoe, J.O., and Kramer, R.H. 2008. STAT3 signaling is induced by intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 314(2): 377–386. doi:10.1016/j.yexcr.2007.09.018. PMID:17961551.
- Parisini, E., Higgins, J.M., Liu, J.H., Brenner, M.B., and Wang, J.H. 2007. The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. *J. Mol. Biol.* 373(2): 401–411. doi:10.1016/j.jmb.2007.08.011. PMID:17850815.
- Patel, S.D., Ciatto, C., Chen, C.P., Bahna, F., Rajebhosale, M., Arkus, N., et al. 2006. Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell*, 124(6): 1255–1268. doi:10.1016/j.cell.2005.12.046. PMID:16564015.
- Perret, E., Benoliel, A.M., Nassoy, P., Pierres, A., Delmas, V., Thiery, J.P., et al. 2002. Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *EMBO J.* 21(11): 2537–2546. doi:10.1093/emboj/21.11.2537. PMID:12032067.
- 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(47): 16472–16477. doi:10.1073/pnas.0402085101. PMID:15546992.
- Pierres, A., Prakasam, A., Touchard, D., Benoliel, A.M., Bongrand, P., and Leckband, D. 2007. Dissecting subsecond cadherin bound states reveals an efficient way for cells to achieve ultrafast probing of their environment. *FEBS Lett.* 581(9): 1841–1846. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.077. PMID:17434495.
- 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(3): 1019–1026. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb19080.x. PMID:8055942.
- Schick, N., Oakeley, E.J., Hynes, N.E., and Badache, A. 2004. TEL/ETV6 is a signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)-induced repressor of Stat3 activity. *J. Biol. Chem.* 279(37): 38787–38796. doi:10.1074/jbc.M312581200. PMID:15229229.
- Shlyonsky, V., Goolaerts, A., Van Beneden, R., and Sariban-Sohraby, S. 2005. Differentiation of epithelial Na⁺ channel function. An in vitro model. *J. Biol. Chem.* 280(25): 24181–24187. doi:10.1074/jbc.M413823200. PMID:15817472.
- Sinibaldi, D., Wharton, W., Turkson, J., Bowman, T., Pledger, W.J., and Jove, R. 2000. Induction of p21^{WAF1/CIP1} and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene*, 19(48): 5419–5427. doi:10.1038/sj.onc.1203947. PMID:11114718.
- Sriuranpong, V., Park, J.L., Amornphimoltham, P., Patel, V., Nelkin, B.D., and Gutkind, J.S. 2003. Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head

- and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res.* **63**(11): 2948–2956. PMID:12782602.
- Steinman, R.A., Wentzel, A., Lu, Y., Stehle, C., and Grandis, J.R. 2003. Activation of Stat3 by cell confluence reveals negative regulation of Stat3 by cdk2. *Oncogene*, **22**(23): 3608–3615. doi:10.1038/sj.onc.1206523. PMID:12789269.
- Su, H.W., Yeh, H.H., Wang, S.W., Shen, M.R., Chen, T.L., Kiela, P.R., et al. 2007. Cell confluence-induced activation of signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) triggers epithelial dome formation via augmentation of sodium hydrogen exchanger-3 (NHE3) expression. *J. Biol. Chem.* **282**(13): 9883–9894. doi:10.1074/jbc.M606754200. PMID:17276988.
- Su, H.W., Wang, S.W., Ghishan, F.K., Kiela, P.R., and Tang, M.J. 2009. Cell confluency-induced Stat3 activation regulates NHE3 expression by recruiting Sp1 and Sp3 to the proximal NHE3 promoter region during epithelial dome formation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**(1): C13–C24. doi:10.1152/ajpcell.00263.2008. PMID:19064501.
- Takeichi, M. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**(5): 619–627. doi:10.1016/0955-0674(95)80102-2. PMID:8573335.
- Turkson, J., Kim, J.S., Zhang, S., Yuan, J., Huang, M., Glenn, M., et al. 2004a. Novel peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 dimerization and biological activity. *Mol. Cancer Ther.* **3**(3): 261–269. PMID:15026546.
- Turkson, J., Zhang, S., Palmer, J., Kay, H., Stanko, J., Mora, L.B., et al. 2004b. Inhibition of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 activation by novel platinum complexes with potent antitumor activity. *Mol. Cancer Ther.* **3**(12): 1533–1542. PMID:15634646.
- Valentich, J.D., Tchao, R., and Leighton, J. 1979. Hemicyst formation stimulated by cyclic AMP in dog kidney cell line MDCK. *J. Cell. Physiol.* **100**(2): 291–304. doi:10.1002/jcp.1041000210. PMID:229113.
- Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., Gutheil, J.C., Harris, L.N., Fehrenbacher, L., et al. 2002. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **20**(3): 719–726. doi:10.1200/JCO.20.3.719. PMID:11821453.
- Vultur, A., Cao, J., Arulanandam, R., Turkson, J., Jove, R., Greer, P., et al. 2004. Cell-to-cell adhesion modulates Stat3 activity in normal and breast carcinoma cells. *Oncogene*, **23**(15): 2600–2616. doi:10.1038/sj.onc.1207378. PMID:15007380.
- Vultur, A., Arulanandam, R., Turkson, J., Niu, G., Jove, R., and Raptis, L. 2005. Stat3 is required for full neoplastic transformation by the Simian Virus 40 large tumor antigen. *Mol. Biol. Cell*, **16**(8): 3832–3846. doi:10.1091/mbc.E04-12-1104. PMID:15917293.
- Yang, J., and Stark, G.R. 2008. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res.* **18**(4): 443–451. doi:10.1038/cr.2008.41. PMID:18364677.
- Yu, H., and Jove, R. 2004. The STATs of cancer — new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer*, **4**(2): 97–105. doi:10.1038/nrc1275. PMID:14964307.
- Zhang, Y., Turkson, J., Carter-Su, C., Smithgall, T., Levitzki, A., Kraker, A., et al. 2000. Activation of Stat3 in v-Src-transformed fibroblasts requires cooperation of Jak1 kinase activity. *J. Biol. Chem.* **275**(32): 24935–24944. doi:10.1074/jbc.M002383200. PMID:10823829.
- Zhang, F., Li, C., Halfter, H., and Liu, J. 2003. Delineating an oncostatin M-activated STAT3 signaling pathway that coordinates the expression of genes involved in cell cycle regulation and extracellular matrix deposition of MCF-7 cells. *Oncogene*, **22**(6): 894–905. doi:10.1038/sj.onc.1206158. PMID:12584569.

CONCLUSION

De nombreux récepteurs exprimés au niveau de la membrane plasmique permettent aux cellules de percevoir leur environnement. Certains de ces récepteurs ont des propriétés adhésives qui contribuent à la structuration et la cohésion des tissus. Parmi ces molécules, les cadhérines ont un rôle décisif au cours du développement embryonnaire dans le tri et la différenciation cellulaire, et aussi à l'âge adulte dans la stabilisation des tissus. En particulier la E-cadhérine a une part active dans l'initiation des jonctions intercellulaires et participe au maintien des épithéliums. Si l'implication des cadhérines dans ces diverses activités biologiques est clairement établie, les mécanismes moléculaires qui permettent de réaliser ces fonctions est encore mal connu.

La façon dont les cadhérines interagissent est à l'heure actuelle toujours sujet à débats. De nombreux points restent à éclaircir : l'existence au sein du segment extracellulaire d'une ou plusieurs interfaces adhésives, l'implication d'autres domaines au delà du domaine EC1, les éléments structuraux intervenant dans la spécificité des interactions, la nécessité ou non de dimères parallèles préétablis pour que les contacts adhésifs se réalisent, la régulation de la réponse cellulaire, etc...

Au début de ce travail, nous avons pensé que la complexité des interactions ne pouvait être décryptée sans des informations complémentaires sur la dynamique de formation des dimères adhésifs. En effet, quatre interactions ont été décrites le long du segment extracellulaire, dont deux sont clairement réalisées au niveau de l'extrémité N-ter (EC12) de la molécule (Perret et al., 2002 ; Perret et al., 2004 ; Bayas et al., 2006 ; du Roure et al., 2006). Les données structurales, multiples, ont progressivement évolué et il est maintenant admis que les cadhérines classiques de type I, au niveau du module EC1, interagissent par échange de brin β (Chen et al., 2005). Néanmoins, à la lumière de ces informations, il est difficile de comprendre comment des interactions entre cadhérines classiques de type I, de type II et desmosomales peuvent être spécifiques malgré la présence d'homologies au niveau des éléments structuraux constituant l'interface adhésive. Il nous a semblé essentiel de définir le rôle de certains acides aminés dans l'interaction adhésive. C'est avec cet objectif que nous avons comparé les paramètres dynamiques d'interaction, à l'échelle d'une paire adhésive individuelle, des segments EC12 de la E-cadhérine (type I) et de la cadhérine-11 (type II).

Notre première étude, centrée sur l'interface adhésive des cadhérines de type I, a permis de mieux caractériser le rôle du Trp2, et d'apporter des informations nouvelles concernant les interactions entre molécules de E-cadhérine. Ce résidu est essentiel pour la fonctionnalité adhésive des cadhérines, à la fois *in vitro* et *in vivo*. La chaîne latérale du Trp2, visualisée dans une poche hydrophobe au niveau du module EC1 soit en intramoléculaire soit de façon intermoléculaire, fait partie de l'échange de brin β . Nous avons montré que ce résidu favorise non seulement la stabilité mais aussi la formation de la liaison ; il semble agir comme un « hameçon moléculaire », explorant l'environnement pour 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, la spécificité d'interaction (homophilie) pourrait venir de l'ajustement de l'interface adhésive et donc jouer dans un deuxième temps, comme ceci a déjà été suggéré (Perret et al., 2002 ; Chen et al., 2005).

La caractérisation structurale des dimères adhésifs a été essentiellement faite par des mesures à l'équilibre (RX, RMN), qui informent sur les états les plus stables, à savoir l'échange des deux brins dans une conformation symétrique. L'approche que nous avons choisie –chambre à flux laminaire– permet de sonder la dynamique de formation et de dissociation d'une interaction à l'échelle de la liaison unique. De façon très intéressante, par le confinement des molécules sur les deux surfaces de la chambre, cette approche permet éventuellement d'influer sur le chemin réactionnel d'une interaction asymétrique. Cette étude a ainsi permis pour la première fois de caractériser un intermédiaire réactionnel et de montrer que l'échange de brin β se fait de façon séquentielle, dissymétrique: l'interaction est initiée par une seule des deux molécules. Une telle interaction asymétrique pourrait intervenir soit pour consolider l'interface adhésive soit pour former des dimères cis et conduire à des arrangements moléculaires complexes, comme décrits au sein des desmosomes (He et al., 2002). La mise en évidence de cet intermédiaire réactionnel n'impliquant qu'un seul Trp2, fournit une base moléculaire pour rendre compte à la fois de la plasticité et de la stabilité des jonctions adhérentes.

Notre seconde étude compare les paramètres cinétiques des cadhérines de type I et de type II. Les images de cristallographie RX montrent que la surface adhésive des cadhérines de type II est formée par échange de brin β incluant les Trp2 et 4 ainsi qu'une zone supplémentaire par rapport aux cadhérines de type I, principalement formée de résidus hydrophobes. En comparant les paramètres cinétiques à l'échelle de la molécule unique, nous avons pu montrer que les cadhérines E- et -11 ont des efficacités adhésives nettement

différentes, mais surtout la principale différence porte sur l'initiation de l'interaction. De façon très inattendue, les Trp2 et 4 des cadhérines des types II ne semblent pas jouer le même rôle que dans les cadhérines de type I. En effet, leur mutation ne modifie pas significativement l'interaction ; c'est en mutant les acides aminés de la zone hydrophobe étendue de l'interface adhésive que l'on perturbe l'interaction. Il apparaît donc que l'interface adhésive des cadhérines de type II, plus structurée, met plus de temps à s'ajuster que celle des cadhérines de type I.

Nous avons ensuite développé une chimie de surface innovante, permettant d'orienter les fragments de cadhérines à la fois de manière orientée et covalente. Cette biofonctionnalisation peut être facilement transposable à d'autres protéines possédant un motif hexahistidine, et fait l'objet d'un dépôt de brevet. Ce travail préliminaire sera poursuivi après cette thèse par la mise au point de surfaces modèles présentant une organisation micro/nanocontrôlée des protéines afin de mimer les différentes étapes de maturation des jonctions adhérentes. Ceci nous aidera à comprendre l'influence de la topographie des cadhérines sur le comportement cellulaire. La dernière partie présente la synthèse des travaux montrant que l'engagement direct de la E-cadhérine intervient sur l'activation et la régulation d'un facteur de transcription, Stat3, et sur la survie cellulaire. Les signaux intracellulaires des cellules devront être étudiés pour être corrélés à la géométrie des cadhérines sur les surfaces biomimétiques.

L'ensemble de ce travail a consisté à étudier les propriétés dynamiques à l'échelle de la molécule unique des cadhérines de type I et de type II. Nous avons ainsi pu déterminer le rôle de certains acides aminés très conservés au sein de ces familles de cadhérines, et mettre en évidence un mécanisme d'interaction différent pour ces deux types de cadhérines. Cette étude des relations structure-fonction des cadhérines, devrait aboutir sur la compréhension des phénomènes collectifs des cadhérines, à la surface des cellules. En effet, dans le contexte cellulaire, les propriétés des cadhérines sont modulées par l'action de divers partenaires membranaires ou/et cytoplasmiques. Le niveau d'expression à la surface cellulaire, le recrutement dans la zone de contact, le renforcement par l'actine et l'activation de voies de signalisation contribuent à la mise en place des jonctions adhérentes. A plus long terme, il sera intéressant de relier les propriétés structurales des divers constituants de ces jonctions avec la dynamique des différentes interactions au sein de ces échafaudages moléculaires pour les intégrer et mieux comprendre le comportement cellulaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe K, Takeichi M (2008) EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 13-19
- Agarwal SK, Lee DM, Kiener HP, Brenner MB (2008) Coexpression of two mesenchymal cadherins, cadherin 11 and N-cadherin, on murine fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum* **58**: 1044-1054
- Al-Amoudi A, Diez DC, Betts MJ, Frangakis AS (2007) The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature* **450**: 832-837
- Allen E, Yu QC, Fuchs E (1996) Mice expressing a mutant desmosomal cadherin exhibit abnormalities in desmosomes, proliferation, and epidermal differentiation. *J Cell Biol* **133**: 1367-1382
- Arulanandam R, Vultur A, Cao J, Carefoot E, Elliott BE, Truesdell PF, Larue L, Feracci H, Raptis L (2009) Cadherin-cadherin engagement promotes cell survival via Rac1/Cdc42 and signal transducer and activator of transcription-3. *Mol Cancer Res* **7**: 1310-1327
- Barrientos LG, Louis JM, Botos I, Mori T, Han Z, O'Keefe BR, Boyd MR, Wlodawer A, Gronenborn AM (2002) The domain-swapped dimer of cyanovirin-N is in a metastable folded state: reconciliation of X-ray and NMR structures. *Structure* **10**: 673-686
- Bayas MV, Leung A, Evans E, Leckband D (2006) Lifetime measurements reveal kinetic differences between homophilic cadherin bonds. *Biophys J* **90**: 1385-1395
- Bennett MJ, Choe S, Eisenberg D (1994a) Domain swapping: entangling alliances between proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3127-3131
- Bennett MJ, Choe S, Eisenberg D (1994b) Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 Å resolution. *Protein Sci* **3**: 1444-1463
- Bergdoll M, Eltis LD, Cameron AD, Dumas P, Bolin JT (1998) All in the family: structural and evolutionary relationships among three modular proteins with diverse functions and variable assembly. *Protein Sci* **7**: 1661-1670
- Bettinger CJ, Langer R, Borenstein JT (2009) Engineering substrate topography at the micro- and nanoscale to control cell function. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**: 5406-5415
- Birchmeier C, Birchmeier W, Brand-Saberi B (1996) Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat (Basel)* **156**: 217-226
- Blaschuk OW, Sullivan R, David S, Pouliot Y (1990) Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol* **139**: 227-229
- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L (2002) C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* **296**: 1308-1313
- Boscher C, Mege RM (2008) Cadherin-11 interacts with the FGF receptor and induces neurite outgrowth through associated downstream signalling. *Cell Signal* **20**: 1061-1072
- Bottcher RT, Niehrs C (2005) Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev* **26**: 63-77
- Bradshaw RA, Brickey WW, Walker KW (1998) N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families. *Trends Biochem Sci* **23**: 263-267
- Butz S, Larue L (1995) Expression of catenins during mouse embryonic development and in adult tissues. *Cell Adhes Commun* **3**: 337-352

- Cadigan KM, Nusse R (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* **11**: 3286-3305
- Carter SB (1965) Principles of cell motility: the direction of cell movement and cancer invasion. *Nature* **208**: 1183-1187
- Chappuis-Flament S, Wong E, Hicks LD, Kay CM, Gumbiner BM (2001) Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol* **154**: 231-243
- Charrasse S, Meriane M, Comunale F, Blangy A, Gauthier-Rouviere C (2002) N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *J Cell Biol* **158**: 953-965
- Chen CP, Posy S, Ben-Shaul A, Shapiro L, Honig BH (2005) 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* **102**: 8531-8536
- Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE (1998) Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnol Prog* **14**: 356-363
- Chen YW, Stott K, Perutz MF (1999) Crystal structure of a dimeric chymotrypsin inhibitor 2 mutant containing an inserted glutamine repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1257-1261
- Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G (1999) Making and reading microarrays. *Nat Genet* **21**: 15-19
- Chitaev NA, Troyanovsky SM (1997) Direct Ca²⁺-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J Cell Biol* **138**: 193-201
- Christofori G, Semb H (1999) The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* **24**: 73-76
- Chu K, Cheng CJ, Ye X, Lee YC, Zurita AJ, Chen DT, Yu-Lee LY, Zhang S, Yeh ET, Hu MC, Logothetis CJ, Lin SH (2008) Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol Cancer Res* **6**: 1259-1267
- Chu YS, Eder O, Thomas WA, Simcha I, Pincet F, Ben-Ze'ev A, Perez E, Thiery JP, Dufour S (2006) Prototypical type I E-cadherin and type II cadherin-7 mediate very distinct adhesiveness through their extracellular domains. *J Biol Chem* **281**: 2901-2910
- Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**: 469-480
- Courjean O, Chevreux G, Perret E, Morel A, Sanglier S, Potier N, Engel J, van Dorsselaer A, Feracci H (2008) Modulation of E-cadherin monomer folding by cooperative binding of calcium ions. *Biochemistry* **47**: 2339-2349
- Crestfield AM, Stein WH, Moore S (1962) On the aggregation of bovine pancreatic ribonuclease. *Arch Biochem Biophys* **Suppl 1**: 217-222
- Cross B, Ronzon F, Roux B, Rieu JP (2005) Measurement of the anchorage force between GPI-anchored alkaline phosphatase and supported membranes by AFM force spectroscopy. *Langmuir* **21**: 5149-5153
- Crowe J, Dobeli H, Gentz R, Hochuli E, Stuber D, Henco K (1994) 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* **31**: 371-387
- Curtis A, Riehle M (2001) Tissue engineering: the biophysical background. *Phys Med Biol* **46**: R47-65

- Dames SA, Bang E, Haussinger D, Ahrens T, Engel J, Grzesiek S (2008) Insights into the low adhesive capacity of human T-cadherin from the NMR structure of Its N-terminal extracellular domain. *J Biol Chem* **283**: 23485-23495
- Damjanov I, Damjanov A, Damsky CH (1986) Developmentally regulated expression of the cell-cell adhesion glycoprotein cell-CAM 120/80 in peri-implantation mouse embryos and extraembryonic membranes. *Dev Biol* **116**: 194-202
- Damsky CH, Richa J, Solter D, Knudsen K, Buck CA (1983) Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* **34**: 455-466
- Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB (2003) A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* **163**: 525-534
- Davis MA, Reynolds AB (2006) Blocked acinar development, E-cadherin reduction, and intraepithelial neoplasia upon ablation of p120-catenin in the mouse salivary gland. *Dev Cell* **10**: 21-31
- de Boer E, Rodriguez P, Bonte E, Krijgsveld J, Katsantoni E, Heck A, Grosveld F, Strouboulis J (2003) Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7480-7485
- de la Fuente JM, Andar A, Gadegaard N, Berry CC, Kingshott P, Riehle MO (2006) Fluorescent aromatic platforms for cell patterning. *Langmuir* **22**: 5528-5532
- Delamarche E, Bernard A, Schmid H, Michel B, Biebuyck H (1997) Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks. *Science* **276**: 779-781
- Derycke LD, Bracke ME (2004) N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol* **48**: 463-476
- Duguay D, Foty RA, Steinberg MS (2003) Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Dev Biol* **253**: 309-323
- Dupin I, Camand E, Etienne-Manneville S (2009) Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity. *J Cell Biol* **185**: 779-786
- Falconnet D, Csucs G, Grandin HM, Textor M (2006) Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials* **27**: 3044-3063
- Farquhar MG, Palade GE (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* **17**: 375-412
- Fedor-Chaiken M, Hein PW, Stewart JC, Brackenbury R, Kinch MS (2003) E-cadherin binding modulates EGF receptor activation. *Cell Commun Adhes* **10**: 105-118
- Fernandez-Lafuente R, Rosell CM, Rodriguez V, Santana C, Soler G, Bastida A, Guisan JM (1993) Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme Microb Technol* **15**: 546-550
- Fixe F, Dufva M, Telleman P, Christensen CB (2004) Functionalization of poly(methyl methacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* **32**: e9
- Foty RA, Steinberg MS (2004) Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. *Int J Dev Biol* **48**: 397-409
- Foty RA, Steinberg MS (2005) The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. *Dev Biol* **278**: 255-263

- Frottin F, Martinez A, Peynot P, Mitra S, Holz RC, Giglione C, Meinnel T (2006) The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Mol Cell Proteomics* **5**: 2336-2349
- Furukawa F, Takigawa M, Matsuyoshi N, Shirahama S, Wakita H, Fujita M, Horiguchi Y, Imamura S (1994) Cadherins in cutaneous biology. *J Dermatol* **21**: 802-813
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **123**: 1777-1788
- Fuss M, Luna M, Alcantara D, Fuente JM, Penades S, Briones F (2008) Supramolecular self-assembled arrangements of maltose glyconanoparticles. *Langmuir* **24**: 5124-5128
- Gallin WJ, Edelman GM, Cunningham BA (1983) Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 1038-1042
- Ganz A, Lambert M, Saez A, Silberzan P, Buguin A, Mege RM, Ladoux B (2006) Traction forces exerted through N-cadherin contacts. *Biol Cell* **98**: 721-730
- Garrod DR, Berika MY, Bardsley WF, Holmes D, Taberner L (2005) Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *J Cell Sci* **118**: 5743-5754
- Gavard J, Lambert M, Grosheva I, Marthiens V, Irinopoulou T, Riou JF, Bershadsky A, Mege RM (2004) Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. *J Cell Sci* **117**: 257-270
- Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 21-33
- Gizeli E, Glad J (2004) Single-step formation of a biorecognition layer for assaying histidine-tagged proteins. *Anal Chem* **76**: 3995-4001
- Green NM (1975) Avidin. *Adv Protein Chem* **29**: 85-133
- Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**: 345-357
- Gumbiner BM (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 622-634
- Guo HB, Johnson H, Randolph M, Pierce M (2009) Regulation of homotypic cell-cell adhesion by branched N-glycosylation of N-cadherin extracellular EC2-3 domains. *J Biol Chem*
- Halbleib JM, Nelson WJ (2006) Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* **20**: 3199-3214
- Harrison OJ, Corps EM, Berge T, Kilshaw PJ (2005a) The mechanism of cell adhesion by classical cadherins: the role of domain 1. *J Cell Sci* **118**: 711-721
- Harrison OJ, Corps EM, Kilshaw PJ (2005b) Cadherin adhesion depends on a salt bridge at the N-terminus. *J Cell Sci* **118**: 4123-4130
- Hartsock A, Nelson WJ (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 660-669

- Hashimoto T, Kiyokawa C, Mori O, Miyasato M, Chidgey MA, Garrod DR, Kobayashi Y, Komori K, Ishii K, Amagai M, Nishikawa T (1997) Human desmocollin 1 (Dsc1) is an autoantigen for the subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus. *J Invest Dermatol* **109**: 127-131
- Hatta K, Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M (1988) Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol* **106**: 873-881
- Hatta K, Takeichi M (1986) Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature* **320**: 447-449
- Haussinger D, Ahrens T, Aberle T, Engel J, Stetefeld J, Grzesiek S (2004) Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *Embo J* **23**: 1699-1708
- Haussinger D, Ahrens T, Sass HJ, Pertz O, Engel J, 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
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA (2000) Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* **148**: 779-790
- He W, Cowin P, Stokes DL (2003) Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science* **302**: 109-113
- Hebbard LW, Garlatti M, Young LJ, Cardiff RD, Oshima RG, Ranscht B (2008) T-cadherin supports angiogenesis and adiponectin association with the vasculature in a mouse mammary tumor model. *Cancer Res* **68**: 1407-1416
- Heupel WM, Baumgartner W, Laymann B, Drenckhahn D, Golenhofen N (2008) Different Ca²⁺ affinities and functional implications of the two synaptic adhesion molecules cadherin-11 and N-cadherin. *Mol Cell Neurosci* **37**: 548-558
- Hinck L, Nathke IS, Papkoff J, Nelson WJ (1994) Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* **125**: 1327-1340
- Hinz B, Pittet P, Smith-Clerc J, Chaponnier C, Meister JJ (2004) Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. *Mol Biol Cell* **15**: 4310-4320
- Hirel PH, Schmitter MJ, Dessen P, Fayat G, Blanquet S (1989) Extent of N-terminal methionine excision from Escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 8247-8251
- Hlady VV, Buijs J (1996) Protein adsorption on solid surfaces. *Curr Opin Biotechnol* **7**: 72-77
- Hodneland CD, Lee YS, Min DH, Mrksich M (2002) Selective immobilization of proteins to self-assembled monolayers presenting active site-directed capture ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5048-5052
- Holloway AJ, van Laar RK, Tothill RW, Bowtell DD (2002) Options available--from start to finish--for obtaining data from DNA microarrays II. *Nat Genet* **32 Suppl**: 481-489
- Hoppler S, Kavanagh CL (2007) Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* **120**: 385-393
- Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R (1994) Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* **127**: 1375-1380

- Hulpiau P, van Roy F (2009) Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 349-369
- Hyafil F, Babinet C, Jacob F (1981) Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* **26**: 447-454
- Hyafil F, Morello D, Babinet C, Jacob F (1980) A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage embryos. *Cell* **21**: 927-934
- Ichihara T, Akada JK, Kamei S, Ohshiro S, Sato D, Fujimoto M, Kuramitsu Y, Nakamura K (2006) A novel approach of protein immobilization for protein chips using an oligo-cysteine tag. *J Proteome Res* **5**: 2144-2151
- Iretton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrisian L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F, Reynolds AB (2002) A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* **159**: 465-476
- Islam S, Carey TE, Wolf GT, Wheelock MJ, Johnson KR (1996) Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol* **135**: 1643-1654
- Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS (2008) Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* **27**: 6920-6929
- Johnsson B, Lofas S, Lindquist G (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem* **198**: 268-277
- Jonkheijm P, Weinrich D, Schroder H, Niemeyer CM, Waldmann H (2008) Chemical strategies for generating protein biochips. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**: 9618-9647
- Kato K, Sato H, Iwata H (2005) Immobilization of histidine-tagged recombinant proteins onto micropatterned surfaces for cell-based functional assays. *Langmuir* **21**: 7071-7075
- Katsamba P, Carroll K, Ahlsen G, Bahna F, Vendome J, Posy S, Rajebhosale M, Price S, Jessell TM, Ben-Shaul A, Shapiro L, Honig BH (2009) Linking molecular affinity and cellular specificity in cadherin-mediated adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 11594-11599
- Kiener HP, Niederreiter B, Lee DM, Jimenez-Boj E, Smolen JS, Brenner MB (2009) Cadherin 11 promotes invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum* **60**: 1305-1310
- Kimura TE, Merritt AJ, Garrod DR (2007) Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive. *J Invest Dermatol* **127**: 775-781
- Koller E, Ranscht B (1996) Differential targeting of T- and N-cadherin in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* **271**: 30061-30067
- Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E (2006) Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* **174**: 593-604
- Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V, Dominis M, Kemler R (1996a) A role for cadherins in tissue formation. *Development* **122**: 3185-3194
- Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V, Dominis M, Kemler R (1996b) A role for cadherins in tissue formation. *Development* **122**: 3185-3194

- Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R (1994) E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8263-8267.
- Leckband D (2004) Nanomechanics of adhesion proteins. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 524-530
- Lee HJ, Yan Y, Marriott G, Corn RM (2005) Quantitative functional analysis of protein complexes on surfaces. *J Physiol* **563**: 61-71
- Lee JN, Jiang X, Ryan D, Whitesides GM (2004) Compatibility of mammalian cells on surfaces of poly(dimethylsiloxane). *Langmuir* **20**: 11684-11691
- Lee KB, Lim JH, Mirkin CA (2003) Protein nanostructures formed via direct-write dip-pen nanolithography. *J Am Chem Soc* **125**: 5588-5589
- Lee MH, Klein RL, El-Shewy HM, Luttrell DK, Luttrell LM (2008) The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth. *Biochemistry* **47**: 11682-11692
- Lee SW (1996) H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer. *Nat Med* **2**: 776-782
- Lewis RJ, Muchova K, Brannigan JA, Barak I, Leonard G, Wilkinson AJ (2000) Domain swapping in the sporulation response regulator Spo0A. *J Mol Biol* **297**: 757-770
- Lin MS, Mascaro JM, Jr., Liu Z, Espana A, Diaz LA (1997) The desmosome and hemidesmosome in cutaneous autoimmunity. *Clin Exp Immunol* **107 Suppl 1**: 9-15
- Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM (2005) Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev* **105**: 1103-1169
- Lutolf MP, Hubbell JA (2005) Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* **23**: 47-55
- Malicki J, Jo H, Pujic Z (2003) Zebrafish N-cadherin, encoded by the glass onion locus, plays an essential role in retinal patterning. *Dev Biol* **259**: 95-108
- Mandai K, Nakanishi H, Satoh A, Obaishi H, Wada M, Nishioka H, Itoh M, Mizoguchi A, Aoki T, Fujimoto T, Matsuda Y, Tsukita S, Takai Y (1997) Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *J Cell Biol* **139**: 517-528
- Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Efthimiopoulos S, Shao Z, Wisniewski T, Robakis NK (2002) A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* **21**: 1948-1956
- Marcozzi C, Burdett ID, Buxton RS, Magee AI (1998) Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. *J Cell Sci* **111 (Pt 4)**: 495-509
- Martzen MR, McCraith SM, Spinelli SL, Torres FM, Fields S, Grayhack EJ, Phizicky EM (1999) A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* **286**: 1153-1155
- Massia SP, Hubbell JA (1991) An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *J Cell Biol* **114**: 1089-1100

- Mege RM, Gavard J, Lambert M (2006) Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 541-548
- Merkel R, Nassoy P, Leung A, Ritchie K, Evans E (1999) Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature* **397**: 50-53
- Miloushev VZ, Bahna F, Ciatto C, Ahlsen G, Honig B, Shapiro L, Palmer AG, 3rd (2008) Dynamic properties of a type II cadherin adhesive domain: implications for the mechanism of strand-swapping of classical cadherins. *Structure* **16**: 1195-1205
- Miranda KC, Joseph SR, Yap AS, Teasdale RD, Stow JL (2003) Contextual binding of p120ctn to E-cadherin at the basolateral plasma membrane in polarized epithelia. *J Biol Chem* **278**: 43480-43488
- Miyaguchi K (2000) Ultrastructure of the zonula adherens revealed by rapid-freeze deep-etching. *J Struct Biol* **132**: 169-178
- Miyatani S, Shimamura K, Hatta M, Nagafuchi A, Nose A, Matsunaga M, Hatta K, Takeichi M (1989) Neural cadherin: role in selective cell-cell adhesion. *Science* **245**: 631-635
- Morishita H, Yagi T (2007) Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 584-592
- Morrison ME, Racaniello VR (1992) Molecular cloning and expression of a murine homolog of the human poliovirus receptor gene. *J Virol* **66**: 2807-2813
- Moyer WA, Steinberg MS (1976) Do rates of intercellular adhesion measure the cell affinities reflected in cell-sorting and tissue-spreading configurations? *Dev Biol* **52**: 246-262
- Mutoh T, Hamada S, Senzaki K, Murata Y, Yagi T (2004) Cadherin-related neuronal receptor 1 (CNR1) has cell adhesion activity with beta1 integrin mediated through the RGD site of CNR1. *Exp Cell Res* **294**: 494-508
- Nagafuchi A, Ishihara S, Tsukita S (1994) The roles of catenins in the cadherin-mediated cell adhesion: functional analysis of E-cadherin-alpha catenin fusion molecules. *J Cell Biol* **127**: 235-245
- Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okasaki K, Yasuda K, Takeichi M (1987) Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* **329**: 341-343
- Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM (1996) Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* **380**: 360-364
- Nelson WJ (2008) Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans* **36**: 149-155
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ (1999) N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* **147**: 631-644
- Niessen CM, Gumbiner BM (2002) Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *J Cell Biol* **156**: 389-399
- Nishimura T, Takeichi M (2009) Remodeling of the adherens junctions during morphogenesis. *Curr Top Dev Biol* **89**: 33-54
- Noe V, Willems J, Vandekerckhove J, Roy FV, Bruyneel E, Mareel M (1999) Inhibition of adhesion and induction of epithelial cell invasion by HAV-containing E-cadherin-specific peptides. *J Cell Sci* **112 (Pt 1)**: 127-135

- Nollet F, Kools P, 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, Takeichi M (1986) A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol* **103**: 2649-2658
- Ogama Y, Ouchida M, Yoshino T, Ito S, Takimoto H, Shiote Y, Ishimaru F, Harada M, Tanimoto M, Shimizu K (2004) Prevalent hyper-methylation of the CDH13 gene promoter in malignant B cell lymphomas. *Int J Oncol* **25**: 685-691
- Ogou S, Okada TS, Takeichi M (1982) Cleavage stage mouse embryos share a common cell adhesion system with teratocarcinoma cells. *Dev Biol* **92**: 521-528
- Ostuni E, Whitesides GM, Ingber DE, Chen CS (2009) Using self-assembled monolayers to pattern ECM proteins and cells on substrates. *Methods Mol Biol* **522**: 183-194
- Ozawa M, Baribault H, Kemler R (1989) The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* **8**: 1711-1717
- Ozawa M, Engel J, Kemler R (1990a) Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. *Cell* **63**: 1033-1038
- Ozawa M, Ringwald M, Kemler R (1990b) Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4246-4250
- Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jeronimo C, Milanezi F, Schmitt FC (2005) P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res* **11**: 5869-5877
- Parisini E, Higgins JM, Liu JH, Brenner MB, Wang JH (2007) The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. *J Mol Biol* **373**: 401-411
- Patel IS, Madan P, Getsios S, Bertrand MA, MacCalman CD (2003a) Cadherin switching in ovarian cancer progression. *Int J Cancer* **106**: 172-177
- Patel SD, Chen CP, Bahna F, Honig B, Shapiro L (2003b) Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 690-698
- Patel SD, Ciatto C, Chen CP, Bahna F, Rajebhosale M, Arkus N, Schieren I, Jessell TM, Honig B, Price SR, Shapiro L (2006) Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell* **124**: 1255-1268
- Pece S, Gutkind JS (2000) Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem* **275**: 41227-41233
- Peifer M, Yap AS (2003) Traffic control: p120-catenin acts as a gatekeeper to control the fate of classical cadherins in mammalian cells. *J Cell Biol* **163**: 437-440
- Perez-Moreno M, Davis MA, Wong E, Pasolli HA, Reynolds AB, Fuchs E (2006) p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin. *Cell* **124**: 631-644
- Perret E, Benoliel AM, Nassoy P, Pierres A, Delmas V, Thiery JP, Bongrand P, Feracci H (2002a) Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *EMBO J* **21**: 2537-2546

- Perret E, Benoliel AM, Nassoy P, Pierres A, Delmas V, Thiery JP, Bongrand P, Feracci H (2002b) Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *Embo J* **21**: 2537-2546.
- Perret E, Leung A, Feracci H, 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
- Perret E, Leung A, Morel A, Feracci H, Nassoy P (2002c) Versatile Decoration of Glass Surfaces To Probe Individual Protein-Protein Interactions and Cellular Adhesion. *Langmuir* **18**: 846-854
- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J (1999a) A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J* **18**: 1738-1747.
- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J (1999b) A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J* **18**: 1738-1747
- Perutz MF, Mathews FS (1966) An x-ray study of azide methaemoglobin. *J Mol Biol* **21**: 199-202
- Philippova M, Ivanov D, Tkachuk V, Erne P, Resink TJ (2003) Polarisation of T-cadherin to the leading edge of migrating vascular cells in vitro: a function in vascular cell motility? *Histochem Cell Biol* **120**: 353-360
- Philippova M, Joshi MB, Kyriakakis E, Pfaff D, Erne P, Resink TJ (2009) A guide and guard: the many faces of T-cadherin. *Cell Signal* **21**: 1035-1044
- Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P (1998a) Interactions between biological surfaces. *Curr Opin Coll & Interface Science* **3**: 525-533
- Pierres A, Feracci H, Delmas V, Benoliel AM, Thiery JP, Bongrand P (1998b) Experimental study of the interaction range and association rate of surface-attached cadherin 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9256-9261
- Pierres A, Prakasam A, Touchard D, Benoliel AM, Bongrand P, Leckband D (2007) Dissecting subsecond cadherin bound states reveals an efficient way for cells to achieve ultrafast probing of their environment. *FEBS Lett* **581**: 1841-1846
- Pierres A, Touchard D, Benoliel AM, Bongrand P (2002) Dissecting streptavidin-biotin interaction with a laminar flow chamber. *Biophys J* **82**: 3214-3223
- Pittet P, Lee K, Kulik AJ, Meister JJ, Hinz B (2008) Fibrogenic fibroblasts increase intercellular adhesion strength by reinforcing individual OB-cadherin bonds. *J Cell Sci* **121**: 877-886
- Ponten J, Stolt L (1980) Proliferation control in cloned normal and malignant human cells. *Exp Cell Res* **129**: 367-375
- Posy S, Shapiro L, Honig B (2008) Sequence and structural determinants of strand swapping in cadherin domains: do all cadherins bind through the same adhesive interface? *J Mol Biol* **378**: 952-966
- Prakasam A, Chien YH, Maruthamuthu V, Leckband DE (2006a) Calcium site mutations in cadherin: impact on adhesion and evidence of cooperativity. *Biochemistry* **45**: 6930-6939
- Prakasam AK, Maruthamuthu V, Leckband DE (2006b) Similarities between heterophilic and homophilic cadherin adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 15434-15439

- Qian X, Karpova T, Sheppard AM, McNally J, Lowy DR (2004) E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **23**: 1739-1748
- Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO (1997) Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Developmental Biology* **181**: 64-78
- Ranscht B, Dours-Zimmermann MT (1991) T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron* **7**: 391-402
- Rao SV, Anderson KW, Bachas LG (1999) Controlled layer-by-layer immobilization of horseradish peroxidase. *Biotechnol Bioeng* **65**: 389-396
- Raptis L, Arulanandam R, Vultur A, Geletu M, Chevalier S, Feracci H (2009) Beyond Structure, to survival: activation of Stat3 by cadherin engagement. *Biochemistry and Cell Biology* **manuscript accepted**: see article IV of this Ph.D. thesis
- Resink TJ, Kuzmenko YS, Kern F, Stambolsky D, Bochkov VN, Tkachuk VA, Erne P, Niermann T (1999) LDL binds to surface-expressed human T-cadherin in transfected HEK293 cells and influences homophilic adhesive interactions. *FEBS Lett* **463**: 29-34
- Reynolds AB, Daniel J, McCrean PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z (1994) Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* **14**: 8333-8342
- Rickman L, Simrak D, Stevens HP, Hunt DM, King IA, Bryant SP, Eady RA, Leigh IM, Arnemann J, Magee AI, Kelsell DP, Buxton RS (1999) N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Hum Mol Genet* **8**: 971-976
- Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C (1995) A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 855-859
- Riou P, Saffroy R, Chenailier C, Franc B, Gentile C, Rubinstein E, Resink T, Debuire B, Piatier-Tonneau D, Lemoine A (2006) Expression of T-cadherin in tumor cells influences invasive potential of human hepatocellular carcinoma. *FASEB J* **20**: 2291-2301
- Robert P, Benoliel AM, Pierres A, Bongrand P (2007) What is the biological relevance of the specific bond properties revealed by single-molecule studies? *J Mol Recognit* **20**: 432-447
- Roth S (1968) Studies on intercellular adhesive selectivity. *Dev Biol* **18**: 602-631
- Rousseau F, Schymkowitz JW, Wilkinson HR, Itzhaki LS (2001) Three-dimensional domain swapping in p13suc1 occurs in the unfolded state and is controlled by conserved proline residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5596-5601
- Rusin KM, Fare TL, Stemple JZ (1992) Immobilization of flavoproteins on silicon: effect of cross-linker chain length on enzyme activity. *Biosens Bioelectron* **7**: 367-373
- Schatz C, Louguet S, Le Meins JF, Lecommandoux S (2009) Polysaccharide-block-polypeptide copolymer vesicles: towards synthetic viral capsids. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**: 2572-2575
- Schmitt J, Hess H, Stunnenberg HG (1993) Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol Biol Rep* **18**: 223-230
- Shan WS, Koch A, Murray J, Colman DR, Shapiro L (1999) The adhesive binding site of cadherins revisited. *Biophys Chem* **82**: 157-163

- Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA (1995) Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**: 327-337
- Shi Q, Chien YH, Leckband D (2008) Biophysical properties of cadherin bonds do not predict cell sorting. *J Biol Chem*
- Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M, et al. (1995) Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol* **128**: 949-957
- Shibata T, Ochiai A, Gotoh M, Machinami R, Hirohashi S (1996) Simultaneous expression of cadherin-11 in signet-ring cell carcinoma and stromal cells of diffuse-type gastric cancer. *Cancer Lett* **99**: 147-153
- Shirayoshi Y, Okada TS, Takeichi M (1983) The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* **35**: 631-638
- Sivasankar S, Briehner W, Lavrik N, Gumbiner B, Leckband D (1999) Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11820-11824
- Sivasankar S, Zhang Y, Nelson WJ, Chu S (2009) Characterizing the initial encounter complex in cadherin adhesion. *Structure* **17**: 1075-1081
- Smock RG, Gierasch LM (2009) Sending signals dynamically. *Science* **324**: 198-203
- Song YF, McMillan N, Long DL, Kane S, Malm J, Riehle MO, Pradeep CP, Gadegaard N, Cronin L (2009) Micropatterned surfaces with covalently grafted unsymmetrical polyoxometalate-hybrid clusters lead to selective cell adhesion. *J Am Chem Soc* **131**: 1340-1341
- Sotomayor M, Schulten K (2008) The allosteric role of the Ca²⁺ switch in adhesion and elasticity of C-cadherin. *Biophys J* **94**: 4621-4633
- Southern E, Mir K, Shchepinov M (1999) Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet* **21**: 5-9
- Steinberg MS, Takeichi M (1994) Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 206-209
- Stevens MM, George JH (2005) Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* **310**: 1135-1138
- Suzuki S, Sano K, Tanihara H (1991) Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul* **2**: 261-270
- Takeichi M (1977) Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* **75**: 464-474
- Takeichi M (1988a) The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* **102**: 639-655
- Takeichi M (1988b) The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* **102**: 639-655
- Takeichi M (1990) Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* **59**: 237-252

- Takeichi M (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**: 1451-1455
- Takeichi M (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 619-627
- Tamura D, Hiraga T, Myoui A, Yoshikawa H, Yoneda T (2008) Cadherin-11-mediated interactions with bone marrow stromal/osteoblastic cells support selective colonization of breast cancer cells in bone. *Int J Oncol* **33**: 17-24
- Tamura K, Shan WS, Hendrickson WA, Colman DR, Shapiro L (1998a) Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* **20**: 1153-1163
- Tamura K, Shan WS, Hendrickson WA, Colman DR, Shapiro L (1998b) Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* **20**: 1153-1163.
- Taniuchi K, Nakagawa H, Hosokawa M, Nakamura T, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Katagiri T, Nakamura Y (2005) Overexpressed P-cadherin/CDH3 promotes motility of pancreatic cancer cells by interacting with p120ctn and activating rho-family GTPases. *Cancer Res* **65**: 3092-3099
- They M, Racine V, Pepin A, Piel M, Chen Y, Sibarita JB, Bornens M (2005) The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol* **7**: 947-953
- Thiery JP (2003) Cell adhesion in development: a complex signaling network. *Curr Opin Genet Dev* **13**: 365-371
- Thiery JP, Sleeman JP (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 131-142
- Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hummingbird DK, Reynolds AB (2000) Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* **148**: 189-202
- Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, Bussemakers MJ, Schalken JA (2000) Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* **60**: 3650-3654
- Tomschy A, Fauser C, Landwehr R, 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 RB, Laur O, Troyanovsky SM (2007) Stable and unstable cadherin dimers: mechanisms of formation and roles in cell adhesion. *Mol Biol Cell* **18**: 4343-4352
- Troyanovsky RB, Sokolov E, Troyanovsky SM (2003) Adhesive and lateral E-cadherin dimers are mediated by the same interface. *Mol Cell Biol* **23**: 7965-7972
- Troyanovsky RB, Sokolov EP, Troyanovsky SM (2006) Endocytosis of cadherin from intracellular junctions is the driving force for cadherin adhesive dimer disassembly. *Mol Biol Cell* **17**: 3484-3493
- Troyanovsky S (2005) Cadherin dimers in cell-cell adhesion. *Eur J Cell Biol* **84**: 225-233
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 285-293
- Uemura K, Kuzuya A, Aoyagi N, Ando K, Shimozono Y, Ninomiya H, Shimohama S, Kinoshita A (2007) Amyloid beta inhibits ectodomain shedding of N-cadherin via down-regulation of cell-surface NMDA receptor. *Neuroscience* **145**: 5-10

- Ultsch MH, Wiesmann C, Simmons LC, Henrich J, Yang M, Reilly D, Bass SH, de Vos AM (1999) Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J Mol Biol* **290**: 149-159
- Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Shelton DL, Parada LF, Presta LG (1995) An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J* **14**: 2795-2805
- van Hengel J, van Roy F (2007) Diverse functions of p120ctn in tumors. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 78-88
- van Roy F, Berx G (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* **65**: 3756-3788
- Vasioukhin V, Bauer C, Degenstein L, Wise B, Fuchs E (2001) Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of alpha-catenin in skin. *Cell* **104**: 605-617
- Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E (2000) Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**: 209-219
- von Nickisch-Rosenegk M, Marschan X, Andresen D, Abraham A, Heise C, Bier FF (2005) On-chip PCR amplification of very long templates using immobilized primers on glassy surfaces. *Biosens Bioelectron* **20**: 1491-1498
- Wallis S, Lloyd S, Wise I, Ireland G, Fleming TP, Garrod D (2000) The alpha isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells. *Mol Biol Cell* **11**: 1077-1092
- Weis WI, Nelson WJ (2006) Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J Biol Chem* **281**: 35593-35597
- Weisbrod SH, Marx A (2008) Novel strategies for the site-specific covalent labelling of nucleic acids. *Chem Commun (Camb)*: 5675-5685
- Wilson DL, Martin R, Hong S, Cronin-Golomb M, Mirkin CA, Kaplan DL (2001) Surface organization and nanopatterning of collagen by dip-pen nanolithography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13660-13664
- Wojcik EJ, Sharifpoor S, Miller NA, Wright TG, Watering R, Tremblay EA, Swan K, Mueller CR, Elliott BE (2006) A novel activating function of c-Src and Stat3 on HGF transcription in mammary carcinoma cells. *Oncogene* **25**: 2773-2784
- Wolfram T, Spatz JP, Burgess RW (2008) Cell adhesion to agrin presented as a nanopatterned substrate is consistent with an interaction with the extracellular matrix and not transmembrane adhesion molecules. *BMC Cell Biol* **9**: 64
- Wong LS, Khan F, Micklefield J (2009) Selective covalent protein immobilization: strategies and applications. *Chem Rev* **109**: 4025-4053
- Xia N, Thodeti CK, Hunt TP, Xu Q, Ho M, Whitesides GM, Westervelt R, Ingber DE (2008) Directional control of cell motility through focal adhesion positioning and spatial control of Rac activation. *FASEB J* **22**: 1649-1659
- Xiao K, Allison DF, Buckley KM, Kottke MD, Vincent PA, Faundez V, Kowalczyk AP (2003) Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* **163**: 535-545
- Yagi T (2008) Clustered protocadherin family. *Dev Growth Differ* **50 Suppl 1**: S131-140

- Yam CM, Deluge M, Tang D, Kumar A, Cai C (2006) Preparation, characterization, resistance to protein adsorption, and specific avidin-biotin binding of poly(amidoamine) dendrimers functionalized with oligo(ethylene glycol) on gold. *J Colloid Interface Sci* **296**: 118-130
- Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ (2005) Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**: 889-901
- Yap AS, Kovacs EM (2003) Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J Cell Biol* **160**: 11-16
- Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM (1998) The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* **141**: 779-789
- Zegers I, Deswarte J, Wyns L (1999) Trimeric domain-swapped barnase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 818-822
- Zhang Y, Sivasankar S, Nelson WJ, Chu S (2009) Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 109-114
- Zhou S, Matsuyoshi N, Liang SB, Takeuchi T, Ohtsuki Y, Miyachi Y (2002) Expression of T-cadherin in Basal keratinocytes of skin. *J Invest Dermatol* **118**: 1080-1084
- Zhu B, Chappuis-Flament S, Wong E, Jensen IE, Gumbiner BM, Leckband D (2003) Functional analysis of the structural basis of homophilic cadherin adhesion. *Biophys J* **84**: 4033-4042