



HAL
open science

**Mécanismes moléculaires responsables des propriétés
migratoires des gliomes [Texte imprimé] : rôle et
dynamique des jonctions adhérentes dans la migration
des astrocytes sains et tumoraux**

Florent Peglion

► **To cite this version:**

Florent Peglion. Mécanismes moléculaires responsables des propriétés migratoires des gliomes [Texte imprimé] : rôle et dynamique des jonctions adhérentes dans la migration des astrocytes sains et tumoraux. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66263 . tel-00834275

HAL Id: tel-00834275

<https://theses.hal.science/tel-00834275v1>

Submitted on 14 Jun 2013

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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Sciences de la Vie
Génomique, Cellule, Développement, microbiologie

Ecole doctorale : Complexité du Vivant

Présentée par

FLORENT PEGLION

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Mécanismes moléculaires responsables des propriétés
migratoires des gliomes: rôle et dynamique des jonctions
adhérentes dans la migration des astrocytes sains et tumoraux.**

Dirigée par Sandrine ETIENNE-MANNEVILLE

Soutenue le 14 Septembre 2012

Devant le jury composé de :

Mme Claire Fournier-Thibault	Présidente du jury
Mme Cécile Gauthier-Rouvière	Rapporteur
M. Christian Giaume	Rapporteur
Mme Danijela Vignjevic	Examineur
M. Marc Sanson	Examineur
Mme Sandrine Etienne-Manneville	Directeur de thèse

*L'art et la science, c'est tâcher de comprendre.
L'échec et la réussite sont tout à fait secondaires.*
Giacometti

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier **Sandrine** de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis d'intégrer son laboratoire pour développer ce projet de thèse. Tout au long de ces quatre années, elle m'a laissé assouvir ma curiosité parfois brouillonne tout en me recadrant et en me remettant dans le droit chemin quand je m'égarais. Cette liberté surveillée m'a permis de m'épanouir pleinement au laboratoire. Les nombreuses discussions scientifiques enrichissantes que nous avons pu avoir ont également été très formatrices. Le tout a contribué à me conforter dans l'idée que j'avais choisi le bon métier. Encore merci !

Je remercie le **Pr Jean-Yves Delattre** de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et de son service à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière pendant les six premiers mois de ma thèse, ainsi que chaque fois que ce fut nécessaire à l'avancée de mes travaux. Les discussions pleines de bienveillance et riches en enseignements cliniques que j'ai pu avoir avec lui m'ont permis de découvrir un aspect plein d'humanité du monde hospitalier. Je lui en suis très reconnaissant.

Je tiens à remercier **Christian Giaume** et **Cécile Gauthier-Rouvière** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi que **Claire Fournier-Thibault**, **Danijela Vignjevic** et **Marc Sanson** de faire partie de mon jury.

Merci à toutes les personnes du laboratoire que j'ai pu côtoyer plus ou moins longtemps. Tout d'abord un immense merci à **Batiste** pour sa disponibilité sans faille tout au long de ma thèse, dans les moments de doute scientifique comme dans les moments plus joyeux de parties de curling endiablées avec la carboglace. Encore merci pour tous les nombreux et précieux conseils prodigués. Merci à **Isabelle, Nael, Emeline, Yasu, Rym** et **Muguette**, « les anciens », pour la transmission du savoir du laboratoire et pour les bonnes tranches de rigolade. Merci aux « nouveaux » **Justin-la-mèche, Cécile, Jan, Keren, Vincent** et **Flora**, de me supporter au quotidien; je conviens que ce n'est pas chose aisée au début, mais on s'y fait petit à petit, vous verrez. J'ai également pu compter sur les précieux conseils et le soutien de **Maryse** pour démêler les nœuds serrés de l'administration pasteurienne... Un grand merci à **Noria** également, pour sa joie de vivre, ses cadeaux, sa musique et son PBS jaune. Mention spéciale aux cuistots de la cantine Pasteur ; une bonne crème brûlée et ça repart.

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire du **Pr Delattre** avec lesquels j'ai interagi pendant un bon tiers de ma thèse. Merci à **Yannick** (même si footballistiquement on n'est pas sur la même longueur d'onde) pour tes précieux conseils lors de l'analyse transcriptomique. Merci à **Blandine** pour m'avoir appris toutes les techniques du laboratoire, et avoir répondu à toutes mes requêtes, même les plus extravagantes. Je tiens également à remercier **Marc, Khê** et **Karima** pour leurs précieux enseignements sur l'aspect clinique et histologique des gliomes. Merci à **Sophie, Catherine, Soufiane, Xiaowei** pour les discussions plus ou moins scientifiques.

Enfin, un petit mot pour mes proches. Je voudrais remercier **mes parents** qui chacun à leur façon m'ont transmis la plus belle chose qui soit, leur curiosité pour les choses de la vie. Je n'oublie pas mes deux sœurs **Armony** et **Mérodie**, pour leur soutien sans faille et tout le reste de la famille monégasque bien au chaud en principauté. Un mot aussi pour la **famille Roquet**. Merci aux amis proches et lointains pour les moments de décompression. Ils se reconnaîtront.

The last but not the least, tonnerre de remerciements à **Clémence**, qui partage ma vie et qui m'a soutenu sans relâche, même quand je restais accroché au microscope pour un voyage merveilleux jusqu'au bout de la nuit...

Résumé

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes. Dérivant des cellules gliales et majoritairement des astrocytes, les gliomes malins évoluent rapidement et sont associés à un très mauvais pronostic, en partie causé par leur nature invasive. Les cellules de gliomes infiltrent activement le parenchyme cérébral, ce qui leur permet d'échapper aux thérapies focales (chirurgie et radiothérapie), et de donner naissance à de nouveaux foyers tumoraux au voisinage direct ou à distance de la tumeur initiale.

En analysant le transcriptome de plus de 130 gliomes de différents grades et en me focalisant uniquement sur les variations d'expression de gènes connus pour être impliqués dans la migration, l'invasion, l'adhérence et la polarité astrocytaire, j'ai mis en évidence une altération des jonctions adhérentes dans les gliomes et suggéré une corrélation inverse entre le niveau de la p120ctn et l'invasivité des gliomes *in vitro* et *in vivo*. En contrôlant une boucle de recyclage inédite de la N-cadhérine dans les cellules en migration, la p120ctn régule spatialement les forces d'adhérence intercellulaire, et assure une migration collective dirigée. L'altération de sa fonction dans les astrocytes sains entraîne une augmentation de la dispersion des cellules, la perturbation de leur directionnalité et *in fine* une augmentation de leur vitesse de migration ; des caractéristiques identiques aux cellules de gliomes en migration. L'ensemble de ces résultats définit la p120ctn comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le traitement des gliomes diffus et comme un potentiel marqueur de l'invasivité des gliomes. Associé aux nouveaux traitements anti-angiogéniques et chimiothérapeutiques, un traitement ciblant spécifiquement l'invasion des cellules gliales cancéreuses améliorerait considérablement le pronostic de cette maladie.

Mots-clés :

Gliome, astrocyte, invasion tumorale, migration collective, jonctions adhérentes, trafic et recyclage membranaire, p120-caténine, flux rétrograde

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION.....	11
I. LES ASTROCYTES SAINS ET TUMORAUX	12
<u>I.A. Les astrocytes sont bien plus que des cellules de support du tissu neuronal.....</u>	12
I.A.1. Une morphologie particulière	12
I.A.2. Les principales fonctions des astrocytes :.....	14
<u>I.B. Les gliomes malins: des tumeurs d'origine gliale</u>	17
I.B.1. Diagnostic et classification histopathologique.....	17
I.B.2. Epidémiologie, pronostic et facteurs environnementaux.....	18
I.B.3. Hétérogénéité des glioblastomes et altérations génétiques majeures des gliomes	19
I.B.4. A la recherche de la cellule d'origine des gliomes malins.....	21
<u>I.C. Les gliomes malins : des tumeurs extrêmement invasives</u>	22
I.C.1. Des capacités invasives intrinsèques entravent la réussite des traitements thérapeutiques localisés	22
I.C.2. Les modes d'invasion des gliomes	25
I.C.3. La nécessité d'obtenir des marqueurs de l'invasivité des gliomes	25
II. LA MIGRATION CELLULAIRE ET SON MODELE EXPERIMENTAL ASTROCYTAIRE.....	27
<u>II.A. Les différents types de migration cellulaire</u>	27
II.A.1. La migration en solo ou en groupe	27
II.A.2. La migration mésenchymale ou amiboïde	28
II.A.3. Quel type de migration s'applique aux cellules des gliomes ?.....	30
<u>II.B. Les mécanismes généraux de la migration cellulaire</u>	30
II.B.1. La phase de polarisation cellulaire et l'établissement d'un axe avant/arrière	30
II.B.2. La phase de formation d'une protrusion à l'avant.....	31
II.B.3. La phase d'adhérence de la protrusion au substrat.....	31
II.B.4. La phase de contraction	31
II.B.5. La phase de rétraction de l'arrière.....	31
II.B.6. L'importance du recyclage des intégrines dans la migration cellulaire.....	32
<u>II.C. La migration astrocytaire</u>	33
II.C.1. Le modèle <i>in vitro</i> de fermeture de blessure.....	33
II.C.2. La signalisation moléculaire gouvernant la migration des astrocytes	34
III. LA JONCTION ADHERENTE OU COMMENT MAINTENIR LA COHESION TISSULAIRE TOUT EN PERMETTANT LES MOUVEMENTS CELLULAIRES.....	37
<u>III.A. Les principales structures de l'adhérence intercellulaire</u>	37
III.A.1. Les différents types de jonctions intercellulaires chez les Vertébrés	37
III.A.2. Les jonctions intercellulaires des astrocytes	39
<u>III.B. Les jonctions adhérentes sont des structures complexes et labiles en adéquation avec leur fonction</u>	40
III.B.1. L'ultrastructure des jonctions adhérentes	41
III.B.2. La présentation des acteurs moléculaires des jonctions adhérentes	41
III.B.3. Le complexe nectine/afadine :	41
<u>III.C. Les cadhérines des jonctions adhérentes</u>	42
III.C.1. Les principales cadhérines classiques.....	43

III.C.2. L'adhérence dépendante des cadhérines.....	43
III.C.3. Le domaine intracellulaire des cadhérines interagit avec les caténines.....	45
III.C.4. Les particularités de la N-cadhérine.....	45
III.C.5. Le processus de « shedding » ou protéolyse de la partie extracellulaire.....	47
<u>III.D. Les caténines des jonctions d'adhérence</u>	48
III.D.1. La sous-famille de la β -caténine.....	48
III.D.2. La sous-famille de l' α -caténine.....	49
III.D.3. La sous-famille de la p120-caténine.....	50
<u>III.E. La dynamique des contacts dépendants des cadhérines est un processus orchestré par les caténines.</u>	52
III.E.1. Etude de la dynamique des cadhérines: diffusion, recyclage et dégradation.....	54
III.E.2. La p120caténine est une molécule clé qui coordonne les différentes étapes du renouvellement des jonctions adhérentes.....	57
III.E.3. Le rôle de la β -caténine dans le renouvellement des JAs.....	60
IV. LES ROLES DES JONCTIONS ADHERENTES DANS LA MIGRATION CELLULAIRE ET L'INVASION TUMORALE.....	61
<u>IV.A. Jonctions adhérentes, migration cellulaire et morphogénèse des tissus</u>	61
IV.A.1. Les jonctions adhérentes constituent des supports adhésifs favorisant la migration cellulaire.....	61
IV.A.2. Les cadhérines favorisent et orientent la migration dirigée.....	64
IV.A.3. Les jonctions adhérentes constituent une plateforme de signalisation favorisant la migration cellulaire.....	67
IV.A.4. Les jonctions d'adhérence dans la migration collective.....	68
IV.A.5. Les contacts dépendants des cadhérines restreignent la migration cellulaire individuelle.....	70
<u>IV.B. La dérégulation des cadhérines dans les carcinomes invasifs</u>	71
IV.B.1. Les altérations de la E-cadhérine favorisent la progression métastatique des tumeurs épithéliales.....	71
IV.B.2. Les mécanismes à l'origine de la diminution d'expression de la E-cadhérine dans les carcinomes.....	71
<u>IV.C. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et l'infiltration des tumeurs épithéliales.</u>	73
IV.C.1. Le changement d'expression des cadhérines lors de la TEM.....	73
IV.C.2. L'induction d'un phénotype invasif : le rôle de la N-cadhérine.....	74
<u>IV.D. Le rôle de p120ctn dans la croissance des cancers épithéliaux</u>	76
IV.D.1. <i>CTNND1</i> , le gène codant pour la p120ctn est un gène suppresseur de tumeur.....	76
IV.D.2. p120ctn et l'invasion tumorale.....	77
<u>IV.E. L'α-caténine et la β-caténine dans la progression tumorale</u>	79
OBJECTIFS.....	80
RESULTATS.....	84
I. CARACTERISATION MOLECULAIRE DES GLIOMES.....	85
<u>I.A. Caractérisation transcriptomique des gliomes axée sur les gènes dits de la migration : modus operandi</u>	85
<u>I.B. Altération de l'expression des principaux acteurs de la voie de signalisation de Cdc42</u>	86
I.B.1. Les deux isoformes de Cdc42 ne sont pas altérées de manière analogue dans les gliomes de haut-grade.....	86
I.B.2. Les protéines kinases aPKC (PKC ζ et PKC ι) sont différenciellement exprimées dans les gliomes de haut-grade.....	88

I.B.3.	L'altération de la voie de signalisation de Cdc42 est associée à une perte de directionnalité et des défauts de polarité des cellules de glioblastomes en migration.	89
<u>I.C.</u>	<u>ARF6 est surexprimée dans les gliomes</u>	90
<u>I.D.</u>	<u>Altération des jonctions d'adhérentes dans les gliomes de haut-grade</u>	91
I.D.1.	Expression de la N-cadhérine dans les gliomes de haut-grade	91
I.D.2.	Rôle de la N-cadhérine dans la migration collective des astrocytes sains et tumoraux	91
I.D.3.	Expression de la p120ctn dans les gliomes	93
I.D.4.	Impact de la perte de la p120ctn sur la migration des astrocytes sains et tumoraux	93
II.	LA DYNAMIQUE DE LA N-CADHERINE AU COURS DE LA MIGRATION CELLULAIRE	97
<u>II.A.</u>	<u>Mise en évidence d'un flux rétrograde de la N-cadhérine</u>	97
II.A.1.	Observation d'un flux rétrograde de petits agrégats de N-cadhérine aux jonctions latérales des astrocytes en migration	97
II.A.2.	Les molécules de N-cadhérine à l'avant sont transportées vers l'arrière de la cellule avec le flux rétrograde des jonctions adhérentes latérales	99
<u>II.B.</u>	<u>Caractérisation du flux rétrograde de N-cadhérine</u>	100
II.B.1.	Le flux rétrograde de N-cadhérine est couplé au flux rétrograde d'actine au cours de la migration	100
II.B.2.	Le flux rétrograde de N-cadhérine dépend de la contractilité du réseau d'acto-myosine	101
<u>II.C.</u>	<u>Le flux rétrograde de N-cadhérine est associé à un recyclage des cadhérines de l'arrière de la cellule vers les jonctions en formation, à l'avant</u>	102
II.C.1.	Le devenir de la N-cadhérine à l'arrière de la cellule	102
II.C.2.	Transport membranaire de la N-cadhérine de l'arrière de la cellule vers le front de migration	103
II.C.3.	Les molécules de N-cadhérine recrutées au front de migration participent à la formation de nouvelles jonctions latérales au cours de la migration	105
II.C.4.	Mise en évidence d'une boucle de recyclage de la N-cadhérine pendant la migration collective des astrocytes	106
III.	LA P120CTN CONTROLE LA DYNAMIQUE DE LA N-CADHERINE PENDANT LA MIGRATION CELLULAIRE	110
<u>III.A.</u>	<u>La perte de la p120ctn altère la boucle de recyclage de la N-cadhérine</u>	110
III.A.1.	Le recrutement de la p120ctn aux jonctions adhérentes diminue de l'avant à l'arrière des cellules en migration et favorise l'endocytose de la N-cadhérine à l'arrière	110
III.A.2.	La perte de la p120ctn empêche le recrutement de la N-cadhérine au front de migration ainsi que la formation de nouvelles jonctions latérales	110
III.A.3.	La perte de la p120ctn facilite la dispersion des cellules en migration collective	113
<u>III.B.</u>	<u>La phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 régule ses fonctions dans la dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration cellulaire</u>	115
III.B.1.	Phosphorylation de la p120ctn au cours de la migration astrocytaire collective	115
III.B.2.	La phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 déstabilise son interaction avec la N-cadhérine	116
III.B.3.	La phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 est dépendante de la GSK-3 β	117
III.B.4.	La phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 est nécessaire au recrutement de la N-cadhérine au front de migration	119
CONCLUSION		123

DISCUSSION	125
I. LA DYNAMIQUE DES JONCTIONS ADHERENTES DANS LA MIGRATION COLLECTIVE	126
I.A. Les mécanismes moléculaires contrôlant la dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration cellulaire.....	126
I.B. La fonction du treadmilling et du recrutement des JAs à l'avant : un rôle dans l'inhibition de la motilité après contact ?.....	130
II. LA P120CTN ET LA DYNAMIQUE DES JONCTIONS ADHERENTES	132
II.A. Le rôle de la perte de la p120ctn sur l'adhérence intercellulaire pendant la migration est-il indépendant de l'altération du niveau global de la N-cadhérine qu'elle induit?	132
II.B. Impact de la phosphorylation de la p120ctn sur la dynamique des jonctions adhérentes	133
II.C. La régulation spatiotemporelle de l'activité de la p120ctn pendant la migration cellulaire	134
III. RECHERCHE DE MARQUEURS DIAGNOSTIQUES DE L'INVASIVITE DES GLIOMES	138
III.A. La N-cadhérine, une molécule pro- ou anti-invasive ?.....	138
III.B. La p120ctn : un nouveau marqueur de l'invasivité des gliomes ?.....	140
ANNEXE ARTICLES.....	143
ANNEXE TECHNIQUE	144
MATERIEL ET METHODES.....	144
ANNEXE FILMS	152
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	156

Liste des abréviations

ADAM: A Disintegrin And Metalloproteinase

APC: Adenomatous Polyposis Coli

aPKC: atypical Protein Kinase C

ARF6: ADP-Ribosylation Factor 6

ARVCF: Armadillo Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome

BARS: Brefeldin A–ADP-Ribosylated Substrate

CASPR2: Contactin ASsociated PRotein-like 2

CBP: CREB-binding protein

βPIX: beta Pak Interacting eXchange factor

CD133: Cluster of Differentiation 133

Cdc42: Cell Division Cycle 42

CDKN2A: Cyclin-Dependent Kinase iNhibitor 2A

Dlg1: Disc LarGe

EGF: Epidermal Growth Factor

FAK: Focal Adhesion Kinase

Fer: Feline Encephalitis virus-Related kinase

FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor

FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching

GBM: Glioblastome

GKAP/ DLGPA1/SAPAP1: Guanylate Kinase-Associated Protein/Disc LarGe Associated Protein 1)/ SAP90/PSD-95-associated protein 1

GSK3β: Glycogen Synthase Kinase 3 beta

IDH1: Isocytate DeHydrogenase 1

IMC: Inhibition de motilité après contact

JAMs: Junctional Adhesion Molecules

L1-CAM: L1-Cell Adhesion Molecule

MAP2e: Microtubule Associated Protein 2e

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MGMT: O-6-MethylGuanine-DNA MethylTransferase

MLC: Myosin Light Chain

MMP: Matrix MetalloProteinase

MTOC: MicroTubule Organizing Center

N-CAM: Neural-Cell Adhesion Molecule

NeuN: Neuronal Nuclei antigen

NEZHA: Dieu protecteur dans la religion taoïste

Nf-1: Neurofibromin-1

NPRAP: Neural Plakophilin Related Armadillo Protein

PAK1: p21 Activated Kinase 1

Par6: PARtitioning defective 6

PI3K: PhosphoInositide 3 Kinase

PLEKHA7: PLEcKstrin Homology domain containing, family A member 7

PTEN: Phosphatase and TENSin homolog

Rac: RAS-related C3 botulinum toxin substrate

RTK: Receptor Tyrosine Kinase

Src: Se prononce « *Sarc* », diminutif de sarcoma

TCF/LEF: T-Cell Factor/Leukocyte-Enhancer Factor

TEM: Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGF-β: Transforming or Tumor Growth Factor beta

TIAM1: T-cell lymphoma Invasion And Metastasis 1

uPA : urokinase-type Plasminogen Activator

Wnt: Se prononce « *Wint* » qui correspond à la réunion de *wingless* (« sans aile », phénotype des drosophiles dépourvues de Wnt) et *Int* (pour *integration site*), homologue de Wnt chez la souris.

ZEB: Zinc finger E-box-Binding homeobox

ZO1: Zonula Occludens

INTRODUCTION

- I. Les astrocytes sains et tumoraux
- II. La migration cellulaire et son modèle expérimental astrocytaire
- III. La jonction adhérente ou comment maintenir la cohésion tissulaire tout en permettant les mouvements cellulaires
- IV. Les rôles des jonctions adhérentes dans la migration cellulaire et l'invasion tumorale

I. Les astrocytes sains et tumoraux

I.A. Les astrocytes sont bien plus que des cellules de support du tissu neuronal

Le système nerveux central (SNC) est composé principalement de deux grands groupes de cellules: les neurones et une population de cellules variées appelées **cellules gliales**, qui représentent la majorité des cellules du SNC. Ces dernières se décomposent en deux sous-populations : la microglie qui correspond aux cellules immunitaires du SNC et la macroglie composée d'**astrocytes**, mais aussi d'oligodendrocytes, d'épendymocytes et des cellules NG-2. Les astrocytes sont les cellules **les plus nombreuses du système nerveux**. Longtemps ignorées et cantonnées à un rôle de support du tissu cérébral parce que jugées inexcitables par les neurophysiologistes - d'où le terme de « glie », signifiant colle, donné par Virchow en 1860 -, des découvertes excitantes quant à leurs capacités de régulation de la communication neuronale lors de ces 20 dernières années ont permis de lever le voile sur certaines fonctions inattendues de ces cellules étoilées.

I.A.1. Une morphologie particulière

Il existe deux types principaux d'astrocytes répartis en fonction de leur localisation dans les SNC. Les astrocytes **protoplasmiques**, les plus nombreux, sont localisés dans la matière grise et possèdent une morphologie étoilée caractéristique (**Figure 1A et B**). Les astrocytes **fibreux**, en revanche, sont présents dans la matière blanche et possèdent une morphologie plus allongée et moins branchée (**Figure 1C**) (Nag, 2011).

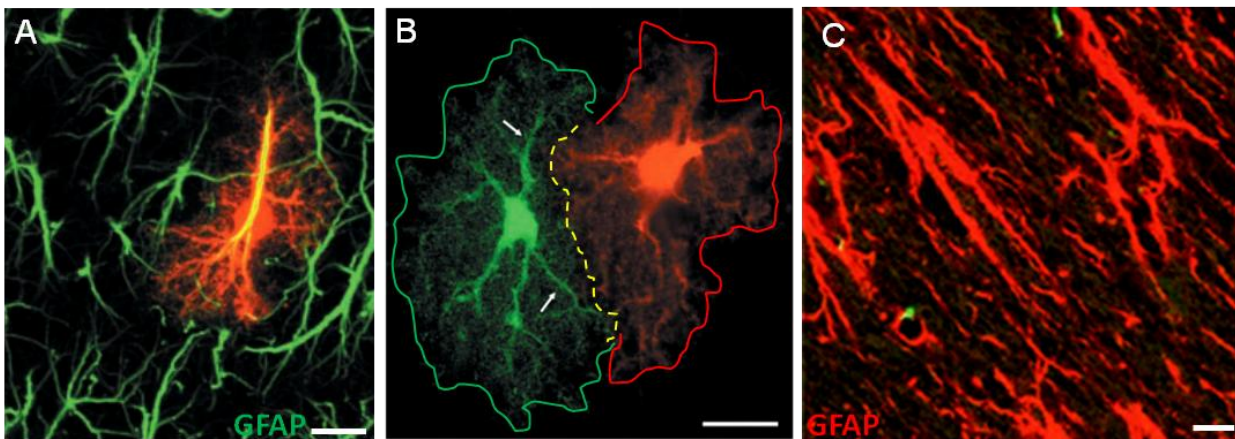


Figure 1 : Aspects morphologiques et établissement des territoires astrocytaires in vivo.

A) Coupe de l'hippocampe d'un cerveau de rat adulte montrant des astrocytes marqués par la GFAP (vert) et le traceur fluorescent Lucifer Yellow (rouge). Si les prolongements les plus épais sont marqués par la GFAP (marquage vert et jaune), on se rend compte qu'elle est absente de la plupart des extensions les plus fines. **B)** Astrocytes hippocampaux marqués par deux traceurs différents. L'image permet de visualiser les domaines établis par chacun des astrocytes. Ils sont bien délimités, avec une zone d'interdigitation très étroite (ligne jaune). **C)** Astrocytes fibreux de la matière blanche. Ils possèdent moins de branchement et leur axe d'élongation est parallèle aux prolongements axonaux adjacents. Barres d'échelle : 20µm. Figure adaptée des figures 2 et 4 de Bushong et al, 2002 et de la figure 1 de (Nag, 2011)

Les astrocytes possèdent en moyenne cinq à huit prolongements majeurs, riches en une protéine des filaments intermédiaires caractéristique de ces cellules : la **GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)** (**Figure 1a**). Ces prolongements forment tout autour du noyau cellulaire une multitude de branchements et d'extensions cytoplasmiques très fins. Ceux-ci s'insinuent entre les différents composants du tissu neural et confèrent aux astrocytes leur **morphologie étoilée** unique, à l'origine de leur nom (Bushong et al., 2002). Au cours de leur différenciation, les astrocytes adjacents n'entremêlent leurs extensions que sur une zone très réduite, permettant de délimiter des « **domaines d'exploration** » bien distincts (Bushong et al., 2004) (**Figure 1b**). C'est dans cette zone d'interdigitation que les astrocytes forment des jonctions communicantes entre eux, leur permettant de fonctionner comme un **syncytium** (Bennett et al., 2003).

Au sein de leur « territoire » pouvant atteindre des volumes de 20 000 à 80 000 μm^3 chez les rongeurs, les astrocytes sont capable d'établir des contacts avec les neurones, les oligodendrocytes et les capillaires sanguins (**Figure 2**). Plus spécifiquement, un seul astrocyte est capable par exemple de s'associer avec 300 à 600 dendrites neuronales pénétrant dans son « domaine » et de réguler plus de 100 000 synapses (Halassa et al., 2007). Chez l'homme, un astrocyte occupant un volume cérébral 30 fois plus important que chez le rongeur, il pourrait se connecter et réguler le fonctionnement de près d'un million de synapses (Oberheim et al., 2006).

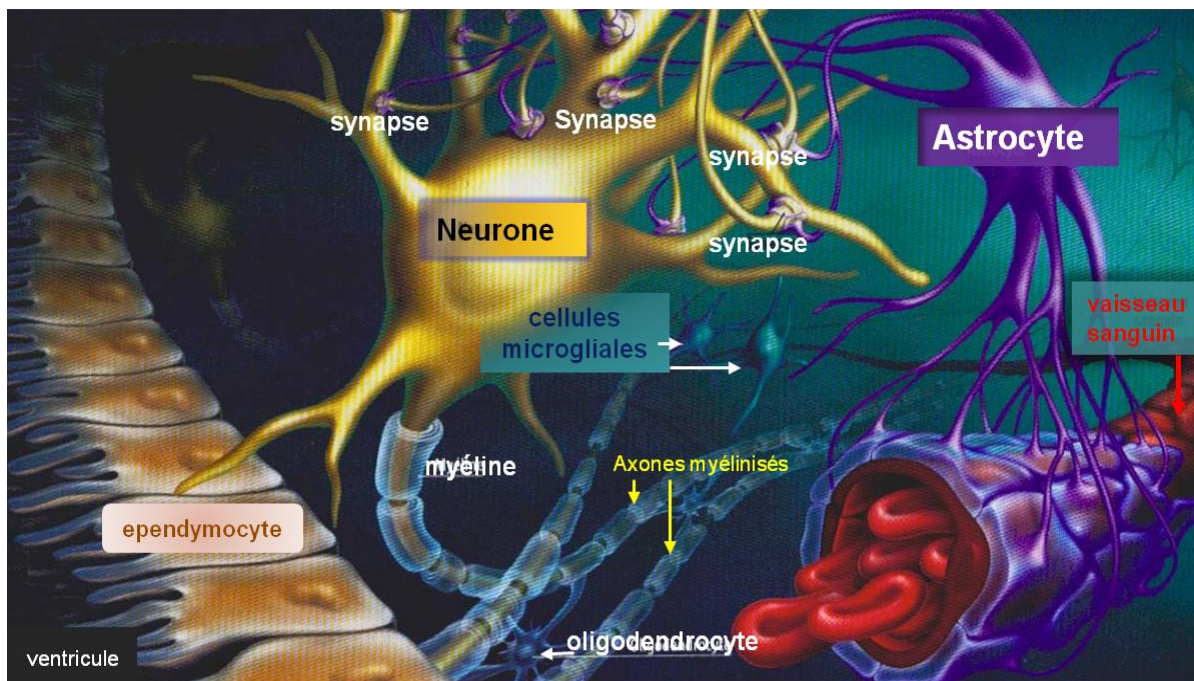


Figure 2 : Principales interactions entre cellules du système nerveux central.

Les astrocytes (violet) sont connectés aux vaisseaux sanguins (rouge) où ils participent à l'imperméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Ils interagissent avec les neurones (jaune) notamment au niveau des synapses dont ils régulent l'activité. Adaptée librement de : <http://associationpourlasanteetlenvironnement.skynetblogs.be/archive/2006/week22/index.html>

I.A.2. Les principales fonctions des astrocytes :

Le contrôle du microenvironnement intracérébral :

La vision traditionnelle des astrocytes veut qu'ils soient au service des autres cellules du SNC et en particulier des neurones. En maintenant l'**homéostasie** du tissu cérébral ils assureraient leur bon fonctionnement. En effet, les astrocytes **éliminent les déchets** métaboliques des neurones et se débarrassent des débris cellulaires émanant de la mort neuronal ou de l'apoptose des cellules immunitaires, par phagocytose (Magnus et al., 2002).

Leur interaction étroite avec les vaisseaux sanguins leur confère également un rôle **d'intermédiaire entre le sang et les neurones (Figure 3)**. Chaque astrocyte est doté d'au moins un prolongement se terminant par un pied astrocytaire qui s'enroule autour d'un capillaire et lui permet de couvrir jusqu'à 99% de la surface du vaisseau sanguin (Mathiisen et al., 2010; Simard et al., 2003). Les pieds astrocytaires expriment de nombreux récepteurs permettant notamment aux astrocytes de pomper le glucose dans le sang, de le métaboliser en lactate et de relarguer le lactate dans le milieu extracellulaire (Bradbury, 1985; Tsacopoulos and Magistretti, 1996). Chaque astrocyte « **nourrit** » ainsi les neurones ayant pénétré leur territoire. Les astrocytes peuvent également stocker le glucose sous forme de grains de glycogène. De nombreux autres métabolites (facteurs de croissance, etc...) sont ainsi transférés du sang aux neurones grâce aux astrocytes.

Les astrocytes régulent également le débit sanguin cérébral (Iadecola and Nedergaard, 2007), l'homéostasie de l'eau et des ions via l'expression de multiples canaux calciques et potassiques et d'aquaporines par les pieds astrocytaires en contact des vaisseaux sanguins (Nielsen et al., 1997). En outre, les pieds astrocytaires joueraient un rôle dans le **maintien** d'une **barrière hémato-encéphalique imperméable** via l'expression de facteurs solubles régulant les jonctions serrées des cellules endothéliales (Petzold and Murthy, 2011; Prat et al., 2001; Rubin et al., 1991).

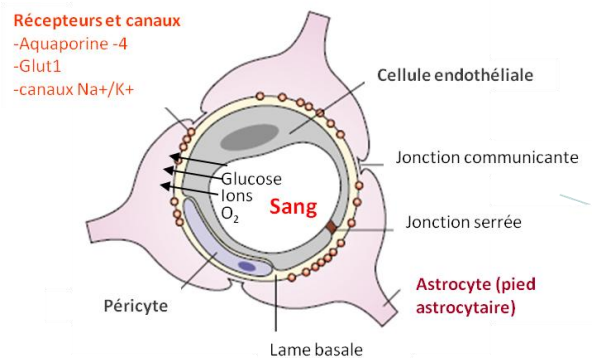


Figure 3 : Les astrocytes sont intimement liés aux vaisseaux sanguins et assurent l'homéostasie du tissu cérébral.

Grâce à des prolongements ou pieds astrocytaires, les astrocytes recouvrent les vaisseaux sanguins. Ils assurent la stabilité de la barrière hémato-encéphalique et jouent le rôle d'intermédiaire énergétique avec les neurones. Ils régulent le débit sanguin, le pH du milieu et la concentration précise des principaux ions dans le tissu cérébral. Adaptée de la figure 4b de (Nedergaard et al., 2003).

Mais au fil des découvertes, les astrocytes ont troqué leurs habits de simples serveurs des neurones, pour devenir de véritables tuteurs, des informateurs, contrôlant directement leurs activités.

La transmission synaptique :

Au fil de l'évolution, le ratio du nombre d'astrocytes par neurone n'a cessé de croître. Alors que chez la sangsue, le ver *Caenorhabditis elegans*, la grenouille ou les petits mammifères, les neurones sont plus nombreux que les astrocytes (de 25/30 neurones pour un astrocyte chez la sangsue à 3 pour 1 chez le rat), chez l'homme, le ratio s'inverse et s'établit à 1,4 astrocytes pour un neurone (Nedergaard et al., 2003). Parallèlement, la pression évolutive a engendré une plus grande complexité des réseaux neuronaux. Les réseaux synaptiques sont de plus en plus denses, plus sophistiqués et requièrent un contrôle toujours plus fin. Au regard des récentes découvertes, les astrocytes semblent jouer un rôle prépondérant dans ce phénomène. En effet, la vision classique de la synapse reliant uniquement un neurone pré- et post-synaptique s'est complexifiée depuis la découverte dans le cortex cérébral et cérébelleux de prolongements astrocytaires associés aux synapses (Grosche et al., 1999; Ventura and Harris, 1999) (**Figure 4a**). On parle dorénavant de **synapse tripartite** (Araque et al., 1999). Les astrocytes façonnent la **structure** des synapses en régulant leur mise en place, leur maintien (Ullian et al., 2001) et la taille de la fente synaptique (Volterra and Meldolesi, 2005). Ils sont aussi capables de réguler leur **fonction** en sécrétant des gliotransmetteurs (glutamate, ATP, adénosine, D-sérine), en éliminant les neurotransmetteurs libérés par le neurone pré-synaptique (tels le glutamate) et en modulant la concentration en ions de la fente synaptique (Newman, 1996) (**Figure 4b**).

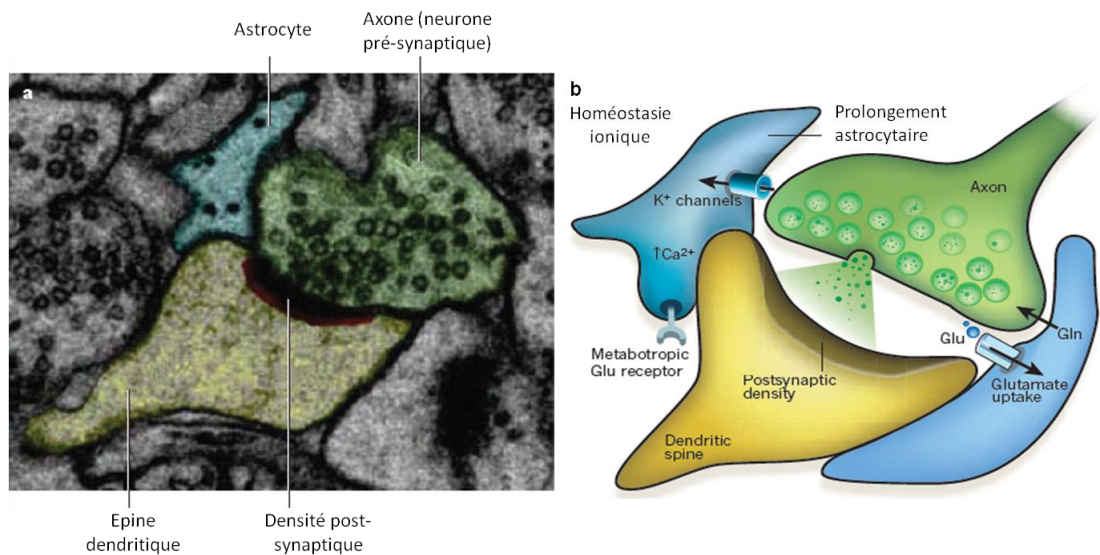


Figure 4 : Association structurelle et fonctionnelle des astrocytes aux synapses : émergence de la synapse tripartite.

A) Microscopie électronique d'une synapse tripartite de l'hippocampe de rat où l'on observe un prolongement astrocytaire (bleu) fermant la fente synaptique (marron) établi entre un axone présynaptique (vert, noter les nombreuses vésicules synaptiques) et une épine dendritique post-synaptique (jaune). **B)** représentation schématique de A). Les prolongements astrocytaires expriment des transporteurs du glutamate (Glu) qu'ils incorporent une fois que la molécule est secrétée dans la fente synaptique. Le glutamate est transformé en glutamine (Gln) par les astrocytes et retourne sous cette forme aux neurones. De plus, la liaison du glutamate à ses récepteurs métabotropiques à la surface des astrocytes provoque une hausse de la concentration calcique cytoplasmique. Ce changement de concentration calcique constitue un signal qui sera transmis aux autres astrocytes par les jonctions communicantes. Les astrocytes maintiennent également l'homéostasie des ions aux synapses en contrôlant la concentration potassique et le pH (Witcher et al., 2007).

Certes les astrocytes ne peuvent pas générer de potentiel d'action ou propager un signal électrique le long de la membrane de leurs prolongements, mais ils sont capables de **générer un signal de novo** ou en réponse à un stimulus neuronal, via l'augmentation de la **concentration calcique** $[Ca^{2+}]$ cytoplasmique. (Charles et al., 1991; Cornell-Bell et al., 1990). L'élévation de la $[Ca^{2+}]$ est propagée rapidement aux astrocytes adjacents par les jonctions communicantes sous la forme de **vague calcique**. Celle-ci, par l'intermédiaire de l'émission de seconds messagers, influence en retour le fonctionnement neuronal. La grande pénétrance du syncytium astrocytaire permet ainsi de stimuler des synapses neuronales éloignées les unes des autres (Schipke and Kettenmann, 2004).

La cicatrisation du système nerveux central :

Lorsque le cerveau et la moelle épinière subissent un stress (traumatisme/blessure, infection, ischémie, dégénérescence neuronale, maladie auto-immune, croissance et invasion tumorale), une réaction inflammatoire est déclenchée par les cellules immunitaires de la microglie. Celles-ci se mettent à libérer diverses cytokines et autres facteurs dans le milieu extracellulaire, qui ciblent spécifiquement les astrocytes résidents. En réponse à l'inflammation, les astrocytes s'hypertrophient, augmentent leur production de protéines des filaments intermédiaires (GFAP, nestine, vimentine) : ils deviennent **réactifs**. C'est l'**astroglie**. Il s'agit d'un spectre de réponses astrocytaires aux traumatismes. Ces réponses peuvent aller jusqu'à la formation d'une **cicatrice gliale**, en cas de lésion profonde (Sofroniew and Vinters, 2010) (**Figure 5a**).

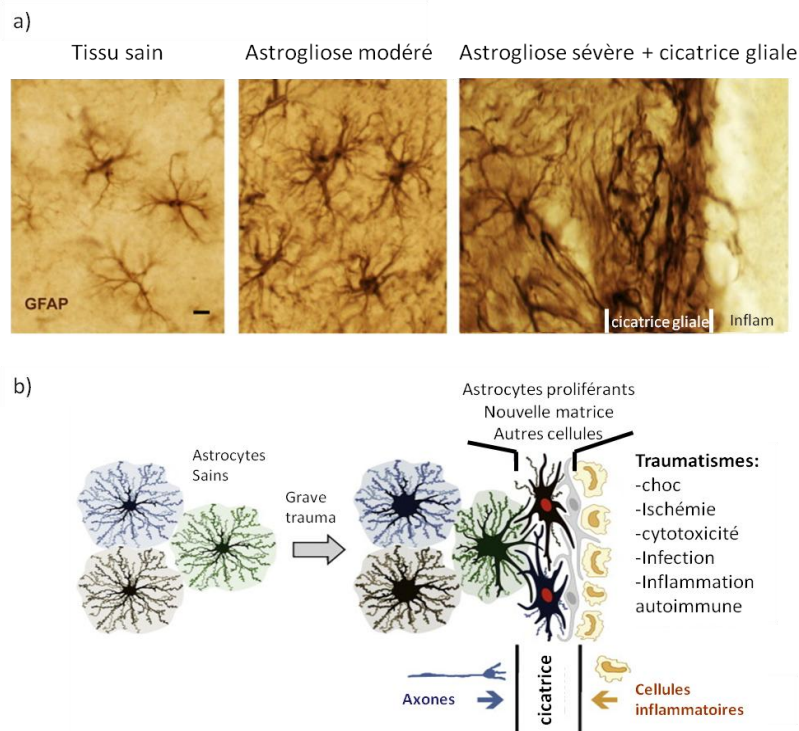


Figure 5 : Les astrocytes et la cicatrisation du cerveau : formation de la cicatrice gliale.

A) Morphologie des astrocytes durant l'astroglie. Noter l'hypertrophie cellulaire (marquage GFAP plus intense) et l'interdigitation des prolongements astrocytaires en cas de cicatrice gliale. Barre d'échelle : 8µm. **B)** Représentation schématique de A) (voir le texte ci-dessous pour plus de détails). Adapté de la figure 1 et 2 de (Sofroniew, 2009).

La cicatrice se forme après la **prolifération** des astrocytes résidents **et la migration polarisée** des astrocytes réactifs éloignés, en direction de la blessure. Sur le site de la lésion, les astrocytes modifient la matrice extracellulaire et établissent des jonctions solides entre eux afin de former une barrière physique impénétrable (Buffo et al., 2010). Cette barrière est primordiale pour maintenir les cellules immunitaires sur place et éviter la propagation de la réaction inflammatoire très délétère pour les neurones (Voskuhl et al., 2009) (**Figure 5b**). La cicatrice gliale stimule le renouvellement des neurones détruits (Robel et al., 2011) et favorise la restauration de la barrière hémato-encéphalique (Sofroniew, 2005; Sofroniew, 2009). Grâce à l'utilisation d'un modèle *in vitro* de fermeture de blessure (*développé dans la partie II-C*), les principaux mécanismes contrôlant la polarisation des astrocytes primaires puis leur migration dirigée en réponse à la blessure ont été découverts.

La neurogénèse:

Les astrocytes régulent la prolifération des cellules souches neuronales (Song et al., 2002) et le destin des neurones immatures, en servant de support à leur migration. Par exemple, après division des progéniteurs neuronaux de la zone sous-ventriculaire, les neurones néoformés migrent en chaîne vers le bulbe olfactif, entourés d'une gaine d'astrocytes **permettant leur migration** (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). De façon surprenante tant les lignées neuronales et astrocytaires ont toujours été perçues comme distinctes, il a été montré récemment que les astrocytes de la zone sous granulaire de l'hippocampe peuvent eux-mêmes proliférer et **être une source de neurones** chez l'adulte (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

La dédifférenciation incontrôlée des astrocytes pourrait être à l'origine du développement d'une des tumeurs les plus létales, l'astrocytome (Holland et al., 2000).

I.B. Les gliomes malins: des tumeurs d'origine gliale

Lorsque les cellules macrogliales subissent une transformation cancéreuse, une tumeur se développe : le **gliome**.

I.B.1. Diagnostic et classification histopathologique

Selon leur degré de **malignité**, les gliomes se décomposent en tumeurs de **bas-grade** (grade I ou gliome pilocytique et grade II, selon les critères histopathologiques de l'OMS) et de **haut-grade** (grade III et IV). Les gliomes de haut-grade représentent à eux seuls **70%** des tumeurs malignes primitives du cerveau et évoluent très rapidement vers le décès du patient. Hormis l'astrocytome pilocytique, bénin chez l'adulte, les gliomes de bas-grades sont des gliomes malins à évolution lente mais constante, tendant irrémédiablement vers l'anaplasie (Furnari et al., 2007).

Plusieurs classifications des gliomes existent. Je citerai ici la méthode retenue par l'OMS (Louis et al., 2007). En fonction de la population gliale majoritaire observée lors de la biopsie de la tumeur, on distingue trois **types** de gliomes : les astrocytomes, à majorité astrocytaire, les oligodendrogliomes, à majorité oligodendrocytaire et les gliomes mixtes. On ne fera pas mention des épendymomes dérivés des épendymocytes, très rares et aux caractéristiques très différentes des autres gliomes. Les gliomes de haut-grades les plus fréquents sont les astrocytomes anaplasiques (ou grade III) et dans **60 à 70%** des cas, les **glioblastomes** (astrocytome de grade IV) (**Tableau 1**).

Une fois le type de gliome connu, il s'agit de distinguer les gliomes de bas-grades des gliomes de haut-grades. D'après le consortium international d'anapathologistes de l'OMC, différents critères histopathologiques sont utilisés pour attester de la malignité des gliomes : l'état de différenciation cellulaire, la densité cellulaire, la présence d'atypies nucléaires (cellules à multiples noyaux, etc...), l'activité mitotique (marquage ki67), la présence de vaisseaux sanguins en nombre et l'apparition de zone nécrotique (Louis et al., 2007). Typiquement, les caractéristiques d'un glioblastome sont: la présence d'une zone de **nécrose**, une **prolifération microvasculaire**, une absence de signes histologiques de différenciation cellulaire, un pléomorphisme cellulaire ainsi que des atypies nucléaires et une activité mitotique intense (**Figure 6**).

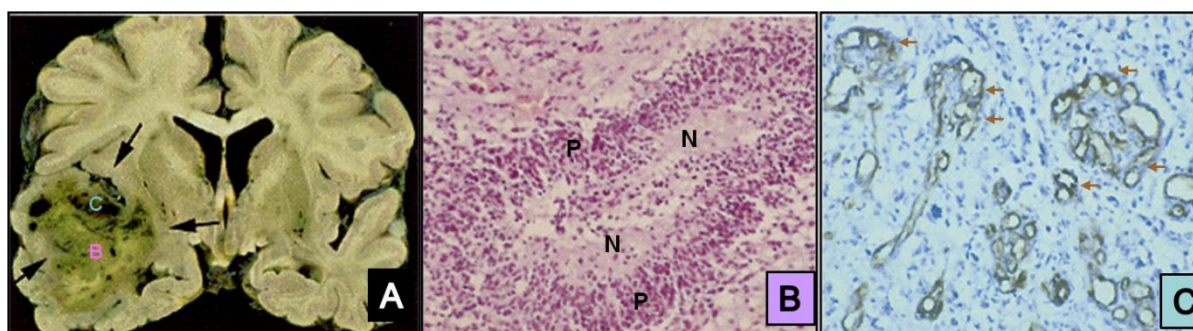


Figure 6 : Caractéristiques histopathologiques principales d'un glioblastome.

A) Section frontale d'un cerveau à l'autopsie montrant l'apparence macroscopique d'un glioblastome du lobe temporal gauche. La tumeur occupe une zone mal délimitée (flèches) et se compose, entre autre, d'une partie centrale nécrosée (B) et de régions hémorragiques (C). B) Nécroses (N) avec accumulation pseudopalisadique périnécrotique (P) typique des glioblastomes. Marquage à l'hémalun-éosine. C) Prolifération microvasculaire avec formation des capillaires tumoraux gloméruloïdes (marquage marron avec le marqueur endothéliale UEA-1 + flèches). Adapté de (Felsberg et al., 2002).

I.B.2. Epidémiologie, pronostic et facteurs environnementaux

Malgré une amélioration de la qualité des soins ces dix dernières années, l'espérance de vie moyenne d'un patient après diagnostic d'un glioblastome est de **15 mois** (Wen and Kesari, 2008).

	Histologie	Grade (OMS)	Incidence / 100 000	% cas	Age moyen au diagnostic	Médiane de survie (années)	Survie à 5 ans
Gliomes de bas-grades	Astrocytome pilocytique	I	0,39	X	20		100%
	Astrocytome diffus	II	0,26	X	41	6 à 8	58%
	Oligodendrogliome	II	0,27	X	40	12	78%
	Oligoastrocytome	II	0,1	X	40	6	70%
Gliomes de hauts-grades	Oligodendroglioma anaplastique	III	0,11	10	49	3 à 10	30%
	Astrocytome anaplastique	III	0,25	10-15	44	3	11%
	Oligoastrocytome anaplastique	III	0,08	10-15	46	3	13%
	Glioblastome	IV	3,39	60-70	61	1 à 2	1%

Tableau 1 : Incidence et survie des patients atteints des principaux gliomes. Le tableau est inspiré d'Oghaki et al, 2009 et de Ricard et al, 2012. Les chiffres donnés sont issus d'études épidémiologiques réalisées à Zurich (Suisse), pour l'Europe, pendant les années 1980-1994.

Les gliomes de grade II et III évoluent inexorablement, mais plus ou moins rapidement (respectivement en 10 à 2 ans en moyenne) en glioblastome. Ils possèdent donc une survie à 5 ans plus élevée, mais restent incurables (**Tableau 1**). On compte 77 000 nouveaux cas de glioblastome par an en Europe et aux Etats-Unis, touchant en moyenne davantage les hommes que les femmes (ratio de 3:2) (Gilbertson and Rich, 2007).

Les **causes** de l'apparition des gliomes sont encore **inconnues** même si quelques facteurs favorisant leur survenue commencent à être évoqués, comme l'exposition prolongée aux rayonnements ionisants lors d'un traitement d'un autre type de tumeur au cou ou à la tête (Neglia et al., 2006) ou de manière plus controversée la présence de cytomégalovirus (Mitchell et al., 2008) et l'exposition aux champs électromagnétiques et radiotéléphoniques (Hardell et al., 2009; INTERPHONE, 2010).

I.B.3. Hétérogénéité des glioblastomes et altérations génétiques majeures des gliomes

Si les glioblastomes représentent un même groupe de tumeurs, des différences frappantes d'aspects et de profils d'invasion existent, amenant certains spécialistes à parler de glioblastome multiforme. Des approches génomiques et transcriptomiques à grande échelle, lancées ces dernières années par le Cancer Genome Atlas Research Network, reprises et analysées par de nombreuses équipes, ont permis de **raffiner la classification des glioblastomes** en y incluant des **données moléculaires** afin de ne plus dépendre entièrement de critères histologiques subjectifs.

Les quatre sous-groupes moléculaires des glioblastomes

Des équipes internationales regroupées en consortium ont réalisé une analyse intégrative multi-dimensionnelle des données de différentes technologies, récoltées sur plus de 200 glioblastomes. L'analyse des altérations du nombre de copie des gènes (Copy Number Analysis) a été réalisée grâce à la compilation des données obtenues par trois plateformes différentes (Agilent, Affymetrix et Illumina). Puis les données du séquençage à haut débit (découverte de nouvelles mutations somatiques), de l'analyse du profil de méthylation des îlots CpG dans les promoteurs de plus de 2300 gènes, et de l'analyse transcriptomique de microarrays à ARNm (Affymetrix et Agilent) ont été ajoutées à l'analyse intégrative. Finalement, **quatre entités de glioblastomes aux profils d'expression et d'altérations génétiques distincts ont ainsi été définies** et pourront à l'avenir faire l'objet de traitements mieux adaptés à leur spécificité (**Figure 7**). Ce sont les sous-types **classique**, **mésenchymal**, **neural** et **proneural**. (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Verhaak et al., 2010)

Les altérations génétiques majeures des glioblastomes

Trois voies de signalisation majeures sont fréquemment altérées dans tous les glioblastomes ; chacun des quatre sous-types de glioblastomes ayant au moins un membre de ces trois voies altéré. Premièrement, il s'agit de la voie **RTK/RAS/PI-3K**, perturbée dans 90% des cas, contenant notamment le récepteur à l'EGF (EGFR) et PTEN. L'EGFR est activé de manière permanente dans 45% des glioblastomes en raison soit d'une amplification de la partie du chromosome 7 où il réside, soit de la délétion de sa partie extracellulaire le rendant constitutivement actif (variant VIII) (Ekstrand et al., 1992). La délétion homozygote de *PTEN* ainsi que des formes mutées sont retrouvées dans 36% des glioblastomes. Deuxièmement, la voie du gène suppresseur de **tumeur TP53** est très souvent inhibée (67 % des cas) à cause notamment de la délétion homozygote de *CDKN2A* dans 55% des cas et l'altération par

délétion ou mutation de *TP53* dans 40% des cas. Enfin, la voie du gène suppresseur de tumeur **RB** est altérée dans 80% des glioblastomes primaires (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

Des altérations génétiques de bons pronostiques pour les gliomes

D'un autre côté, la recherche de marqueurs prédictifs du devenir de chaque gliome a permis de déterminer des altérations moléculaires associées à un meilleur pronostic. Ainsi, les tumeurs présentant la co-délétion des fragments du chromosome 1p et du chromosome 19q (résultant d'une translocation réciproque non équilibrée entre les deux chromosomes) progressent-elles plus lentement et répondent-elles mieux aux traitements (Cairncross et al., 2006). La méthylation du promoteur du gène *MGMT* (gène réparateur de l'ADN) est un marqueur de bon pronostic pour les glioblastomes nouvellement diagnostiqués ; la tumeur réagissant mieux au traitement par des agents alkylants comme le témodal® (Hegi et al., 2005). Enfin, quel que soit le grade du gliome, la mutation du gène *IDH1* est un marqueur de bon pronostic (Yan et al., 2009).

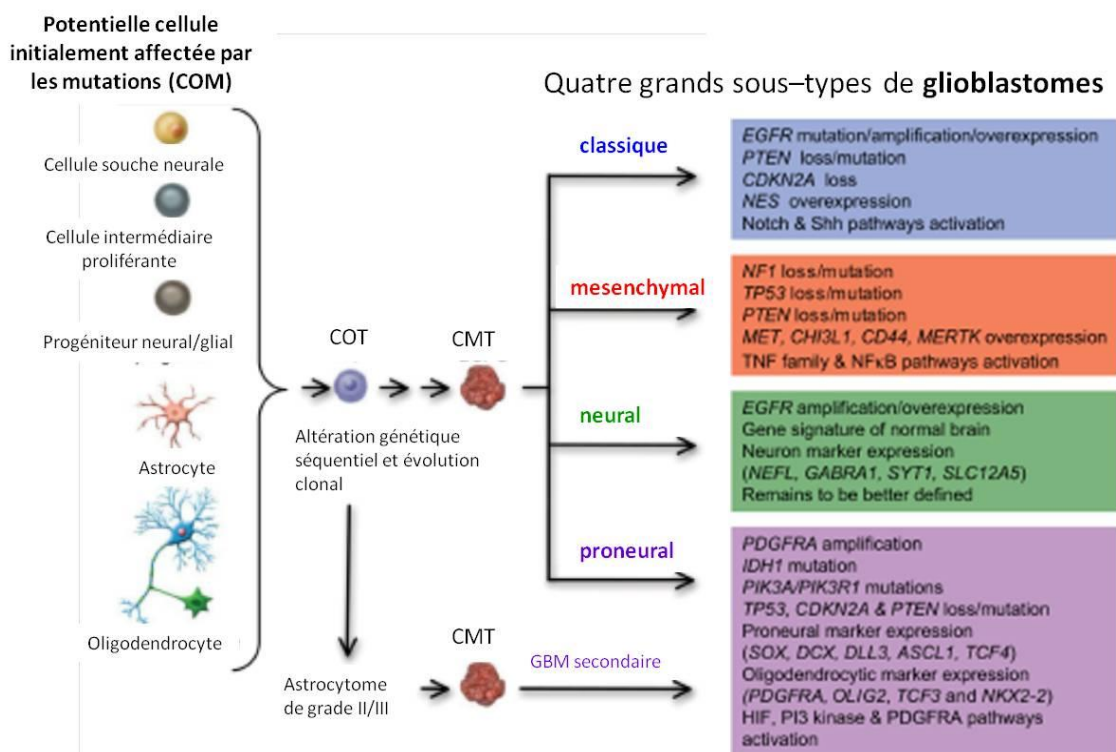


Figure 7 : Les principales altérations génétiques des glioblastomes définissent quatre sous-types moléculairement distincts.

Certaines cellules du système nerveux central subissent initialement des mutations oncogéniques. Ce sont les cellules d'origine de la mutation (COM). Les COM accumulent des mutations et propagent ces aberrations génétiques à leur descendance jusqu'à ce que l'environnement moléculaire d'une cellule fille soit propice à une prolifération incontrôlée. On parle alors de cellule d'origine de la tumeur (COT). Celle-ci prolifère pour donner naissance aux cellules de la masse tumorale (CMT). Les CMT subissent une pression sélective de façon à ce que les cellules présentant les altérations oncogéniques les plus favorables à l'adaptation à l'environnement direct de la tumeur survivent et prolifèrent. C'est à partir du phénotype moléculaire de ces cellules qu'est établi le nouveau diagnostic des glioblastomes. En regroupant les anomalies génétiques les plus fréquentes avec les données transcriptomiques, quatre sous-groupes ont émergé : les glioblastomes classique, mésenchymal, neural et proneural, de meilleur pronostic. Figure adaptée de (Van Meir et al., 2010).

I.B.4. A la recherche de la cellule d'origine des gliomes malins

La découverte des cellules souches des gliomes

Les cancers apparaissent après l'accumulation d'altérations somatiques ou héréditaires dans des gènes contrôlant des processus biologiques critiques pour la cellule. La théorie des cellules souches cancéreuses s'est développée avec l'idée qu'une tumeur se comporte comme un organe. Les organes se développant et se renouvelant grâce à un pool de cellules souches bien distinctes, la croissance des tumeurs devait être entretenue par certaines cellules cancéreuses seulement, les cellules souches tumorales (Clarke et al., 2006). Ces cellules seraient plus propices que d'autres à l'accumulation et à « l'expression » des mutations oncogéniques. Elles constitueraient un réservoir de cellules qui auto-entretiendrait le développement de la tumeur. La découverte des cellules souches cancéreuses dans de nombreux types de cancer a renforcé cette hypothèse et l'a rendue quasi-universelle.

Concernant les gliomes, des cellules multipotentes, capables d'auto-renouvellement et exprimant le marqueur membranaire CD133, ont été isolées dans la tumeur initiale et transplantées en série dans le cerveau de souris immunodéprimées adultes. Là, elles ont permis la croissance de tumeur récapitulant les caractéristiques du gliome initial. (Galli et al., 2004; Singh et al., 2003; Singh et al., 2004). Les **cellules souches des gliomes** étaient découvertes. Cependant, hormis l'expression de CD133 qui les rapprochent des précurseurs neuronaux, mais qui elle-même semble controversée (Beier et al., 2007), la nature de ces cellules reste pour le moment inconnue.

La cellule initiale touchée par les mutations n'est pas forcément la cellule propagatrice de la tumeur

Comme on l'a vu un peu plus haut, les gliomes sont des tumeurs très hétérogènes qui, malgré la prédominance d'un type cellulaire majeur (astrocyte ou oligodendrocyte), contiennent souvent les deux types cellulaires. Aussi, la cellule à l'origine des gliomes doit-elle être capable de donner naissance aussi bien à des astrocytes qu'à des oligodendrocytes. Selon la théorie principale faisant consensus, ce sont les cellules souches neurales ou progéniteurs neuronaux qui subiraient les transformations oncogéniques à l'origine des gliomes (Hadjipanayis and Van Meir, 2009; Phillips et al., 2006). La localisation physique préférentielle des gliomes dans les régions où résident les cellules souches neuronales renforce cette théorie (Alcantara Llaguno et al., 2009). Cependant ces cellules pourraient transmettre les mutations accumulées à leur descendance, et ne pas être initiatrices de la tumeur.

En effet, la tumeur ne se développerait que lorsque l'environnement moléculaire de la cellule présentant les mutations est favorable. C'est la différence entre la **cellule touchée par la mutation** (COM ou « cell of mutation ») et la **cellule à l'origine de la tumeur** (COT ou « cell of origin ») (Visvader, 2011) (**Figure 7**). Une étude récente a démontré de manière élégante dans un modèle murin de glioblastome spontané ($p53^{-/-}$; $Nf1^{-/-}$), que si les mutations oncogéniques étaient induites dans les cellules souches neuronales, il fallait attendre qu'elles soient transmises aux progéniteurs oligodendrocytaires pour provoquer une prolifération anarchique de ces cellules et le développement d'une tumeur (Liu et al., 2011). Enfin, d'autres études font état d'une possible dédifférenciation d'astrocytes et d'oligodendrocytes matures, capables de se remettre à proliférer de manière anarchique (Bachoo et al., 2002).

L'hétérogénéité cellulaire des gliomes pourrait s'expliquer également par l'application du **modèle stochastique** de développement de la tumeur. Dans ce modèle, toutes les cellules d'une tumeur ont la même probabilité d'accumuler les mutations et de se remettre à proliférer, pour permettre l'auto-renouvellement et la croissance de la tumeur (Till et al., 1964).

I.C. Les gliomes malins : des tumeurs extrêmement invasives

I.C.1. Des capacités invasives intrinsèques entravent la réussite des traitements thérapeutiques localisés

Invasivité et grades des gliomes

Une des caractéristiques majeures des gliomes malins quels qu'ils soient est leur capacité intrinsèque à envahir le cerveau sur de longue distance. Leur **nature invasive** est un obstacle permanent au traitement efficace de ces tumeurs et explique en grande partie leur mauvais pronostic. Les cellules tumorales infiltrantes sont perçues comme étant à l'origine des rechutes après chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie (Giese et al., 2003). La **Figure 8** illustre clairement cette problématique. Malgré une exérèse de la tumeur qui semble totale sur le cliché de l'IRM, la tumeur réapparaît en bordure de la cavité chirurgicale. Ce schéma classique de récurrence des glioblastomes suggère la présence de cellules tumorales ayant envahi le tissu avoisinant, sans laisser de trace visible.

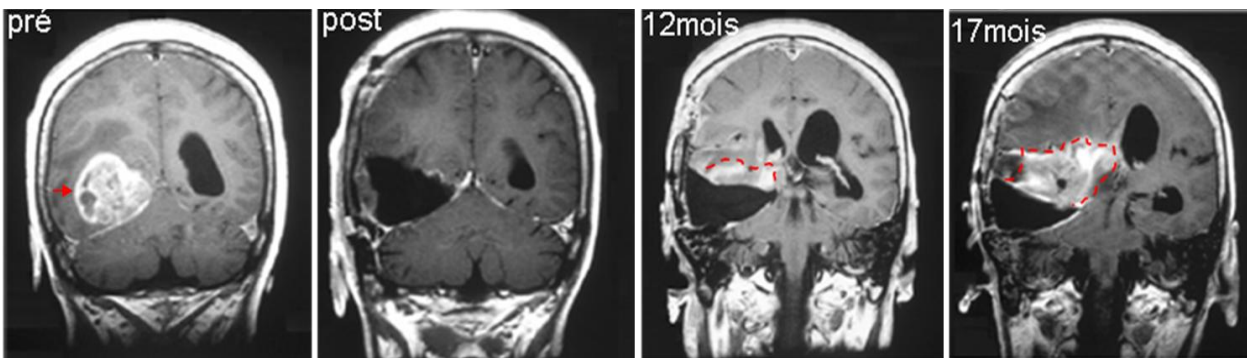


Figure 8 : Récurrence d'un glioblastome après résection totale de la tumeur.

IRM d'un glioblastome occipital de l'hémisphère droit (flèche rouge) avant (pré) et après (post) chirurgie. Malgré une résection complète de la tumeur et l'administration du traitement classique radiothérapie+chimiothérapie, la tumeur est réapparue un an après (ligne rouge en pointillés) et le patient est décédé au bout de 17 mois. Extrait de (Nakada et al., 2007)

Le degré d'invasivité ne reflète pas nécessairement le degré de malignité. Certes, de manière globale, les **glioblastomes sont les formes les plus invasives**, mais certaines formes d'astrocytome de bas-grade acquièrent rapidement des propriétés invasives importantes. Ils évoluent plus lentement mais envahissent progressivement (4mm/an) le cerveau sain jusqu'à acquérir les traits d'une **gliomatose cérébrale**. Dans ce cas précis, l'ensemble du parenchyme cérébral est envahi par les cellules cancéreuses. La tumeur conserve des critères histologiques de bas-grade mais sa dissémination extrême empêche toute résection complète et favorise la progression vers un grade de malignité supérieur (Sanson et al., 2005).

L'étendue de l'infiltration tumorale dépend aussi de la localisation de la tumeur initiale dans le cerveau. Certaines zones riches en fibres myélinisées compactes et enchevêtrées ne favorisent pas la croissance d'une masse tumorale par exemple.

Traitement : historique, état des lieux et nouveaux espoirs

- La chirurgie

Les premières études au XX^{ème} siècle montrèrent que la chirurgie ultra-radical n'était pas la solution pour traiter cette maladie invasive. Malgré l'ablation de tout l'hémisphère abritant un glioblastome, le patient rechutait inexorablement, en raison de la présence d'une masse tumorale ayant gagné l'autre hémisphère (résumé dans (Giese et al., 2003) (**Figure 9a**). Une autre étude menée sur 100 gliomes de hauts-grades en vue de déterminer le potentiel thérapeutique d'une chirurgie invasive, démontra à l'autopsie que près de la moitié des tumeurs (47%) avaient atteint l'hémisphère opposé (Matsukado et al., 1961). Devant les résultats de ces études et les effets secondaires parfois très handicapants de cette technique - le patient était souvent laissé hémiplégique ou hémiparésique – la chirurgie ultra-radical a été abandonnée.

Les progrès considérables réalisés dans le domaine de la chirurgie ces dernières années permettent aujourd'hui de retirer le maximum de la masse tumorale sans toucher aux parties saines du cerveau. Si elle ne permet pas de guérir, l'exérèse totale de la tumeur améliore la médiane de survie des patients en réduisant les symptômes (épilepsie, pression intracrânienne) et possiblement en améliorant l'efficacité des thérapies adjuvantes (Sanai and Berger, 2008; Stummer et al., 2011). De plus, l'utilisation du **traceur fluorescent 5-ALA** (acide 5-aminolévulinique, substance active du Gliolan®) a permis de maximiser la résection des gliomes malins. En effet, après administration du Gliolan® au patient par voie orale, le produit s'accumule dans les cellules tumorales pour être métabolisé en porphyrine fluorescente (Tonn and Stummer, 2008). Il assure une meilleure visualisation du tissu cancéreux, par rapport au cerveau sain (**Figure 9b**). Cependant, en raison de la profondeur et de la localisation privilégiée sous-tentorielle des glioblastomes, l'acte chirurgical n'est pas toujours possible.

- La radiothérapie

De même que pour la chirurgie, la nature invasive des gliomes amena les médecins à traiter les patients par radiothérapie sur l'ensemble du cerveau (pan-encéphalique). Dans un premier temps, cette approche sembla prolonger la survie des patients par rapport à la seule intervention chirurgicale. Mais très vite, l'apparition de zones nécrotiques et de démence chez ces patients, a freiné l'utilisation systématique de la radiothérapie pan-encéphalique (Leibel and Sheline, 1987). L'administration de la même puissance globale de rayonnement sur une zone plus réduite autour de la tumeur (radiochirurgie stéréotaxique) et parfois à raison de séances répétées (radiothérapie stéréotaxique fractionnée) permet maintenant d'obtenir le même bénéfice sur la survie, sans les effets secondaires (Laperriere et al., 2002). Il est à noter cependant qu'au fur et à mesure des séances de radiothérapie, des cellules de glioblastomes CD133+ seraient capables d'acquiescer une résistance aux rayonnements ionisants, limitant l'efficacité de ce traitement (Bao et al., 2006).

- La chimiothérapie

La chimiothérapie aussi était utilisée pour traiter le cerveau dans son entier, afin d'éradiquer les cellules tumorales disséminées que la chirurgie n'avait pu retirer. Cependant, il n'y eut que très peu de progrès avec ce type de traitement ; notamment en raison de la difficulté pour les agents chimiothérapeutiques d'allier à la fois les capacités à franchir la barrière hémato-encéphalique, à détruire les cellules tumorales et à être non-toxique pour les cellules neurales avoisinantes en cas d'accumulation dans la zone infiltrée. Il a fallu attendre 2007 et les essais cliniques du **témolozomide** (Témodal®) sur les glioblastomes primaires, pour voir une

amélioration de la moyenne de survie et du taux de survie à cinq ans due à la chimiothérapie (Stupp et al., 2007).

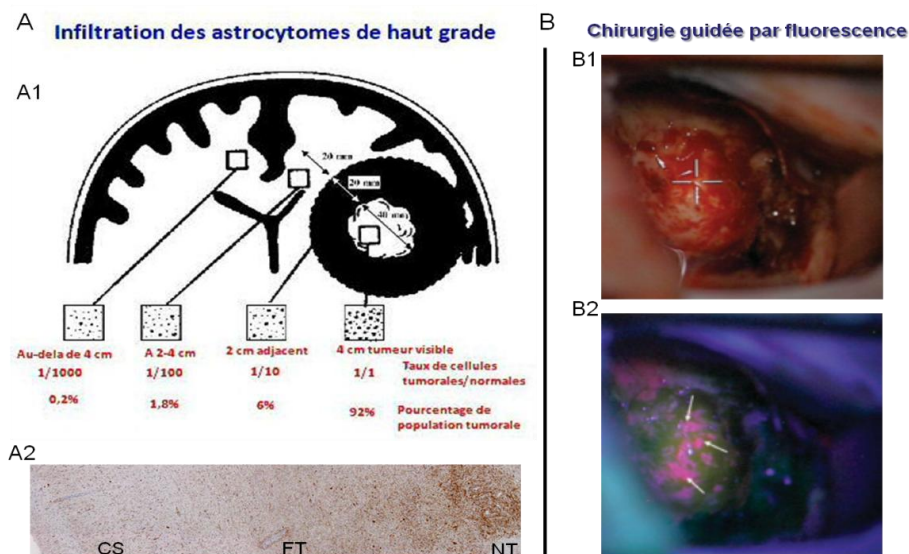


Figure 9: L'invasion du tissu sain, un challenge chirurgical.

A) Etendue de l'invasion du tissu sain par un astrocytome de haut-grade. *A1* : schéma représentant le pourcentage de cellules tumorales au voisinage du noyau tumoral. On notera les distances considérables que sont capables de parcourir ces cellules (plus de 4cm parfois). Adapté de (Wilson et al., 1990). *A2* : apparence macroscopique d'un glioblastome et de ses marges. NT=noyau tumoral, FT : frontière tumoral, CS : cerveau sain. Les cellules tumorales sont marquées par MAP2e, marqueur supposé des gliomes. Adapté de (Onishi et al., 2011). **B)** Exemple de chirurgie guidée par fluorescence après injection au patient de 5-ALA. *B1* : champ opératoire vu par le neurochirurgien en lumière blanche et après stimulation à la lumière bleue (*B2*) Les cellules tumorales (flèches blanches) accumulent le 5-ALA pour produire un composé fluorescent apparaissant en rose après illumination. Extrait de (Van Meir et al., 2010).

- Traitement actuel et futur

Actuellement toujours **incurables**, les gliomes malins font l'objet d'intenses investigations afin de parvenir à rallonger la durée de vie des patients. Le traitement classique consiste en une chirurgie guidée par fluorescence afin d'éliminer le maximum de cellules tumorales lors de l'intervention et réduire les risques de récives, suivie d'un cycle de radiothérapie et un traitement chimiothérapique de première ligne concomitant (Témodal®) (Ricard et al, 2012). Ces deux derniers traitements sont maintenant étroitement associés dans le processus de radiochimiothérapie. Pendant les 6 semaines en moyenne que dure la radiothérapie fractionnée, le patient prend le Témodal® une heure avant la séance de radiothérapie. Cette prise concomitante de l'agent chimiothérapique augmenterait l'efficacité globale des deux traitements.

Grâce aux avancées de la recherche préclinique et l'utilisation de nouveaux modèles murins, de nouvelles cibles thérapeutiques ont été définies et ont permis la mise en place de nouveaux traitements en phases cliniques avancées (Furnari et al., 2007). On retiendra notamment l'essai en phase III du cilengitide, inhibiteur des intégrines $\alpha\beta3$, 5, 6 et l'utilisation d'agents anti-angiogéniques comme le bevacizumab (Avastin®).

I.C.2. Les modes d'invasion des gliomes

A l'échelle macroscopique, les gliomes utilisent des routes anatomiques permissives

Bien que les données concernant les modes d'invasion des gliomes restent limitées, il apparaît que les cellules de gliomes peuvent se détacher seules ou en groupe de la masse tumorale initiale et se servir de « **routes anatomiques** » **permissives** comme support d'infiltration (Scherer, 1940). Scherer, un éminent neuropathologiste allemand, qui hélas collabora avec les nazis pour mener à bien leur programme d'eugénisme à la fin de sa vie, fut le pionnier de la recherche sur les gliomes et notamment sur la façon dont ils envahissent le cerveau. L'analyse de cerveaux infiltrés par des gliomes a montré la présence en nombre de petites cellules anaplasiques au contact de faisceaux **d'axones myélinisés**, ainsi que le long de la **lame basale des capillaires sanguins** ou encore **sous les méninges** (zone sous-pié-mérienne) et dans le liquide céphalo-rachidien (Giese et al., 2003; Louis, 2006) (**Figure 10**). Les gliomes sont également capables **d'envahir la matière grise sans support**, en se frayant un chemin au travers de la matrice extracellulaire cérébrale. Cette dernière diffère des autres matrices extracellulaires par sa composition riche en acide hyaluronique et autres protéoglycanes et pauvre en collagène. Les cellules de gliomes dégradent les protéines existantes et synthétisent leur propre matrice, riche en tenascine C notamment (Zamecnik, 2005). Si la zone sous-méningée et la membrane basale des vaisseaux sont composées de glycoprotéines matricielles similaires, les composants de la matrice extracellulaire de la matière blanche et du cortex cérébral sont très différents. Aussi les cellules des gliomes sont-elles capables de s'adapter à différents substrats et sont donc intrinsèquement des cellules à fort potentiel invasif.

L'invasion des gliomes à l'échelle cellulaire est encore mal comprise

A l'échelle cellulaire, peu de données existent sur l'aspect des cellules de gliomes en train d'infiltrer le tissu neural. Mais de part la nature unique de ce tissu cérébral, elles risquent fort d'utiliser des mécanismes bien différents des autres types de tumeurs invasives. Par exemple, une étude récente *ex vivo* a montré que des cellules issues d'un échantillon de glioblastome humain et réimplantées dans le cerveau de rats immunodéprimés, migrent selon le même mode opératoire que les progéniteurs neuronaux pendant le développement embryonnaire (Beadle et al., 2008). Cette migration est spécifique de ce type cellulaire et n'a été observée chez aucune cellule hors du système nerveux central. *Pour plus de détails sur la migration des cellules de gliome, se reporter à la partie II-A-3.*

Le manque d'information sur la façon dont les cellules de gliomes migrent dans le cerveau, organe à l'environnement extracellulaire très étrié, est vraisemblablement à l'origine du peu de succès des nombreux essais cliniques traitant les gliomes malins avec des agents thérapeutiques utilisés contre d'autres types d'invasion tumorale (Groves et al., 2006; Raymond et al., 2008).

I.C.3. La nécessité d'obtenir des marqueurs de l'invasivité des gliomes

A cause de l'absence de marqueur fiable, les méthodes actuelles de diagnostic des gliomes ne prennent pour le moment pas en compte leur potentiel invasif. Des gliomes non diffus sont traités de manière identique aux gliomes à infiltration rapide. Comme on l'a vu ci-dessus, le diagnostic de gliome est établi après biopsie et analyse des critères histologiques décrits par l'OMS. L'IRM permet d'apprécier la localisation de la tumeur (indispensable à la chirurgie) et sa taille, mais ne permet pas de connaître avec précision l'étendue de la zone

infiltrée par la tumeur. En effet, le signal visible sur le cliché peut parfois être confondu avec l'œdème cérébral que génère la croissance tumorale ; les vaisseaux sanguins tumoraux étant relativement poreux. De nouveaux outils d'imagerie comme les IRM multimodales (IRM de perfusion et spectro-IRM) permettent dorénavant d'avoir une meilleure idée de l'évolution de la tumeur et dans certains cas peuvent prédire le devenir des gliomes de bas-grades (Hlail et al., 2010). Cependant, ils ne constituent toujours pas un marqueur fiable de l'invasivité des gliomes.

Aussi me suis-je attaché au cours de ma thèse à découvrir de nouveaux marqueurs de l'invasivité des gliomes. Pour ce faire, j'ai notamment comparé les profils de migration et d'invasion des astrocytomes avec ceux des astrocytes sains dans différents modèles *in vitro*.

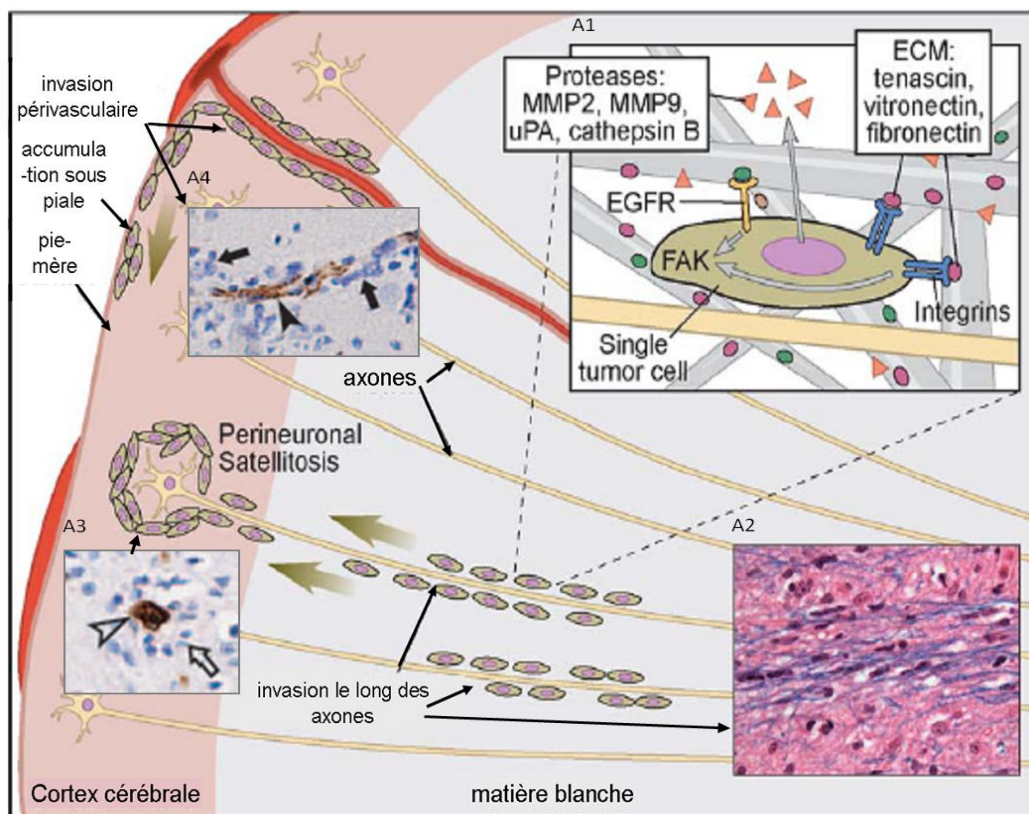


Figure 10 : Profils d'invasion des gliomes malins.

Les cellules tumorales suivent des routes anatomiques préexistantes ou « structures secondaires de Scherer ». Ce sont les faisceaux d'axones de la matière blanche (A2), l'espace périvasculaire (A4) ou la zone sous piaie des méninges. Par ailleurs, les cellules de gliome s'accumulent souvent autour des neurones du cortex, on parle de satellitose neuronale (A3). **A1**) Schéma d'une cellule tumorale envahissant le parenchyme cérébral via un remodelage de la matrice. Elle dégrade les constituants existants grâce à l'expression des protéases MMPs, cathepsin ou uPA, et synthétise de nouveaux composants (tenascin C, vitronectine, fibronectine). Ceux-ci interagissent avec les intégrines appropriées pour favoriser la migration via l'activation de la kinase FAK. **A2**) Marquage à l'Hémalun-Eosine (noyau en violet) + Luxol fast blue (axone myélinisé en bleu clair) illustrant une morphologie allongée des noyaux de cellules tumorales, typique de cellules en migration, le long des fibres d'axones myélinisés (x400). **A3**) Satellitose péri-neuronale : les cellules de gliomes (flèche) s'accumulent autour du corps cellulaire d'un neurone (marqué au NeuN, tête de flèche) (Zagzag et al., 2008). **A4**) Invasion périvasculaire : les cellules de gliomes (flèches) s'accumulent le long des vaisseaux sanguins (marqués par l'actine des muscles lisses SMA) (Zagzag et al., 2008). Figure globale adaptée de la figure 2 de (Louis, 2006)

II. La migration cellulaire et son modèle expérimental astrocytaire

La migration cellulaire est un processus finement régulé essentiel à la morphogénèse des tissus embryonnaires et adultes. Elle permet de façonner, renouveler, réparer et vasculariser les tissus. De plus, la détection et l'élimination des agents pathogènes au cours de la réponse immunitaire requièrent le recrutement rapide des cellules immunitaires, qui y parviennent grâce à une migration très efficace au travers des tissus. Malheureusement, la migration cellulaire est également un processus fondamental pour le développement de nombreuses maladies comme l'athérosclérose, les retards mentaux, l'arthrite et l'ostéoporose, les malformations cardiaques congénitales et les cancers. Comme c'est le cas pour les gliomes, la machinerie permettant le mouvement est bien souvent dérégulée et favorise l'infiltration des tissus avoisinants.

II.A. Les différents types de migration cellulaire

II.A.1. La migration en solo ou en groupe

La migration individuelle

Quelques types cellulaires migrent de manière individuelle. C'est le cas principalement des cellules immunitaires, qui sont en mouvement pendant la majeure partie de leur vie, et sont habituées à répondre rapidement à un stimulus inattendu. Certaines cellules tumorales envahissent le tissu avoisinant seules, se détachant de la masse cancéreuse initiale. C'est le cas des cellules des fibrosarcomes ou des cancers du poumon à petites cellules (Friedl and Wolf, 2003).

La migration collective

Mais la plupart des types cellulaires migrent en groupe, lors de la mise en place, du renouvellement ou de la réparation des tissus épithéliaux, par exemple (Solnica-Krezel, 2005). On parle alors de migration collective. La migration est considérée collective si les cellules se déplacent ensemble, en maintenant des contacts qui affectent le comportement des cellules du groupe (Rorth, 2009). La migration collective permet de garder la structure d'un tissu intact pendant sa réorganisation. Elle permet aussi aux cellules mobiles de guider voir d'emmener avec elles les cellules immobiles et elle facilite l'intégration de différents signaux pendant la migration par toutes les cellules du groupe afin de répondre collégialement à l'ensemble des stimuli externes.

La **migration en feuillet** intervient lors de la cicatrisation ou lors de processus développementaux comme la fermeture dorsale chez la drosophile (Martin and Parkhurst, 2004). La **ramification** ou **arborisation** du réseau vasculaire ou trachéaire, la **migration en chaîne** des cellules de la crête neurale, des cellules gliales ou des neurones néo-formés du bulbe olfactif, ou la migration de **groupes isolés** de cellules comme ceux des cellules du bord de l'ovaire chez la drosophile, sont autant d'autres exemples de migration collective (Rorth, 2009) (**Figure 11**).

D'autre part, même si la vision classique du processus métastatique veut que les cellules tumorales s'échappent principalement de la tumeur de manière individuelle, il est maintenant devenu clair que pour la plupart des cancers d'origine épithéliale (les carcinomes), l'invasion tumorale fait intervenir un type de migration collective (Christiansen and Rajasekaran, 2006; Friedl and Wolf, 2003) (**Figure 10**). Récemment, il a même été montré que la migration individuelle de certains types de tumeur (fibrosarcomes) présente en réalité des caractéristiques

de migration collective (Wolf et al., 2007). En effet, les premières cellules se détachant de la masse tumorale sont capables de dégrader la matrice environnante pour former des routes de migration dans lesquelles s'engouffrent des groupes de cellules « suiveuses ».

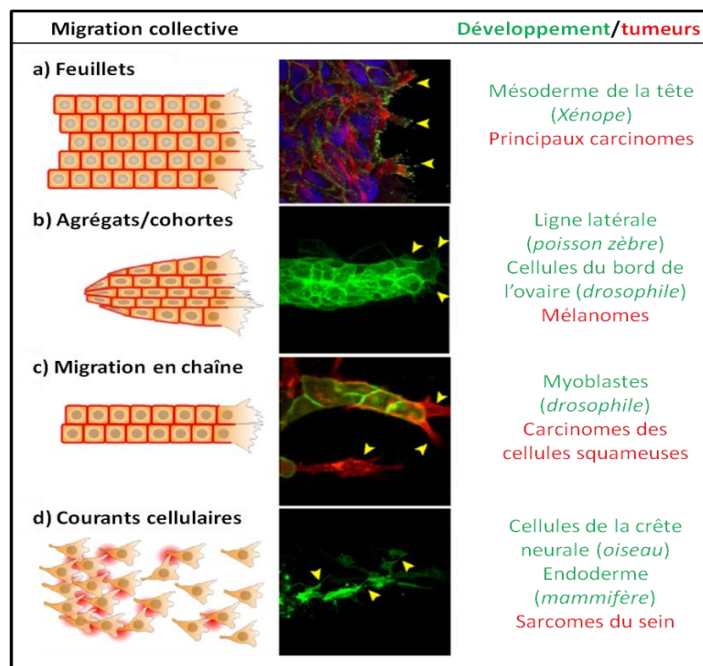


Figure 11 : Exemples de migrations cellulaires collectives pendant le développement embryonnaire et l'invasion tumorale.

Gauche : représentation schématique des différentes migrations. En rouge, zone de contact entre cellules. **Milieu** : a) cellules épithéliales intestinales. b) cellules de la ligne latérale du poisson zèbre. c) invasion des cellules squameuses cancéreuses dirigée par les fibroblastes. d) cellules de la crête neurale aviaire. Les têtes de flèche localisent les protrusions. **Droite** : Exemple pendant le développement (vert) et l'invasion tumorale (rouge) des différents types de migration. Adapté de (Mayor and Carmona-Fontaine, 2010).

II.A.2. La migration mésenchymale ou amiboïde

Que la migration soit individuelle ou collective, les différents types cellulaires utilisent des mécanismes variés pour migrer au sein de la matrice extracellulaire.

La migration mésenchymale

Le mouvement mésenchymal est caractéristique de la migration des fibroblastes, des kératinocytes, des cellules endothéliales et des cellules tumorales des carcinomes. Ces cellules ont une forme allongée, **fusiforme** et migrent selon un processus en quatre étapes (**Figure 12** et *partie II-B*). La migration mésenchymale est **dépendante** principalement de **l'adhérence au substrat** par les intégrines et des forces de traction qu'elles permettent de générer à l'avant et à l'arrière de la cellule (Friedl and Wolf, 2003). De plus, elle nécessite un **remodelage actif de la matrice extracellulaire** permettant à la cellule de se frayer un chemin au travers des fibres de collagène notamment (Sameni et al., 2001). Ce processus est accompli par la sécrétion péricellulaire de protéases (MMPs, uPA) (d'Ortho et al., 1998).

La migration amiboïde (ou améboïde)

D'autre part, de nombreux types cellulaires comme les lymphocytes, les neutrophiles ou d'autres cellules tumorales, n'ont pas besoin des intégrines et des forces d'adhérence à la matrice pour migrer (Rintoul and Sethi, 2002). Ces cellules possèdent une morphologie ronde ou **ellipsoïde**, caractéristique du mouvement observé chez les amibes (Enterline and Coman, 1950) (**Figure 12**). L'étude de *Dictyosilium discoideum* a permis de définir ce mouvement amiboïde (Firtel and Meili, 2000). Il ne requiert que très peu d'adhérence avec le substrat, est **indépendant des intégrines** et se produit grâce à l'alternance très rapide de phase de contraction et d'expansion chez des cellules extrêmement **déformables** (Wolf et al., 2003). En témoigne la signification du mot amibe qui vient du grec ancien *amoibê* (=échange, transformation), en raison de leur changement fréquent de forme lors de leur migration. De plus, ces cellules ne nécessitent **pas de dégradation et de remodelage de la matrice** pour se mouvoir (Friedl and Wolf, 2003).

Il est important de noter que dans certaines circonstances, surtout chez les cellules tumorales, on peut observer une transition entre un type de migration et l'autre. L'inhibition des protéases dégradant la matrice par exemple, induit une transition mésenchymale-amiboïde de la migration des cellules cancéreuses (Wolf et al., 2003).

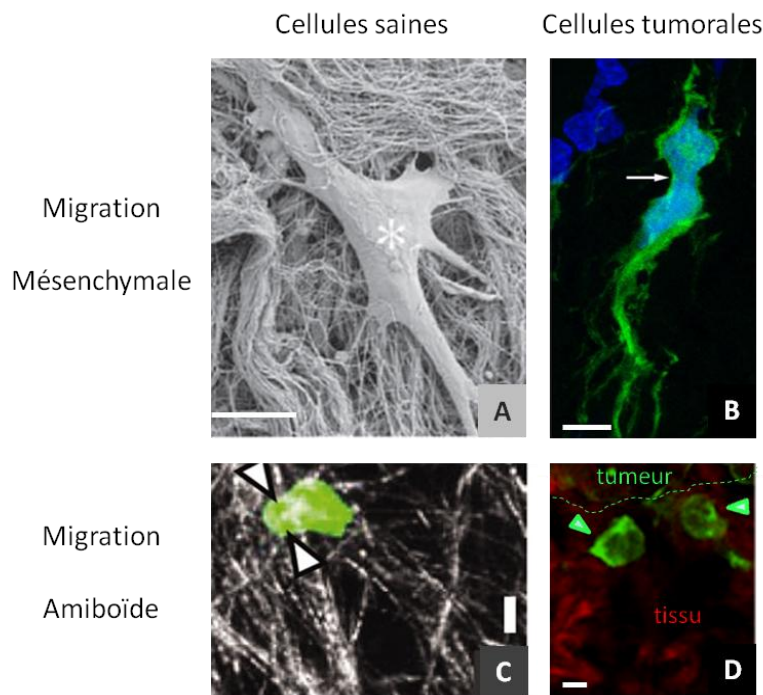


Figure 12 : Les différents modes généraux de la migration individuelle.

A) Microscopie électronique à balayage d'un fibroblaste dans une matrice de collagène. Extrait de (Stoitzner et al., 2002). **B)** Immuno-marquage d'une cellule de **gliome humain** exprimant la GFP qui infiltre le cerveau d'une souris immunodéprimée. Remarquer l'aspect fusiforme de la cellule dont le noyau est en train de transloquer vers l'avant de la cellule (flèche). Extrait de (Beadle et al., 2008). **C)** Lymphocyte-T exprimant la GFP en migration au sein d'une matrice de collagène (fibres blanches). Noter la protrusion à l'avant de la cellule (têtes de flèche). Extrait de (Friedl et al., 2001). **D)** Cellules de cancer du sein métastatiques MTLn3e exprimant la MLC-GFP et implantées dans la masse grasseuse mammaire chez la souris. Ces cellules présentent une morphologie amiboïde lors de l'invasion du tissu sain (tête de flèche). Extrait de (Wyckoff et al., 2006)

II.A.3. Quel type de migration s'applique aux cellules des gliomes ?

Contrairement aux principaux cancers épithéliaux, la migration des cellules de gliomes semble être **individuelle** et **mésenchymale** (Beadle et al., 2008). Elle requiert le remodelage du parenchyme cérébral via la synthèse de nombreuses enzymes dégradant la matrice extracellulaire du cerveau. Le niveau d'expression des protéases MMP-2, MMP-9, MMP-12, Cathepsine-B et uPA a été associé à une capacité invasive accrue des gliomes *in vivo* (Claes et al., 2007; Lakka et al., 2004; Sawaya et al., 1996; Zhao et al., 2010). Les cellules de gliome synthétisent leur propre matrice riche en Tenascine-C, vitronectine et laminine, plus propice à leur dissémination dans le neuropile (Giese et al., 1996; Sarkar et al., 2006). Caractéristique d'une migration mésenchymale, leur motilité requiert l'adhérence à ces protéines extracellulaires. Ainsi, certaines intégrines ($\alpha3\beta1$, $\alpha v\beta1$, $\alpha v\beta3$ et $\alpha v\beta5$) sont-elles surexprimées dans les gliomes et semblent-elles indispensables à la croissance de la tumeur *in vivo* (Bello et al., 2003; Stupp et al., 2010). Enfin, les études sur des cellules humaines de glioblastomes greffées dans des cerveaux de rat immunodéprimés ont montré qu'elles avaient une morphologie fusiforme et non ronde et ellipsoïdale (Beadle et al., 2008; Soroceanu et al., 1999).

Ces caractéristiques uniques des cellules de gliome en font les seules cellules tumorales capables d'envahir le tissu cérébral sain puisque les métastases cérébrales d'autres tumeurs forment des lésions bien délimitées et non diffuses.

II.B. Les mécanismes généraux de la migration cellulaire

Les mécanismes contrôlant la migration cellulaire ont été très étudiés. *Pour une vision complète du processus le lecteur peut se référer aux revues suivantes* : (Horwitz and Parsons, 1999; Lauffenburger and Horwitz, 1996; Ridley et al., 2003). Je présente ici les grands principes généraux permettant de décrire la migration cellulaire, en mettant l'accent sur la migration mésenchymale.

L'action coordonnée de l'activité protrusive à l'avant et de l'activité rétractive à l'arrière, associée à l'assemblage et au désassemblage des adhérences au substrat, génère le déplacement net de la cellule (**Figure 13**).

II.B.1. La phase de polarisation cellulaire et l'établissement d'un axe avant/arrière

La migration cellulaire est un exemple caractéristique d'un processus biologique polarisé. La cellule réagit à un signal polarisé extrinsèque en générant une polarité intrinsèque, **l'axe avant-arrière**, et en orientant cet axe vers le signal pro-migratoire (Ridley et al., 2003). Cette asymétrie structurelle est indispensable à la cellule afin de coordonner les forces intracellulaires générées par son cytosquelette et engendrer un mouvement net. L'organisation intracellulaire asymétrique se traduit donc avant tout par une organisation polarisée des éléments du cytosquelette.

De plus, dans de nombreux types cellulaires le trafic intracellulaire s'oriente selon l'axe de polarité afin d'assurer un apport constant en membrane et en protéines en tout genre au front de migration. Aussi retrouve-t-on l'appareil de Golgi positionné entre le front de migration et le noyau au cours de la migration. De même le centrosome, équivalent au Centre Organisateur des Microtubules (MTOC) dans de nombreux types cellulaires (dont les astrocytes), se repositionne en avant du noyau, face au front de migration. Ce repositionnement permet de polariser le réseau de microtubules et d'orienter préférentiellement le trafic vésiculaire vers le front de migration (*commenté par* (Horwitz and Webb, 2003) *et analysé par* (Wittmann and Waterman-Storer, 2001).

II.B.2. La phase de formation d'une protrusion à l'avant

En réponse à des signaux extracellulaires, la cellule se polarise et définit un **front de migration** à l'avant. Là, dans la majorité des types cellulaires, la polymérisation active des filaments d'actine crée une force protrusive qui pousse la membrane vers l'avant. C'est la **phase de création d'une protrusion**. Dans les astrocytes, les microtubules sont nécessaires à la formation d'une protrusion (Etienne-Manneville, 2004). S'il est peu probable que le réseau de microtubules agisse directement comme une force protrusive, son organisation polarisée à l'avant dans les cellules qui migrent sur de longue distance en maintenant leur directionnalité (astrocytes, neurones notamment), suggère un rôle fondamental dans la stabilisation de l'axe avant-arrière de la cellule. *Pour plus de détails se référer à la revue (Ridley, 2011).*

II.B.3. La phase d'adhérence de la protrusion au substrat

Parallèlement au remodelage du cytosquelette, la cellule s'attache au substrat à l'avant, afin de bénéficier d'une force de traction pour faciliter sa progression. Au front de migration des adhérences à la matrice ou **contacts focaux** se forment via la synthèse et le recrutement de récepteurs membranaires hétérodimériques (α/β), **les intégrines**. Ces molécules se lient spécifiquement à certaines protéines de la matrice extracellulaire et forment, en s'associant à d'autres partenaires intracellulaires eux-mêmes en contact avec le réseau d'actine sous-jacent, de véritables points d'attache pour la cellule en migration (Horwitz et al., 1986). Ces plaques d'adhérence servent de points d'ancrage aux filaments d'actine, stabilisent le réseau de microtubules et servent aussi de plateforme de signalisation pour réguler la vie de la cellule en fonction de son adhérence ou non au substrat qui l'entoure (Martin et al., 2002). C'est la **phase d'adhérence au substrat** de la protrusion. *Ce phénomène est analysé en détails dans (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Mitchison and Kirschner, 1988).*

II.B.4. La phase de contraction

Au centre et sur les côtés de la cellule en migration, des câbles d'actine appelés **fibres de stress** sont associés à des moteurs moléculaires spécifiques, les myosines. Ensemble, ils forment le réseau d'actomyosine qui, en se contractant, produit des forces de tension nécessaires à la translocation du noyau et du reste du corps cellulaire vers le front de migration. Afin de générer ces forces de contraction, les câbles d'actomyosine doivent être ancrés de chaque côté à un point d'attache fixe. Ce sont les points focaux générés à l'avant précédemment, et se retrouvant au fur et à mesure de la progression sous le corps cellulaire, qui vont servir de points d'ancrage (**Figure 13**). Les points focaux d'adhérence grandissent et se transforment en plaques d'adhérence plus larges et plus stables, idéales pour permettre aux fibres de stress de générer les forces de contraction nécessaire à l'avancée de la cellule. Dans certains types cellulaires comme les neurones, la translocation du noyau requiert également un réseau dynamique de microtubules (Martini and Valdeolmillos, 2010).

II.B.5. La phase de rétraction de l'arrière

Enfin, pour assurer une progression nette de la cellule et compenser l'avancée du front de migration, il est nécessaire que l'arrière suive et se rétracte. Cette activité est permise d'une part par la contraction des câbles d'actomyosine et d'autre part par le désassemblage des plaques d'adhérence présentes à l'arrière. C'est **la phase de rétraction de l'arrière**.

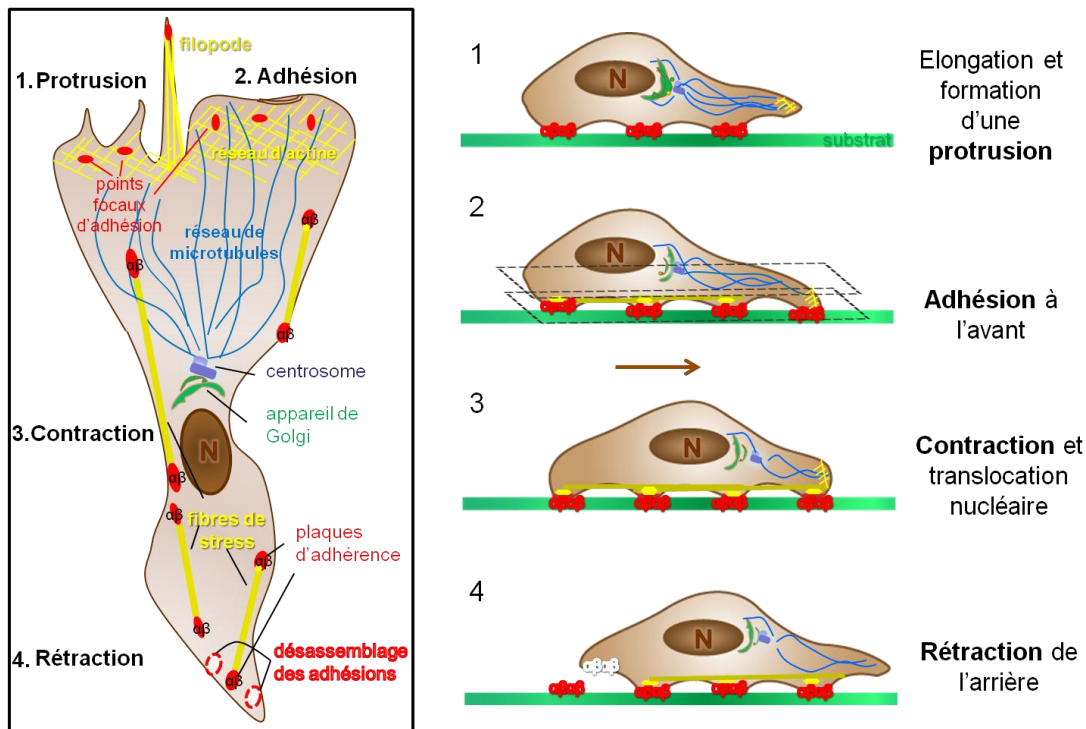


Figure 13 : Etapes clés de la migration cellulaire.

1) En réponse à un signal pro-migratoire, la cellule se polarise, définit un front de migration et grâce au réarrangement des cytosquelettes d'actine et de microtubules forme une protrusion. 2) Celle-ci établit des contacts focaux d'adhérence avec le substrat via les intégrines ($\alpha\beta$) afin de pouvoir produire une force de traction. 3) Des câbles d'actomyosine ou fibres de stress s'organisent et s'ancrent aux plaques d'adhérence. En se contractant, elles génèrent des forces de tension capables de faire avancer le noyau et le reste du corps cellulaire vers l'avant. 4) Enfin, la progression nette de la cellule n'est atteinte que lorsque l'arrière se rétracte. Cette étape est permise par la contraction des fibres de stress et le désassemblage des adhésions via le recyclage des intégrines.

II.B.6. L'importance du recyclage des intégrines dans la migration cellulaire

Tout au long de la migration, l'adhérence au substrat doit être finement régulée spatiotemporellement afin de promouvoir l'adhérence à l'avant de la cellule et l'inhiber à l'arrière. Le **recyclage des intégrines** est un mécanisme astucieux pour permettre aux points d'adhérence de rester dynamique tout en maintenant en permanence un pool d'intégrines à la membrane plasmique nécessaire à la perception de l'environnement extracellulaire (Nagano et al., 2012). Au cours de la migration individuelle, les intégrines sont **endocytées** à l'**arrière** de la cellule par un mécanisme essentiellement dépendant de la clathrine (Ezratty et al., 2009) et des petites GTPases (Rabs et Arf) (Caswell et al., 2009), puis transportées et **recyclées** à la membrane plasmique vraisemblablement à l'**avant** de la cellule (Webb et al., 2002). La dynamique des intégrines a été étudiée récemment dans un système de migration cellulaire induit par la présence du facteur de croissance PDGF (Gu et al., 2011). Dans ce système les intégrines subissent un recyclage différent. A l'arrière de la cellule, elles sont recrutées au niveau de ruffles circulaires dorsaux où elles sont internalisées par macropinocytose. Puis, elles sont rapidement recyclées à l'avant de la cellule via leur transport dans différents compartiments de recyclage exprimant Rab4, Rab5 et Rab 11 (**Figure 14**). Le recyclage des intégrines serait également essentiel à la persistance de direction pendant la migration (White et al., 2007) et impliqué dans la progression tumorale (Shin et al., 2011) *Pour plus de détails sur les acteurs du recyclage des intégrines, se référer à (Caswell et al., 2009).*

Il est intéressant de noter que la dérégulation du recyclage des cadhérines favorise l'invasion des cellules cancéreuses dépourvues de p53 (Muller et al., 2009); ce gène étant fréquemment muté dans les gliomes.

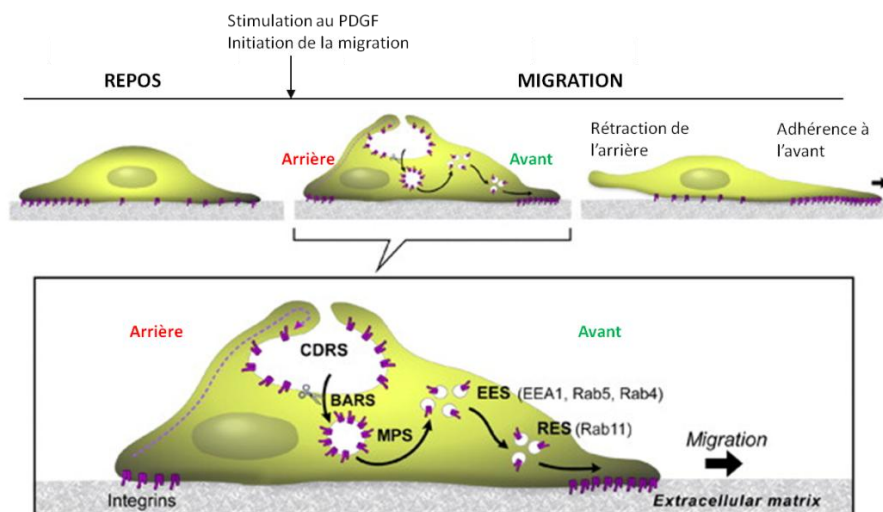


Figure 14 : Un exemple de recyclage des intégrines pendant la migration cellulaire

Les intégrines sont en violet. Plus de détails sur le mécanisme dans le texte ci-dessus. CDRS : Circular dorsal ruffles ; BARS : Brefeldin A-ADP-ribosylated substrate ; MPS : Macropinosomes ; EES : Early endosomes ; RES : Recycling endosomes. Adaptée de (Gu et al., 2011)

Ces étapes ont pu être clairement identifiées et décrites grâce à des modèles de migration simples, en 2D. Il est important de noter ici que si la migration en 3D et *in vivo* fait intervenir le même mécanisme général, elle n'en reste pas moins quelque peu différente. Par exemple, la présence et la fonction des plaques d'adhérence semblent parfois remise en cause dans la migration en 3D (Kubow and Horwitz, 2011). *Pour plus de détails, lire* (Even-Ram and Yamada, 2005).

II.C. La migration astrocytaire

II.C.1. Le modèle *in vitro* de fermeture de blessure

Les astrocytes sont des cellules immobiles qui deviennent réactives, polarisées et motiles en cas de lésion du système nerveux central. Un modèle *in vitro* récapitulant les principales caractéristiques de l'astrogliose lors d'une lésion du cerveau a permis d'étudier en détails les modalités de la migration astrocytaire.

Le modèle *in vitro* consiste à pratiquer une **rayure dans une monocouche d'astrocytes** primaires prélevés chez l'embryon E18 de rat (Etienne-Manneville, 2006; Faber-Elman et al., 1996). En réponse à ce signal pro-migratoire, les cellules se polarisent en émettant une protrusion très fine qui adhère au substrat. La protrusion est riche en microtubules et s'oriente perpendiculairement à la blessure. Le réseau de microtubules est extrêmement polarisé dans un astrocyte en migration, suivant l'axe avant-arrière défini par la cellule en réponse aux stimuli externes. La position du centrosome et de l'appareil de Golgi sont des bons indicateurs de l'orientation de la cellule en migration.

Après l'initiation d'une asymétrie cellulaire nécessaire au processus de migration, les cellules migrent jusqu'à la fermeture de la blessure, qui survient après que les cellules de

chacun des deux bords de la blessure ont établi de nouveaux contacts (**Figure 15**). Dans ce modèle, les astrocytes migrent lentement (0.1µm/min en moyenne), collectivement en feuillet, en maintenant des contacts permanents avec leurs voisins (Etienne-Manneville, 2006). Dans ce même modèle, les fibroblastes migrent plus rapidement (0.5µm/min) et moins collectivement. Il semblerait que, contrairement aux autres types cellulaires, la formation de la protrusion des astrocytes dépende principalement du cytosquelette de microtubules car elle n'est que faiblement affectée par des inhibiteurs du cytosquelette d'actine (Etienne-Manneville and Hall, 2001a).

Pour résumer, il s'agit d'une migration **mésenchymale, collective et dirigée**.

J'ai comparé au cours de ma thèse la migration astrocytaire saine avec la migration des cellules extraites d'échantillons de glioblastomes afin d'affiner nos connaissances sur la migration des astrocytes tumoraux. Il est effectivement primordial de comprendre les différentes caractéristiques de migration, au sein d'un même modèle, entre un type cellulaire et son équivalent tumoral, pour pouvoir mettre en lumière les principales voies altérées.

II.C.2. La signalisation moléculaire gouvernant la migration des astrocytes

Grâce à l'utilisation de ce modèle simple, les mécanismes moléculaires contrôlant l'initiation de la migration et l'établissement de la polarité cellulaire des astrocytes primaires ont pu être découverts (**Figure 16**).

- L'**initiation** de la polarisation et de la migration des astrocytes primaires dans un modèle *in vitro* de fermeture de blessure est **dépendante de l'engagement des intégrines**, en particulier des intégrines β1 (Peng et al., 2008), avec la matrice extracellulaire à l'avant des cellules qui bordent la lésion. L'activation des intégrines conduit ensuite à l'activation et au recrutement à l'avant des cellules des petites GTPases, **Cdc42** et **Rac**. Cdc42 est essentiellement responsable de l'orientation de la migration cellulaire alors que Rac contrôle l'avancée des cellules et donc la migration proprement dite (Etienne-Manneville and Hall, 2001b).

- Pour que les cellules migrent de manière efficace, les voies de signalisation contrôlées par Cdc42 et Rac doivent être **restreintes à l'avant des cellules en migration**. Une activation non localisée de ces voies conduit à un arrêt de la migration cellulaire ou éventuellement à une migration aléatoire. La localisation et l'activation de Cdc42 et Rac mettent en jeu la protéine Scrib, ainsi que les facteurs d'échange (activateurs des petites protéines G) βPIX (Osmani et al., 2006) et probablement Tiam1 (John Collard, communication personnelle au laboratoire).

- **Cdc42** contrôle l'**orientation cellulaire** en s'associant aux protéines de polarité Par6 et aPKC (PKCζ et PKCι/λ). L'activation des aPKC conduit ensuite à la régulation de APC (Adenomatous Polyposis Coli), et de Dlg1. APC et Dlg1 interagissent pour réguler la dynamique et l'ancrage membranaire des microtubules via GKAP et ainsi permettre l'orientation du réseau de microtubules et du centrosome dans la direction de migration (Etienne-Manneville and Hall, 2003a; Etienne-Manneville et al., 2005a; Manneville et al., 2010).

- **Rac** contrôle la migration proprement dite en **favorisant la protrusion** de la membrane plasmique. Rac agit essentiellement via son effecteur PAK1 qui permet à la fois la régulation des cytosquelettes d'actine et de microtubules pour générer une force protrusive (Etienne-Manneville and Hall, 2001a).

Analyse des caractéristiques de la migration astrocytaire grâce au modèle de fermeture de blessure *in vitro*.

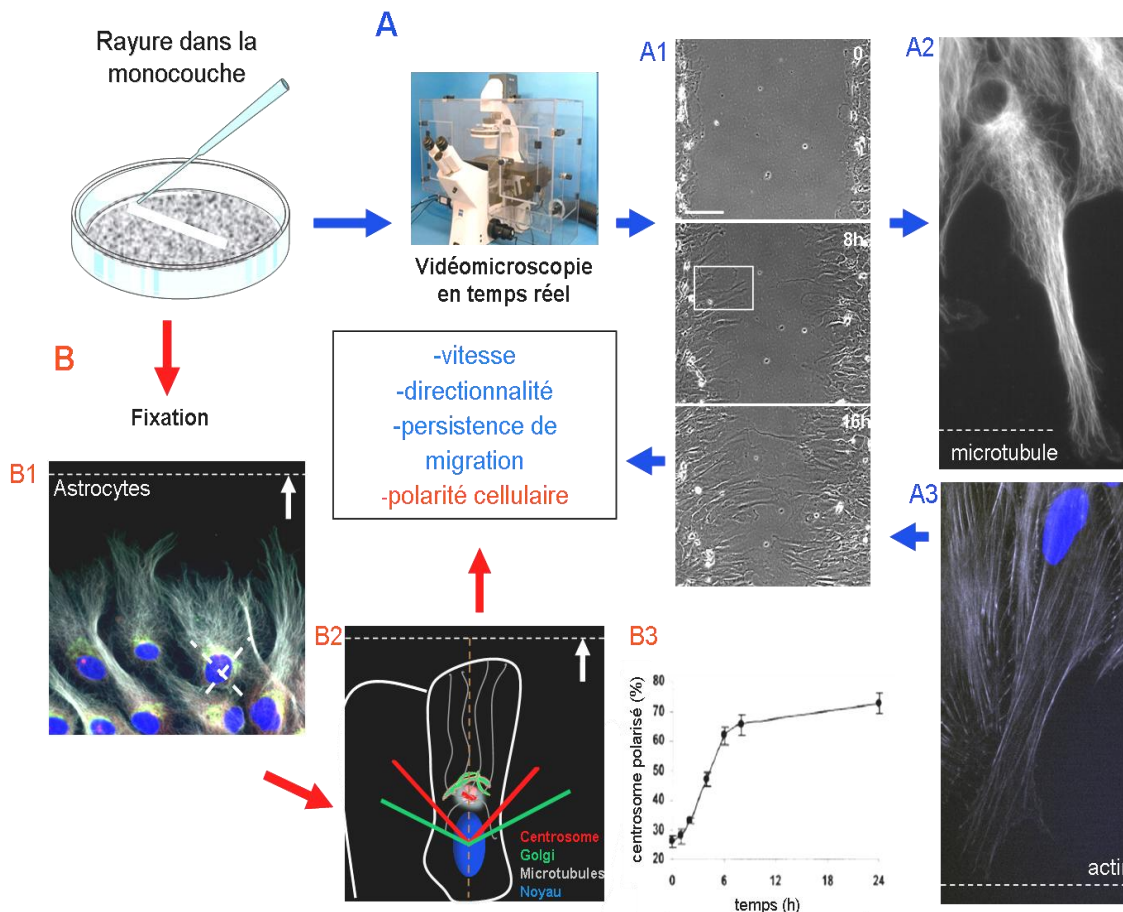


Figure 15 : Modèle *in vitro* de migration astrocytaire

Après dissection d'un cerveau embryonnaire de rat et mise en culture d'astrocytes primaires purifiés, une boîte confluente de cellules est rayée à l'aide d'un cône ou d'une micropipette en verre. Les cellules sont soit : **A**) placées dans une chambre thermostatée couplée à un microscope pour enregistrer la migration en temps réel et déterminer leurs caractéristiques (vitesse, directionnalité, persistance) ou **B**) fixées 8 heures après induction de la migration par la rayure pour évaluer leur polarité cellulaire via l'immunomarquage de la péricentrine (centrosome), de GM-130 (Golgi), et de l' α -tubuline (microtubules) (**B1**). Le centrosome est dit réorienté et par conséquent la cellule polarisée, s'il est localisé dans le quadrant faisant face au noyau (**B2**). Il en est de même pour l'appareil de Golgi (zone verte, **B2**). La réorientation des organelles face au noyau a lieu exponentiellement au cours des 8 premières heures de la migration puis atteint un plateau (**B3**). **A1, A2, A3** : Dans ce modèle de migration, les cellules migrent collectivement et perpendiculairement à la blessure dans l'espace laissé libre (**A1**). Elles émettent une longue protrusion riche en microtubules (**A2**) et en filaments d'actine (**A3**) extrêmement polarisés dans l'axe avant/arrière de la cellule (Etienne-Manneville and Hall, 2001a).

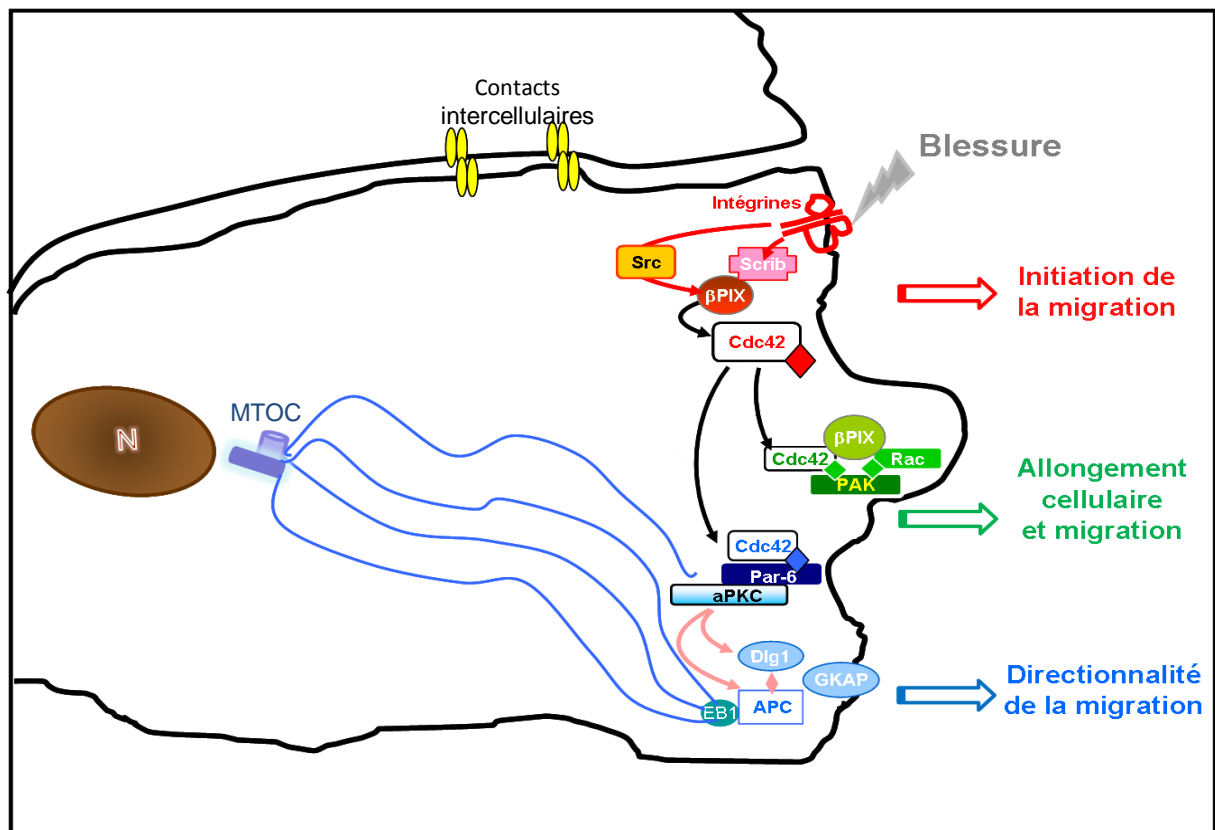


Figure 16 : Voie de signalisation contrôlant l'initiation et l'établissement d'une migration dirigée dans un modèle de fermeture de blessure astrocytaire

Suite à la rayure de la monocouche, l'engagement des intégrines à l'avant de la cellule conduit à l'activation et au recrutement au front de migration des petites protéines G, Cdc42 et Rac. Cdc42 contrôle l'orientation de la migration cellulaire via son association avec le complexe Par-6/aPKC. Rac contrôle la migration proprement dite, via son effecteur PAK1 agissant sur l'actine et les microtubules, en favorisant la protrusion de la membrane.

Contrairement à d'autres modèles *in vitro* de migration cellulaire, comme les chambres de chimiotactisme, dans lesquels les cellules sont dissociées avant l'induction de la migration, le modèle astrocytaire de fermeture de blessure est particulièrement adapté à l'étude de l'impact des interactions cellules-cellules sur la migration. A mon arrivée dans le laboratoire, le rôle des jonctions intercellulaires dans le contrôle de la migration astrocytaire n'était pas encore connu. Néanmoins, il venait d'être découvert que les contacts intercellulaires régissaient l'établissement de la polarité cellulaire (Dupin et al., 2009).

III. La jonction adhérente ou comment maintenir la cohésion tissulaire tout en permettant les mouvements cellulaires

III.A. Les principales structures de l'adhérence intercellulaire

Les contacts entre cellules sont essentiels au bon développement et fonctionnement d'un organisme multicellulaire. Au fur et à mesure de l'évolution, les cellules eucaryotes ont acquis des structures membranaires spécialisées leur permettant de s'associer et de communiquer entre elles pour former un ensemble cohérent aux multiples fonctionnalités. Dans un organisme pluricellulaire, les cellules agissent de concert et interagissent avec leur microenvironnement via des récepteurs à la surface de leur membrane plasmique. Ceux-ci reconnaissent aussi bien des facteurs solubles, des protéines de la matrice extracellulaire ou d'autres récepteurs à la surface des cellules avoisinantes. Notamment, les multiples contacts intercellulaires permettent la formation et l'organisation précise des différents tissus en organes fonctionnels. Les cellules s'attachent entre elles grâce à des **interactions adhésives, stables mais dynamiques**, favorisant le renouvellement ou la réparation du tissu, tout en maintenant sa cohésion : les **jonctions intercellulaires**.

III.A.1. Les différents types de jonctions intercellulaires chez les Vertébrés

Les jonctions communicantes (ou « gap junctions »)

Elles lient chimiquement et électriquement deux cellules voisines. Leur perméabilité est finement régulée afin d'assurer les échanges de métabolites, d'ions et de petites molécules informatives (<1.1kDa) en réponse aux stimuli externes (Bruzzone et al., 1996) (**Figure 17**).

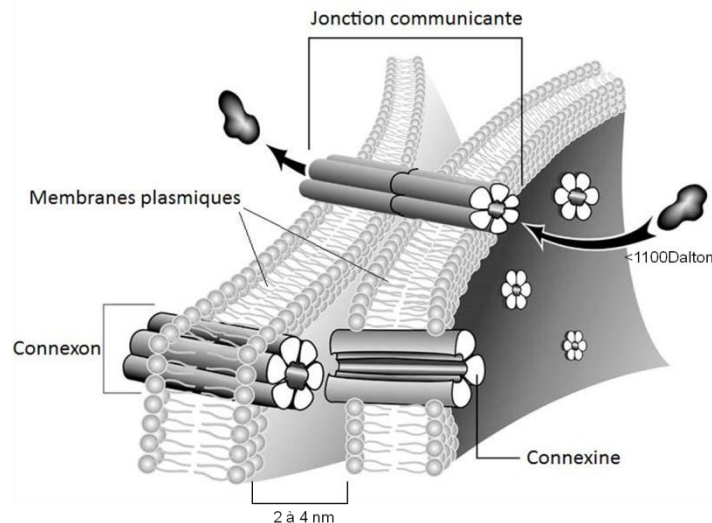


Figure 17 : Diagramme représentant la structure des jonctions communicantes

Elles sont composées de deux connexons (ou demi-canaux) chacun présent à la surface de deux cellules adjacentes et mis en série afin d'établir un canal. Chaque demi-canal est constitué d'un hexamère de connexines arrangées autour d'un pore central de diamètre variable, en fonction des différentes connexines qui le composent. Source : http://www.futura-sciences.com/uploads/RTEmagicP_jonction-communicante_DR_txdam16193_f485a1.jpg

Les jonctions serrées (ou « tight junctions »)

Elles sont essentielles pour maintenir l'étanchéité des barrières épithéliales et endothéliales. On les trouve principalement dans la « zonula occludens », la partie la plus apicale des contacts entre cellules épithéliales et endothéliales polarisées (**Figure 18a**). Elles se composent de protéines aux noms évocateurs de leurs fonctions, les claudines (du latin *claudere*, fermer), les occludines, ZO-1/2 et les JAMs (junctional adhesion molecules), associées au cytosquelette d'actine (Shin et al., 2006).

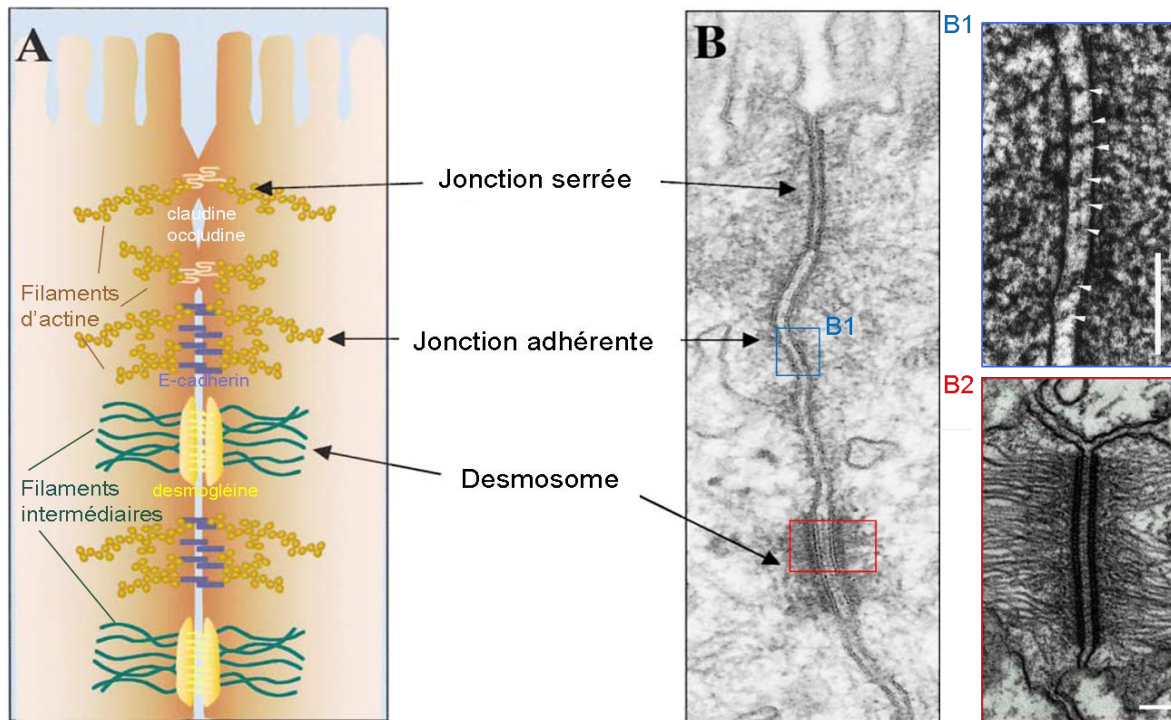


Figure 18 : Les jonctions intercellulaires au contact de deux cellules épithéliales

A. Diagramme des trois principales jonctions intercellulaires des cellules épithéliales montrant leur composition en différents récepteurs membranaires adhésifs, liés à un cytosquelette sous-jacent. **B.** Image de microscopie électronique montrant l'ultrastructure des jonctions serrées, adhérentes et des desmosomes entre deux cellules épithéliales de l'intestin. D'après (Perez-Moreno et al., 2003) **B1.** Microscopie électronique au niveau de la zonula adherens montrant les structures membranaires en barreaux (« rod-like ») des jonctions adhérentes (têtes de flèche). Barre d'échelle : 100nm. Extrait de (Miyaguchi, 2000). **B2.** Desmosome entre deux cellules épidermales d'un triton, montrant avec précision le réseau de filaments intermédiaires attachés à la membrane plasmique. Barre d'échelle : 100nm. Extrait de (Kelly, 1966).

Les desmosomes

Ce sont des superstructures adhésives ovales de 400nm de diamètre que l'on retrouve essentiellement dans les cellules épithéliales où elles constituent la « macula adherens » (point d'adhérence en latin). Constitués de cadhérines desmosomales (desmoglérines et desmocollines), ils sont ancrés au cytosquelette de filaments intermédiaires (Garrod et al., 2002; Kowalczyk et al., 1999) (**Figure 18b₂**).

Les jonctions adhérentes (ou « adherens junctions »)

Les jonctions adhérentes (JAs) sont aussi appelées jonctions intermédiaires car elles ont été initialement décrites comme participant aux contacts étroits des cellules épithéliales polarisées entre les jonctions serrées, plus apicales et les desmosomes. Dans cet exemple précis, elles participent à la « zonula adherens » (Farquhar and Palade, 1963) (**Figure 18b₁**). Les cellules non épithéliales et non endothéliales forment également des JAs structurellement identiques, bien que plus petites. *L'organisation et la structure moléculaire des jonctions adhérentes seront développées plus en détails dans les parties III-B et III-C.*

De nombreux autres types d'adhérence intercellulaire existent mais ne seront pas développés ici. On peut noter néanmoins l'existence des protéines de la famille des immunoglobulines comme les N-CAMs, qui jouent un rôle important dans les contacts entre les astrocytes (Edelman and Crossin, 1991), mais ne s'organisent pas en jonctions adhésives en tant que telles.

Pour résumer, hormis les jonctions communicantes, chacune de ces jonctions intercellulaires se compose de protéines transmembranaires reliées à un cytosquelette sous-jacent afin de consolider l'ancrage des cellules entre elles et leur permettre de résister aux forces de tension qu'elles subissent.

III.A.2. Les jonctions intercellulaires des astrocytes

Les astrocytes forment des jonctions communicantes

Les diverses fonctions exercées par les astrocytes les amènent à entrer en contact avec de nombreux types cellulaires distincts. Aussi les astrocytes doivent –ils être capables d'établir des jonctions diverses et variées. Cependant, leur morphologie même est un frein à une caractérisation précise de ces jonctions *in situ*, tant leurs expansions cytoplasmiques sont fines et entremêlées. De nombreuses études font tout de même état de **jonctions communicantes** - plus aisément identifiables par l'utilisation de traceurs fluorescents. Elles sont composées majoritairement des connexines Cx23, Cx30 et surtout de Cx43 (Giaume and McCarthy, 1996; Simard et al., 2003). Les jonctions communicantes permettent aux astrocytes de former un véritable syncytium glial, nécessaire à la propagation rapide des vagues calciques ainsi que du glucose et de ses métabolites, qui régulent la transmission synaptique (Nag, 2011; Nagy et al., 1999; Rouach et al., 2008). Les astrocytes peuvent aussi se connecter aux oligodendrocytes par des jonctions communicantes (Rash et al., 2001).

De manière intéressante, les cellules de gliome exprimant la Cx43 établissent des jonctions communicantes avec les astrocytes sains avoisinants ce qui **favorisent leur invasion du parenchyme cérébral**. Des cellules de gliomes dépourvues de Cx43 infiltrent le cerveau sur de moins longues distances et restreignent leur route d'invasion aux espaces périvasculaires (Lin et al., 2002). Néanmoins, le rôle de la Cx43 dans la progression des gliomes reste encore méconnu et controversé.

Les astrocytes de mammifères ne forment ni jonctions serrées ni desmosomes

Aucune étude ne fait état de la présence de jonctions serrées dans les astrocytes de mammifères *in vivo* (Massa and Mugnaini, 1982). Même si ZO-1 et les occludines semblent exprimées dans les astrocytes murins (Bauer et al., 1999; Howarth et al., 1992), elles ne

seraient cependant pas impliquées dans la formation de jonctions serrées. En effet, dans les astrocytes de souris *in vivo*, ZO-1 est localisée aux jonctions communicantes et interagit avec les connexines Cx30 et Cx43 (Penes et al., 2005). Si chez les mammifères, les astrocytes ne semblent pas former de jonctions serrées, les astrocytes de poisson de rouge s'associent entre eux via ce type de jonction (Wolburg et al., 1983).

D'autre part, si certaines structures ressemblant à des desmosomes semblent avoir été aperçues dans les astrocytes de certaines zones cérébrales humaines (Matsunaga et al., 1995), aucune protéine classique des desmosomes n'a pour l'instant été localisée chez les astrocytes des mammifères.

Les astrocytes forment-ils des jonctions adhérentes in vivo ?

Très peu de données *in vivo* existent sur d'éventuelles autres jonctions entre astrocytes. Un premier type de jonction a pourtant été décrit 40 ans plus tôt : les « puncta adherentia », après observation sur coupes de cerveaux, de zones où les membranes de deux astrocytes adjacents étaient à 25/30 nm de distance. Mais aucune caractérisation moléculaire n'avait pu être réalisée à l'époque (Farquhar and Palade, 1963).

Les astrocytes de mammifères ne forment pas de jonctions serrées. Or, que ce soit au niveau de la barrière hémato-encéphalique où les pieds astrocytaires sont en contact tout autour du capillaire pour maintenir une structure imperméable, ou au niveau des synapses tripartites qui nécessitent la présence d'un astrocyte au contact des deux prolongements neuronaux communicants, ces cellules doivent se maintenir associées à leurs partenaires.

La culture *in vitro* d'astrocytes primaires issus de cerveaux de rats prénataux a permis de mettre en évidence l'expression de protéines des JAs et la formation de jonctions d'adhérence (Dupin et al., 2009; Schnadelbach et al., 2000; Wilby et al., 1999). Mais la relevance physiologique de ces contacts a longtemps été sujet à débat puisqu'établie dans des conditions non physiologiques, avec des astrocytes différenciés artificiellement par la présence de sérum dans le milieu de culture.

Cependant, une étude récente a permis de clarifier la situation en utilisant des méthodes de purification rapide basées sur le triage par cytométrie en flux des sous-populations astrocytaires, oligodendrocytaires et neuronales (Cahoy et al., 2008). Ils ont obtenu des informations cruciales sur l'expression différentielle de plus de 20 000 gènes dans ces lignées cellulaires *in vivo*. Ils ont clairement établi que les **astrocytes *in vivo* expriment toutes les protéines des jonctions adhérentes.**

En outre, en comparant le transcriptome d'astrocytes purs *in vivo* à celui d'astrocytes ayant été isolés selon la méthode traditionnelle utilisée au laboratoire (Etienne-Manneville and Hall, 2001a), cette étude a montré que les différences d'expression protéique entre astrocytes cultivés et astrocytes *in vivo* ne portent pas sur l'état d'expression des cadhérines (Cahoy et al., 2008). Les JAs observés *in vitro* entre astrocytes ne semblent donc pas être des artéfacts de culture cellulaire.

III.B. Les jonctions adhérentes sont des structures complexes et labiles en adéquation avec leur fonction

Les jonctions adhérentes constituent les structures essentielles de l'adhérence intercellulaire et donc du maintien cohésif de l'organisme. Contrairement à celle des jonctions serrées ou d'autre type d'adhérence (N-CAM dépendant par exemple), leur désorganisation est létale très tôt dans le développement embryonnaire (Larue et al., 1994; Riethmacher et al., 1995).

III.B.1. L'ultrastructure des jonctions adhérentes

Les JAs ont été caractérisées initialement comme des organites composés de plaques denses aux électrons, et associés aux membranes plasmiques de cellules adjacentes séparées de 10 à 50 nm. Ces plaques sont composées de nombreux filaments d'actine et l'espace intercellulaire est rempli de structures cylindriques dites en barreau, faisant un angle de 60° avec la membrane sous-jacente (**Figures 18b₁ et 19a**). Celles-ci pourraient refléter les structures moléculaires des protéines transmembranaires les composant (Miyaguchi, 2000). Autrement dit, les JAs sont des structures qui lient les membranes plasmiques et les cytosquelettes sous-jacents de deux cellules voisines, à des points de contact précis.

La bicouche lipidique de la membrane plasmique est fine et souple et ne pourrait transmettre seule les forces de tensions exercées sur les cellules pour les maintenir entre elles lors de la morphogénèse des tissus. L'ancrage des protéines transmembranaires adhésives aux filaments d'actine du cytosquelette qui produisent ces forces de tension, leur permet de former une structure stable, capable de supporter et propager des tensions mécaniques.

III.B.2. La présentation des acteurs moléculaires des jonctions adhérentes

Comme envisagé par l'ultrastructure, les JAs sont composées à l'échelle moléculaire de trois unités majeures :

- des **récepteurs transmembranaires** à l'origine de l'adhérence: les **cadhérines** et les **nectines**
- un **réseau de cytosquelette** auquel sont ancrés les récepteurs membranaires : l'**actine**
- des **adaptateurs** servant à relier les molécules adhésives au cytosquelette sous-jacent : les **caténines** s'associent avec les cadhérines et l'**afadine** avec les nectines.

Le complexe cadhérine/caténines est l'acteur majeur des jonctions adhérentes. Il constitue le sujet principal de ma thèse. *Son organisation est détaillée dans la partie III-C.*

III.B.3. Le complexe nectine/afadine :

Les nectines sont des molécules d'adhérence de la superfamille des **immunoglobulines transmembranaires** dont le fonctionnement ne requiert pas la présence de calcium. Il en existe de quatre sortes : les nectines 1 à 4. Elles forment des homodimères latéraux qui peuvent engager des interactions *en trans* avec les mêmes nectines (interaction homophile) ou avec des nectines différentes (interaction hétérophile), présentes sur la membrane adjacente. Le domaine cytoplasmique de la nectine inter-agit avec une protéine liant l'actine : l'afadine (AF6). Cette protéine constitue un autre moyen pour les JAs de se lier au cytosquelette d'actine (Niessen and Gottardi, 2008) (**Figure 18B**).

Les **astrocytes** expriment la nectine 1 et l'afadine (Lim et al., 2008). De plus, ils semblent former des contacts avec les axones via une protéine proche de la nectine, Nec11 (Nectin-like 1) qui établit des adhérences hétérophiles avec les nectines 1 et 3 (Kakunaga et al., 2005).

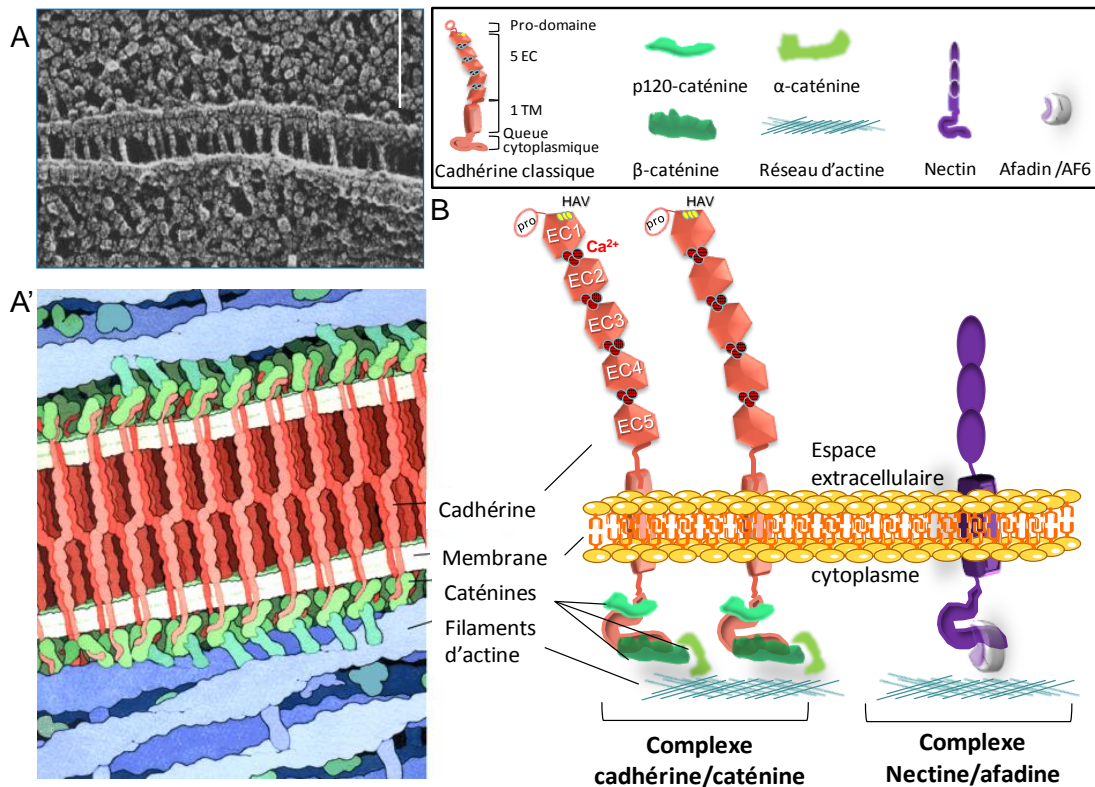


Figure 19 : Ultrastructure et composition moléculaire d'une jonction adhérente.

A) Image obtenue après cryodécoupage, montrant les structures membranaires en barreaux (« rod-like ») aux jonctions adhérentes entre deux cellules épithéliales. Il y aurait jusqu'à 700 barreaux inter-membranaires par μm^2 aux JAs (Miyaguchi, 2000) et chaque barreau contiendrait un monomère ou un dimère de cadhérine, ou des nectines. Barre d'échelle : 100nm. Extrait de (Hirokawa and Heuser, 1981)
A'. Diagramme représentant A). **B)** Schéma illustrant les composants des deux complexes moléculaires des JAs : le complexe cadhérine/caténines et le complexe nectine/afadine.

Source de A' : <http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/Cadherins/FUNCTION.html>

III.C. Les cadhérines des jonctions adhérentes

La superfamille des cadhérines contient plus de 100 membres chez les Vertébrés et différentes façons de les hiérarchiser existent (Hulpiau and van Roy, 2009). Globalement, elle se décompose en 5 sous-groupes : les **cadhérines classiques**, les cadhérines desmosomales, les protocadhérines, les cadhérines atypiques et les protéines de signalisation apparentées aux cadhérines (Takeichi, 2007). Ce sont toutes des **glycoprotéines transmembranaires** composées d'une extrémité N-terminal extracellulaire de taille variable contenant un **domaine EC** (Extracellular Cadherin repeat) répété de 1 à 34 fois. Ce domaine est responsable de la fonction adhésive des cadhérines et contient des séquences de liaison au **calcium** localisées à la frontière entre deux domaines EC. Un pro-domaine dans la partie la plus distale de la partie extracellulaire est clivé avant l'initiation de l'adhérence (Koch et al., 2004). Si les cadhérines ont des régions extracellulaires relativement conservées, leurs domaines intracellulaires divergent fortement. Cela expliquerait les rôles distincts qu'elles jouent dans le contrôle de certains processus cellulaires.

Dorénavant, j'utiliserai le terme cadhérine pour traiter des cadhérines classiques.

III.C.1. Les principales cadhérines classiques

Classification et appellation

Chez les Vertébrés, les cadhérines sont réparties en deux sous-groupes : les cadhérines de **type I** et les cadhérines de **type II**. Les cadhérines de type I regroupent la cadhérine épithéliale (E-cadhérine), la cadhérine neurale (N-cadhérine), la cadhérine musculaire (M-cadhérine), la cadhérine placentaire (P-cadhérine) et la cadhérine rétinale (R-cadhérine), dénommées ainsi d'après le tissu principal dans lequel elles ont été découvertes. Leur expression n'est pas systématiquement restreinte au tissu dont elles portent le nom. Certains types cellulaires comme les neurones expriment plusieurs cadhérines classiques de type I comme la N- et la R-cadhérine (Inuzuka et al., 1991). Les **cadhérines de type II** sont désignées par un nombre de 5 à 12, comme la cadhérine 5 aussi appelée VE-cadhérine (Vasculaire Endothéliale) (Ivanov et al., 2001). Ces deux types de cadhérines se distinguent les unes des autres par la présence, uniquement dans les cadhérines de type I, d'un tripeptide HAV (histidine, alanine, valine) dans le domaine EC1 le plus N-terminale de la partie extracellulaire (Gumbiner, 2005; Wheelock and Johnson, 2003).

Les cadhérines astrocytaires

Les astrocytes expriment majoritairement la N-cadhérine. Dans une moindre mesure les cadhérines 10 et 11 seraient également synthétisées, mais en moindre proportion (Cahoy et al., 2008). Cette dernière étude a également validé l'absence d'expression de la E-cadhérine par les cellules astrocytaires. Enfin, certains sous-types d'astrocytes exprimeraient la VE-cadhérine (Boda-Heggemann et al., 2009).

III.C.2. L'adhérence dépendante des cadhérines.

Une molécule de cadhérine adhère avec une autre molécule de cadhérine présente sur la membrane de la cellule adjacente via son domaine EC1 extracellulaire, **en présence de calcium** (Nose et al., 1990; Tamura et al., 1998). Les détails de cette liaison sont présentés dans la **Figure 20**.

A de rares exceptions près, leur **interaction** est de nature **homophilique**. En d'autre terme, la E-cadhérine formera des liaisons avec d'autres E-cadhérines et la N-cadhérine avec d'autres N-cadhérines. Une exception notable concerne l'observation d'une association hétérophilique entre la N- et la R-cadhérine (Shan et al., 2000). L'interaction homophilique entre cadhérines laisse penser qu'elles pourraient être à l'origine de la ségrégation des cellules en différents tissus donnés, pendant le développement embryonnaire (Takeichi, 1988).

D'autre part, même si cela reste encore un sujet de débat, il est maintenant accepté que l'adhérence intercellulaire est permise par **l'homodimérisation en cis des cadhérines** présentes sur chaque membrane des cellules adjacentes. Le recrutement progressif de ces *cis*-dimères aux zones de contacts constituerait l'élément initial primordial du renforcement de l'adhérence après contact (Leckband and Sivasankar, 2012; Troyanovsky et al., 2007). En effet, comme tout récepteur membranaire s'associant à une molécule ancrée à la surface d'une autre cellule, l'interaction des cadhérines en *trans* est de faible affinité. Afin de créer une interaction forte et durable, une grande quantité de cadhérines doivent se lier simultanément avec leurs ligands présents à la surface de la membrane plasmique adjacente (principe du Velcro®). L'interaction *en cis* des cadhérines permettrait ce phénomène.

Biochimie des contacts homophiliques *en trans* des cadhérines

Deux molécules de cadhérine à la surface de membranes plasmiques adjacentes interagissent *en trans* grâce au domaine EC le plus distal, le **domaine EC1** (Zhang et al., 2009). L'adhérence est **dépendante du calcium** qui, de part sa présence aux jonctions des différents domaines EC, permet de rigidifier la région extracellulaire et lui confère une courbure adéquate à l'interaction des deux domaines EC1 adjacents (Boggon et al., 2002). Ceux-ci s'associent alors via leur feuillet β le plus N-terminal qu'ils s'échangent entre eux : on parle du modèle de liaison par échange de feuillet ou **strand-swap binding model** (Brasch et al., 2012; Shapiro and Weis, 2009).

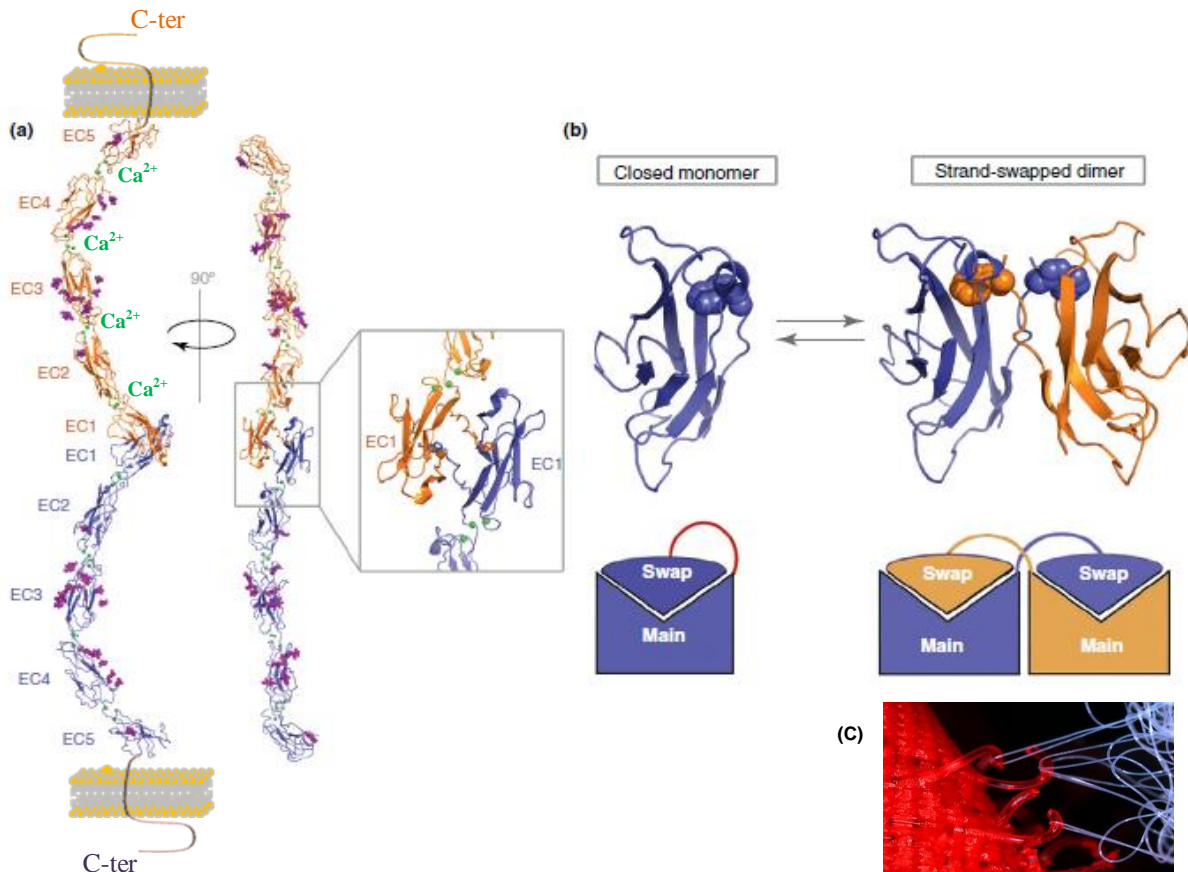


Figure 20 : Les cadhérines classiques forment des *trans*-dimères adhésifs via l'association de leur domaine EC1 respectif.

A) Représentation cristallographique d'un *trans*-dimère de cadhérine classique (P-cadhérine de xénope) selon deux axes orthogonaux. Seules les parties extracellulaires sont représentées sous la forme de diagramme en rubans. Chaque monomère adhésif (un bleu et un orange) est composé de cinq domaines EC, reliés par trois ions Ca²⁺ (sphères vertes). A noter la présence de régions hautement N-glycosylées en violet. **B)** Mécanisme adhésif des cadhérines classiques : un exemple du modèle d'échange de feuillet 3D (ou 3D domain swapping). Seul le domaine EC1 de chaque monomère est représenté. Le résidu hautement conservé responsable de l'adhérence, le tryptophane 2, est échangé entre les deux monomères permettant l'ancrage des deux molécules. **C)** Pour comparaison, représentation graphique de la surface d'un Velcro®, avec son modèle de boucle-crochet, semblable au modèle adhésif des cadhérines. Une multitude de cadhérines s'associant *en trans* simultanément permet *in fine* d'établir une adhérence forte à la manière d'un Velcro®, où le nombre d'interactions de faible affinité est crucial pour permettre l'adhérence. Adapté librement de (Brasch et al., 2012).

Après le contact des deux membranes plasmiques voisines, les cadhérines activent et recrutent aux jonctions adhérentes de nombreuses molécules qui, localement, réorganisent le cytosquelette d'actine. Cette restructuration du cytosquelette favorise l'extension de la zone de contact et le renforcement de l'adhérence entre les deux cellules. *Pour plus de détails concernant les acteurs moléculaires de la formation des JAs et leur régulation spatiotemporelle, se référer à (Etienne-Manneville, 2011; Harris and Tepass, 2010).*

III.C.3. Le domaine intracellulaire des cadhérines interagit avec les caténines

Afin de transmettre à l'ensemble de la cellule un signal d'adhérence, après l'engagement de son domaine extracellulaire avec une cadhérine adjacente, la cadhérine interagit avec les protéines cytoplasmiques appelées **caténines**, grâce à son domaine intracellulaire. Le nom de caténine provient du latin *catena* (**chaîne**) qui leur a été assigné en réponse à leur fonction de lien entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine. Ce terme est particulièrement bien choisi puisqu'il résume à lui seul la **dualité** de la fonction des caténines. Elles permettent à la fois l'ancrage, comme une chaîne attache un objet, des récepteurs d'adhésion aux structures solides de la cellule ; mais aussi, elles participent à la chaîne mise en place par la cellule pour récupérer des informations sur son environnement extérieur. En effet, bien plus qu'une simple fonction mécanique, les caténines jouent un rôle crucial de signalisation. D'un côté elles fournissent à la cellule la capacité de réguler les forces d'adhérence en fonction de la situation (rétrocontrôle des jonctions). De l'autre, elles lui permettent d'agir sur des processus cellulaires fondamentaux à sa survie (arrêt de la division cellulaire par exemple).en lui signalant la présence d'une cellule dans son voisinage

Pour résumer, les cadhérines classiques possèdent deux caractéristiques majeures :

- un domaine extracellulaire contenant 5 répétitions EC adhésives, pouvant être clivé.
- un domaine intracellulaire très court (150aa) et très conservé, contenant un site de liaison à la β -caténine et un autre à la p120-caténine (Tepass et al., 2000).

III.C.4. Les particularités de la N-cadhérine

Caractérisation et expression tissulaire de la N-cadhérine

La N-cadhérine a été identifiée en 1982 comme étant une protéine de 130kd, présente dans la rétine du poussin (Grunwald et al., 1982). Le gène de la N-cadhérine humaine contient 16 exons et se situe sur le chromosome 18. Son promoteur ne contient aucune séquence CATT ou TATA mais une séquence de liaison au facteur de transcription NF κ B dont l'activation régule la transcription de la N-cadhérine (Kuphal and Bosserhoff, 2006). Pour l'instant un seul variant de cette protéine a été identifié chez l'homme, même si un épissage alternatif mutuellement exclusif des exons 7, 13 et 18 génère entre 8 et 12 isoformes chez les insectes. Ces isoformes auraient des fonctions redondantes (Hsu et al., 2009; Nern et al., 2005; Ting et al., 2005). Très vite, on a relevé la localisation et le rôle de la N-cadhérine crucial dans l'établissement de contacts intercellulaires (Takeichi et al., 1988; Volk and Geiger, 1984).

La N-cadhérine est exprimée essentiellement dans les tissus nerveux, cardiaque, musculaire squelettique, osseux, adipeux et conjonctif, où elle est à l'origine de jonctions adhérentes **plus petites**, comme celles permettant la formation des synapses (Uchida et al., 1996) ou celles liant les fibroblastes entre eux (Beertsen and Everts, 1980). Ces structures présentant la plupart des caractéristiques des JAs sont appelées **puncta adherentia**. De manière intéressante, dans les fibroblastes, la N-cadhérine forme des jonctions adhérentes à proximité

des jonctions communicantes (El Sayegh et al., 2007). L'observation de l'interdépendance de la stabilité de la N-cadhérine avec celle de la connexine 43 dans les fibroblastes et les cardiomyocytes renforce l'idée que la formation des contacts dépendants de la N-cadhérine est intimement liée avec celle des jonctions communicantes (Hertig et al., 1996; Wei et al., 2005).

La N-cadhérine pendant le développement

Brièvement, les souris KO-Ncad meurent au dixième jour du développement embryonnaire (Radice et al., 1997). La N-cadhérine est essentielle pendant le développement pour la formation du tube cardiaque, la neurulation, la somitogénèse et la maturation des synapses (Arikath and Reichardt, 2008; Radice et al., 1997). Le remodelage du tissu connectif et la cicatrisation requièrent également l'expression de la N-cadhérine (Gabbiani, 1981; Ko et al., 2001). *Pour plus de détails sur la N-cadhérine, se référer à (Derycke and Bracke, 2004).*

Quelques points de comparaison entre la E- et la N-cadhérine

La **synthèse** des deux cadhérines diffère. Contrairement à la E-cadhérine, les précurseurs de la N-cadhérine s'associent très tôt avec les principales caténines du complexe lors de leur biosynthèse. La p120ctn est la première molécule à se lier à la pro-N-cadhérine puis, en réaction à la phosphorylation du domaine cytoplasmique de la cadhérine (sans doute via la caséine kinase II), la β -caténine interagit avec la pro-N-cadhérine et assure l'association avec l' α -caténine (Wahl et al., 2003). Cette dernière interaction est nécessaire au transport de la pro-N-cadhérine à la membrane plasmique où le pro-domaine est clivé par la furine, avant l'engagement de la N-cadhérine dans les JAs (El Sayegh et al., 2007).

Malgré une cinétique d'interaction *en trans* similaire, la E- et la N-cadhérine génèrent des **forces d'adhérence différentes**. Grâce à l'utilisation de la technique des micropipettes dans laquelle deux cellules sont maintenues accolées par une légère aspiration, il a été montré que la force requise pour séparer les deux cellules était beaucoup plus importante (entre 2,5 et 5 fois plus) lorsque les cellules expriment la E-cadhérine plutôt que la N-cadhérine (Chu et al., 2006; Chu et al., 2004) (**Figure 21**). La N-cadhérine semble donc moins adhésive que la E-cadhérine. Cette moindre adhérence pourrait être expliquée par une organisation différente du cytosquelette d'actine sous-jacent. En effet, contrairement aux JAs des cellules épithéliales, les JAs dépendantes de la N-cadhérine des fibroblastes ne sont pas renforcées par la présence d'une ceinture sous-membranaire de filaments d'actine radiaux (Gloushankova et al., 1998; Yonemura et al., 1995).

D'autre part, la N-cadhérine et la E-cadhérine peuvent recruter aux JAs différents partenaires moléculaires qui modulent les forces d'adhérence de ces deux types de JAs. Par exemple, elles **s'associent avec des isoformes de p120ctn différentes**. Une étude dans des cellules de cancer du pancréas montre que la E-cadhérine interagit avec une isoforme courte et non phosphorylée sur ses résidus tyrosine tandis que la N-cadhérine s'associe préférentiellement avec une isoforme longue, hautement phosphorylée (Seidel et al., 2004). Or l'état de phosphorylation de la p120ctn régule la force d'adhérence des cadhérines (Anastasiadis and Reynolds, 2000).

La E- et la N-cadhérine sont également **impliquées différemment dans la progression métastatique** et la croissance tumorale. *Cette différence est développée plus loin. (Voir IV-B-2)*

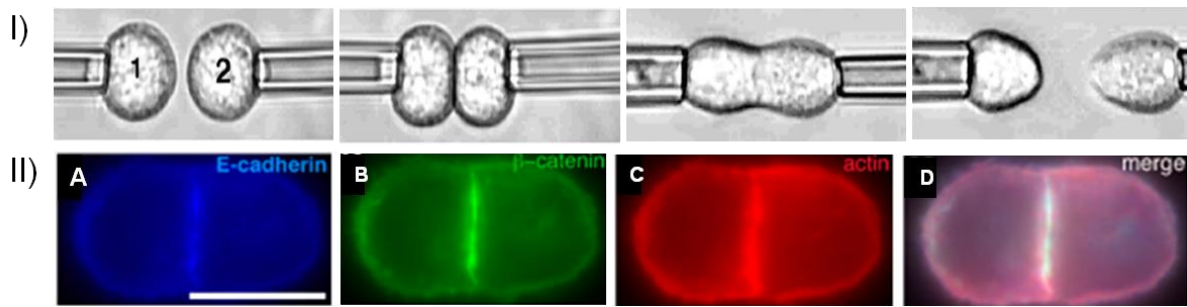


Figure 21 : Mesure des forces d'adhérence médiées par les cadhérines

I) Deux cellules peu adhérentes en culture sont transfectées avec différentes cadhérines et maintenues en contact au bout d'une micropipette. Une aspiration de plus en plus forte sépare les deux cellules. Cette force de séparation (SF) est alors mesurée pour chacune des cadhérines transfectées. **II)** Immunofluorescence montrant que les cellules en contact forment de véritables JAs. Noter ici le co-marquage de la E-cadhérine (bleu), la β -caténine (vert) et l'actine (rouge). Adaptée de (Chu et al, 2004). Barre d'échelle :10 μ m.

III.C.5. Le processus de « shedding » ou protéolyse de la partie extracellulaire

Comme 2 à 4% des protéines membranaires, les cadhérines subissent dans certaines conditions une **protéolyse de leur domaine extracellulaire**. Le fragment libéré dans le milieu extracellulaire module l'activité des cadhérines entières soit de manière paracrine/autocrine en diffusant librement dans l'espace extracellulaire, soit en s'accrochant aux protéines de la matrice et en servant de point d'ancrage pour les cadhérines non clivées à la surface des cellules (De Wever et al., 2007). La protéolyse est réalisée par les familles de métalloprotéases ADAM et MMPs (Noe et al., 2001; Seals and Courtneidge, 2003).

Le clivage de la E-cadhérine libère un fragment de 80kd (sE-cad) qui inhibe l'agrégation des cellules épithéliales et accroît leur prolifération et leur invasion (Damsky et al., 1983; Noe et al., 2001; Wheelock et al., 1987). La protéolyse de la N-cadhérine est spécifiquement réalisée par ADAM10 et libère un fragment de 90kd (sN-cad) qui, en se retrouvant piégé dans la matrice extracellulaire, conserve ses fonctions biologiques et promeut l'adhérence des cellules neuronales et la croissance de leur neurites (Paradies and Grunwald, 1993; Reiss et al., 2005; Utton et al., 2001). Une autre étude plus récente indique cependant que le clivage de la N-cadhérine aurait les mêmes conséquences que celui de la E-cadhérine. En empêchant l'arrivée à la membrane d'ADAM10, l'inhibition du clivage de la N-cadhérine favorise l'adhérence intercellulaire et inhibe la migration des cellules épithéliales (Linford et al., 2012). Ces différences pourraient néanmoins s'expliquer par le rôle différent joué par la N-cadhérine dans l'adhérence et la migration des neurones et des cellules épithéliales (*voir partie IV-A*).

Outre la partie extracellulaire clivée, le reste de la protéine agit également sur certains processus cellulaires. En effet, le fragment intramembranaire de la cadhérine restant devient le substrat d'une protéolyse régulée par la prénésiline/ γ -secrétase. La partie C-terminale intracellulaire ainsi libérée est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes, via son association avec le co-activateur de la transcription CBP (Marambaud et al., 2003).

III.D. Les caténines des jonctions d'adhérence

Il existe trois grandes familles de caténines:

- la sous-famille de **β -caténine**
- la sous-famille de l' **α -caténine**. Essentiels, ses composants ne s'associent pas directement aux cadhérines mais lient la β -caténine.
- la sous-famille de **p120-caténine** que je détaillerai plus particulièrement, ayant travaillé pendant ma thèse sur le rôle et la régulation de la p120ctn pendant la migration cellulaire.

Les plakophilines font aussi partie des caténines, mais elles n'interagissent qu'avec les cadhérines desmosomales et ne seront pas traitées ici (McCrea and Gu, 2010).

III.D.1. La sous-famille de la β -caténine

Hormis la β -caténine, cette sous-famille comprend la **plakoglobine** ou **γ -caténine**, un homologue très proche de la β -caténine, principalement enrichie aux desmosomes mais pouvant se trouver parfois aux jonctions adhérentes. Les astrocytes expriment principalement la β -caténine mais également la plakoglobine, en moindre quantité (Boda-Heggemann et al., 2009).

La β -caténine est une protéine cytoplasmique très conservée qui, contrairement aux cadhérines ou aux α -caténines, n'est présente qu'en un seul exemplaire chez les Vertébrés et les insectes. Elle n'a pas d'isoforme spécifique à certains tissus. Elle est composée d'une région centrale contenant 12 **répétitions armadillo** (arm-repeat) qui sont des structures en super-hélice dédiées aux interactions protéine-protéine. Hormis les α -caténines, toutes les autres caténines possèdent au moins une répétition armadillo (McCrea and Gu, 2010). Ces 12 répétitions armadillo permettent à la β -caténine de se lier à la partie C-terminale intracellulaire des cadhérines, au niveau de leur **domaine de liaison aux caténines** (Catenin Binding Domain). Cette interaction semble être un pré-requis indispensable à l'adhérence.

En effet, des études menées sur la E-cadhérine ont montré que la région intracellulaire des cadhérines est complètement déstructurée en absence de liaison avec la β -caténine (Huber et al., 2001). La cadhérine nouvellement synthétisée dans le cytoplasme a besoin d'être associée à la β -caténine pour être transportée jusqu'à la membrane plasmique (Chen et al., 1999). De plus, l'altération de leur liaison induit la destruction protéosomique de la cadhérine (Chen et al., 1999; Hinck et al., 1994). Aussi la β -caténine joue-t-elle un rôle important dans la **stabilité des cadhérines**.

Aux JAs, la β -caténine sert de lien entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine via son **association avec l' α -caténine** (Aberle et al., 1994; Jou et al., 1995).

La β -caténine est également un acteur majeur de la voie de signalisation **Wnt**. Elle s'associe avec les composants majeurs de la voie, TCF/LEF, APC et **GSK-3 β** , via sa région centrale. En absence de Wnt, un complexe Axine/APC/GSK-3 β interagit avec la β -caténine. Stabilisée par les autres membres du complexe, GSK-3 β phosphoryle la β -caténine dans sa partie N-terminale. La β -caténine phosphorylée est reconnue par une ubiquitine ligase E3 et dégradée par le protéosome. En présence de Wnt, la phosphorylation de la β -caténine est inhibée et la protéine est stabilisée. En plus de sa présence à la membrane plasmique au niveau des JAs, la β -caténine est alors capable de pénétrer dans le **noyau** et d'interagir avec des facteurs de transcription (TCF/LEF, BCL9-2) pour réguler l'expression de différents gènes cibles (Zhang et al., 2012). En fonction du contexte cellulaire (contact cellule-cellule ou activation de la voie Wnt), la β -caténine est davantage impliquée dans le contrôle de l'adhérence ou dans la régulation de la transcription (Harris and Peifer, 2005).

L'altération de la signalisation Wnt/ β -caténine constitue un facteur crucial dans le développement des cancers (Schepeler et al., 2011), y compris dans la progression des gliomes (Zhang et al., 2012).

III.D.2. La sous-famille de l' α -caténine

Chez les mammifères, l' α -caténine existe sous trois formes aux séquences primaires très similaires : l' α E-caténine (Epithéliale), l' α N-caténine (Neuronale), et l' α T-caténine (Testis et tissu cardiaque). La sous-famille des caténines contient aussi l' α -catuline, une protéine voisine. L' α E- et l' α N-caténine sont co-exprimées dans de nombreux tissus, dont les **astrocytes**, souvent à des stades développementaux différents (Shapiro and Weis, 2009). La majorité des connaissances sur l' α -caténine provient de l'étude de l' α E-caténine.

L' α -caténine lie la cadhérine au cytosquelette d'actine

L' α -caténine ne possède pas de répétition armadillo et n'interagit donc pas directement avec les cadhérines. Elle est associée aux JAs grâce à sa partie **N-terminale** qui se lie avec la **β -caténine**. La présence d'un site de **liaison à l'actine** dans sa partie **C-terminale** en a fait une protéine clé dans l'ancrage des JAs au cytosquelette. En effet, les domaines de liaison à la β -caténine et à l'actine se trouvant aux deux extrémités de la protéine, elle répond parfaitement aux critères d'adaptateur assurant le lien entre les récepteurs d'adhérence membranaires et le cytosquelette sous-jacent (**Figure 22**). De plus, l' α -caténine est un homologue de la vinculine, protéine qui joue ce rôle d'ancrage dans l'association des intégrines au cytosquelette d'actine, lors de la maturation des points focaux d'adhérence (Kobielak and Fuchs, 2004). L' α -caténine se lie directement avec la F-actine *in vitro* (Rimm et al., 1995), et joue un rôle crucial dans la polymérisation de l'actine au voisinage ou directement aux JAs, *in vivo* (Cavey et al., 2008; Vasioukhin et al., 2000). En outre, l'expression d'une protéine chimère constituée de l'E-cadhérine privée de son domaine C-terminale fusionnée directement à l' α -caténine dans des cellules aux jonctions altérées, permet de restaurer l'adhérence intercellulaire (Sako et al., 1998; Watabe et al., 1994). Pendant des années, l' α -caténine a donc été perçue comme la **protéine reliant directement le complexe cadhérine/ β -caténine au cytosquelette**.

Vers un nouveau modèle d'association de l' α -caténine avec l'actine

Le rôle de l' α -caténine dans la liaison des JAs au cytosquelette d'actine a été précisé ces dernières années. L' α E-catenin **s'associe à l'actine** préférentiellement lorsqu'elle est **homodimérisée**. Or, son domaine d'homodimérisation est confondu en partie avec son domaine d'interaction à la β -caténine (**Figure 22**). L' α E-caténine ne serait donc **pas** capable de s'associer **en même temps** à l'actine et à la **β -caténine**. Cette hypothèse est confortée par l'observation dans deux laboratoires distincts qu'*in vitro*, la β -caténine inhibe la liaison de l' α -caténine à l'actine (Abe and Takeichi, 2008; Yamada et al., 2005). De plus, malgré différentes approches, jamais les quatre protéines (cadhérine, β -caténine, α -caténine et actine) n'ont été observées formant un complexe quaternaire (Yamada et al., 2005). Cependant, des études récentes ont montré que l' α -caténine serait impliquée dans la traduction des stimuli mécaniques en signaux chimiques grâce à un changement de conformation induit par la tension (Yonemura et al., 2010). Ce changement de conformation pourrait lui permettre, à ce moment là, de se lier à la fois à la β -caténine et à l'actine.

Un autre modèle a néanmoins émergé mettant en évidence un ancrage instable du complexe cadhérine/caténines au cytosquelette. L'agrégation en *cis* des cadhérines associées à la β -caténine favorise le recrutement d'une grande quantité d' α -caténine. L'augmentation de sa concentration locale qui en résulte provoque une réorganisation conformationnelle du réseau d'actine qui ancre plus fortement le complexe cadhérine/caténines (Drees et al., 2005). Brièvement, au stade initial de la formation des JAs, au moment où les membranes plasmiques entrent en contact, les filaments d'actine aux JAs sont essentiellement perpendiculaires à la

membrane. L'augmentation de la concentration en α -caténine aux JAs favorise sa dimérisation et les dimères d' α -caténine entrent en compétition pour la liaison à l'actine avec le nucléateur de filaments d'actines branchés Arp2/3. L' α -caténine réduit ainsi le nombre de filaments d'actine branchés perpendiculaires à la membrane et favorise l'organisation du réseau d'actine en filaments parallèles. Cette dernière organisation est indispensable à l'extension de la zone de contact et au renforcement des jonctions.

Alternativement, des molécules intermédiaires pourraient faire le lien entre l' α -caténine et l'actine puisque l' α -caténine peut se lier à de nombreuses protéines interagissant avec l'actine : vinculine, afadin, α -actinin, ZO-1, formin-1, EPLIN (Kobiela and Fuchs, 2004; Maiden and Hardin, 2012).

Pour résumer, quelque soit son type d'interaction avec le cytosquelette d'actine (direct ou indirect, transitoire ou stable), l' α -caténine est indispensable à l'adhérence dépendante des cadhérines. Sans α -caténine, les JAs sont altérées et la connexion du complexe cadhérine/ β -caténine avec le cytosquelette perdue (Hirano et al., 1992; Vasioukhin et al., 2001).

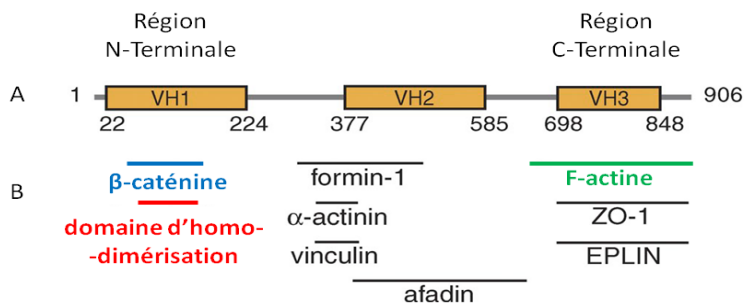


Figure 22 : Principales caractéristiques moléculaires de l' α -caténine.

A) Structure primaire de l' α -caténine comportant 3 domaines d'homologie à la vinculine (VH1-3). **B)** Principales protéines interagissant avec l' α -caténine et leur domaine de liaison. On notera l'emplacement des sites de liaison à la β -caténine et à la F-actine à chaque extrémité de la protéine lui conférant la capacité d'ancrer les JAs au cytosquelette sous-jacent. D'autre part le chevauchement entre le domaine d'homodimérisation de l' α -caténine et le site d'interaction avec la β -caténine empêcherait la liaison à l'actine puisqu'elle se fait préférentiellement par des dimères d' α -caténine.

Contrairement aux autres caténines détaillées ici, l' α -caténine ne semble pas être capable de pénétrer dans le noyau des cellules saines. Elle a néanmoins été détectée dans le noyau de cellules du cancer colorectal où elle inhiberait le signal de transcription générée par la β -caténine (Giannini et al., 2000).

III.D.3. La sous-famille de la p120-caténine

L'interaction de p120-caténine avec les cadhérines

Hormis la p120caténine (p120ctn), la sous-famille contient essentiellement trois autres membres : **p0071/PKP4**, **ARVCF** et **δ 2-caténine/NPRAP**, qui partagent quasiment la même structure et les mêmes modes de liaison aux cadhérines que la p120ctn. Ces trois protéines semblent jouer des rôles similaires dans le contrôle de l'adhérence cellulaire (Hatzfeld, 2005). Cela dit, la redondance de ces gènes avec la p120ctn est loin d'être totale puisqu'une souris n'exprimant pas de p120ctn (KO p120ctn) meurt pendant le développement embryonnaire, malgré la présence de ces trois protéines homologues (Reynolds and Roczniak-Ferguson,

2004). On notera que ces trois protéines disposent d'un motif de liaison PDZ dans leur partie C-terminale dont ne dispose pas p120ctn et qui leur conférerait des rôles additionnels potentiels dans la régulation de la polarité cellulaire par exemple (Hatzfeld, 2005). Hormis la p120ctn, les **astrocytes** expriment p0071/PKP4 mais pas NPRAP (Thomsen and Lade Nielsen, 2011; Wang et al., 2011).

La p120ctn est une protéine contenant une région centrale riche de neuf répétitions armadillo qui lui permet de se lier aux cadhérines au niveau de leur **domaine juxtamembranaire** (acides aminés 747 à 799, pour la N-cadhérine humaine). Ce domaine juxtamembranaire est différent du site de la cadhérine avec lequel interagit la β -caténine (Daniel and Reynolds, 1995; Ishiyama et al., 2010; Ohkubo and Ozawa, 1999). Aussi la p120ctn et la β -caténine peuvent-elles s'associer simultanément avec les cadhérines. C'est une observation surprenante tant la région cytoplasmique des cadhérines est courte et n'était pas supposer pouvoir supporter la présence simultanée de deux protéines faisant plus de dix fois sa taille (**Figure 23c**).

L'obtention récente d'un cristal de la p120ctn interagissant avec une cadhérine a permis de définir précisément la façon dont ces deux caténines se lient ensemble aux cadhérines. L'architecture tridimensionnelle de ces interactions a montré qu'une fois en place, la région cytoplasmique des cadhérines est quasi-complètement imperméable à l'association avec d'autres molécules (Ishiyama et al., 2010). Cette étude envisage aussi la possibilité que la p120ctn puisse s'associer avec la cadhérine de manière **dynamique** ou **statique** selon les besoins. Les séquences de la p120ctn impliquées dans ces interactions sont très conservées parmi les membres de la sous-famille de p120ctn (Ishiyama et al., 2010).

En empêchant l'internalisation de la cadhérine, la p120ctn joue un rôle de **régulateur majeur de la stabilité des cadhérines à la membrane plasmique** (*se référer à la partie III-E-2 pour les détails du mécanisme en jeu*). Grâce à des études récentes, on sait que p120ctn interagit aussi avec d'autres régulateurs du turnover des cadhérines comme Numb (Sato et al., 2011) afin sans doute de coordonner leurs actions.

Les différentes isoformes et modifications post-traductionnelles de la p120ctn

La p120ctn existe sous de nombreuses formes phosphorylées ou tronquées par épissage alternatif, reflétant un rôle crucial qui nécessite une régulation très fine de sa fonction (**Figure 23a**). En effet, la présence de quatre codons ATG dans la partie N-terminale de la protéine permet l'expression de **quatre isoformes (p120ctn 1 à 4)** (Keirsebilck et al., 1998; Reynolds et al., 1994). P120ctn-1 est la forme la plus longue tandis que p120ctn-4 est l'isoforme la plus courte. La présence d'une isoforme plutôt qu'une autre est dépendante du type cellulaire et permet l'interaction avec différents partenaires modulant sa fonction. Par exemple, les cellules motiles exprimeront davantage l'isoforme p120ctn-1 tandis que les cellules immobiles exprimeront l'isoforme p120ctn-3 (Slorach et al., 2011). Un autre épissage alternatif peut avoir lieu dans la partie C-terminale via l'expression d'un exon A, B, ou C (Anastasiadis and Reynolds, 2000).

D'autre part, p120ctn est une protéine **hautement phosphorylée** qui a été initialement découverte en tant que substrat de la protéine kinase Src (Mariner et al., 2001; Reynolds et al., 1989). Elle interagit dans sa région N-terminale avec de nombreuses autres tyrosine-kinases comme Fer, Fyn, Yes et les tyrosine-phosphatases PTPs et SHP. Elle apparaît également phosphorylée sur des résidus sérine et thréonine (Alema and Salvatore, 2007). Cette région spécifique très phosphorylée est appelée domaine de phosphorylation ou domaine régulateur (**Figure 23a**).

Ses multiples transformations post-traductionnelles semblent être à l'origine de la dualité du rôle joué par la p120ctn sur l'adhérence. En stabilisant les cadhérines à la membrane

plasmique (Thoreson et al., 2000), en favorisant leur homodimérisation en *cis* (Yap et al., 1998) et en régulant l'assemblage du réseau d'actine, elle semble avoir un **effet positif** sur l'adhérence. Cependant, dans certaines conditions d'hyperphosphorylation elle aurait un **effet négatif** sur la stabilisation des JAs (Aono et al., 1999; Ohkubo and Ozawa, 1999). *Le rôle de la p120ctn dans la dynamique des JAs est développé plus en détails dans la partie III-E-2.*

Les principaux partenaires de p120ctn

Au contraire de l' α -caténine qui agit directement avec l'actine, **p120ctn affecte indirectement les propriétés du cytosquelette d'actine** via sa capacité à réguler les petites GTPases. Notamment, la p120ctn **cytosolique** s'associe directement avec **RhoA**, dont elle inhibe l'activité (Anastasiadis et al., 2000) et activerait Cdc42 et Rac1 via son association avec leur GEF (Guanine exchange factor, activateur de RhoGTPase) **Vav2** (Noren et al., 2000). En outre, son interaction parallèle avec les cadhérines lui permettrait de localiser son activité régulatrice des GTPases au voisinage des JAs pour y réguler l'organisation du cytosquelette d'actine et contrôler ainsi les forces d'adhérence (Anastasiadis, 2007).

P120ctn interagit aussi indirectement avec le cytosquelette de **microtubules** via la protéine se liant à leur extrémité (-) PLEKHA7 (Meng et al., 2008) ou via la kinésine (Chen et al., 2003).

Enfin, tout comme la β -caténine, la p120ctn peut pénétrer dans le **noyau** et interagir avec le facteur de transcription Kaiso pour réguler l'expression de gènes cibles, dont le gène codant pour la E-cadhérine (Daniel, 2007). En s'associant avec Kaiso, la p120ctn empêche l'interaction du facteur de transcription avec différentes séquences d'ADN promotrices et lève la répression transcriptionnelle médiée par Kaiso (Kim et al., 2004; Prokhortchouk et al., 2001).

D'autre part, la p120ctn pourrait réguler le niveau global d'expression des cadhérines grâce à la régulation de leur transcription. En effet, l'ablation de la p120ctn dans l'épiderme conduit à une hyperactivation de NF κ B (Perez-Moreno et al., 2006) qui, compte tenu de son rôle de facteur de transcription de la N-cadhérine, pourrait activer son expression.

Pour résumer, la p120ctn possède deux rôles majeurs :

- la régulation de l'adhésion dépendante des cadhérines
- la régulation du cytosquelette d'actine via son contrôle des petites GTPases.

III.E. La dynamique des contacts dépendants des cadhérines est un processus orchestré par les caténines.

Les JAs sont ancrées de manière stable au cytosquelette d'actine sous-jacent, mais la formation des JAs est un processus éminemment dynamique. Plusieurs étapes finement régulées se succèdent, pour permettre à tout moment l'arrêt du processus et le retour à la situation initiale. D'autre part, l'interaction entre deux molécules de cadhérine est par nature faible ; l'adhérence des deux membranes plasmiques adjacentes se faisant par le recrutement d'un grand nombre de molécules. Cette caractéristique est fondamentale puisque si l'interaction était plus forte, les cellules en contact resteraient vraisemblablement collées les unes aux autres et incapables de bouger les unes par rapport aux autres.

Afin de permettre les mouvements cellulaires tout en maintenant la cohésion du tissu, les jonctions adhérentes doivent être capables de répondre rapidement aux stimuli externes pour

moduler ces deux actions a priori antinomiques. La **mobilité des cadhérines au sein de la membrane** ainsi que la **régulation de leur endocytose** par un réseau dense de partenaires cytoplasmiques leur confèrent cette capacité.

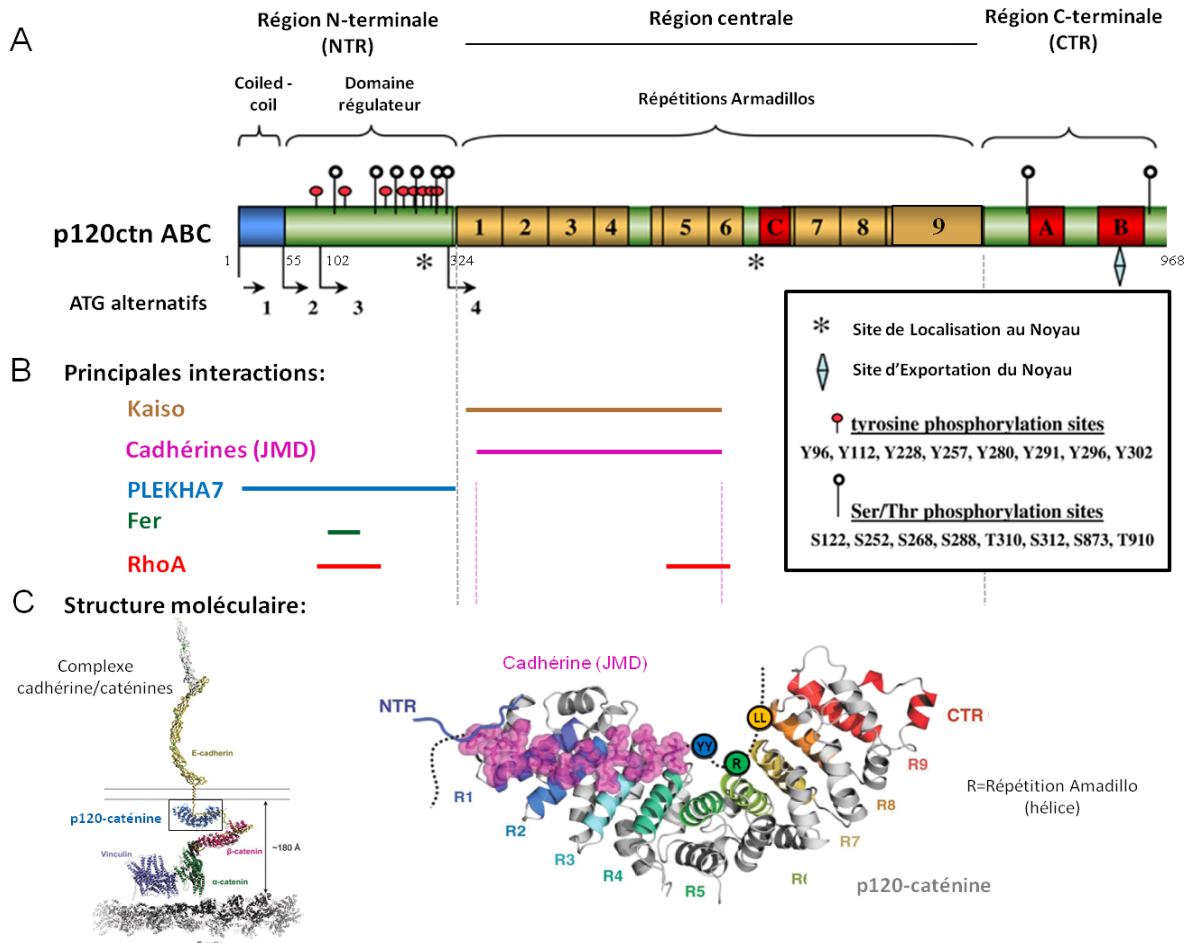


Figure 23 : Principales caractéristiques moléculaires de la p120ctn

A. Structure primaire de p120ctn. La protéine est formée d'une région N-terminale composée d'un domaine d'interaction protéique coiled-coil et d'un domaine régulateur hautement phosphorylé (15 résidus tyrosines, sérines et thréonine peuvent y être phosphorylés), d'une région centrale comprenant 9 répétitions armadillo et d'une région C-terminale. 4 codons ATG dans sa partie N-terminale permettent l'expression de 4 isoformes distinctes (possédant ou non le domaine régulateur par exemple) : p120ctn 1 à 4. Les exons A, B et C sont épissés de manière alternative générant différentes isoformes. Des sites de localisation (astérisque) et d'exportation (losange) du noyau lui confèrent un rôle sur le profil d'expression de gènes cibles via son interaction avec un facteur de transcription, Kaiso. **B.** Partenaires notoires de p120ctn. Elle interagit avec Kaiso et les cadhérines au niveau des 5 premières répétitions armadillo, avec PLEKHA7 dans sa partie N-terminale, tout comme la tyrosine kinase Fer. Sa liaison avec la petite GTPase RhoA se fait grâce à deux séquences de la région N-terminale et centrale se repliant pour englober RhoA. **C.** Structure tertiaire de la région centrale de p120 interagissant avec le JMD des cadhérines. Adaptée de (Ishiyama and Ikura, 2012; Ishiyama et al., 2010) et (Reynolds and Rocznik-Ferguson, 2004).

III.E.1. Etude de la dynamique des cadhérines: diffusion, recyclage et dégradation.

La diffusion

Le mécanisme exact contrôlant la durée de vie et le devenir des cadhérines à la membrane est encore sujet à controverse. Tout d'abord, l'utilisation de billes recouvertes d'une protéine chimère Ncad-Fc (=partie extracellulaire adhésive de la N-cadhérine + fraction cristallisable des anticorps IgG) et maintenues au contact de myoblastes en culture par une pince optique, a permis de mettre en évidence qu'au **stade initial du contact**, la N-cadhérine **diffuse librement** dans la membrane plasmique (Lambert et al., 2002). De plus, des études plus récentes de FRAP ont montré qu'une partie des cadhérines des JAs, même matures, diffusent dans la membrane (Cavey et al., 2008). Cela dit, elles diffuseraient moins rapidement qu'une molécule totalement libre de se mouvoir dans la bicouche lipidique (Canel et al., 2010). Les monomères non engagés d'E-cadhérine diffusent davantage que les homodimères engagés. Ces-derniers sont en effet ancrés à un réseau d'actine certes dynamique, mais limitant le mouvement latéral des complexes adhésifs (Cavey et al., 2008).

Il convient de distinguer **deux types d'ancrage des JAs au cytosquelette** : un premier correspond à l'ancrage des points de contact ou petits agrégats de cadhérine à un réseau d'actine stable sous-jacent. Ces points de contact peuvent être **très mobiles**, surtout lors de la migration de deux cellules épithéliales en contact l'une de l'autre ou lors de leur recrutement vers la *zonula adhérens* (Kametani and Takeichi, 2007). Un deuxième type d'interaction avec l'actine est requis pour stabiliser les adhérences. Dans les tissus épithéliaux embryonnaires de la drosophile, cette interaction dépendant de l' α -caténine et permet de **limiter les mouvements des cadhérines dans la membrane** (Cavey et al., 2008).

En outre, l'étude du comportement de la E-cadhérine dans des cellules épithéliales *in vitro* et dans ces mêmes cellules greffées sous la peau de souris immunodéprimées, *in vivo*, montre que la dynamique des cadhérines est plus importante *in vivo* qu'*in vitro* (Serrels et al., 2009).

Le renouvellement et le recyclage des cadhérines à la membrane

Hormis la diffusion des cadhérines au sein de la membrane plasmique, la dynamique des JAs est assurée par un **renouvellement constant** des cadhérines et leur **recyclage** à la membrane plasmique (de Beco et al., 2009). Endocytées en permanence, les cadhérines sont soit recyclées à la membrane plasmique, soit dégradées. Le devenir des molécules internalisées est finement régulé afin de maintenir un niveau de cadhérine à la membrane plasmique en adéquation avec les besoins de la cellule (*se reporter aux parties III-E-2 et III-E-3 pour plus de détails concernant les mécanismes moléculaires précis en jeu*). Cependant, une étude plus récente montre que l'inhibition de l'endocytose n'empêche pas totalement le renouvellement des jonctions épithéliales ; laissant penser qu'un autre mécanisme consommant de l'énergie (dépendant de l'ATP) pourrait être en jeu (Hong et al., 2010).

- Les acteurs de l'endocytose des cadhérines

L'analyse *in vitro* et *in vivo* du renouvellement de l'E-cadhérine dans des cellules épithéliales ayant établi des jonctions stables et matures, permet de montrer que leur internalisation est dépendante de la **clathrine** (Le et al., 1999), de la **dynamine** et de l'**actine** (Georgiou et al., 2008; Kaksonen et al., 2006; Leibfried et al., 2008), de **Rab 5** (Le et al., 1999; Ulrich and Heisenberg, 2008) et d'**Arf6** (Palacios et al., 2001). Arf6 promeut l'endocytose dépendante de la dynamine en recrutant aux jonctions nm23H1, une kinase des nucléotides di-

phosphates qui pourrait fournir les GTP nécessaires à l'activité de la dynamine (Palacios et al., 2002). La régulation de l'endocytose de la E-cadhérine par les petites protéines G de la famille des Rabs semble conservée chez la N-cadhérine puisque la suppression de Rab5 et de Rab 6 augmente le pool de N-cadhérine à la membrane plasmique des neurones (Kawauchi et al., 2010; Tong et al., 2011) ((**Figure 24-4**)).

D'autres mécanismes d'endocytose des cadhérines indépendants de la clathrine, faisant intervenir les caveolae, la macropinocytose et les « rafts lipidiques » existent également dans certains types cellulaires (Delva and Kowalczyk, 2009; Lu et al., 2003). Le mode d'endocytose des cadhérines dépendrait de l'environnement cellulaire et en particulier de la présence ou non de facteurs de croissance dans le milieu (Delva and Kowalczyk, 2009).

- Le recyclage des cadhérines endocytées

Une fois endocytées, les cadhérines sont soit dégradées (*voir paragraphe suivant*), soit recyclées à la membrane plasmique. Ce **recyclage** dépend des Rabs, qui assurent le transit des vésicules endocytées destinées à retourner à la membrane, vers les compartiments cellulaires liés au recyclage (*endocytic recycling compartments*). Les E- et N-cadhérines ont été localisées dans ces compartiments enrichis en Rab 11 (Kawauchi et al., 2010; Langevin et al., 2005; Lock and Stow, 2005) et la suppression de Rab 11 perturbe dramatiquement le transport de la N-cadhérine à la membrane (Kawauchi et al., 2010). La redirection à la membrane des cadhérines endocytées est également permise par la nexine de triage SNX1 (Bryant et al., 2007) (**Figure 24-6**).

Enfin, le recyclage des cadhérines dépend de l'exocyste et plus particulièrement de trois des composants de ce complexe (Sec5, Sec6 et Sec15) qui, en interagissant avec les caténines, dirige le trafic vésiculaire des cadhérines vers les jonctions (Langevin et al., 2005).

- Le trafic des cadhérines

Les microtubules influencent le **transport** des protéines des JAs dans le cytoplasme. La N-cadhérine cytoplasmique est présente dans des vésicules associées aux microtubules et transportées grâce au moteur moléculaire kinésine-1 (Mary et al., 2002) (**Figure 24-1**). De plus, l'intégrité des JAs est perturbée par des agents moléculaires qui altèrent la dynamique des extrémités « plus » sans désassembler le réseau de microtubules. Cependant cette inhibition de la dynamique des bouts « plus » ne change pas le niveau de la E-cadhérine à la membrane plasmique, suggérant que les microtubules, en plus de leur rôle dans le transport vésiculaire (qui dans ces conditions serait réduit), agissent également en évitant **la dispersion** des molécules de cadhérine dans la membrane plasmique (Stehbens et al., 2006).

D'autre part, le réseau d'actine est également impliqué dans le trafic des cadhérines à la membrane plasmique puisque la myosine II, moteur moléculaire du réseau d'actine, contrôle l'accumulation des cadhérines aux zones de contact (Shewan et al., 2005).

La dégradation

L'activation des **tyrosines kinases** EGFR (récepteur au facteur de croissance épidermal), c-Met (ou récepteur au facteur de croissance hépatocytaire), FGFR (ou récepteur au facteur de croissance des fibroblastes) et Src, favorise l'étalement des cellules épithéliales en leur conférant un phénotype mésenchymateux (Weidner et al., 1990). C'est en fait le résultat de l'altération des JAs par la phosphorylation des résidus tyrosine des complexes cadhérines/caténines (Behrens et al., 1993; Hamaguchi et al., 1993).

En 2002, Fujita et ses collègues découvrirent une molécule homologue à une **ubiquitine ligase E3 (c-Cbl), Hakai**, capable de se lier avec la E-cadhérine phosphorylée sur deux résidus tyrosine, de l'ubiquitinyler et ainsi vraisemblablement de promouvoir son recrutement au lysosome et sa dégradation (Fujita et al., 2002; Galan and Haguener-Tsapis, 1997). En résumé, les tyrosines kinases phosphorylent E-cadhérine au niveau de leur domaine JMD riche en tyrosines, ce qui induit sa liaison avec Hakai, son ubiquitinylation, son endocytose et sa dégradation dans les lysosomes. Néanmoins, il semblerait que la seule ubiquitinylation de la E-cadhérine par Hakai ne soit pas l'élément déclencheur de l'internalisation de la cadhérine puisque des cadhérines mutées pour le site de liaison à Hakai peuvent encore être internalisées (Fujita et al., 2002). De plus, d'autres cadhérines classiques (comme la P- et la N-cadhérine) ne possèdent pas les deux résidus tyrosine ciblés par Hakai. D'autres mécanismes régulant la dégradation des cadhérines sont alors vraisemblablement à l'œuvre. Il existe ainsi une deuxième ubiquitine ligase, MDM 2, capable de dégrader la E-cadhérine (Yang et al., 2006).

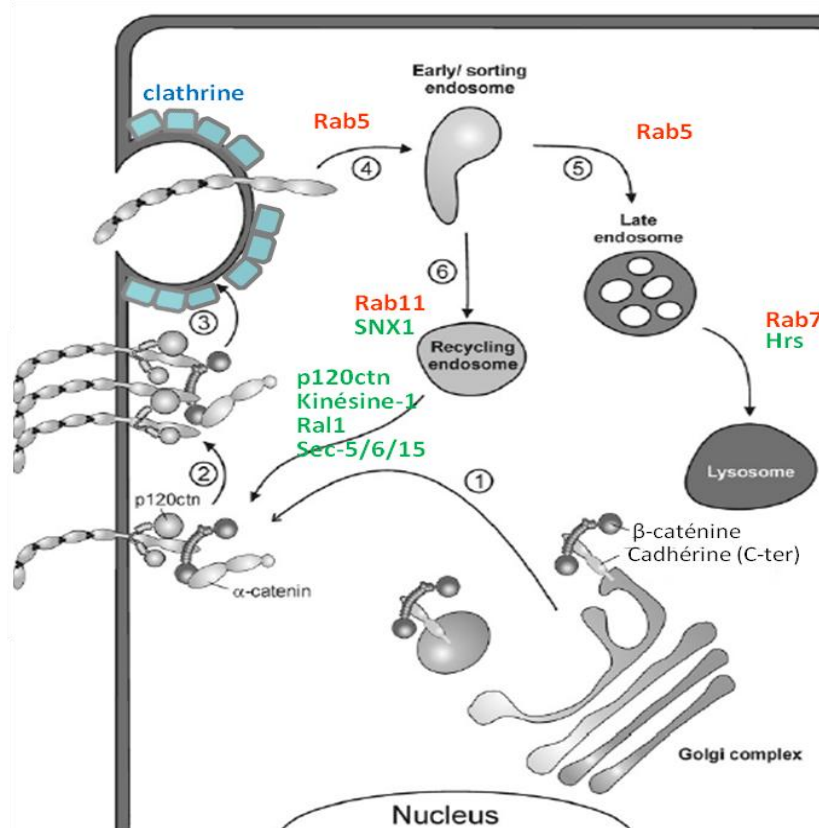


Figure 24 : Les différents acteurs et étapes du renouvellement des cadhérines aux JAs

1) Le transport des cadhérines néo-synthétisées du Golgi à la membrane plasmique nécessite la présence de la β -caténine qui stabilise la queue cytoplasmique des cadhérines. 2) Agrégation des cadhérines à la membrane plasmique grâce aux interactions homophiliques *en cis* permises par p120ctn. 3) et 4) Endocytose des cadhérines dépendante de la clathrine et transport vers les endosomes de triage Rab5+. Là, les cadhérines sont soit transportées vers les endosomes tardifs et les lysosomes grâce à Rab5, Rab7 et Hrs (5) ou alors, elles sont redirigées vers les endosomes de recyclage via Rab11a et SNX1 (6). Leur recrutement à la membrane se fait grâce au complexe d'exocytose et à ses sous-unités sec-5/6/15 et à la p120ctn qui, en permettant l'association des cadhérines à la kinésine facilite son transport à la membrane. Adaptée de (van Roy and Berx, 2008).

III.E.2. La p120caténine est une molécule clé qui coordonne les différentes étapes du renouvellement des jonctions adhérentes

La dérégulation de l'homéostasie des JAs a des conséquences dramatiques sur l'organisation des tissus. Par exemple, une endocytose accrue des cadhérines des cellules épithéliales aurait pour conséquence de réduire le niveau global de la E-cadhérine à la membrane plasmique. Or, cette diminution du niveau d'E-cadhérine prédispose à l'apparition de tumeurs très invasives (Guilford, 1999; Vleminckx et al., 1991). Il est donc nécessaire que le processus de renouvellement des jonctions soit finement contrôlé.

Une série d'études effectuées dans le laboratoire de AB Reynolds montre que la perte de la p120ctn, soit à cause d'altérations génétiques dans des cellules cancéreuses, soit due à une sous-expression par siARN, augmente le taux de renouvellement de la E-cadhérine (Davis et al., 2003; Ireton et al., 2002). Des résultats similaires ont été trouvés concernant le rôle de p120ctn sur la régulation de la VE-cadhérine dans les cellules endothéliales (Xiao et al., 2005). Plus précisément, il semblerait que la présence de la p120ctn à la membrane plasmique soit essentielle à la stabilité des cadhérines aux jonctions. La translocation de p120ctn dans le cytoplasme, par l'expression ectopique de Nanos-1 par exemple, dissout les jonctions adhérentes chez la drosophile (Strumane et al., 2006).

La p120ctn et l'endocytose des cadhérines

Le site de liaison des cadhérines à la p120ctn est fondamental dans le contrôle de la stabilité des cadhérines à la membrane plasmique. La liaison de p120ctn à ce domaine juxtamembranaire inhibe l'endocytose de la VE-cadhérine (Xiao et al., 2005). Des mutations dans ce domaine empêchant l'interaction avec la p120ctn augmente considérablement le taux d'endocytose des cadhérines (Miyashita and Ozawa, 2007b). Le mécanisme principal, par lequel la p120ctn empêche l'endocytose des cadhérines, a été récemment validé grâce à l'obtention de la structure moléculaire précise de l'interaction entre la p120ctn et la cadhérine (Ishiyama and Ikura, 2012; Ishiyama et al., 2010).

Les résidus du domaine juxtamembranaire impliqués dans l'interaction dynamique avec la p120ctn sont aussi impliqués dans la reconnaissance d'autres partenaires, y compris des protéines de la machinerie endocytique ou de dégradation (Ishiyama et al., 2010) (**Figure 25**). En effet, les cadhérines s'associent avec l'adaptateur de la clathrine AP-2 grâce à un motif comprenant **deux leucines (L)** au niveau de son domaine juxtamembranaire (Chiasson et al., 2009; Miyashita and Ozawa, 2007a; Miyashita and Ozawa, 2007b). De plus, les résidus **tyrosine phosphorylé (Y)** permettant l'ubiquitinylation de la E-cadhérine par Hakai, et son internalisation, se situent au voisinage du motif LL dans le domaine juxtamembranaire (Fujita et al., 2002) (**Figure 25, encadré**). Aussi, en présence de la p120ctn ces sites sont-ils **masqués** et la cadhérine ne peut-elle pas être endocytée. L'aspect dynamique de l'interaction de la p120ctn avec ces motifs facilite, sans doute, la dégradation ou le recyclage des cadhérines en fonction du contexte cellulaire (Ishiyama et al., 2010).

Au stade initial du contact cependant, la formation des JAs nécessite une association forte entre la p120ctn et la cadhérine afin d'empêcher son internalisation. Cette interaction ferait intervenir les **nectines**, premières molécules adhésives recrutées aux zones de contact lors de la formation des JAs (Tachibana et al., 2000). En effet, l'inhibition de l'endocytose des cadhérines non engagées *en trans* requiert la formation d'un complexe entre Rap1, p120ctn et l'afadine (Hoshino et al., 2005).

D'autre part, la p120ctn pourrait avoir un mode d'action indirect dans la régulation de l'endocytose via sa capacité à contrôler l'activité des Rho GTPases. En effet, le timing et la

coordination de l'activation de Rac et Rho sont cruciaux pour l'établissement de jonctions stables mais dynamiques. Ces protéines régulent en effet les phases de formation des JAs mais surtout l'endocytose des cadhérines (**Figure 26**). D'après différentes études et malgré l'absence d'observation claire de ce phénomène dans d'autres (Macpherson et al., 2007), la p120ctn semble inhiber l'activité de RhoA et accroître celle de Rac1 et de Cdc42 (Grosheva et al., 2001; Noren et al., 2000). Aux JAs, ce phénomène pourrait avoir lieu grâce au recrutement par la p120ctn liée à la N-cadhérine d'un inhibiteur de Rho, **p190RhoGAP** (Anastasiadis et al., 2000). Cet effet indirect de la p120ctn sur l'endocytose des cadhérines pourrait être spécifique à certains types de cadhérines, puisqu'un mutant de la p120ctn, incapable de réguler RhoA, a le même effet que la p120ctn sauvage sur l'endocytose de la VE-cadhérine, dans les cellules endothéliales (Chiasson et al., 2009).

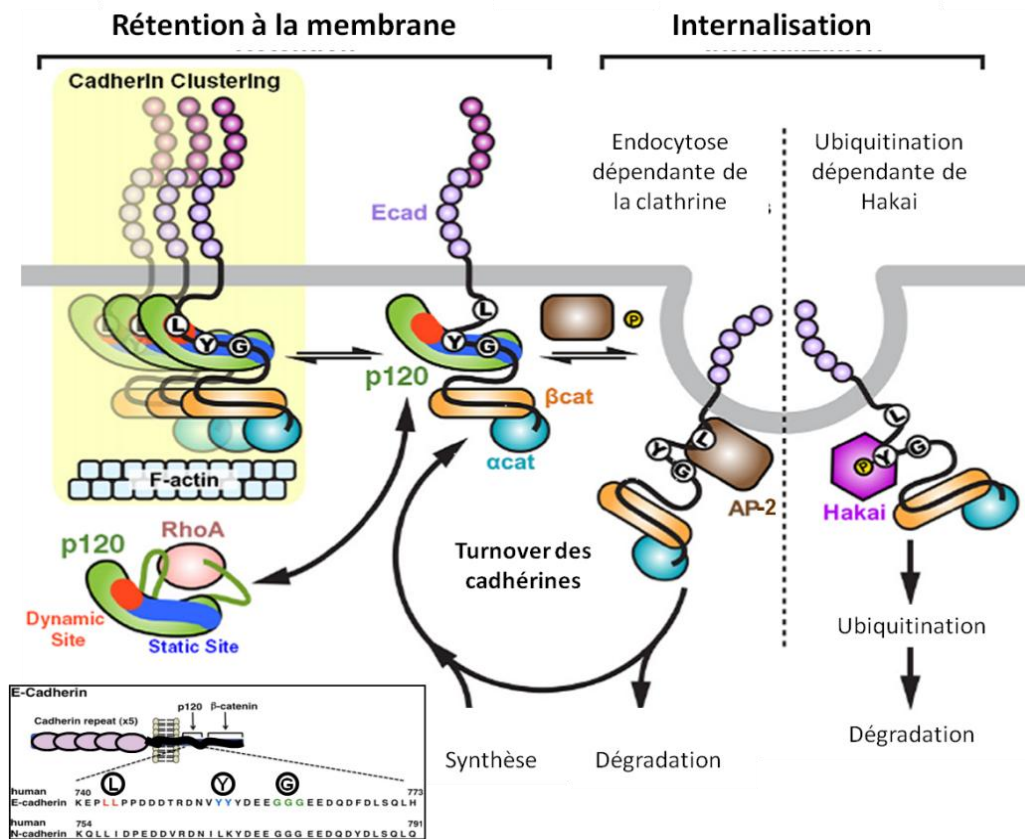


Figure 25 : Principal mécanisme de régulation de l'internalisation des cadhérines par la p120ctn.

La p120ctn (vert), en interagissant avec la cadhérine de manière dynamique (rouge) et statique (bleu, grâce aux trois résidus glycine G), masque des motifs d'internalisation (L et Y) conservés chez les deux principales cadhérines classiques (encadré). En absence de p120ctn, l'adaptateur de la clathrine AP-2 (marron) se lie effectivement aux deux résidus leucine (L) du domaine juxtamembranaire tandis que l'ubiquitine ligase E3 Hakai interagit avec le résidu tyrosine phosphorylé Y. On notera également que la p120ctn régule le renouvellement des JAs via son interaction directe avec RhoA et la régulation de l'activité des GTPases qui s'en suit. Adaptée de (Ishyima et al, 2010).

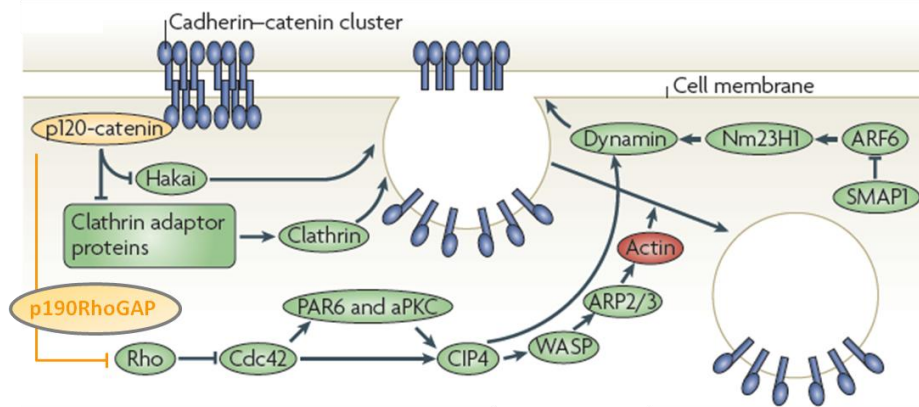


Figure 26 : Régulation des voies de signalisations des Rho GTPases contrôlant l'endocytose des cadhérines par la p120ctn.

Différentes voies de signalisation permettent le recrutement des agrégats (clusters) de cadhérines dans les puits de clathrine où elles seront endocytées. Les Rho GTPases agissent principalement en favorisant la scission des vésicules d'endocytose par la dynamine et le réseau d'actine. La p120ctn orchestre ces voies de signalisation en inhibant Rho par le recrutement de p190RhoGAP. Adaptée de (Harris and Tepass, 2010).

Pour résumer, p120ctn est un régulateur majeur de la stabilité des cadhérines par sa capacité à masquer les motifs d'internalisation présents dans la séquence des cadhérines, et à contrôler l'activité des Rho GTPases

La p120ctn et le trafic des cadhérines

En présence de signaux de désagrégation cellulaire, qui affaiblissent et altèrent les jonctions, le trafic des cadhérines est considérablement augmenté (Le et al., 1999). En plus de stabiliser les cadhérines à la membrane plasmique, la p120ctn contrôle le niveau global de cadhérines disponibles pour l'adhérence cellulaire en **favorisant leur transport** vers les points de contact.

Quand la p120ctn est surexprimée dans les cellules, elle est associée à la N-cadhérine dans des vésicules intracellulaires et promeut leur liaison à la kinésine-1. Celle-ci favorise leur transport le long des microtubules. La perturbation du lien entre la p120ctn et la N-cadhérine, ou entre la p120ctn et la kinésine-1, diminue le niveau de N-cadhérine aux points de contact. L'association de la p120ctn avec **la kinésine-1** favorise donc le transport de la N-cadhérine le long des microtubules vers le site d'assemblage des nouvelles jonctions adhérentes (Chen et al., 2003).

L'orientation du trafic vésiculaire des cadhérines vers les JAs pourrait être favorisée par l'ancrage des réseaux de microtubules aux jonctions (**Figure 27**). Un réseau de microtubules s'ancre aux JAs grâce à l'interaction de protéines associées à leur extrémité+ (la dynéine et APC) avec la β -caténine (Ligon et al., 2001). De manière intéressante, un deuxième réseau de microtubules non ancrés au centrosome s'associe aux JAs grâce à l'interaction de **PLEKHA7**, protéine liée aux extrémités- des microtubules par NEZHA, avec **la p120ctn**. Les extrémités- recrutent également aux sites d'adhérence le moteur moléculaire KIF3c (Meng et al., 2008).

De plus, l'association de la p120ctn avec le précurseur de la N-cadhérine au niveau du réticulum endoplasmique grâce à la phosphatase PTP1B, favoriserait le transport de la N-cadhérine immature vers l'appareil de Golgi (Hernandez et al., 2010). Cependant, de manière surprenante, la perte de p120ctn ne change pas le taux de E-cadhérine nouvellement synthétisée délivrée à la membrane plasmique (Davis et al., 2003). P120ctn pourrait être impliquée uniquement dans le transport actif de certaines cadhérines comme la N-cadhérine ou jouerait un

rôle dans le transport kinésine-dépendant des cadhérines majoritairement lors du recyclage à partir des endosomes, et peu dans le transport des cadhérines néo-synthétisées.

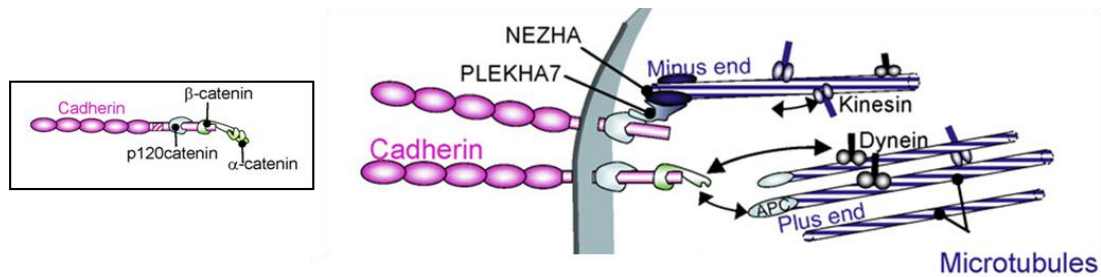


Figure 27: L'association des microtubules aux jonctions d'adhérence se fait en partie grâce à la p120ctn.

Deux réseaux de microtubules inversement polarisés interagissent avec les cadhérines transmembranaires via leur interaction avec les caténines. NEZHA, protéine liée aux extrémités-(minus end) des microtubules interagit avec PLEKHA7 qui, en s'associant avec la p120ctn, ancre ce réseau de microtubules aux JAs. Les extrémités+ (plus end) des microtubules se lient avec la β -caténine via APC (protéine liée aux extrémités+) ou directement via le moteur moléculaire dynéine. Extrait de (Etienne-Manneville, 2011).

III.E.3. le rôle de la β -caténine dans le renouvellement des JAs

Outre la p120ctn, la β -caténine contribue, plus modestement semble-t-il, au renouvellement des JAs. Elle serait impliquée dans le transport des cadhérines à la membrane plasmique et dans leur recyclage après endocytose.

L'altération de la liaison de la β -caténine avec la E-cadhérine augmente l'endocytose de la cadhérine (Dupre-Crochet et al., 2007). L'endocytose de la N-cadhérine aux synapses, contrôlée par la β -caténine, est essentielle au bon fonctionnement des synapses (Tai et al., 2007). La β -caténine est également requise pour la macropinocytose de la N-cadhérine aux « ruffles » membranaires (Sharma and Henderson, 2007).

D'autre part, des cadhérines mutées incapables de se lier avec la β -caténine, ne sont pas délivrées à la membrane plasmique correctement, et s'accumulent dans des compartiments post-golgien, avant d'être dirigées vers les lysosomes pour dégradation (Chen et al., 1999; Miyashita and Ozawa, 2007a).

Pour résumer le rôle des caténines dans la dynamique des JAs, le scénario principal consiste en un rôle positif des interactions de la β -caténine et de la p120ctn avec la partie cytoplasmique des cadhérines dans la stabilisation des JAs. Ces interactions empêchent, en effet, l'endocytose des cadhérines. Une série de signaux moléculaires pourrait permettre de moduler l'association des caténines avec les cadhérines afin de promouvoir ou restreindre, en fonction du contexte, leur internalisation et la force des jonctions adhérentes. **Un des objectifs de ma thèse a été de découvrir la nature de ces signaux.**

NB : Les nombreux résultats contradictoires concernant la dynamique des JAs peuvent venir d'une différence de nature entre les jonctions observées dans les différentes études. En effet, outre les différents types cellulaires utilisés, l'état exact de maturation des JAs qui ne peut être identique entre les différentes études doit vraisemblablement être à l'origine de certaines contradictions.

IV. Les rôles des jonctions adhérentes dans la migration cellulaire et l'invasion tumorale

Les résultats obtenus dans l'étude transcriptomique d'échantillons de gliomes et de cerveaux sains m'ont amené à m'intéresser à la façon dont les jonctions adhérentes régulent la migration cellulaire. La fonction cruciale qu'elles remplissent dans l'établissement de la polarité des cellules immobiles (Dupin et al., 2009) laisse en effet penser que les cadhérines jouent un rôle dans la régulation du processus fondamentalement polarisé qu'est la migration cellulaire.

Compte tenu de la variété des cadhérines existantes, il semble difficile de faire émerger un rôle commun à toutes ces molécules dans la migration cellulaire. Je m'attacherai, ici, à décrire principalement les rôles joués par la N-cadhérine, qui a été l'objet d'étude majeur de ma thèse, et la E-cadhérine, parce qu'elle constitue la cadhérine la plus étudiée.

IV.A. Jonctions adhérentes, migration cellulaire et morphogénèse des tissus

Certains processus développementaux nécessitent la migration de cellules produites à distance de leur futur lieu de résidence. Celles-ci doivent pouvoir se détacher de leur lieu de naissance, naviguer entre les cellules stromales de la matrice extracellulaire et arriver sur leur lieu de destination où elles referont des nouveaux contacts. Il y a donc nécessité d'une régulation très fine de l'expression des cadhérines pendant le développement pour permettre à ces deux actions apparemment opposées de se produire. De plus, pendant la migration même, les cellules sont en contact permanent avec les cellules avoisinantes et doivent donc moduler la dynamique de leurs jonctions **afin de coordonner au mieux l'adhérence et la migration**.

Les contacts intercellulaires peuvent agir sur la migration essentiellement de quatre manières différentes :

- comme **supports mécaniques de la migration**
- comme **plateforme de signalisation** favorisant la migration cellulaire
- comme **promoteurs de la cohésion** du groupe de cellules lors de la migration collective
- comme freins ou aiguilleurs de la migration lors de **l'inhibition de contact de la mobilité**
-

IV.A.1. Les jonctions adhérentes constituent des supports adhésifs favorisant la migration cellulaire

L'ancrage des jonctions adhérentes au cytosquelette permet, non seulement de maintenir l'adhérence entre cellules adjacentes qui se retrouvent « collées » les une aux autres, mais d'assurer également un **couplage mécanique** entre les forces d'adhérence générées aux zones de contact intercellulaire et le reste de la cellule. Ce couplage permet aux cellules d'utiliser les cadhérines comme **supports adhésifs** pour promouvoir la migration cellulaire. Par exemple, au cours de l'oogénèse chez la *drosophile*, les cellules du bord, détachées de l'épithélium, utilisent la E-cadhérine pour migrer entre les cellules nourricières et atteindre l'oocyte à l'autre extrémité de la drosophile (Niewiadomska et al., 1999). Chez le *poisson zèbre*, la N-cadhérine contrôle le positionnement des neurones et leur correcte innervation du tissu en régulant leur adhérence au neuroectoderme et leur migration pendant la neurulation (Lele et al., 2002). Enfin, chez la souris, la croissance axonale, la fasciculation et le branchement dendritique sont finement régulés par l'adhérence dépendante de la N-cadhérine (Riehl et al., 1996; Yu and Malenka, 2003; Zhu and Luo, 2004).

Le principe du couplage mécanique aux jonctions adhérentes

Le mécanisme à l'œuvre lors du couplage mécanique a d'abord été investigué *in vitro* grâce à l'utilisation de substrats artificiels de cadhérines. Les cellules neuronales sont placées sur un substrat recouvert d'une protéine chimère contenant la partie extracellulaire adhésive de la N-cadhérine, couplée au fragment Fc des anticorps. Ces études ont permis de mettre en évidence le rôle positif de la liaison à la N-cadhérine dans la migration du cône de croissance (Bard et al., 2008; Giannone et al., 2009). Cette interaction génère des forces protrusives et contractiles nécessaires à l'avancée de la cellule.

Les contacts dépendant des cadhérines supportent un stress mécanique associé à la migration cellulaire de la même manière que les plaques d'adhérence dépendantes des intégrines supportent des forces de traction quand la cellule migre sur la matrice extracellulaire. En effet, la magnitude des forces subies par les cadhérines liées à un substrat solide est du même ordre que celles transmises par les intégrines aux points focaux d'adhésion (Ganz et al., 2006; Ladoux et al., 2010). L'architecture solide des JAs est fondamentale pour que la cellule, qui migre, puisse se servir de la cellule, sous-jacente ou voisine, comme de support. En effet, des anticorps contre la N-cadhérine empêchent la migration des cônes de croissance neuronaux sur les cellules de Schwann *in vitro*, tandis que des anticorps contre une autre molécule d'adhérence neuronale, L1-CAM, n'affectent pas leur migration (Letourneau et al., 1990). Les contacts intercellulaires indépendants de la cadhérine et médiés par des récepteurs transmembranaires non liés solidement au cytosquelette sous-jacent ne semblent pas capables de résister aux forces nécessaires à la migration cellulaire.

Quand les cellules migrent sur un substrat de cadhérines, le couplage mécanique entre les JAs et le réseau contractile d'actomyosine sous-jacent fait intervenir de nombreuses protéines liant l'actine et directement ou indirectement les caténines associées aux cadhérines. La vitesse d'avancée du cône de croissance est corrélée avec l'efficacité du couplage mécanique entre la N-cadhérine et le flux rétrograde d'actine, et dépend de l' α -caténine (Bard et al., 2008). Des données *in vivo* concernant la migration des cellules germinales du *poisson zèbre* ont permis de montrer que la liaison de la E-cadhérine au réseau d'actine via la β -caténine était indispensable à leur migration (Kardash et al., 2010). Afin de supporter les forces d'adhérence, de nombreux câbles d'actine parallèles à la membrane sont formés après contact et la contractilité de ce réseau d'actine, permise par le recrutement de la myosine II par Rho, permet de soutenir un peu plus l'adhérence (Adams and Nelson, 1998; Liu et al., 2010).

L'embrayage moléculaire aux JAs assure leur fonction de support de la migration

La polymérisation de l'actine à l'avant de la cellule génère une force de réaction de la membrane plasmique à l'avancée des filaments d'actine, entraînant un **flux rétrograde de l'actine** (Cramer, 1997; Lin and Forscher, 1995). Lorsque ce flux est stoppé par l'ancrage des filaments aux points focaux d'adhésion, la polymérisation de l'actine à l'avant génère cette fois une avancée nette de la membrane plasmique puisque la force de réaction de la membrane est inférieure à celle, opposée, produite aux points focaux d'adhésion. C'est le principe **d'embrayage moléculaire** (ou « **molecular clutch** ») lié aux intégrines (Mitchison and Kirschner, 1988; Suter and Forscher, 2000) (**Figure 28**).

Un deuxième type d'embrayage moléculaire peut avoir lieu, lorsque deux cellules superposées établissant des JAs avancent en se servant l'une de l'autre comme support (Kardash et al., 2010). Si le substrat n'est plus la matrice extracellulaire mais la cellule adjacente, le mécanisme reste le même. En effet, le flux rétrograde d'actine s'enclenchant aux JAs, la formation de connections JAs-actine solides contrebalance les forces de réaction qui

apparaissent au front de migration. L’embrayage moléculaire permet alors la formation d’une protrusion à l’avant de la cellule (Giannone et al., 2009; Suter et al., 1998) (**Figure 28**).

En outre, au fur et à mesure de la migration, la cellule établit de nouveaux contacts adhésifs qui sont soutenus par un flux polarisé de vésicules transportant les cadhérines vers les jonctions en formation (Kametani and Takeichi, 2007). Ce flux de cadhérine, mis en évidence dans des cellules épithéliales sous-confluentes, permettrait de favoriser le glissement de deux cellules les unes sur les autres.

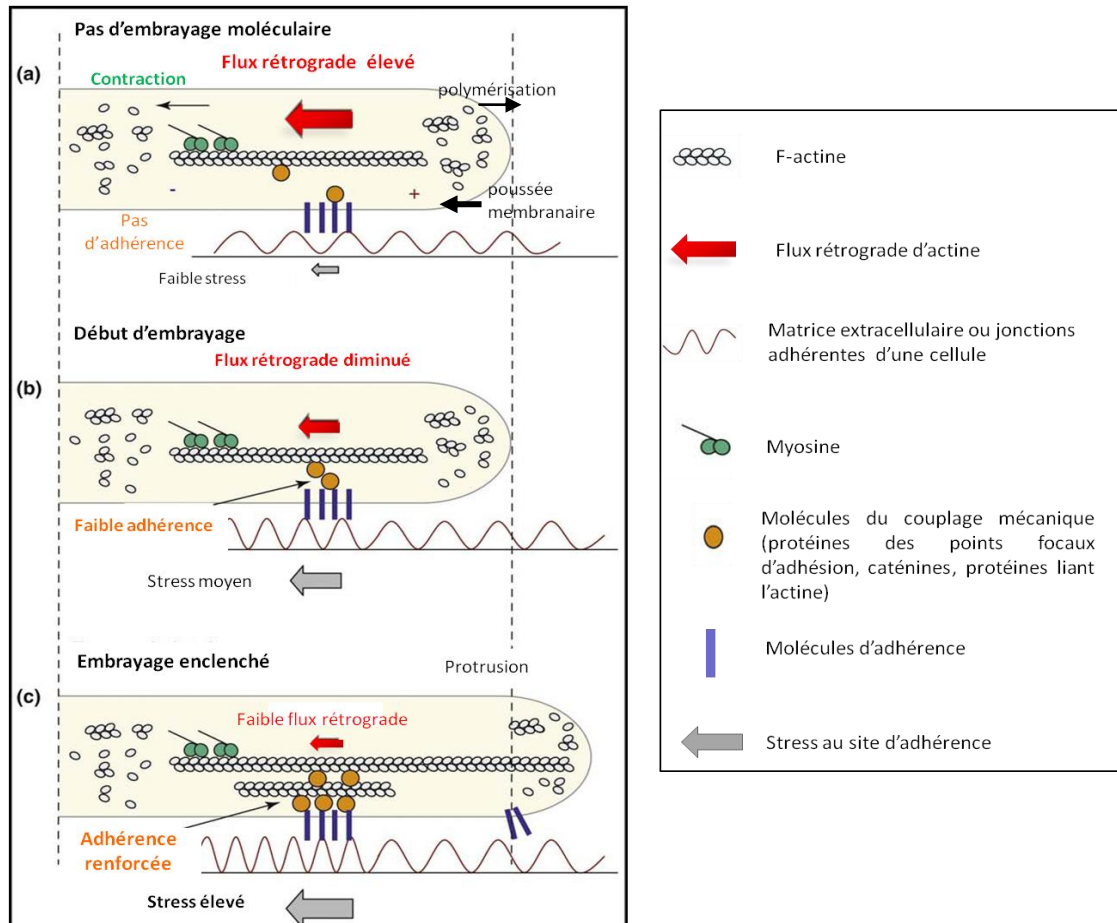


Figure 28 : L’embrayage moléculaire au cours de la migration cellulaire

Vue de côté d’une extension membranaire d’une cellule en migration sur un substrat plus ou moins rigide de molécules de la matrice extracellulaire ou de molécules d’adhérence intercellulaire. La cellule exprime les récepteurs d’adhérence adéquats (bleu) et peut former des complexes d’adhérence sur sa face ventrale. Les filaments d’actine sont entraînés dans un flux rétrograde en raison 1) de leur polymérisation aux extrémités + contre la membrane plasmique, 2) de leur dépolymérisation à leurs extrémités – et 3) aux forces de traction de la contraction des myosines le long des filaments. La connexion dynamique entre la F-actine et les complexes d’adhérence est permise par des molécules adaptatrices spécifiques de chaque type d’adhérence. La force exercée aux sites d’adhérence déforme le substrat (longueur d’onde de plus en plus courte en fonction du stress d’adhérence). **A)** Il n’y a pas de connexion entre la F-actine et les récepteurs d’adhérence. L’embrayage moléculaire n’est pas enclenché et aucune force ne contrebalance la force de contraction de la myosine et la force de réaction de la membrane plasmique à l’avant. S’en résulte un **flux rétrograde élevé**. **B)** L’interaction des molécules d’adhérence avec le réseau d’actine est faible, l’embrayage s’enclenche et commence à réduire le flux rétrograde, mais il patine. **A)** Le couplage mécanique est en place, l’adhérence est renforcée par la régulation positive des molécules adaptatrices. Le flux rétrograde est réduit, permettant l’extension d’une protrusion à l’avant de la cellule en migration. Adaptée de (Giannone et al., 2009).

Pour résumer, on notera les similitudes entre le couplage mécanique aux jonctions adhérentes et aux points focaux d'adhésion. Cela suggère que les effets des interactions avec les cellules exprimant les cadhérines, et avec la matrice extracellulaire, peuvent être intégrés facilement au niveau cellulaire pour aboutir à une régulation commune du cytosquelette, qui dirigera la migration cellulaire dans un environnement complexe.

Il reste maintenant à savoir comment, *in vivo*, les JAs de la cellule « réceptrice » ou « support » résistent à la tension exercée par la cellule en migration. Il serait également intéressant de savoir ce qui différencie les deux côtés des JAs pour savoir s'il y a une signature des complexes cadhérines/caténines du côté de la cellule qui guide, qui supporte et du côté de la cellule qui migre.

IV.A.2. Les cadhérines favorisent et orientent la migration dirigée

En plus de moduler la capacité intrinsèque de migration des cellules via leur rôle mécanique, les interactions dépendantes des cadhérines influencent la polarité cellulaire et la directionnalité de la migration cellulaire. Cette fonction a été mise en évidence principalement dans le système nerveux central, grâce aux études sur la croissance axonale.

Exemples de migration dirigée régulée par les cadhérines

Plusieurs cadhérines classiques sont exprimées par les cellules environnantes tout au long du trajet de l'axone et jouent ainsi un rôle dans la navigation du cône de croissance et la formation des circuits neuronaux (Honig et al., 1998; Iwai et al., 1997) (**Figure 29a**). L'altération de la N-cadhérine des axones de l'optique rétinienne chez le poisson zèbre ou des cellules photorécepteurs (cellules R) chez la drosophile, les empêche d'atteindre leur destination finale et entraîne des erreurs « d'aiguillage » lors de la migration de leur cône de croissance (Masai et al., 2003; Prakash et al., 2005) (**Figure 29b**).

Les neurones néoformés de la zone sous-ventriculaire migrent radialement vers la plaque corticale. La Reeline est exprimée majoritairement dans la plaque corticale et stimule le recrutement de la N-cadhérine à la membrane plasmique des cellules en migration via la petite GTPase Rap1. Cette régulation de la dynamique de la N-cadhérine par un gradient de Reeline suggère un rôle prépondérant des interactions dépendantes de la N-cadhérine dans la migration dirigée des neurones multipolaires vers la plaque corticale (Jossin and Cooper, 2011). De plus, dans ce même modèle de migration neuronale, l'utilisation de mutants pour les Rabs impliquées dans l'endocytose des cadhérines (Rab 11, Rab 5 ou Rab7) empêche la migration dirigée et la localisation des neurones à la plaque corticale (Kawauchi et al., 2010) (**Figure 29c**).

Plus encore qu'une jonction stable, la **dynamique des cadhérines au sein de la cellule**, pourrait jouer un rôle essentiel à la migration dirigée des neurones. Elle permettrait une meilleure synchronisation spatiotemporelle entre les différents signaux pro et anti-migratoires. En effet en tant que signal en lui-même, l'interaction dépendante des cadhérines se doit d'être dynamique pour agir de manière transitoire à un moment donné et s'éteindre l'instant d'après.

Le mécanisme exact responsable du rôle des cadhérines dans la captation et la translation des signaux directeurs lors de la migration reste méconnu. Cependant, plusieurs études récentes ont permis de lever partiellement le voile sur les mécanismes sous-jacent.

Les jonctions adhérentes assurent la perception d'un gradient de contrainte mécanique : ce sont des mécanosenseurs

Quand la rigidité d'un substrat recouvert de cadhérines augmente, les forces exercées sur la cellule par les JAs augmentent également (Ladoux et al., 2010). La perception de rigidités différentes dans le microenvironnement par les JAs permettrait ainsi d'orienter la migration cellulaire. La création de supports de rigidités différentes peut se faire par exemple via des différences quantitatives du nombre de molécules de cadhérines à la surface des cellules avoisinantes. Ainsi, au cours de la gastrulation, la migration dirigée des cellules latérales vers la ligne médiane de l'embryon nécessite-elle l'établissement d'un gradient de BMP (protéine de la morphogénèse osseuse) qui induit la formation d'un **gradient inverse d'adhérence cellulaire** (von der Hardt et al., 2007).

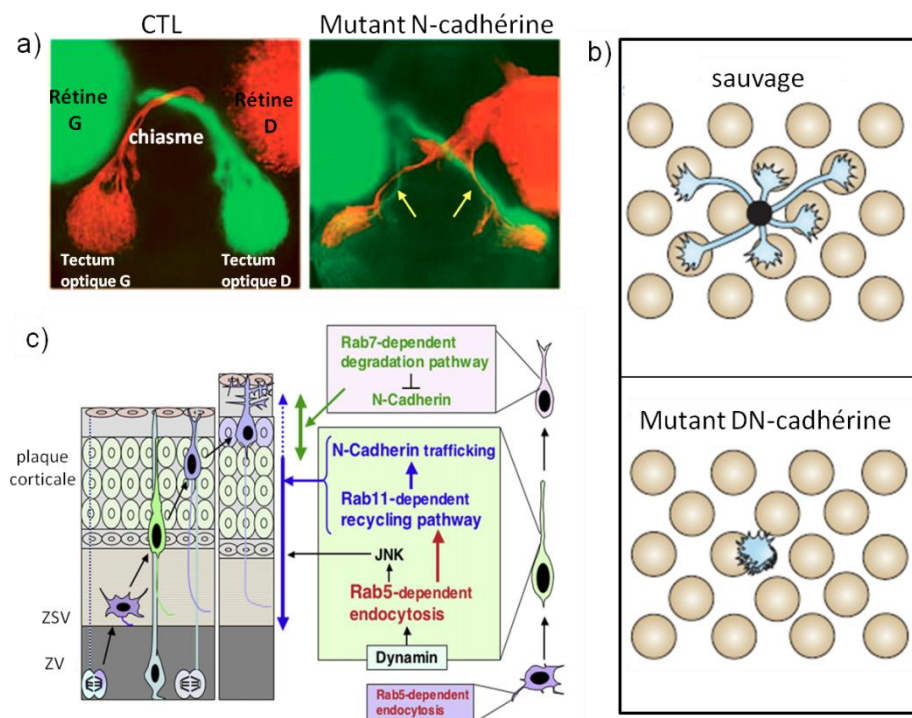


Figure 29 : Effets de l'altération de la N-cadhérine dans la morphogénèse rétinienne et la migration neuronale.

A) Axones rétiens de poisson zèbre visualisés après injection des fluorophores Dil (rouge) et DiO (vert), respectivement dans l'œil droit et l'œil gauche. Les axones de la rétine droite, se projettent contralatéralement et forment le toit optique gauche et vice versa. Dans le cas contrôle, noter la ségrégation exclusive des axones de chaque rétine dans le tectum optique opposé. Par contre, chez les mutants N-cadhérine, on observe des axones mal guidés (flèches jaunes) qui forment des projections ipsilatérales. **B)** Schéma illustrant les effets de la mutation de la N-cadhérine chez la drosophile (DN-cadhérine) dans la projection des axones des cellules photoréceptrices. Chez la mouche sauvage, les axones atteignent des cibles bien spécifiques (ronds marrons) dans la lamina du lobe optique, tandis que lorsque la N-cadhérine est altérée, les axones ne grandissent pas et n'atteignent pas leurs cibles. **A)** et **B)** sont adaptés de (Takeichi, 2007) **C)** Diagramme illustrant le renouvellement des cadhérines pendant la migration neuronale le long de la glie radiaire vers la plaque corticale. Les neurones changent de morphologie au cours de la migration et de leur maturation. Le trafic de la cadhérine dépendant de Rab 5 (pour l'endocytose) et Rab 11 (pour le recyclage à la membrane) est nécessaire à la migration et à l'entrée du neurone mobile (vert) dans la plaque corticale. La voie de dégradation dépendante de Rab7 est requise au contraire pour la dernière étape de migration des neurones, une fois arrivés dans la plaque corticale, pour établir leurs dendrites. Adapté de (Kawauchi et al., 2010).

De même, sachant que les différents types de cadhérines ne soutiennent pas toutes les mêmes forces d'adhérences (Chu et al., 2004) et qu'elle s'associent de manière homophile, leur rôle de mécanosenseurs serait à l'origine des mouvements morphogénétiques aboutissant à la ségrégation des cellules et les frontières nettes entre tissus. L'hypothèse de **l'adhérence différentielle** formulée par Steinberg veut que les cellules migrent intrinsèquement de manière non dirigée pendant le développement et qu'elles s'agencent en tissus bien délimités en répondant aux différentes contraintes mécaniques perçues par les différents types de cadhérine (Batlle and Wilkinson, 2012; Steinberg, 1963; Steinberg, 2007).

Le mécanisme permettant aux JAs de percevoir les différentes contraintes mécaniques fait intervenir des protéines responsables de leur ancrage au cytosquelette, dont la principale est **l' α -caténine**. En effet, en réponse à un stress mécanique l' α -caténine subit une transformation conformationnelle qui libère son site d'interaction à la vinculine. Cette protéine ainsi activée interagit avec le réseau d'actine et favorise sa réorganisation nécessaire au renforcement de la JA (Yonemura et al., 2010).

D'autre part, il semblerait que l'intégration des contraintes mécaniques par les cadhérines fasse intervenir le cytosquelette des **filaments intermédiaires**. En effet, l'application locale d'une tension aux JAs induit une réorganisation polarisée du réseau de filaments intermédiaires de kératine au niveau des JAs ayant subi le stress mécanique (Weber et al., 2012). Cette étude montre ainsi que les JAs s'étendent principalement en direction des forces exercées sur elles. La croissance anisotrope des JAs est sans doute à l'origine de l'orientation asymétrique du cytosquelette sous-jacent, nécessaire à la migration dirigée.

De la perception des contraintes mécaniques à la persistance de la polarité cellulaire nécessaire à la migration dirigée

Pour permettre aux JAs de favoriser une direction de migration plutôt qu'une autre, l'engagement des cadhérines aux JAs doit générer un signal intracellulaire permettant la mise en place d'un axe de polarité.

La distribution des interactions dépendantes de la cadhérine à la périphérie de la cellule est fondamentale pour établir l'orientation cellulaire. *In vitro*, lorsque des cellules gliales sont placées sur un micropatron asymétrique recouvert de N-cadhérine, le centrosome et l'appareil de Golgi se réorientent devant le noyau, face au côté non adhérent (Dupin et al., 2009; Dupin et al., 2011) (**Figure 30a et b**). Ainsi, le positionnement des cadhérines exprimées par les extensions radiales des neurones ou par la glie radiale sous-jacente pourrait être perçu par les neurones multipolaires en migration comme des signaux environnementaux de direction favorisant leur migration dirigée vers la plaque corticale (Jossin and Cooper, 2011). De la même manière, la directionnalité de la migration en chaîne des neurones granulaires du cervelet dépend des cadhérines. L'imagerie cellulaire en temps réel chez le *poisson zèbre* a révélé une régulation dynamique de la polarité de ces cellules. Pendant la migration, la cadhérine 2 (homologue de la N-cadhérine chez le poisson zèbre) est transférée le long de la membrane plasmique à l'avant de la cellule, et participerait à l'orientation de la migration en stabilisant le centrosome à l'avant du noyau, vers la protrusion (Rieger et al., 2009) (**Figure 30c**).

Il est également possible que les cadhérines interagissent avec d'autres récepteurs membranaires à la surface de la cellule, comme les récepteurs aux facteurs de croissance, et modifient leur activité. La modulation des voies de signalisation en aval de ces facteurs de croissance pourraient affecter de nombreux processus cellulaires dont l'établissement de l'orientation cellulaire. *Pour plus de détails se référer à la partie IV-A-3 et à* (McEwen et al., 2012).

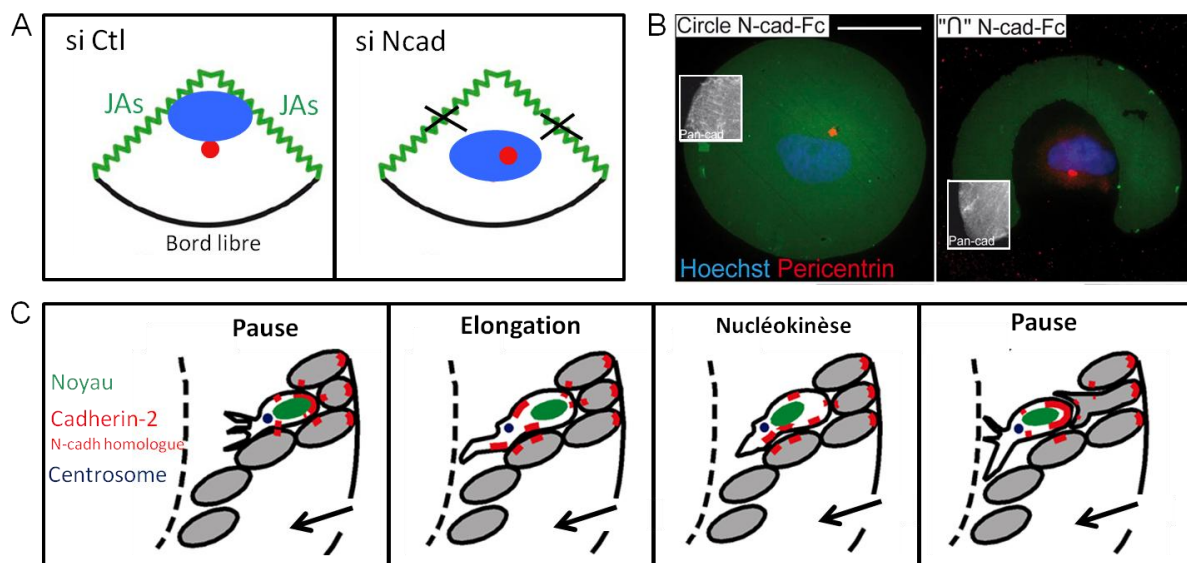


Figure 30 : Les jonctions dépendantes de la N-cadhérine contrôlent la polarité cellulaire des cellules immobiles et en migration.

A) Schéma illustrant le fait que les JAs dépendantes de la N-cadhérine régulent le positionnement du noyau et du centrosome. Adapté librement de (Dupin et al., 2009). B) Des interactions asymétriques médiées par la N-cadhérine sont suffisantes pour promouvoir l'orientation d'un axe de polarité noyau-centrosome. Immunofluorescence d'astrocytes de rat placés sur des micropatrons asymétriques de N-cad-Fc. Extrait de (Dupin et al., 2009). C) Schéma représentant les différentes étapes de la migration dirigée des neurones granulaires du cervelet chez le *poisson zèbre*. La dynamique de la cadhérine-2 au cours de la migration (homologue chez le poisson de la N-cadhérine) permet le maintien de la polarité cellulaire interne nécessaire à la migration dirigée de ces cellules. Pendant la phase d'élongation la cadhérine-2 est transportée au front de migration où, en établissant de nouveaux contacts, elle maintiendrait le positionnement du centrosome devant le noyau. Adapté de (Rieger et al., 2009).

IV.A.3. Les jonctions adhérentes constituent une plateforme de signalisation favorisant la migration cellulaire

Outre leur rôle dans le couplage mécanique, les cadhérines influencent la migration cellulaire par les voies de signalisation qu'elles activent lors de la formation des jonctions adhérentes. Même si les cadhérines n'ont pas d'activité catalytique, très tôt après leur engagement *en trans*, elles contrôlent la réorganisation du cytosquelette, notamment via la modulation de l'activité des Rho GTPases par les caténines. P120ctn est essentielle à la migration dépendante de la N-cadhérine des cellules de la crête neurale (Ciesiolka et al., 2004). L'effet de la perte de la p120ctn sur la migration est surmonté par l'expression d'un mutant dominant négatif de Rac suggérant que la signalisation des Rho GTPases est cruciale dans la régulation de la migration cellulaire par les JAs.

Les complexes cadhérine/caténines agissent sur la signalisation en se liant avec des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), qui ont la capacité, par eux-mêmes de réguler la migration cellulaire via le déclenchement d'une cascade de signalisation. Par exemple, la N-cadhérine s'associe directement avec le récepteur du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR-1) et active la cascade de signalisations sous-jacentes dépendante de Erk qui promeut la migration cellulaire (Suyama et al., 2002). L'activité tyrosine kinase de FGFR est requise aussi pour la croissance axonale induite par la N-cadhérine et la cadhérine 11 (Boscher and Mege, 2008; Kolkova et al., 2000). D'autre part, la N-cadhérine et la β -caténine sont capables de

former un complexe avec le récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) et la protéine stabilisatrice NHERF (Theisen et al., 2007). Cette interaction entre la N-cadhérine et PDGFR entraîne une réorganisation du cytosquelette d'actine qui favorise la migration cellulaire. Enfin, l'engagement *en trans* de la E-cadhérine active le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGFR) indépendamment de la liaison avec son ligand. En retour, l'EGFR activé stimule les voies de signalisation régulées par PI3K et MAPK (protéine kinase activée par des mitogènes) pouvant être impliquées dans la migration cellulaire (Kovacs et al., 2002; Pece and Gutkind, 2000)

L'association des différentes cadhérines, avec de multiples combinaisons de protéines signalisatrices, semble en partie responsable des différences d'adhérence entre les cadhérines et des différents rôles joués dans la migration (*voir IV-A-6*).

IV.A.4. Les jonctions d'adhérence dans la migration collective

Pendant le développement, les mouvements collectifs du mésoderme chez le *poisson zèbre* (Arboleda-Estudillo et al., 2010) ou la formation de la trachée (Shaye et al., 2008) et des canaux mammaires chez les mammifères (Ewald et al., 2008) requièrent l'adhérence dépendante des cadhérines.

Les JAs permettent l'ancrage de filaments d'actine transversaux et maintiennent la cohésion du groupe de cellules

Tout d'abord, les cadhérines maintiennent la cohésion intercellulaire lors de la migration collective grâce à leur lien avec le cytosquelette d'actine. En effet, les complexes cadhérines/caténines sont associés à la fois à des fibres d'actine qui courent le long de la membrane plasmique en contact avec la cellule voisine, mais aussi avec des **filaments d'actine perpendiculaires** à la membrane plasmique. Ces filaments, enrichis en myosine II et arrangés de manière antiparallèle sont ancrés aux JAs et semblent relier mécaniquement les cellules entre elles. L'accumulation de ces filaments d'actomyosine transversaux aux JAs, en périphérie du groupe, participe notamment à la cicatrisation de l'épithélium et à la fermeture dorsale chez la *drosophile* (Jacinto et al., 2002; Martin and Parkhurst, 2003). L'altération de l'organisation du réseau d'actomyosine aux jonctions d'adhérence résulte en une perturbation de la migration collective et une augmentation de la migration individuelle (Hidalgo-Carcedo et al., 2011).

L'inhibition de motilité après contact : plus qu'un frein à la migration, un aiguilleur de la migration collective dirigée

D'autre part, les cadhérines promeuvent un comportement coordonné des cellules en inhibant la formation des protrusions aux contacts intercellulaires et en favorisant leur formation aux bords libres des cellules (Theveneau et al., 2010). Ce phénomène correspond à **l'inhibition de motilité après contact (IMC)**, découvert par Abercrombie et Heaysman il y a 60 ans (Abercrombie and Heaysman, 1953; Abercrombie and Heaysman, 1954). Ainsi, la N-cadhérine permet la migration collective des cellules de la crête neurale attirées par un gradient de chimiokine (**Figure 31c**). Chaque cellule du groupe étant intrinsèquement mobile, l'absence complète de régulation de leur migration aboutirait à la déstabilisation du tissu. Aussi, après contact avec une cellule X exprimant la cadhérine, la cellule en migration stoppe-elle son mouvement vers X et émet-elle une protrusion vers le bord libre (Theveneau et al., 2010). Ce phénomène fait intervenir l'inhibition locale, aux JAs, de Rac1 (**Figure 31c**). La cellule en migration change alors de direction, se remet à migrer jusqu'à la rencontre d'une nouvelle cellule avec laquelle ce phénomène se produira à nouveau, et ainsi de suite (**Figure 31a**). On

comprend mieux ainsi comment un groupe de cellules peut maintenir son cap vers un chimioattractant sans se désunir.

Les interactions adhésives entre cellules et l'inhibition de motilité après contact contribuent à la stabilisation de l'organisation des cellules en limitant leur enchevêtrement.

On peut se demander cependant si, en absence de chimioattractant, cette motilité contrainte peut, à elle seule, diriger la migration d'un groupe de cellules sur de longues distances. Si l'une des cellules du groupe devient plus mobile ou plus résistante aux forces appliquées que le reste du groupe, et que la cohésion persiste, la migration sera dirigée par la cellule meneuse (**Figure 31b**). Il suffit donc d'augmenter ou de restreindre spatialement la motilité cellulaire pour permettre une migration collective dirigée (Rorth, 2011). On observe ce phénomène notamment lors de l'invasion de cellules cancéreuses qui suivent des voies permissives tracées dans la matrice par des cellules guides (Friedl and Gilmour, 2009; Gaggioli et al., 2007).

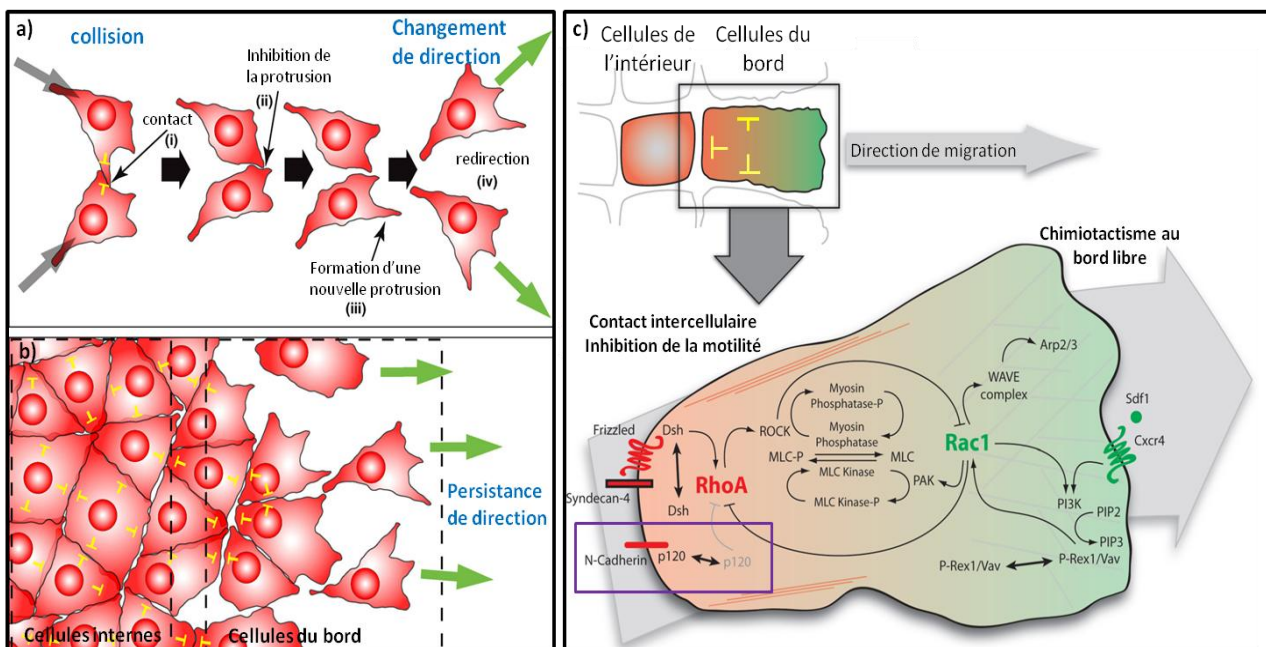


Figure 31 : Rôles de l'inhibition de la motilité après contact dans la migration collective.

Inhibition de la motilité après contact (IMC, représentée par les T jaunes) dans des cellules isolées A) ou en groupes B) et C). Les schémas A) et B) ne prennent pas en compte la présence d'un gradient de chimioattractant. A) La collision entre deux cellules conduit à la rétraction de la protrusion et à un changement de direction de migration (flèches vertes). Les 4 étapes de l'IMC correspondent aux chiffres romains (i, ii, iii, iv) du schéma. B) Dans un groupe de cellules, l'IMC des cellules internes inhibe la formation de protrusion et favorise l'extension de protrusion aux bords de libres. Cela aboutit à la polarisation des cellules meneuses et à la migration dirigée. C) Exemple des mécanismes moléculaires à l'œuvre lors de la migration dirigée des cellules de la crête neurale. L'intégration des différents signaux moléculaires résultant de l'IMC et du chimiotactisme de Sdf1 résulte en un ratio RhoA/Rac1 asymétrique dans la cellule, permettant sa polarisation. Aux jonctions, Rac 1 est inhibée par l'activation locale de RhoA, notamment via la p120ctn et ses partenaires. L'activité de Rac1 est ainsi restreinte au bord libre où elle active notamment la polymérisation de l'actine. Cette activation asymétrique de ces 2 RhoGTPases lors de l'IMC permet une migration dirigée. a) et b) sont adaptés de (Mayor and Carmona-Fontaine, 2010) et c) de (Theveneau and Mayor, 2010).

IV.A.5. Les contacts dépendants des cadhérines restreignent la migration cellulaire individuelle

Dans le système de migration des cellules de la crête neurale, la perte de la N-cadhérine empêche la migration collective, mais elle favorise la séparation des cellules et leur migration individuelle (Theveneau et al., 2010). La N-cadhérine est, en effet, largement exprimée dans le neuroépithélium mais devient sous-exprimée dans les cellules de la crête neurale avant leur migration. La perte d'adhérence, par rapport aux cellules voisines qui en résulte, est un élément déclencheur de leur migration (Hatta and Takeichi, 1986; Nakagawa and Takeichi, 1995). Ce procédé qui consiste à diminuer l'adhérence des cellules entre elles pour permettre le décrochage de groupes de cellules, et leur migration, est à l'œuvre pendant le développement de nombreux tissus (Baum et al., 2008). Ainsi, les cellules endothéliales soumises à un traitement par la thrombine diminuent-elle la solidité de leur JAs et migrent hors des parois endothéliales pour promouvoir la formation de nouveaux vaisseaux (Stepniak et al., 2009). Les neurones néoformés, chez l'oiseau adulte, diminuent leur niveau de N-cadhérine avant de pouvoir migrer le long de la glie radiaire et sortir de la zone sous-épendymale (Barami et al., 1994).

Cette diminution du niveau de cadhérine, préalable à la migration, a été étudiée principalement dans les cellules épithéliales. Elle est à l'origine de la progression métastatique des carcinomes (*voir partie IV-B*) mais aussi de nombreux mouvements morphogénétiques comme la formation du mésoderme à partir de l'ectoderme primitif lors de gastrulation (Yang and Weinberg, 2008). C'est la **transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)** dont l'altération des JAs est une caractéristique majeure.

Dans de très nombreux cas, y compris dans les exemples précédents, la diminution d'un type de cadhérine prépondérant dans le tissu environnant est corrélée avec l'expression d'un autre type de cadhérine qui favorisera, à ce moment là, la migration cellulaire. On parle **d'échange de cadhérine** ou « **cadherin switching** ». Après la perte de la N-cadhérine, les cellules de la crête neurale se mettent à exprimer la cadhérine 6b puis ensuite la cadhérine 11 (Clay and Halloran, 2010). Les neurones néoformés chez le canari adulte expriment lors de leur migration la molécule d'adhérence L1 (Ng-CAM) (Barami et al., 1994). Les cellules épithéliales, elles, après la perte de la E-cadhérine exprime la N-cadhérine.

Pour résumer, les JAs peuvent avoir des effets distincts, voir opposés, sur la migration cellulaire. En fonction du type cellulaire et du microenvironnement, les JAs favorisent la migration individuelle, la migration collective coordonnée ou participent à l'inhibition de la motilité après contact.

Compte tenu des nombreuses fonctions des jonctions adhérentes dans la migration cellulaire, on conçoit aisément qu'une altération de leur intégrité ait des conséquences dramatiques pour l'organisme. Outre les défauts de développement embryonnaire générés, la perte des protéines formant les JAs participe à la progression invasive cancéreuse.

IV.B. La dérégulation des cadhérines dans les carcinomes invasifs

La capacité des cellules cancéreuses à se disséminer et à former des métastases à distance de la masse tumorale initiale est, dans 90% des cas, la cause de la mortalité associée au cancer (Gupta and Massague, 2006). La compréhension du mécanisme à l'origine du détachement des cellules cancéreuses de la masse tumorale est fondamentale en vue de trouver un jour un traitement anticancéreux.

Les travaux de Coman au milieu du XX^{ème} siècle ont montré que les cellules tumorales adhèrent moins solidement entre elles que ne le font des cellules non tumorales (Brugmans et al., 1978; Coman, 1944). Les cadhérines jouant un rôle clé dans les mouvements cellulaires du développement embryonnaire (Takeichi, 1991), elles sont des candidats majeurs pouvant relier l'adhérence intercellulaire et l'invasion tumorale.

Compte tenu de la prépondérance des cancers épithéliaux (95% de l'ensemble des cancers), davantage de données ont été accumulées sur l'altération de la E-cadhérine dans la propagation des cellules tumorales.

IV.B.1. Les altérations de la E-cadhérine favorisent la progression métastatique des tumeurs épithéliales

Dans la majorité des tumeurs épithéliales, l'absence ou la diminution d'expression de la E-cadhérine est associée à des cancers de haut-grade au fort potentiel invasif. De plus, à part quelques exceptions dans les tumeurs épithéliales ovariennes ou les cancers du sein inflammatoires (Rodriguez et al., 2012; Strumane et al., 2004), le taux d'expression de la E-cadhérine est souvent inversement corrélé avec la médiane de survie des patients (Birchmeier and Behrens, 1994; Vasioukhin, 2012) (**Figure 32b**). Néanmoins, les études d'association et de corrélation ne fournissent pas de preuves formelles que l'altération du niveau de la E-cadhérine déclenche ou favorise l'invasion tumorale.

L'utilisation de modèles génétiques *in vitro* et *in vivo* a permis de montrer que l'inhibition de la E-cadhérine était capable de transformer des cellules épithéliales normales en cellules invasives, et d'accélérer la progression tumorale vers un phénotype invasif et métastatique (Perl et al., 1998; Vleminckx et al., 1991). La réexpression d'une E-cadhérine fonctionnelle dans des cellules tumorales pancréatiques sans E-cadhérine, diminue la fréquence de conversion des adénomes en carcinomes invasifs (Perl et al., 1998). Plus récemment, une autre étude *in vivo* a confirmé ce résultat : la délétion conditionnelle de la E-cadhérine dans l'épithélium mammaire d'une souris dépourvue de p53 favorise l'initiation d'une tumeur et sa progression invasive et métastatique (Derksen et al., 2006). Ces expériences *in vivo* apportent la preuve que la perte de la E-cadhérine est une étape essentielle à l'acquisition d'un phénotype invasif par la tumeur

IV.B.2. Les mécanismes à l'origine de la diminution d'expression de la E-cadhérine dans les carcinomes

Perte d'hétérozygotie et mutations inactivantes

Quelques années après la localisation du gène codant pour la E-cadhérine (*CDH1*) sur le chromosome 16 (16q22.1), on découvrit que la perte d'hétérozygotie 16q était un événement très fréquent dans les carcinomes gastriques, de la prostate, de l'œsophage et surtout du sein, où elle est présente dans plus de 50% des cas (Cleton-Jansen et al., 2001; Strumane et al., 2004). De plus, des mutations somatiques inactivantes de *CDH1*, touchant principalement le domaine

extracellulaire adhésif, ont été répertoriées principalement dans les cancers diffus de l'estomac et les cancers du sein lobulaires (Berx et al., 1995; Berx et al., 1996). De manière caractéristique, ces mutations sont associées à une perte d'hétérozygotie de l'allèle restant et sont corrélées avec une progression invasive et métastatique de la tumeur (Jeanes et al., 2008). Par ailleurs, dans plus de 30% des cancers gastriques diffus héréditaires on observe des mutations germinales dans le gène *CDH1* (Guilford et al., 1998; Oliveira et al., 2006) suggérant un rôle de tumeur suppresseur agissant en amont dans le développement de certaines tumeurs.

Extinction épigénétique et répression transcriptionnelle de *CDH1*

Pendant la progression tumorale, l'hyperméthylation du promoteur de *CDH1* est un événement épigénétique associé fréquemment à la perte d'expression de la E-cadhérine. La méthylation aberrante d'un large îlot CpG dans la région 5' proximale du promoteur observée dans au moins huit carcinomes humains différents est corrélée avec l'expression réduite de la E-cadhérine (Graff et al., 1995; Yoshiura et al., 1995). Le recrutement des histones déacétylases (Koizume et al., 2002) et des répresseurs de la transcription (Takeno et al., 2004) aux zones hyperméthylées du promoteur contribue à l'extinction du gène.

Ces répresseurs de la transcription font principalement partie des familles de facteurs de transcription à doigt de zinc Snail/slugs et ZEB (SIP1/ZEB2 et ZEB1) et sont surexprimés dans les carcinomes de haut grade (Moreno-Bueno et al., 2008). Les facteurs E47 et Twist1 de la famille des bHLH (basic helix-loop-helix) régulent directement (E47) ou indirectement (Twist1) l'expression de la E-cadhérine et sont associés à un phénotype invasif des cellules épithéliales (Yang and Weinberg, 2008). Plus récemment, Slorach et ses collègues ont découvert Zeppo1, un nouveau répresseur de la E-cadhérine surexprimé dans les cancers du sein. La surexpression de Zeppo1 dans un modèle murin de tumeur mammaire augmente le nombre de métastases aux poumons (Slorach et al., 2011).

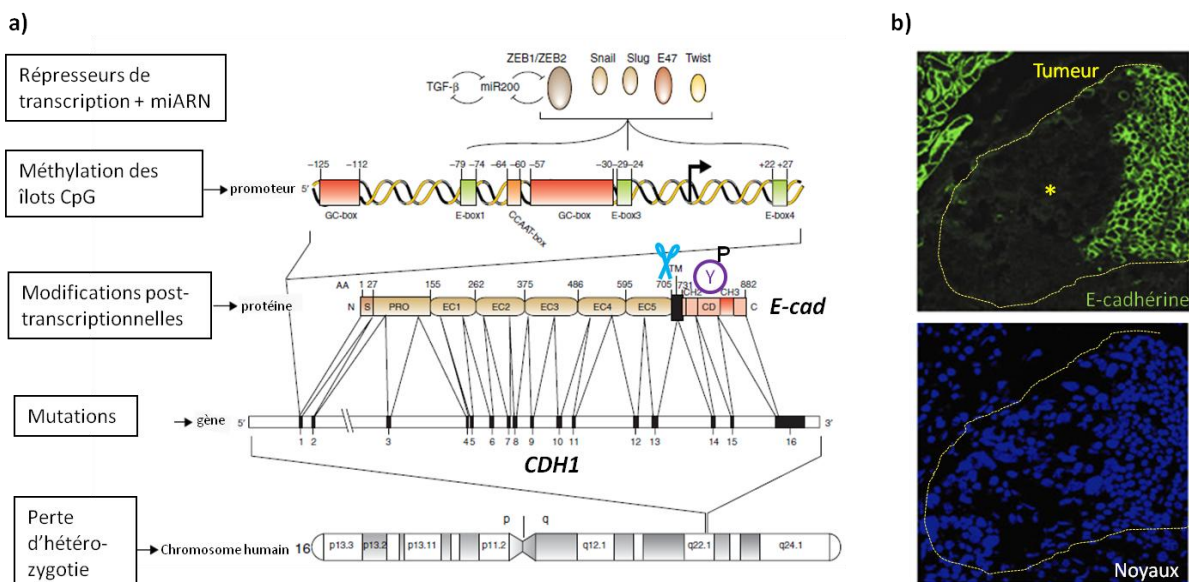


Figure 32 : Les principaux mécanismes responsables de la diminution de l'expression de la E-Cadhérine dans les carcinomes.

A) Différents niveaux de régulation de l'expression de la E-cadhérine. Voir le texte de la partie IV-B-2 pour plus de détails. Adapté de (Berx and van Roy, 2009) **B)** Coupe d'une tumeur des cellules β du pancréas (modèle murin) montrant la perte d'expression de la E-cadhérine (astérisque) au cours de la progression tumorale. Noter la morphologie allongée des noyaux des cellules dépourvues de E-cadhérine, signe d'un phénotype plus invasif. Adaptée de (Cavallaro and Christofori, 2004).

Modifications post-transcriptionnelles par les micros ARNs

D'autre part, de nombreux micros ARN (miARN) contrôlent la traduction des ARNm codant pour la E-cadhérine en se fixant à leur région 3' UTR. C'est le cas de miR-9, dont la surexpression dans des lignées cancéreuses non invasives entraîne la formation de métastases (Ma et al., 2010). De même, miR-92a est surexprimé dans des carcinomes œsophagiens où il promeut la migration et l'invasion tumorale (Chen et al., 2011). Enfin, certains miARNs comme miR-200 régulent indirectement le niveau de l'E-cadhérine en réprimant l'expression de son répresseur de transcription ZEB1 (Burk et al., 2008).

Modifications post-traductionnelles : régulation de l'endocytose, de la dégradation et du clivage de la E-cadhérine

Les cadhérines formant des jonctions d'adhérence sont constamment renouvelées à la membrane plasmique grâce à une régulation fine de leur endocytose et de leur recyclage aux sites de contact. Cependant, l'activation anormale de proto-oncogènes comme cMet, l'EGFR ou Src, perturbe cette dynamique en augmentant notamment la phosphorylation de résidus tyrosine dans le domaine juxtamembranaire de la cadhérine. Cela induit un recrutement plus important de l'ubiquitine ligase Hakai aux jonctions, l'internalisation accrue de la E-cadhérine et sa dégradation dans les lysosomes (Shen et al., 2008). L'altération de la p120ctn, est un autre mécanisme pouvant entraîner une diminution de l'expression de la E-cadhérine (van Hengel and van Roy, 2007).

Enfin, de nombreuses protéases impliquées dans le clivage de la partie extracellulaire de la E-cadhérine sont surexprimées dans les carcinomes (Berx and van Roy, 2009). Notamment, la E-cadhérine est clivée par MMP-3, protéase dont le niveau est régulé par la N-cadhérine (Suyama et al., 2002; Xian et al., 2005). De plus, la protéase ADAM15, qui est associée à la progression des cancers du sein et de la prostate, clive la E-cadhérine et libère des fragments solubles. *Pour plus de détails, le lecteur peut se référer aux revues (Berx and van Roy, 2009; De Wever et al., 2007).*

Les fonctions anti-invasives et anti-métastatiques de la E-cadhérine sont maintenant clairement établies dans la plupart des carcinomes. Cependant, la façon dont la perte de la E-cadhérine induit une progression agressive de la tumeur n'a pas encore été démontrée. Est-ce seulement via la diminution de l'adhérence intercellulaire et la promotion du détachement des cellules tumorales au début du processus métastatique ? Ou la perte de la E-cadhérine entraîne-t-elle également l'altération des voies de signalisation régulant l'invasion cellulaire ?

IV.C. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et l'infiltration des tumeurs épithéliales.

IV.C.1. Le changement d'expression des cadhérines lors de la TEM

Pendant le développement embryonnaire, la transition épithélio-mésenchymateuse se produit de manière contrôlée dans de nombreux tissus. Elle provoque la migration des cellules qu'elle transforme et participe à la morphogénèse des organes. Au cours de ce processus, les cellules épithéliales changent de morphologie et de comportement pour devenir motiles et invasives. Les cellules perdent leur polarité apico-basale, se détachent de l'épithélium, prennent une morphologie mésenchymateuse fusiforme et infiltrent le tissu interstitiel (**Figure 33**). La TEM est associée à des modifications d'expression de certaines protéines essentielles comme

les **filaments intermédiaires**, avec la diminution du taux de kératine et l'augmentation de la vimentine, ou les **cadhérines**, avec la perte de la E-cadhérine et la hausse du niveau de la **N-cadhérine** (Yang and Weinberg, 2008). L'expression de la N-cadhérine est activée par les répresseurs transcriptionnels de la E-cadhérine lors de la TEM (Cano et al., 2000; Vandewalle et al., 2005). De plus, dans certains types cellulaires, la perte de la E-cadhérine conduit à l'hyperactivation de NFκB et à l'augmentation du niveau d'expression de la N-cadhérine (Kuphal and Bosserhoff, 2006), sans doute via la dérégulation de la p120ctn (Perez-Moreno et al., 2006).

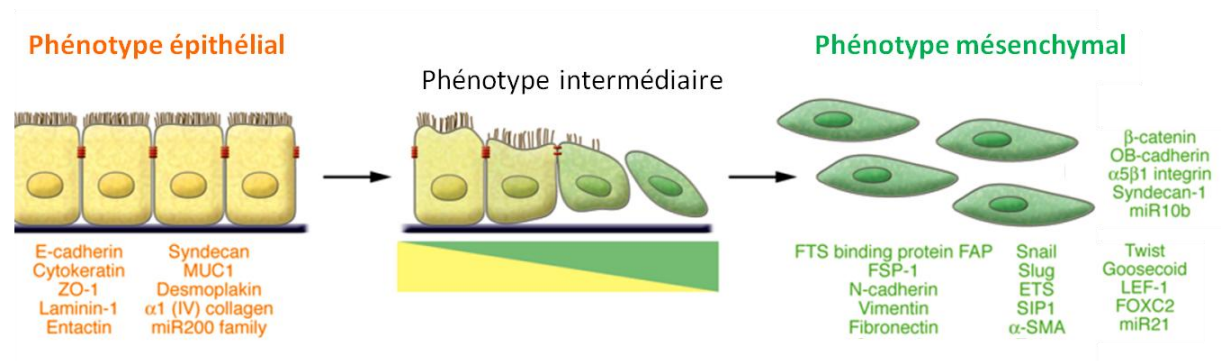


Figure 33 : La transition épithélio-mésenchymateuse.

Perte du phénotype épithélial (orange) et acquisition progressive d'un phénotype mésenchymateux (vert). Plus de détails dans le texte ci-dessus. Chaque phénotype est caractérisé par l'expression des marqueurs listés. Adapté de (Kalluri and Weinberg, 2009)

De nombreuses études ont montré ces dernières années qu'une TEM peut se produire anormalement dans certains adénomes ou hyperplasies épithéliales et conduire à la dissémination des cellules tumorales (Thiery and Sleeman, 2006). En effet, dans la majorité des tumeurs épithéliales de hauts-grades, on retrouve la signature d'une TEM, associant la perte de la E-cadhérine à l'augmentation du niveau de la N-cadhérine (Wheelock et al., 2008). L'altération de la E-cadhérine dans ces tumeurs ne serait que la conséquence d'un programme du développement embryonnaire anormalement activé lors de la progression tumorale par différents signaux, comme TGFβ (Janda et al., 2002).

Les conséquences fonctionnelles d'une TEM sur des cellules tumorales sont dramatiques au niveau de l'organisme. Elle convertit des cellules à fort potentiel prolifératif mais encore immobiles et adhérentes en cellules invasives capables de franchir la lame basale sous-jacente, d'envahir le tissu interstitiel avoisinant et de passer dans la circulation sanguine.

IV.C.2. L'induction d'un phénotype invasif : le rôle de la N-cadhérine

En plus des effets consécutifs à la diminution du niveau de la E-cadhérine (perte d'adhérence, altérations de la polarité cellulaire et de l'inhibition de motilité après contact, entre autres), l'augmentation de l'expression de la N-cadhérine par les cellules tumorales favorise en elle même l'invasion. Sa surexpression dans des cellules de tumeurs épithéliales du sein exprimant encore la E-cadhérine suffit à leur conférer des capacités migratrices, invasives et métastatiques (Nieman et al., 1999). La N-cadhérine augmente le potentiel invasif des carcinomes à la fois en **modulant la signalisation** de FGFR (Suyama et al., 2002) mais aussi en permettant l'interaction des cellules tumorales avec les cellules du tissu conjonctif environnant (**Figure 34**). En effet, l'**interaction** avec les cellules du **stroma** et les cellules

endothéliales de l'hôte (qui expriment la N-cadhérine) favoriserait la pénétration des cellules métastatiques dans la circulation sanguine et leur survie dans des organes secondaires (Hazan et al., 2000).

En plus de favoriser le détachement et la migration individuelle des cellules tumorales, l'échange de cadhérines pourrait faciliter **l'invasion collective** observée dans de nombreuses tumeurs. La perte de la E-cadhérine faciliterait le détachement de la masse tumorale et l'expression de la N-cadhérine suffirait à maintenir le groupe cohésif et à diriger la migration vers les vaisseaux sanguins, par exemple. En outre, l'expression de la N-cadhérine permet aux cellules tumorales d'interagir avec les fibroblastes associés aux cancers (FACs). Ceux-ci ont été récemment décrits comme jouant un rôle prépondérant dans l'invasion tumorale. En effet, après activation par des signaux provenant de la tumeur, les FACs sont recrutés au front d'invasion où ils remodelent la matrice extracellulaire, la rendant plus permissive (Gaggioli et al., 2007).

Ensuite, la stimulation de l'expression de la N-cadhérine pendant la TEM aboutit à la synthèse de N-cadhérine immatures. La présence à la membrane plasmique d'une quantité importante de précurseurs de la N-cadhérine non adhésifs favoriserait le détachement des cellules de la masse tumorale et augmenterait la motilité des cellules (Maret et al., 2010).

Enfin, des fragments solubles de la N-cadhérine résultant du clivage de leur partie extracellulaire, sont retrouvés fréquemment dans le sérum de patients atteints de cancer de la prostate ou du pancréas (De Wever et al., 2007). Outre le rôle de marqueur pronostique que pourrait jouer la N-cadhérine soluble, ce clivage tend à affaiblir l'adhérence intercellulaire et à promouvoir la migration et l'invasion cellulaires (Niessen et al., 2011).

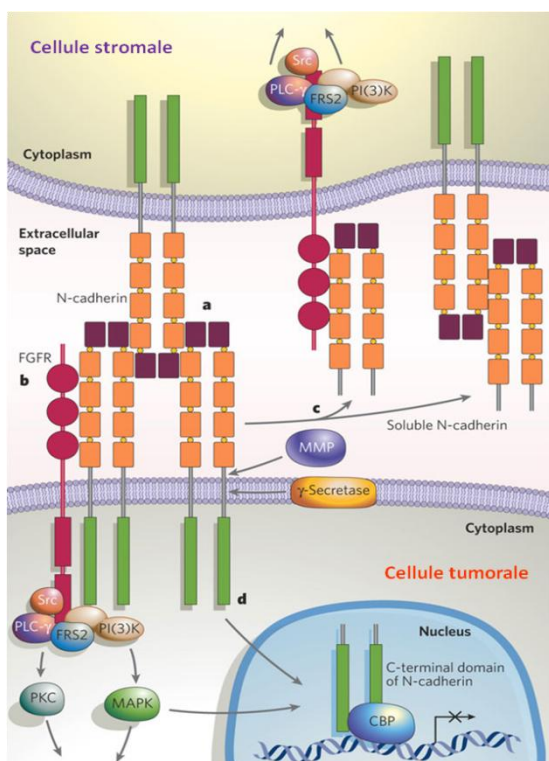


Figure 34 : Principaux rôles joués par la N-cadhérine lors de l'invasion tumorale

Au cours de la TEM, la perte de la E-cadhérine est associée à une surexpression de la N-cadhérine. Celle-ci agit sur plusieurs mécanismes qui, tous, contribuent à l'invasion tumorale et à la formation de métastases : **a.** Adhérence dépendante de la N-cadhérine avec les cellules stromales. **b.** Liaison et activation des FGFRs et de ses effecteurs en aval, la phospholipase C (PLC), PI3K et MAPK. L'activation de ces voies de signalisation promeut la survie cellulaire, la migration et l'invasion. **c.** Protéolyse du domaine extracellulaire par les MMPs. La partie clivée ou N-cadhérine soluble neutralise l'adhérence dépendante des N-cadhérines et/ou stimule la signalisation des FGFRs des cellules avoisinantes. **d.** Clivage au niveau de la partie intramembranaire de la N-cadhérine par une γ -sécrétase. Le domaine C-terminal clivé est transporté dans le noyau, où il réprime l'expression des gènes sous contrôle du facteur de transcription CBP. Adaptée de (Christofori, 2006).

Le rôle de la N-cadhérine dans la progression tumorale et la formation de métastases des carcinomes est souligné par l'action positive sur la réduction de la tumeur de différents agents

inhibiteurs de sa fonction dans des modèles murins de cancer du pancréas (Shintani et al., 2008) et de la prostate (Tanaka et al., 2010).

D'autre part, dans les tissus non épithéliaux sains comme les tissus musculaires, nerveux, fibreux, osseux et adipeux, la N-cadhérine établit des jonctions adhérentes et assure les principaux contacts entre les cellules. Leur altération pourrait avoir des conséquences sur la formation de tumeurs associées à ces tissus. En effet, la N-cadhérine semble jouer un rôle important dans le développement des sarcomes musculaires (Charrasse et al., 2004; Soler et al., 1993) et des fibrosarcomes (Foty et al., 1998)

IV.D. Le rôle de p120ctn dans la croissance des cancers épithéliaux

La p120ctn apparaît sous-exprimée ou anormalement localisée dans la majorité des tumeurs humaines (van Hengel and van Roy, 2007). Elle est absente dans 17% des cas de cancer de la vessie et dans 58% des cas de cancer de la peau (van Hengel and van Roy, 2007). De plus, le niveau de p120ctn est diminué dans 70% des cancers de la vessie (Nakopoulou et al., 2000) et dans 86% des cas de cancer du colon. La sous-expression de p120ctn dans de nombreuses tumeurs est associée à un faible taux de survie des patients.

Ces observations suggèrent que la diminution du niveau de p120ctn *in vivo* doit jouer un rôle dans la formation et la progression des tumeurs.

IV.D.1. *CTNND1*, le gène codant pour la p120ctn est un gène suppresseur de tumeur

L'utilisation de modèles animaux a permis de clarifier les fonctions de la p120ctn dans la progression tumorale. Les souris KO pour la p120ctn meurent pendant le développement embryonnaire (Stairs et al., 2011). La déplétion ciblée de la p120ctn dans les glandes salivaires aboutit à des malformations ou dysplasies mais pas à un cancer (Davis and Reynolds, 2006). De même, les souris KO conditionnels dans la peau présentent des hyperplasies épidermales associées à des anomalies mitotiques fréquentes et une inflammation chronique, mais ne forment pas spontanément de tumeur (Perez-Moreno et al., 2006; Perez-Moreno et al., 2008). Cependant, la preuve formelle du rôle de *CTNND1* comme **gène suppresseur de tumeur** a été apportée récemment avec la délétion conditionnelle de la p120ctn dans la cavité orale, l'œsophage et l'estomac. Dans ces tissus, la perte de la p120ctn génère des cancers au phénotype identique à ceux observés chez l'homme (Stairs et al., 2011) (**Figure 35**).

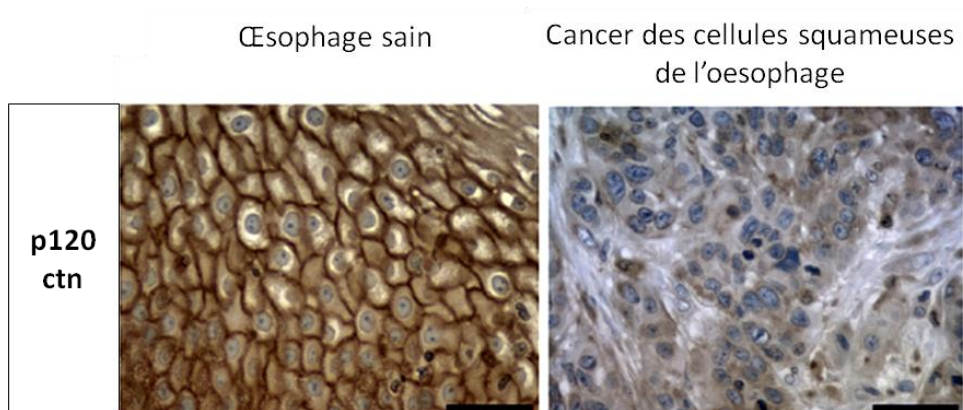


Figure 35 : Sous-expression de la p120ctn dans un cancer de l'œsophage

Immunohistochimie révélant la présence de p120ctn (marron) à la membrane plasmique des cellules saines de l'œsophage. Dans les cellules squameuses cancéreuses son niveau global est fortement diminué et sa localisation essentiellement cytoplasmique. Barre d'échelle : 50µm. (Stairs et al., 2011).

IV.D.2. p120ctn et l'invasion tumorale

Lors de la progression tumorale, la p120ctn est touchée soit par une **sous-expression globale** soit par une **redistribution dans le cytoplasme**.

Effet de la sous-expression globale de la p120ctn sur l'invasion tumorale

La perte de la p120ctn régule l'invasivité en perturbant l'adhérence intercellulaire et sans doute en favorisant la sous-expression corrélée de la E-cadhérine, élément prépondérant de la transition épithélio-mésenchymateuse. Cependant les données *in vitro* et *in vivo* ne sont pas toutes cohérentes envers un rôle anti-invasif de la p120ctn. En effet, l'utilisation de siARN réduisant la quantité globale de p120ctn dans des cellules tumorales a pour conséquence de freiner l'invasion des cellules cancéreuses dérivées des cancers métastatiques du sein et du rein (Yanagisawa and Anastasiadis, 2006) et de la vulve (Macpherson et al., 2007). A contrario, de manière plus attendue, la diminution du niveau de la p120ctn favorise la dissémination des tumeurs et la formation de métastases dans d'autres cancers comme celui du poumon (Liu et al., 2009). Ces différences tiennent sûrement à l'environnement moléculaire différent entre ces tissus et notamment à la présence de facteurs de croissance différents pouvant affecter la phosphorylation de p120ctn et moduler son activité. D'autre part, le mode de migration et d'invasion de ces tumeurs peut jouer un rôle. En effet, les tumeurs nécessitant une migration collective pour envahir les tissus semblent plus prônes à la présence de la p120ctn pour accomplir leur tâche (Macpherson et al., 2007). La p120ctn stabiliserait l'adhérence dépendante des cadhérines mésenchymales (Yanagisawa and Anastasiadis, 2006) pour maintenir la cohésion du groupe et permettre l'interaction des cellules cancéreuses avec les cellules du stroma de l'hôte.

Effet de la redistribution cytoplasmique et nucléaire de la p120ctn sur l'invasion tumorale

Lorsque la perte de la E-cadhérine survient avant celle de la p120ctn, on observe plutôt une accumulation cytoplasmique de la p120ctn. Cette dernière n'est en effet plus retenue à la membrane plasmique par les jonctions dépendantes de la E-cadhérine. Contrairement à la β -caténine qui, une fois dans le cytoplasme est rapidement dégradée par le protéasome, la concentration cytoplasmique de p120ctn s'accroît considérablement (Thoreson et al., 2000). L'expression de la N-cadhérine à la place de la E-cadhérine au cours de la TEM ne permet pas de séquestrer complètement la p120ctn à la membrane plasmique puisque la stabilité de la liaison entre p120ctn et la N-cadhérine est moins forte que celle entre la E-cadhérine et p120ctn (Anastasiadis and Reynolds, 2001).

En inhibant RhoA et en activant Rac et Cdc42, la p120ctn pourrait être le régulateur majeur de la réorganisation du cytosquelette dans les cellules tumorales en cours de transformation mésenchymateuse (**Figure 36**). Ainsi, l'accumulation cytosolique de p120ctn dans un type de cancer du sein métastatique (carcinome lobulaire invasif) active indirectement Rho et ses partenaires, et confère une résistance à l'anoikis aux cellules tumorales (Schackmann et al., 2011).

De plus, dans certaines tumeurs comme celles du pancréas, la p120ctn est localisée dans le noyau (Mayerle et al., 2003) où elle pourrait réguler la transcription de gènes importants pour l'invasion tumorale. Dans le noyau, la p120ctn s'associe avec le répresseur transcriptionnel Kaiso et lève son inhibition de nombreux gènes cibles comme la metalloprotéase MMP-7 impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire ou des gènes de la voie canonique Wnt (van Roy and McCrea, 2005). Pour plus de détails le lecteur peut se référer à (Daniel, 2007).

La phosphorylation de p120ctn et le cancer

La p120ctn a été découverte comme étant le substrat le plus évident de la famille des tyrosine-kinases oncogéniques Src (Reynolds et al., 1989). La phosphorylation de la p120ctn sur ses tyrosines n'est possible que par une isoforme de Src capable de transformer une cellule en une cellule tumorale, suggérant un rôle de cette phosphorylation dans le processus oncogénique. Cette phosphorylation n'a lieu que si les deux protéines sont à la membrane plasmique (Thoreson et al., 2000). Elle devrait donc intervenir en amont de la progression tumorale, puisque p120ctn s'accumule progressivement dans le cytoplasme au cours de la TEM. Une étude récente a montré que l'expression de la p120ctn phosphorylée à la membrane plasmique était élevée dans des lésions de la cavité buccale potentiellement malignes, et que la progression de ces lésions en carcinomes s'accompagnait d'une relocalisation de la p120ctn phosphorylée dans le cytoplasme. L'étude conclut que la détection de la p120ctn phosphorylée pourrait être un marqueur de haut risque de progression des cancers des cellules squameuses de la cavité buccal (Ma et al., 2012). Il n'existe pour l'instant pas d'autre étude sur l'état de phosphorylation de la p120ctn dans des échantillons de tumeur humaines *in vivo*. De plus, il n'existe pour l'instant aucune étude rapportant un rôle de la phosphorylation de la p120ctn sur ses résidus sérine/thréonine dans l'invasion tumorale.

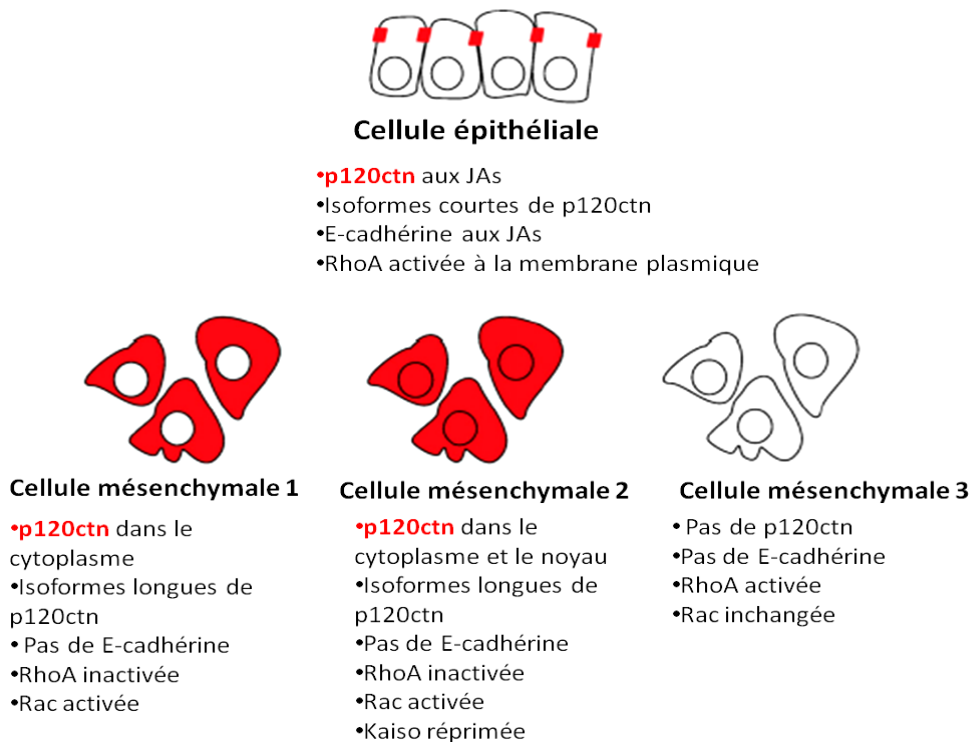


Figure 36 : Diverses localisations et expressions de p120ctn pendant la transition épithélio-mésenchymateuse.

Dans les cellules épithéliales, les isoformes courtes de la p120ctn (en rouge) sont localisées aux JAs où leur régulation des RhoGTPases permet de maintenir des jonctions solides. Les cellules mésenchymateuses et les cellules tumorales épithéliales peu différenciées, très malignes et invasives expriment au contraire des isoformes longues de la p120ctn. Celles-ci, suite à la perte d'expression de la E-cadhérine sont localisées préférentiellement dans le cytoplasme où elles inactivent Rho et activent Rac, et dans le noyau où, en s'associant à Kaiso elles activent des gènes favorables à la progression tumorale. Enfin, dans certaines tumeurs, l'événement précurseur serait la perte de la p120ctn qui entraîne une dégradation accrue de la E-cadhérine. Adaptée de (van Hengel and van Roy, 2007).

Enfin, il semblerait que, dans des cellules issues de tumeur du pancréas, la N-cadhérine s'associe préférentiellement avec l'isoforme longue de p120ctn (p120ctn 1) phosphorylée sur des résidus tyrosines, tandis que la E-cadhérine interagirait avec l'isoforme courte (p120ctn-3) non phosphorylée (Seidel et al., 2004). La différence, entre les isoformes de la p120ctn avec lesquelles les cadhérines se lient, pourrait expliquer pourquoi l'expression de la N-cadhérine, lors de la TEM, ne maintient pas la fonction anti-invasive de la E-cadhérine.

IV.E. L' α -caténine et la β -caténine dans la progression tumorale

Les autres caténines des jonctions adhérentes interviennent dans la progression tumorale soit directement en altérant l'expression des cadhérines soit indirectement via la dérégulation d'autres voies de signalisation. Si l' α -caténine semble directement impliquée dans l'invasion tumorale, la β -caténine joue davantage un rôle dans la croissance tumorale.

L' α -caténine dans les cancers

La délétion conditionnelle de l' α -caténine épithéliale, dans les cellules souches des follicules pileux, entraîne la formation de tumeur des cellules squameuses de la peau, suggérant un rôle de tumeur suppresseur pour l' α -caténine (Silvis et al., 2011). La perte de l' α -caténine est une caractéristique de nombreux cancers et constitue souvent un marqueur de mauvais pronostic (Benjamin and Nelson, 2008). Elle entraînerait la déstabilisation des jonctions adhérentes, mais, jouerait également un rôle dans la réorganisation des cytosquelettes d'actine et de microtubule non jonctionnels, et dans le contrôle du cycle cellulaire via la régulation des voies de signalisation Ras/MAPK, Hedgehog et Hippo (Maiden and Hardin, 2011).

En outre, l' α -caténine joue un rôle prépondérant dans l'invasion tumorale puisque sa réexpression, dans des lignées cancéreuses dépourvues d' α -caténine, résulte en un retour à un phénotype épithélial et à une atténuation de l'invasion cellulaire (Ewing et al., 1995; Watabe et al., 1994).

La β -caténine dans les cancers

La β -caténine influence la progression tumorale via son rôle dans le complexe cadhérine/caténine, mais aussi, comme composant principal de la voie de signalisation Wnt. En présence de Wnt, la β -caténine est transloquée dans le noyau où elle active la transcription de nombreux gènes favorables au développement de la tumeur dont *MYC*, *CCND1* et *MMP7*. Les mutations, entraînant à la fois une perte de fonction et un gain de fonction de la β -caténine, sont des événements fréquents dans les cancers humains. Elles ont pour conséquence *in fine* d'altérer l'adhérence intercellulaire et d'activer la transcription de gènes oncogéniques, deux mécanismes favorables à la progression tumorale (Hajra and Fearon, 2002).

OBJECTIFS

Le laboratoire Polarité cellulaire, Migration et Cancer dirigé par le Dr Sandrine Etienne-Manneville travaille sur l'identification et la caractérisation des voies de signalisation contrôlant la migration astrocytaire, dans le but de comprendre comment sont régies la polarité et la migration cellulaires en général. Récemment, le laboratoire s'est tourné vers la recherche d'altérations potentielles de ces voies dans les gliomes. Des découvertes de cet ordre permettraient une meilleure caractérisation des gliomes et de leur mode de migration, ainsi que l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour pouvoir traiter ces tumeurs encore incurables.

Ma thèse s'est située à la croisée de ces axes de recherche.

OBJECTIF n°1 : Caractériser les anomalies transcriptomiques des gliomes.

J'ai tout d'abord voulu chercher dans les gliomes des modifications d'expression de gènes déjà connus pour contrôler la **migration astrocytaire**. Parallèlement, j'ai voulu découvrir de nouveaux gènes altérés dans les gliomes les plus agressifs et comprendre leur rôle dans la migration astrocytaire.

⇒ Pour ce faire, j'ai analysé les résultats d'une étude transcriptomique à grande échelle réalisée sur plus de 130 gliomes de différents grades et 3 cerveaux sains, dans le laboratoire de neuro-oncologie expérimentale du Pr Jean-Yves Delattre (CRICM, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière). *Les résultats de cette analyse sont traités dans la partie I.*

OBJECTIF n°2 : Découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques et des marqueurs diagnostiques de l'invasivité des gliomes.

J'ai cherché ensuite à corrélérer les altérations des niveaux d'expression des gènes cibles avec les caractéristiques phénotypiques de l'invasion des gliomes, afin d'établir des marqueurs diagnostiques de l'invasivité. En effet, à cause de l'absence de marqueur fiable, les médecins ne prennent pour le moment pas en compte **l'invasivité comme critère de diagnostic** et des gliomes non diffus sont traités de manière identique aux gliomes à infiltration rapide. Or, associé aux nouveaux traitements anti-angiogéniques et chimiothérapeutiques, un traitement ciblant spécifiquement l'invasion des cellules gliales cancéreuses améliorerait considérablement le pronostic de cette maladie.

⇒ Pour remplir cet objectif, j'ai collecté des échantillons de glioblastomes que j'ai mis en culture. J'ai utilisé ces cellules « primaires » dans des tests de migration *in vitro* et étudié leur comportement migratoire après manipulation artificielle des gènes cibles. Ensuite, en collaboration avec le neuro-chirurgien Laurent Capelle et le Dr Marc Sanson, j'ai réalisé une étude comparative de l'expression des gènes cibles (objectif 1) dans des gliomes clairement non invasifs et très invasifs. Cette étude a permis de mettre en évidence des potentiels marqueurs de l'invasivité *in vivo*.

Ces résultats sont traités dans la partie I.

OBJECTIFS n°3 : Déterminer le rôle des jonctions adhérentes dans la migration des astrocytes sains et tumoraux.

1) Parmi les différentes anomalies transcriptomiques que j'ai mises en évidence, je me suis concentré sur l'altération des molécules des jonctions adhérentes et sa conséquence sur la migration des astrocytes sains et des gliomes.

Je me suis intéressé en particulier au **rôle des cadhérines** dans la migration des astrocytes sains et tumoraux puisqu'une observation récente du laboratoire a mis en évidence un rôle fondamental de la N-cadhérine dans l'établissement d'un axe de polarité intrinsèque (Dupin et al., 2009). Cette étude a confirmé une étude parue parallèlement (Desai et al., 2009). Si ce résultat a été obtenu sur des astrocytes et des cellules de gliomes **immobiles**, il est intéressant de se demander si les jonctions dépendantes de la N-cadhérine ne sont pas également responsables du maintien de la polarité et de la directionnalité des cellules lors d'une **migration collective** dirigée.

Si tel est le cas, compte tenu des conséquences de la perte de la polarité cellulaire sur le développement invasif des cancers (Humbert et al., 2003; Iden and Collard, 2008), **l'altération de la N-cadhérine dans les gliomes pourrait-elle favoriser la dissémination de ces cellules tumorales comme la perte de la E-cadhérine favorise l'invasion des carcinomes?**

Les données issues de la littérature scientifique sur le sujet sont souvent contradictoires. Certaines études concluent à un rôle pro-invasif de la N-cadhérine dans les gliomes (Utsuki et al., 2002), quand d'autres évoquent un rôle anti-invasif (Asano et al., 2004; Perego et al., 2002). Ce fut un **objectif majeur de ma thèse** de tirer au clair les apparentes contradictions des données scientifiques actuelles.

⇒ Pour répondre à cette question et remplir l'objectif 4, j'ai analysé les caractéristiques de migration de cellules issues de glioblastomes exprimant des niveaux variés de N-cadhérine. Pour cela, j'ai utilisé le test de fermeture de blessure *in vitro*. J'ai également étudié la migration des cellules de glioblastomes ré-exprimant la N-cadhérine alors qu'elles en étaient dépourvues, afin de savoir si cela suffisait à restaurer un comportement migratoire normal d'astrocyte sain. Ces expériences m'ont permis de trancher entre un rôle pro- et anti-migratoire de la N-cadhérine dans les gliomes.

Ces résultats, obtenus avec la participation d'Emeline Camand, post-doctorante au laboratoire au début de ma thèse, sont traités dans la partie I-D.

2) Cette étude m'a ensuite amené à m'intéresser à la p120ctn. J'ai cherché à comprendre si cette protéine, qui est un suppresseur de tumeur contrôlant la stabilité des cadhérines aux JAs, était impliquée dans la dissémination des gliomes.

En d'autres termes, existe-t-il un lien causal entre la perte de la p120ctn et les capacités de migration et d'invasion accrues des gliomes? Si tel est le cas, comment la p120ctn régule-t-elle la migration cellulaire ?

⇒ Afin d'apporter des réponses à ces questions, j'ai effectué la même démarche que pour l'étude de la N-cadhérine (objectif 4). J'ai analysé les caractéristiques de migration de cellules primaires de glioblastomes exprimant des niveaux variés de p120ctn. De plus, grâce à l'utilisation d'ARNs interférents (siARN) dirigés contre la p120ctn, j'ai étudié les conséquences de la perte de la p120ctn sur la migration des astrocytes sains et des cellules de gliomes exprimant encore la p120ctn. J'ai utilisé ici divers tests de migration *in vitro* comme le test de fermeture de blessure et le test de migration radiale à partir d'un agrégat cellulaire (en 2D et en 3D).

OBJECTIF n°5 : Etudier la dynamique spatiotemporelle de la N-cadhérine au cours de la migration cellulaire.

Le rôle essentiel joué par la N-cadhérine et la p120ctn dans la migration des astrocytes et des cellules de gliomes m'a poussé à étudier le comportement de la N-cadhérine dans la migration collective. La dynamique des cadhérines pourrait jouer un rôle fondamental dans la régulation des deux phénomènes apparemment contradictoires que sont l'adhérence intercellulaire et la migration.

Si le turnover des cadhérines dans des cellules statiques d'épithélium ou d'endothélium a été largement étudié (Kowalczyk and Nanes, 2012), peu de données existent sur **la dynamique des cadhérines pendant la migration cellulaire**. S Rieger et ses collègues ont analysé le comportement de la N-cadhérine *in vivo* au cours de la migration neuronale chez le *poisson zèbre*. Ils ont mis en évidence une localisation à la membrane plasmique différente en fonction des phases de migration (Rieger et al., 2009). Mais la résolution et la fréquence d'acquisition des images utilisées ne permettent pas d'avoir une vision complète de la dynamique de la N-cadhérine.

⇒ Pour remplir cet objectif, j'ai construit des outils moléculaires performants afin de visualiser la N-cadhérine par fluorescence dans des cellules en migration sur des temps très longs, pouvant atteindre 24h à 48h. L'utilisation de techniques d'imagerie cellulaire de pointe comme le FRAP ou la photoconversion a permis de mettre en évidence les principales composantes de la dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration.

OBJECTIF n°6 : Chercher à intégrer la régulation de la dynamique de la N-cadhérine avec la régulation des autres processus cellulaires en jeu lors de la migration collective.

J'ai ensuite exploré les mécanismes moléculaires régulant la dynamique de la N-cadhérine. De l'initiation de la migration au contrôle de la directionnalité en passant par le processus de formation du front de migration, plusieurs voies de signalisation permettant une migration astrocytaire collective dirigée ont été découvertes au laboratoire. Un objectif majeur est de comprendre **comment la dynamique des jonctions adhérentes influence ce comportement migratoire et par quels moyens la régulation de la dynamique des JAs s'intègre dans la régulation des autres processus en jeu lors de la migration cellulaire**.

⇒ En utilisant les outils développés pour étudier la dynamique des JAs, ainsi que grâce à l'emploi de diverses drogues et siARNs j'ai pu commencer à caractériser les mécanismes de cette dynamique. Compte tenu du rôle de la p120ctn dans la dynamique des JAs dans les cellules d'épithéliums ou d'endothélium, statiques, je me suis particulièrement intéressé à sa fonction dans la régulation de la dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration. J'ai ensuite étudié la façon dont la fonction de p120ctn était régulée pendant la migration en m'attachant particulièrement au rôle de sa phosphorylation.

RESULTATS

I. Caractérisation moléculaire des gliomes

I.A. Caractérisation transcriptomique des gliomes axée sur les gènes dits de la migration : *modus operandi*

Afin de déterminer avec précision quelles sont les voies de signalisation altérées dans les gliomes et capables de participer à leur capacité invasive, je me suis attaché à connaître le niveau d'expression d'une centaine de gènes contrôlant la polarité, la migration et l'adhérence intercellulaire dans ces tumeurs.

Nous avons entamé une collaboration avec le laboratoire de neuro-oncologie expérimentale dirigé par le professeur Jean-Yves Delattre à l'Institut du Cerveau de la Moelle épinière de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière (Paris). Au sein de ce laboratoire, le Dr François Ducray venait d'obtenir les résultats d'une analyse transcriptomique réalisée sur des échantillons frais de plus de 130 gliomes à malignité variable, grâce aux puces Affymetrix (Human genome U133 plus 2.0) (**Figure 37**).

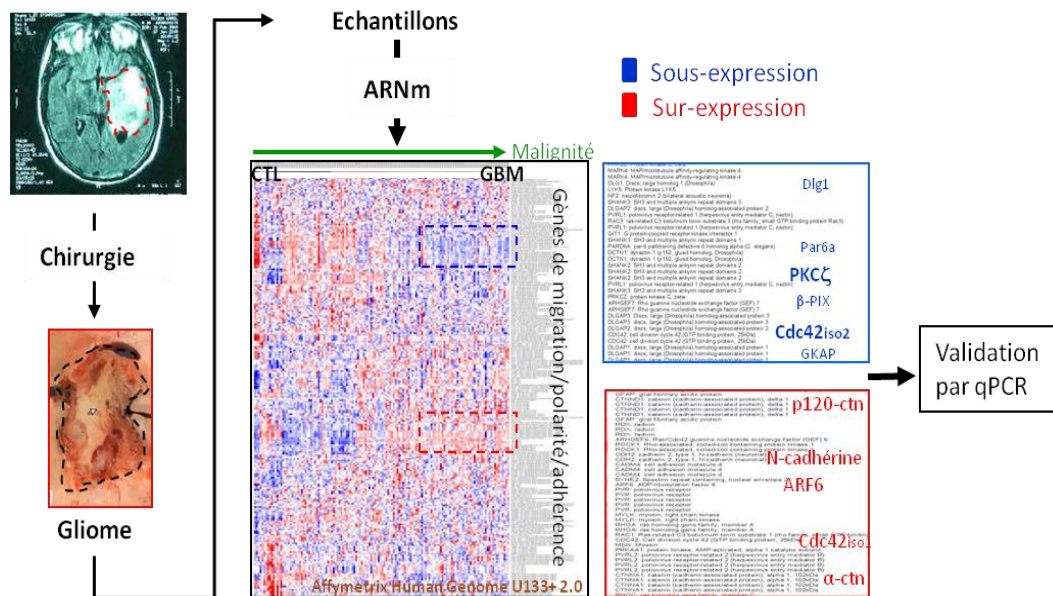


Figure 37: Analyse transcriptomique de 130 gliomes centrée sur les gènes de la migration
Mode opératoire: les échantillons de gliomes sont récoltés quelques heures après la chirurgie et l'extraction des ARNs est réalisée dans la foulée. Analyse de clustering non supervisé des puces Affymetrix U133+2.0. En abscisse, les échantillons de tissu : cerveau CTL d'un patient épileptique (n=3); gliome de grade I ou GI (n=4); gliome GII (n=26); gliome GIII (n=31); gliome GIV ou glioblastome/GBM (n=64). En rouge, les gènes surexprimés et en bleu, les gènes sous-exprimés. On note la mise en évidence de deux pools de gènes altérés dans les gliomes de haut-grade (encadré pointillé et ligne pleine), dont la sous-expression des acteurs de la voie de signalisation de Cdc42, régulant la polarité cellulaire dans la migration astrocytaire

Après normalisation des données, j'ai utilisé l'approche statistique d'analyse des variances pour comparer le niveau moyen d'expression des gènes dans les différents sous-groupes de gliomes (rangés par grades) et les cerveaux sains. Je me suis intéressé aux gènes les plus massivement altérés dans les gliomes de hauts-grades, puis j'ai validé leur dérégulation par PCR quantitative. De manière intéressante, certains gènes impliqués dans la persistance de direction au cours de la migration astrocytaire (*voir intro II-C-2*) sont sous-exprimés. C'est le cas de *CDC42*, *PARD6*, *PRKCZ*, suggérant une perte de la polarité cellulaire des gliomes de

hauts-grades. De l'autre côté, le gène *ARF6*, impliqué dans le trafic membranaire, et les gènes codants pour les protéines des jonctions d'adhérentes p120ctn, α -caténine (α -ctn) et N-cadhérine sont surexprimés par rapport à leur expression dans les cerveaux sains (**Figure 37**).

I.B. Altération de l'expression des principaux acteurs de la voie de signalisation de Cdc42

D'après l'étude Affymetrix, de nombreux acteurs de la voie moléculaire régulant l'orientation cellulaire pendant la migration astrocytaire sont altérés (Figure 36, encadré bleu). Je me suis plus particulièrement intéressé à l'acteur majeur de cette voie, Cdc42 et à certains de ses effecteurs telles les protéines aPKC.

I.B.1. Les deux isoformes de Cdc42 ne sont pas altérées de manière analogue dans les gliomes de haut-grade.

L'épissage alternatif du gène *CDC42* permet la synthèse de deux protéines, Cdc42 iso1 et Cdc42 iso2, qui diffèrent dans leur partie C-terminale (Nicole et al., 1999; Shinjo et al., 1990) (**Figure 38a**). La partie C-terminale de Cdc42 subit des modifications post-traductionnelles essentielles pour son ancrage aux membranes. (Kang et al., 2008). Les isoformes Cdc42 iso1 et iso2 sont également décrites comme, respectivement, les isoformes placentaires et cérébrales, en raison du tissu initial dans lequel elles ont été découvertes. Si l'isoforme 1 est ubiquitaire, l'isoforme 2 serait restreinte au tissu cérébral (Marks and Kwiatkowski, 1996).

L'analyse détaillée des données des puces Affymetrix met en évidence des différences d'altérations dans les gliomes entre les deux isoformes (**Figure 38b**). Le niveau d'expression de l'isoforme 1 ne diffère pas entre les gliomes et le cerveau sain. Par contre, l'isoforme 2 est très significativement sous-exprimée dans les gliomes (**Figure 38c, histogramme de gauche**). Les données de PCR quantitative (qPCR), technologie plus sensible donc plus précise, confirment les divergences entre les deux isoformes et les raffinent. Seuls les gliomes de haut-grade (GIII+GIV) présentent une sous-expression significative de l'isoforme 2, le niveau dans les gliomes de bas-grade (GII) n'étant pas différent du niveau dans les cerveaux sains (**Figure 38c, histogramme de droite**).

Au niveau protéique, l'utilisation d'un anticorps spécifique de l'isoforme 2 sur des lysats de cerveaux sains et de glioblastomes a permis de confirmer la sous-expression drastique de Cdc42 iso 2 dans les gliomes de haut-grade (**Figure 38d, western-blot de gauche**). En outre, afin d'éviter de possibles contaminations des échantillons par les tissus avoisinants lors de la biopsie, j'ai mis en culture trois glioblastomes (GBM). Confirmant les précédents résultats, les cellules primaires dérivées de ces GBM expriment Cdc42 iso 2 à un niveau beaucoup plus faible que les cellules des cerveaux sains (**Figure 38d, western-blot de droite**).

Comme de nombreux types de cellules tumorales (Etienne-Manneville, 2011), les cellules de GBM perdent leur capacité à maintenir un axe de polarité constant au cours de la migration (**Figure 40** et (Camand et al., 2012)). Or, cette fonction est, en grande partie, contrôlée par le recrutement de Cdc42 à l'avant de la cellule et l'activation spatialement restreinte de ses effecteurs Par6 et aPKC (Etienne-Manneville and Hall, 2001a).

Cdc42 iso2 étant l'unique isoforme de Cdc42 capable d'être palmitoylée (Kang et al., 2008) et par conséquent adressée à un certain type de domaines membranaires, son altération dans les gliomes est susceptible de jouer un rôle important dans la perte de polarité cellulaire des cellules de glioblastomes pendant leur migration. Une étude plus poussée des différents rôles des deux isoformes de Cdc42 dans la migration astrocytaire et tumorale est en cours au

laboratoire et permettrait notamment de comprendre la fonction remplie par la palmitoylation de Cdc42 dans les mécanismes que cette protéine contrôle.

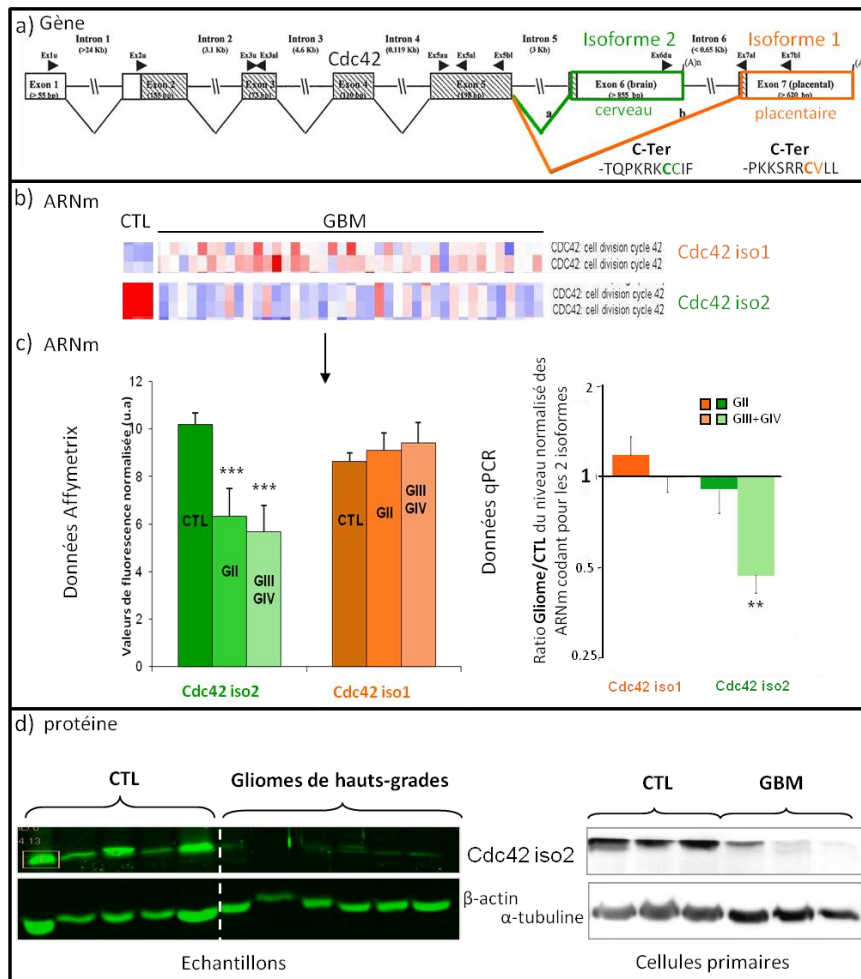


Figure 38 : Contrairement à l'isoforme 1, Cdc42 iso2 est sous-exprimée dans les gliomes : analyse transcriptomique et protéomique.

A) Schéma du gène humain *CDC42*, adapté de (Nicole et al., 1999). L'épissage altératif des exons 6 et 7 aboutit respectivement à la synthèse de l'isoforme 2 (ou cérébrale) et de l'isoforme 1 (ou placentaire). Ces deux protéines diffèrent uniquement par leur partie C-terminale et notamment par leurs quatre derniers acides aminés impliqués dans la palmitoylation de Cdc42. Plus précisément, le motif cystéine-cystéine (CC) semble être le site accepteur du groupe palmitoyle et serait responsable de la spécificité de cette modification post-traductionnelle à l'isoforme 2. **B)** Extrait du clustering non supervisé des puces Affymetrix montrant les différences d'altérations de la transcription de ces deux isoformes dans les GBM. **C)** Analyse quantitative de B) et validation par qPCR. Si la quantité d'ARNm codant pour Cdc42 iso1 reste inchangée dans les GBM par rapport au cerveau sain, Cdc42 iso 2 est sous-exprimée dans les gliomes de haut-grade. Les données de qPCR (histogramme de droite) sont normalisées par le gène de référence *ALAS1*. L'histogramme représente les valeurs du ratio gliomes/CTL pour les 2 isoformes et pour les différents types de gliomes : bas-grade, GII (n=17) et hauts-grade, GIII+GIV (n=29). T-test montrant la spécificité de la sous-expression de Cdc42 dans les gliomes de haut-grade (p-value=0.006). **D)** Immunodétection par Western Blot (WB) du niveau protéique de Cdc42 iso 2 dans des lysats de cerveaux sains (CTL, n=5) et de gliomes de haut-grade (n=6). Pour ce WB, le gène de référence utilisé est *ACTB*. Le WB de droite représente le niveau protéique de Cdc42 iso 2 dans des cellules primaires dérivées de biopsies de GBM, comparé à des cellules de cerveaux sains.

I.B.2. Les protéines kinases aPKC (PKC_{ζ} et PKC_{ι}) sont différenciellement exprimées dans les gliomes de haut-grade

Les protéines atypiques aPKC (PKC_{ζ} et $PKC_{\iota/\lambda}$) appartiennent à la famille des PKC (Protein Kinase C) (Hirai and Chida, 2003; Selbie et al., 1993). Dans la migration astrocytaire, elles agissent en aval de la voie de Cdc42, pour réguler APC et Dlg (**Figure 16**). Peu de données existent quant à un rôle spécifique de chacune de ces isoformes dans la régulation de la polarité cellulaire. Néanmoins, des études récentes ont montré que *PRKCZ* (gène codant pour **PKC $_{\zeta}$**) agit comme un gène **tumeur suppresseur** *in vivo*, dans un modèle de souris KO (Galvez et al., 2009). Par contre, *PRKCI* (gène codant pour **PKC $_{\iota}$**) est un potentiel **oncogène** dans divers cancers (Eder et al., 2005; Regala et al., 2005; Zhang et al., 2006). De plus, sa surexpression favoriserait l'invasion des cellules de glioblastomes (Baldwin et al., 2010).

L'analyse par qPCR du niveau d'expression de *PRKCZ* et *PRKCI* dans des échantillons de gliomes et de cerveaux sains illustre a priori la fonction opposée que ces deux isoformes remplissent dans la progression tumorale. Le niveau de PKC_{ζ} dans les gliomes et plus particulièrement dans les gliomes de hauts-grades est plus de 5 fois plus bas que dans les cerveaux sains. Par contre, dans cette étude, le niveau de $PKC_{\iota/\lambda}$ ne semble pas significativement altéré, malgré une légère hausse (1,6 fois) dans les gliomes de bas-grade (**Figure 39**).

Une étude plus détaillée des rôles spécifiques de PKC_{ζ} et PKC_{ι} dans la régulation de la polarité et de l'invasion des gliomes est nécessaire pour comprendre les conséquences de ces différences d'altération de ces deux isoformes sur la progression agressive des glioblastomes.

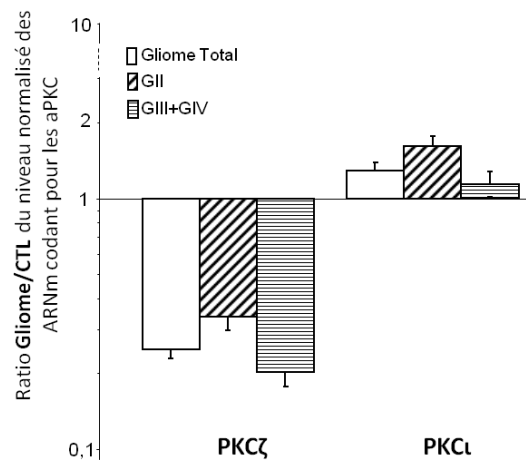


Figure 39 : Les protéines kinases C atypiques (aPKC) sont différenciellement altérées dans les gliomes.

Histogramme illustrant les niveaux des ARNm codant pour PKC_{ζ} et PKC_{ι} , quantifiés par qPCR. Le gène de référence utilisé est *ALAS1*. Les données normalisées sont montrées sous la forme d'un ratio taux d'expression dans les gliomes sur taux d'expression dans les cerveaux sains. Ratio=1 : l'expression dans les gliomes est similaire à celle dans le cerveau sain, ratio < 1 : sous-expression dans les gliomes; > 1 : surexpression dans les gliomes. GII (n=29) ; GIII+GIV (n=39).

I.B.3. L'altération de la voie de signalisation de Cdc42 est associée à une perte de directionnalité et des défauts de polarité des cellules de glioblastomes en migration.

Hormis Cdc42 et les aPKC, d'autres acteurs de la voie de Cdc42 sont sous-exprimés dans les gliomes de hauts-grades. Ainsi, d'après les données Affymetrix validées par qPCR, Par6, β -pix, Dlg, et GKAP sont sous-exprimées dans les gliomes. L'altération de la voie de Cdc42 est susceptible d'être responsable de la perte de polarité et la diminution de la persistance de direction observée lors de la migration des cellules de glioblastomes (**Figure 40** et (Camand et al., 2012)).

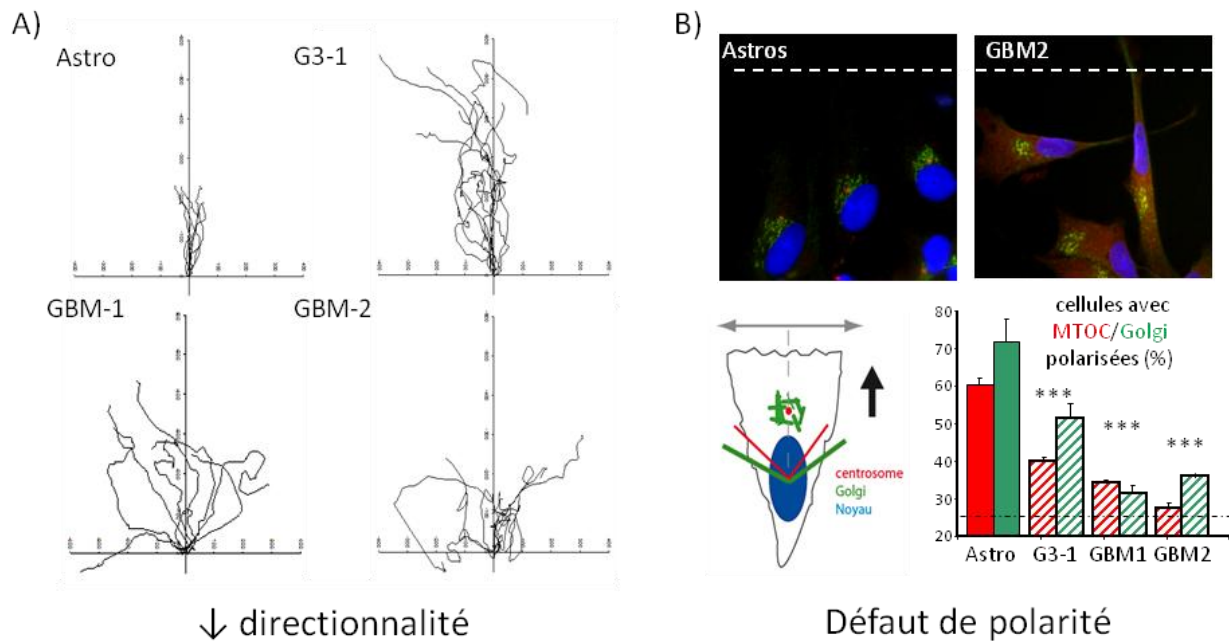


Figure 40 : Altération de la polarité cellulaire des cellules de glioblastomes.

A) Graphique illustrant la trajectoire d'astrocyte sains ou extraits d'un gliome de grade III (G3-1) et de deux GBM (GBM-1 et -2) dans un test de fermeture de blessure. Dix cellules au comportement caractéristique de l'ensemble des cellules étudiées pour chaque groupe sont représentées. Si les astrocytes sains maintiennent leur direction perpendiculaire à l'axe de la blessure durant la migration (trajectoire le long de l'axe des ordonnées), les cellules de gliomes de haut-grade (et principalement des GBM) ont des trajectoires moins dirigées et plus chaotiques. **B)** Etude de la polarité par analyse de la réorientation du centrosome (ou MTOC dans ces cellules) et de l'appareil de Golgi dans un test de fermeture de blessure. *En haut* : Immunomarquages anti-péricentrine (centrosome, rouge) et anti-GM130 (Golgi, vert). *En bas à gauche* : schéma illustrant la méthode de quantification. Lorsque le centrosome/appareil de Golgi est localisé dans le quadrant rouge/vert devant le noyau, face à la blessure, il est dit correctement réorienté. *En bas à droite* : histogramme représentant les données de quantification (n>300, 3 à 5 expériences différentes, t-test avec p-value <0.001 (***)). 60% des astrocytes sains ont leur centrosome correctement orienté tandis que seulement 27 à 35% des cellules de GBM parviennent à orienter correctement leur axe de polarité avant-arrière dans ce test de migration *in vitro*.

I.C. ARF6 est surexprimée dans les gliomes

ARF6 appartient aux protéines G de la famille Arf qui régulent, avec les protéines Rab, le trafic membranaire au sein des cellules. Plus précisément, Arf6 intervient dans l'endocytose et régule le recyclage de nombreuses protéines membranaires à surface dont l'intégrine $\beta 1$ (Powelka et al., 2004) et les cadhérines (Palacios et al., 2001). ARF6 intervient également dans le remodelage du cytosquelette d'actine via sa régulation de la localisation membranaire de Rac1 (Sabe, 2003).

Les données des puces Affymétrie révèle une surexpression d'ARF6 dans les gliomes. L'analyse par qPCR valide ces résultats et montre que le niveau d'ARF6 est près de 2.5 fois plus important dans les gliomes de bas-grade que dans le cerveau sain (**Figure 40A**). Ce résultat fait écho à une étude faisant état d'une surexpression d'ARF6 dans des lignées de cellules de glioblastomes et dans 50% des échantillons de glioblastomes analysés (Li et al., 2009). De plus, la suppression d'ARF6 dans des astrocytes sains réduit significativement leur vitesse de migration (**Figure 40B**). Enfin, la surexpression d'ARF6 favoriserait l'invasion des gliomes via le recrutement d'IQGAP1 et l'activation de Rac1 au front de migration (Hu et al., 2009).

Ces résultats ont été inclus à un travail réalisé au laboratoire qui souligne l'importance du trafic membranaire contrôlé par ARF6 dans la localisation et l'activation de Cdc42 à l'avant des cellules en migration (Osmani et al., 2010) (**Article 1** en annexe).

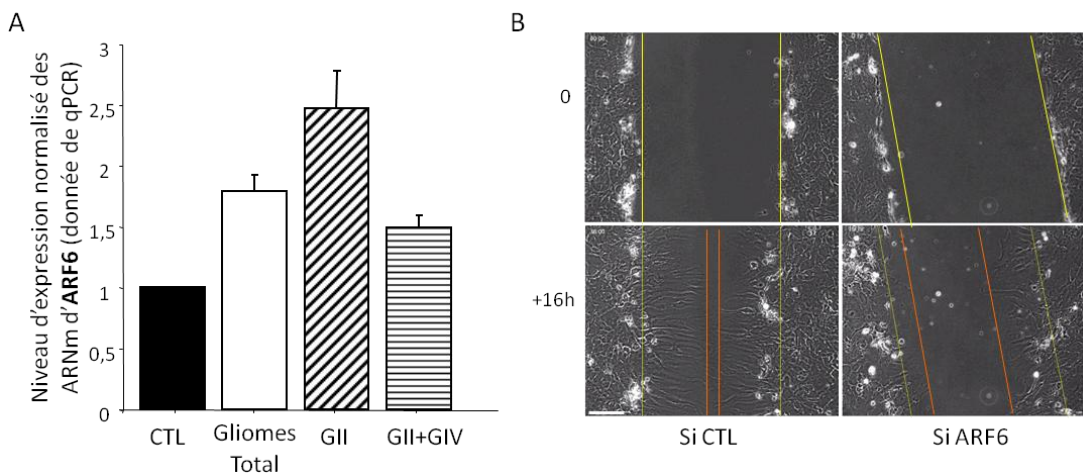


Figure 41 : Surexpression d'ARF6 dans les gliomes

A) Analyse par qPCR du niveau des ARNm codant pour ARF6. Les valeurs sont normalisées (ARF6n) par l'expression du gène de référence ALAS1. L'histogramme représente le ratio $ARF6n(\text{Gliome})/ARF6n(\text{CTL})$ pour l'ensemble des gliomes utilisés et pour les sous-groupes gliomes de bas grade (GII) et gliomes de haut-grade (GIII+GIV). CTL=cerveau sain (n=2, moyenné puis normalisé), GII (n=15), GIII+GIV (n=34), Gliome Total (n=49). **B)** La déplétion d'ARF6 dans des astrocytes primaires de rat réduit leur vitesse de migration dans un test de fermeture de blessure. Si après 16h (lignes oranges) la blessure est pratiquement fermée dans les astrocytes CTL (si CTL), les astrocytes si ARF6 n'en ont pas encore parcouru la moitié. Les lignes jaunes correspondent aux bordures initiales de la blessure. Ces images sont représentatives de l'analyse quantitative effectuée sur plus de 100 cellules dans trois expériences distinctes. Barre d'échelle : 100 μ m.

I.D. Altération des jonctions d'adhérentes dans les gliomes de haut-grade

Si la contribution de l'altération des cadhérines classiques à la progression métastatique des tumeurs épithéliales est bien connue (*voir introduction partie IV-B*), elle l'est beaucoup moins en ce qui concerne le développement et les capacités invasives des tumeurs non-épithéliales

De nombreuses études dévoilant une altération du niveau de la N-cadhérine dans les gliomes se sont accumulées ces quinze dernière années (Asano et al., 2004; Asano et al., 1997; Utsuki et al., 2002). Néanmoins, au vue des résultats contradictoires obtenus, aucun scenario consensus n'a clairement été formulé. Nous avons étudié en détails le niveau d'expression des acteurs des jonctions d'adhérence dans les gliomes, à **l'échelle des ARNm** et à l'échelle **protéique**.

I.D.1. Expression de la N-cadhérine dans les gliomes de haut-grade

Dans un premier temps, les données des puces Affymetrix validées par qPCR évoquent une **surexpression des ARNm** codant pour la N-cadhérine dans les gliomes de haut-grade (**Figure 42a**). Ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans d'autres études transcriptomiques (Asano et al., 2004) ; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

A l'échelle protéique, par contre, on constate une **sous-expression significative** (prés de trois fois moins) de la N-cadhérine dans des échantillons de GBM (**Figure 42b** et (Camand et al., 2012)).

Cette apparente contradiction entre les niveaux d'ARNm et de protéines reflète sans doute des défauts de synthèse ou de stabilité de la protéine dans les cellules des gliomes de haut-grade.

I.D.2. Rôle de la N-cadhérine dans la migration collective des astrocytes sains et tumoraux

En vue de comprendre le rôle joué par la perte de la N-cadhérine dans le potentiel invasif des gliomes, nous avons étudié puis comparé le comportement migratoire d'astrocytes dépourvus de N-cadhérine avec celui de lignées de GBM qui n'expriment peu ou pas de N-cadhérine. L'analyse a été réalisée dans le test de fermeture de blessure *in vitro*. Ces travaux montrent que la N-cadhérine module la polarité dépendante des intégrines pendant la migration collective et qu'elle agit sur la vitesse et la directionnalité des cellules gliales saines et tumorales en migration (**Figure 43**). La réexpression de la N-cadhérine dans des cellules de GBM ralentit considérablement leur migration et restore leur persistance de direction *in vitro*. L'étude, à laquelle j'ai participé en tant que second auteur a été publiée (**Article 2**, en annexe : (Camand et al., 2012)) et a fait l'objet d'un commentaire que j'ai rédigé avec le Dr Sandrine Etienne-Manneville (**Article 3**, en annexe).

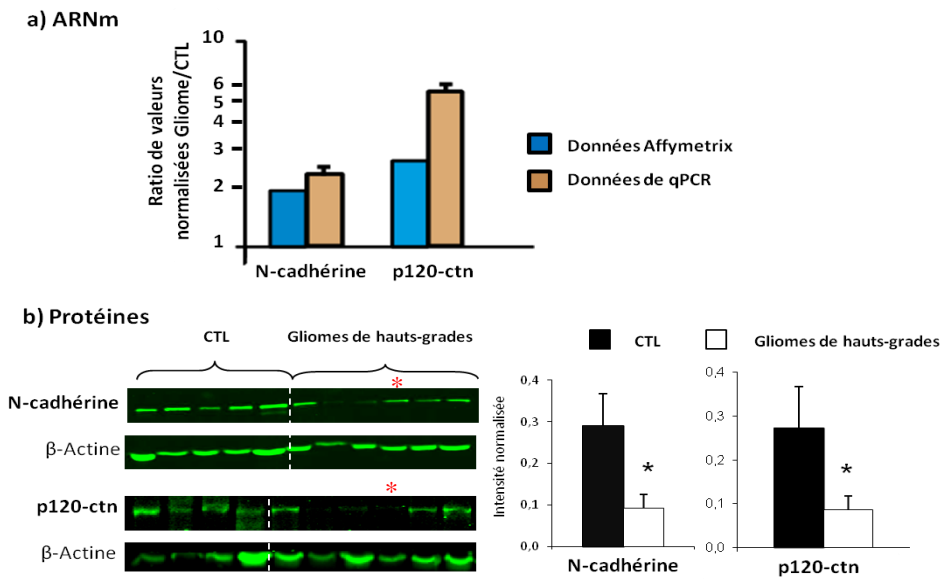


Figure 42 : Altération de la N-cadhérine et la p120ctn dans les gliomes de haut-grade.

a) Histogramme représentant le ratio du niveau des ARNm de la N-cadhérine et de la p120ctn entre les échantillons de gliomes de haut-grade (n=50) et les cerveaux sains (n=3). En bleu : les données des puces affymetrix normalisées et en marron les données de qPCR normalisées par l'expression du gène de référence *ALAS1*. Les deux techniques mettent en évidence une surexpression de la N-cadhérine et de la p120ctn dans les gliomes de haut-grade. **b)** Immunodétection du niveau protéique de la N-cadhérine et de la p120 dans des échantillons de cerveaux sains (CTL, n=5) et de gliomes de haut-grade (n=6). L'analyse quantitative normalisée par l'expression de la β -actine de chaque échantillon, permise par la mesure précise de la fluorescence (technique LICOR®) révèle une sous-expression significative des deux protéines. T-test, p-value < 0.05. Il existe une corrélation entre le niveau de la p120ctn et celui de la N-cad. Noter une exception (astérisque rouge) dans un GBM où la perte de la p120ctn n'impacte pas le niveau de la N-cad.

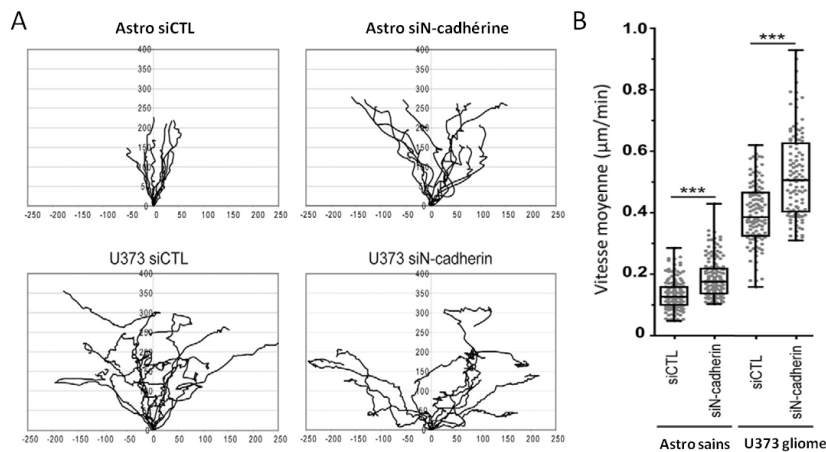


Figure 43 : Effets de la perte de la N-cadhérine sur la migration des astrocytes sains et tumoraux.

A) Trajectoires de la migration pendant 36h de 10 cellules représentatives d'astrocytes sains (panneaux du haut) et de gliomes (U373) nucléofectés avec un siCTL (gauche) ou un siN-cadhérine (droite). Noter l'augmentation de la distance parcourue et la baisse de la persistance de direction dans les cellules dépourvues de N-cadhérine. **B)** Histogramme en boîte à moustache quantifiant les données de plus de 150 cellules par condition, analysées dans 3 expériences différentes, dont 10 sont illustrées en A). Les boîtes représentent les 1^{er} et 3^{ème} quartiles ainsi que la médiane et les valeurs extrêmes. *** : p-value < 0.001. La perte de la N-cadhérine augmente significativement la vitesse de migration d'astrocytes sains et tumoraux dans le test de fermeture de blessure *in vitro*. Adaptée librement de la figure de (Camand et al., 2012).

I.D.3. Expression de la p120ctn dans les gliomes

L'expression de la p120ctn dans les gliomes de haut-grade est altérée : résultats contradictoires de l'analyse transcriptomique et protéique

La p120ctn est un régulateur majeur de la stabilité de la N-cadhérine (Ireton et al., 2002). La diminution de son niveau d'expression entraîne une hausse de l'internalisation et de la dégradation des cadhérines membranaires. Aussi me suis-je intéressé à sa possible dérégulation dans les gliomes afin d'expliquer la contradiction entre le niveau d'ARNm et de protéine de la N-cadhérine.

Les données des puces Affymetrix, validées par qPCR, mettent en évidence une surexpression du niveau des transcrits ARNm codant pour la p120ctn dans les gliomes de haut-grade (**Figure 42a**). Par contre, **à l'échelle protéique**, la p120ctn est en moyenne sous-exprimée dans les gliomes de haut-grade (**Figure 42b, histogramme droite**).

Comparaison des niveaux d'expression de la p120ctn et de la N-cadhérine

En comparant dans les mêmes échantillons de gliomes de haut-grade la quantité de protéines de N-cadhérine et de p120ctn, on constate une forte corrélation entre leur niveau d'expression dans 5 des 6 échantillons analysés. Lorsque la p120ctn est détectable, le niveau de N-cadhérine l'est aussi, tandis qu'une perte de la p120ctn corrèle avec une perte de la N-cadhérine (**Figure 42b**). Ce résultat suggère que dans la plupart des cas, la perte de la p120ctn pourrait être un événement ayant lieu en amont de la progression tumorale et qui subséquemment entraînerait la diminution du niveau de la N-cadhérine en augmentant son taux d'internalisation et de dégradation.

Cependant, dans certains gliomes de haut-grade, la perte de la p120ctn n'est pas associée à la diminution d'expression protéique de la N-cadhérine (**Figure 42b, astérisque rouge**). Ce résultat est peu compatible avec l'hypothèse évoquée ci-dessus et révèle qu'un autre phénomène est sûrement à l'origine de la perte d'expression de ces deux acteurs majeurs des jonctions d'adhérence.

De manière intéressante, l' α N-caténine est sous-exprimée dans les gliomes de haut-grade à la fois au niveau des ARNm et des protéines (données non montrées), et des mutations non-sens ont été identifiées dans le gène *CTNNA2* codant pour l' α N-caténine dans des glioblastomes (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Des expériences sont en cours au laboratoire pour étudier le rôle de l' α N-caténine dans la stabilité des protéines des JAs.

I.D.4. Impact de la perte de la p120ctn sur la migration des astrocytes sains et tumoraux

La perte de la p120ctn est un événement observé dans de nombreux cancers épithéliaux et qui est corrélé avec une progression invasive de certaines tumeurs (Liu et al., 2009). Le niveau de p120ctn est diminué plus fortement dans les gliomes de haut-grade, majoritairement plus invasifs, que dans les gliomes de bas-grade (données non montrées). Cette observation n'est cependant pas suffisante pour définir p120ctn comme un acteur majeur de l'invasion des gliomes puisqu'elle est basée sur des estimations d'invasivité et des moyennes de taux d'expression.

Afin de tester néanmoins cette hypothèse, j'ai tout d'abord analysé le niveau de la p120ctn dans des biopsies de gliomes nettement définissables par leur caractère plus ou moins invasif. Les gliomes de bas-grade, bien que moins agressifs, possèdent dans certains cas, des propriétés invasives similaires à celles des gliomes de haut-grade. En outre, contrairement aux GBM très hétérogènes en termes d'altérations génétiques, les gliomes de bas-grade ont un fond

génétique plus homogène. Aussi, grâce au diagnostic du neurochirurgien de la Pitié-Salpêtrière, le Dr Laurent Capelle, nous avons pu analyser le niveau de la p120ctn dans deux sous-groupes de gliomes de bas-grade ne différant que par leur phénotype invasif. Une première étude incluant au moins huit tumeurs par sous-groupe a montré que les gliomes les plus invasifs ont un niveau de p120ctn significativement plus faible que des gliomes non invasifs (**Figure 44c**).

Des analyses de détection systématique de la quantité de p120ctn dans un deuxième lot de tumeurs plus ou moins invasives est en cours afin de valider la p120ctn comme marqueur de l'invasivité dans les gliomes.

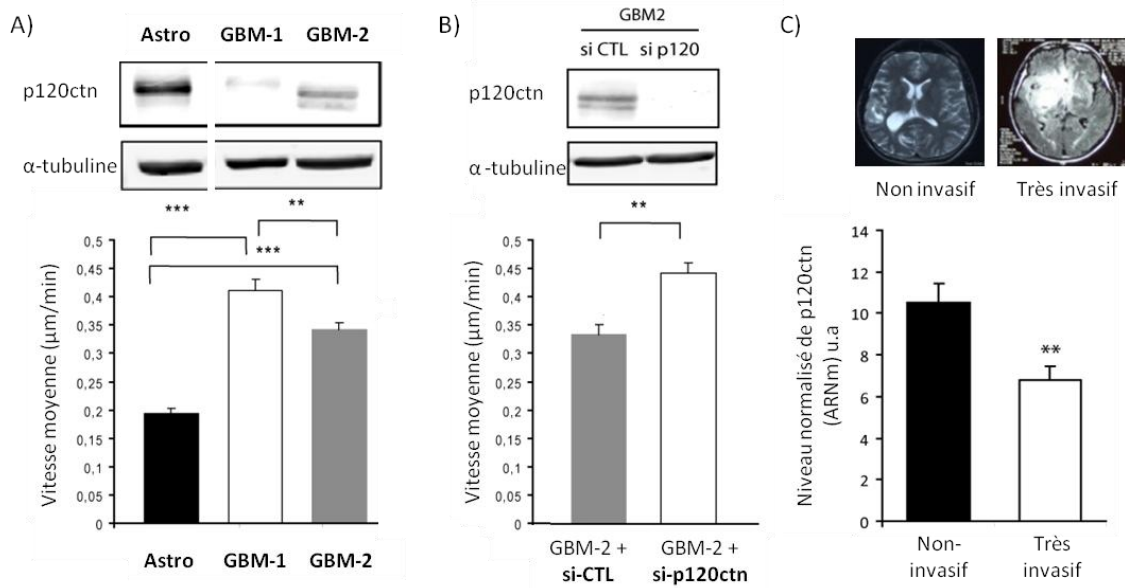


Figure 44: Le niveau de p120ctn est inversement corrélé avec le potentiel invasif des gliomes.

A) En haut : Immunodétection par Western blot de la p120ctn dans les lysats protéiques de cellules dérivées de biopsies de GBM (GBM-1 et GBM-2). Le western-blot illustre la forte diminution de l'expression de la p120ctn dans les GBM, comparé aux astrocytes non tumoraux (astro). Néanmoins, le GBM-2 exprime plus de p120ctn que le GBM-1. **En bas :** Graphique présentant la vitesse de migration des astrocytes sains et des cellules de GBM-1 et GBM-2 dans un test de fermeture de blessure in vitro ($n > 50$, 3 expériences différentes). Les cellules du GBM2 exprimant plus de p120ctn migrent significativement moins vite que celles du GBM1.

B) En haut : Immunodétection par Western blot de la p120ctn dans les lysats de cellules de GBM-2 transfectées par un si CTL et un si 120ctn. De manière intéressante, après réduction de leur niveau de p120ctn les cellules de GBM2 acquièrent une vitesse de migration plus élevée que les cellules traitées par un siARN CTL.

C) En haut : Des gliomes de grade II ont été séparés en deux groupes distincts en fonction de leur profil invasif à l'IRM. Après extraction des ARNs le niveau d'expression de p120ctn a été mesuré par qPCR. **En bas :** Histogramme représentant le niveau de p120ctn normalisé par l'expression d'*ALAS-1*. Les gliomes les plus infiltrant ($n=9$) expriment moins de p120ctn que les gliomes non invasifs ($n=8$). **: p-value (t-test) < 0.01; ***: p-value (t-test) < 0.001.

Je me suis alors demandé s'il pouvait exister une corrélation inverse entre le niveau de la p120ctn et la migration des cellules de glioblastome. Parmi les glioblastomes mis en culture, tous ont un niveau de p120ctn diminué par rapport aux astrocytes sains, mais certains en expriment plus que d'autres (**Figure 43a** et données personnelles non communiquées). Les cellules de GBM exprimant une quantité quasi-indétectable de p120ctn (GBM-1) migrent en moyenne à une vitesse de $0.41 \mu\text{m}/\text{min}$ (plus de deux fois plus vite que les astrocytes sains migrant à $0.19 \mu\text{m}/\text{min}$). En revanche, les cellules issues du GBM-2 expriment plus de p120ctn que les cellules du GBM-1 (mais moins que les astrocytes sains) et migrent significativement

moins vite ($0.33\mu\text{m}/\text{min}$). De manière intéressante, lorsque l'on **enlève la p120ctn** des cellules de GBM-2 par transfection avec un si ARN spécifique du gène humain de la p120ctn (si p120), **la vitesse de migration augmente** significativement pour atteindre $0.43\mu\text{m}/\text{min}$ (**Figure 45b**).

Dans le but de clarifier le rôle de la p120ctn dans la migration cellulaire, je me suis tourné vers l'étude des conséquences de sa sous-expression sur le comportement migratoire des cellules gliales saines.

Dans un premier temps, j'ai transfecté des astrocytes sains avec des siARNs spécifiques de la p120ctn (si p120#1 et #2) et étudié leurs caractéristiques de migration dans le test de fermeture de blessure *in vitro*. Les astrocytes exprimant le si p120#2 migrent près de 40% plus vite que les astrocytes transfectés par un siARN spécifique de la GFP (si CTL) (**Figure 44b**). D'autre part, la directionnalité des astrocytes si p120#2 en migration est diminuée significativement par rapport aux astrocytes CTL (**Figure 45c**). Enfin, ces astrocytes perdent leur capacité à orienter correctement leur centrosome et l'appareil de Golgi au cours de la migration collective (**Figure 45d**). L'absence de défaut de polarité et de directionnalité de migration chez les astrocytes si p120#1 semble due à la faible efficacité de cet si ARN (**Figure 45a**).

Néanmoins, grâce à la différence d'efficacité entre les deux si p120ctn on se rend compte que, globalement, plus le niveau de la p120ctn est faible et plus les cellules migrent rapidement et de manière non polarisée. Ces altérations de la migration des astrocytes si p120 évoquent le comportement migratoire des cellules de glioblastomes, dépourvues de p120ctn (**Figure 43**).

Pour résumer, tous ces résultats *in vitro* et *in vivo* mettent en évidence une corrélation inverse entre le niveau de p120ctn exprimé et le potentiel invasif et migratoire des astrocytes sains et tumoraux. Ils suggèrent un rôle de **suppresseur d'invasivité de la p120ctn** dans les gliomes.

Compte tenu de l'association quasi-systématique entre la perte de la p120ctn et celle de la N-cadhérine, il est probable que la disparition de la p120ctn dans les gliomes favorise leur invasion en déstabilisant les jonctions adhérentes et en augmentant la dispersion des cellules. Néanmoins, en plus de l'aspect mécanique à retenir, nous avons envisagé que la perte de la p120ctn favorise la migration en perturbant la dynamique des jonctions adhérentes, sans forcément en affecter l'expression. En effet, dans certains cas la perte de la p120ctn n'impacte pas le niveau de la N-cadhérine (**Figure 41b**, GBM à astérisque rouge).

Afin d'étudier cette hypothèse j'ai, dans un premier temps, caractérisé la dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration collective et dirigée des astrocytes, *in vitro*.

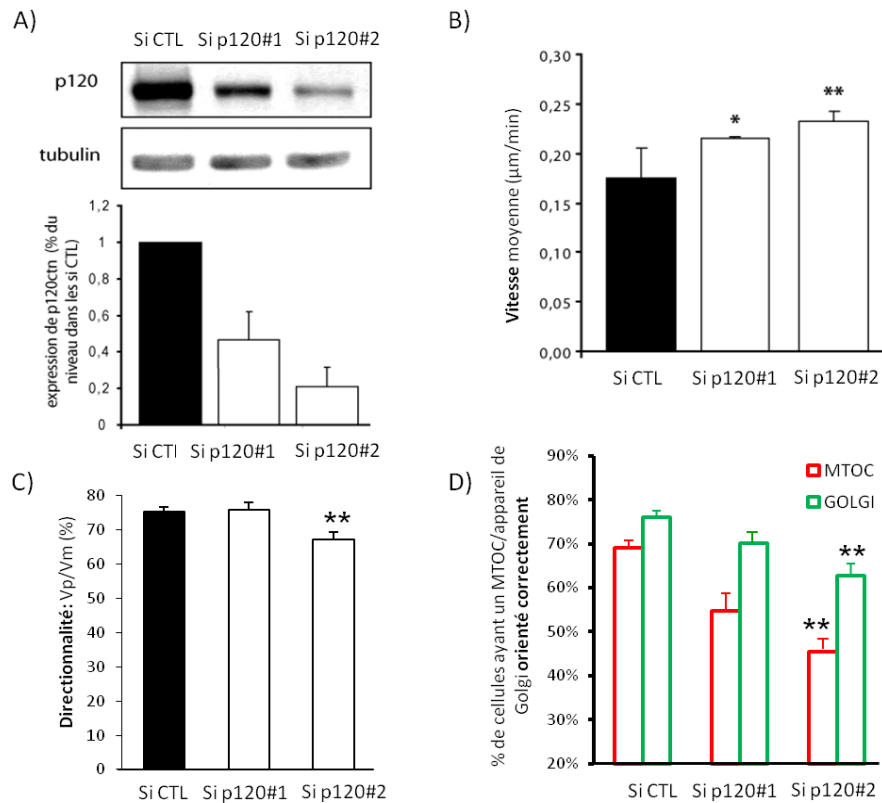


Figure 45 : Effet de la diminution du niveau de la p120ctn sur la migration des astrocytes sains dans un test de fermeture de blessure *in vitro*.

A) Immunodétection par Western-blot de l'expression protéique de la p120ctn et de l' α -tubuline dans des lysats d'astrocytes transfectés par un si GFP (=si CTL) et deux si p120. L'histogramme en dessous illustre l'efficacité des siARN. Le si p120#2 est le plus efficace puisqu'il permet la réduction de 80% du niveau standard de la p120ctn. **B)** Histogramme représentant la vitesse moyenne des astrocytes si CTL et si p120ctn. Plus le niveau de la p120ctn baisse, plus la migration est rapide. Si CTL: 0.17µm/min ; si p120#1: 0.21µm/min ; si p120#2: 0.23µm/min. Les données ont été obtenues sur plus de 150 cellules par condition, issues de 3 à 5 expériences différentes. **C)** Histogramme illustrant la baisse de la directionnalité des astrocytes si p120ctn en migration. La directionnalité correspond au ratio *Vitesse polarisé* (c'est à dire perpendiculaire à l'axe de la blessure)/*Vitesse moyenne*. Une directionnalité de 100% correspond à une migration parfaitement perpendiculaire à l'axe de la blessure. Les astrocytes si p120ctn ont une directionnalité diminuée significativement de 11% par rapport aux astrocytes CTL, illustrant leur difficulté à s'orienter correctement en réponse à un stimulus externe. **D)** Histogramme représentant les défauts de polarité des astrocytes si p120ctn dont seulement 45% d'entre eux (pour si p120#2) ont un centrosome correctement orienté contre 69% pour les astrocytes CTL (voir figure 39 pour la méthode de quantification). Les données correspondent à l'analyse de plus de 300 cellules par condition, sur 3 expériences différentes. Le test statistique utilisé est le test de student. * : p-value<0.05 ;** : p-value<0.01.

II. La dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration cellulaire

Si la dynamique des jonctions adhérentes au sein de cellules épithéliales **statiques** a largement été étudiée, peu de données existent sur ce phénomène dans des cellules **en migration**. L'analyse de différentes lignées de cellules épithéliales dont les protrusions se chevauchent dans des monocouches non confluentes a mis en évidence un flux baso-apical d'agrégats de cadhérines aussi bien dans la monocouche que lorsque l'on induit leur migration (Kametani and Takeichi, 2007). Dans ce cas précis, le flux de cadhérines est observable parce que lorsque la protrusion avance, les agrégats restent fixes par rapport au substrat. D'après les auteurs, ce flux faciliterait la locomotion d'une cellule sur une autre en permettant à la cellule du dessus de glisser sur l'autre.

Pour le moment, aucune étude ne s'est attachée à décrire la dynamique de la N-cadhérine dans des cellules non épithéliales de mammifères en migration collective.

II.A. Mise en évidence d'un flux rétrograde de la N-cadhérine

II.A.1. Observation d'un flux rétrograde de petits agrégats de N-cadhérine aux jonctions latérales des astrocytes en migration

Contrairement aux cellules épithéliales avoisinant les 15 μ m d'épaisseur (Jaulin et al., 2007), les astrocytes primaires de rat sont des **cellules extrêmement plates** (3 μ m, données du laboratoire) qui étendent des protrusions encore plus fines lorsqu'elles migrent dans un système de fermeture de blessure *in vitro*. L'expression de la N-cadhérine-GFP (Ncad-GFP) dans ces cellules montre que les astrocytes en migration établissent des contacts latéralement avec leurs cellules voisines tout au long de leur migration (**Figure 46a**). Compte tenu de la faible épaisseur des protrusions le signal fluorescent émanant de ces contacts n'appartient quasiment qu'à un unique plan.

L'observation sur des temps longs de la dynamique de la Ncad-GFP dans les astrocytes en migration a mis en évidence un **flux rétrograde** inédit de spots de N-cadhérine **aux jonctions latérales** (**Figure 46a** et **Films 1 et 2** en annexe). En effet, des agrégats de N-cadhérine apparaissant à l'avant des jonctions latérales sont transportés vers l'arrière de la cellule. Au sein de la monocouche, aucun flux n'est observé aux jonctions des cellules statiques (**Figure 46b**). Par ailleurs, dans des conditions plus physiologiques, lorsque des astrocytes exprimant la Ncad-GFP migrent au sein d'une couche de matrigel®, on observe également ce flux rétrograde de la N-cadhérine (**Film 3** en annexe)

Afin de savoir si ce phénomène est restreint aux cellules en migration, j'ai utilisé la technique des micros-patrons développée récemment dans le laboratoire (Dupin et al., 2009). Les astrocytes exprimant la Ncad-GFP sont déposés sur des micros-patrons circulaires de fibronectine (11 000 μ m²) permettant l'adhérence de 4 à 7 cellules. Le traitement du substrat au polyéthylène glycol (PEG) empêche les cellules de migrer hors du patron de fibronectine. De manière surprenante, on observe un flux rétrograde de la N-cadhérine aux contacts entre les cellules **ayant un bord libre, similaire** à celui observé dans les cellules en migration (**Figure 46c et d** et **Film 4**).

L'analyse de kymographes le long des jonctions pendant des périodes de pause de la cellule en migration (afin d'éviter une sous-estimation des valeurs due à l'avancée parallèle de la cellule) a permis de quantifier la vitesse de ce flux à **0.32 μ m/min**. L'utilisation d'un logiciel de suivi ciblant les spots de cadhérine transportés vers l'arrière de la cellule a validé cette analyse quantitative dans les trois conditions évoquées plus haut (**Figure 46 d**).

Pour la première fois un flux rétrograde de cadhérines classiques est mis en évidence aux jonctions latérales de cellules non-épithéliales en migration.

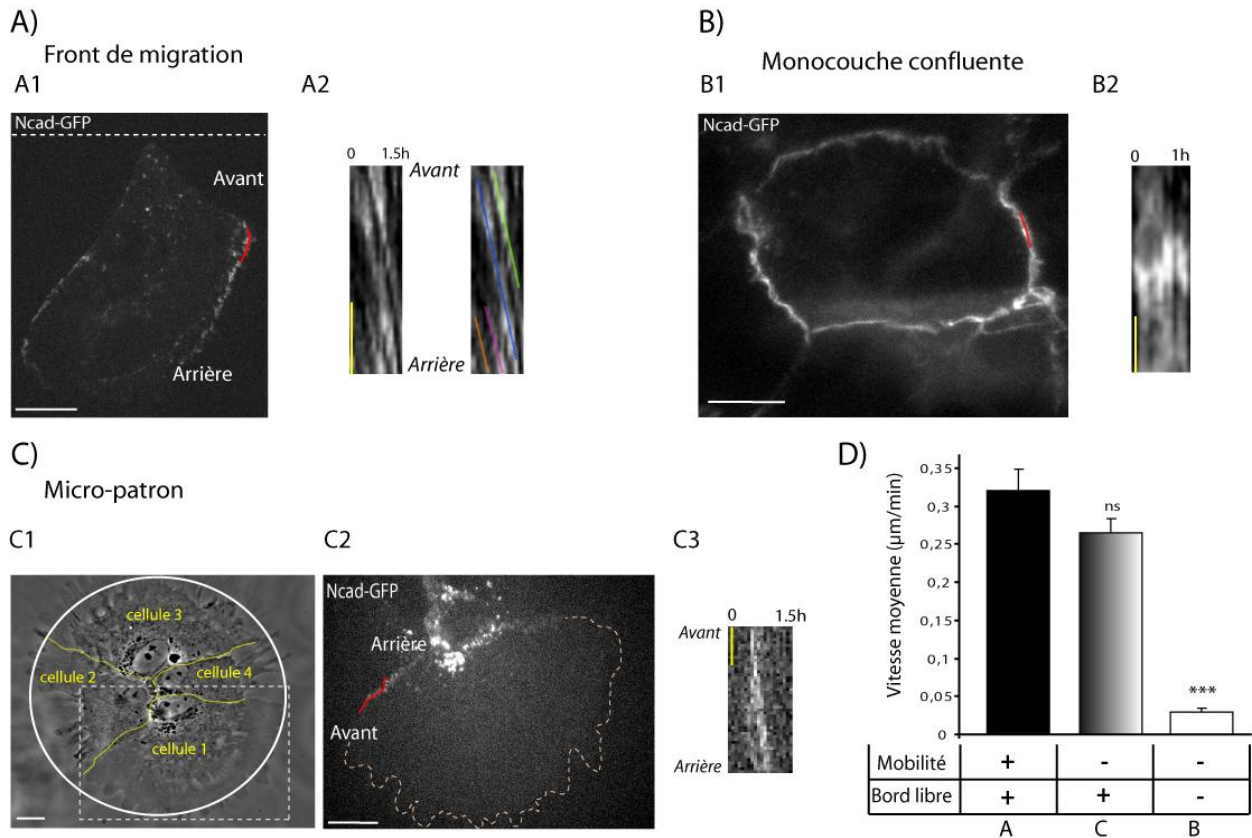


Figure 46 : Observation d'un flux rétrograde de N-cadhérine aux jonctions latérales des cellules en migration et des cellules immobiles ayant au moins un bord libre.

A) Astrocyte transfecté avec la Ncad-GFP en migration dans un test de fermeture de blessure *in vitro*. **A1.** En réponse à une blessure (dont l'axe est représenté par la ligne pointillée) la cellule se polarise et établit des contacts latéraux avec ses voisines. **A2.** Kymographe représentant la fluorescence le long de la jonction (trait rouge, **A1**) au cours du temps (1,5h). Il montre très nettement un flux rétrograde. **B1.** Astrocytes exprimant la Ncad-GFP au sein d'une monocouche confluente. Les cellules ne possèdent aucun bord libre. **B2.** Kymographe le long du trait rouge en **B1** illustrant l'absence de flux rétrograde de Ncad aux jonctions. **C)** Astrocytes exprimant la Ncad-GFP étalés sur un micro-patron circulaire de fibronectine (cercle blanc). **C1.** Image en contraste de phase montrant quatre astrocytes immobiles restreints à la surface adhésive du micro-patron. **C2.** Zoom sur l'encadré en pointillé blanc (**C1**) montrant un astrocyte avec un bord libre (ligne pointillé beige), exprimant la Ncad-GFP. **C3.** Kymographe le long du trait rouge (**C2**) illustrant la présence d'un flux rétrograde. **D).** Histogramme représentant la vitesse moyenne de ce flux rétrograde de Ncad dans les astrocytes: **A)** mobiles et avec au moins un bord libre, **B)** immobiles et sans bord libre (au sein d'une monocouche), **C)** immobiles et avec au moins un bord libre (micro-patron). Les données proviennent de trois expériences différentes: **A:** n=16, **B** et **C** (n=7). Toutes les barres d'échelle blanche représentent 10µm. Les barres d'échelle verticales jaunes, sur les kymographes représentent 2µm.

Test statistique : test de student, ***: p-value < 0.001.

II.A.2. Les molécules de N-cadhérine à l'avant sont transportées vers l'arrière de la cellule avec le flux rétrograde des jonctions adhérentes latérales

Pour valider l'existence d'un flux rétrograde de N-cadhérine, il faut vérifier que les molécules de N-cadhérine à l'avant des jonctions latérales sont effectivement celles que l'on retrouve à l'arrière de ces jonctions. Dans un premier temps, j'ai effectué des expériences de **FRAP**, en ciblant la zone à «éteindre» à l'avant de la cellule en migration. Le recouvrement de la fluorescence émise par la Ncad-GFP étant relativement lent, j'ai pu observer dans un laps de temps d'une heure, le **recul vers l'arrière** de la cellule de la zone «éteinte» (**Figure 47a**).

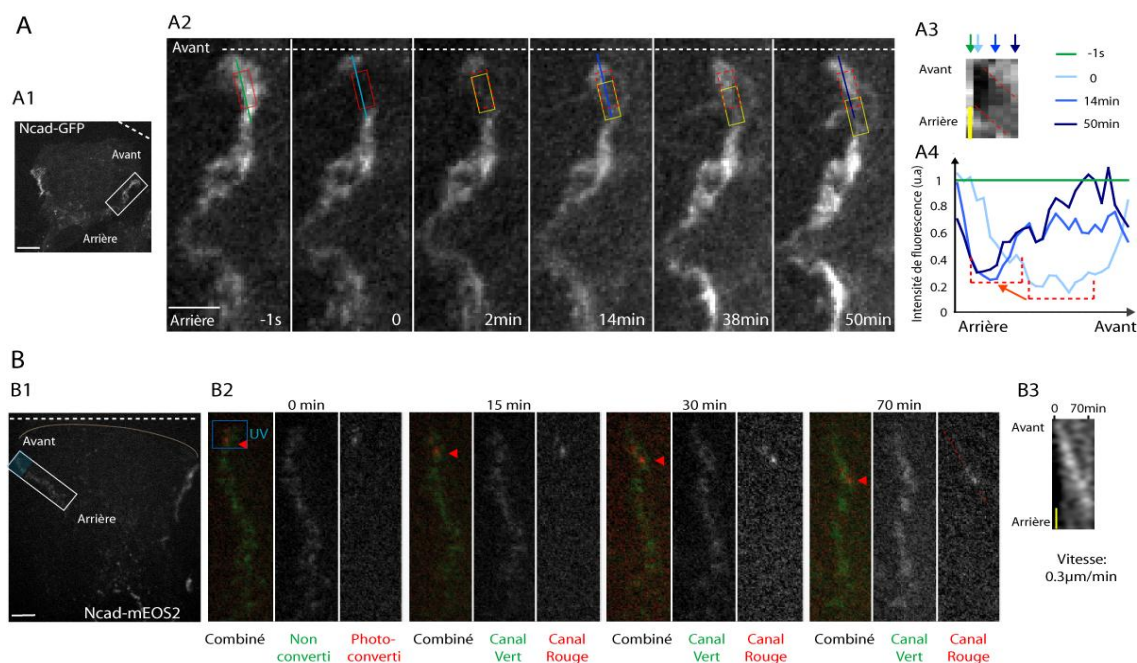


Figure 47: Les molécules de N-cadhérine à l'avant de la cellule sont transportées vers l'arrière grâce à un flux rétrograde le long des jonctions latérales.

A) Expérience de FRAP montrant un mouvement vers l'arrière de la cellule de la Ncad-GFP aux jonctions. **A1.** Astrocyte en migration exprimant la Ncad-GFP. La blessure (trait pointillé) a été réalisée 6h auparavant. **A2.** Agrandissement de l'encadré blanc (**A1**) avant et après "extinction" de la zone indiquée par un encadré rouge. Le rectangle jaune représente la position de la zone photobleachée au cours du temps. **A3.** Kymographe le long des lignes colorées (**A2**) illustrant le flux rétrograde de la zone photobleachée. Barre jaune verticale: 2µm. **A4.** Intensité de fluorescence normalisée le long des traits colorés (**A2**). Chaque couleur (vert, bleu clair, bleu, bleu foncé) représente un temps donné, comme indiqué. L'analyse quantitative valide le mouvement vers l'arrière de la zone de faible intensité de fluorescence (zone bleachée). **B)** La photoconversion de Ncad-mEOS2 à l'avant de la cellule montre le recrutement de ces molécules vers l'arrière. **B1.** Astrocyte exprimant la Ncad- mEOS2, 8h après induction de la migration (trait pointillé : axe de la blessure). Le trait marron délimite l'avant de sa protrusion. **B2.** Images prises juste après la photoconversion d'une zone à l'avant de la jonction (pulse à 409nm, encadré bleu) et aux temps indiqués. En vert la Ncad non photoconvertie et en rouge la Ncad photoconvertie. Celle-ci est transportée de l'avant vers l'arrière de la cellule (têtes de flèche rouge). Ce flux rétrograde est illustré par le kymographe (**B3**) réalisée le long du trait rouge pointillé (**B2**, 70min). Barres jaune verticale : 5µm

En vue de confirmer cette expérience, j'ai cloné la N-cadhérine dans un vecteur codant pour le fluorophore photoconvertible **mEOS2** (McKinney et al., 2009). Après stimulation par une longueur d'onde de 409nm (UV), le fluorophore passe d'une émission dans le vert à une émission dans le rouge. La Ncad-mEOS2 s'exprime et se localise de manière analogue à la Ncad-GFP dans les astrocytes. La photoconversion des molécules de Ncad-mEOS2 à l'avant de

la cellule permet de suivre avec précision leur devenir dans la cellule au cours de la migration. La **Figure 47b** montre clairement le transport des molécules de Ncad de l'avant vers l'arrière de la cellule, à une vitesse similaire à celle trouvée précédemment (0.3µm/min).

Ces expériences valident définitivement l'existence d'un **flux rétrograde latéral des jonctions adhérentes** au cours de la **migration collective des astrocytes**.

II.B. Caractérisation du flux rétrograde de N-cadhérine

II.B.1. Le flux rétrograde de N-cadhérine est couplé au flux rétrograde d'actine au cours de la migration

A l'avant de la plupart des cellules en migration, le réseau d'actine est hautement dynamique. La polymérisation des filaments d'actine couplée à la force de réaction de la membrane contre laquelle les filaments poussent engendre un flux rétrograde d'actine (Ponti et al., 2004; Watanabe and Mitchison, 2002). Dans les astrocytes, ce sont les microtubules, plus que l'actine, qui jouent un rôle prépondérant dans l'établissement de la protrusion (Etienne-Manneville, 2004). Afin de déterminer néanmoins la dynamique du cytosquelette d'actine, j'ai transfecté les astrocytes avec un plasmide codant pour un marqueur des filaments d'actine, le Lifeact (Riedl et al., 2008), associé à un fluorophore. J'ai ainsi mis en évidence dans les astrocytes en migration un flux rétrograde de filaments d'actine de l'avant à l'arrière de la cellule, jusqu'au niveau du noyau (**Films 5 et 6**).

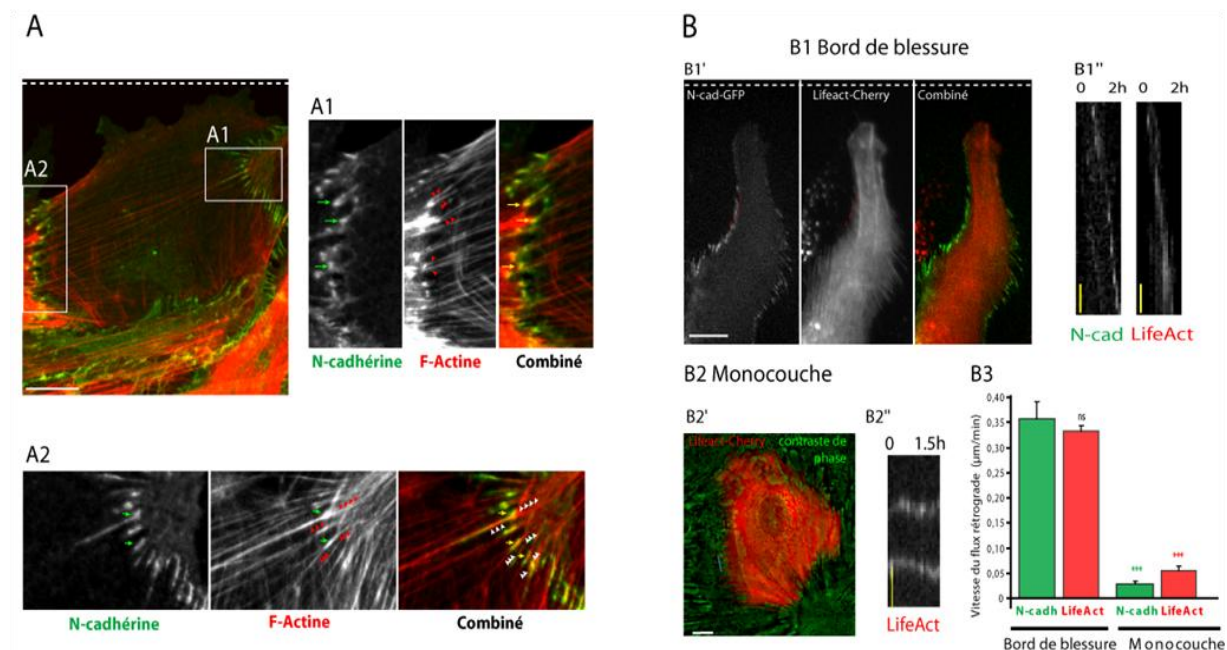


Figure 48 : Le flux rétrograde de N-cadhérine est couplé au flux rétrograde d'actine.

A) Astrocyte en migration fixé 8 heures après la rayure (trait pointillé) de la monocouche et marqué par des anticorps anti-Ncad (vert) et par la phalloïdine-rhodamine pour détecter les filaments d'actine (rouge). *A1 et A2* : Zoom des encadrés correspondant. La N-cadhérine (flèches vertes) est localisée au bout des fibres d'actine transverses ancrées aux JAs (têtes de flèche rouge). **B)** Analyse comparée des flux rétrogrades d'actine et de cadhérine aux jonctions dans des cellules au bord de la rayure (*B1*) et au sein de la monocouche (*B2*). Les cellules sont co-transfectées avec les constructions Ncad-GFP et Lifeact-Cherry. La vitesse des deux flux n'est pas significativement différente (*B3*, n=31 pour les cellules du bord et n=3 pour les cellules de la monocouche test-t, échantillons indépendants, p-value=0.62).

J'ai établi la vitesse de ce flux à $0.3\mu\text{m}/\text{min}$ (**Figure 48b₁**). Par contre, au sein d'une monocouche où les cellules immobiles n'ont aucun bord libre, on ne distingue aucun flux rétrograde d'actine (**Figure 48b₂**).

Aussi nous sommes-nous demandés s'il pouvait y avoir un lien entre le flux rétrograde d'actine et le flux rétrograde de N-cadhérine. Dans les astrocytes exprimant la Ncad-GFP et le Lifeact-Cherry, les deux flux d'actine et de cadhérine ont la même vitesse (**Figure 48b₃**). Une analyse détaillée des cellules fixées a montré que les **filaments d'actine transversaux** transportés vers l'arrière de la cellule sont **ancrés** aux jonctions adhérentes (**Figure 48a**). De plus, la réduction du niveau de l' α -caténine, protéine clé de l'ancrage de l'actine aux JAs, diminue significativement la vitesse du flux rétrograde de N-cadhérine (résultat non montré).

II.B.2. Le flux rétrograde de N-cadhérine dépend de la contractilité du réseau d'acto-myosine.

La contraction de la myosine associée aux fibres d'actine est essentielle à la formation d'un flux rétrograde d'actine dans le cône de croissance des neurones (Lin et al., 1996). Pour tester son implication dans le flux rétrograde de N-cadhérine, j'ai utilisé deux inhibiteurs de la contractilité de la myosine : Y27632 (inhibiteur de ROCK, activateur la myosine) et ML-7 (inhibiteur de la chaîne légère de la myosine). Le traitement des astrocytes en migration avec ces inhibiteurs réduit significativement le nombre de fibre de tension normalement visible dans la protrusion (**Figure 49a**), et inhibe le flux rétrograde de N-cadhérine.

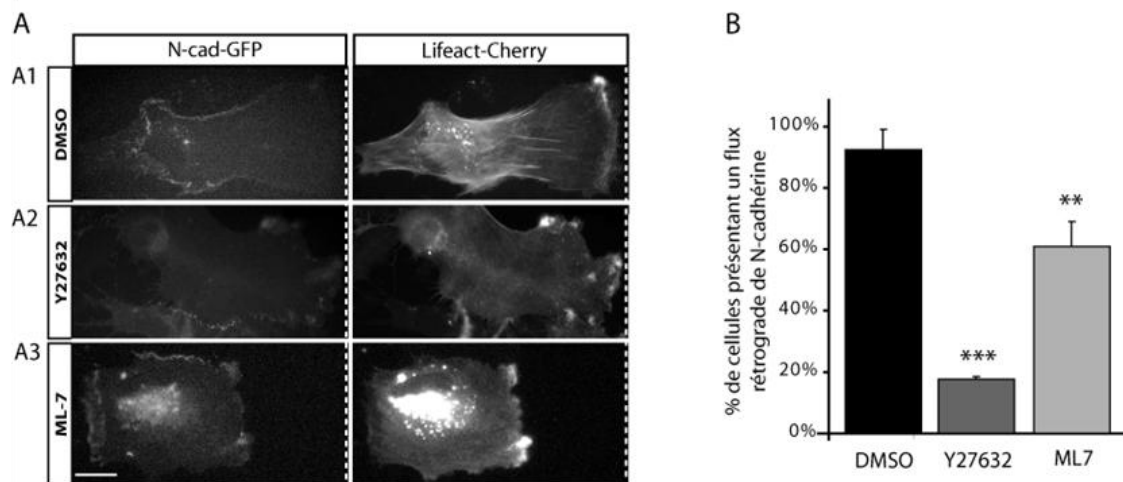


Figure 49 : Le flux rétrograde de la N-cadhérine est régi par la contractilité du réseau d'actomyosine.

A) Effet des inhibiteurs de la contractilité de la myosine sur l'organisation des jonctions et du cytosquelette des astrocytes en migration. Les cellules CTL (traitement au DMSO, A1) établissent des jonctions tout le long de leurs zones de contact latérales avec ses voisines. En outre, des fibres de stress contractiles sont visibles (marquage Lifeact) sur le côté et au milieu des cellules CTL. Par contre, l'ajout d'Y27632, inhibiteur de ROCK empêchant l'activation de la myosine, fait disparaître ces fibres de tension (A2). Les jonctions dépendantes de la N-cadhérine sont également altérées et deviennent discontinues. L'utilisation de ML-7, inhibiteur spécifique de la chaîne légère de la myosine, a des conséquences similaires sur l'organisation des fibres d'actomyosine et des JAs (A3). **B)** Histogramme illustrant les effets de l'inhibition de la myosine sur le flux rétrograde de N-cadhérine. Près de 90% des cellules CTL (DMSO) analysées présentent un flux rétrograde de N-cadhérine tandis que seulement 19% (Y27632) et 60% (ML-7) des cellules dont la contractilité de la myosine est inhibée montrent un flux rétrograde de N-cadhérine aux jonctions. Test statistique: $n > 35$, t-test, échantillons indépendants, **: p-value < 0.01 ; ***: p-value < 0.001 .

Lorsque les cellules sont en présence de DMSO (CTL), ce flux est détecté dans près de 90% des cellules. En présence d'Y27632 un flux des jonctions adhérentes n'est détectable que dans 19% des cellules analysées (**Figure 49b**).

L'ensemble de ces résultats démontre que le flux rétrograde de N-cadhérine est régi par le flux rétrograde de filaments d'actine transversaux ancrés aux jonctions adhérentes.

II.C. Le flux rétrograde de N-cadhérine est associé à un recyclage des cadhérines de l'arrière de la cellule vers les jonctions en formation, à l'avant

L'observation d'un flux rétrograde continu de N-cadhérine m'a amené à me demander comment les jonctions dépendantes de la N-cadhérine peuvent-elles perpétuellement se reformer à l'avant des zones de contact entre cellules adjacentes.

II.C.1. Le devenir de la N-cadhérine à l'arrière de la cellule

L'analyse de la dynamique plus rapide de la N-cadhérine m'a permis de m'intéresser à son devenir une fois transportée vers l'arrière de la cellule par le flux rétrograde. Les films acquis lors de la migration d'astrocytes exprimant la Ncad-GFP montrent un transport vésiculaire semblant émergé des jonctions adhérentes **à l'arrière** de la cellule. La **Figure 50** représente des images extraites de ces films et qui mettent en évidence ce phénomène.

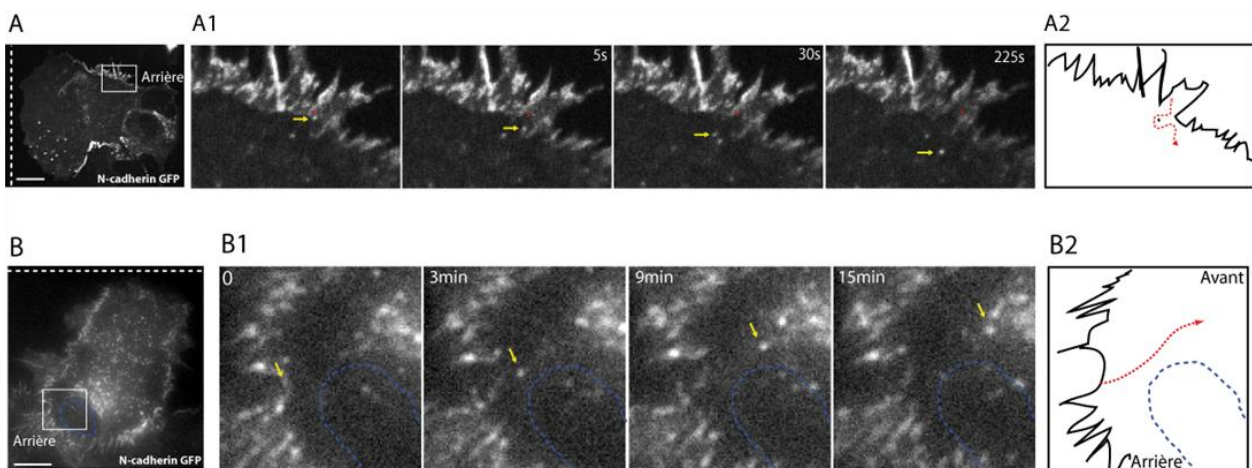


Figure 50 : Trafic vésiculaire de la N-cadhérine hors des jonctions adhérentes à l'arrière des cellules en migration.

A) et B) Astrocytes exprimant la Ncad-GFP en migration vers la blessure (trait pointillé). *A1 et B1*. Série de grossissements de l'encadré blanc (en A et B) au cours du temps. La succession d'images sélectionnées met en évidence le décrochage des JAs d'une vésicule transportant la N-cadhérine (flèche jaune), et son mouvement vers une zone périnucléaire. La croix rouge marque l'emplacement à t0 de la vésicule. *A2 et B2*. Schémas représentant la trajectoire (pointillés rouge) de la vésicule internalisée. En B, le trait pointillé bleu délimite le noyau. Barre d'échelle blanche : 10µm.

II.C.2. Transport membranaire de la N-cadhérine de l'arrière de la cellule vers le front de migration

L'observation de la dynamique de la Ncad-GFP à la fréquence d'une image toutes les secondes met en évidence un **trafic vésiculaire de la N-cadhérine dirigé et orienté vers le front de migration (Film 7 et Figure 51a)**. Le suivi individuel des vésicules de N-cadhérine montre un trafic rapide ($\sim 0.5\mu\text{m/s}$) de l'arrière de la cellule (au niveau des jonctions ou d'une zone périnucléaire) vers l'avant de la protrusion (**Figure 51a₁**). Une fois à l'avant de la cellule, **les vésicules de N-cadhérine sont transportées jusqu'au front de migration (Figure 51b)**. Des expériences d'immunodétection des cadhérines sur cellules fixées valident ces observations, et les étendent à un recrutement au front de migration de l'ensemble des protéines des jonctions d'adhérence. En effet, la N-cadhérine, la p120ctn, l' α -caténine et la β -caténine sont enrichis à l'avant de la cellule en migration (**Figure 51c et d**). Afin d'éviter les faux-positifs l'expression de la GFP a été utilisée comme marqueur du volume cellulaire. Lorsque le ratio entre l'intensité de la N-cadhérine et celle de la GFP est suffisamment élevé, la cellule est dite enrichie en cadhérine au front de migration (**Figure 51c**).

Pour résumer, ces résultats montrent que la majeure partie des protéines des JAs, dont les cadhérines, sont recrutées au front de migration.

Je me suis ensuite intéressé aux acteurs contrôlant ce recrutement vers l'avant. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des **microtubules** dans le trafic des cadhérines aux JAs (Etienne-Manneville, 2011). Je me suis alors demandé si ce cytosquelette était impliqué dans le recrutement de la N-cadhérine au front de migration.

L'altération du réseau de microtubules par l'ajout de nocodazole empêche l'enrichissement de la N-cadhérine au front de migration (**Figure 52a**). De plus, la dynamique de la E-cadhérine est altérée dans les cellules épithéliales lorsque son endocytose est bloquée par un inhibiteur de la dynamine (de Beco et al., 2009). Dans les astrocytes en migration, l'utilisation du Dynasore, inhibiteur de la **dynamine**, diminue significativement le pourcentage de cellules dont le front de migration est enrichi en N-cadhérine (**Figure 52b**). En outre, de nombreuses Rabs ont été impliquées dans le turnover des cadhérines, que ce soit dans les épithéliums ou dans les neurones en migration (**Figure 24** de l'introduction et (Kawauchi et al., 2010)). L'expression d'un mutant dominant négatif de **Rab5** dans les astrocytes en migration réduit le nombre de cellules présentant un recrutement de la N-cadhérine au front de direction (**Figure 52c**). Enfin, Arf6 étant impliqué dans le trafic des cadhérines, je me suis intéressé à un potentiel rôle de cette protéine dans le recrutement au front de migration de la N-cadhérine. Néanmoins, de manière inattendue, la réduction de son niveau d'expression par siARN, n'affecte pas le recrutement de la N-cadhérine à l'avant de la cellule (résultat non montré).

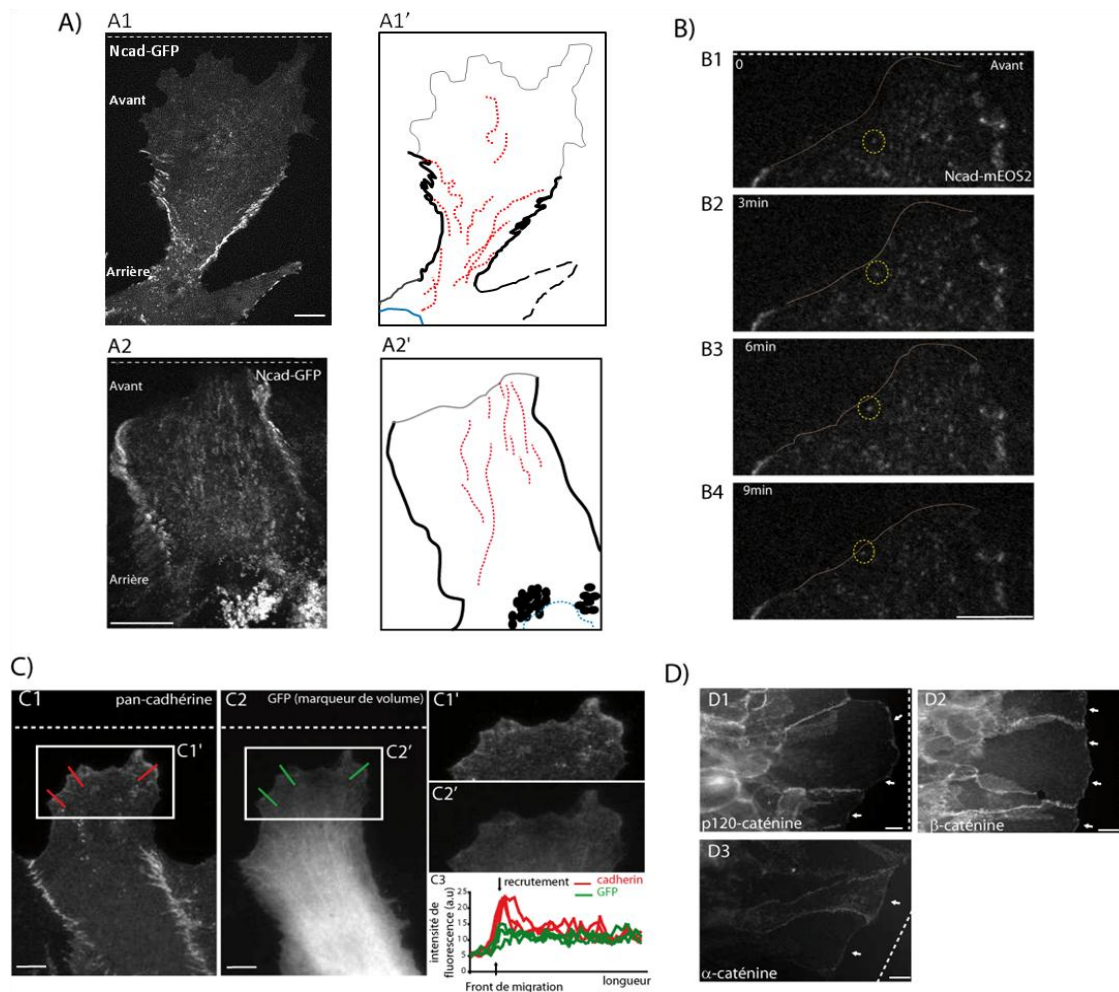


Figure 51 : Recrutement des protéines des jonctions d'adhérence au front de migration.

A) Trafic vésiculaire dirigé et orienté de la N-cadhérine vers l'avant des cellules en migration. *A1*. Image extraite du film 4 représentant un astrocyte en migration exprimant la Ncad-GFP. *A1'*. Schéma illustrant les principales trajectoires des vésicules de Ncad observées pendant 5min. Le focus de l'image est sur l'arrière de la cellule. Cela explique la faible proportion de trajectoire visible jusqu'au front de migration. Ces mouvements de vésicules se font préférentiellement de l'arrière vers l'avant. *A2*. Projection d'images représentant un astrocyte en migration pendant 2h et exprimant la Ncad-GFP. Noter les trajectoires rectilignes des vésicules de Ncad schématisées en *A2'* (lignes pointillées rouge). **B)** Série d'images extraites du film 5 montrant le recrutement de vésicules de N-cadhérine mEOS2 non photoconverties au front de migration. Le trafic vésiculaire semble plus lent à cet endroit de la cellule. **C)** Immunodétection des cadhérines (anti-pancadhérine, *C1*), et de la GFP (*C2*), comme marqueur de volume. *C1'* et *C2'*. Agrandissements du front de migration (encadré blanc respectivement de *C1* et *C2*). *C3*. Graphique illustrant les mesure d'intensités de fluorescence le long des traits rouges (*C1*, pancadhérine) et vert (*C2*, GFP). Noter le pic d'intensité de la cadhérine au front de migration, contrairement à la GFP. **D)** Immunodétection de la p120ctn (*D1*), de la β -caténine (*D2*), de l' α -caténine (*D3*) au front de migration des astrocytes (flèches blanches). Barres d'échelle : 10 μ m.

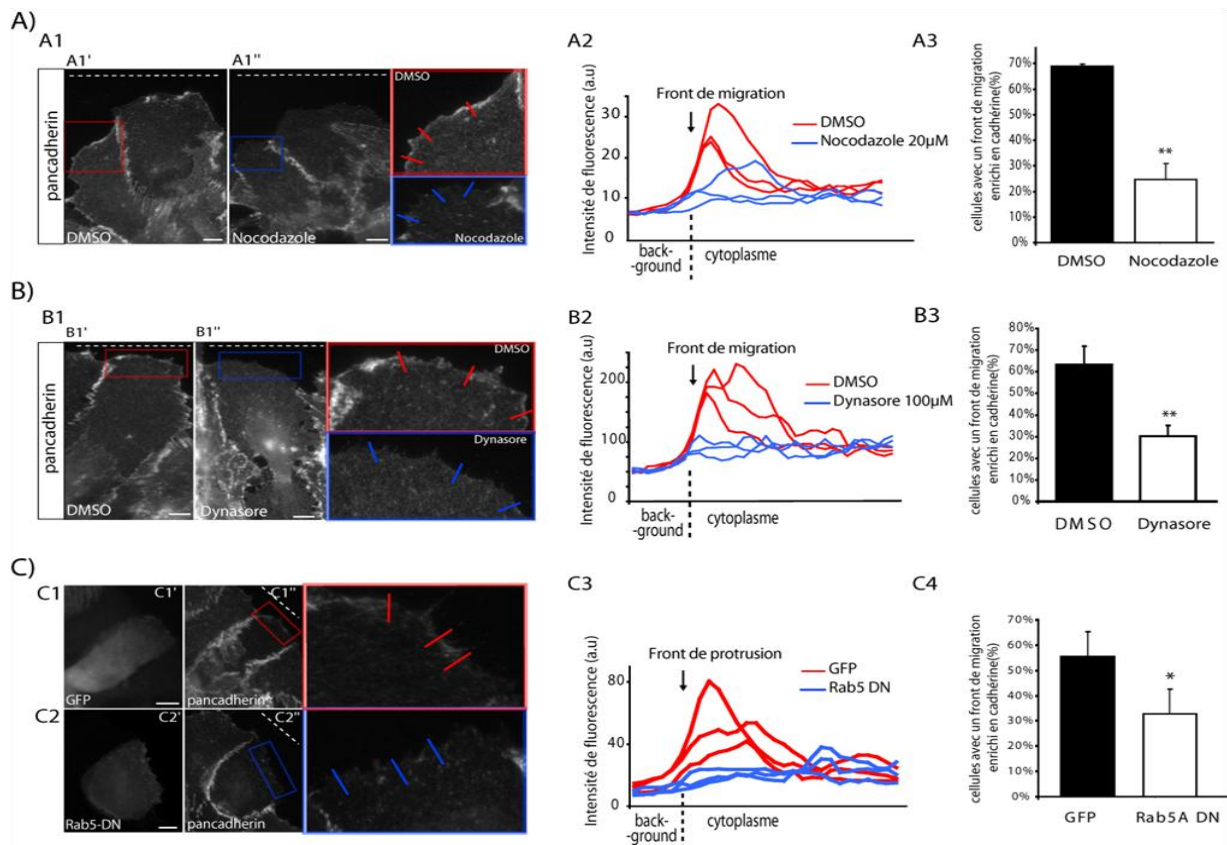


Figure 52 : Le trafic de la N-cadhérine au front de migration est régulé par le réseau de microtubules, l'endocytose dépendante de la dynamine et Rab5.

A) et B) Immunodétection de la cadhérine (anti-pancadhérine) dans les astrocytes en migration traités avec du DMSO (A1', B1'), du nocodazole (20μM, A1'') et du dynasore (100μM, B1''). **A2 et B2.** Intensité de fluorescence le long des traits tracés au front de migration dans les encarts en A1', A1'', B1' et B1'', montrant une inhibition de l'enrichissement de la N-cadhérine à l'avant lorsque les microtubules (A) et la dynamine (B) sont altérés. **A3 et B3.** Histogrammes montrant le pourcentage de cellules possédant un front de migration enrichi en cadhérine en présence de DMSO, de nocodazole (A3) et Dynasore (B3). **C)** Rab5a inhibite le recrutement de la N-cadhérine à l'avant de la cellule en migration. **C1.** Expression de la GFP (C1') et immunomarquage des cadhérines (C1''). **C2** Expression du dominant négatif Rab5a(S34N)-myc et immunomarquage anti-myc (C2'), et anti-pancadhérine (C2''). **C3 et C4.** Analyses quantitatives. Test statistique : $n > 100$, 5 expériences différentes, test-t, échantillons indépendants, * : $p\text{-value} < 0.05$; ** : $p\text{-value} < 0.01$. Barres d'échelle: 10μm.

II.C.3. Les molécules de N-cadhérine recrutées au front de migration participent à la formation de nouvelles jonctions latérales au cours de la migration

Afin de connaître la fonction du recrutement des protéines des JAs au front de migration, je me suis focalisé sur le devenir des molécules de N-cadhérine à l'avant de la cellule. Le suivi des vésicules à l'avant de la protrusion est rendu compliqué par la formation de ruffles membranaires. Néanmoins, j'ai pu observer dans quelques films d'astrocytes en migration exprimant la Ncad-GFP, le recrutement vers les jonctions en formation d'agrégats de cadhérines apparus quelques minutes auparavant au front de migration (**Figure 53a et Film 8**). En outre, la photoconversion de molécules de Ncad-mEOS2 localisées à l'avant de la protrusion, a permis de suivre avec plus de précision la dynamique de la N-cadhérine dans cette

zone de la cellule en migration. Quelques minutes après la photoconversion, **les molécules de N-cadhérine photoconverties au front de migration participent à la formation de nouvelles jonctions latérales (Figure 53b₂ flèche rouge et 53c)**. En outre, l'apparition de N-cadhérines photoconverties aux jonctions latérales se fait bien par diffusion depuis le pool de N-cadhérine du front de migration puisque l'on détecte plus de cadhérines photoconverties à l'avant (F) de la jonction qu'à l'arrière (R) (**Figure 53d**).

II.C.4. Mise en évidence d'une boucle de recyclage de la N-cadhérine pendant la migration collective des astrocytes

Je me suis ensuite demandé si l'accumulation de la N-cadhérine au front de migration n'était pas due à la néosynthèse de N-cadhérine. Les cellules ont été traitées avec du cycloheximide pour bloquer la synthèse protéique (Munro et al., 1968). Dans ces conditions, le recrutement de la N-cadhérine à l'avant de la cellule n'est pas significativement altéré (résultat non montré). Ce résultat m'a amené à m'interroger sur un possible **recyclage** des cadhérines de l'arrière de la cellule vers le front de migration.

La photostabilité élevée du fluorophore mEOS2 (McKinney et al., 2009) permet d'étudier la dynamique de la N-cadhérine sur une longue période au cours de la migration. De manière frappante, une heure après photoconversion de la Ncad-mEOS2 à l'arrière des jonctions latérales de la cellule, on observe une accumulation de la N-cadhérine photoconvertie à l'avant des jonctions (**Figure 54a**). Cette observation surprenante révèle l'existence, pendant la migration cellulaire, **d'un recyclage dirigé des cadhérines aux jonctions, de l'arrière de la cellule vers l'avant**. De plus, l'altération de l'endocytose de la cadhérine par l'utilisation du Dynasore perturbe considérablement la formation de nouvelles jonctions à l'avant de la cellule (**Film 9 et Figure 54b**). Cette dernière expérience renforce l'importance du recyclage de la N-cadhérine dans l'établissement de nouvelles jonctions à l'avant, au cours de la migration collective des astrocytes dans un modèle de fermeture de blessure.

L'ensemble des résultats obtenus sur la dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration collective m'a amené à proposer le modèle illustré en **Figure 55**.

Pour avancer, la cellule doit réduire l'adhérence aux cellules avoisinantes, notamment à l'arrière, afin de diminuer les forces de tension opposées (**Figure 55** flèches noires en pointillé). Ce phénomène se produit grâce à **l'endocytose accrue** de la N-cadhérine à l'**arrière** des jonctions latérales. Néanmoins, la migration étant collective, la cellule doit maintenir en permanence sa cohésion au groupe au fur et à mesure de sa progression. Cela se produit principalement par la **formation de nouvelles jonctions latérales**, à l'**avant**, avec les cellules voisines. Aussi, le **recrutement des cadhérines endocytées** à l'arrière **vers le front de migration** puis vers les jonctions en formation, permet-il de soutenir la cohésion entre les cellules. Enfin, le **flux rétrograde** des cadhérines de l'avant des jonctions vers l'arrière assure la dynamique nécessaire à ce recyclage afin d'assurer la meilleure **balance entre adhérence et dé-adhérence** indispensable à la migration collective de la cellule (**Figure 55**).

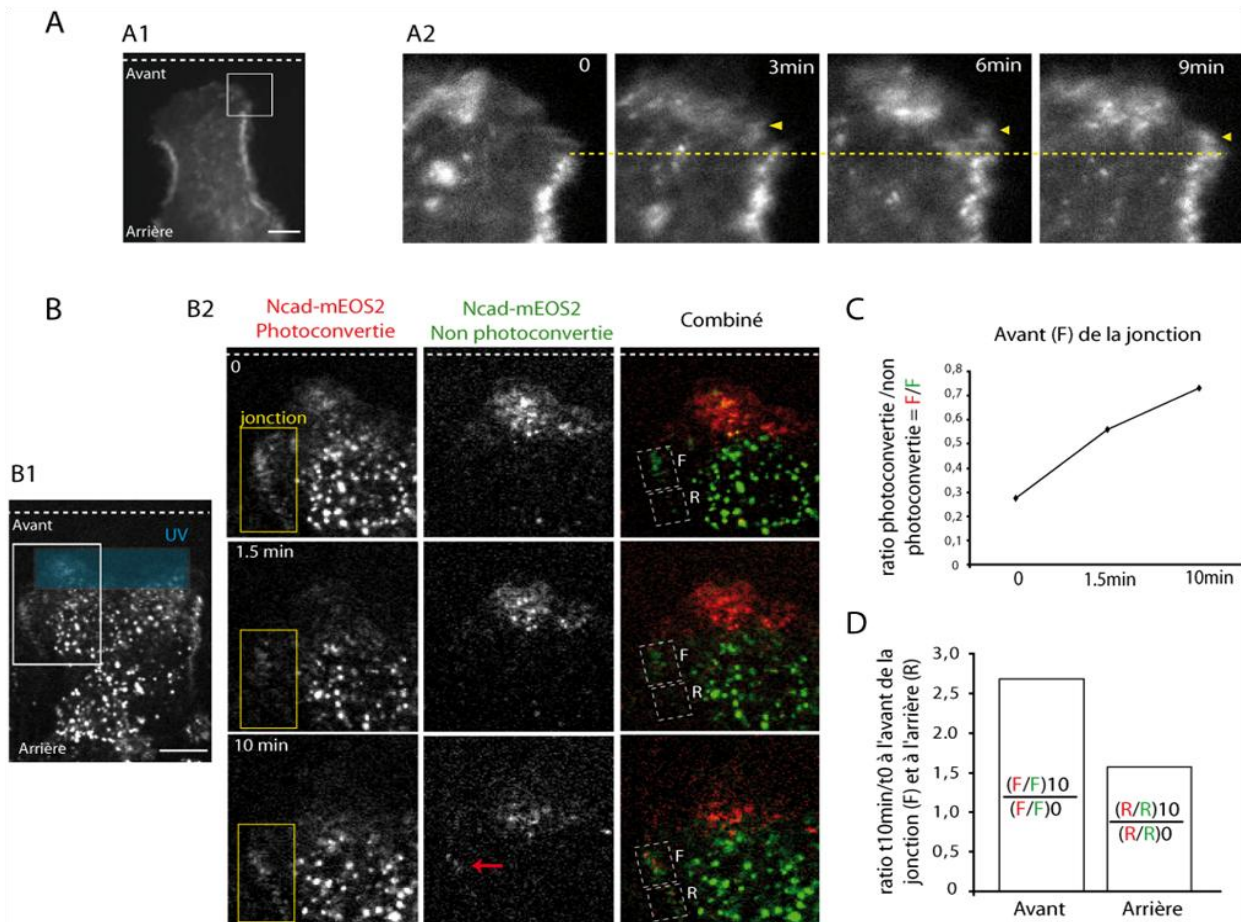


Figure 53 : La N-cadhérine nouvellement recrutée au front de migration est dirigée aux jonctions latérales en formation.

A) Astrocyte en migration exprimant la Ncad-GFP. **A2.** Série d'images prises toutes les 3min (encadré blanc en A1) représentant la frontière entre le front de migration et la nouvelle zone de contact entre les deux cellules voisines (trait pointillé jaune). Noter l'apparition et le transport d'un agrégat de cadhérines de l'avant de la protrusion vers la nouvelle zone de contact (tête de flèche). **B)** Expérience de photoconversion de la Ncad-mEOS2, localisée au front de migration (rectangle bleu, B1). **B2.** L'acquisition d'une image 1,5min puis 10min après, permet de mettre en évidence l'apparition de N-cadhérines photoconverties à l'avant de la jonction latérale gauche (flèche rouge). Cette jonction (rectangle jaune) est subdivisée en 2 zones égales : l'avant de la jonction (F) et l'arrière de la jonction (R). **C)** Quantification du recrutement des cadhérines du front de migration aux jonctions en formation. Le graphique représente le ratio de l'intensité de fluorescence rouge/vert (=photoconvertie/non photoconvertie) dans la partie avant de la jonction (F). **D)** Histogramme représentant le ratio entre la fluorescence des molécules photoconverties (normalisée par la fluorescence non photoconvertie) au bout de 10 minutes et cette même fluorescence normalisée à t0. Cette mesure est effectuée à l'avant (F) de la jonction et à l'arrière (R). Noter l'augmentation de la fluorescence rouge principalement à l'avant de la jonction. Barres d'échelle : 10µm.

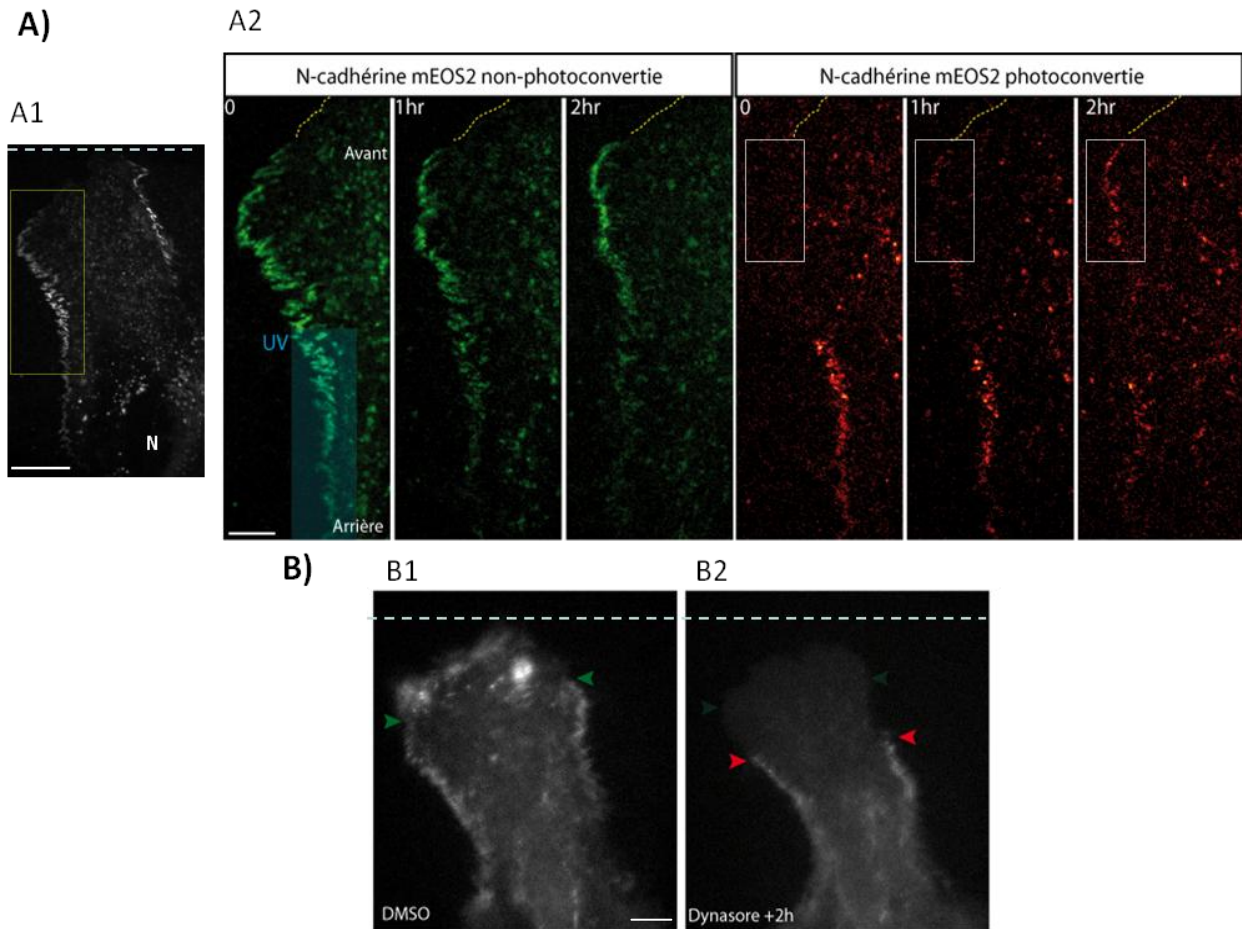


Figure 54 : Recyclage dirigé de la N-cadhérine au cours de la migration collective

A) Photoconversion de la Ncad-mEOS2 dans un astrocyte en migration. A2. Série d'images (grossissement du rectangle jaune, A1) prises à une heure d'intervalle, montrant la redistribution de la Ncad-mEOS2 photoconvertie à l'arrière de la jonction (rectangle bleu, UV). Noter le recyclage des molécules de Ncad de l'arrière de la cellule aux jonctions récentes ou en formation (rectangle blanc). Barre d'échelle en A1 : 10µm, en A2 : 5µm. **B)** Effet de l'inhibition de la dynamine sur le recyclage des cadhérines. Les images sont extraites du film 7. Un astrocyte en migration exprimant la Ncad-GFP en présence de DMSO établit des jonctions à l'avant de la protrusion avec les cellules voisines (têtes de flèche verte). L'ajout de Dynasore (100µM) dans le milieu altère la formation des nouvelles jonctions. Seules les anciennes jonctions plus à l'arrière persistent après 2h de traitement (têtes de flèche rouge). Barres d'échelle : 10µm.

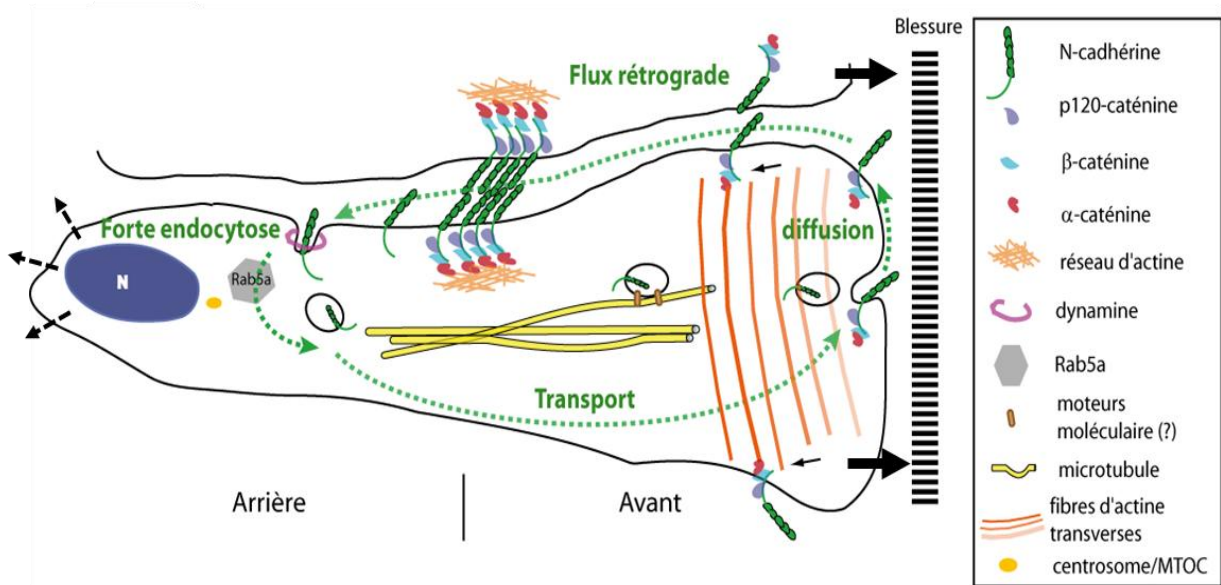


Figure 55: Dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration collective astrocytaire.

Modèle illustrant la dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration collective des astrocytes dans un modèle de fermeture de blessure. A l'arrière d'une cellule au bord de la blessure, l'endocytose de la N-cadhérine, assurée par un mécanisme dépendant de la dynamine et de Rab5a, mais pas d'ARF6, diminue l'adhérence aux cellules avoisinantes. Cela réduit ainsi les forces de tension opposées à l'avancée de la cellule (flèches noires en pointillés à l'arrière vs flèches pleines noires à l'avant). En plus de ce rôle mécanique, l'endocytose des cadhérines génère un pool de molécules «libres» dont certaines sont recrutées vers le front de migration grâce au trafic membranaire dépendant des microtubules. Les moteurs moléculaires impliqués dans le transport de ce cargo n'ont pas été investigués, même si, compte tenu de l'implication des kinésines dans le turnover classique de la N-cadhérine (Chen et al, 2003), ces protéines sont des cibles potentielles. A l'avant de la protrusion, les vésicules transportant la N-cadhérine fusionnent avec la membrane et rapidement, les molécules de cadhérine sont recrutées vers les jonctions latérales où elles participent à la formation de nouvelles jonctions. La dynamique rapide de cette étape suggère que la N-cadhérine diffuse latéralement une fois arrivée au front de migration. Les autres protéines des JAs (α -caténine, β -caténine et p120ctn) sont également recrutées au front de migration. En outre, la N-cadhérine présente à l'avant des jonctions latérales est transportée lentement ($0.3\mu\text{m}/\text{min}$) vers l'arrière de la jonction. Ce mouvement ou flux rétrograde de la N-cadhérine est dépendant d'un réseau intact de filaments d'actine, de la contractilité de la myosine et de la présence de l' α -caténine. Enfin, l'ancrage des fibres d'actines transverses aux JAs suggère que le moteur du flux rétrograde de la N-cadhérine est le flux rétrograde d'actine observé classiquement dans les différents types cellulaires en migration. L'ensemble de ces différentes étapes (endocytose à l'arrière, recrutement à l'avant, diffusion latérale et flux rétrograde) constitue une boucle de recyclage de la cadhérine au cours de la migration (ou recycling flow, flèches vertes en pointillés).

III. La p120ctn contrôle la dynamique de la N-cadhérine pendant la migration cellulaire

III.A. La perte de la p120ctn altère la boucle de recyclage de la N-cadhérine

III.A.1. Le recrutement de la p120ctn aux jonctions adhérentes diminue de l'avant à l'arrière des cellules en migration et favorise l'endocytose de la N-cadhérine à l'arrière

A la recherche de régulateurs de la dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration, je me suis intéressé à la p120ctn dont le rôle de stabilisateur de la N-cadhérine à la membrane plasmique est bien connu (Ishiyama et al, 2010). De plus, la découverte de sa potentielle implication dans l'invasion des gliomes a motivé notre investigation des processus moléculaires dérégulés lors de la perte de la p120ctn, dans des astrocytes sains en migration. Son marquage par immunofluorescence montre une **distribution non-uniforme de la p120ctn** le long des jonctions des astrocytes en migration (**Figure 56a**). Le ratio p120ctn/Ncad diminue de l'avant vers l'arrière des jonctions latérales (**Figure 56a₂, a₃**).

La p120ctn ayant été impliquée dans le contrôle de l'internalisation des cadhérines (Davis et al., 2003), j'ai cherché à localiser les sites d'internalisation de la N-cadhérine au cours de la migration. On observe une augmentation de la colocalisation de la N-cadhérine avec la clathrine - protéine impliquée dans la principale voie d'endocytose des cadhérines - spécifiquement dans la partie arrière de la cellule (**Figure 56b₁**). Alors que près de **30%** de la N-cadhérine observée aux jonctions à l'**arrière** est **colocalisée avec la clathrine**, seulement 6% de la N-cadhérine à l'avant colocalise avec la clathrine (**Figure 56b₂**). La **localisation préférentielle de la p120ctn à l'avant** de la cellule pourrait être responsable de **l'endocytose accrue de la N-cadhérine à l'arrière**.

L'altération du niveau de p120ctn global perturbe la distribution asymétrique de l'endocytose de la N-cadhérine dans les cellules en migration. En effet, le ratio du taux de clathrine colocalisée avec la N-cadhérine à l'avant sur le taux de clathrine colocalisée avec la N-cadhérine à l'arrière diminue significativement dans les cellules transfectées avec un si p120, comparé aux cellules CTL (**Figure 56b₃**). Dans les cellules si p120 le niveau d'endocytose de la N-cadhérine à l'avant est quasi-identique à celui à l'arrière (ratio arrière/avant=1,12), tandis que dans les cellules si CTL, l'endocytose est près de deux fois plus importante à l'arrière de la cellule. A noter que dans les astrocytes sains non transfectés l'endocytose étant cinq fois plus importante à l'arrière qu'à l'avant, l'expression du si CTL utilisé (si GFP) semble affecter légèrement ce processus.

Pour résumer, l'ensemble de ces résultats met en évidence l'établissement d'un gradient décroissant d'adhérence dépendante de la N-cadhérine, de l'avant vers l'arrière des cellules en migration. Ce gradient serait maintenu en partie par la distribution non uniforme de la p120ctn le long des jonctions latérales.

III.A.2. La perte de la p120ctn empêche le recrutement de la N-cadhérine au front de migration ainsi que la formation de nouvelles jonctions latérales

De manière surprenante, la co-expression de Ncad-GFP et p120ctn-Cherry dans des astrocytes en migration montrait non seulement une colocalisation de la p120ctn avec la N-cadhérine aux jonctions, mais aussi dans des vésicules de trafic membranaire (données non

montrées). Cette observation m'a amené à m'interroger sur une possible implication de la p120ctn dans le recyclage de la N-cadhérine. Dans les cellules si p120, on observe une absence du recrutement du complexe Ncad/caténines (**Figure 57a₁**). La réexpression de la p120ctn dans ces cellules restaure de manière significative le recrutement de la N-cadhérine au front de migration, indiquant que la p120ctn est nécessaire à ce phénomène (**Figure 57a₂**). En outre, la perte de la p120ctn altère la formation des nouvelles jonctions latérales. Dans les astrocytes si p120, la distance entre le front de migration et la première jonction latérale riche en N-cadhérine est plus de quatre fois supérieure à celle visible dans les astrocytes si CTL (**Figure 57b**).

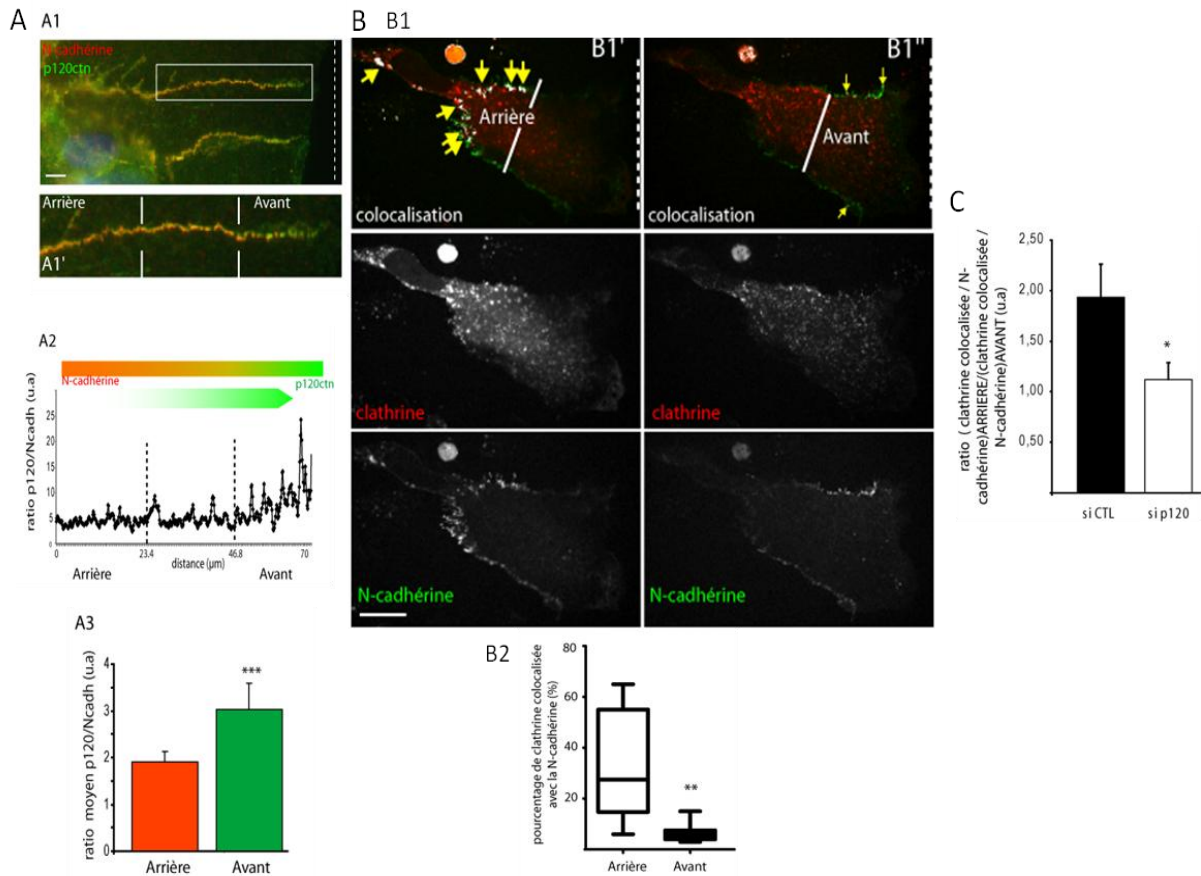


Figure 56: La localisation préférentielle de la p120ctn à l'avant de la jonction accroît l'endocytose de la N-cadhérine à l'arrière de la cellule.

A) Distribution de la p120ctn le long des jonctions. *A1*. Immunodétection de la p120ctn (vert) et de la N-cadhérine (rouge) dans un astrocyte en migration (image combinée). *A1'*. Zoom de l'encadré blanc en *A1*, montrant l'enrichissement en p120ctn de la partie avant de la jonction. *A2*. Graphique représentant le ratio p120ctn/Ncad le long de la jonction visible en *A1'*. Noter l'augmentation du ratio à l'avant de la jonction. *A3*. Histogramme quantifiant la distribution non uniforme de la p120ctn aux JAs (n=25, 3 expériences différentes). *** : p-value<0.001. **B)** Augmentation de l'endocytose de la Ncad à l'arrière des cellules en migration. *B1*. Astrocyte exprimant la Ncad-GFP et la clathrine-Cherry au cours de la migration. Les flèches jaunes soulignent les zones de colocalisation (points blancs) obtenues par le plugin «colocalization highlighter» d'Image J. Nombreuses à l'arrière (*B1'*), elles sont quasi-absentes à l'avant de la cellule (*B1''*). Ce résultat est quantifié dans l'histogramme en *B2* représentant le pourcentage de cadhérine colocalisée avec la clathrine (n>18, ** : pvalue <0.01). Les images de *B1'* et *B1''* sont focalisées respectivement sur l'arrière et l'avant de la cellule *B3*. Histogramme illustrant le ratio du pourcentage de cadhérine colocalisée avec la clathrine à l'arrière sur le pourcentage de cadhérine colocalisée à l'avant dans des cellules CTL et des cellules si p120. La perte de la p120ctn altère ce ratio et génère une endocytose uniforme de la Ncad à l'avant et à l'arrière de la cellule. N>15, 3 expériences différentes, * : p-value<0.05. Barres d'échelle 10µm.

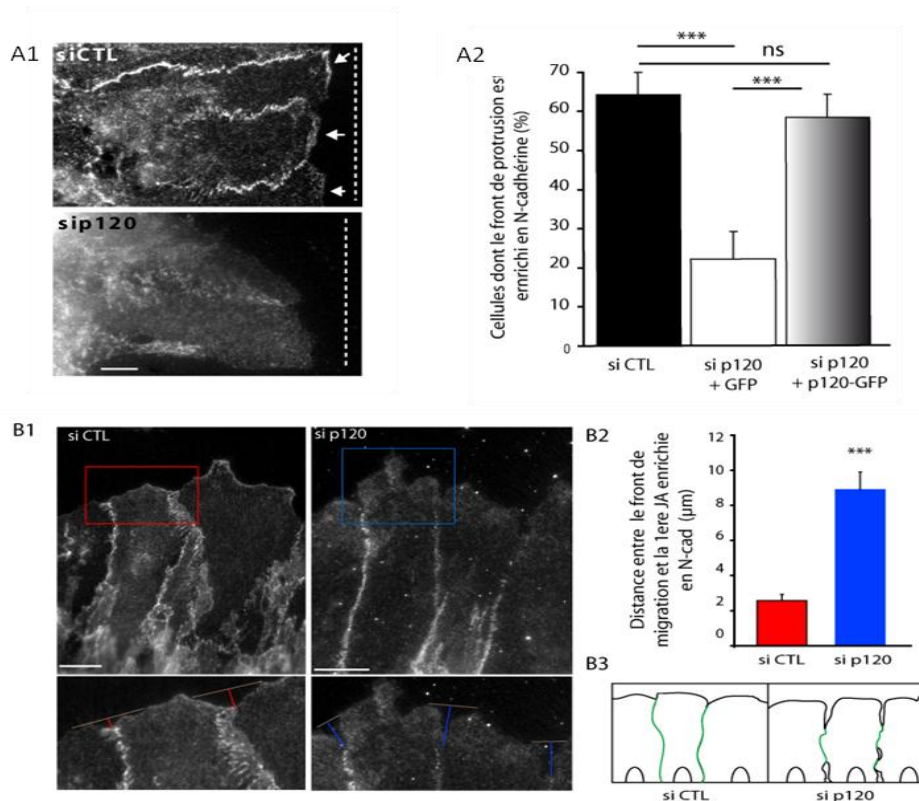


Figure 57: La perte de la p120ctn altère la dynamique de la boucle de recyclage de la N-cadhérine au cours de la migration

A) La perte de la p120ctn altère le recrutement de la N-cadhérine au front de migration. **A1.** Immunodétection de la N-cadhérine (anti-pancadhérine) dans des astrocytes en migration transfectés avec un si GFP (si CTL) et le si p120#2. Noter la présence de N-cadhérine (flèches blanches) au front de migration dans les astrocytes CTL et son absence dans les astrocytes si p120. **A2.** Histogramme représentant le pourcentage de cellules dont le front de migration est enrichi en N-cad. La N-cad est recrutée à l'avant dans plus de 60% des cellules CTL mais dans seulement 20% des cellules si p120 exprimant la GFP (les données sont équivalentes dans les astrocytes exprimant uniquement le si p120). Par contre, la réexpression de la p120ctn dans les cellules si p120 grâce à l'utilisation d'une forme de la p120ctn résistante au si p120#2 permet de restaurer la distribution de la N-cad à l'avant de la protrusion dans 58% des cellules. Les données ont été collectées sur plus de 100 cellules par condition dans au moins 3 expériences différentes. **B)** La perte de la p120ctn perturbe la formation de nouvelles jonctions à l'avant des cellules en migration. **B1.** Immunodétection de la N-cadhérine (anti-pancadhérine) dans des astrocytes exprimant un si CTL (rouge) ou le si p120#2 (bleu). La distance entre la première JA et le front de migration est mesurée dans les deux conditions (traits rouges et bleus dans les agrandissements des zones encadrées) et quantifiée dans l'histogramme. **B2.** Cette distance est plus de 4 fois supérieure dans les astrocytes si p120 ; indiquant une perturbation de la formation des nouvelles jonctions dans ces cellules. Les données ont été collectées sur plus de 89 cellules dans 3 expériences différentes. **B3.** Schéma illustrant l'organisation des contacts latéraux dans des cellules CTL et des cellules dont le niveau de p120ctn est réduit. Barres d'échelle: 10µm.

Pour résumer, en **empêchant le recyclage des protéines des JAs** à la membrane plasmique au front de migration, la perte de la p120ctn perturbe la formation de nouvelles jonctions latérales et participe à la diminution de la cohésion des astrocytes au fur et à mesure de la migration.

III.A.3. La perte de la p120ctn facilite la dispersion des cellules en migration collective

Les résultats précédents illustrent la façon dont l'altération du niveau de la p120ctn agit sur la dynamique de la N-cadhérine. Dans une cellule en bordure de blessure, elle entraîne une déstabilisation progressive des jonctions et une baisse de la cohésion entre les cellules à l'avant. J'ai alors cherché à comprendre quelles étaient les conséquences de ce phénomène sur le comportement migratoire global des cellules dépourvues de p120ctn.

Lorsque les cellules **migrent** et que les forces s'exerçant sur elles augmentent, la **diminution de la p120ctn facilite le détachement des astrocytes** du bord de la rayure. L'espace libre entre les cellules migrant en bordure de la blessure est en effet plus important dans les cellules transfectées avec les si p120#1 et si p120#2 que dans les cellules transfectées avec un si CTL (**Figure 58a**). En outre, dans une monocouche **d'astrocytes immobiles, la diminution de la p120ctn n'altère pas la cohésion des cellules**; elles sont capables de former des JAs entre elles similaires à celles observées entre des cellules CTL (**Figure 58c**, flèches blanches). Comme pour les astrocytes CTL, aucun espace libre entre les cellules n'est observée dans les monocouches d'astrocytes si p120. Ces résultats montrent que le rôle de la p120ctn dans **le maintien d'une migration collective** se fait vraisemblablement davantage par le contrôle de la dynamique des JAs que par celui du niveau global de N-cadhérine à la membrane plasmique.

Un autre modèle de migration, plus physiologique, consiste à déposer des agrégats d'astrocytes si CTL ou si p120 dans un milieu dépourvu de sérum et enrichi en facteurs de croissance. Les cellules migrent alors radialement, hors de l'agrégat. Comme vu précédemment dans le modèle de fermeture de blessure, les astrocytes exprimant un si p120 se détachent puis se dispersent plus rapidement et sur de plus longues distances que les cellules CTL (**Film 10** et **Figure 58d**).

Ce phénomène de détachement accru semble favoriser une migration individuelle, plus rapide et non dirigée des astrocytes exprimant un taux de p120ctn réduit. De manière intéressante, la cinétique de la réorientation du centrosome et de l'appareil de Golgi dans les astrocytes transfectés avec un si p120 montre une altération progressive (à partir de 4h de migration) de la polarité cellulaire (**Figure 59**). Ce résultat **met en évidence une corrélation entre l'altération de la polarité cellulaire et le détachement progressif des cellules**.

Pour résumer, la perte de la p120ctn accroît la dissémination désorganisée des astrocytes en favorisant leur détachement d'un amas cellulaire.

L'ensemble des résultats montre que la p120ctn joue un rôle prépondérant dans le contrôle de la dynamique la N-cadhérine au cours de la migration (**Article 4**, en préparation). Son altération entraîne une diminution de la cohésion des cellules à l'arrière et à l'avant où elle empêche le recrutement de la N-cadhérine et donc la formation de nouvelles jonctions. La diminution progressive du niveau de p120ctn entre l'avant et l'arrière des jonctions établies entre cellules en migration semble être à l'origine du recyclage polarisé des JAs. Cette redistribution des protéines des JAs au front de migration pourrait être impliquée dans de la formation de nouvelles jonctions lors de la phase ultime de la fermeture de blessure quand les deux bords rentrent en contact. Elle serait ainsi un élément essentiel pour la mise en place de l'inhibition de la motilité après contact.

J'ai donc cherché à comprendre ensuite quels étaient les mécanismes contrôlant le niveau du ratio p120ctn/Ncad le long des jonctions latérales. Je me suis intéressé aux modes de régulation de la p120ctn au cours de la migration collective des astrocytes.

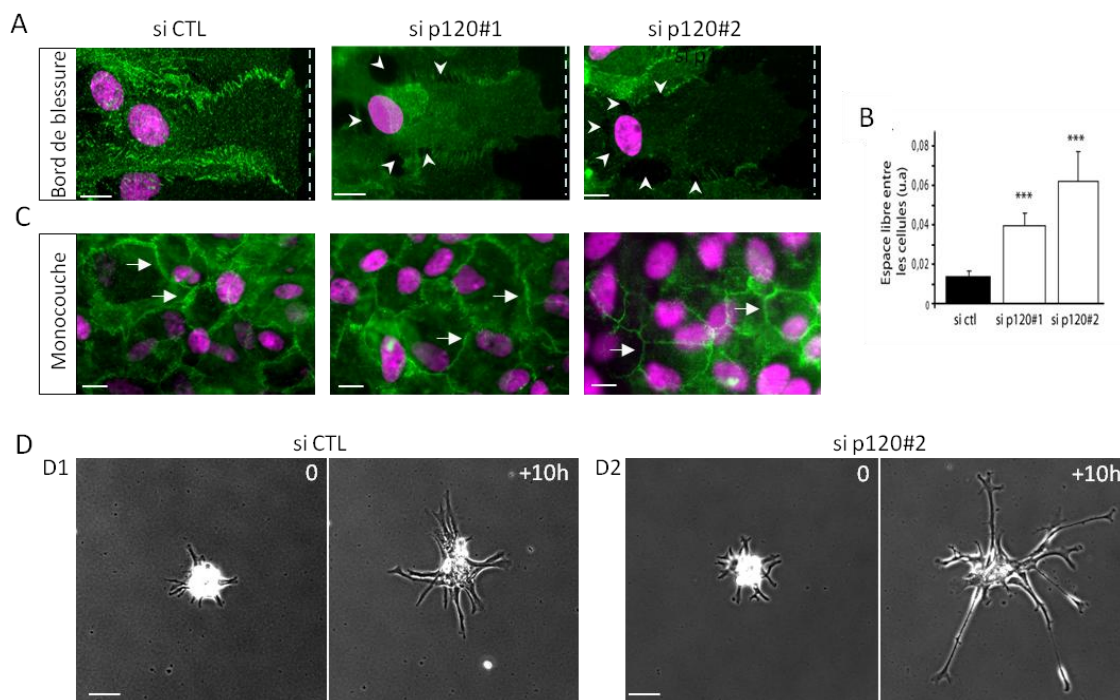


Figure 58: La perte de p120ctn favorise le détachement des cellules en migration collective. **A)** La perte de la p120ctn augmente la dé-adhérence à l'arrière des cellules. Immunodétection de la N-cadhérine (anti-N-cadhérine, vert) et du noyau (rose) dans des astrocytes en migration exprimant un si CTL (*panneau de gauche*), et deux si p120 dont l'efficacité est présentée dans la figure 42. Les têtes de flèches blanches indiquent les espaces libres entre les cellules, bien visibles dans les cellules dont le niveau de p120ctn est bas (*panneau du milieu* et de *droite*) mais absentes dans les cellules CTL. Barres d'échelle: 10µm. **B).** Histogramme quantifiant l'aire des espaces libres entre les cellules en bordure de blessure, à l'arrière (moitié de la cellule la plus éloignée de la blessure). Plus le niveau de la p120ctn est faible, plus l'espace entre les cellules à l'arrière augmente. Les données ont été collectées sur plus de 40 cellules dans 3 expériences différentes. **C)** Immunomarquage de la N-cadhérine (vert) dans les astrocytes précédant organisés en monocouche confluite. Noter l'absence d'espace libre entre les astrocytes si p120 et la présence de JAs semblables entre le si CTL et les si p120 (flèches blanches). **D)** Images extraites du film 8. Des agrégats d'astrocytes exprimant l'ARN interférant indiqué sont déposés sur un substrat recouvert de poly-ornithine, dans un milieu dépourvu de sérum mais riche en facteurs de croissance. L'observation de la migration radiale des astrocytes hors des agrégats montre une dispersion accrue des astrocytes si p120. Barres d'échelle: 50µm.

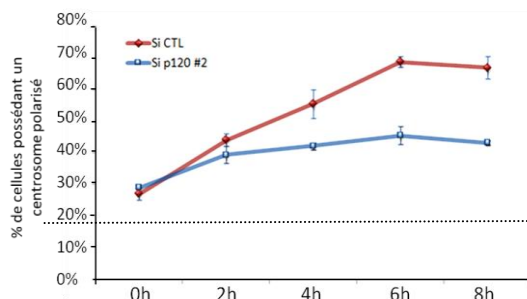


Figure 59 : La p120ctn assure le maintien de la polarité cellulaire au cours de la migration collective. Graphique présentant les cinétiques de réorientation du centrosome dans des astrocytes transfectés avec un si GFP (si CTL, rouge) et un si p120 (si p120#2, bleu). Noter l'absence de réorientation du centrosome chez les astrocytes si p120. Alors qu'au bout de 6h de migration près de 70% des cellules CTL possèdent un centrosome polarisé, devant le noyau et face à la blessure, seulement 40% des cellules dépourvues de p120ctn sont correctement polarisées. N>300, 3 expériences différentes.

III.B. La phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 régule ses fonctions dans la dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration cellulaire

La régulation de la boucle de recyclage de la N-cadhérine au cours de la migration nécessite une distribution non-uniforme de la p120ctn le long des jonctions latérales. Les mécanismes permettant la localisation prépondérante de la p120ctn à l'avant doivent faire intervenir des acteurs moléculaires différenciellement activés à l'avant et à l'arrière de la cellule, au cours de la migration. Compte tenu des nombreux sites de phosphorylation qu'arbore la p120ctn (Alema and Salvatore, 2007), nous avons émis l'hypothèse que la régulation spatiale et temporelle de la phosphorylation de la p120ctn puisse intervenir dans la régulation de la dynamique de la N-cadhérine.

III.B.1. Phosphorylation de la p120ctn au cours de la migration astrocytaire collective

La p120ctn a été initialement découverte comme étant un substrat de la protéine kinase Src essentiel à la transformation oncogénique de la cellule (Reynolds et al., 1989). De nombreux résidus tyrosine sont également phosphorylés par d'autres tyrosine-kinases telles que Fer, Fyn ou Yes (Alema and Salvatore, 2007). L'identification des résidus tyrosine phosphorylés par Src (Mariner et al., 2001) a permis d'élaborer des anticorps reconnaissant spécifiquement la p120ctn phosphorylée à chacun de ces sites. J'ai donc dans un premier étudié l'état de phosphorylation de deux tyrosines particulières, Y96 et Y228, au cours de la migration. Y96 est présente uniquement dans l'isoforme 1 de la p120ctn (l'isoforme longue). Celle-ci est prépondérante dans les astrocytes et les cellules motiles en général, au contraire de l'isoforme 3, majoritairement exprimée dans les cellules statiques. Le résidu Y228 serait lui la cible directe de l'EGFR, *in vivo*, et pourrait être impliqué dans la régulation du turnover des cadhérines (Mariner et al., 2004). L'étude de la cinétique de la phosphorylation d'Y96 et Y228 n'a cependant pas permis de mettre en évidence une variation claire de l'état de phosphorylation de ces résidus au cours des différentes phases de la migration astrocytaire (**Figure 60**). Il semble néanmoins que l'induction de la migration entraîne rapidement un pic de phosphorylation sur le résidu Y228. Celui-ci se maintient pendant la première heure de migration avant de s'estomper progressivement au fur et à mesure de la migration. De son côté, le résidu Y96 semble davantage phosphorylé au cours de la migration à partir d'une heure de migration.

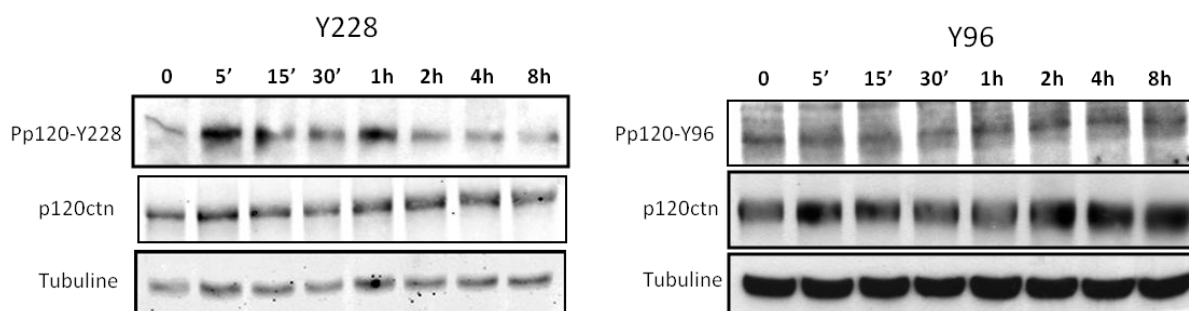


Figure 60 : Cinétiques de phosphorylation des résidus tyrosine Y96 et Y228 de la p120ctn au cours de la migration astrocytaire

Les astrocytes en migration sont lysés aux temps indiqués avec un tampon contenant des anti-phosphatases. La phosphorylation du résidu Y228 (*gauche*) et de Y96 (*droite*) dans ces lysats est analysée grâce à l'utilisation des anticorps anti Pp120-Y228 et Pp120-Y96. L'immunodétection de la p120ctn et de l' α -tubuline dans ces lysats est réalisée pour permettre la normalisation de la phosphorylation avec le niveau endogène de ces protéines.

La p120ctn est également phosphorylée sur de nombreux résidus sérine ou thréonine (voir **Figure 23**, partie III-D-3 de l'introduction). L'obtention récente de quatre nouveaux anticorps capables de reconnaître spécifiquement la phosphorylation des résidus T310, T910, S268 et S288 a fourni de nouveaux outils pour étudier les mécanismes de régulation de la p120ctn (Xia et al., 2004). L'utilisation de l'anticorps anti-Pp120-T310 sur des lysats d'astrocytes collectés à différents temps de migration, montre très clairement une **augmentation** de la **phosphorylation du résidu T310** au cours de la **migration** (**Figure 61**).

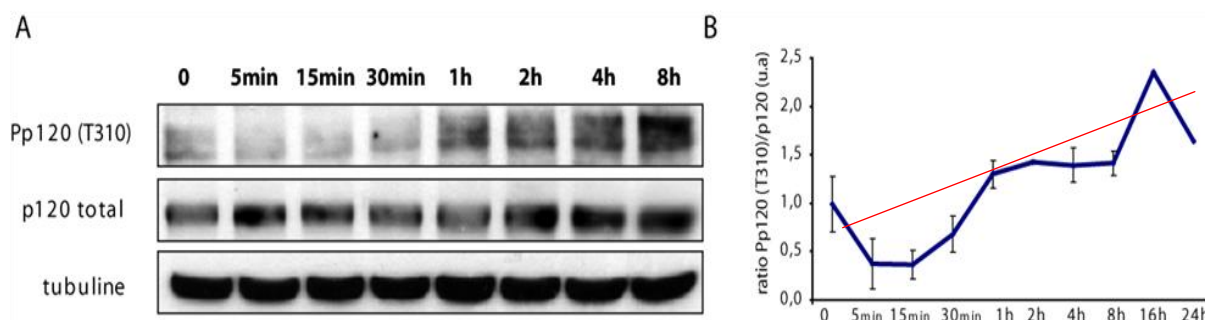


Figure 61: La p120ctn est phosphorylée sur son résidu T310 au cours de la migration

A) Cinétique d'immunodétection par Western Blot de la phosphorylation de T310, de la p120ctn totale et de la tubuline sur des lysats d'astrocytes en migration. L'augmentation de la phosphorylation commence à être visible à partir d'une heure de migration. **B)** Graphique représentant le ratio d'intensité de la phosphorylation de T310 sur celle du niveau global de p120ctn au cours de la migration. Les données représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne des valeurs collectées sur quatre expériences différentes (sauf pour les points 16h et 24h, obtenus une seule fois).

III.B.2. La phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 déstabilise son interaction avec la N-cadhérine

La phosphorylation des caténines est souvent vue comme un moyen de contrôler la stabilité de leur association avec les cadhérines (Alema and Salvatore, 2007). Par exemple, plusieurs études rapportent que la phosphorylation de la p120ctn sur ses résidus tyrosines renforce son interaction avec la E-cadhérine (Calautti et al., 1998; Kinch et al., 1995; Piedra et al., 2003). D'un autre côté, la phosphorylation de la β -caténine et de la δ -caténine par GSK-3 β réduit leur stabilité et stimule leur dégradation par le protéasome (Oh et al., 2009; Xu et al., 2009).

Je me suis donc intéressé à l'impact de la phosphorylation du résidu T310 de la p120ctn sur l'interaction de la p120ctn avec la N-cadhérine. Pour ce faire, j'ai tout d'abord construit un mutant non phosphorylable de la p120ctn, en substituant la thréonine T310 par une alanine, qui est résistante au si p120#2 via une mutation silencieuse dans son site ciblé par le si ARN. Ce mutant p120^{T310A} et le variant de la p120ctn sauvage, p120^{wt}, résistants lui aussi au si p120#2, ont été couplés au polypeptide HA. La détection de la phosphorylation de T310 dans des lysats de cellules co-transfectées par le si p120#2 et les deux variants de p120ctn résistants à cet siARN montre que contrairement à la p120^{wt}, le mutant non phosphorylable n'est pas reconnu par un anticorps spécifique du résidu T310 phosphorylé (**Figure 62a**) En effet le niveau obtenu (3^{ème} colonne) est comparable au niveau basal de cellules non transfectées (1^{ère} colonne) et dont le niveau de p120ctn est réduit.

La co-expression de la Ncad-GFP avec les variants p120^{wt}-HA et p120^{T310A}-HA dans des cellules COS-7 m'a permis de montrer par des tests de co-immunoprécipitation, que

l'interaction entre la N-cadhérine et la p120^{T310A} est plus forte que celle entre la N-cadhérine et la p120ctn sauvage (**Figure 61b et c**). Autrement dit, la phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 réduirait son affinité avec la N-cadhérine et pourrait ainsi favoriser la déstabilisation des jonctions adhérentes. Des études sont actuellement en cours pour approfondir et valider définitivement cette hypothèse.

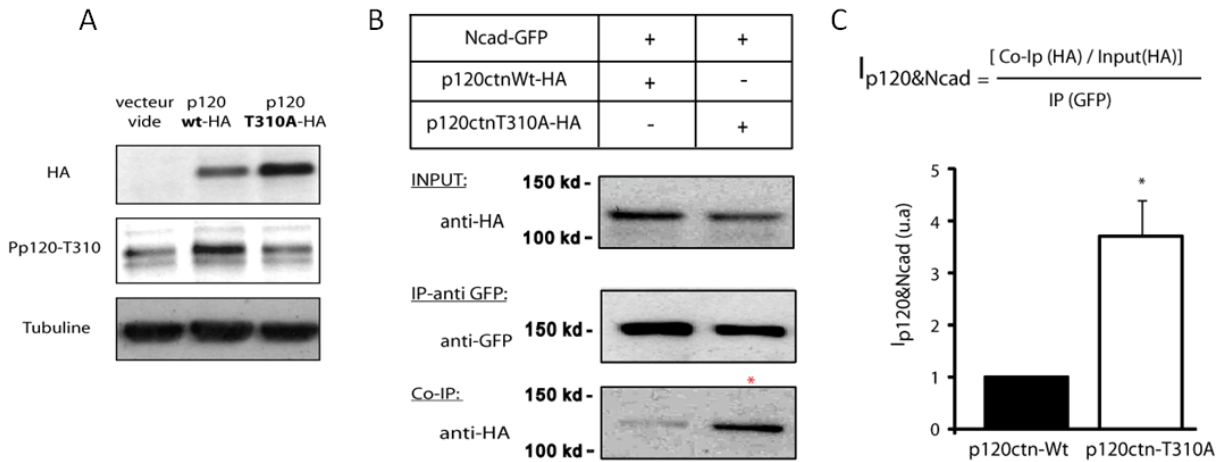


Figure 62: La phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 altère son interaction avec la N-cadhérine

A) Immunoblots illustrant le niveau de T310 phosphorylé dans des cellules co-transfectées par le si p120#2 et par un vecteur vide, le variant sauvage p120^{wt}-HA et le mutant non phosphorylable p120^{T310A}-HA, résistants au si ARN. Noter le niveau de phosphorylation de T310 des cellules transfectées avec p120^{T310A} beaucoup plus bas que celui obtenu dans les cellules transfectées avec la p120ctn sauvage. **B)** La Ncad-GFP est co-exprimée avec p120ctn^{wt}-HA (*première colonne*) ou avec p120ctn^{T310A} (*deuxième colonne*), dans des cellules COS-7. Le niveau d'expression de chacun des deux variants de la p120ctn est mesuré par immunodétection du peptide HA (anti-HA, INPUT). La Ncad-GFP est immunoprécipitée sur billes de sépharose grâce à un traitement des lysats cellulaires par un anticorps anti-GFP (IP anti-GFP). Le niveau des deux types de p120ctn interagissant avec la N-cadhérine immunoprécipitée est ensuite détecté avec un anticorps anti-HA (Co-IP). Noter la présence beaucoup plus importante de p120^{T310A} (astérisque rouge) que de p120^{wt} associées à la N-cadhérine. **C)** Histogramme quantifiant le niveau d'interaction entre la N-cadhérine et les deux variants de la p120ctn. L'index d'interaction correspond au ratio entre le niveau de p120ctn (normalisé par son niveau basal (input)) co-immunoprécipitée avec la Ncad et la quantité de Ncad immunoprécipitée dans chacune des conditions. Les données représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne des résultats obtenus dans 3 expériences différentes. L'interaction est 3,7 fois plus importante entre la version non phosphorylable de la p120ctn^{T310A} et la N-cadhérine qu'entre la p120ctn^{wt} et la N-cadhérine. *: p-value=0.017<0.05.

III.B.3. La phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 est dépendante de la GSK-3β

Nous avons émis l'hypothèse que la phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 serait plus forte à l'arrière qu'à l'avant des cellules en migration. Elle faciliterait ainsi la dissociation du complexe p120/N-cadhérine et l'internalisation de la N-cadhérine en résultant, à l'arrière des cellules en migration.

Afin de déterminer les acteurs moléculaires à l'origine de la phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310, je me suis tourné vers les voies de signalisation induites au cours de la migration astrocytaire et régulées différemment à l'avant et à l'arrière. La voie Cdc42,

identifiée précédemment au laboratoire, est activée spécifiquement à l'avant et induit une activation polarisée de Cdc42 et des aPKC, associée à une inhibition localisée de GSK-3 β .

Les kinases GSK-3 β et PKC ont été impliquées dans la phosphorylation de la p120ctn dans des fibroblastes et des cellules épithéliales en culture (Xia et al., 2003). Plus précisément, cette étude a montré que GSK-3 β phosphoryle la p120ctn *in vitro*, lorsque les deux protéines sont immunoprécipitées et mis en présence de [γ -P³²]ATP dans un tampon favorable aux serine/thréonine kinase. Néanmoins, dans cette étude, l'utilisation du chlorure de lithium (LiCl), inhibiteur de GSK-3 β (Stambolic et al., 1996), n'empêche pas la phosphorylation de la p120ctn dans les cellules utilisées.

Afin de clarifier l'implication de la GSK-3 β dans la phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310, j'ai analysé l'impact de l'altération de l'activité de GSK-3 β sur l'augmentation de la phosphorylation sur T310 au cours de la migration astrocytaire. L'addition de LiCl dans le milieu des astrocytes en migration abolit la phosphorylation de T310, visible dans les conditions CTL au bout de 8h de migration (**Figure 63**). De même, l'ajout d'un inhibiteur pharmaceutique de la GSK-3 β plus spécifique, SB415286, empêche cette phosphorylation de manière dose-dépendante (résultat non montré). Enfin, l'utilisation d'un ARN interférant réduisant le niveau de la GSK-3 β de 85% (si GSK-3 β #2) altère considérablement le niveau de phosphorylation du résidu T310 après 8h de migration, en comparaison de celui visible dans les cellules transfectées avec un ARN interférant CTL (si GFP) (**Figure 63**).

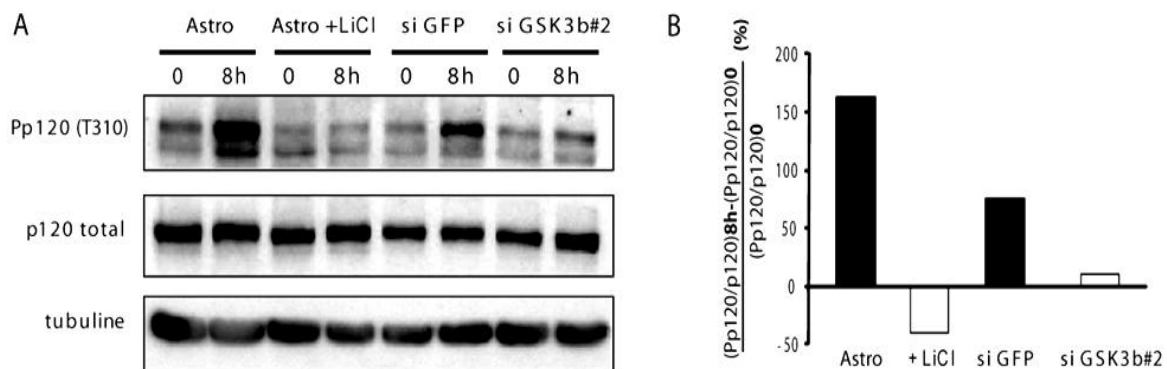


Figure 63: GSK3- β régule la phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 au cours de la migration cellulaire

A) Immunodétection par Western Blot de la phosphorylation de T310 au moment de l'induction de la migration (0) et 8 heures plus tard (8h), dans les conditions standards (Astro), après traitement avec du LiCl (20mM) ajouté 1h avant la migration et dans les astrocytes transfectés 3 jours auparavant avec un si GFP ou le si GSK-3 β #2. Les niveaux d'expression de la p120ctn ainsi que de la tubuline sont également représentés. **B)** Histogramme quantifiant la diminution de la phosphorylation de T310 au cours de la migration lorsque GSK-3 β est inhibée. En ordonnées, le pourcentage de p120ctn phosphorylée sur T310 après 8h de migration. Au lieu d'une augmentation du niveau de p120ctn phosphorylée après 8h de migration (plus de 150% pour les astrocytes en conditions normales, et près de 75% pour les astrocytes si GFP, l'altération de la GSK-3 β empêche quasi-complètement toute phosphorylation de T310.

La phosphorylation de la p120ctn sur T310 au cours de la migration est dépendante de l'activité de GSK-3 β . En outre, **GSK-3 β** est une kinase constitutivement active qui **est spécifiquement inhibée** à l'avant des cellules en migration, suite à l'activation du complexe Cdc42-par6-aPKC (Etienne-Manneville and Hall, 2003b). Aussi peut-on supposer que la phosphorylation de la p120ctn n'a lieu qu'à l'arrière ou sur les côtés des cellules en migration.

III.B.4. La phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 est nécessaire au recrutement de la N-cadhérine au front de migration

Compte tenu du rôle joué par la p120ctn dans le contrôle de la boucle de recyclage de la N-cadhérine au cours de la migration, je me suis intéressé aux conséquences de sa phosphorylation sur le résidu T310 sur la dynamique de la N-cadhérine. De manière surprenante, l'ajout d'inhibiteurs de la GSK-3 β , qui inhibe la phosphorylation de la p120ctn sur T310, diminue significativement le recrutement de la N-cadhérine (ainsi que celui de la β -caténine) au front de migration (**Figure 64a**). En effet, si 61% des cellules CTL (DMSO) observées possèdent un front de migration enrichi en N-cadhérine 8h après le début de la migration, cette dernière est recrutée à l'avant de la protrusion dans seulement 35% et 25% des cellules traitées respectivement avec 50 μ m de SB415286 et 20mM de LiCl (**Figure 64b**). Cette expérience révèle que la **présence de la N-cadhérine au front de migration est dépendante de l'activité de GSK-3 β** . Elle suggère aussi que la phosphorylation de la p120ctn pourrait être impliquée dans ce phénomène puisqu'elle est dépendante de GSK-3 β .

Afin de valider cette hypothèse, j'ai cloné les variants p120^{wt} et p120^{T310A} dans un plasmide pEGFP et les ai exprimés dans des astrocytes si p120. L'expression du mutant phosphorylable dans les astrocytes en migration montre une localisation similaire à la p120ctn sauvage. La diminution du taux de p120ctn accompagnée de l'expression du vecteur vide pEGFP (si p120 +GFP) réduit le pourcentage de cellules ayant un front de migration enrichi en N-cadhérine à 20% des cellules observées, contre plus de 60% dans les astrocytes si CTL. L'expression ectopique de p120^{wt} dans les cellules si p120 (si p120+p120^{wt}) parvient à restaurer le recrutement à l'avant de la N-cadhérine puisque le pourcentage de cellules positives pour la Ncad au front de migration n'est pas significativement différent de celui des cellules si CTL (58% vs 64%). A contrario, l'expression de p120^{T310A} dans les cellules si p120 ne permet pas de restaurer l'enrichissement du front de migration en N-cadhérine au cours de la migration puisque seulement 30% des cellules sont positives (**Figure 64c et d**). Ce résultat démontre la **nécessité de la phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 dans le recrutement de la N-cadhérine à l'avant** de la cellule.

Il soulève également une question primordiale : comment la phosphorylation de la p120ctn régule-t-elle la boucle de recyclage de la N-cadhérine? L'ensemble des connaissances de la migration astrocytaire nous amène à proposer le modèle suivant, schématisé dans la **Figure 65** :

- 1) Au cours de la migration, la GSK-3 β est inhibée à l'avant de la cellule et reste activée à l'arrière et sur les côtés.
- 2) Dans les zones où GSK-3 β est activée, la p120ctn est préférentiellement phosphorylée sur son résidu T310, ce qui aboutit à une diminution de son interaction avec la N-cadhérine.
- 3) S'en suit une endocytose accrue de N-cadhérine à l'arrière des jonctions latérales puisque l'interaction de la p120ctn avec la N-cadhérine permet de réduire son endocytose en masquant ses sites d'internalisation.
- 4) Parmi ce pool cytoplasmique de N-cadhérine une partie est recrutée au front de migration (4a) où les molécules diffusent rapidement vers les jonctions latérales et facilitent la formation de nouvelles jonctions au fur et à mesure que la cellule avance (4b).
- 5) A l'avant de la cellule, la GSK-3 β est inhibée par l'activation du complexe Cdc42-par6-aPKC, ce qui, en théorie, limite la phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 et renforce son interaction avec la N-cadhérine.
- 6) Ce mécanisme aboutit à une interaction plus soutenue de la p120ctn avec la N-cadhérine à l'avant de la cellule, et donc à l'établissement d'un **gradient décroissant d'adhérence de**

l'avant vers l'arrière de la cellule. Il assure à la fois l'avancée de la cellule et sa cohésion avec le reste du groupe, essentiel au maintien de sa direction lors de la migration collective.

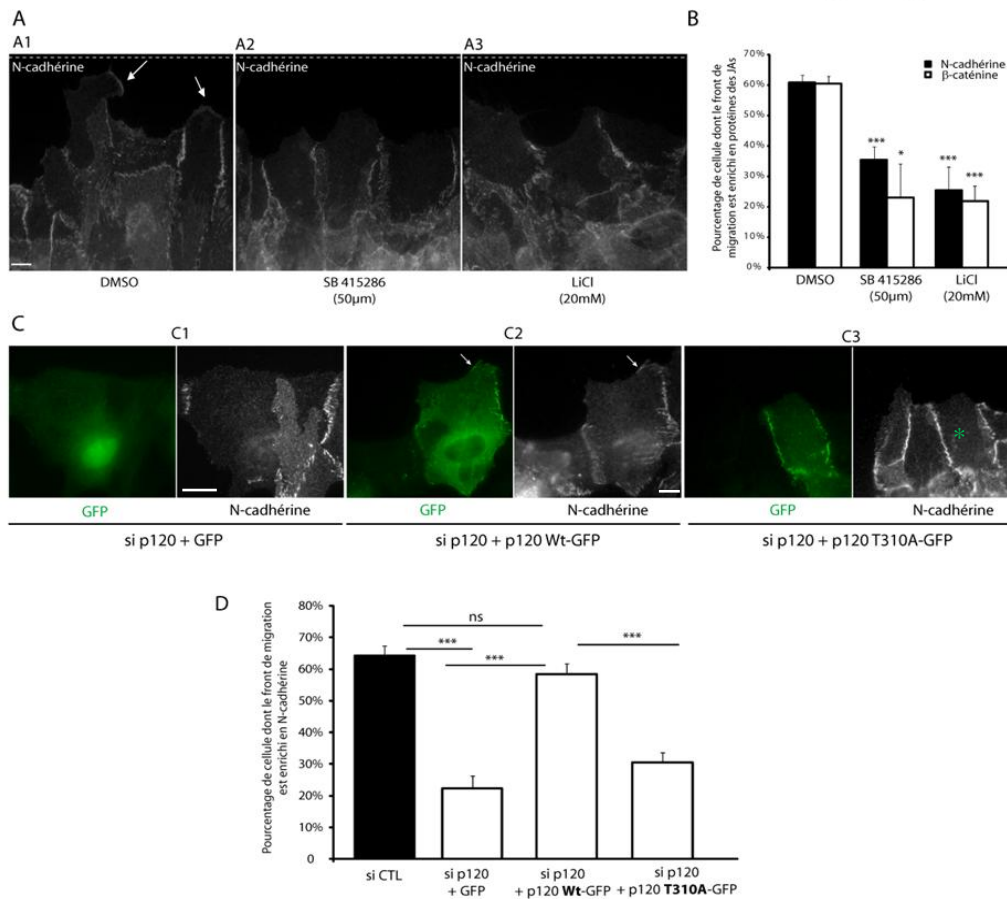


Figure 64: La présence de N-cadhérine au front de migration dépend de GSK-3 β et de la phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310.

A) Immunodétection de la N-cadhérine dans les astrocytes en migration (+8hr) en présence de DMSO (A1), de SB415286 (50 μ m, A2) et de LiCl (20mM, A3). Les drogues ont été ajoutées 1h avant l'initiation de la migration. Noter la présence de la N-cadhérine à l'avant des protrusions des cellules CTL (flèches blanches, A1) et l'absence de marquage au front de migration lorsque les inhibiteurs de GSK-3 β sont ajoutés dans le milieu de culture (A2 et A3). Barre d'échelle : 10 μ m. **B)** Histogramme représentant le pourcentage de cellules dans lesquelles on observe un recrutement de la N-cadhérine (noir) et de la β -caténine (blanc) à l'avant de leur protrusion. Ce pourcentage chute significativement en présence des inhibiteurs de la GSK-3 β . Les données représentées correspondent à la moyenne et à l'erreur standard de la moyenne obtenues pour au moins 100 cellules par condition dans 3 expériences différentes. **C)** Astrocytes transfectés par le si p120#2 et exprimant la GFP (C1), la p120^{wt}-GFP (C2) et la p120^{T310A}-GFP (C3). Les deux dernières constructions sont résistantes au si p120#2. L'immunodétection de la N-cadhérine 8h après le début de la migration révèle sa présence au front de migration (flèche blanche) dans les cellules ré-exprimant la p120ctn sauvage (C2), mais pas dans les cellules exprimant une version non phosphorylable de la p120ctn (astérisque verte, C3) ou simplement la GFP (C1). Noter la présence de la p120^{wt}-GFP colocalisée avec la N-cadhérine à l'avant de la protrusion (C2, flèche blanche). **D)** Histogramme représentant le pourcentage de cellules dans lesquelles on observe un recrutement de la N-cadhérine au front de migration. L'expression de la p120^{wt} dans des cellules dépourvues de p120ctn restaure un pourcentage de cellules positives (58%) proche de celui visible dans les cellules CTL (64%). Les valeurs ne sont pas significativement différentes (ns). Par contre, l'expression de la GFP (22%) ou de la p120^{T310A} (30%) ne permettent pas de retrouver les valeurs des cellules CTL. La présence de la N-cadhérine au front de migration nécessite la phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310. Tests statistiques : t-test, ***: p-value<0.001 et *: p-value<0.05. Barres d'échelle: 10 μ m.

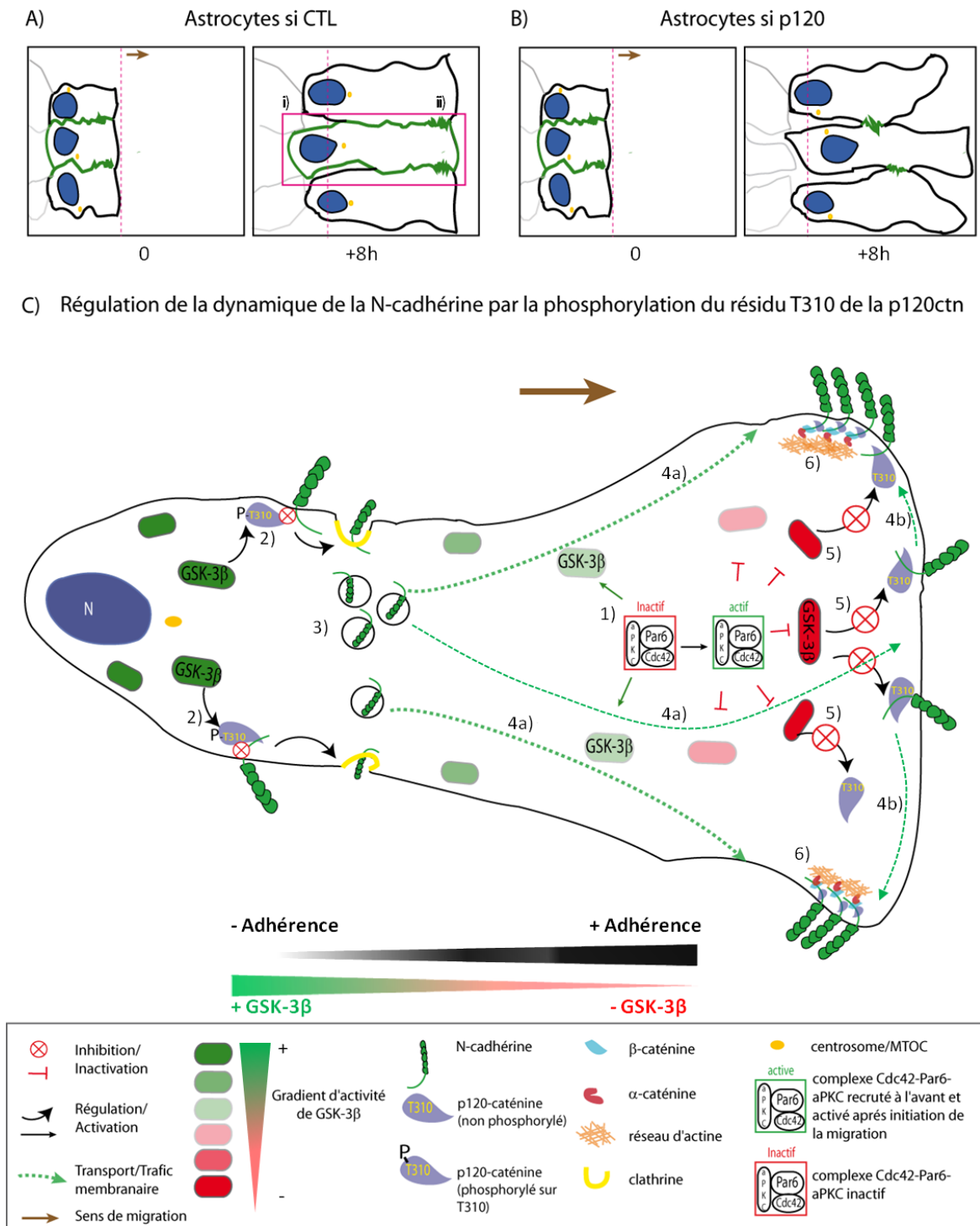


Figure 65: Modèle explicatif du rôle de la p120ctn et de sa phosphorylation dans la régulation de la dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration collective en feuillet

A) Astrocytes CTL au départ (0) et après 8h de migration collective en feuillet. i) la diminution d'adhérence à l'arrière de la cellule aux jonctions vertes lui permet d'avancer, et ii) le maintien de la cohésion au groupe est assuré par la formation de nouvelles jonctions latérales, à l'avant. **B)** Dans les astrocytes exprimant moins de p120ctn (si p120), les étapes i) et ii) sont perturbées. Il en résulte un décrochage des cellules à l'arrière et une perte d'adhérence conjointe à l'avant. En conséquence, la polarité cellulaire est altérée comme le montre la position des centrosomes après 8h de migration. La migration de ces cellules est caractérisée par une diminution de la persistance de migration et une augmentation de leur vitesse. **C)** Zoom de l'encadré rose illustrant les mécanismes moléculaires régulant la dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration. Les différentes étapes aboutissant au gradient décroissant de forces d'adhérences de l'avant vers l'arrière de la cellule en migration sont détaillées dans le texte.

Afin de valider définitivement ce modèle, il nous reste encore à montrer que :

- la phosphorylation de la p120ctn est bien localisée spécifiquement à l'arrière
- le mutant non phosphorylable p120^{T310A} bloque la dynamique des jonctions des cellules en migration en les stabilisant, et en conséquence inhibe la migration
- l'état de phosphorylation de la p120ctn dans les gliomes qui en expriment a un impact sur leur invasivité.

CONCLUSION

Au cours de ma thèse j'ai cherché à découvrir de nouvelles voies de signalisation altérées dans les gliomes et dont la perturbation pourrait être impliquée dans les capacités invasives de ces tumeurs.

J'ai tout d'abord mis en évidence :

- 1) Une perturbation de la voie contrôlant la polarité cellulaire au cours de la migration astrocytaire, dans les gliomes de hauts-grades. L'expression de ses principaux acteurs (Cdc42, aPKC, Par6, β -Pix, Dlg) est en effet diminuée dans ces tumeurs infiltrantes.
- 2) Une altération des jonctions adhérentes dans les gliomes, et un **rôle potentiel de suppresseur d'invasivité de la p120ctn**.

Ensuite, en cherchant à comprendre en quoi l'altération de la p120ctn et des jonctions d'adhérence pouvait participer à la dissémination des astrocytes tumoraux, j'ai étudié le comportement de la N-cadhérine au cours de la migration astrocytaire. Cette étude s'est faite dans un modèle *in vitro* de migration collective.

J'ai alors mis à jour une **dynamique inédite de la N-cadhérine** impliquant un « **treadmilling** » des **jonctions adhérentes**, compensé par un **recyclage polarisé** de la cadhérine.

- 1) Au sein d'une cellule qui migre en feuillet, les cadhérines sont **endocytées** massivement à **l'arrière**.
- 2) Parmi ce pool de cadhérines endocytées, certaines sont **recrutées au front de migration**,
- 3) Où elles diffusent latéralement pour **former de nouvelles jonctions**.
- 4) Là, les molécules de cadhérine engagées dans les JAs sont transportées lentement vers l'arrière de la cellule suivant un **flux rétrograde** de câbles d'actine.

Je me suis ensuite intéressé aux mécanismes moléculaires régulant la dynamique de la N-cadhérine, en essayant d'intégrer cette régulation aux voies de signalisations déjà connues pour contrôler la migration astrocytaire. Au cours de ces recherches, j'ai découvert un **rôle essentiel de la p120ctn** et de sa régulation dans le **maintien d'une migration collective dirigée** :

- 1) la p120ctn régule la dynamique de la N-cadhérine.
- 2) la p120ctn est essentielle pour maintenir la cohésion du groupe de cellules et empêcher la dispersion cellulaire.
- 3) Les astrocytes au taux de p120ctn diminué en migration partagent de nombreuses caractéristiques avec les cellules de glioblastomes dans ce même test de migration *in vitro* : augmentation de la vitesse, baisse de la directionnalité, altération de la polarité, accroissement de la dispersion hors du groupe de cellules.
- 4) Au fur et à mesure de la migration, la phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 augmente et entraîne une réduction de l'affinité de la p120ctn pour la N-cadhérine. Cette phosphorylation est nécessaire à la présence de la N-cadhérine au front de migration.
- 5) La phosphorylation de la p120ctn est dépendante de l'activité de GSK-3 β . Au cours de la migration astrocytaire cette activité est inhibée à l'avant et maintenue à l'arrière et sur les côtés, où elle restreint la phosphorylation de la p120ctn sur T310 qui favorise la dissociation de p120ctn des JAs, accroît l'endocytose de la N-cadhérine et réduit l'adhérence intercellulaire.

DISCUSSION

Avant propos :

Au fur et à mesure des résultats obtenus au cours de ma thèse, j'ai été amené à m'intéresser à des pans très variés de la biologie cellulaire. Cela a rendu mon travail de thèse au jour le jour passionnant puisque je me suis intéressé à des thèmes aussi différents que l'analyse transcriptomique à grande échelle de tumeurs humaines, l'invasivité tumorale, le trafic membranaire, la migration et la polarité cellulaire et l'adhérence intercellulaire. La régulation de la dynamique des jonctions adhérentes et sa fonction dans la migration cellulaire collective sont effectivement à la croisée de tous ces grands axes de la biologie cellulaire.

La variété des sujets traités m'amène ici à faire des choix et à limiter la discussion à certains d'entre eux uniquement. J'ai conscience que les résultats dont je ne parlerai pas plus loin peuvent faire l'objet de discussion mais pour des soucis de clarté et par choix personnel, je m'en tiendrai aux points détaillés ci-dessous.

I. La dynamique des jonctions adhérentes dans la migration collective

I.A. Les mécanismes moléculaires contrôlant la dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration cellulaire

Le flux rétrograde de la N-cadhérine et sa liaison avec le flux rétrograde d'actine

J'ai mis en évidence un flux rétrograde inédit de N-cadhérine aux contacts latéraux entre astrocytes en migration. L'observation récente d'un flux similaire de cadhérines desmosomales (desmocolline et desmogléine) dans des cellules épithéliales en migration (Roberts et al., 2011), renforce mes résultats et montre l'importance de la dynamique des jonctions intercellulaires dans la migration collective.

Le flux rétrograde de N-cadhérine est dépendant de la présence d'un flux rétrograde de fibres d'actine transverses, lui-même nécessitant la contractilité de la myosine. La caractérisation dans des cellules épithéliales chevauchantes d'un flux baso-apical de spots de cadhérines engagées se déplaçant sur des filaments d'actomyosine ancrés aux JAs par l' α -caténine (Kametani and Takeichi, 2007) renforce l'idée d'une liaison étroite entre la dynamique du cytosquelette d'actine et celle des cadhérines, afin de coordonner à la fois l'adhérence intercellulaire et la migration cellulaire. Cette étude met également en avant l'importance de l' α -caténine dans l'interaction entre ces deux protéines.

En vue de comprendre le mécanisme moléculaire permettant le flux rétrograde de la N-cadhérine dans notre système, j'ai testé l'implication de l' α -caténine. Celle-ci est présente essentiellement sous ses deux formes principales dans les astrocytes, l' α N- et l' α E-caténine, majoritaire (données de J.Elric, en thèse au laboratoire). Si la vitesse du flux de N-cadhérine est significativement diminuée dans les cellules si α E-caténine (0,16 μ m/min contre 0,36 μ m/min), le flux n'en reste pas moins **toujours visible**. La présence d' α N-caténine, certes en petite quantité, peut expliquer le maintien du flux dans les cellules si α E-caténine. Malheureusement, les cellules co-transfectées avec un si α E-caténine et un si α N-caténine ne forment pas de monocouche suffisamment confluente et ne peuvent donc pas être utilisées dans un test de fermeture de blessure pour tester cette hypothèse. **Indépendamment de l' α -caténine** la liaison des fibres d'actine transverses aux JAs pourrait se faire, via un adaptateur pouvant se lier directement aux cadhérines ou aux autres caténines. En effet, plusieurs protéines se liant à l'actine et présentes aux JAs, comme la cortactine ou la myosine VI, sont immunoprécipitées

avec les cadhérines et pourraient assurer l'association entre la N-cadhérine et les fibres d'actine (El Sayegh et al., 2004; Maddugoda et al., 2007; Mangold et al., 2011). La cortactine pourrait se lier aux JAs via la p120ctn puisque ces deux protéines interagissent directement ensemble (Boguslavsky et al., 2007); renforçant un peu plus le rôle de la p120ctn dans la dynamique de la N-cadhérine des cellules en migration.

L'implication de la p120ctn (et de la β -caténine) dans le flux rétrograde de N-cadhérine pourra être testée tout d'abord par l'observation de leur dynamique pendant la migration cellulaire. Une colocalisation avec la N-cadhérine lors du flux rétrograde soulignerait leur importance dans le maintien de ce flux. Dans le cas contraire, on s'orienterait vers un autre mécanisme permettant à la N-cadhérine d'être liée à l'actine indépendamment des caténines. Les premières observations révèlent que la p120ctn serait transportée vers l'arrière de la cellule avec la N-cadhérine, et pourrait donc servir de point d'ancrage à des adaptateurs moléculaires liant l'actine. Il faut noter que tous ces différents mécanismes d'ancrage de la cadhérine au cytosquelette d'actine sous-jacent ne sont pas mutuellement exclusifs et peuvent cohabiter en parallèle. Si un mécanisme dépendant de l' α -caténine a déjà été montré, il faudra approfondir une potentielle implication de la p120ctn et d'adaptateurs tels que la cortactine et la myosine VI.

Le flux rétrograde de N-cadhérine et le cytosquelette de microtubules

La présence d'un flux rétrograde de N-cadhérine en absence d' α E-caténine peut signifier également qu'un autre cytosquelette est impliqué dans la génération des forces nécessaires au flux. Les microtubules sont ancrés aux JAs via essentiellement deux mécanismes impliquant la p120ctn et la β -caténine, mais pas l' α -caténine (**Figure 27** de l'introduction). D'autre part, un flux rétrograde de microtubules dépendant du flux rétrograde d'actine existe dans certaines cellules en migration (Waterman-Storer and Salmon, 1997). Aussi peut-on imaginer que, dans les astrocytes, la contractilité des fibres d'actomyosine génère à la fois un flux rétrograde d'actine, qui serait la principale force directrice du flux rétrograde de N-cadhérine, et un flux rétrograde de microtubules qui, ancrés aux JAs, favoriserait également le flux rétrograde de N-cadhérine. En absence d' α -caténine, le flux rétrograde d'actine est maintenu mais ne peut entraîner les JAs. Néanmoins, il pourrait engendrer un flux rétrograde plus lent de microtubules toujours ancrés aux JAs (même en absence d' α -caténine), ce qui permettrait d'expliquer l'observation d'un flux de N-cadhérine même en absence d' α -caténine.

Une autre possibilité serait d'imaginer la présence de microtubules parallèles à la membrane plasmique sur lesquels courraient des moteurs moléculaires associées parallèlement aux JAs. On sait par exemple que la dynéine se lie à la fois aux microtubules et aux JAs via son interaction avec la β -caténine (Ligon et al., 2001). Afin de tester cette hypothèse, il sera intéressant d'observer la dynamique des microtubules aux JAs au cours de la migration. Enfin, l'analyse précise de la dynamique de la N-cadhérine en présence de drogues déstabilisant le cytosquelette de microtubules, comme le nocodazole, permettrait de confirmer ou d'infirmer la thèse du cytosquelette de microtubules convoyeur de forces aux JAs.

Caractérisation du trafic vésiculaire des cadhérines

Pendant la migration astrocytaire, la N-cadhérine est endocytée massivement à l'arrière de la cellule avant d'être recyclée à la membrane plasmique au front de migration, et de s'engager dans la formation de nouvelles jonctions adhérentes. Les données obtenues suggèrent de manière indirecte que l'endocytose de la N-cadhérine est dépendante de la dynamine et de la clathrine puisque, d'une part, la présence de cadhérine au front de migration est diminuée par l'inhibition de la dynamine et d'autre part, les cadhérines internalisées co-localisent avec la

clathrine. Ce mode d'endocytose est celui le plus souvent observé dans les différents modèles étudiant l'endocytose des cadhérines. Néanmoins, les cadhérines peuvent également être endocytées via des mécanismes indépendants de la clathrine mais toujours dépendants de la dynamine, lorsqu'elles ne sont pas engagées *en trans* (Kowalczyk and Nanes, 2012). Il serait donc intéressant de chercher des preuves directes de l'implication de la **clathrine** et de la **dynamine** dans l'endocytose des cadhérines à l'arrière des cellules en migration.

Tout comme l'inhibition de la dynamine, l'inhibition de **Rab5a** diminue significativement le recrutement de la N-cadhérine au front de migration, suggérant son implication dans la voie d'endocytose de la N-cadhérine dans les cellules en migration. Il serait important d'essayer de localiser les molécules de N-cadhérine internalisées dans des vésicules riches en Rab5, pour valider un rôle direct de Rab5 dans l'endocytose de la N-cadhérine dans ce modèle. Ces résultats sont néanmoins cohérents avec les données montrant l'influence de Rab5 et de la dynamine dans l'endocytose de la N-cadhérine dans les cellules neuronales en migration (Kawauchi et al., 2010). Dans ces cellules, la perte de Rab5 *in vivo* altère la migration des neurones néoformés, les empêchant d'atteindre la plaque corticale. On pourrait alors se demander si les astrocytes exprimant un variant de Rab5 dominant négatif ou un siRab5, migrent anormalement. L'altération de Rab5 diminuant le recyclage de la N-cadhérine à l'avant des cellules en migration, elle devrait réduire la formation de nouvelles jonctions adhérentes à l'avant et perturber la migration collective des astrocytes. En effet, on a vu dans les cellules si p120 que la réduction de l'adhérence à l'avant de la cellule pouvait altérer la polarité cellulaire et le maintien d'une migration collective dirigée.

De manière surprenante, **Arf6**, dont le rôle dans l'endocytose des cadhérines a été mis en évidence dans les cellules épithéliales (Palacios et al., 2001), ne semble pas impliquée dans le recyclage de la N-cadhérine au front de migration (résultat non montré). Son rôle pourrait ainsi être limité à l'endocytose des cadhérines présentes dans les cellules épithéliales. De plus, contrairement à d'autres études sur les myoblastes par exemple (Mary et al., 2002), la N-cadhérine internalisée ne colocalise pas avec les endosomes riches en EEA1 dans les astrocytes (résultat non montré).

Une fois internalisées, les cadhérines sont recyclées vers le front de migration. A la recherche des compartiments membranaires impliqués dans la redirection des molécules de la N-cadhérine vers l'avant, j'ai commencé à m'intéresser aux marqueurs spécifiques des différents endosomes. Des études ont montré l'importance de **Rab11** et des protéines Sec5, Sec6 et Sec 15 de l'exocyste dans le turnover des cadhérines épithéliales (**Figure 24** de l'introduction). Rab11 a été impliquée également dans le renouvellement de la N-cadhérine aux JAs des neurones en migration (Kawauchi et al., 2010). Si les premiers immunomarquages n'ont pas permis de montrer une colocalisation avec Sec6 de l'exocyste, j'ai observé des vésicules positives à la fois pour Rab11 et N-cadhérine (résultat non montré). L'implication de Rab11 dans la boucle de recyclage de la N-cadhérine nécessite néanmoins de plus amples investigations.

Enfin, la polarisation du réseau de **microtubules**, contrôlée par l'interaction d'APC et de Dlg1 au front de migration (Etienne-Manneville and Hall, 2003b; Etienne-Manneville et al., 2005b; Manneville et al., 2010), est nécessaire pour assurer le recrutement de la N-cadhérine à l'avant de la cellule. Mais de nombreuses zones d'ombres demeurent, concernant notamment la **nature du ou des moteurs moléculaires** assurant le transport de la N-cadhérine vers l'avant. Néanmoins, sachant que 1) le recrutement de la N-cadhérine est dépendant de la p120ctn, 2) la N-cadhérine colocalise avec la p120ctn dans des vésicules membranaires (résultat non montré) et 3) la p120ctn favorise la liaison de la **kinésine** avec les vésicules riches en N-cadhérine (Mary et al., 2002), on cherchera prochainement à valider l'importance de la kinésine dans la dynamique de la N-cadhérine dans les astrocytes en migration.

Le rôle des RhoGTPases dans la boucle de recyclage des JAs

Afin de coordonner la migration et l'adhérence intercellulaire, la **localisation** et l'**activation spatio-temporelle** des RhoGTPases doivent être finement régulées (Fukata and Kaibuchi, 2001). Par son contrôle à la fois de l'activité des RhoGTPases (inhibition de Rho et activation de Cdc42 et Rac1) et de la stabilité des JAs, la p120ctn est une protéine clé pour permettre cette coordination (Wildenberg et al., 2006). Néanmoins, peu de données existent sur la localisation et l'activation spatio-temporelle de la p120ctn elle-même. Au cours de la migration astrocytaire collective, le ratio p120ctn/N-cadhérine est significativement plus élevé **à l'avant** des jonctions latérales indiquant que leur interaction n'est plus stœchiométrique et que les molécules de p120ctn sont prépondérantes. Ces molécules disponibles en quantité pourrait accentuer l'inhibition de Rho et l'activation de Cdc42 et Rac1 préférentiellement à l'avant de la cellule pour y favoriser l'activité protrusive et la formation de nouvelles jonctions latérales.

Cependant, il sera nécessaire de vérifier le rôle de la p120ctn sur l'activation et l'inhibition des trois RhoGTPases sus-cités dans les astrocytes en migration. En effet, dans certains types cellulaires comme les myoblastes C2C12, le complexe N-cadhérine-p120ctn active RhoA (Taulet et al., 2009).

Le devenir de la N-cadhérine à la membrane plasmique : flux rétrograde et recyclage vs diffusion aléatoire

La dynamique des cadhérines à la membrane plasmique a été étudiée abondamment dans les cellules épithéliales (van Roy and Berx, 2008). Plusieurs hypothèses quant au devenir des cadhérines engagées s'opposent. D'un côté, la membrane plasmique contiendrait un large réservoir de cadhérines diffusant librement, alternant des phases d'interaction de faible affinité *en trans* avec des phases de dissociation et de diffusion aléatoire (Sako et al., 1998). De l'autre, les cadhérines seraient tout aussi dynamique mais via un processus dépendant uniquement de l'endocytose et du recyclage à la membrane (Trojanovsky et al., 2006). Ces deux mécanismes dépendent du type cellulaire et de la maturité de la jonction adhérente. Des analyses de FRAP sur des temps courts dans les astrocytes en migration ont montré que seule une petite fraction de la N-cadhérine est rapidement échangée (probablement par diffusion), suggérant que le reste des molécules est engagé dans des interactions plus stables (données non montrées). J'ai pu aussi remarquer que la fraction diffusible est plus importante à l'avant qu'à l'arrière de la cellule. Cela pourrait correspondre au fait que les JAs à l'avant sont moins « matures » que celles vers l'arrière, et qu'une quantité plus importante de N-cadhérine peut diffuser dans la membrane. Ces cadhérines proviendraient par exemple de la membrane plasmique du front de migration où les cadhérines non engagées *en trans* diffusent beaucoup plus librement.

Ces données sont d'importance afin de comprendre comment un recyclage polarisé des cadhérines est possible. En effet, un comportement hautement diffusif de la N-cadhérine aurait certainement rendu plus compliqué la possibilité d'une boucle de recyclage au cours de la migration. La diffusion de la cadhérine pourrait être spatialement limitée par la présence de domaines membranaires restrictifs, comme les lipides rafts. En effet, dans les cellules musculaires, la N-cadhérine est stabilisée dans certaines zones de contact par son association avec des domaines riches en cholestérol (Taulet et al., 2009).

I.B. La Fonction du treadmilling et du recrutement des JAs à l'avant : un rôle dans l'inhibition de la motilité après contact ?

Au cours de ma thèse, j'ai montré pour la première fois l'existence d'un flux rétrograde des JAs assimilé à un treadmilling, dans les astrocytes en migration dans un modèle *in vitro* de fermeture de blessure. L'extrême **finesse** des protrusions des astrocytes et l'observation inhabituelle de la cadhérine sur des **temps longs** ont permis de mettre en évidence cette dynamique inédite des JAs. Après avoir commencé à caractériser ce flux et montré qu'il faisait partie d'une boucle de recyclage de la N-cadhérine, il nous reste à découvrir la fonction d'une telle dynamique dans la migration astrocytaire.

Premièrement, il faut s'assurer que ce phénomène existe *in vivo*. L'observation d'un flux rétrograde de N-cadhérine dans des astrocytes migrant hors d'un agrégat cellulaire déposé au sein d'une couche épaisse de matrigel (migration 3D), renforce l'hypothèse de l'existence d'un tel flux *in vivo*. Cependant, plus l'environnement cellulaire est complexe plus les difficultés d'observation de ce flux grandissent. Plusieurs caractéristiques sont nécessaires pour le mettre en évidence. Tout d'abord, les cellules doivent migrer collectivement, et plus lentement que le flux lui-même, puisque le sens de la migration est opposé au flux. De plus, les cellules du bord doivent avoir un côté dénué de contacts intercellulaires, même avec les cellules au dessus et en dessous d'elles. Ces contraintes limitent les modèles de migration *in vivo* utilisables. Néanmoins, nous sommes actuellement en train de tester l'existence d'un tel treadmilling des JAs dans un modèle de migration cellulaire chez le *poisson zèbre*, en collaboration avec le laboratoire du Dr Philippe Herbomel à l'Institut Pasteur, ainsi que chez la *drosophile*, lors de la fermeture dorsale.

Une fois l'existence du flux rétrograde confirmée *in vivo* il sera intéressant de déterminer sa contribution mécanique exacte dans la migration :

- **Favorise-t-il la migration cellulaire en diminuant les forces d'adhérence intercellulaire tout en les maintenant suffisamment élevées pour ne pas altérer la cohésion des cellules ?** Il est en effet tentant de spéculer qu'une quantité importante de cadhérines à la surface maintiendrait les cellules entre elles tandis que de faibles quantités de cadhérines en permanence recyclées rapidement vers des JAs immatures favoriseraient la migration.

- **Permet-il aux cellules de s'appuyer à tour de rôle les unes sur les autres pour favoriser leur avancée?** Auquel cas la vitesse du flux devrait être différente entre les cellules voisines et varierait au fur et à mesure de la migration pour permettre la progression décalée des cellules adjacentes. En effet, on imagine que si le flux a la même vitesse entre toutes les cellules et qu'il est le générateur principal de la migration collective (en ne tenant pas en compte de l'action des plaques d'adhérence sur la matrice extracellulaire par exemple), chaque cellule, à la façon d'une chenille de char s'activant dans le vide, resterait immobile. Une étude biophysique des forces en jeu entre les cellules lors de la migration collective en feuillet permettrait d'en savoir davantage sur le rôle mécanique du flux rétrograde de N-cadhérine dans l'initiation de la migration cellulaire.

En outre, j'ai montré que la N-cadhérine est recrutée à l'avant de la cellule tout au long de la migration astrocytaire. Le recrutement des cadhérines au front de migration a été observé dans de nombreux autres types cellulaires (McNeill et al., 1993; Vasioukhin et al., 2000; Vasioukhin and Fuchs, 2001). Leur présence à l'avant de la cellule en migration permettrait à la cellule de former une jonction dépendante des cadhérines tout de suite après un contact cellulaire. Ainsi, elle peut réorienter sa trajectoire via l'inhibition de la motilité après contact lors d'une migration aléatoire (**Figure 31** de l'introduction) ou s'arrêter et consolider l'interaction lors d'une cicatrisation par exemple. L'aspect dynamique de ce recrutement permet une réaction rapide de la cellule. Ce phénomène rappelle le recyclage dynamique des

intégrines pendant la migration cellulaire. Celui-ci assure en permanence la présence de ces récepteurs à la membrane plasmique, en vue d'interagir à tout moment avec un ligand extracellulaire sur lequel la cellule pourra s'appuyer pour favoriser sa migration. Cependant, dans le cas des intégrines la grosse partie du recyclage s'effectue sur une courte distance à l'avant des cellules ; le recyclage des intégrines provenant de l'arrière de la cellule étant très discuté.

Le test *in vitro* de fermeture de blessure est un bon outil pour analyser l'inhibition de motilité après contact. En effet, on imagine qu'au moment de la fermeture de la blessure, quand les deux bords se rejoignent, la présence de N-cadhérine au front de migration est cruciale. Aussi, l'inhibition de ce recrutement par l'ajout de dynasore quelques minutes avant la fermeture permettrait de valider ce postulat. En présence de dynasore, la N-cadhérine n'étant plus recyclé à l'avant, les cellules des deux bords devraient continuer à migrer et à se chevaucher.

II. La p120ctn et la dynamique des jonctions adhérentes

II.A. Le rôle de la perte de la p120ctn sur l'adhérence intercellulaire pendant la migration est-il indépendant de l'altération du niveau global de la N-cadhérine qu'elle induit?

J'ai montré au cours de ma thèse que la perte de la p120ctn dans les astrocytes sains et tumoraux perturbe leur migration collective en altérant les jonctions adhérentes. De nombreuses études font part d'une diminution d'expression de la plupart des cadhérines et des autres protéines des JAs dans les cellules dépourvues de p120ctn (Davis et al., 2003; Xiao et al., 2003). La p120ctn jouerait un rôle de rhéostat régulant la quantité de cadhérine à la membrane plasmique. En effet, en se liant à la partie juxtamembranaire des cadhérines la p120ctn masque deux séquences d'acides aminés pouvant être reconnues par la machinerie endocytique, et empêche son internalisation (Ishiyama et al., 2010). La p120ctn favoriserait également le recyclage à la membrane plasmique des cadhérines endocytées via son association à la kinésine (Chen et al., 2003) et empêcherait ainsi leur transport vers les lysosomes et leur dégradation. Dés lors, on peut se poser la question de savoir **si la perte d'adhérence localisée que l'on observe dans les astrocytes si p120 en migration n'est pas une conséquence de la diminution globale de la quantité de N-cadhérine disponible.**

Tout d'abord, les données les plus concluantes concernant la diminution des protéines de JAs suite à la perte de la p120ctn ont été obtenues dans les **cellules épithéliales**. En effet, dans ces cellules, la délétion de p120ctn diminue quasi complètement le niveau de E-cadhérine mais également celui de la β -caténine et de l' α -caténine (Davis et al., 2003). En absence de p120ctn, la E-cadhérine expose son motif dileucine (LL) à l'adaptateur de la clathrine AP-2, favorisant son endocytose. De plus, une tyrosine proche du motif dileucine est reconnue par l'ubiquitine ligase Hakai, qui provoque l'internalisation et la dégradation de la protéine (voir **Figure 24**). De manière intéressante, Hakai se lie à la E-cadhérine mais ne peut pas se lier à la N-cadhérine. Néanmoins, dans les myoblastes C2C12, le niveau de N-cadhérine est fortement diminué lorsque le niveau de p120ctn est quasi nul (Davis et al., 2003; Taulet et al., 2009). Il semble donc que dans ces cellules le taux global de N-cadhérine dépende de la présence de la p120ctn.

Cependant, de manière intéressante, dans les **cellules cérébrales** dépourvues de p120ctn (neurones et astrocytes) le niveau de N-cadhérine n'est pas autant diminué que dans les cellules musculaires : seulement 30% de baisse d'expression dans des neurones de l'hippocampe n'exprimant pas de p120ctn (Elia et al., 2006) et 39% de baisse d'expression dans les astrocytes si p120 (résultat non montré). En outre, la perte de la p120ctn n'entraîne pas de diminution significative du taux d' α -caténine et de β -caténine dans ces cellules. Dans les astrocytes si p120, le taux de N-cadhérine est suffisant aux cellules pour s'organiser en monocouche confluite et former des JAs stables, similaires à celles des cellules CTL.

Ces résultats suggèrent que dans les cellules cérébrales, des mécanismes redondants sont présents pour maintenir un niveau de cadhérines suffisant pour assurer les multiples interactions vitales entre cellules du CNS, même en absence de p120ctn. Ces mécanismes pourraient faire intervenir d'autres membres de la famille de p120ctn capable de se lier à la N-cadhérine comme δ -caténine/NPRAP ou ARVCF.

Aussi, **plus encore que la perturbation du niveau global de la N-cadhérine, il semble que ce soit l'altération de la dynamique de la N-cadhérine** qui soit à l'origine des capacités migratoires accrues des astrocytes dépourvues de la p120ctn. La p120ctn régulerait la dynamique globale de la N-cadhérine pour permettre une migration collective dirigée.

Les astrocytes en migration dans le test de fermeture de blessure subissent des forces opposées à leur avancement, en particulier à l'arrière des cellules, où les tensions entre les cellules meneuses du 1^{er} rang et les cellules des rangs suivant sont particulièrement importantes (Trepap et al., 2009). Dans les astrocytes si p120, on observe une altération des JAs majoritairement à l'arrière des cellules et une augmentation du nombre de cellules se détachant au fur et à mesure de la migration. Dans ces cellules, le niveau diminué de N-cadhérine est certes suffisant pour former des JAs lorsque les cellules sont immobiles, mais il pourrait n'être pas suffisant pour supporter le stress mécanique de la migration cellulaire.

Afin de savoir si l'altération des JAs au cours de la migration des astrocytes si p120 est le résultat d'une moindre quantité de N-cadhérine ou si plutôt elle est le résultat de la perturbation de la dynamique des JAs, nous avons regardé l'état des JAs dans des cellules déposées sur des micropatrons. Un flux de N-cadhérine semblable à celui observé lorsque les cellules migrent existe dans ces cellules (**Figure 46c**). Les astrocytes sont étalés sur des micropatrons circulaires pouvant contenir 6 à 8 cellules. Ils ne migrent pas mais toute la machinerie nécessaire à l'avancée de la cellule semble être mise en jeu puisqu'on observe un flux rétrograde d'actine similaire à celui observé dans les cellules en migration. Cet état entre la cellule immobile (ce qu'elle est) et la cellule en mouvement (ce qu'elle aimerait être si le substrat autour de l'îlot le lui permettait) semble générer la présence de forces de tension supérieures à celles observées dans la monocouche mais inférieures à celles à l'œuvre lors de la migration. Si la perte de la p120ctn n'altère pas les JAs dans ce modèle où les cellules subissent un stress mécanique plus important que dans la monocouche, on pourra évoquer un rôle de la p120ctn sur l'adhérence intercellulaire indépendant de son contrôle de la quantité globale de cadhérine dans la cellule.

L'analyse des JAs dans des astrocytes si p120 déposés sur ces micropatrons, a montré que la perte de la p120ctn ne perturbe pas les jonctions intercellulaires (données d'Isabelle Dupin). Ce résultat renforce l'idée que la p120ctn peut réguler l'adhérence intercellulaire via le contrôle de la dynamique des JAs, indépendamment de la quantité globale de la N-cadhérine qu'elle participe à maintenir.

En outre, l'analyse de l'expression de la p120ctn et de la N-cadhérine dans les gliomes pourrait nous permettre de valider cette hypothèse. Certains glioblastomes possèdent un niveau de N-cadhérine stable malgré la perte de la p120ctn (**Figure 41b**, astérisque rouge). Dans un premier temps, il faudrait étendre cette analyse aux résultats du transcriptome pour essayer de déterminer la proportion de gliomes présentant ces altérations d'expression. Dès lors, on pourrait étudier rétrospectivement le caractère invasif de ces tumeurs (en comparant les IRM) et mettre en évidence que malgré un niveau élevé de N-cadhérine, les gliomes présentant une perte de la p120ctn sont tout aussi invasifs. Cela s'expliquerait par l'altération de la dynamique des JAs favorisant une migration non dirigée et plus rapide en l'absence de la p120ctn.

II.B. Impact de la phosphorylation de la p120ctn sur la dynamique des jonctions adhérentes

Afin de maintenir un certain dynamisme des JAs, **l'inhibition de l'internalisation de la cadhérine par la p120ctn doit être dynamique**. La liaison elle-même de la p120ctn avec les cadhérines est relativement faible et dynamique, permettant ainsi au motif LL de la cadhérine, masqué par la liaison de p120ctn, d'avoir l'opportunité d'être en présence des adaptateurs de la clathrine et de déclencher l'endocytose des cadhérines en cas de besoin (Ishiyama et al., 2010; Reynolds et al., 1994) (**Figure 24**). L'interaction p120ctn-cadhérine peut aussi être déstabilisée par divers signaux moléculaires comme l'augmentation allostérique d'affinité entre les

molécules d'endocytose et le motif LL (Kelly et al., 2008) ou la **phosphorylation/déphosphorylation de p120ctn** (Bauer et al., 1998).

Les données concernant le rôle de la phosphorylation de la p120ctn sur son interaction avec les cadhérines et sur la stabilité des JAs sont pour l'instant contradictoires et dépendent de la nature du résidu phosphorylé (Alema and Salvatore, 2007). P120ctn est un substrat multi-sites pour les tyrosine et sérine/thréonine kinases (**Figure 22a**). La phosphorylation des résidus tyrosine de la p120ctn ne semble pas affecter l'interaction p120ctn-E-cadhérine puisque les mutants non phosphorylables se lient à la E-cadhérine et la stabilisent à la membrane comme la p120ctn sauvage (Mariner et al., 2004). L'impact de la phosphorylation des résidus S/T sur l'endocytose des cadhérines n'a pas été testé dans cette étude. Cependant, la délétion de la partie N-terminale abritant la majorité des sites de phosphorylation de la p120ctn restaure la stabilité de la E-cadhérine plus efficacement que les isoformes de p120ctn contenant cette partie N-terminale (Ireton et al., 2002). De même, une étude sur des cellules de tumeurs du colon (colo205), exprimant normalement la E-cadhérine et les caténines des JAs mais qui ne parviennent pas à s'agréger ensemble, a montré que la partie N-terminale de la p120ctn était responsable de l'altération des JAs dans ces cellules. L'hyperphosphorylation anormale de la partie N-terminale de p120ctn, déclenchée par la perturbation de voies de signalisation dans ces cellules tumorales, serait responsable de ce mécanisme (Aono et al., 1999). Cette hyperphosphorylation de p120ctn se ferait sur les résidus sérines de la partie N-terminale de la protéine (Ratcliffe et al., 1997).

Pour résumer l'état actuel des connaissances, la phosphorylation de la p120ctn sur ses résidus tyrosines n'aurait pas d'effet sur la stabilité des jonctions tandis que la phosphorylation de la p120ctn sur ses résidus sérines et thréonines de la partie N-terminale provoquerait une déstabilisation des JAs en diminuant la capacité d'interaction de la p120ctn avec la N-cadhérine.

Les résultats établis au cours de ma thèse sont en accord avec la littérature scientifique. J'ai en effet établi que la phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310 déstabilise son interaction avec la N-cadhérine puisqu'un mutant non phosphorylable de la p120ctn sur T310 interagit plus fortement avec la N-cadhérine (**Figure 61**). Ce résultat renforce encore l'idée que l'état de phosphorylation de la p120ctn est prépondérant dans sa capacité à réguler la stabilité des jonctions adhérentes.

II.C. La régulation spatiotemporelle de l'activité de la p120ctn pendant la migration cellulaire

Les derniers résultats que j'ai obtenus suggèrent que la phosphorylation de la p120ctn sur son résidu thréonine T310 pourrait être impliquée dans la régulation de la dynamique de la N-cadhérine au cours de la migration cellulaire. Cette phosphorylation diminue l'interaction entre la p120ctn et la N-cadhérine et favorise le recrutement de la N-cadhérine au front de migration. Nous postulons que l'activation **restreinte à l'arrière** de la cellule de la phosphorylation de la p120ctn sur T310 favorise l'endocytose de la N-cadhérine et le décrochage des cellules nécessaire à leur avancée.

Plusieurs expériences restent à être menées pour valider ce modèle et répondre aux questions suivantes :

La phosphorylation de la p120ctn sur T310 est-elle impliquée dans la dynamique des jonctions adhérentes des cellules en migration ?

L'expression d'un mutant de la p120ctn non phosphorylable sur T310 dans des astrocytes dépourvus de p120ctn endogène empêche le recrutement à l'avant de la N-cadhérine. Or ce mutant p120ctn^{T310A} stabilise les JAs. Nous postulons donc qu'il réduit le recyclage des cadhérines à l'avant en diminuant le pool de N-cadhérines cytosoliques. La création d'un mutant de la p120ctn phosphomimétique, en remplaçant la thréonine T310 par l'acide glutamique (p120ctn^{T310E}), aurait pu nous apporter une preuve plus directe du rôle de la phosphorylation de T310 sur la dynamique des JAs. Dans les cellules transfectées avec ce mutant, on s'attendait à une diminution de l'interaction entre la p120ctn constitutivement phosphorylée et la N-cadhérine, et à une augmentation du recrutement de la N-cadhérine à l'avant. Or, j'ai observé une augmentation de son interaction avec la N-cadhérine, et un recrutement de la N-cadhérine similaire à celui induit par l'expression de la p120ctn sauvage. L'acide glutamique est l'acide aminé ayant la structure la plus proche de la phosphothréonine, ce qui explique mon choix de l'utiliser pour la création d'un mutant phosphomimétique d'une thréonine. Néanmoins, de nombreuses études utilisent l'acide aspartique (D) comme acide aminé de substitution. Il serait intéressant de tester un mutant p120ctn^{T310D} dans ce modèle. En outre, ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par le fait qu'en surexprimant un variant phosphomimétique, la p120ctn disponible est **constitutivement phosphorylée**. Si la phosphorylation de la p120ctn déstabilise directement l'interaction avec la N-cadhérine on s'attend alors à une augmentation de cette déstabilisation dans les cellules transfectées avec la p120ctn^{T310E}. Cependant, si cette phosphorylation est nécessaire de manière **transitoire** pour activer ou inhiber une tierce molécule qui déstabilisera alors l'interaction entre la p120ctn et la N-cadhérine, la présence permanente de la phosphorylation sur le résidu T310 pourrait perturber ce processus et favoriser l'interaction. C'est sans doute ce deuxième mécanisme qui est en jeu ici.

De plus, afin de savoir si la phosphorylation de la p120ctn sur T310 est impliquée dans la dynamique des jonctions, il sera intéressant d'analyser la dynamique de la N-cadhérine ainsi que de la vitesse des astrocytes en migration transfectés avec le mutant p120ctn^{T310A}. Si notre modèle est exact, on s'attend à une stabilisation des JAs et une diminution du flux rétrograde de la N-cadhérine, ainsi qu'une réduction de la vitesse de migration. Si tel est le cas, il serait intéressant de tester l'inhibition de la phosphorylation de la p120ctn sur T310 dans les gliomes formant encore des JAs, pour savoir si cela suffirait à réduire leur vitesse de migration et leur invasion.

La phosphorylation de la p120ctn sur T310 est-elle localisée spécifiquement à l'arrière de la cellule ?

Pour répondre à cette question il faudra par exemple améliorer le protocole d'immunofluorescence pour l'anticorps anti-phospho p120ctn^{T310} (Pp120^{T310}). Si le modèle est exact, on s'attend à observer davantage de Pp120^{T310} à l'arrière des cellules en migration puisque c'est là que les JAs sont les plus altérées et que la liaison entre la p120ctn et la N-cadhérine pourrait être la plus perturbée. En outre, compte tenu de son effet sur l'interaction avec la N-cadhérine, on ne s'attend pas à observer une présence de la Pp120^{T310} aux JAs. Les résultats préliminaires sont très encourageants puisqu'ils montrent une localisation particulière sous membranaire, préférentiellement à l'arrière des cellules en migration (**Figure 65**). Une analyse quantitative précise est néanmoins requise pour valider cette observation cruciale. L'analyse de ce marquage dans des astrocytes confluent sera aussi un contrôle important à réaliser. En outre il sera intéressant de localiser avec précision le mutant p120^{T310A} pour savoir s'il est spécifiquement exclu de ces zones sous-membranaires.

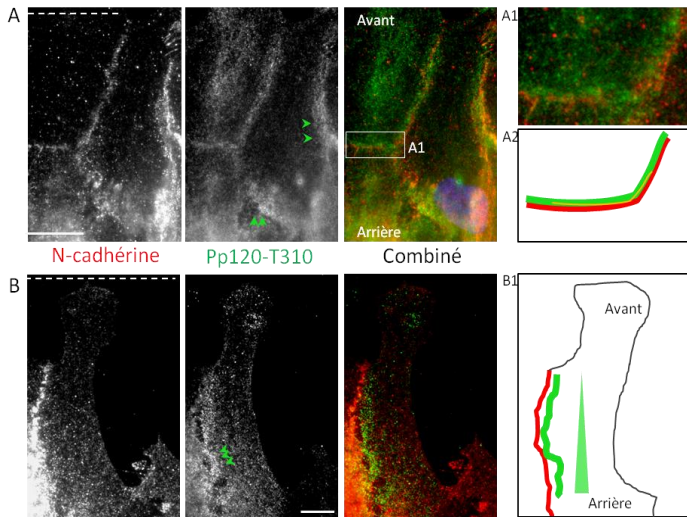


Figure 66: La p120ctn phosphorylée sur son résidu T310 a une localisation sous-membranaire à l'arrière des cellules en migration

A et B) Immunodétection de la p120ctn phosphorylée sur T310 (vert) et de la N-cadhérine (rouge) dans des astrocytes en migration. Noter que la p120ctn phosphorylée semble préférentiellement sous la membrane (A1 et A2) et davantage présente à l'arrière des cellules (têtes de flèche vertes). En B, un gradient d'expression de l'arrière vers l'avant de la phosphorylation est visible (illustré en B1). Barres d'échelle : 10µm.

Quels sont les acteurs moléculaires contrôlant l'activité de GSK-3β à l'avant comme à l'arrière de la cellule ?

En vue de comprendre le mécanisme en jeu dans la régulation spatiotemporelle de la phosphorylation de la p120ctn sur T310, je me suis intéressé à des kinases différenciellement activées au cours de la migration (régulation temporelle) entre l'avant et l'arrière de la cellule (régulation spatiale). GSK-3β répondant à ces critères (Etienne-Manneville and Hall, 2003b), j'ai montré qu'il était effectivement nécessaire à la phosphorylation sur T310.

Nous émettons donc l'hypothèse qu'au cours de la migration, l'activation du complexe Cdc42/Par6/aPKC inhibe spécifiquement GSK-3β à l'avant et génère un gradient d'activité de GSK-3β de l'arrière vers l'avant. Ce gradient se traduit par une phosphorylation de la p120ctn sur T310 accrue à l'arrière de la cellule, et à la mise en place du gradient d'adhérence décroissant de l'avant vers l'arrière que l'on observe lors de la migration collective des astrocytes dans un test *in vitro* de fermeture de blessure (**Figure 64**).

D'après le modèle proposé, l'inhibition du complexe Cdc42/aPKC/Par6 lèverait l'inhibition de la GSK-3β et entraînerait une augmentation du niveau de phosphorylation de la p120ctn sur son résidu T310. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en quantifiant le recrutement stable au front de migration du complexe cadhérine/caténines. En effet, la phosphorylation de T310 réduisant l'interaction de la p120ctn avec la N-cadhérine, sa présence à l'avant de la cellule devrait diminuer le recrutement de la N-cadhérine puisqu'une fois à la membrane plasmique au front de migration la p120ctn phosphorylée entraînerait sa déstabilisation. En outre, on s'attend à un recul des jonctions et une endocytose de la N-cadhérine uniforme dans les cellules, de manière identique à ce que l'on observe dans les cellules dépourvues de p120ctn.

D'autre part, on peut imaginer qu'il y ait un mécanisme semblable qui maintienne l'activité de la GSK-3β à l'arrière. Par exemple, on sait que PI-3K (Phosphoinositide 3-kinase) permet l'accumulation de PIP3, un lipide impliqué dans le maintien de la polarité des cellules en migration (Sulis and Parsons, 2003). De plus PI-3K active Akt (aussi appelée PKB) et que Akt inhibe GSK-3β en phosphorylant son résidu S9 (Cross et al., 1995). PTEN est un antagoniste de la voie de signalisation PI-3K/Akt qui régule la migration dirigée via le contrôle du niveau de PIP3. Chez *Dictyostelium*, la perte de PTEN provoque l'accumulation de PIP3 spécifiquement à l'avant de la cellule en migration, qui se retrouve polarisée *de facto* et incapable de suivre un gradient de chimiotactisme (Funamoto et al., 2002). Aussi est-il tentant

d'évoquer une possible localisation préférentielle de l'activité de PTEN à l'arrière des cellules en migration pour permettre la définition d'un front de migration riche en PIP3. A l'arrière de la cellule PTEN inhiberait PI-3K/Akt et assurerait ainsi le maintien de l'activité de GSK-3 β . Cette hypothèse est en cours d'analyse au laboratoire.

GSK-3 β phosphoryle-t-elle directement p120ctn sur son résidu T310

Cette dernière question mérite d'être adressée afin de chercher, en cas d'absence d'interaction directe entre la GSK-3 β et la p120ctn, de nouveaux régulateurs de la phosphorylation de la p120ctn. GSK-3 β est capable de phosphoryler la p120ctn dans un test *in vitro* de phosphorylation, où seulement les deux protéines sont présentes dans un tampon spécifique riche en phosphates radioactifs (Xia et al., 2003). Néanmoins, la p120ctn ne possède pas le site consensus requis pour assurer l'interaction avec GSK-3 β . La GSK-3 β cible les substrats possédant la séquence consensus suivante **S/TxxxS/T^P**, où la première Ser ou Thr (N-terminale) est le résidu ciblé, x est n'importe quel acide aminé (souvent la proline) et la Ser ou Thr en C-terminal est souvent phosphorylée en amont pour favoriser l'accrochage de la GSK-3 β (Doble and Woodgett, 2003). Or, les résidus autour de la thréonine T310 de p120ctn ne forment pas la séquence consensus reconnue par GSK-3 β : *Nter*-**TARRTG**T**³¹⁰**PS****-*Cter*. La relative proximité de cette séquence avec le site consensus reconnu par GSK-3 β peut expliquer néanmoins que leur mise en présence forcée lors du test *in vitro* puisse aboutir *in fine* à une phosphorylation de la p120ctn.

Au vue de la littérature actuelle, la question n'est pas tranchée et sera étudiée prochainement, notamment grâce à l'utilisation de l'anticorps Pp120^{T310}. Une co-immunoprécipitation de la GSK-3 β avec la p120ctn phosphorylée sur T310 serait un bon indicateur de leur interaction indirecte. De plus il serait intéressant de comparer la quantité de GSK-3 β immunoprécipitée avec la p120ctn sauvage et avec la p120ctn non phosphorylable p120ctn^{T310A}.

III. Recherche de marqueurs diagnostiques de l'invasivité des gliomes

III.A. La N-cadhérine, une molécule pro- ou anti-invasive ?

Si la N-cadhérine favorise l'invasion des cancers épithéliaux (Christofori, 2006), nos découvertes suggèrent que dans les gliomes, elle agit comme une protéine anti-invasive, freinant la migration de ces cellules tumorales (Camand et al., 2012). Comment une même protéine, la N-cadhérine, peut-elle avoir des effets différents sur un même processus, l'invasion tumorale?

Rappel : le niveau d'expression de la N-cadhérine diffère dans les tumeurs épithéliales et non épithéliales

La N-cadhérine possède un taux d'expression élevé dans les tumeurs métastatiques épithéliales mais réduit dans les gliomes. Dans la majorité des tumeurs épithéliales, l'augmentation du niveau de la N-cadhérine résulte principalement de l'activation anormale de facteurs de transcription contrôlant la transition épithélio-mésenchymateuse, qui aboutit à la diminution d'expression de la E-cadhérine et l'augmentation du niveau de N-cadhérine (Yang and Weinberg, 2008). S'il est admis depuis 20 ans que la perte de la E-cadhérine favorise la progression vers une tumeur invasive et métastatique, le rôle positif de la N-cadhérine sur l'invasivité tumorale n'a été démontré que plus récemment. Il est en effet plus intuitif de corrélérer l'augmentation de la dissémination d'un cancer dans l'organisme avec une diminution d'adhérence intercellulaire que le contraire. De plus, il fallait séparer les effets dus à la perte de la E-cadhérine de ceux exclusivement dus à la hausse de l'expression de la N-cadhérine. Néanmoins, le meilleur exemple du rôle positif joué par la N-cadhérine dans la progression tumorale reste la découverte en 2010 que l'utilisation d'anticorps anti-Ncad empêche le développement de métastase et réduit la taille des tumeurs pré-établies dans un modèle murin de cancer de la prostate résistant à la castration (Tanaka et al, 2010).

Par contre, nous avons montré que dans des tumeurs apparaissant en dehors des épithéliums établis, la N-cadhérine n'a pas un rôle pro-migratoire mais au contraire, une fonction anti-invasive. Dans les tumeurs primaires les plus fréquentes du système nerveux central, les gliomes, le niveau protéique de N-cadhérine est plus faible que dans le cerveau sain avoisinant. De plus, la réexpression de N-cadhérine dans les cellules de gliomes réduit leur vitesse de migration (Camand et al, 2012).

Il serait intéressant de savoir quels sont les éléments déclencheurs de la perte d'expression protéique de la N-cadhérine dans les gliomes. D'après nos résultats, et l'absence de mutations détectées dans le gène *CDH2* codant pour la N-cadhérine (The Genome Cancer Atlas), il semblerait que la diminution du taux protéique de la N-cadhérine dans les gliomes soit due à une instabilité protéique. La détection systématique du niveau d'expression et de la présence ou non d'une mutation non-sens dans chacune des protéines des JAs pour chaque échantillon de gliome permettrait de savoir si l'altération du niveau protéique de l'ensemble des molécules des JAs est due à l'altération génomique d'un de ses composants, qui provoquerait alors la déstabilisation de tout le complexe, ou si la cause est extérieure.

L'activation anormale de facteurs de croissance dans les gliomes pourrait altérer l'état de phosphorylation de la N-cadhérine et des caténines et provoquer leur dégradation. Dans 40 à 50% des gliomes, l'EGFR est constitutivement activée (Ekstrand et al., 1992). Son inhibition ainsi que celle d'un autre récepteur de l'EGF, HER2, exprimé dans les gliomes et de mauvais pronostic également (Koka et al., 2003), permet d'augmenter l'expression protéique de la N-

cadhérine et de favoriser sa localisation à la membrane plasmique (Rappl et al., 2008). La dérégulation de certains miARNs altérant la traduction des ARNm codant pour la N-cadhérine et la p120ctn pourrait également être à l'origine de la perte d'expression de ces protéines dans les gliomes.

Le potentiel invasif d'un groupe de cellules est-il dépendant simplement de la quantité et des capacités adhésives des molécules d'adhérence présentes à leur surface?

Dans les tumeurs épithéliales, se produit un échange de cadhérine (« cadherin switch »). La E-cadhérine est remplacée par la N-cadhérine, moins adhésive (Chu et al., 2004). Les cellules gliales n'expriment pas la E-cadhérine, et la perte de la N-cadhérine dans les gliomes n'est palliée a priori par l'expression d'aucune autre cadhérine classique.

Une explication simpliste mais intuitive serait d'imaginer qu'in fine, dans les deux situations, les **forces d'adhérence** globales perçues par la cellule tumorale sont moindres, ce qui favoriserait son détachement de la tumeur.

Néanmoins, ce postulat n'explique pas pourquoi dans certaines tumeurs épithéliales comme le cancer de la prostate, l'inhibition de la N-cadhérine réduit l'infiltration tumorale et le nombre de métastases (Tanaka et al., 2010).

En outre même si la quantité globale de N-cadhérine n'est pas affectée dans certains gliomes de haut grade, **l'altération de leur dynamique** suite à la dérégulation de la p120ctn, par exemple (Figure 42, astérisque rouge), pourrait favoriser la diminution de cadhérines disponibles à la membrane plasmique.

Les fonctions de la N-cadhérine dans l'invasion tumorale sont dépendantes du type cellulaire et de leur environnement extracellulaire

Interaction avec les cellules du stroma

Dans les tumeurs épithéliales, l'expression de la N-cadhérine par les cellules cancéreuses favoriserait l'interaction avec les fibroblastes capables d'arranger la matrice extracellulaire en un support permissif. De plus, elle permettrait l'interaction avec les cellules endothéliales, qui faciliterait leur intravasation dans la circulation sanguine.

En ce qui concerne les gliomes, l'impact des interactions entre cellules gliales et les cellules avoisinantes est plus controversé. L'infiltration du parenchyme cérébrale se fait notamment le long de faisceaux d'axones myélinisés ou dans les espaces périvasculaires, le long des capillaires. Ces routes anatomiques permissives ou structures secondaires de Scherer, permettent l'extension de la tumeur sur de longues distances, et parfois même l'invasion de l'hémisphère contralatéral (Giese et al., 2003). Les contacts des cellules de gliomes avec les axones neuronaux, les cellules endothéliales ou d'autres cellules gliales semblent donc essentiels à leur capacité invasive.

Néanmoins, de nombreuses études ont montré que la **diminution** du niveau d'expression des molécules d'adhérence comme la NCAM (Duenisch et al., 2010; Owens et al., 1998; Prag et al., 2002), CASPR-2 (Bralten et al., 2010) et la N-cadhérine (Camand et al., 2012) **augmente la migration et l'invasion des gliomes**. Une étude récente a montré que certains types de gliomes auraient pour origine les cellules précurseurs d'oligodendrocytes (Liu et al., 2011). Or, si les précurseurs d'oligodendrocytes sont capables de s'étaler sur une monocouche d'astrocytes ou sur une surface couverte de N-cadhérine, ils sont incapables de migrer sur ces supports. L'inhibition de la N-cadhérine restaure leur capacité à migrer et augmente considérablement leur vitesse (Schnadelbach et al., 2000). Ces données suggèrent

que la réduction de l'adhérence entre les cellules de gliomes et les cellules environnantes saines facilite leur infiltration du cerveau plutôt qu'elle ne la réduit.

Les contacts entre cellules de gliomes et les cellules avoisinantes lors de l'invasion ne dépendraient pas des JAs, et se feraient alternativement grâce aux jonctions serrées ou aux jonctions communicantes. Celles-ci pourraient en effet promouvoir leur migration via l'induction de voies de signalisation pro-invasives. Aussi bien l'augmentation de l'expression des JAMs (Tenan et al., 2010) que de la connexine 43 (Lin et al., 2002) dans les gliomes favorise leur capacité invasive.

L'environnement moléculaire module les fonctions de la N-cadhérine

Enfin, les différences de fonctions de la N-cadhérine dans l'invasion tumorale des cancers épithéliaux et non épithéliaux pourraient s'expliquer par des environnements moléculaires différents dans ces deux types cellulaires. La N-cadhérine y lie des partenaires membranaires et cytoplasmiques sans doute différents. La combinaison d'interaction en résultant doit générer des signaux pro- ou anti-migratoires bien distinct, spécifiques de chaque type cellulaire. Par exemple, dans les gliomes où l'EGFR est constitutivement actif, et HER-2 surexprimé, ces deux récepteurs de l'EGF interagissent ensemble et diminuent la localisation membranaire de la N-cadhérine. Cette diminution favorise alors la migration des gliomes (Rappl et al., 2008). Dans les cellules tumorales épithéliales par contre, la N-cadhérine augmente le potentiel invasif des carcinomes en modulant la signalisation de FGFR (Suyama et al., 2002).

La N-cadhérine peut-elle être un bon marqueur de l'invasivité des gliomes

Les données mettant en évidence un rôle anti-migratoire de la N-cadhérine dans les cellules de glioblastomes ont été obtenues dans un modèle *in vitro* de migration cellulaire (Camdand et al, 2012). Si la réexpression de la N-cadhérine dans les cellules de gliomes freine leur migration dans un test de fermeture de blessure, parvient-elle à empêcher l'infiltration du cerveau par les cellules des gliomes ? Afin d'obtenir une réponse simple, il sera intéressant de comparer la mesure du niveau de N-cadhérine dans des gliomes invasifs et dans des gliomes non invasifs. Cette donnée nous manque pour l'instant pour proposer la N-cadhérine comme marqueur de l'invasivité des gliomes.

De plus, un problème de taille subsiste quant à une possible utilisation de la N-cadhérine comme marqueur diagnostique de l'invasivité : son niveau d'expression ne coïncide pas forcément avec son niveau à la membrane plasmique. En effet, à la membrane plasmique, la N-cadhérine peut être clivée par ADAM10 (partie III-C-5 de l'introduction).

III.B. La p120ctn : un nouveau marqueur de l'invasivité des gliomes ?

Les résultats obtenus au cours de ma thèse impliquent la p120ctn comme potentiel suppresseur d'invasivité dans les gliomes. Les tests *in vitro* ont établi que la perte de la p120ctn dans des astrocytes sains induit un comportement migratoire proche de celui observé dans les astrocytes tumoraux des gliomes. La diminution de la p120ctn favorise en effet le détachement des cellules, accélère leur migration et altère leur persistance de direction. En outre, l'ablation totale de la p120ctn dans les cellules de glioblastomes en exprimant encore, augmente significativement leur vitesse de migration. Finalement, une étude sur une dizaine de gliomes diffus ou non diffus a permis de montrer une baisse significative du niveau de p120ctn dans le

groupe de gliomes invasifs. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études ayant montré une corrélation entre la perte de la p120ctn et le caractère invasif des principaux cancers épithéliaux (van Hengel and van Roy, 2007) et étendent cette association à des tumeurs non épithéliales.

Afin de valider le caractère anti-invasif de la p120ctn dans les gliomes, il faudra tout d'abord augmenter le nombre de tumeurs analysées, premièrement au sein d'une étude rétrospective comparable à celle déjà réalisée (**Figure 43c**). Ultérieurement, il sera nécessaire de réaliser une étude prospective du taux d'expression de p120ctn sur la biopsie de nouveaux patients diagnostiqués, afin de valider définitivement la p120ctn comme marqueur fiable de l'invasivité des gliomes. En effet, l'étude de l'évolution de la tumeur, permise par un excellent suivi de chaque patient intégré au projet à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière, nous renseignera finalement sur le caractère prédictif ou non du niveau de la p120caténine dans l'invasivité des gliomes.

Pour accélérer l'étude, nous avons établi un partenariat avec les laboratoires Roche Diagnostics® et la plateforme de transcriptomique de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (Hôpital de la Pitié-Salpêtrière) auquel appartient le laboratoire du Pr Delattre. Cette collaboration a permis de mettre au point une méthode d'analyse rapide du niveau d'ARNm par qPCR de 25 gènes pour 16 échantillons à la fois, grâce à la méthode RealTimeReady® appliquée à des plaques 1536 puits. En plus du niveau de la p120ctn dans chaque nouvelle tumeur invasive ou non intégrée au projet, on établira le profil d'expression des précédents gènes auxquels je me suis intéressé comme les isoformes Cdc42 iso2 et iso1, tous les gènes des JAs, et d'autres cibles potentielles trouvées lors de la première analyse des puces Affymetrix.

Parallèlement, l'analyse de l'expression de la p120ctn sur des coupes de glioblastomes permettant de visualiser clairement le cœur de la tumeur, les marges et le cerveau sain aux alentours permettrait d'apporter un supplément de preuve, *in vivo*, du rôle de la diminution de p120ctn dans l'invasivité des gliomes. Ce postulat serait conforté par l'observation préférentielle de cellules négatives pour la p120ctn en marge de la tumeur, voire infiltrées dans le cerveau sain, plutôt qu'au cœur de la tumeur.

Enfin, l'analyse de l'effet de la réintroduction de p120ctn sur le comportement migratoire des cellules primaires de glioblastomes (expériences de « rescue ») pourra permettre d'apporter une preuve plus directe quant au rôle de suppresseur d'invasivité de la p120ctn dans les gliomes. Cette expérience pourrait être réalisée dans le test de fermeture de blessure mais également dans des modèles de migration plus physiologiques comme la migration des cellules de gliomes sur des tranches de cerveau de rat, ou sur un tapis d'axones (Oellers et al., 2009). Si ces expériences donnent des résultats positifs, on pourra essayer de greffer les cellules de glioblastomes humains modifiées pour exprimer stablement la p120ctn, dans le cerveau de souris immunodéprimées, afin d'évaluer l'invasivité de la tumeur *in situ*.

Une question primordiale demeure néanmoins : **en quoi la p120ctn serait-elle un meilleur marqueur de l'invasivité dans les gliomes que la N-cadhérine ?**

D'après les premiers échantillons analysés, dans chaque glioblastome exprimant la p120ctn, la N-cadhérine est exprimée alors que l'inverse n'est pas vrai (**Figure 42b**). Il serait intéressant de montrer que ces tumeurs là (absence de p120ctn mais présence de N-cadhérine) sont tout aussi invasives que les tumeurs dépourvues de N-cadhérine. Cela suggérerait que la p120ctn peut à la fois affecter l'invasivité des gliomes via l'altération du niveau de la N-cadhérine mais également indépendamment de cet effet. Dès lors, la p120ctn serait un meilleur marqueur de l'invasivité que la N-cadhérine. En outre, il est primordial de comparer le niveau de N-cadhérine entre le groupe de gliomes invasifs et le groupe de gliomes non invasifs afin de

savoir si, comme la p120ctn, son taux est diminué dans les gliomes les plus invasifs ou non. Dans le cas contraire, cela apporterait une preuve d'une meilleure fiabilité de la p120ctn comme marqueur de l'invasivité.

ANNEXE ARTICLES

- **Article 1 :**

"Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic" (Publié, 2nd auteur).

- **Article 2 :**

"N-cadherin expression level modulates integrin mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration" (Publié, 2nd auteur).

- **Article 3 :**

"N-cadherin expression level as a potential indicator of tumor invasiveness in gliomas" (Publié, 1^{er} auteur, commentaire de l'article 2)

- **Article 4 :**

"P120ctn-dependent dynamics of adherens junctions is crucial during collective migration" (En préparation)

- **Article 5 :**

"A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry" (Publié, 3^{ème} auteur, réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr Delattre)

Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic

Naël Osmani,¹ Florent Peglion,¹ Philippe Chavrier,² and Sandrine Etienne-Manneville¹

¹Cell Polarity and Migration Group, Institut Pasteur, and Centre National de la Recherche Scientifique URA 2582, 75724 Paris, Cedex 15, France

²Institut Curie and Centre National de la Recherche Scientifique UMR144, 75248 Paris, Cedex 05, France

Cell polarity is essential for cell division, cell differentiation, and most differentiated cell functions including cell migration. The small G protein Cdc42 controls cell polarity in a wide variety of cellular contexts. Although restricted localization of active Cdc42 seems to be important for its distinct functions, mechanisms responsible for the concentration of active Cdc42 at precise cortical sites are not fully understood. In this study, we show that during directed cell migration, Cdc42 accumulation at the cell leading edge relies on membrane traffic. Cdc42 and its exchange factor β PIX localize to

intracytoplasmic vesicles. Inhibition of Arf6-dependent membrane trafficking alters the dynamics of Cdc42-positive vesicles and abolishes the polarized recruitment of Cdc42 and β PIX to the leading edge. Furthermore, we show that Arf6-dependent membrane dynamics is also required for polarized recruitment of Rac and the Par6- α PKC polarity complex and for cell polarization. Our results demonstrate influence of membrane dynamics on the localization and activation of Cdc42 and consequently on directed cell migration.

Introduction

Cell polarity is crucial both during development and in the adult, where it participates in polarized cell functions such as neuronal synaptic transmission, epithelial barriers, or cell migration. Cdc42 is a major regulator of cell polarity from yeast to mammalian cells (Etienne-Manneville, 2004) and controls the direction of cell migration in chemotaxis and wound-induced migration (Allen et al., 1998; Etienne-Manneville and Hall, 2001; Li et al., 2003). Cdc42 activity can be regulated either positively by guanine nucleotide exchange factors (GEFs) or negatively by GTPase-activating proteins (GAPs; Etienne-Manneville and Hall, 2002). Inhibition but also constitutive activation of Cdc42 or its GEF perturbs cell orientation (Adams et al., 1990; Etienne-Manneville and Hall, 2001; Caviston et al., 2002; Etienne-Manneville, 2004), indicating that Cdc42 activation must be temporally and spatially restricted to successfully promote cell polarization (Park and Bi, 2007). In *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc42 accumulates at the presumptive growth site, where it promotes polarized cell growth (Nern and Arkowitz, 2000) or the formation of mating projection in response to

pheromone (Johnson, 1999). During wound-induced directed cell migration, Cdc42 is recruited to the wound edge to induce the polarization of the cell toward the wound (Nobes and Marsh, 2000; Etienne-Manneville and Hall, 2001; Palazzo et al., 2001; Nalbant et al., 2004).

The mechanisms that control Cdc42 localization are likely to be crucial for cell polarity but are still poorly understood. In budding yeast, Cdc42p-restricted localization requires the polarized recruitment of the Cdc42p GEF Cdc24p, which is regulated by various polarity cues (Nern and Arkowitz, 2000; Shimada et al., 2000). It also involves actin-driven membrane delivery (Wedlich-Soldner et al., 2003; Slaughter et al., 2009). In migrating astrocytes, Cdc42 recruitment and activation to the leading edge depend on its GEF β PIX (Osmani et al., 2006), but the involvement of membrane trafficking in Cdc42 localization and cell polarity remains unknown. Thus, we investigated the dynamics of Cdc42 and its regulation in polarizing astrocytes. The colocalization of Cdc42 with Arf6, a key regulator of membrane endocytosis and recycling, prompted us to study the role

Correspondence to Sandrine Etienne-Manneville: sandrine.etienne-manneville@pasteur.fr

Abbreviations used in this paper: APC, adenomatous polyposis coli; CCD, charge-coupled device; GAP, GTPase-activating protein; GEF, guanine nucleotide exchange factor.

© 2010 Osmani et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date [see <http://www.rupress.org/terms>]. After six months it is available under a Creative Commons License [Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>].

Supplemental Material can be found at:
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2010/12/20/jcb.201003091.DC1.html>

of Arf6-dependent membrane traffic in Cdc42 localization and cell polarity.

Arf6 is a member of the ARF (ADP ribosylation factor) family of small GTPases. Arf6 localizes at the plasma membrane and the endocytic system, where it acts in a wide range of processes, including endocytosis, recycling, and organization of the actin cytoskeleton (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). Arf6 is overexpressed in invasive tumors like gliomas and is essential for tumor cell invasion (Sabe, 2003; Li et al., 2006; Hu et al., 2009). Arf6 function in cell migration (Santy and Casanova, 2001; Svensson et al., 2008) is thought to be mediated by its role in the regulation of the Rho GTPase Rac and actin remodeling (Di Cesare et al., 2000; Matafora et al., 2001; Palacios and D'Souza-Schorey, 2003; Cotton et al., 2007). In this study, we show that Arf6 also plays a key role in the regulation of Cdc42 and cell polarity.

Results and discussion

We used a wound-induced astrocyte migration assay to monitor the dynamics of GFP-Cdc42 during cell polarization (Fig. 1 and Videos 1 and 2). Although expression of GFP alone induced a diffuse fluorescence that concentrated in the nucleus, GFP-Cdc42 accumulated at the leading edge of wound-edge cells (Fig. 1 A). We have previously demonstrated that the increased GFP-Cdc42 fluorescence at the leading edge was not caused by membrane ruffling but reflected the local accumulation of Cdc42 at the leading edge (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Osmani et al., 2006). Cdc42-GFP was also visible in limited regions of cell-cell contact, as reported previously (Michaelson et al., 2001). In addition, Cdc42 was visible on a perinuclear compartment, where it colocalized with the cis-Golgi marker GM130 (Fig. 1 E), which is in agreement with the previously reported interaction of Cdc42 with the γ COP subunit of coatomer (Erickson et al., 1996; Wu et al., 2000; Nalbant et al., 2004). Cdc42 also labeled vesicles of various sizes. In nonmigrating confluent cells, Cdc42-positive vesicles were mainly immobile (Fig. 1 B and Video 3). In migrating astrocytes, large Cdc42-positive structures were visible and resembled macropinosomes, which form during astrocyte migration (Video 4). These large vesicles tended to accumulate when Cdc42 was largely overexpressed (Video 2), possibly as a consequence of Cdc42 function in endocytosis (Georgiou et al., 2008; Rodal et al., 2008; Hehny et al., 2009). In migrating cells, we also observed small and very dynamic Cdc42-positive vesicles, moving in a directed manner toward the leading edge and also from the leading edge toward the cell center (Fig. 1 C and Videos 1 and 2). To determine the nature of the Cdc42-positive membrane structures, we stained cells with the early endosome marker EEA1. Large and some of the small Cdc42-positive vesicles were EEA1 positive, showing the localization of Cdc42 on the endosomal compartment (Fig. 1 F).

The presence of EEA1 on Cdc42-positive vesicles led us to compare the localization of Cdc42 with that of Arf6, a well-established component of endocytic and recycling pathways (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). Arf6 has been shown to control the vesicular traffic of the Rho GTPase Rac1

(Albertinazzi et al., 2003; Balasubramanian et al., 2007; Cotton et al., 2007), but its relationship with Cdc42 has not been investigated so far. In the absence of antibody suitable for immunofluorescence, we used a CFP-tagged Arf6 construct. CFP-Arf6 localized at the plasma membrane and decorated intracellular vesicles in cell periphery and in a pericentriolar region (Peters et al., 1995; Radhakrishna and Donaldson, 1997; D'Souza-Schorey et al., 1998). CFP-Arf6 colocalized with Cdc42 on patches at the plasma membrane and on intracytoplasmic vesicles (Fig. 2, A and B). We depleted Arf6 using two different siRNA (Fig. S1) and analyzed the dynamics of GFP-Cdc42-positive structures (Video 5). In Arf6-depleted cells, the Golgi localization of Cdc42 was perturbed, although the Golgi structure, as seen with GM130 staining, remained intact (Fig. S1 B). Cdc42 localization on vesicles was only slightly decreased, and Cdc42-GFP was still present on EEA1-positive vesicles, which often accumulated in a perinuclear area (Fig. 2 C and Fig. S1 C). Rab5 inhibition was more potent than Arf6 in perturbing Cdc42 localization on vesicles (Fig. 2 C), suggesting that Cdc42 localization on vesicles requires endocytosis and that Arf6 does not play a major role in this process. Nevertheless, depletion of Arf6 dramatically reduced the dynamics of the Cdc42-positive vesicles (Fig. 2 D and Video 2). These results indicate that endocytosis and Arf6-dependent membrane traffic are key regulators of membrane-bound Cdc42 dynamics in migrating cells.

We then tested whether Cdc42-polarized recruitment required membrane traffic. Inhibition of Arf6 by siRNA or by a dominant-negative construct dramatically perturbed Cdc42 recruitment at the leading edge (Fig. 2, E and F). Similarly, dominant-negative Rab5 prevented Cdc42 accumulation at the leading edge (Fig. 2 E). In contrast, control siRNA (Fig. 2, E and F, siCTL) and siRNA-mediated depletion of Rac, which prevents astrocyte migration but not centrosome reorientation (Etienne-Manneville and Hall, 2001), had no effect (Fig. S2). These observations show that Cdc42 accumulation at the leading edge plasma membrane involves Arf6-dependent vesicular traffic independently of the role of Arf6 in the regulation of Rac activity and cell motility. They suggest that recycling of membrane-bound Cdc42 is involved in Cdc42 recruitment to sites of cell polarization. A similar role of membrane recycling has been suggested for polarized recruitment of Cdc42 to the bud site in *S. cerevisiae* (Wedlich-Soldner et al., 2003; Slaughter et al., 2009), suggesting that membrane traffic may be a very general mechanism to direct the delivery of Cdc42 to polarizing sites.

We then determined whether vesicular traffic was involved in wound-induced Cdc42 activation. In response to the scratch, Cdc42 is activated by the exchange factor β PIX downstream of an integrin-induced Src-dependent signaling cascade, which is activated at the cell wound edge (see Fig. 5; Osmani et al., 2006). Depletion of Arf6 abolished wound-induced Cdc42 activation (Fig. 3 A), demonstrating the role of Arf6-dependent membrane dynamics in Cdc42 regulation. In agreement with the role of Arf6 in focal adhesion turnover (Daher et al., 2008; Torii et al., 2010), focal adhesions appeared longer in Arf6-depleted than control cells. However, the distribution of focal adhesions remained polarized (Fig. S1 D), indicating that in Arf6-depleted and control cells, integrin

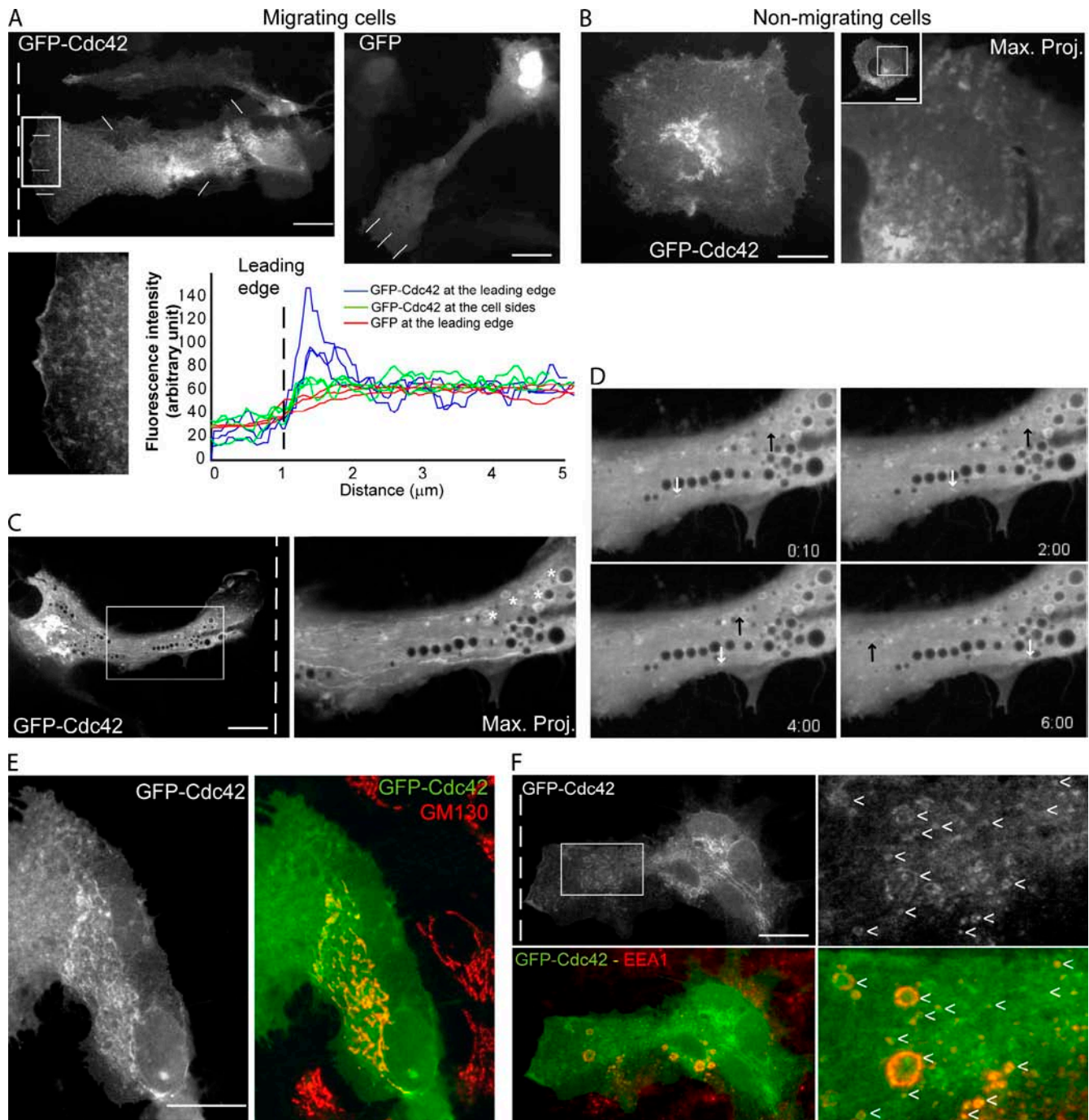


Figure 1. GFP-Cdc42 localizes to plasma membrane and intracellular vesicles of migrating cells. (A) GFP-Cdc42 (top left) and GFP (top right) fluorescence in migrating primary astrocytes. (bottom left) Higher magnification view of the boxed region shows accumulation of GFP-Cdc42 at the leading edge. (bottom right) Fluorescence intensity of GFP-Cdc42 (blue) measured along three lines (as indicated) drawn across the leading edge (blue) or side edge (green) is shown. Fluorescence intensity of GFP measured along three lines drawn across the leading edge of the GFP-expressing cell is shown in red. Cell-cell contact areas with increased Cdc42 intensity have been disregarded. (B) GFP-Cdc42 fluorescence in a nonmigrating confluent astrocyte (left) and image showing the maximum projection of Video 3 (right). (C) Images showing the maximum projection of Video 2. A higher magnification of the boxed area is shown on the right. Directed movement of small Cdc42-positive vesicles appears as white lines along the length of the protrusion. Large immobile Cdc42-positive vesicles are indicated with asterisks. (D) Still images from Video 2 showing the retrograde (black arrow) and anterograde movement (white arrows) of Cdc42-positive vesicles in the cell protrusion. (E) GM130 staining (red) in GFP-Cdc42 (green)-expressing cells. (F) EEA1 staining (red) in GFP-Cdc42 (green)-expressing cells showing the endosomal EEA1 marker on Cdc42-positive vesicles (arrowheads). Images are representative of at least 100 cells from three independent experiments. The dashed line indicates the direction of the wound. Bars, 10 μ m.

signaling was restricted to the wound edge. In migrating cells, β PIX colocalized with Cdc42 at the leading edge (Fig. 3, B and C) and on small intracytoplasmic vesicles (Fig. 3 C,

arrowheads), but it was absent from larger cytoplasmic structures (Fig. 3 C, asterisk). β PIX recruitment to the leading edge was strongly reduced in Arf6-depleted cells (Fig. 3 D), suggesting

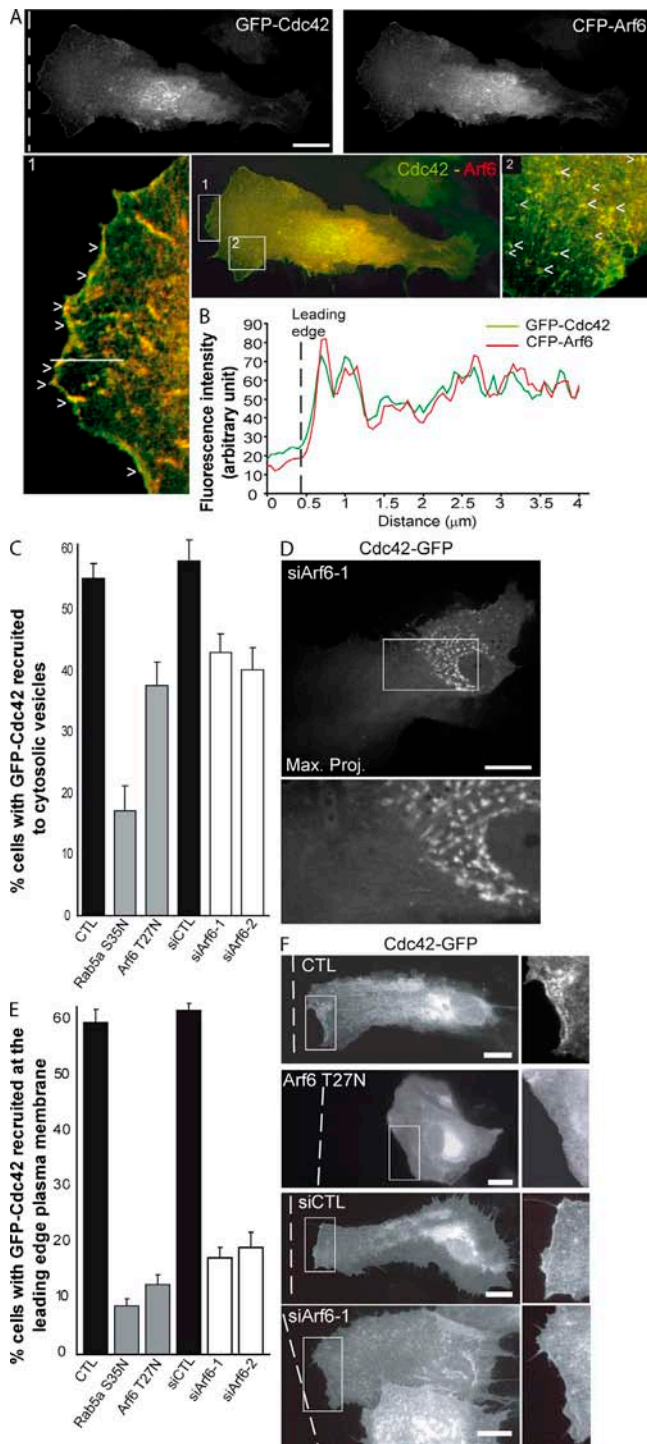


Figure 2. Arf6 colocalizes with Cdc42 and regulates Cdc42 dynamics and localization. (A) Colocalization of GFP-Cdc42 (green) and CFP-Arf6 (red) in a migrating astrocyte. Higher magnification images of boxed areas 1 and 2 are shown on the left and right, respectively. CFP-Arf6 and GFP-Cdc42 colocalized (arrowheads) in discrete areas at the leading edge plasma membrane (box 1) and on intracellular vesicles (box 2). (B) Fluorescence intensities of GFP-Cdc42 (green) and CFP-Arf6 (red) measured along the line shown in A (box 1). (C) GFP-Cdc42 recruitment to intracytoplasmic vesicles in astrocytes microinjected with the indicated constructs or nucleofected with the indicated siRNA. (D) Maximum projection of Video 4. (bottom) A higher magnification of the boxed area is shown. (E) Recruitment of GFP-Cdc42 to the leading edge of migrating astrocytes after microinjection with the indicated constructs or nucleofection with the indicated siRNA. (F) GFP-Cdc42 fluorescence images in cells microinjected with the indicated

that vesicular traffic controls the delivery of Cdc42 together with its GEF β PIX to the wound-edge plasma membrane (see Fig. 5). It is tempting to speculate that wound-induced Src activation downstream of integrins and interaction with Scrib promotes β PIX activation and consequently Cdc42 activation (see Fig. 5; Feng et al., 2006; Osmani et al., 2006). Active Cdc42 together with β PIX may inhibit Arf6 activity at the leading edge via GIT, a β PIX-associated Arf6 GAP (Hoefen and Berk, 2006), to maintain a stable accumulation of Cdc42 at the leading edge of migrating cells. Alternatively, Cdc42 may also modulate Arf6 activity through aPKC and GSK3 β as shown in epithelial cells (Farooqui et al., 2006).

In migrating astrocytes, Cdc42 controls centrosome positioning in front of the nucleus and cell orientation toward the wound (Etienne-Manneville and Hall, 2001). Wound-induced Cdc42 activation induces the recruitment and activation of the polarity protein complex Par6-aPKC, which in turn phosphorylates GSK3 β to locally promote adenomatous polyposis coli (APC) clustering at microtubule plus ends, microtubule anchoring, and centrosome reorientation (Etienne-Manneville and Hall, 2003; Etienne-Manneville et al., 2005; Manneville et al., 2010). Depletion of Arf6 strongly affected the Cdc42-dependent recruitment of Par6 and aPKC to the wound edge of the cells (Fig. 4 A). Immunolocalization of the Thr410-phosphorylated aPKC indicated that the leading edge recruitment of the activated aPKC also depended on Arf6 (Fig. 4 B). APC accumulation at microtubule plus ends was strongly reduced in Arf6-depleted cells (Fig. 4 C). These results confirm the role of Arf6-dependent membrane traffic in the wound-induced activation of Cdc42- and Cdc42-dependent polarity pathway. Consistently, inhibition of Arf6 by siRNA or a dominant-negative construct inhibited centrosome and Golgi reorientation in wounded astrocytes (Fig. 4, D and E). Expression of an siRNA-insensitive Arf6 construct restored a correct cell orientation (Fig. 4 E). Expression of a GFP protein or transfection with control siRNA had no effect on cell polarization. Thus, we conclude that the regulation of Cdc42 localization by Arf6 contributes to the activation of the Par6-aPKC polarity pathway and to the polarized reorganization of the microtubule network (Fig. 5). Dominant-negative Rab5 and Eps15, which interfere with endocytosis, also prevented Cdc42 recruitment to the leading edge and inhibited cell orientation (Fig. 2 E and not depicted). Collectively, these observations indicate that membrane traffic is involved in the regulation of cell polarity by controlling Cdc42-polarized delivery to cortical sites and consequently by promoting the integrin-mediated activation of Cdc42 and the Cdc42-mediated polarity pathway (Fig. 5).

In addition to its role in cell orientation, Arf6-dependent membrane traffic also controlled the formation of protrusion (Fig. 4 F). We have shown previously that protrusion length depends essentially on Rac activity (Etienne-Manneville and

constructs or nucleofected with the indicated siRNA. (right) Higher magnification images of the leading edges (boxed areas) are shown. Dotted lines indicate the direction of the wound. Data are shown as mean \pm SEM of three to six independent experiments totaling >200 cells. Bars, 10 μ m.

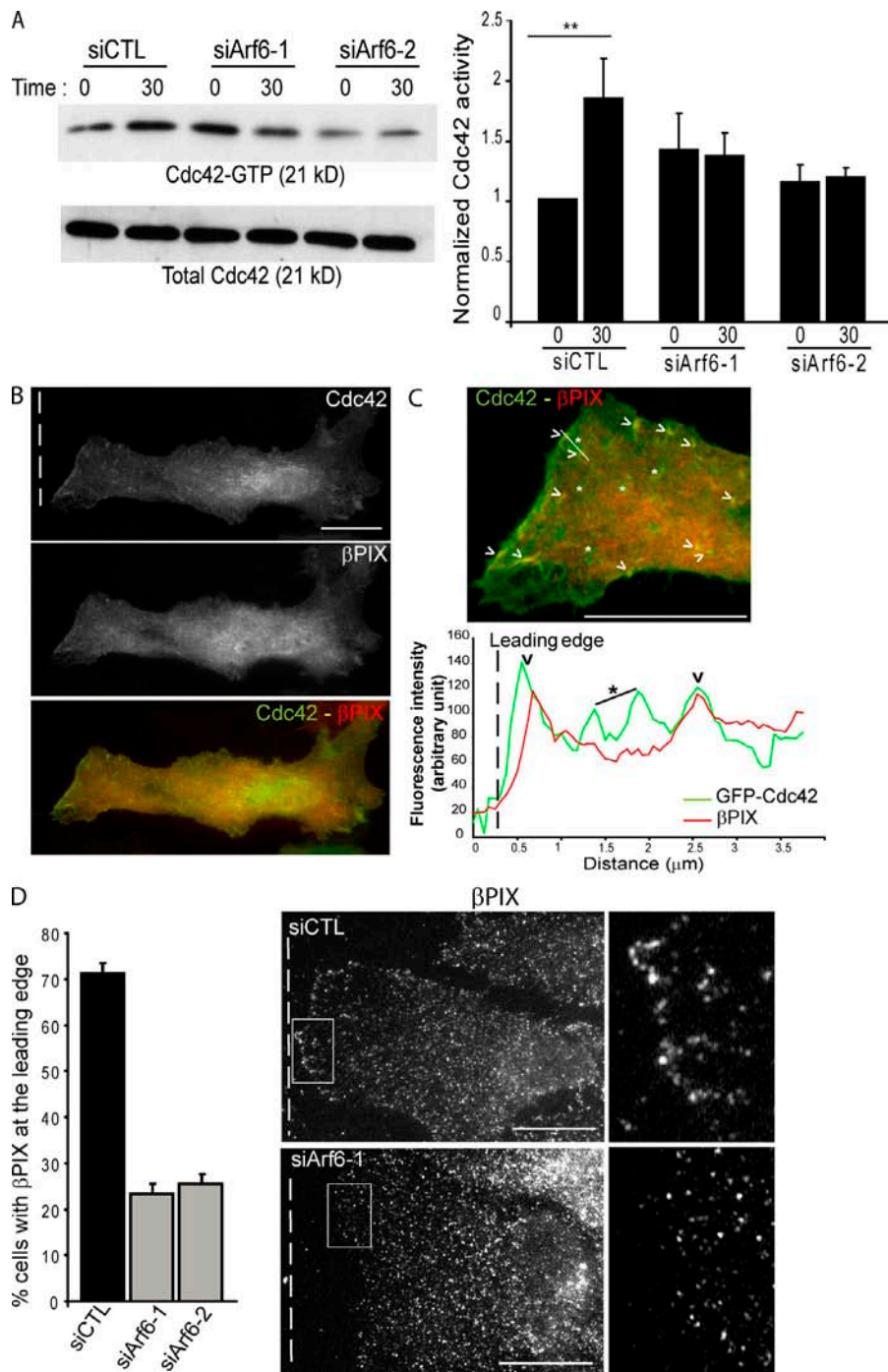
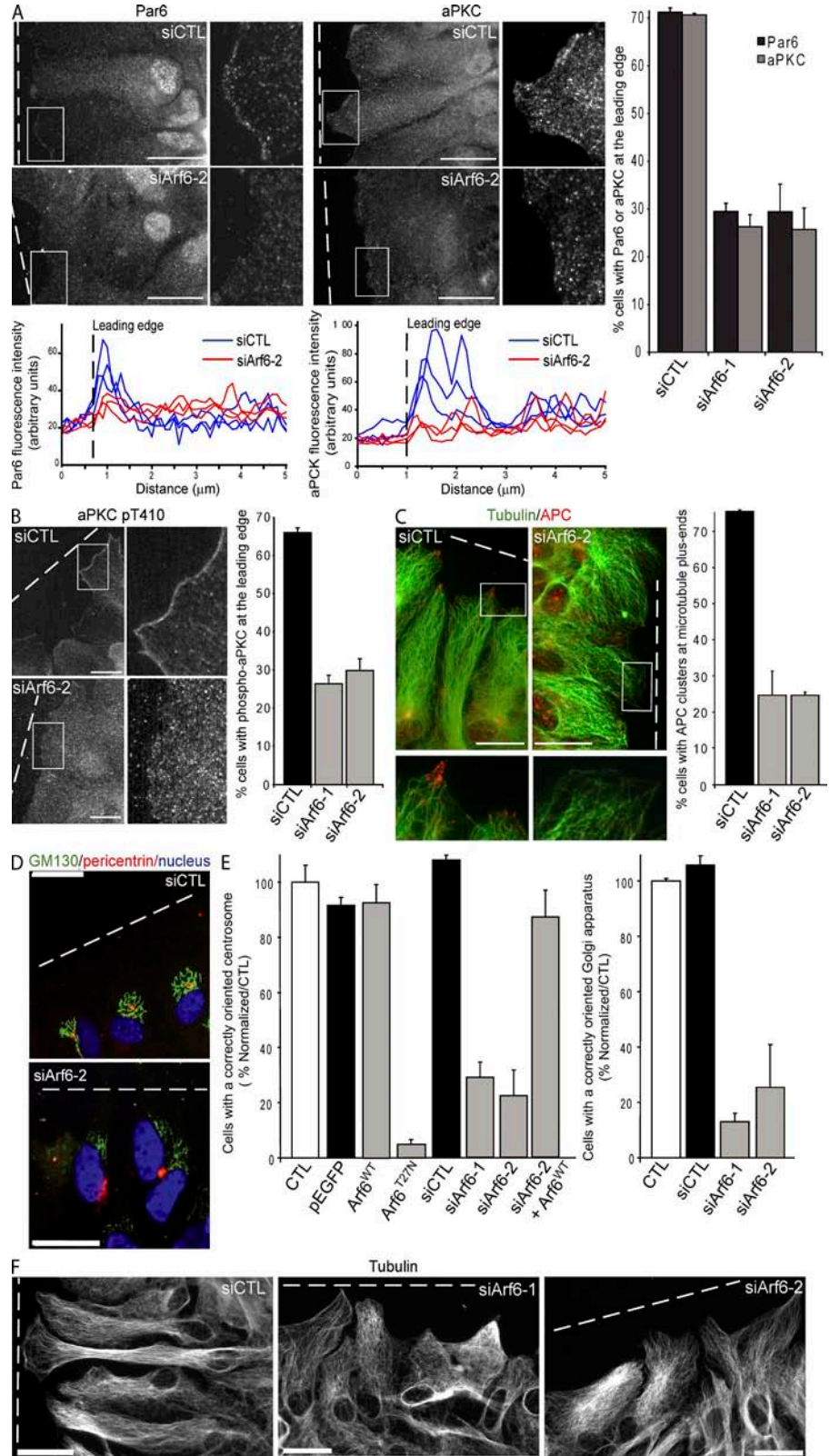


Figure 3. Arf6 controls the localization of the Cdc42-GEF β PIX and Cdc42 activation upon wounding. (A) Wound-induced Cdc42 activation in cells nucleofected with the indicated siRNA. (left) Western blots showing a representative experiment. (right) Histogram showing the quantitative measurement of Cdc42 activity. Values are normalized by the Cdc42 activity observed in the control condition (siCTL, time 0). **, $P = 0.01$. (B) Colocalization of GFP-Cdc42 (green) and HA- β PIX (red) in a migrating astrocyte. (C) Magnified view of the front edge area of the cell shown in B. Arrowheads point to regions showing colocalization of GFP-Cdc42 and HA- β PIX. Fluorescence intensities of GFP-Cdc42 (green) and HA- β PIX (red) along the line drawn in the image show the colocalization of Cdc42 and β PIX at the leading edge and on some of the Cdc42-positive vesicles. Large Cdc42-positive vesicles (asterisks) are usually not stained with the anti- β PIX antibody. (D) β PIX recruitment to the leading edge of astrocytes nucleofected with the indicated siRNA. (left) The percentage of cells with a leading edge accumulation of β PIX. (right) Representative images of β PIX immunofluorescence in cells nucleofected with the indicated siRNA. Higher magnification views of the boxed regions are shown. Dotted lines indicate the direction of the wound. Data are shown as mean \pm SEM of three independent experiments totalizing >300 cells. Bars, 10 μ m.

Hall, 2001). However, although Rac depletion totally abolished astrocyte protrusion and migration, Arf6 depletion only had a moderate effect. Protrusions in Arf6-depleted cells were shorter (Figs. 2 F and 4 F), and cell migration was 20–25% slower than in control cells (Fig. S1 E and Videos 6 and 7). We found that Arf6 and β PIX were required for Rac accumulation at the leading edge of migrating astrocytes (Fig. S3). However, in contrast with Cdc42 (Osmani et al., 2006), Rac recruitment did not involve β PIX catalytic activity but required the SH3 domain of β PIX (Fig. S3; Cau and Hall, 2005; Mott et al., 2005; ten Klooster et al., 2006). We could not detect any change in Rac activity levels after Arf6 depletion.

These observations suggest that, in absence of polarized recruitment to the leading edge, Rac activity, although not sufficient to promote a fully developed protrusion, can sustain cell migration. These observations suggest that Arf6-dependent vesicular traffic promotes β PIX accumulation at the leading edge, which is required for Cdc42 accumulation and activation and for Rac accumulation, whereas Rac activity is regulated by another GEF. Several GEFs including Tiam1 and Dock180 may be involved in Rac activation at the leading edge (Santy et al., 2005; Pegtel et al., 2007). By controlling both cell polarization via Cdc42 and cell protrusion via Rac and PAK, Arf6 emerges as a crucial regulator of

Figure 4. Arf6 controls the Cdc42-mediated polarity signaling pathway and cell orientation during migration. Astrocytes were nucleofected with the indicated siRNA or microinjected with the indicated constructs. (A) Immunostaining of Par6 and aPKC in migrating astrocytes 4 h after wounding. (right) Higher magnification views of the boxed regions are shown. Graphs plotting the fluorescence intensity of Par6 and aPKC measured along lines drawn perpendicularly to the leading edge of three different siCTL (blue)- and siArf6-2 (red)-transfected cells are shown below the corresponding images. Histogram showing the percentage of wound-edge cells with a leading edge accumulation of Par6 (black bars) and aPKC (gray bars). (B) Immunostaining of Thr⁴¹⁰-phosphorylated aPKC in control or Arf6-depleted astrocytes 4 h after wounding. (right) Higher magnification views of the boxed areas are shown. The histogram shows the percentage of cells with an accumulation of phospho-aPKC at the leading edge. (C) Immunostaining of APC (red) and tubulin (green) in migrating astrocytes 8 h after wounding. (right) Histogram shows the percentage of wound-edge cells with APC clusters at microtubule plus ends. (D) Fluorescence images of the microtubules (green), centrosome (red), and nucleus (blue) in nucleofected migrating astrocytes 8 h after wounding. (E) Centrosome and Golgi reorientation 8 h after wounding. (F) Immunostaining of tubulin in migrating astrocytes 16 h after wounding. Data are shown as mean \pm SEM of three independent experiments totalizing >300 cells. The dotted lines indicate the direction of the wound. Bars, 10 μ m.



directed cell migration, further emphasizing its critical role in tumor invasion.

Collectively, our results show that membrane dynamics plays a key role in cell polarization and migration by promoting Cdc42 delivery to the leading edge of cells. Evidence is

accumulating for a role of Cdc42 in endocytosis and may support the hypothesis of a Cdc42-driven feedback loop enhancing Cdc42 accumulation at the leading edge, similar to the role of actin-based membrane delivery of Cdc42 in polarized yeast cells (Wedlich-Soldner et al., 2004).

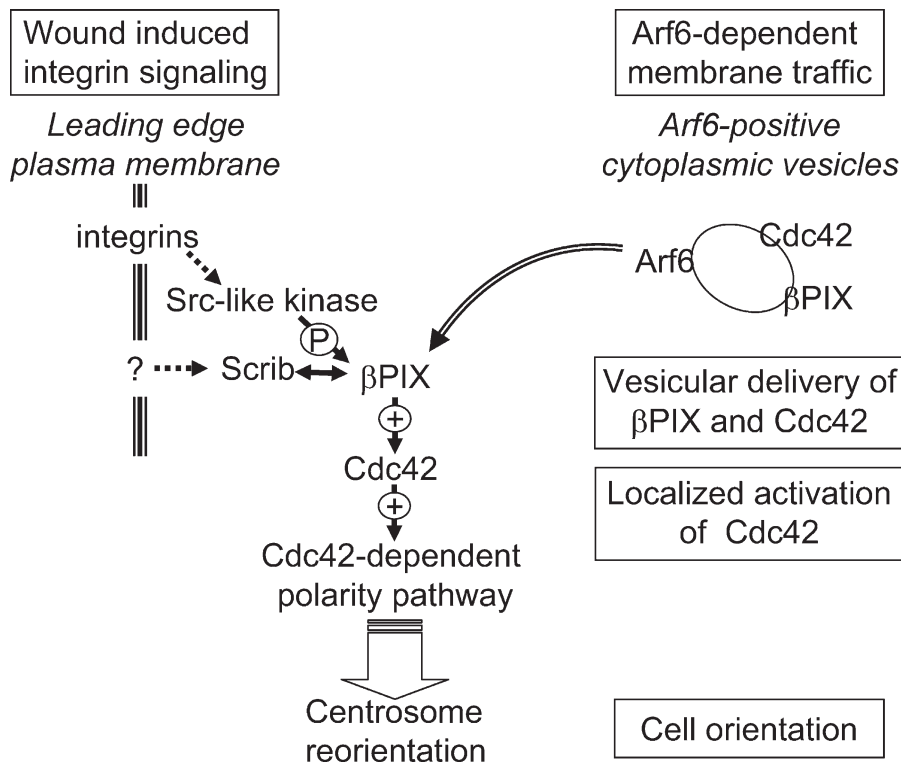


Figure 5. Arf6-dependent membrane traffic and wound-induced integrin engagement control Cdc42 activation at the wound edge. Cdc42 accumulation and activation at the wound edge result from wound-induced integrin signaling (Etienne-Manneville and Hall, 2001) and Arf6-dependent vesicular delivery of Cdc42 and its GEF β PIX. We propose that β PIX interaction with Scrib (Osmani et al., 2006) and phosphorylation by Src (Feng et al., 2006) at the wound edge promotes β PIX GEF activity toward Cdc42 and thus leads to the generation of a Cdc42-mediated polarity signal that involves Par6, aPKC, and APC (Etienne-Manneville and Hall, 2003).

Materials and methods

Materials

Anti- α -tubulin was obtained from Sigma-Aldrich, phalloidin-rhodamine from Invitrogen, anti-pericentrin from BabCO, anti-GM130, anti-EEA1, and anti-Rac1 from BD, anti-Arf6 from AbCam, anti-Cdc42, anti-Par6, and anti-PKC ζ from Santa Cruz Biotechnology, Inc., anti-PKC ζ pT410 from Cell Signaling Technology, and anti- β PIX from Millipore. Anti-APC was provided by I. Näthke (University of Dundee, Dundee, Scotland, UK). Secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. pEGFP-Cdc42, β PIX, and Arf6 constructs were previously described (Osmani et al., 2006). Two siRNA duplexes corresponding to rat Arf6 starting at nucleotides 76 (siArf6-2) and 143 (siArf6-1; GenBank/EMBL/DBJ accession no. NM_024152) were obtained from Prologo. The sequence of the siArf6-2 did not match the corresponding human sequence allowing expression of a human Arf6 construct. siRNAs were introduced into cells by nucleofection according to the vendor's instructions (Lonza).

Cell culture and scratch-induced migration

Primary rat astrocytes were prepared as described previously (Etienne-Manneville, 2006). For scratch-induced assays, cells were seeded on poly-L-ornithine-coated coverslips or 90-mm diameter dishes and grown to confluence in MEM medium supplemented with 10% serum. Individual wounds (suitable for microinjection and immunofluorescence; \sim 300- μ m wide) were made with a microinjection needle. Wound closure occurred \sim 16–24 h later. Multiple wounds (suitable for subsequent biochemical analysis) were made with an eight-channel pipette (0.1–2- μ l tips) that was moved several times across the 90-mm dish. Nuclear microinjections in the first row of wound-edge cells were performed immediately after scratching. Expression vectors were used at 100–400 μ g/ml.

Immunofluorescence and image quantification

Cells were stained as described previously (Etienne-Manneville, 2006). Epifluorescence images of fixed cells mounted in Mowiol (Polysciences, Inc.) were obtained on a microscope (DM6000; Leica) equipped with 40 \times 1.25 NA and 63 \times 1.4 NA objectives and were recorded on a charge-coupled device (CCD) camera (DFC350 FX; Leica) using Application Suite AF software (Leica). Images were also obtained with the fast spinning-disk confocal system (UltraView RS Nipkow-disk; PerkinElmer) equipped with 40 \times 1.4 NA and 63 \times 1.4 NA objectives and recorded on an electron-multiplying CCD camera (C-9100; Hamamatsu Photonics).

Live cell imaging

Videos 1–7 were acquired at the Plateforme d'Imagerie Dynamique at the Pasteur Institute. Cells or nucleofected cells were seeded on 35-mm glass-bottom dishes (MaTek) and grown to confluence. The monolayer was wounded, and cells were microinjected with pEGFP-Cdc42. 6 h later, cells were imaged at 37°C in MEM culture medium supplemented with 20 mM Hepes using either a fast spinning-disk confocal system (UltraView RS Nipkow-disk) equipped with 40 \times 1.4 NA and 63 \times 1.4 NA objectives and recorded on an electron-multiplying CCD camera (C-9100) or a CCD camera (ORCA II ER; Hamamatsu Photonics) installed on a microscope (Axiovert 200M; Carl Zeiss, Inc.) equipped with 10 \times 0.45 NA, 40 \times 1.4 NA, and 63 \times 1.4 NA objectives.

Centrosome and Golgi apparatus reorientation and cell protrusion

Centrosome and Golgi apparatus reorientation was determined as previously described (Etienne-Manneville, 2006). In brief, 8 h after wounding, astrocytes were fixed and stained with anti-pericentrin (centrosome), anti-GM130 (Golgi apparatus), Hoechst (nucleus), and anti-Myc when necessary. Cells in which the centrosome was within the quadrant facing the wound (\pm 45° deviation from the direction perpendicular to the wound) or cells in which the Golgi apparatus was within \pm 60° from the direction perpendicular to the wound were scored as positive. For each point, at least 300 cells from three independent experiments were examined. Because random polarization is 25% for the centrosome and 33% for the Golgi apparatus in our assay, data were normalized to control conditions by subtracting random orientation (25% for centrosome reorientation or 33% for Golgi apparatus reorientation) and by setting reorientation to 100% for cells treated by a control siRNA against GFP (siGFP).

Protrusion formation was determined as described previously (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Etienne-Manneville, 2006). In brief, 16 h after wounding, astrocytes were fixed and stained with anti- α -tubulin. Cells that were at least four times longer than wide were scored as positive.

Protein localization

Cdc42 localization. Microinjection of GFP-tagged Cdc42 WT was used for visualization of Cdc42 because of the lack of anti-Cdc42 antibodies that work in immunofluorescence. The percentage of cells showing an increased GFP fluorescence at the leading edge was determined 4 h after wounding (unless otherwise stated).

β PIX, Par6, or aPKC localization. 4 h after wounding, cells were fixed and stained with the appropriate antibody. For the scoring of polarized protein recruitment, cells in which the protein was specifically enriched at

the leading edge were counted as positive. Relative fluorescence intensity was measured at the leading edge using ImageJ software (National Institutes of Health) in three different cells from three independent experiments. In the case of GFP-Cdc42, fluorescence intensity was measured in three different areas of the same cell leading edge.

In general, only very few migrating astrocytes show membrane ruffling at the leading edge. However, to avoid artifacts from increased fluorescence caused by membrane ruffling, these cells were not included in the analysis.

APC localization. 8 h after wounding, cells were fixed and stained with APC and tubulin antibodies. The percentage of cells showing APC clusters at microtubule tips of the leading edge was measured.

Cdc42 activity

Cells were washed with ice-cold PBS and lysed at 4°C in RIPA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM MgCl₂, 1 mM orthovanadate, and protease inhibitors cocktail [Roche]). GTP-bound Cdc42 was affinity purified using GST-PAK-CRIB attached to glutathione Sepharose beads (GE Healthcare). Proteins were eluted with SDS sample buffer and analyzed by 15% SDS-PAGE and anti-Cdc42 Western blotting.

Online supplemental material

Fig. S1 shows the depletion of Arf6 by siRNA and its consequences on Golgi structure, focal adhesion localization, and cell migration. Fig. S2 shows that Cdc42 localization at the leading edge is independent of Rac activity. Fig. S3 shows that Arf6 and βPIX are involved in Rac recruitment to the leading edge. Videos 1–3 and 5 show spinning-disc imaging of GFP-Cdc42 dynamics in migrating (Videos 1 and 2), nonmigrating (Video 3), and Arf6-depleted astrocytes (Video 5). Video 4 shows phase-contrast images of membrane dynamics at the leading edge of migrating astrocytes. Videos 6 and 7 show phase-contrast images of control and Arf6-depleted astrocytes. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201003091/DC1>.

We thank Inke Näthke, Nicolas Vitale, and W.M. Bement for reagents and constructs and the Imaging Platform at Institut Pasteur for technical help.

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche, the Institut Pasteur, and La Ligue contre le Cancer. N. Osmani is funded by the Association pour la Recherche sur le Cancer. S. Etienne-Manneville is a member of the European Molecular Biology Organization Young Investigator Programme.

Submitted: 19 March 2010

Accepted: 22 November 2010

References

- Adams, A.E., D.I. Johnson, R.M. Longnecker, B.F. Sloat, and J.R. Pringle. 1990. CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 111:131–142. doi:10.1083/jcb.111.1.131
- Albertinazzi, C., L. Za, S. Paris, and I. de Curtis. 2003. ADP-ribosylation factor 6 and a functional PIX/p95-APP1 complex are required for Rac1B-mediated neurite outgrowth. *Mol. Biol. Cell.* 14:1295–1307. doi:10.1091/mbc.E02-07-0406
- Allen, W.E., D. Zicha, A.J. Ridley, and G.E. Jones. 1998. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J. Cell Biol.* 141:1147–1157. doi:10.1083/jcb.141.5.1147
- Balasubramanian, N., D.W. Scott, J.D. Castle, J.E. Casanova, and M.A. Schwartz. 2007. Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nat. Cell Biol.* 9:1381–1391. doi:10.1038/ncb1657
- Cau, J., and A. Hall. 2005. Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J. Cell Sci.* 118:2579–2587. doi:10.1242/jcs.02385
- Caviston, J.P., S.E. Tcheperegine, and E. Bi. 2002. Singularity in budding: a role for the evolutionarily conserved small GTPase Cdc42p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:12185–12190. doi:10.1073/pnas.182370299
- Cotton, M., P.L. Boulay, T. Houndolo, N. Vitale, J.A. Pitcher, and A. Claing. 2007. Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Mol. Biol. Cell.* 18:501–511. doi:10.1091/mbc.E06-06-0567
- D'Souza-Schorey, C., and P. Chavrier. 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:347–358. doi:10.1038/nrm1910
- D'Souza-Schorey, C., E. van Donselaar, V.W. Hsu, C. Yang, P.D. Stahl, and P.J. Peters. 1998. ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane:

insights from an ultrastructural investigation. *J. Cell Biol.* 140:603–616. doi:10.1083/jcb.140.3.603

- Daher, Z., J. Noël, and A. Claing. 2008. Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. *Cell. Signal.* 20:2256–2265. doi:10.1016/j.cellsig.2008.08.021
- Di Cesare, A., S. Paris, C. Albertinazzi, S. Dariozzi, J. Andersen, M. Mann, R. Longhi, and I. de Curtis. 2000. p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin. *Nat. Cell Biol.* 2:521–530. doi:10.1038/35019561
- Erickson, J.W., C. Zhang, R.A. Kahn, T. Evans, and R.A. Cerione. 1996. Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 271:26850–26854. doi:10.1074/jbc.271.43.26850
- Etienne-Manneville, S. 2004. Cdc42—the centre of polarity. *J. Cell Sci.* 117:1291–1300. doi:10.1242/jcs.01115
- Etienne-Manneville, S. 2006. In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. *Methods Enzymol.* 406:565–578. doi:10.1016/S0076-6879(06)06044-7
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell.* 106:489–498. doi:10.1016/S0092-8674(01)00471-8
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 420:629–635. doi:10.1038/nature01148
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2003. Cdc42 regulates GSK-3β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature.* 421:753–756. doi:10.1038/nature01423
- Etienne-Manneville, S., J.B. Manneville, S. Nicholls, M.A. Ferenczi, and A. Hall. 2005. Cdc42 and Par6–PKCζ regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J. Cell Biol.* 170:895–901. doi:10.1083/jcb.200412172
- Farooqui, R., S. Zhu, and G. Fenteany. 2006. Glycogen synthase kinase-3 acts upstream of ADP-ribosylation factor 6 and Rac1 to regulate epithelial cell migration. *Exp. Cell Res.* 312:1514–1525. doi:10.1016/j.yexcr.2006.01.018
- Feng, Q., D. Baird, X. Peng, J. Wang, T. Ly, J.L. Guan, and R.A. Cerione. 2006. Cool-1 functions as an essential regulatory node for EGF receptor- and Src-mediated cell growth. *Nat. Cell Biol.* 8:945–956. doi:10.1038/ncb1453
- Georgiou, M., E. Marinari, J. Burden, and B. Baum. 2008. Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr. Biol.* 18:1631–1638. doi:10.1016/j.cub.2008.09.029
- Hehny, H., K.M. Longhini, J.L. Chen, and M. Stammes. 2009. Retrograde Shiga toxin trafficking is regulated by ARHGAP21 and Cdc42. *Mol. Biol. Cell.* 20:4303–4312. doi:10.1091/mbc.E09-02-0155
- Hoefen, R.J., and B.C. Berk. 2006. The multifunctional GIT family of proteins. *J. Cell Sci.* 119:1469–1475. doi:10.1242/jcs.02925
- Hu, B., B. Shi, M.J. Jarzynka, J.J. Yiin, C. D'Souza-Schorey, and S.Y. Cheng. 2009. ADP-ribosylation factor 6 regulates glioma cell invasion through the IQ-domain GTPase-activating protein 1-Rac1-mediated pathway. *Cancer Res.* 69:794–801. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2110
- Johnson, D.I. 1999. Cdc42: an essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:54–105.
- Li, Z., M. Hannigan, Z. Mo, B. Liu, W. Lu, Y. Wu, A.V. Smrcka, G. Wu, L. Li, M. Liu, et al. 2003. Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell.* 114:215–227. doi:10.1016/S0092-8674(03)00559-2
- Li, M., S.S. Ng, J. Wang, L. Lai, S.Y. Leung, M. Franco, Y. Peng, M.L. He, H.F. Kung, and M.C. Lin. 2006. EFA6A enhances glioma cell invasion through ADP ribosylation factor 6/extracellular signal-regulated kinase signaling. *Cancer Res.* 66:1583–1590. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2424
- Manneville, J.B., M. Jehanno, and S. Etienne-Manneville. 2010. Dlg1 binds GKAP to control dynein association with microtubules, centrosome positioning, and cell polarity. *J. Cell Biol.* 191:585–598. doi:10.1083/jcb.201002151
- Matafora, V., S. Paris, S. Dariozzi, and I. de Curtis. 2001. Molecular mechanisms regulating the subcellular localization of p95-APP1 between the endosomal recycling compartment and sites of actin organization at the cell surface. *J. Cell Sci.* 114:4509–4520.
- Michaelson, D., J. Silletti, G. Murphy, P. D'Eustachio, M. Rush, and M.R. Philips. 2001. Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J. Cell Biol.* 152:111–126. doi:10.1083/jcb.152.1.111
- Mott, H.R., D. Nietlispach, K.A. Evetts, and D. Owen. 2005. Structural analysis of the SH3 domain of beta-PIX and its interaction with alpha-p21 activated kinase (PAK). *Biochemistry.* 44:10977–10983. doi:10.1021/bi050374a
- Nalbant, P., L. Hodgson, V. Kraynov, A. Touchkine, and K.M. Hahn. 2004. Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science.* 305:1615–1619. doi:10.1126/science.1100367

- Nern, A., and R.A. Arkowitz. 2000. Nucleocytoplasmic shuttling of the Cdc42p exchange factor Cdc24p. *J. Cell Biol.* 148:1115–1122. doi:10.1083/jcb.148.6.1115
- Nobes, C., and M. Marsh. 2000. Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? *Curr. Biol.* 10:R739–R741. doi:10.1016/S0960-9822(00)00736-3
- Osmani, N., N. Vitale, J.P. Borg, and S. Etienne-Manneville. 2006. Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration. *Curr. Biol.* 16:2395–2405. doi:10.1016/j.cub.2006.10.026
- Palacios, F., and C. D'Souza-Schorey. 2003. Modulation of Rac1 and ARF6 activation during epithelial cell scattering. *J. Biol. Chem.* 278:17395–17400. doi:10.1074/jbc.M300998200
- Palazzo, A.F., T.A. Cook, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2001. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Biol.* 3:723–729. doi:10.1038/35087035
- Park, H.O., and E. Bi. 2007. Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:48–96. doi:10.1128/MMBR.00028-06
- Pegtel, D.M., S.I. Ellenbroek, A.E. Mertens, R.A. van der Kammen, J. de Rooij, and J.G. Collard. 2007. The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity. *Curr. Biol.* 17:1623–1634. doi:10.1016/j.cub.2007.08.035
- Peters, P.J., V.W. Hsu, C.E. Ooi, D. Finazzi, S.B. Teal, V. Oorschot, J.G. Donaldson, and R.D. Klausner. 1995. Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J. Cell Biol.* 128:1003–1017. doi:10.1083/jcb.128.6.1003
- Radhakrishna, H., and J.G. Donaldson. 1997. ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J. Cell Biol.* 139:49–61. doi:10.1083/jcb.139.1.49
- Rodal, A.A., R.N. Motola-Barnes, and J.T. Littleton. 2008. Nervous wreck and Cdc42 cooperate to regulate endocytic actin assembly during synaptic growth. *J. Neurosci.* 28:8316–8325. doi:10.1523/JNEUROSCI.2304-08.2008
- Sabe, H. 2003. Requirement for Arf6 in cell adhesion, migration, and cancer cell invasion. *J. Biochem.* 134:485–489. doi:10.1093/jb/mvg181
- Santy, L.C., and J.E. Casanova. 2001. Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J. Cell Biol.* 154:599–610. doi:10.1083/jcb.200104019
- Santy, L.C., K.S. Ravichandran, and J.E. Casanova. 2005. The DOCK180/Elmo complex couples ARNO-mediated Arf6 activation to the downstream activation of Rac1. *Curr. Biol.* 15:1749–1754. doi:10.1016/j.cub.2005.08.052
- Shimada, Y., M.P. Gullii, and M. Peter. 2000. Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat. Cell Biol.* 2:117–124. doi:10.1038/35000073
- Slaughter, B.D., A. Das, J.W. Schwartz, B. Rubinstein, and R. Li. 2009. Dual modes of cdc42 recycling fine-tune polarized morphogenesis. *Dev. Cell.* 17:823–835. doi:10.1016/j.devcel.2009.10.022
- Svensson, H.G., M.A. West, P. Mollahan, A.R. Prescott, R. Zaru, and C. Watts. 2008. A role for ARF6 in dendritic cell podosome formation and migration. *Eur. J. Immunol.* 38:818–828. doi:10.1002/eji.200737331
- ten Klooster, J.P., Z.M. Jaffer, J. Chernoff, and P.L. Hordijk. 2006. Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor β -Pix. *J. Cell Biol.* 172:759–769. doi:10.1083/jcb.200509096
- Torii, T., Y. Miyamoto, A. Sanbe, K. Nishimura, J. Yamauchi, and A. Tanoue. 2010. Cytohesin-2/ARNO, through its interaction with focal adhesion adaptor protein paxillin, regulates preadipocyte migration via the downstream activation of Arf6. *J. Biol. Chem.* 285:24270–24281. doi:10.1074/jbc.M110.125658
- Wedlich-Soldner, R., S. Altschuler, L. Wu, and R. Li. 2003. Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase. *Science.* 299:1231–1235. doi:10.1126/science.1080944
- Wedlich-Soldner, R., S.C. Wai, T. Schmidt, and R. Li. 2004. Robust cell polarity is a dynamic state established by coupling transport and GTPase signaling. *J. Cell Biol.* 166:889–900. doi:10.1083/jcb.200405061
- Wu, W.J., J.W. Erickson, R. Lin, and R.A. Cerione. 2000. The gamma-subunit of the coatomer complex binds Cdc42 to mediate transformation. *Nature.* 405:800–804. doi:10.1038/35015585

N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration

Emeline Camand¹, Florent Peglion¹, Naël Osmani^{1,*}, Marc Sanson^{2,3} and Sandrine Etienne-Manneville^{1,‡}

¹Institut Pasteur–CNRS URA 2582, Cell Polarity, Migration and Cancer Unit, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris CEDEX 15, France

²UMR975, Hôpital de la Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 75013 France

³Service de Neurologie Mazarin, Hôpital de la Salpêtrière, Paris, 75013 France

*Present address: Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch CEDEX, France

‡Author for correspondence (sandrine.etienne-manneville@pasteur.fr)

Accepted 23 September 2011

Journal of Cell Science 125, 1–14

© 2012. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.087668

Summary

Perturbation of cell polarity is a hallmark of cancer cells. In carcinomas, loss of epithelial E-cadherin contributes to the loss of cell polarity and promotes epithelial–mesenchymal transition and carcinoma infiltration. However, the contribution of classical cadherins to the development of non-epithelial tumours is less well documented. We investigated the impact of the level of N-cadherin expression on the polarity and migration of normal and tumour glial cells. Low levels of N-cadherin were frequently observed in human glioma samples and purified glioma cells. Using a wound-healing assay, we show that a decreased level of N-cadherin promotes a faster and less-directed migration both in normal and tumour cells. N-cadherin-mediated contacts control cell velocity and polarity through the regulation of focal adhesions. In cells expressing low levels of N-cadherin, small focal adhesions are present at the entire cell periphery of confluent cells and are not affected by wounding of the cell monolayer. Under these conditions, wound-induced integrin-mediated recruitment of the small GTPase Cdc42, activation of the Cdc42-mediated polarity pathway and centrosome reorientation do not occur. Re-expression of N-cadherin in gliomas restores cell polarity and strongly reduces cell velocity, suggesting that loss of N-cadherin could contribute to the invasive capacity of tumour astrocytes.

Key words: N-cadherin, Astrocyte, Glioma, Cell migration, Cell polarity

Introduction

Malignant gliomas are the most common and lethal primary intracerebral tumours in adults. They comprise a group of different kinds of tumours arising within the central nervous system and sharing characteristics with glial cells, namely astrocytes, oligodendrocytes or their precursors (Jung et al., 2010; Nishiyama et al., 1989; Prestegarden et al., 2010). Gliomas are currently classified by the World Health Organization (WHO) into four grades, where grade I comprises benign tumours and grade IV are the highly malignant tumours, also called glioblastomas, that are the most frequent (Kleihues et al., 1993; Louis et al., 2007). Glioblastomas are characterized by extensive genetic alterations, frequently including amplification of the gene encoding the epidermal growth factor receptor (EGFR) and loss of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) activity, both promoting invasion (McLendon et al., 2008). While systemic metastases are rare, these cancers show an aggressive progression, characterized by widespread invasion throughout the brain parenchyma and resistance to classical therapeutic approaches (Giese, 2003). As a consequence, one major challenge is to prevent cell detachment and tumour spreading from the original tumour site.

Cell surface adhesion molecules are the principal mediators of interaction between cells and are thus likely to be key players in tumour spreading. Classical cadherins are Ca²⁺-dependent

transmembrane cell-adhesion molecules, which mediate homophilic interaction between adjacent cells and display tissue-specific expression (Angst et al., 2001; Takeichi, 1990). E-cadherin and N-cadherin are the best studied of these molecules and are, respectively, mainly expressed in epithelial and neural tissues (Hatta and Takeichi, 1986). Defects in the expression or function of cadherins have been implicated in carcinoma progression and metastasis (Makrilia et al., 2009). Loss of E-cadherin is observed, most often associated with an up-regulation of N-cadherin, which has, in this situation, a pro-migratory effect (Hazan et al., 2004). In gliomas, no obvious scenario has emerged on the basis of N-cadherin protein levels, and the role of N-cadherin in glioma cell migration is still unknown (Asano et al., 2004; Asano et al., 2000; Foty and Steinberg, 2004; Hegedus et al., 2006; Shinoura et al., 1995; Utsuki et al., 2002). We have recently shown that N-cadherin is a key regulator in the polarity of non-migrating astrocytes (Dupin et al., 2009). As loss of cell polarity is a common characteristic of tumour cells, we wondered whether alteration of N-cadherin levels in gliomas impacts on polarity and migration, a fundamentally polarized process.

To investigate how N-cadherin-mediated junctions could modulate cell migration, we used an *in vitro* wound-healing assay that induces a collective, directed migration (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Faber-Elman et al., 1996; Nobes and

Hall, 1999). In this model, we and others have shown that primary astrocytes undergo a highly polarized migration, perpendicularly oriented to the scratch (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Peng et al., 2008). Astrocyte polarization and migration are initiated by integrin engagement with the extracellular matrix at the wound edge of the cell. We show here that glioblastoma cells are unable to polarize and display a faster and less-directed migration in this assay. We also demonstrate that N-cadherin-mediated junctions contribute to the polarization and directed migration of astrocytes and that decreased N-cadherin expression is, at least partly, responsible for the abnormal migratory behaviour of glioblastoma cells. We attribute this role of N-cadherin to its regulatory function on focal adhesions and to the subsequent alteration of the integrin-dependent Cdc42 activity and polarity pathway. Our work broadens the role of N-cadherin in cell polarity and supports the idea that a decrease in N-cadherin levels contributes to the invasive capacity of astrocytic tumours.

Results

N-cadherin protein levels are often downregulated in glioma cells

Although sometimes contradictory, evidence showing changes in N-cadherin levels in gliomas is accumulating (Asano et al., 2004; Asano et al., 1997; Utsuki et al., 2002). We analyzed N-cadherin levels in normal and glioma samples by western blots. Quantitative western blotting comparing normal brain samples and high-grade gliomas showed a significant twofold decrease in N-cadherin expression in glioblastomas (Fig. 1A,B). To confirm the decrease in N-cadherin expression, we used purified tumour cells from tumour samples (G3-1, G4-1 and G4-2), as well as two different cell lines derived from human gliomas of different grades, the U138 (glioblastoma) and the U373 (astrocytoma, grade III) cells (Ponten and Macintyre, 1968). N-cadherin levels were variable but generally lower in tumour cells than in control astrocytes (Fig. 1C,E). Quantification showed a decrease of $91\% \pm 3.5$ in the U138 cells and of $77\% \pm 7$ in the U373 cells in the N-cadherin level compared with normal primary astrocytes (Fig. 1E). Diminution of N-cadherin protein levels was not associated with an increase in the expression of other classical cadherins, such as E-cadherin (supplementary material Fig. S1).

The decrease in N-cadherin expression was confirmed by immunofluorescence. In primary glioma cells (Fig. 1D) and glioma cell lines (Fig. 1F; supplementary material Fig. S2), N-cadherin staining appeared discontinuous, leaving empty spaces between adjacent cells. By contrast, in normal astrocytes, N-cadherin accumulated in regions of cell–cell contacts, forming a continuous line of adherens junctions between adjacent cells (Fig. 1F; supplementary material Fig. S2). Together, these results suggest that N-cadherin levels and adherens junctions are frequently downregulated in high-grade gliomas.

Decreased N-cadherin expression in primary astrocytes and glioma cells leads to a faster and less-directed migration

We next investigated whether differences in N-cadherin expression levels correlated with variations in the characteristics of cell migration. Wounding of a monolayer of primary rat astrocytes (see supplementary material Movie 1) induces a slow, cohesive and directed migration (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Nobes and Hall, 1999). In the same

assay, the trajectories of U373 and U138 glioma cells were longer, and less directed, than those of normal astrocytes, with cells often turning around or changing direction during migration (Fig. 1G). We also observed that, in contrast to normal astrocytes, glioma cells often escaped the monolayer and migrated as individual cells. U138 cells also showed a loss of contact inhibition and often migrated on top of one another without stopping or changing direction following contact (see supplementary material Movies 2, 3). As glioma cells divide more frequently than normal astrocytes and tend to form very dense monolayers, we tested whether the level of confluence was responsible for their high velocity and their non-persistent migration. Non-confluent U373 migrated faster and less persistently than in confluent culture conditions (Fig. 2A,B), suggesting that confluence acts as a brake rather than a driving force for glioma cell migration.

The extensive genetic alterations that characterize gliomas limit their direct comparison with normal astrocytes (McLendon et al., 2008). To overcome this problem and determine the specific contribution of N-cadherin in cell migration, we used a siRNA approach to reduce N-cadherin levels in glioma cells and primary astrocytes. Downregulation of N-cadherin in U373 cells led to a faster and less-persistent migration, similar to that of U138 (Fig. 2A–C). In primary astrocytes, two different sequences induced, respectively, a $93\% \pm 5.5$ and a $94\% \pm 4$ reduction of N-cadherin protein levels (Fig. 2D). Downregulation of N-cadherin in primary astrocytes increased cell velocity and decreased migration persistence, reminiscent of that of glioma cells (Fig. 2A,B). Adherens junctions were severely reduced but not totally absent from N-cadherin-depleted astrocytes. Cell–cell contacts were less stable, and, upon wounding, the front rows of N-cadherin-depleted cells often detached from the monolayer and migrated as isolated cells (supplementary material Movie 4). However, N-cadherin-depleted astrocytes did not migrate as fast as glioma cells and still exhibited contact inhibition, suggesting that loss of N-cadherin strongly perturbs cell migration but also that additional alterations of the tumour cells contribute to their abnormal migration.

We conclude that N-cadherin participates in the regulation of the speed and direction of glial cell migration and that low N-cadherin levels in glioma cells promote a faster and less-directed migration and might ultimately strongly influence the invasive behaviour of glioblastomas. This correlation between a low N-cadherin level and faster and less-persistent migration led us to investigate whether and how N-cadherin levels might affect cell migration.

N-cadherin is required for astrocyte polarization during migration

To better characterize the migration defects observed in cells expressing low levels of N-cadherin, we analyzed the intracellular organization of the cytoskeleton. Directed astrocyte migration is associated with the formation of an elongated protrusion in the direction of migration that corresponds to the polarized reorganization of the actin and microtubule cytoskeletons (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Osmani et al., 2006). By contrast, U373 and U138 cells formed short and unstable protrusions. In glioma cell lines, the actin and microtubule networks did not show a polarized organization (Fig. 3A). Similar alterations were observed in N-cadherin-depleted astrocytes (Fig. 3A). Thus, we further analyzed the

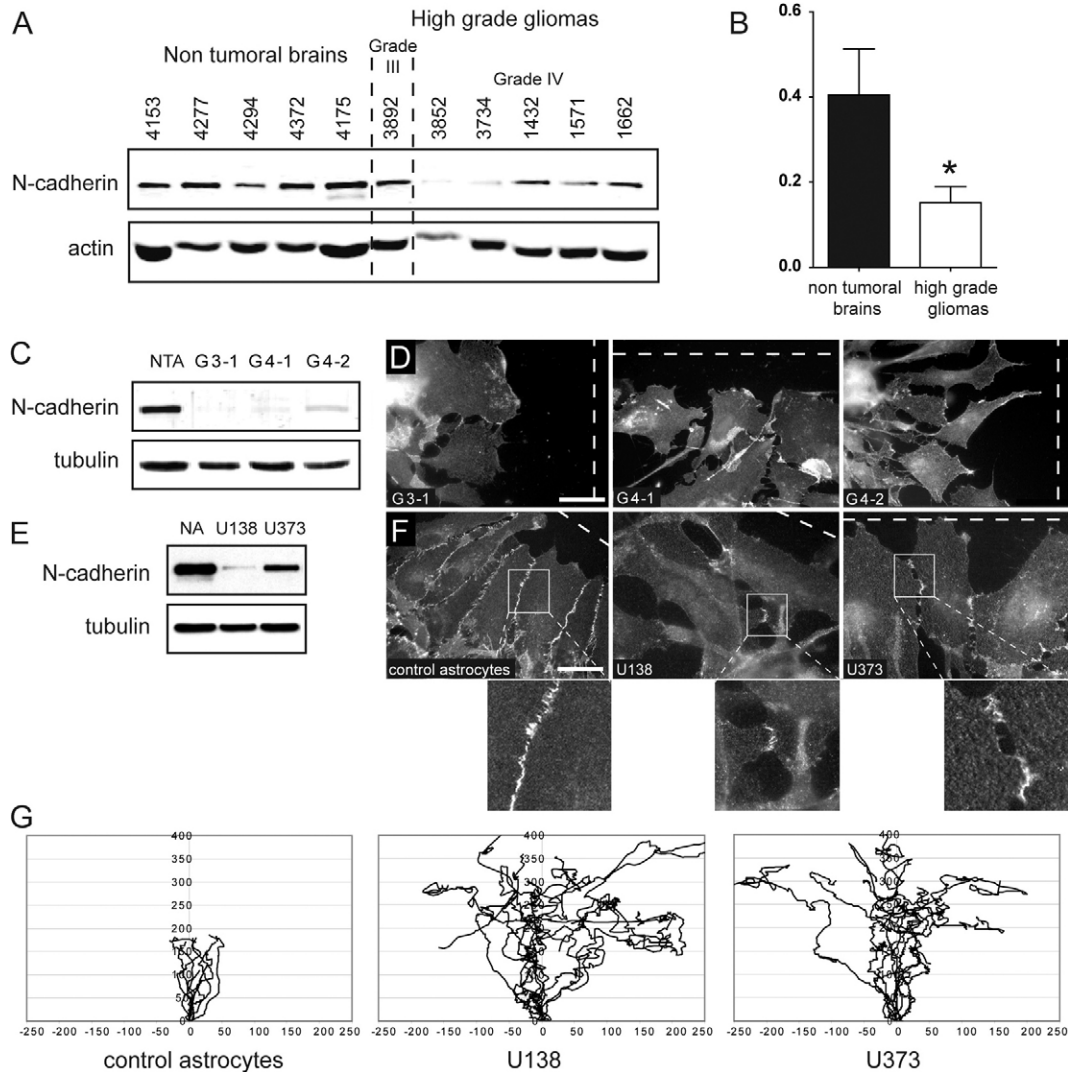


Fig. 1. Downregulation of N-cadherin protein levels in glioma cell lines correlates with nondirected migration. (A) Anti-N-cadherin and anti- β -actin western blot analysis of total protein extracts from primary high-grade gliomas and control brain samples. (B) Quantification of fluorescence intensity after N-cadherin western blotting indicates a threefold decrease of N-cadherin protein levels in glioblastomas compared with normal brain (Student's *t*-test, $*P < 0.05$). (C) Anti-N-cadherin and anti- β -tubulin western blot analysis of total protein extracts from non-tumoural astrocytes (NTAs) and three cell lines (G3-1, G4-1 and G4-2) established from human fresh tissue samples. N-cadherin protein levels are strongly decreased in the three cell lines in comparison with non-tumoural astrocytes. (D) Immunofluorescence images showing N-cadherin localization in fresh tissue-sample-derived cells revealing that they form almost no contacts with one another. The broken lines show the position of the wound. (E) Anti-N-cadherin and anti- β -tubulin western blot analysis of total protein extracts from primary astrocytes (NA), U138 and U373 cell lines. U138 cells show only faint N-cadherin protein levels, whereas diminution in U373 cells is less important. (F) Immunofluorescence images showing N-cadherin localization in migrating control astrocytes, U138 and U373 cells. The two cell lines exhibit only small areas with intercellular contacts. Thick broken lines show the position of the wound. The lower panels show a high magnification of the boxed areas in the images above. Image contrasts have been adjusted to render N-cadherin staining visible in all cell types. Non-modified images can be seen in supplementary material Fig. S2. (G) Diagrams representing the migration trajectories covered in 36 hours of ten representative cells in primary rat astrocytes (supplementary material Movie 1), U138 and U373 glioma cell lines (supplementary material Movies 2 and 3). Scale bars: 35 μ m for control astrocytes, G3-1, G4-1 and G4-2 and 25 μ m for U373 and U138 cells.

impact of N-cadherin levels on glial cell polarization. The relative position of the centrosome, which is also the microtubule-organizing centre (MTOC), and the nucleus is a good indicator of cell polarity. In migrating astrocytes, the centrosome and the Golgi apparatus localize in front of the nucleus in the direction of migration (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Etienne-Manneville et al., 2005). Reorientation of the centrosome and the Golgi apparatus was strongly perturbed in both glioma cell lines (Fig. 3B). However, U373 cells, which

express a higher level of N-cadherin than U138, were less affected than U138 (41% vs 30%; $P < 0.05$) (Fig. 3C). We then tested whether changes in N-cadherin expression levels could affect glioma cell polarity. Increased downregulation of the level of N-cadherin in U373 cells by siRNA further altered centrosome reorientation in these cells, whereas control siRNA had no effect (Fig. 3C). Interestingly, only 31% of N-cadherin-depleted U373 cells had a correctly oriented centrosome. This percentage was similar to that of U138 cells and not statistically different from

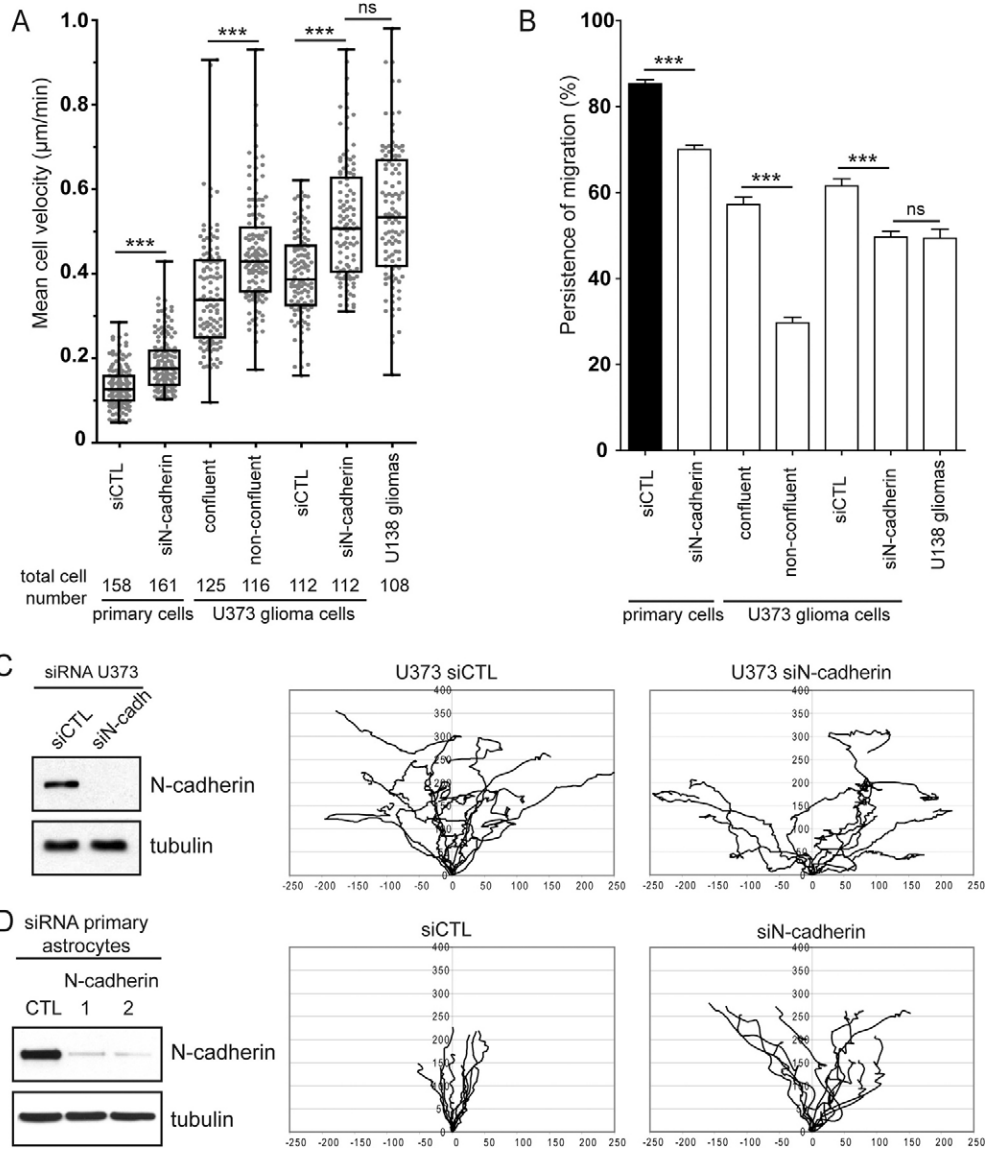


Fig. 2. Loss of N-cadherin in primary astrocytes and glioma cells leads to a faster and less-directed migration. (A) Box-and-whisker plots overlaid with the mean velocity obtained for each tracked cell. The boxes represent the 25th and 75th percentile of the data, and the line bisecting the box corresponds to the median ($***P < 0.001$; ns, nonsignificant). N-cadherin depletion in primary astrocytes, as well as in U373 glioma cells, leads to an increase in cell velocity. U138 glioma cells, showing the lower levels of N-cadherin, are the faster ones. Non-confluent culture conditions for U373 cells also increases their average velocity. (B) Histogram showing the persistence of migration expressed as a percentage. It represents the ratio between the vectorial distance and the mean distance (see Materials and Methods) ($***P < 0.001$). N-cadherin depletion in primary astrocytes, as well as in U373 glioma cells, induces a less-persistent migration of the cells in one given direction. The least-persistent migration is observed in non-confluent culture conditions. (C) Anti-N-cadherin and anti- β -tubulin western blot analysis of total protein extracts from U373 cells after control (CTL) or N-cadherin-specific siRNA nucleofection (siN-cadh). The diagrams represent the migration trajectories covered in 36 hours of ten representative cells in U373 cells nucleofected with control or N-cadherin siRNA. (D) Anti-N-cadherin and anti- β -tubulin western blot analysis of total protein extracts from primary astrocytes after control (CTL) or N-cadherin-specific siRNA nucleofection. The diagrams represent the migration trajectories covered in 36 hours of ten representative cells in primary astrocytes nucleofected with control or N-cadherin siRNA (supplementary material Movie 4).

25%, which corresponds to a totally random centrosome orientation. In normal astrocytes, depletion of N-cadherin and Ca^{2+} depletion, which prevents cadherin-mediated intercellular contacts, also profoundly altered centrosome reorientation (Fig. 3C). Taken together, these results show that the level of expression of N-cadherin is a crucial parameter in the control of polarity in normal astrocytes and in glioma cells.

N-cadherin-mediated contacts control the turnover of focal adhesions and spatially restrict their engagement to the leading edge

During wound healing, astrocyte polarization and directed migration are totally dependent on integrin engagement at the wound edge of the cells (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Peng et al., 2008). Localized integrin signalling leads to the

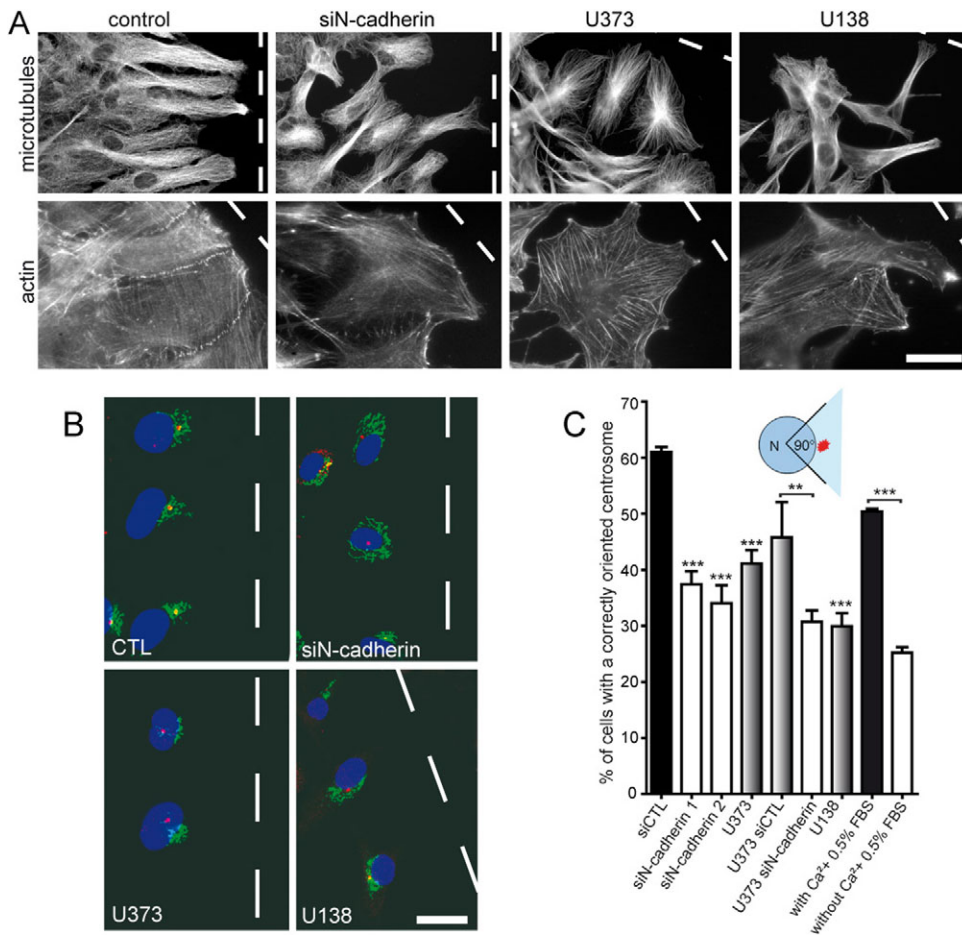


Fig. 3. N-cadherin is required for astrocyte polarization during migration.

(A) Anti- α -tubulin and phalloidin stainings 8 hours after scratching showing the organization of microtubule and actin networks in control astrocytes (CTL), N-cadherin-depleted astrocytes (siN-cadherin), U373 and U138 glioma cells.

(B) Immunofluorescence images showing anti-pericentrin (red, centrosome) and anti-GM130 (green, Golgi apparatus) immunostaining associated with Hoechst staining (blue, nucleus).

(C) Histogram showing the percentage of cells with a correctly oriented centrosome 8 hours after wounding in each culture condition. Centrosomes located within the quadrant facing the wound, in front of the nucleus, were scored as correctly oriented (see Materials and Methods). For each time-point and each experimental condition, a minimum of 100 cells was scored. Results are shown as means \pm s.e.m. of 3–5 independent experiments (** $P < 0.001$; * $P < 0.01$). Scale bars: 35 μ m (upper panel) and 20 μ m (lower panel) in A and 30 μ m in B. The broken line shows the position of the wound.

polarized recruitment of the small GTPases Cdc42 and Rac (Osmani et al., 2010; Osmani et al., 2006), two major regulators of the microtubule and actin cytoskeletons and crucial modulators of the speed and direction of cell migration (Frame and Brunton, 2002; Watanabe et al., 2005).

In order to determine whether N-cadherin-reduced expression could influence cell–matrix adhesion, we first examined the distribution of focal adhesions in basal conditions without any scratch (Fig. 4A,B). Immunofluorescence staining for paxillin, a major component of the integrin-mediated signalling pathway, showed that non-confluent glioma cells had a significantly higher number of focal adhesions than normal astrocytes (Fig. 4A,C) and that the mean size of these focal adhesions was smaller (Fig. 4D). Depletion of N-cadherin in astrocytes was sufficient to induce a strong increase in focal adhesion number, as well as a decrease in focal adhesion size (Fig. 4A,C,D). These effects were not due to a difference in cell size (Fig. 4E). These observations suggest that N-cadherin levels influence the formation of focal adhesions in non-confluent cells.

When confluent, control astrocytes were strongly adhesive with one another, and few focal adhesions were detectable using paxillin staining (Fig. 4B). By contrast, numerous focal adhesions were visible in glioma cells as well as in confluent N-cadherin-depleted astrocytes (Fig. 4B), suggesting that N-cadherin-mediated contacts prevent formation of focal adhesions.

In control primary astrocytes, scratching induced a major increase in the number of focal adhesions at the wounded edge (Fig. 4F). Just after wounding, paxillin was essentially

cytoplasmic, with very few detectable focal contacts. One hour after wounding, paxillin localized in focal adhesions that accumulated at the front edge of the cells and were polarized in the direction of the wound (Fig. 4G). As reported previously (Borghini et al., 2010; Dupin et al., 2009), paxillin and N-cadherin stainings in normal astrocytes showed a mutual exclusion between focal adhesions and adherens junctions (Fig. 5A), confirming the inhibitory role of cadherin-mediated contacts on formation of focal adhesions. By contrast, focal adhesions were present at the entire periphery of glioma cells prior to wounding, and the distribution of focal adhesions was not modified in response to the wound and showed no preferential localization regarding the wound orientation (Fig. 4G). N-cadherin depletion in astrocytes strongly affected wound-induced formation of focal adhesions at the wound edge. As in glioma cells, the number and localization of focal adhesions did not significantly change following wounding (Fig. 4F,G). Focal adhesions were found at the front as well as the back of the cells and were not excluded from regions of cell–cell contacts (Fig. 5A). We conclude that reduction of N-cadherin levels and inhibition of N-cadherin-mediated contacts strongly affects the distribution of focal adhesions and prevents wound-induced formation of focal adhesions at the wound edge of the cells.

N-cadherin is involved in the decrease of Src inhibitory phosphorylation on Y529 in response to the wound

Downstream of integrins, activation of Src-like kinases is required for polarized migration of astrocytes (Etienne-Manneville and

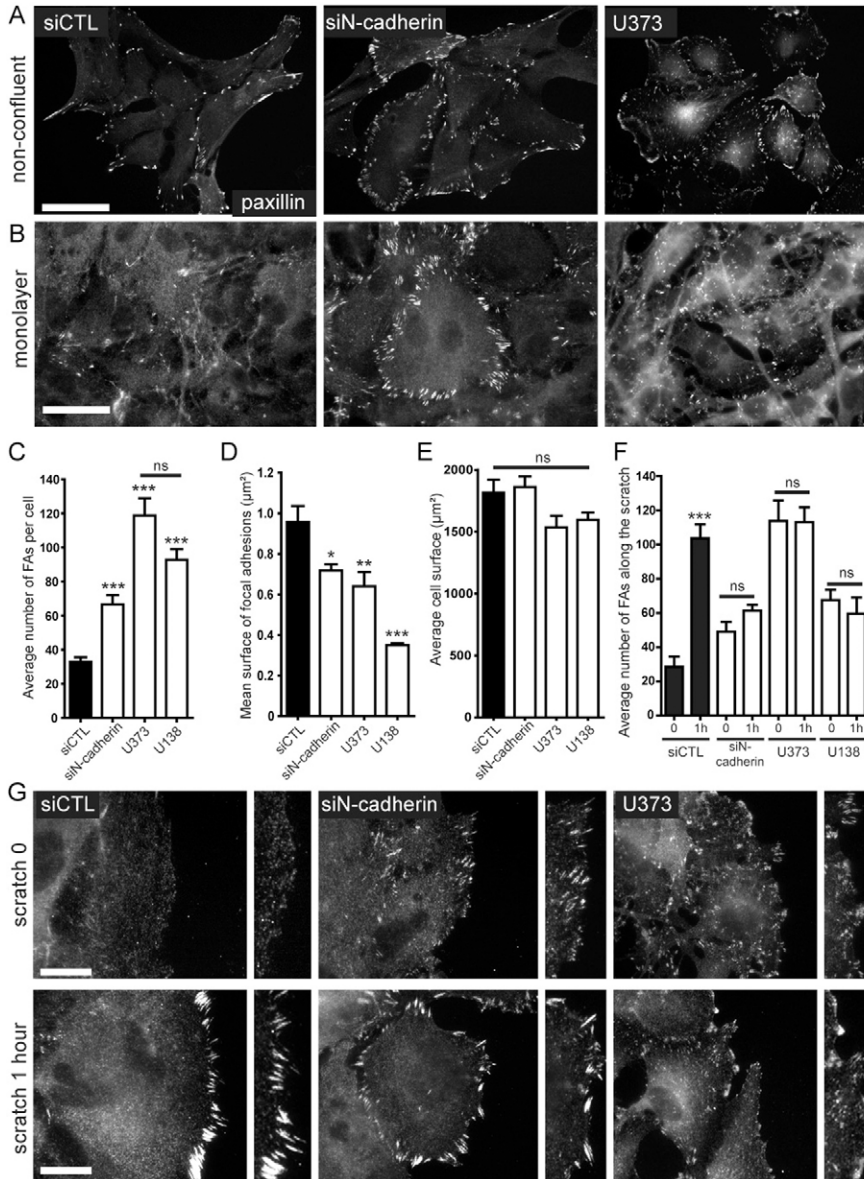


Fig. 4. N-cadherin is involved in the control of the formation of focal adhesions and of their spatial restriction in response to the wound. (A,B) Paxillin immunostaining in control astrocytes (siCTL), N-cadherin-depleted astrocytes (siN-cadherin) and U373 glioma cells. Cells were fixed without scratching under non-confluent conditions (A) or confluent conditions (B; monolayer). (C) Histogram showing the average number of focal adhesions (FAs) in each indicated cell type based on paxillin immunostaining under non-confluent conditions (***) $P < 0.001$; ns, nonsignificant). (D) Histogram showing, for each indicated cell type, the mean surface occupied by focal adhesions based on paxillin immunostaining under non-confluent conditions for each cell type (***) $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$). (E) Histogram showing, in each indicated cell type, the average surface occupied by individual cells under non-confluent conditions (ns, nonsignificant). (F) Histogram showing the average number of focal adhesions (FAs) at the leading edge of wounded cells, just after (time 0) or one hour after the scratch (time 1h), in each indicated cell type (***) $P < 0.001$; ns, nonsignificant). (G) Paxillin immunostaining in control astrocytes (siCTL), N-cadherin-depleted astrocytes (siN-cadherin) and U373 glioma cells. Cells were fixed and stained just after (scratch 0) or one hour (scratch 1h) after scratching. The small panels on the right of each image show a high magnification of the front edge of the cells. Scale bars, 20 µm in A and G and 35 µm in B. The broken line shows the position of the wound.

Hall, 2001). In particular, the activity of Src, a tyrosine kinase activated following integrin engagement (Guarino, 2010), is tightly regulated by its phosphorylation state on two principal tyrosine residues, the activating Y418 and the inhibiting Y529. Both phosphorylations have been shown to be involved in the turnover of focal adhesions and tumour invasion (Guarino, 2010).

Although we could not detect a significant increase in Y418 phosphorylation, Src Y529 phosphorylation was strongly decreased during the first hour following wounding of control astrocytes (Fig. 5B). Double phospho-Src Y529 and paxillin staining showed that the dephosphorylation of Src Y529 was concentrated at the leading front of migrating astrocytes (Fig. 5C) and suggested that decreased phosphorylation was associated with focal adhesion formation and signalling. In N-cadherin-depleted astrocytes and in glioma cells, Src Y529 phosphorylation did not decrease following wounding and even increased during this time (Fig. 5B). Moreover, phosphorylated

Src Y529 was found in most focal adhesions, irrespective of the wound orientation (Fig. 5C). These results indicate that N-cadherin-mediated contacts are required to restrict integrin-mediated signalling in time and space.

N-cadherin-mediated contacts are required for integrin-mediated recruitment of β PIX at the leading edge

Upon wounding, the Rho guanine nucleotide exchange factor 7 (hereafter referred to as β PIX) is recruited to the wound edge of astrocytes, where it induces Cdc42 and Rac recruitment and activates Cdc42 to promote cell polarization and migration (Osmani et al., 2006). β PIX is known to interact with focal adhesion proteins (Frank and Hansen, 2008) and to be activated by Src (Feng et al., 2010).

Cell treatment with a cyclic RGD peptide to block integrin engagement with the extracellular matrix and the phosphatase PP2, a specific inhibitor of Src-like protein kinases, significantly decreased β PIX recruitment to the leading edge (Fig. 6A),

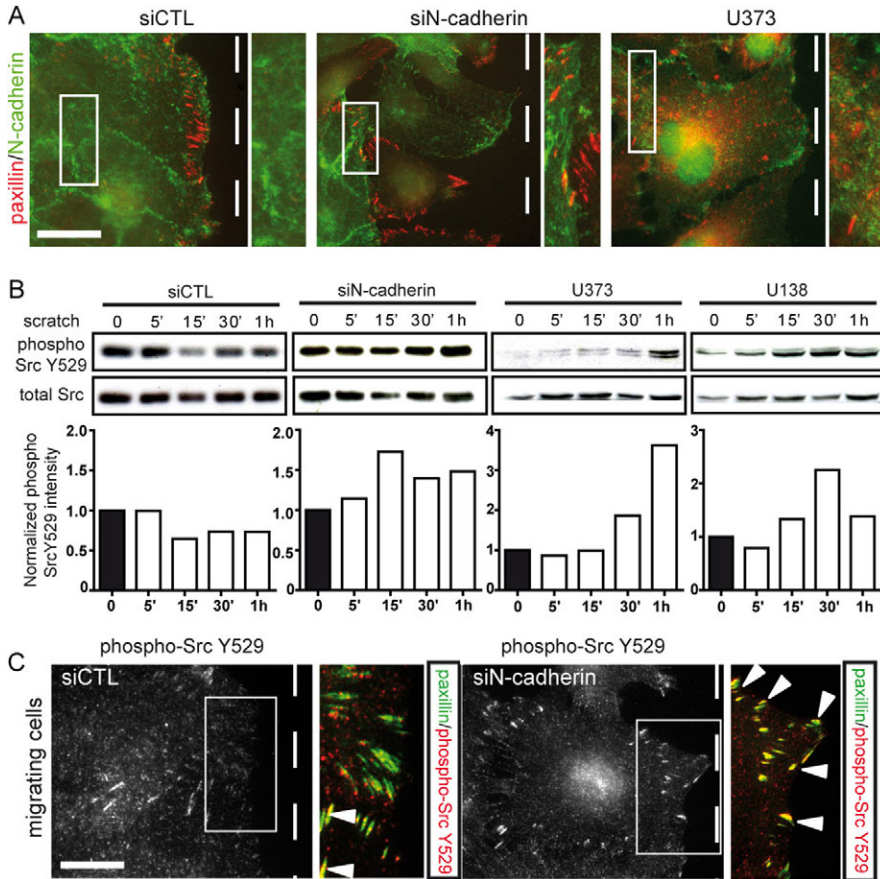


Fig. 5. N-cadherin is involved in the diminution of Src-inhibitory phosphorylation on tyrosine 529 in response to the wound. (A) Paxillin and N-cadherin double immunostaining one hour after scratching in control astrocytes (siCTL), N-cadherin-depleted astrocytes (siN-cadherin) and U373 glioma cells. The broken lines show the position of the wound. The small panels show a high magnification of the rear of the cells (bottom panel). The contrast of the images has been modified so as to compare the different culture conditions. See supplementary material Fig. S2 for unmodified contrast. (B) Anti-phospho-Src Y529 and anti-Src western blot analysis of total protein extracts from control astrocytes (siCTL), N-cadherin-depleted astrocytes (siN-cadherin), U373 and U138 glioma cells at the indicated time after scratching. The quantification is shown beneath each corresponding blot. (C) Specific phospho-Src Y529 immunostaining in control astrocytes (siCTL) and N-cadherin-depleted astrocytes (siN-cadherin) while migrating 8 hours after the scratch. The broken lines show the position of the wound. The two small panels show a high magnification of paxillin (green) and phospho-Src Y529 (red) immunostaining at the leading edge. Scale bars: 20 μ m in A and 15 μ m in C.

showing that wound-induced integrin signalling is required for leading edge recruitment of β PIX in migrating astrocytes. As N-cadherin depletion impaired wound-induced integrin engagement, we asked whether it consequently affected integrin-mediated β PIX recruitment at the cell leading edge. The percentage of cells

exhibiting β PIX immunofluorescence at the wound edge was significantly reduced in N-cadherin-depleted astrocytes compared with control cells (Fig. 6A–C). Similarly, the localization of β PIX at the leading edge of U138 and U373 cells was barely detectable (Fig. 6B,C).

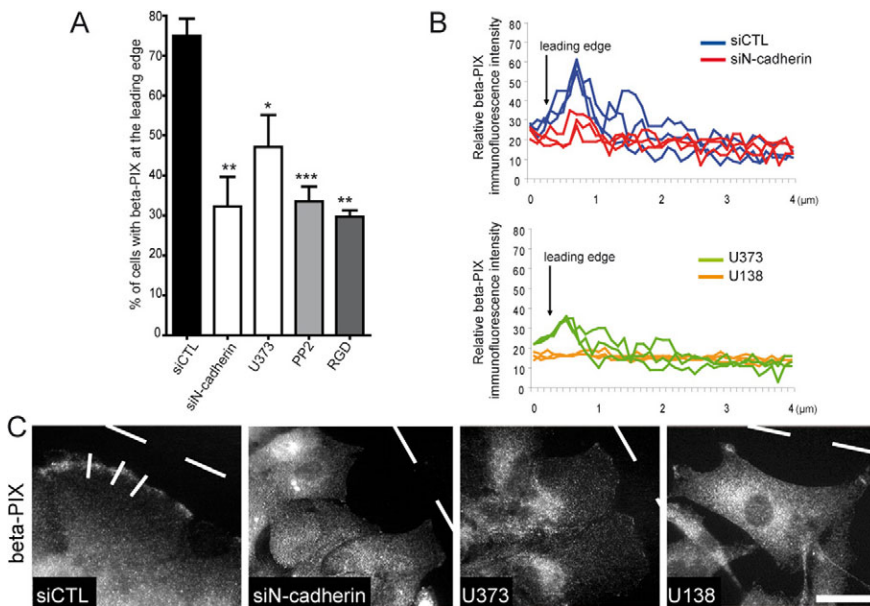


Fig. 6. N-cadherin-mediated contacts are required for integrin-mediated recruitment of β PIX at the leading edge. (A) Histogram showing the percentage of cells with β PIX immunofluorescence at the leading edge in the different culture conditions. PP2 is an inhibitor of Src-like tyrosine kinases, and cyclic RGD peptide specifically inhibits integrin engagement with the extracellular matrix (** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$). (B) Graphs showing, for each indicated cell type, three representative profiles corresponding to β PIX fluorescence intensity along three different lines across the cell edges. (C) β PIX immunostaining 4 hours after scratching in control astrocytes (siCTL), N-cadherin-depleted astrocytes (siN-cadherin), U373 and U138 glioma cells. Scale bar: 30 μ m. The broken line shows the position of the wound.

Wound-induced Cdc42 polarized activation and Cdc42-dependent polarity pathway are altered in N-cadherin-depleted astrocytes and glioma cell lines

The role of N-cadherin in the regulation of focal adhesions and β PIX recruitment to the wounded cell front prompted us to test whether N-cadherin levels could modulate the regulation of the β PIX target Cdc42 (Feng et al., 2004; Osmani et al., 2006). Cdc42 is an evolutionarily conserved regulator of cell polarity (Etienne-Manneville, 2004) and plays a key role in astrocyte polarization and directed migration (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Osmani et al., 2006). During wound healing, β PIX activates and recruits Cdc42 at the leading edge (Cau and Hall, 2005; Etienne-Manneville and Hall, 2001; Osmani et al., 2006; Shen et al., 2008).

Astrocytes of the migrating front were microinjected with a GFP-tagged wild-type Cdc42 construct. Upon wounding, GFP-Cdc42 was recruited to the cell leading edge of control astrocytes (Fig. 7A,B), as previously described (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Osmani et al., 2006). GFP-Cdc42 was cytosolic and also associated with the Golgi apparatus and perinuclear membranes (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Michaelson et al., 2001; Osmani et al., 2006). In migrating U138 and U373 cells, GFP-Cdc42 was still present on intracellular membranes but was not enriched at the leading edge of the cells (Fig. 7A,B). Similarly, N-cadherin depletion in primary astrocytes did not affect Cdc42 localization on perinuclear membranes but prevented GFP-Cdc42 recruitment to the cell leading edge (Fig. 7A,B). This inhibition of Cdc42 recruitment was not due to the alteration of membrane protrusion as we have previously shown that the recruitment of Cdc42 at the leading edge was independent of cell protrusion (Osmani et al., 2010).

We then used a pulldown assay to assess Cdc42 activation following wounding. Scratch-induced activation of Cdc42 was dramatically reduced in U138 and U373 cells as well as in N-cadherin-depleted astrocytes (Fig. 7C). Despite the different expression level of N-cadherin between U373 and U138, we could not detect any difference between these cells in the regulation of Cdc42 localization and activity in response to wounding. The low N-cadherin levels observed in U373 might not be sufficient to generate a wound-induced signal. It is also possible that our detection methods are not sensitive enough to detect a limited Cdc42 activation. However, these results show that N-cadherin is required for integrin- and β PIX-mediated activation and recruitment of Cdc42 at the leading edge of migrating astrocytes.

During wound-induced migration, active Cdc42 binds to the Par6-PKC ζ complex to promote PKC ζ activation (Etienne-Manneville and Hall, 2001). In turn, the Par6-PKC ζ complex controls centrosome reorientation by inducing adenomatous polyposis coli (APC) clustering at the plus-end of leading edge microtubules (Etienne-Manneville and Hall, 2003). Par6 and PKC ζ showed a cytoplasmic distribution, with a specific enrichment at the leading edge of control migrating astrocytes (Fig. 8A,B). Par6 was also localized to the nucleus (Fig. 8A), and PKC ζ was also associated with some intercellular contacts (data not shown), as already described for other cell types (Izumi et al., 1998; Manabe et al., 2002). In N-cadherin-depleted astrocytes, U373 and U138 cells, the leading edge recruitment of both Par6 and PKC ζ was strongly perturbed (Fig. 8A,B), and the percentage of cells exhibiting Par6 or PKC ζ immunofluorescence at the leading edge was significantly decreased (Fig. 8C). APC recruitment to leading edge microtubules was strongly reduced in

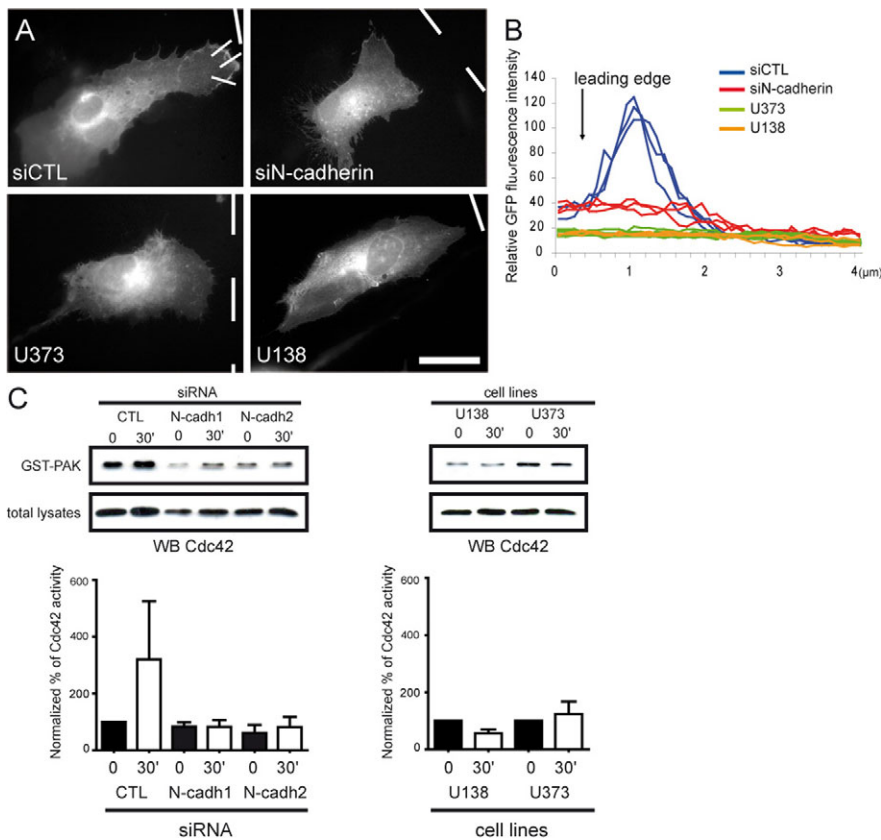


Fig. 7. Scratch-induced recruitment and activation of Cdc42 at the leading edge is lost in N-cadherin-depleted astrocytes and glioma cells.

(A) Microinjection of a GFP-tagged Cdc42 construct reveals the localization of Cdc42 in the different cell types. (B) Three representative intensity profiles corresponding to GFP-Cdc42 fluorescence intensity along three different lines drawn across the cell front edge (as shown in the siCTL panel of A). (C) Western blots showing active Cdc42 (as determined by GST-PAK pulldown assay) and total Cdc42, 0 or 30 minutes after scratching in control and N-cadherin-depleted astrocytes (left panel) and in glioma cell lines (right panel). Histograms represent the normalized Cdc42 activity 0 and 30 minutes after scratching. Results are shown as means \pm s.e.m. of 3–7 independent experiments. Scale bar: 30 μ m in A. The broken line shows the position of the wound.

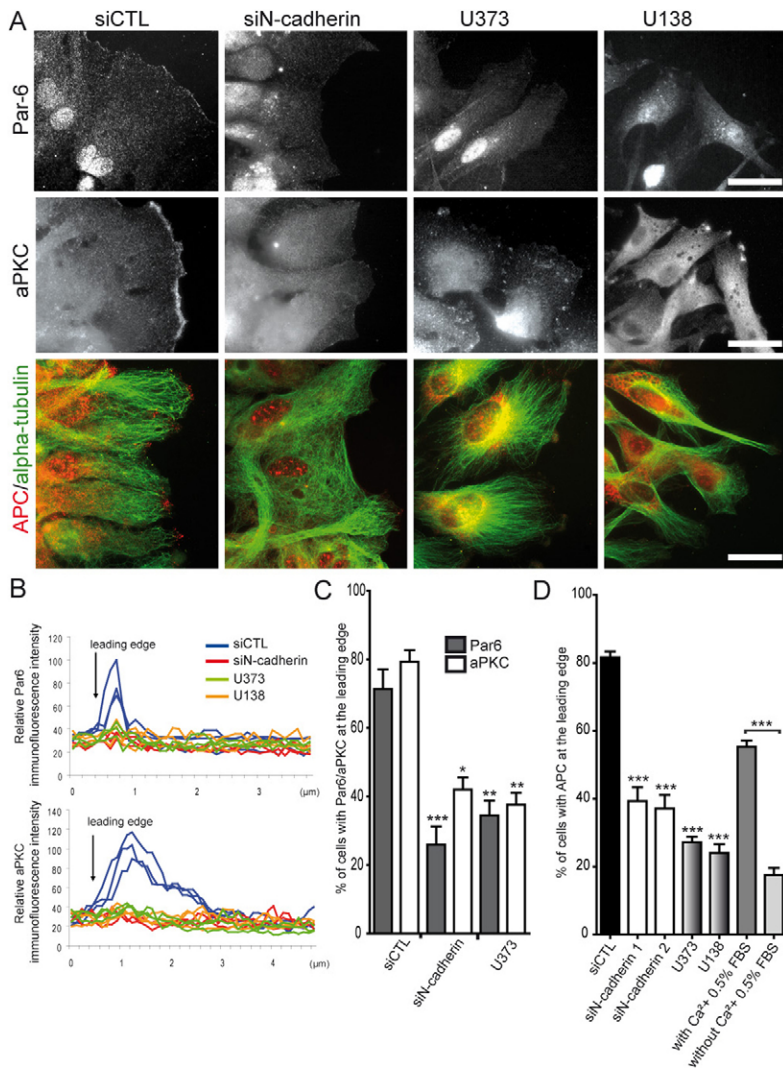


Fig. 8. The Cdc42-dependent polarity pathway is altered in gliomas and N-cadherin-depleted astrocytes. (A) Fluorescence images showing Par6, PKC ζ , as well as APC (red) and α -tubulin (green) immunostaining in control astrocytes (siCTL), N-cadherin-depleted astrocytes and glioma cell lines. (B) Graphs showing, for each indicated cell type, three representative profiles corresponding to Par6 (higher panel) and PKC ζ (lower panel) fluorescence intensity along three different lines across the cell edges. (C) Histogram showing the percentage of migrating cells with an accumulation of Par6 (dark grey) or PKC ζ (white) at the leading edge (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; * $P < 0.05$). (D) Histogram showing the percentage of cells in which APC formed clusters at the plus-ends of leading edge microtubules. This recruitment is lower after N-cadherin depletion or in low-Ca²⁺ culture medium, as well as in U373 cells, than in the control astrocytes. For each time-point and each experimental condition, a minimum of 100 cells were scored. Results are shown as means \pm s.e.m. of three independent experiments (** $P < 0.01$). Scale bars: 25 μ m. The broken line shows the position of the wound.

U373 and U138 as well as after N-cadherin depletion in astrocytes (Fig. 8A,D). This effect was also observed in astrocytes cultured in a Ca²⁺-depleted medium (Fig. 8D). Our results show that N-cadherin-mediated intercellular contacts control the integrin-dependent polarity pathway that regulates centrosome positioning and directed astrocyte migration.

Rescuing N-cadherin expression restores cell polarity and inhibits glial cell migration

As N-cadherin expression appears necessary for wound-induced astrocyte polarization, we investigated whether the absence of N-cadherin was responsible for the altered polarity of glioma cells. We expressed a siRNA-resistant GFP-tagged N-cadherin construct in N-cadherin-depleted cells and glioma cell lines (Fig. 9A). Nucleofection of the GFP vector with control or N-cadherin siRNA had no effect on centrosome reorientation (Fig. 9A,B). By contrast, expression of GFP-N-cadherin in N-cadherin-depleted astrocytes rescued centrosome reorientation, further demonstrating the role of N-cadherin in cell polarity (Fig. 9B). Interestingly, expression of N-cadherin also had a dramatic effect on the polarization of U373 and U138 cells. In both cell lines, wound-induced centrosome reorientation was restored and the percentage of polarized cells was almost the

same as that of normal astrocytes (Fig. 9A,B). These results indicate that a decrease of N-cadherin expression is a major event perturbing polarity during glioma cell migration.

Finally, we wanted to determine whether loss of N-cadherin was responsible for the abnormal migration of glioma cells. We performed live experiments on GFP-tagged N-cadherin-expressing glioma cell lines. Expression of the GFP vector led to slight changes in the average velocity of both glioma cell lines ($0.410 \pm 0.010 \mu\text{m minute}^{-1}$ for U373 GFP and $0.456 \pm 0.016 \mu\text{m minute}^{-1}$ for U138 GFP) (Fig. 9C). These changes might be due to GFP expression, nucleofection itself and/or the selection of a more restricted population of cells in these experiments. We thus compared the migratory behaviour of GFP-expressing glioma cells with that of N-cadherin GFP-expressing glioma cells. We observed that long-term expression of N-cadherin in glioma cells was frequently toxic. We did not investigate the reasons for this toxicity, which seems specific to N-cadherin (data not shown), and suffering cells were excluded from our analysis. We observed that N-cadherin-expressing glioma cells migrated in a limited space area in comparison with their control counterparts (Fig. 9C,D). Interestingly, increased N-cadherin expression in glioma cell lines strongly reduced their mean velocity ($0.318 \pm 0.015 \mu\text{m minute}^{-1}$ for rescue U373 and 0.236 ± 0.023

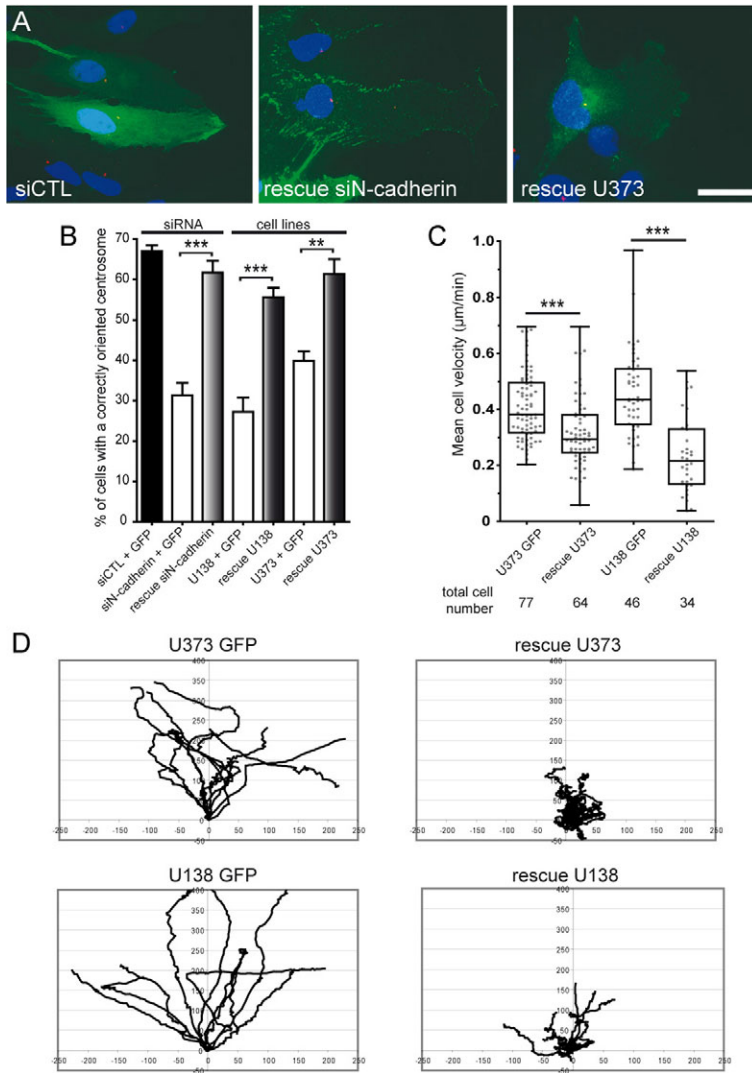


Fig. 9. Exogenous expression of N-cadherin rescues centrosome orientation and reduced glioma cell velocity. A wound-induced migration assay was performed using control astrocytes (siCTL), N-cadherin-depleted astrocytes (siN-cadherin), U373 and U138 glioma cells nucleofected, or not nucleofected, with the pEGFP-N-cadherin construct. (A) Fluorescence image showing GFP expression (green, pEGFP-N-cadherin), pericentrin immunostaining (red, centrosome) and Hoechst staining (blue, nucleus). (B) Histogram showing the percentage of cells with a correctly oriented centrosome 8 hours after wounding for each culture condition. Results are shown as means \pm s.e.m. of 3–5 independent experiments ($***P < 0.001$; $**P < 0.01$). (C) Box-and-whisker plots overlaid with the mean velocity obtained for each tracked cell. The boxes represent the 25th and 75th percentile of the data, and the line bisecting the box corresponds to the median ($***P < 0.001$). (D) Diagrams representing the migration trajectories of ten representative cells in primary rat astrocytes and glioma cell lines. Scale bar: 30 μm in A. The broken line shows the position of the wound.

$\mu\text{m minute}^{-1}$ for rescue U138) (Fig. 9C). However, it did not restore the directed and coordinated migration, possibly because the proportion of N-cadherin-expressing cells was not sufficient. These results confirm that N-cadherin acts as a brake to cell migration and that the decreased expression of N-cadherin participates, with other molecular changes, in the abnormal migration of glioma cells.

Discussion

Role of intercellular adhesion molecules in the migration behaviour of glioma cells

Intercellular adhesion together with adhesion to the extracellular matrix play a crucial role in the establishment and maintenance of cell polarity in developing and mature tissues. In tumour cells, loss of polarity is now considered as one of the triggering signals of tumourigenesis and invasion of the surrounding tissue (Humbert et al., 2003; Iden and Collard, 2008). In the case of epithelial cancers, polarity alteration occurs through an epithelial–mesenchymal transition (EMT) that is believed to be one of the major processes involved in tumour progression and metastasis (Kang and Massague, 2004; Micalizzi et al., 2010; Thiery, 2002). An EMT results from

several molecular changes, consisting of a global loss of epithelial markers, including E-cadherin, and an accompanying gain of mesenchymal markers such as N-cadherin (Kuphal and Bosserhoff, 2006; Maeda et al., 2005; Nakajima et al., 2004). In this situation, N-cadherin has a promigratory effect, helping the tumour cells to detach from their normal location and to spread in their environment (Agiostatidou et al., 2007; Hazan et al., 2004).

In the central nervous system, cells do not express E-cadherin but mainly N-cadherin, and no switch between cadherins has been described in the case of malignant gliomas, except in some specific cases (Lewis-Tuffin et al., 2010). Changes in N-cadherin expression are still controversial mainly owing to the observation of an inverse correlation between N-cadherin mRNA and protein levels (Asano et al., 2004; Shinoura et al., 1995), which we also observed (data not shown). This discrepancy most probably reflects defects in protein synthesis or stability. Catenins might be involved in this phenomenon as they have been shown to stabilize cadherin interactions (Reynolds and Carnahan, 2004; Xiao et al., 2007). In favour of this hypothesis, we observed a low expression level of catenins in glioma cell lines, as well as in fresh tissue-sample-derived cells (data not shown).

When only considering N-cadherin protein expression, it has been shown to be either downregulated (Asano et al., 1997; Asano et al., 2000; Foty and Steinberg, 2004; Hegedus et al., 2006) or upregulated (Utsuki et al., 2002), and its precise role in glial cell migration is still unknown. Our observations made in glioma samples, in tissue-sample-derived glioma cells and in glioma cell lines suggest that N-cadherin expression is variable but generally diminished in high-grade gliomas compared with normal primary glial cell cultures. Using a siRNA approach as well as rescue experiments, we show that N-cadherin is involved in the control of astrocyte and glioma cell velocity, which is in agreement with previous studies performed in other cell lines. Overexpression of N-cadherin in the C6 glioma cell line indeed leads to a significant decrease in their invasive behaviour (Asano et al., 2004), whereas a decrease of N-cadherin in LN18 cells induces an increase in cell migration (Rappl et al., 2008). Following siRNA-induced depletion of N-cadherin, astrocyte velocity is also increased. However, a decrease in N-cadherin levels cannot be solely responsible for the abnormal velocity of glioma cells, which migrate much faster than N-cadherin-depleted astrocytes. It is tempting to speculate that some of the numerous genetic alterations observed in gliomas, such as the downregulation of the tumour suppressor PTEN, also contribute to this increased migration speed (Raftopoulou et al., 2004). Nevertheless, we observe that glioma cells migrate even faster when N-cadherin levels are further decreased and migrate slower when N-cadherin is re-expressed in these cells, confirming that changes in N-cadherin levels are likely to impact strongly on the migration speed of glioma cells. In theory, loss of N-cadherin without re-expression of other cadherins should mechanically favour tumour cell migration away from the initial tumour, by loosening cell–cell junctions. Accordingly, *in vitro* migration of N-cadherin-depleted astrocytes showed that cells tend to escape from the monolayer to migrate individually inside the wound – a behaviour rarely observed with N-cadherin-expressing normal astrocytes.

Other cell-adhesion molecules normally expressed in the central nervous system have been described as playing important roles in glioma cell migration. Expression of neural cell-adhesion molecule (NCAM) is, for instance, decreased in glioma cells (Andersson et al., 1991; Gratsa et al., 1997; Maidment et al., 1997), and an inverse correlation was found between the expression of one NCAM isoform and the WHO-defined grade of a human glioma cell (Duenisch et al., 2010). NCAM over-expression in tumour astrocytes leads to a significant decrease in their invasive behaviour (Edvardsen et al., 1994; Owens et al., 1998), whereas addition of polysialylated acid (PSA) on NCAM has been shown to facilitate glioma invasion (Suzuki et al., 2005). Finally, PSA-NCAM has been recently proposed as a biomarker for the prognosis of patients with glioblastomas (Amoureux et al., 2010).

Studies support the notion that alterations in the organization or processing of intercellular junction proteins are more important than the regulation of their expression for explaining the migratory behaviour of glioma cells (Kohutek et al., 2009; Perego et al., 2002; Shinoura et al., 1995). Thus, whatever the mechanism employed by tumour cells, the weakening of cell–cell adhesion in gliomas would facilitate their migration and invasion throughout the central nervous system.

Cadherin–integrin interplay in the control of glial cell migration and polarization

In a non-migration situation on micropatterned substrates, an anisotropic distribution between cadherin-mediated interactions and focal adhesions determines the cell polarity axis through nucleus and centrosome positioning (Desai et al., 2009; Dupin et al., 2009). We show here that, in migrating cells, loss of N-cadherin also dramatically perturbs cell polarity and directed migration. Wound-induced cell-directed migration is promoted by an integrin-dependent pathway involving Src-like tyrosine kinases and Rho GTPases (Etienne-Manneville and Hall, 2001). Following wounding, integrin-mediated signalling leads to the activation and the recruitment of the small G-proteins Cdc42 and Rac, which are essential regulators of cell polarization and orientation during migration (Hall, 2005). Modifications in expression and/or activation of these small G-proteins have been reported to contribute to cancer development (Vega and Ridley, 2008). We have previously shown that, following wounding, Cdc42 is activated and recruited to the leading edge of migrating astrocytes in a wound-healing assay and that localized activity of Cdc42 plays a key role in astrocyte polarization and directed migration (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Osmani et al., 2010; Osmani et al., 2006). In agreement with a recent study realized in smooth muscle cells, by using a blocking antibody against N-cadherin (Sabatini et al., 2008), we show here that intercellular contacts are required for the recruitment and activation of Cdc42 at the leading edge in response to the wound. Active Cdc42 induces the recruitment and activation of the Par6–PKC ζ polarity complex (Etienne-Manneville and Hall, 2001) and APC clustering at microtubule plus-ends (Etienne-Manneville and Hall, 2003). This polarity pathway is strongly altered in the N-cadherin-depleted astrocytes, as well as in glioma cell lines. As a consequence, centrosome reorientation does not occur. Exogenous expression of N-cadherin in N-cadherin-depleted cells and in glioma cells rescues centrosome reorientation, confirming the crucial role of N-cadherin in the control of cell polarity.

Interestingly, the migratory behaviour of N-cadherin-depleted astrocytes is strongly similar to that observed for β -null astrocytes (Peng et al., 2008), suggesting that these two kinds of adhesions act in the same pathway controlling cell migration (Gimond et al., 1999; Huttenlocher et al., 1998). While regulation of N-cadherin-mediated contacts by focal-adhesion-associated proteins such as focal adhesion kinase (FAK) or paxillin has been reported (Yano et al., 2004), less is known about the regulation of focal adhesion by N-cadherin. We show here that N-cadherin expression affects the localization, number and size of focal adhesions, as previously reported for E-cadherin (Borghi et al., 2010). The increased number and smaller size of focal adhesions observed in cells expressing a low level of N-cadherin suggest that N-cadherin controls focal adhesion turnover. These effects might involve the regulation of Src phosphorylation on Y529, which has been shown to influence the dynamics of focal adhesions (Pera et al., 2005; Vielreicher et al., 2007). Increased turnover of focal adhesions might thus be responsible for the effect of N-cadherin on cell migration (Gupton et al., 2007), promoting a faster mesenchymal-like migration in a wound-healing assay. In addition, the constitutive engagement of integrins at the cell periphery does not allow further stimulation upon wounding and therefore prevents the generation of wound-induced integrin-mediated signals. Finally, homogenous distribution of focal adhesions does

not allow the generation of a spatially localized signalling pathway and thus does not sustain a persistent directed migration. Thus, downregulation of N-cadherin in glioma cells might induce, as EMT in epithelial cancer cells, a decrease in intercellular contacts in favour of more-dynamic and less spatially regulated adhesions to the extracellular matrix, resulting in the abnormal migratory behaviour of these cells.

Conclusions

Adherens junction proteins are now considered as key players in tumour progression in different types of cancer. Creating N-cadherin-depleted astrocytes by using a siRNA approach constitutes a good model to investigate the involvement of N-cadherin in glioma cell migration. We show that the levels of N-cadherin strongly impact on glial cell polarity and promote a nondirected migration. In addition, the decrease in the levels of N-cadherin participates in the release of a migration brake caused by adhesive interactions with neighbouring cells and probably contributes to the increased cell velocity observed in glioma cells. Together, our results point to the downregulation of N-cadherin as an important event favouring the acquisition of the invasive properties of gliomas.

Materials and Methods

Cell cultures and scratch-induced migration

All procedures were performed in accordance with the guidelines approved by the French Ministry of Agriculture, following European standards. Glioblastoma samples were provided by the local Department of Neurosurgery from patients who had given written and informed consent, as approved by the local research ethics boards at the Salpêtrière Hospital. Samples were washed with Hanks balanced salt solution (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), dissected, sectioned and enzymatically dissociated with both 5 mg ml⁻¹ of trypsin and 200 U ml⁻¹ of DNase (both from Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for 10 minutes at 37°C. Erythrocytes were lysed using NH₄Cl. The cells were seeded into T75 flasks at 10,000 cells cm⁻². Cultures were incubated in 5% CO₂ at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium-F12 (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 20 ng ml⁻¹ of epidermal growth factor (Sigma-Aldrich), 20 ng ml⁻¹ of basic fibroblast growth factor (Sigma-Aldrich), B27 (1:50; Gibco) and penicillin-streptomycin (10,000 U ml⁻¹ and 10,000 µg ml⁻¹; Gibco).

U138 (human glioblastoma) and U373 (human astrocytoma, grade III) cells were grown in modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum (qualified, origin Australia), penicillin-streptomycin (10,000 U ml⁻¹ and 10,000 µg ml⁻¹) and non-essential amino-acids (all from Gibco). Primary rat astrocytes were prepared as previously described (Etienne-Manneville, 2006). In non-confluent conditions, cell density was divided four times. For calcium depletion, primary rat astrocytes were cultured in Ca²⁺-depleted medium (Gibco) supplemented with 0.5% foetal calf serum. In control conditions, Ca²⁺ (1.8 mM), glutaMAX and sodium pyruvate were added to the medium. JEG-3 epithelial cells were grown in minimum essential medium supplemented with 10% foetal calf serum, glutamax, nonessential amino acids and sodium pyruvate.

For wound-healing assays, primary rat astrocytes were seeded on coverslips coated with poly-L-ornithine (Sigma-Aldrich) or on Petri dishes and grown in the presence of serum to confluence. No coating was used for the two cell lines and primary glioblastomas. For all cell types, the medium was changed the day before scratching. Individual wounds were made with a cone tip (20–200 µl) or a blunt capillary. For biochemical analysis, multiple wounds were made with an eight-channel pipette (0.1–2 µl tips).

Live imaging experiments

Confluent cell monolayers were placed immediately after scratching in a Zeiss Axiovert 200M microscope, equipped with a humid chamber maintained at 37°C with 5% CO₂ (10×, 0.45-NA objective and Hamamatsu ORCA II ER CCD camera) or an IncuCyte Live-Cell Imaging System (Essen BioScience, Ann Arbor, Michigan). We have used the IncuCyte FLR model that allows us to combine phase-contrast and fluorescence imaging for rescue experiments. Cell migration was recorded for 36 hours after the scratch. Movies were then analyzed using ImageJ software (W.S. Rasband, ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2005). The manual tracking of the nucleus was used to follow migration of individual cells. In the rescue experiments, only GFP-positive cells were tracked and attention was paid not to include dying or suffering cells in the analysis. The average individual cell speeds

were calculated from individual cell tracks by averaging the distances over the time interval from at least three independent experiments (Figs 2, 9) for the precise total number of cells in each cell culture condition. The persistence of migration is defined as the ratio between the vectorial distance (*D_v*), which is the real shifting of the cell, and the total distance (*D*) covered by the cell.

Immunofluorescence

We used the following antibodies or reagents: rat monoclonal anti- α -tubulin (1:100; Serotec, Kidlington, UK), rhodamin-coupled phalloidin (1:400; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA), rabbit polyclonal (1:200; Abcam, Cambridge, UK) or mouse monoclonal (diluted 1:100; BD Biosciences Transduction Laboratories, NJ), anti-N-cadherin, mouse monoclonal anti-paxillin (1:100; BD Biosciences Transduction Laboratories), rabbit polyclonal anti-phospho-Src Y529 (1:100; Invitrogen), mouse monoclonal anti-GM130 (1:100; BD Biosciences Transduction Laboratories), rabbit polyclonal anti-pericentrin (1:200; Covance, Princeton, NJ, USA), rabbit polyclonal anti- β -PIX (1:500; Chemicon, Billerica, MA), goat polyclonal anti-Par6 N-18 (1:50; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-PKC ζ C-20 (1:100; Santa Cruz Biotechnology), and rabbit polyclonal antibodies against adenomatous polyposis coli (APC; gift from I. Näthke, University of Dundee, Dundee, UK). Donkey anti-mouse and donkey anti-rat coupled to CY2, donkey anti-rabbit TRITC and donkey anti-goat coupled to TRITC (1:200) were from Chemicon. Hoechst was used to visualize nuclei.

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized in 0.2% Triton X-100 in PBS and blocked with sodium borohydride (0.5 mg ml⁻¹) in PBS (each for 10 minutes). Alternatively, for microtubule staining, cells were fixed in cold methanol for 5 minutes. Cells were then incubated for 1 hour with primary antibodies, washed three times in PBS and incubated another hour with secondary antibodies. Finally, coverslips were washed and mounted in Mowiol. Epifluorescence images were obtained on a microscope (model DM6000, Leica, Solms, Germany) equipped with 40×, NA 1.25 and a 63×, NA 1.4 objective lenses and were recorded on a CCD camera (CoolSNAP HQ, Roper Scientific, France) using Leica software. Grey-level images were treated and assembled using Adobe Photoshop and Adobe Illustrator CS2 software version 9.0 (Adobe System).

Western blotting

Cell lysates were obtained using Laemmli buffer containing 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS and 50 mM DTT. Proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE and anti-N-cadherin (mouse monoclonal diluted 1:1000; BD Biosciences Transduction Laboratories), anti-pan-cadherin (mouse monoclonal, clone CH-19 diluted 1:1000, Sigma-Aldrich), rabbit polyclonal anti-phospho-Src Y529 (1:1000; Invitrogen) or mouse monoclonal anti-Src (clone L4A1, 1:1000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) western blotting. Anti- α -tubulin or anti-actin (mouse monoclonal; 1:4000, Sigma-Aldrich) western blotting was used as a control. Antibodies were diluted in PBS with 0.2% Tween and 4% milk, or TBS with 0.2% Tween and 4% milk and applied at room temperature. Washes were conducted with PBS with 0.2% Tween or TBS with 0.2% Tween. Quantification of signal intensity was performed using the ImageJ software and normalized to the control value. In the case of biopsy samples, quantification with the ODYSSEY Infrared Imaging system (LI-COR, Biosciences, Lincoln, NE) was used. Each N-cadherin signal was normalized with the β -actin signal intensity, using the Odyssey V3.0 software. The fluorescence signals were obtained using appropriate IRDye (LI-COR) infrared secondary antibodies.

DNA constructs and siRNAs

GFP-WT-Cdc42 was expressed by the pEGFP vector (Clontech Laboratories, Mountain View, CA). Nuclear microinjections were performed in the first row of wounded astrocytes in the first 30 minutes after scratching, and microinjected cells were returned to a 37°C, 5% CO₂ incubator. Expression vectors were used at 100–200 µg ml⁻¹. Protein expression was detectable ~1 hour after microinjection, and the cells were fixed 6–8 hours after microinjection.

pEGFP-N-cadherin was a gift of Cécile Gauthier-Rouvière (Mary et al., 2002). siRNA duplexes corresponding to rat N-cadherin were used as described previously (Dupin et al., 2009). pEGFP-N-cadherin (10–15 µg) and siRNA were introduced into cells using nucleofection technology (Amaxa, Cologne, Germany) as described previously (Etienne-Manneville et al., 2005). Transfected cells were fixed 4 days after nucleofection, and pEGFP-N-cadherin expression was detected with mouse monoclonal antibodies against GFP (diluted 1:100, Roche, France).

Measurements of polarity

Centrosome orientation

Centrosome reorientation in response to the scratch has already been characterized (Etienne-Manneville and Hall, 2001). This assay was performed 8 hours after wounding, and only the migrating astrocytes of the wounded edge were quantified. Centrosomes located in front of the nucleus, within the quadrant facing the wound, were scored as correctly oriented. A score of 25% represents the absolute minimum corresponding to random centrosome positioning. In rescue experiments, only the GFP-positive cells were taken into account.

Protein localization

To localize Cdc42 in cells, we microinjected the GFP-WT-Cdc42 construct (see above) because of the lack of anti-Cdc42 antibodies suitable for immunofluorescence. For β PIX, Par6 and PKC ζ localization, cells were fixed 4 hours after wounding and stained with the appropriate antibodies. To quantify the protein recruitment, cells in which the protein was specifically enriched at the leading edge were scored as positive, as previously described (Osmani et al., 2006). Relative fluorescence intensity was measured at the leading edge using the ImageJ software, and graphs illustrate three representative cells for each considered protein. For this analysis, unmodified images were used.

APC recruitment at microtubule plus-ends was determined as described previously (Etienne-Manneville and Hall, 2003; Etienne-Manneville et al., 2005; Osmani et al., 2006). Cells were fixed 6 hours after wounding and stained with antibodies against APC and α -tubulin. The number of cells presenting APC clusters at the microtubule tips was determined.

As previously described (Osmani et al., 2006), primary rat astrocytes are very flat cells and they rarely form membrane ruffling at the leading edge. However, in order to avoid an artifact from increased fluorescence due to membrane ruffling, ruffling cells were not included in the analysis. On the contrary, U138 are very thick cells that do not show a clear leading edge. As a result, protein recruitment was not evaluated in these cells.

Focal adhesion quantifications

Surface quantifications

The mean surface occupied by focal adhesions was measured after binarization and thresholding of paxillin immunofluorescence grey-level acquisitions using the ImageJ software. Under non-confluent conditions, average cell surfaces were determined after manual drawing of individual cell outlines.

Number of focal adhesions

The average number of focal adhesions was calculated using the Anlyze Particles tool in ImageJ. Pixel size was chosen so as to include mature focal adhesions as well as most focal contacts. Under non-confluent conditions, the number of focal adhesions was determined in each cell. After the scratch, in confluent conditions, it was only quantified at the wound edges along the scratch, contained in a rectangle of 25 μm^2 surface area in order to avoid the cytoplasmic paxillin immunofluorescence observed in the perinuclear region, especially in glioma cells.

Cdc42 activity

GTP-bound Cdc42 was affinity purified using GST-PAK-PBD protein agarose beads and Cdc42 activation assay Biochem Kit (Cytoskeleton, Denver, CO). Proteins were analyzed by 15% SDS-PAGE and anti-Cdc42 western blotting using a specific mouse monoclonal antibody included in the kit (Cytoskeleton).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0. All data are presented as the mean \pm s.e.m. One-way ANOVA analysis of the variance was followed by the Tukey's multiple comparison post-hoc test. Unpaired Student *t*-tests were used for LI-COR western blot quantification (Fig. 1B) and comparison of the average number of focal adhesions along the scratch (Fig. 4D). A *P* value of <0.05 was considered as statistically significant.

Acknowledgements

We are particularly grateful to Olivier Renaud from the Plate-Forme d'Imagerie Dynamique of Institut Pasteur, for his help with live-cell imaging. We thank Cécile Gauthier-Rouvière for the pEGFP-N-cadherin construct, Inke Nätke for the gift of anti-APC antibodies and Matteo Bonazzi for JEG-3 cell cultures.

Funding

Funded by Institut National du Cancer [grant number 2009-1-RT-05 to E.C.]; the Association pour la Recherche sur le Cancer to N.O.; and the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche to F.P. This work was also supported by the Centre National de la Recherche Scientifique; the Institut Pasteur; Association pour la Recherche sur le Cancer, La Ligue contre le Cancer. S.E.M. is a member of the EMBO YIP.

Supplementary material available online at

<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.087668/-/DC1>

References

- Agiostrotidou, G., Hulit, J., Phillips, G. R. and Hazan, R. B. (2007). Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **12**, 127-133.
- Amoureux, M. C., Coulibaly, B., Chinot, O., Loundou, A., Metellus, P., Rougon, G. and Figarella-Branger, D. (2010). Polysialic acid neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) is an adverse prognosis factor in glioblastoma, and regulates olig2 expression in glioma cell lines. *BMC Cancer* **10**, 91.
- Andersson, A. M., Moran, N., Gaardsvoll, H., Linnemann, D., Bjerkvig, R., Laerum, O. D. and Bock, E. (1991). Characterization of NCAM expression and function in BT4C and BT4Cn glioma cells. *Int. J. Cancer* **47**, 124-129.
- Angst, B. D., Marcozzi, C. and Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Sci.* **114**, 629-641.
- Asano, K., Kubo, O., Tajika, Y., Huang, M. C., Takakura, K., Ebina, K. and Suzuki, S. (1997). Expression and role of cadherins in astrocytic tumors. *Brain Tumor Pathol.* **14**, 27-33.
- Asano, K., Kubo, O., Tajika, Y., Takakura, K. and Suzuki, S. (2000). Expression of cadherin and CSF dissemination in malignant astrocytic tumors. *Neurosurg. Rev.* **23**, 39-44.
- Asano, K., Duntsch, C. D., Zhou, Q., Weimar, J. D., Bordelon, D., Robertson, J. H. and Pourmotabbed, T. (2004). Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion. *J. Neurooncol.* **70**, 3-15.
- Borghi, N., Lowndes, M., Maruthamuthu, V., Gardel, M. L. and Nelson, W. J. (2010). Regulation of cell motile behavior by crosstalk between cadherin- and integrin-mediated adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 13324-13329.
- Cau, J. and Hall, A. (2005). Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J. Cell Sci.* **118**, 2579-2587.
- Desai, R. A., Gao, L., Raghavan, S., Liu, W. F. and Chen, C. S. (2009). Cell polarity triggered by cell-cell adhesion via E-cadherin. *J. Cell Sci.* **122**, 905-911.
- Duenisch, P., Reichart, R., Mueller, U., Brodhun, M., Bjerkvig, R., Romeike, B., Walter, J., Herbold, C., Regenbrecht, C. R., Kalff, R. et al. (2010). Neural cell adhesion molecule isoform 140 declines with rise of WHO grade in human gliomas and serves as indicator for the invasion zone of multiform glioblastomas and brain metastases. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **137**, 399-414.
- Dupin, I., Camand, E. and Etienne-Manneville, S. (2009). Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity. *J. Cell Biol.* **185**, 779-786.
- Edvardsen, K., Pedersen, P. H., Bjerkvig, R., Hermann, G. G., Zeuthen, J., Laerum, O. D., Walsh, F. S. and Bock, E. (1994). Transfection of glioma cells with the neural-cell adhesion molecule NCAM: effect on glioma-cell invasion and growth in vivo. *Int. J. Cancer* **58**, 116-122.
- Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42 – the centre of polarity. *J. Cell Sci.* **117**, 1291-1300.
- Etienne-Manneville, S. (2006). In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. *Methods Enzymol.* **406**, 565-578.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell* **106**, 489-498.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2003). Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* **421**, 753-756.
- Etienne-Manneville, S., Manneville, J. B., Nicholls, S., Ferenczi, M. A. and Hall, A. (2005). Cdc42 and Par6-PKC ζ regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J. Cell Biol.* **170**, 895-901.
- Faber-Elman, A., Solomon, A., Abraham, J. A., Marikovsky, M. and Schwartz, M. (1996). Involvement of wound-associated factors in rat brain astrocyte migratory response to axonal injury: in vitro simulation. *J. Clin. Invest.* **97**, 162-171.
- Feng, Q., Baird, D. and Cerione, R. A. (2004). Novel regulatory mechanisms for the Dbl family guanine nucleotide exchange factor Cool-2/ α -Pix. *EMBO J.* **23**, 3492-3504.
- Feng, Q., Baird, D., Yoo, S., Antonyak, M. and Cerione, R. A. (2010). Phosphorylation of the cool-1/ β -Pix protein serves as a regulatory signal for the migration and invasive activity of Src-transformed cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 18806-18816.
- Foty, R. A. and Steinberg, M. S. (2004). Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 397-409.
- Frame, M. C. and Brunton, V. G. (2002). Advances in Rho-dependent actin regulation and oncogenic transformation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 36-43.
- Frank, S. R. and Hansen, S. H. (2008). The PIX-GIT complex: a G protein signaling cassette in control of cell shape. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 234-244.
- Giese, A. (2003). Glioma invasion – pattern of dissemination by mechanisms of invasion and surgical intervention, pattern of gene expression and its regulatory control by tumor suppressor p53 and proto-oncogene ETS-1. *Acta Neurochir. Suppl.* **88**, 153-162.
- Gimond, C., van Der Flier, A., van Delft, S., Brakebusch, C., Kuikman, I., Collard, J. G., Fassler, R. and Sonnenberg, A. (1999). Induction of cell scattering by expression of beta1 integrins in beta1-deficient epithelial cells requires activation of members of the rho family of GTPases and downregulation of cadherin and catenin function. *J. Cell Biol.* **147**, 1325-1340.
- Gratsa, A., Rooprai, H. K., Rogers, J. P., Martin, K. K. and Pilkington, G. J. (1997). Correlation of expression of NCAM and GD3 ganglioside to motile behaviour in neoplastic glia. *Anticancer Res.* **17**, 4111-4117.
- Guarino, M. (2010). Src signaling in cancer invasion. *J. Cell Physiol.* **223**, 14-26.
- Gupton, S. L., Eisenmann, K., Alberts, A. S. and Waterman-Storer, C. M. (2007). mDia2 regulates actin and focal adhesion dynamics and organization in the lamella for efficient epithelial cell migration. *J. Cell Sci.* **120**, 3475-3487.

- Hall, A. (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 891-895.
- Hatta, K. and Takeichi, M. (1986). Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature* **320**, 447-449.
- Hazan, R. B., Qiao, R., Keren, R., Badano, I. and Suyama, K. (2004). Cadherin switch in tumor progression. *Ann. New York Acad. Sci.* **1014**, 155-163.
- Hegedus, B., Marga, F., Jakab, K., Sharpe-Timms, K. L. and Forgacs, G. (2006). The interplay of cell-cell and cell-matrix interactions in the invasive properties of brain tumors. *Biophys. J.* **91**, 2708-2716.
- Humbert, P., Russell, S. and Richardson, H. (2003). Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *BioEssays* **25**, 542-553.
- Huttenlocher, A., Lakonishok, M., Kinder, M., Wu, S., Truong, T., Knudsen, K. A. and Horwitz, A. F. (1998). Integrin and cadherin synergy regulates contact inhibition of migration and motile activity. *J. Cell Biol.* **141**, 515-526.
- Iden, S. and Collard, J. G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 846-859.
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kempthues, K. J. and Ohno, S. (1998). An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J. Cell Biol.* **143**, 95-106.
- Jung, T. Y., Jung, S., Lee, K. H., Cao, V. T., Jin, S. G., Moon, K. S., Kim, I. Y., Kang, S. S., Kim, H. S. and Lee, M. C. (2010). Nogo-A expression in oligodendroglial tumors. *Neuropathology* **31**, 11-19.
- Kang, Y. and Massagué, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* **118**, 277-279.
- Kleihues, P., Burger, P. C. and Scheithauer, B. W. (1993). The new WHO classification of brain tumours. *Pathol. J.* **3**, 255-268.
- Kohutek, Z. A., diPierro, C. G., Redpath, G. T. and Hussaini, I. M. (2009). ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J. Neurosci.* **29**, 4605-4615.
- Kuphal, S. and Bosserhoff, A. K. (2006). Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. *Oncogene* **25**, 248-259.
- Lewis-Tuffin, L. J., Rodriguez, F., Giannini, C., Scheithauer, B., Necela, B. M., Sarkaria, J. N. and Anastasiadis, P. Z. (2010). Misregulated E-cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. *PLoS ONE* **5**, e13665.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W. and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97-109.
- Maeda, M., Johnson, K. R. and Wheelock, M. J. (2005). Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J. Cell Sci.* **118**, 873-887.
- Maidment, S. L., Rucklidge, G. J., Rooptai, H. K. and Pilkington, G. J. (1997). An inverse correlation between expression of NCAM-A and the matrix-metalloproteinases gelatinase-A and gelatinase-B in human glioma cells in vitro. *Cancer Lett.* **116**, 71-77.
- Makrilia, N., Kollias, A., Manolopoulos, L. and Syrigos, K. (2009). Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest.* **27**, 1023-1037.
- Manabe, N., Hirai, S., Imai, F., Nakanishi, H., Takai, Y. and Ohno, S. (2002). Association of ASIP/mPAR-3 with adherens junctions of mouse neuroepithelial cells. *Dev. Dyn.* **225**, 61-69.
- Mary, S., Charrasse, S., Meriane, M., Comunale, F., Travo, P., Blangy, A. and Gauthier-Rouviere, C. (2002). Biogenesis of N-cadherin-dependent cell-cell contacts in living fibroblasts is a microtubule-dependent kinesin-driven mechanism. *Mol. Biol. Cell* **13**, 285-301.
- McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Van Meir, E. G., Brat, D. J., Mastrogianakis, G. M., Olson, J. J., Mikkelsen, T., Lehman, N., Aldape, K. et al. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061-1068.
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M. and Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **15**, 117-134.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M. and Philips, M. R. (2001). Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J. Cell Biol.* **152**, 111-126.
- Nakajima, S., Doi, R., Toyoda, E., Tsuji, S., Wada, M., Koizumi, M., Tulachan, S. S., Ito, D., Kami, K., Mori, T. et al. (2004). N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4125-4133.
- Nishiyama, A., Onda, K., Washiyama, K., Kumanishi, T., Kuwano, R., Sakimura, K. and Takahashi, Y. (1989). Differential expression of glial fibrillary acidic protein in human glioma cell lines. *Acta Neuropathol.* **78**, 9-15.
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* **144**, 1235-1244.
- Osmani, N., Vitale, N., Borg, J. P. and Etienne-Manneville, S. (2006). Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration. *Curr. Biol.* **16**, 2395-2405.
- Osmani, N., Peglion, F., Chavrier, P. and Etienne-Manneville, S. (2010). Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J. Cell Biol.* **191**, 1261-1269.
- Owens, G. C., Orr, E. A., DeMasters, B. K., Muschel, R. J., Berens, M. E. and Kruse, C. A. (1998). Overexpression of a transmembrane isoform of neural cell adhesion molecule alters the invasiveness of rat CNS-1 glioma. *Cancer Res.* **58**, 2020-2028.
- Peng, H., Shah, W., Holland, P. and Carbonetto, S. (2008). Integrins and dystroglycan regulate astrocyte wound healing: the integrin beta1 subunit is necessary for process extension and orienting the microtubular network. *Dev. Neurobiol.* **68**, 559-574.
- Pera, I. L., Iuliano, R., Florio, T., Susini, C., Trapasso, F., Santoro, M., Chiariotti, L., Schettini, G., Viglietto, G. and Fusco, A. (2005). The rat tyrosine phosphatase eta increases cell adhesion by activating c-Src through dephosphorylation of its inhibitory phosphotyrosine residue. *Oncogene* **24**, 3187-3195.
- Perego, C., Vanoni, C., Massari, S., Raimondi, A., Pola, S., Cattaneo, M. G., Francolini, M., Vicentini, L. M. and Pietrini, G. (2002). Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. *J. Cell Sci.* **115**, 3331-3340.
- Ponten, J. and Macintyre, E. H. (1968). Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **74**, 465-486.
- Prestegarden, L., Svendsen, A., Wang, J., Sleire, L., Skafnesmo, K. O., Bjerkvig, R., Yan, T., Askland, L., Persson, A., Sakariassen, P. O. et al. (2010). Glioma cell populations grouped by different cell type markers drive brain tumor growth. *Cancer Res.* **70**, 4274-4279.
- Raftopoulou, M., Etienne-Manneville, S., Self, A., Nicholls, S. and Hall, A. (2004). Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science* **303**, 1179-1181.
- Rappl, A., Piontek, G. and Schlegel, J. (2008). EGFR-dependent migration of glial cells is mediated by reorganisation of N-cadherin. *J. Cell Sci.* **121**, 4089-4097.
- Reynolds, A. B. and Carnahan, R. H. (2004). Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 657-663.
- Sabatini, P. J., Zhang, M., Silverman-Gavrila, R., Bendeck, M. P. and Langille, B. L. (2008). Homotypic and endothelial cell adhesions via N-cadherin determine polarity and regulate migration of vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **103**, 405-412.
- Shen, Y., Li, N., Wu, S., Zhou, Y., Shan, Y., Zhang, Q., Ding, C., Yuan, Q., Zhao, F., Zeng, R. et al. (2008). Nudel binds Cdc42GAP to modulate Cdc42 activity at the leading edge of migrating cells. *Dev. Cell* **14**, 342-353.
- Shinoura, N., Paradies, N. E., Warnick, R. E., Chen, H., Larson, J. J., Tew, J. J., Simon, M., Lynch, R. A., Kanai, Y., Hirohashi, S. et al. (1995). Expression of N-cadherin and alpha-catenin in astrocytomas and glioblastomas. *Br. J. Cancer* **72**, 627-633.
- Suzuki, M., Nakayama, J., Suzuki, A., Angata, K., Chen, S., Sakai, K., Hagihara, K., Yamaguchi, Y. and Fukuda, M. (2005). Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology* **15**, 887-894.
- Takeichi, M. (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 237-252.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 442-454.
- Utsuki, S., Sato, Y., Oka, H., Tsuchiya, B., Suzuki, S. and Fujii, K. (2002). Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in astrocytomas. *J. Neurooncol.* **57**, 187-192.
- Vega, F. M. and Ridley, A. J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* **582**, 2093-3101.
- Vielreicher, M., Harms, G., Butt, E., Walter, U. and Obergfell, A. (2007). Dynamic interaction between Src and C-terminal Src kinase in integrin alpha11beta3-mediated signaling to the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **282**, 33623-33631.
- Watanabe, T., Noritake, J. and Kaibuchi, K. (2005). Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* **15**, 76-83.
- Xiao, K., Oas, R. G., Chiasson, C. M. and Kowalczyk, A. P. (2007). Role of p120-catenin in cadherin trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 8-16.
- Yano, H., Muzaki, Y., Kurokawa, K., Hanks, S. K., Matsuda, M. and Sabe, H. (2004). Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* **166**, 283-295.

N-cadherin expression level as a critical indicator of invasion in non-epithelial tumours.

Florent Pégliion and Sandrine Etienne-Manneville

Institut Pasteur-CNRS URA 2582, Cell Polarity and Migration Group, 25 rue du Dr Roux
75724 Paris Cedex 15, France.

Abstract:

Cancer cell dissemination away from the primary tumour and their ability to form metastases remain the major causes of death from cancer. Understanding the molecular mechanisms triggering this event could lead to the design of new cancer treatments. The establishment and maintenance of tissue architecture depends on the coordination of cell behaviour within this tissue. Cell-cell interactions must form adhesive structures between neighbouring cells while remaining highly dynamic to allow and control tissue renewal or remodelling. Among intercellular junctions, cadherin-based adherens junctions mediate strong physical interactions and transmit information from the cell microenvironment to the cytoplasm. Disruption of these cell-cell contacts perturbs the polarity of epithelial tissues leading to their disorganisation and ultimately to aggressive carcinomas. In non-epithelial tissues, the role of cadherins in the development of cancer is still debated. We recently found that downregulation of N-cadherin in malignant glioma-the most frequent primary brain tumour-results in cell polarisation defects leading to abnormal motile behaviour with increased cell speed and decreased persistence in directionality. Re-expression of N-cadherin in glioma cells restores cell polarity and limits glioma cell migration, providing a potential therapeutic tool for diffuse glioma.

Key words: cadherin, adherens junctions, migration, invasion, polarity, astrocyte, glioma, glioblastoma.

Introduction

The migration of cancer cells blurs tumour margins and possibly leads to metastases. Tumour invasion frequently prevents the success of focal therapies such as surgery or radiotherapy and constitutes a major obstacle on the road to cancer treatment. It is thus essential to better understand the mechanisms responsible for cancer cell invasion. The process of cell migration has been widely studied over the last decades and the main molecular components required for cell motility have been deciphered^{1 2 3}. Numerous regulators of the cytoskeleton have been found to be over-activated in cancers. According to various studies led in breast, colon and lung cancers (for a review, see ref⁴), Rho GTPases proteins (Rac1, Cdc42, RhoA and RhoC) show a higher activity in cancer cells than in normal cells. The PI3K pathway, involved in the very first steps of cell migration, is also overactivated in a wide range of tumours such as prostate, breast, endometrium, colon and nervous system cancers, due to *Pik3ca* activating mutations⁵ and/or *Pten* deletion (for a review see ref⁶) and is linked to invasive forms of these tumours⁷.

If the overactivation of the motility machinery is a well-known feature of invasive cells, the relationship between cancer cells and their microenvironment is another fundamental topic which, in contrast, has not been fully explored. To coordinate the intracellular forces generated by the cell cytoskeleton and produce a net displacement, cells must acquire a structural asymmetry that discriminates the cell front from the cell rear. The polarization and the orientation of the cell are tightly controlled by extracellular cues and cancer cell dissemination certainly requires profound alterations of these regulatory mechanisms. *In vitro* and *in vivo* experiments have shown that decreased adhesion to the substratum or to the surrounding epithelial cells favours the invasion process of carcinoma cells leading ultimately to metastasis^{8 9 10} (for a review see ref¹¹). These changes can result from oncogenic pathways, such as increased TGFbeta or Wnt signalling^{12 13} which ultimately destabilize the epithelial barrier, or from abnormal levels of adhesion molecules at the plasma membrane. We have recently demonstrated that alterations in the expression level of the intercellular adhesion molecule N-cadherin in glia-derived tumours lead to dramatic changes in the migratory behaviour of cancer cells.

Perturbation of cadherin levels in tumours.

The integrin family of cell adhesion receptors directly binds components of the extracellular matrix providing the traction force necessary for cell motility and invasion. The expression level of integrins is frequently altered in cancers. Such alterations are associated with increased or decreased cell invasion depending on the adhesive properties of the integrin but also on the cell context and the tumour stage^{11 14}. Similarly, altered expression of the intercellular adhesion molecules coincides with tumour progression and increased dissemination¹⁵.

Among the various molecular complexes involved in cell-cell interactions, adherens junctions allow calcium dependent cell-cell adhesion and play a key role in maintaining tissue integrity. Classical cadherins are essential transmembrane components of adherens junctions. E-cadherin is mainly expressed in epithelial tissues¹⁶ and loss of E-cadherin is viewed as a triggering event of carcinoma cell detachment from the primary tumour and invasion of the conjunctive tissues^{17 9}. Conversely, the expression of N-cadherin molecules in these cells seems to have a promigratory effect, promoting tumour infiltration in the conjunctive tissue^{18 19} (for a review ref²⁰), possibly by favouring association of cancer cells with endothelial and other stromal cells. Although the changes in cadherin levels during carcinoma progression are

now well documented, the possibility that such changes occur in non-epithelial tumours has only recently begun to be explored.

Gliomas account for more than 50 % of all brain tumours and are the most common primary brain tumours in adult. Its malignant forms are associated with one of the poorest prognoses for cancer because of their ability to infiltrate diffusely into the normal cerebral parenchyma. The causes of glioma invasion remain poorly understood. Various studies have shown that changes in N-cadherin levels occur in malignant gliomas^{21 22 23 24}. Some results show an inverse correlation between N-cadherin expression and glioma invasiveness^{21 25}. Others do not show any correlation²⁴ and even report a positive correlation with the grade of the gliomas, knowing that, the higher the grade is, the more invasive gliomas are²². This apparent contradiction may result from the use of different animal models or from the fact that, in some studies, the level of N-cadherin mRNA is analysed, while other studies are based on the level of N-cadherin protein. In our recent study²⁶, we have used fresh malignant glioma samples, tumour-derived primary glioma cells and commercial glioma cell lines. We observed that the level of N-cadherin protein is variable but is generally lower in tumour samples and in tumour cells than in normal brain and primary glial cells. Surprisingly, we observed that mRNA levels were, in contrast, higher in tumour samples than in normal tissues (F. P., unpublished data). These seemingly contradictory results may reflect a decrease in protein stability that would need to be confirmed. They may also explain the discrepancy between previous reports. A downregulation of the catenins, major protein partners of cadherin, was also observed in glioma cells, strengthening the idea of a decrease in N-cadherin protein levels and further showing that adherens junctions are destabilized in glioma cells. Decreased cell-cell adhesion was also confirmed after staining of adherens junction components in glioma cells. Alteration of cell-cell adhesion was associated with an abnormal migratory behaviour *in vitro*, suggesting that changes in cadherin expression levels may play a key role in tumour invasion.

N-cadherin in control of cell migration

Cadherins are adhesive molecules that transmit most of the mechanical forces exerted between neighbouring cells. As such, they strongly contribute to tissue integrity. In addition, N-cadherin has been shown to serve as a support for neurons that migrate in a chain-like fashion²⁷. In some circumstances, they may also function as a brake for cell migration²⁸. In glioma cells, downregulation of adherens junction molecules was associated with an increased velocity when cell migration was tested in a wound-healing *in vitro* assay. In this assay, normal glial cells migrate slowly as a cohesive sheet. Downregulation of N-cadherin levels led to the detachment of wound-edge cells from the monolayer, suggesting that alteration of adherens junctions may release a brake caused by cell-cell adhesion at the cell rear. However, the migration induced by wounding a 2D confluent cell monolayer is very different from the migration observed during tumour cell invasion. We thus also analysed the cell migratory behaviour in a 3D matrigel spheroid assay, closer to physiological conditions. Decreasing the expression of N-cadherin by siRNA increased glial cell invasion in the surrounding matrigel, mimicking the dispersion of glioma cells in this assay (F.P. unpublished data). It is thus tempting to speculate that, in neural as in epithelial tissues, loss of the adhesion molecules responsible for tissue cohesion favours the escape of tumour cells from the tissue of origin. The versatility of N-cadherin in the control of migration speed is likely to result from different expression levels of this molecule at the cell surface and in the cell microenvironment.

In addition to faster migration, we also observed that a decrease in N-cadherin levels induced a less persistent movement, with cells frequently turning and changing direction. This phenomenon was associated with a perturbation of the front-rear polarity axis in these cells

and suggested that N-cadherin may also play a key role in the regulation of cell polarity. Beyond its mechanical role, N-cadherin can also transduce intracellular signals which could indirectly affect cell migration²⁹. Cadherin-mediated signals have been involved in the regulation of cell polarity and may thereby affect the direction of migration. In epithelial cells, there is a strong interdependent relationship between adherens junction formation and baso-apical polarity determination (for a review, see ref³⁰). Baso-apical polarity in epithelial cells is defined by the appropriate segregation of three different polarity complexes which are the Par, the Crumbs and the Scribble complexes^{31 32 33}. Cadherins have been linked to polarity complexes either via their direct interaction with members of the polarity complexes or via the regulation of the small GTPases and specific phospholipids which controls the asymmetric distribution of polarity complexes in epithelial cells. Par3, a member of the Par complex, has indeed been shown to localize at cadherin-dependent cell-cell junctions³⁴ and to interact with VE- and N-cadherin complexes. Loss of E-cadherin perturbs the localization of aPKC, another member of the Par complex. E-cadherin can also interact with Dlg a member of the Scribble complex³⁵ (for a review see ref³⁰). In addition, E-cadherin contributes to the polarized targeting of basolateral membrane components via its interaction with the exocyst complex³⁶.

Essential to baso-apical polarity, cadherins are also involved in the front-rear polarization of wound edge cells^{37 38}. Anisotropic distribution of cadherin-mediated interactions sets the direction of the centrosome-nucleus polarity axis in astrocytes. As a consequence, cells that cannot maintain N-cadherin-mediated junctions are unable to polarize properly. We propose that this causes frequent changes in the orientation of the polarity axis and, in consequence, in the direction of migration. A similar behaviour is observed in glioma cells that express low levels of cadherins. In these cells the centrosome is mispositioned and the direction of migration induced by wounding continuously varies (Fig.1A, lower panel). Importantly, re-expression of N-cadherin in glioma cells restores centrosome orientation and normal cell polarity, indicating that the decrease in N-cadherin levels is a major event leading to perturbation of cell polarity in glioma cells.

How cadherins actually control front-rear polarity during collective migration is still not fully understood. In fact, integrins signalling has been previously shown to be required for polarization of migrating astrocytes^{39 40}. Formation of new focal adhesions is restricted to the leading edge. Integrin signalling leads to the polarized recruitment and activation of the polarity complex Par6-aPKC via the small G protein, Cdc42 (Fig.1B). In gliomas or in N-cadherin depleted astrocytes, the distribution of focal adhesions is not polarized. The presence of adherens junctions normally limits the formation of focal adhesions^{37 41}. Thus, in a confluent monolayer, very few focal adhesions are present. In contrast, in absence of stable adherens junctions, focal adhesions are present all around the cell periphery (Fig.1A upper panel). In these conditions, the release of cell-cell contacts at the wound-edge does not trigger the formation of new integrin-mediated interactions. The recruitment of Cdc42 does not occur and cell orientation remains random.

Conclusion

Our current understanding of the events leading to non-epithelial tumour spreading, such as gliomas, mainly relies on anatomical studies and, more recently, on rodent models and orthotopic xenograft of glioblastoma cells⁴². A better comprehension of the mechanisms responsible for tumour cell migration is essential to find new therapeutic targets and to avoid relapses after classic treatments. Glioma cells can invade and spread into the brain parenchyma over long distances. It is not a metastatic process but an active dissemination either along pre-existing structures such as myelinated axons or perivascular spaces, or through the cerebrospinal fluid⁴³. The therapeutic challenge for glioma invasion is however

the same as for metastatic cancers: it aims at preventing the detachment of cancerous cells from the initial tumour mass to limit their dissemination. Re-introducing N-cadherin in glioma cells *in vitro* rescues glioma cell polarity and limits their migration. These findings need to be validated *in vivo*, but lead us to think that restoring cadherin cell-cell contacts in glioma cells may reduce glioma invasion and could become a new potential therapeutic strategy for glioma treatment.

Acknowledgments :

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur, l'Agence Nationale pour la Recherche, La Ligue contre le Cancer. F.P. is funded by the Association pour la Recherche contre le Cancer. S.E.M. is a member of the EMBO YIP.

References:

1. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003; 302:1704-9.
2. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003; 112:453-65.
3. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996; 84:359-69.
4. Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:133-42.
5. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004; 304:554.
6. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009; 4:127-50.
7. Hayes MP, Wang H, Espinal-Witter R, Douglas W, Solomon GJ, Baker SJ, et al. PIK3CA and PTEN mutations in uterine endometrioid carcinoma and complex atypical hyperplasia. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5932-5.
8. Zutter MM, Santoro SA, Staatz WD, Tsung YL. Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:7411-5.
9. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998; 392:190-3.
10. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* 2008; 68:3645-54.
11. Bacac M, Stamenkovic I. Metastatic cancer cell. *Annu Rev Pathol* 2008; 3:221-47.
12. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 2005; 307:1603-9.
13. Vincan E, Barker N. The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25:657-63.
14. Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*; 10:9-22.
15. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:118-32.
16. Hatta K, Takeichi M. Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature* 1986; 320:447-9.

17. Vleminckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991; 66:107-19.
18. Agiostratidou G, Hult J, Phillips GR, Hazan RB. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2007; 12:127-33.
19. Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 1999; 147:631-44.
20. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1014:155-63.
21. Asano K, Duntsch CD, Zhou Q, Weimar JD, Bordelon D, Robertson JH, et al. Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion. *J Neurooncol* 2004; 70:3-15.
22. Utsuki S, Sato Y, Oka H, Tsuchiya B, Suzuki S, Fujii K. Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in astrocytomas. *J Neurooncol* 2002; 57:187-92.
23. Asano K, Kubo O, Tajika Y, Huang MC, Takakura K, Ebina K, et al. Expression and role of cadherins in astrocytic tumors. *Brain Tumor Pathol* 1997; 14:27-33.
24. Shinoura N, Paradies NE, Warnick RE, Chen H, Larson JJ, Tew JJ, et al. Expression of N-cadherin and alpha-catenin in astrocytomas and glioblastomas. *Br J Cancer* 1995; 72:627-33.
25. Peregó C, Vanoni C, Massari S, Raimondi A, Pola S, Cattaneo MG, et al. Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. *J Cell Sci* 2002; 115:3331-40.
26. Camand E, Peglion F, Osmani N, Sanson M, Etienne-Manneville S. N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration. *J Cell Sci*.
27. Rieger S, Senghaas N, Walch A, Koster RW. Cadherin-2 controls directional chain migration of cerebellar granule neurons. *PLoS Biol* 2009; 7:e1000240.
28. Monier-Gavelle F, Duband JL. Control of N-cadherin-mediated intercellular adhesion in migrating neural crest cells in vitro. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 12):3839-53.
29. Etienne-Manneville S. Control of polarized cell morphology and motility by adherens junctions. *Semin Cell Dev Biol*; 22:850-7.
30. Bryant DM, Mostov KE. From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:887-901.
31. Petronczki M, Knoblich JA. DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 2001; 3:43-9.
32. Tepass U, Theres C, Knust E. crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* 1990; 61:787-99.
33. Bilder D, Perrimon N. Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 2000; 403:676-80.
34. Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, Schwarz H, Gunzel D, Fromm M, et al. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *Embo J* 2005; 24:1146-56.
35. Laprise P, Viel A, Rivard N. Human homolog of disc-large is required for adherens junction assembly and differentiation of human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279:10157-66.

36. Nejsum LN, Nelson WJ. Epithelial cell surface polarity: the early steps. *Front Biosci* 2009; 14:1088-98.
37. Dupin I, Camand E, Etienne-Manneville S. Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity. *J Cell Biol* 2009; 185:779-86.
38. Desai RA, Gao L, Raghavan S, Liu WF, Chen CS. Cell polarity triggered by cell-cell adhesion via E-cadherin. *J Cell Sci* 2009; 122:905-11.
39. Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 2001; 106:489-98.
40. Peng H, Shah W, Holland P, Carbonetto S. Integrins and dystroglycan regulate astrocyte wound healing: the integrin beta1 subunit is necessary for process extension and orienting the microtubular network. *Dev Neurobiol* 2008; 68:559-74.
41. Borghi N, Lowndes M, Maruthamuthu V, Gardel ML, Nelson WJ. Regulation of cell motile behavior by crosstalk between cadherin- and integrin-mediated adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:13324-9.
42. Beadle C, Assanah MC, Monzo P, Vallee R, Rosenfeld SS, Canoll P. The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Mol Biol Cell* 2008; 19:3357-68.
43. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* 2003; 21:1624-36.

Figure legend

Figure 1. N-cadherin expression level affects astrocyte adhesion, polarity and migration.

A. N-cadherin-mediated cell-cell contacts locally inhibit the formation of focal adhesions. As a consequence, glioma cells which express less N-cadherin (right side) have less adherens junctions and more focal adhesion around their periphery than normal astrocytes (left side). During wound healing, normal astrocytes at the wound edge display anisotropic cell-cell contacts. Focal adhesions form and accumulate at the cell wound edge, promoting cell polarization and directed migration. In contrast, in cells lacking N-cadherin, the distribution of focal adhesions is not polarized and the direction of migration is random.

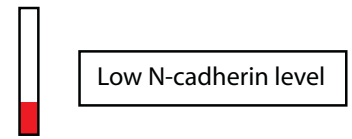
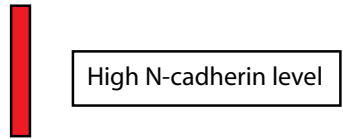
B. In confluent astrocytes, removal of cell-cell contacts by wounding of the monolayer allows the formation of focal adhesion at the wound edge. This induces an intracellular signal promoting the recruitment and activation of the polarity complex Cdc42-Par6-aPKC.

A

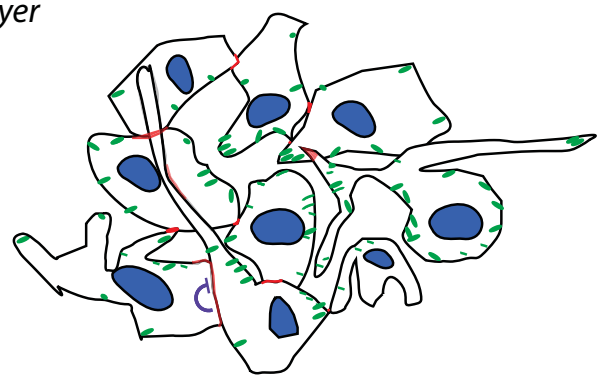
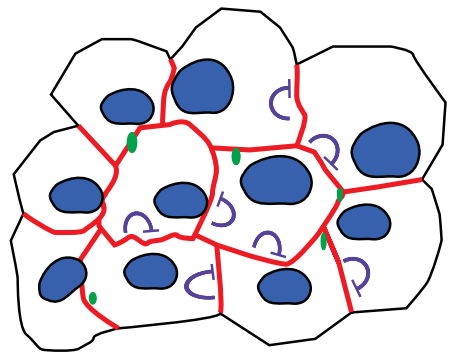
Control glial cells

N-cadherin depleted glial cells

Glioma cells



In confluent monolayer

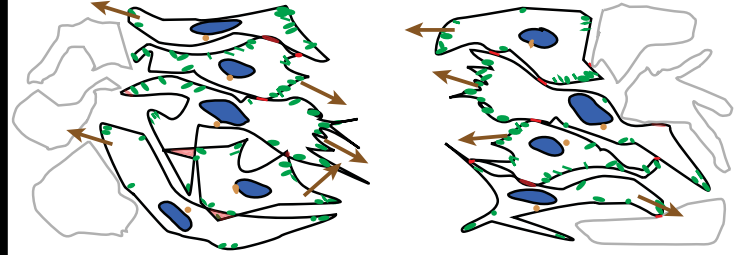
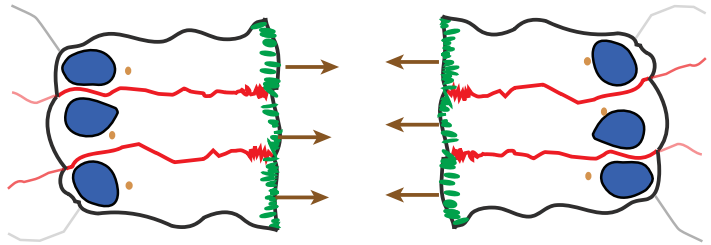


● Nucleus ● Integrin mediated focal adhesion — N-cadherin mediated adherens junction ∩ Inhibition of focal adhesion formation by adherens junction

During wound-induced directed and collective migration

expected direction of migration

Abnormal direction of migration

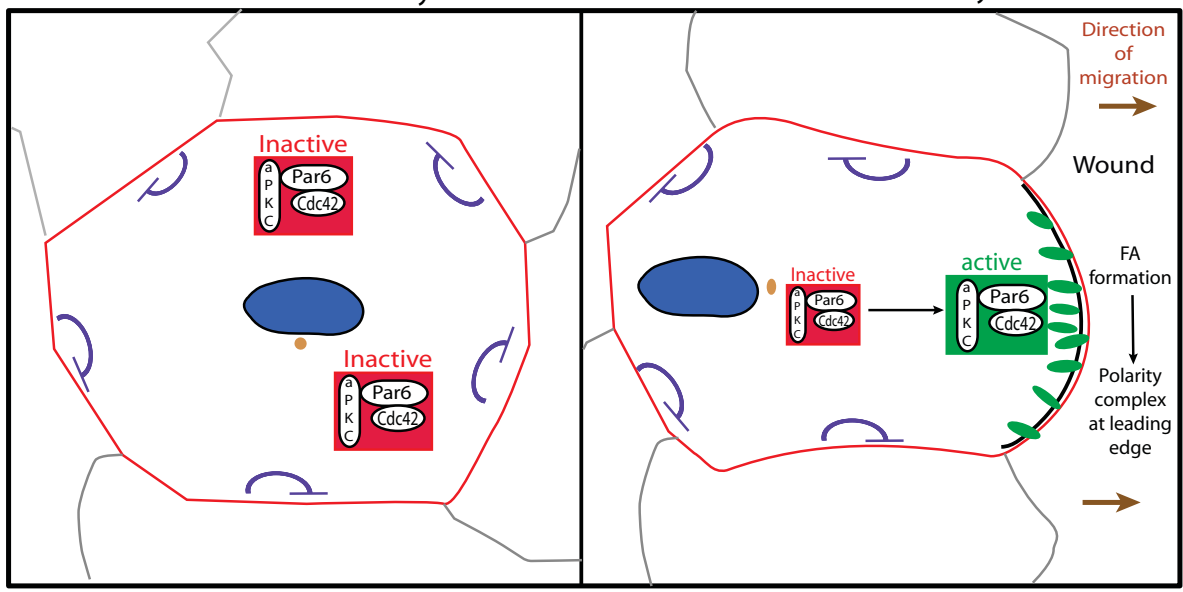


● Nucleus ● Centrosome ● Integrin-mediated focal adhesion — N-cadherin-mediated adherens junction

B

Confluent monolayer

Wounded monolayer



Direction of migration →
Wound
FA formation
Polarity complex at leading edge
→

A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry

Soufiane El Hallani,¹ Blandine Boisselier,¹ Florent Peglion,¹ Audrey Rousseau,² Carole Colin,³ Ahmed Idbaih,^{1,4} Yannick Marie,¹ Karima Mokhtari,² Jean-Léon Thomas,¹ Anne Eichmann,⁵ Jean-Yves Delattre,^{1,4} Andrew J. Maniotis⁶ and Marc Sanson^{1,4}

1 UMR975, Hôpital de la Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 75013 France

2 Service de Neuropathologie Raymond Escourrolle, Hôpital de la Salpêtrière, Paris, 75013 France

3 UMR911-CRO2, Faculté de Médecine Timone, Université de la Méditerranée, Marseille, 13000 France

4 Service de Neurologie Mazarin, Hôpital de la Salpêtrière, Paris, 75013 France

5 INSERM U833, Collège de France, Paris, 75005 France

6 Department of Pathology, University of Illinois at Chicago, IL, 60612 USA

Correspondence to: Dr Soufiane El Hallani,
British Columbia Cancer Research Centre,
Cancer Imaging Department,
675 West 10th Avenue,
Vancouver,
BC V5Z 1L3, Canada
E-mail: soufiane.elhallani@yahoo.ca

Glioblastoma is one of the most angiogenic human tumours and endothelial proliferation is a hallmark of the disease. A better understanding of glioblastoma vasculature is needed to optimize anti-angiogenic therapy that has shown a high but transient efficacy. We analysed human glioblastoma tissues and found non-endothelial cell-lined blood vessels that were formed by tumour cells (vasculogenic mimicry of the tubular type). We hypothesized that CD133⁺ glioblastoma cells presenting stem-cell properties may express pro-vascular molecules allowing them to form blood vessels *de novo*. We demonstrated *in vitro* that glioblastoma stem-like cells were capable of vasculogenesis and endothelium-associated genes expression. Moreover, a fraction of these glioblastoma stem-like cells could transdifferentiate into vascular smooth muscle-like cells. We describe here a new mechanism of alternative glioblastoma vascularization and open a new perspective for the antivascular treatment strategy.

Keywords: glioblastoma; angiogenesis; vasculogenic mimicry; stem cell

Abbreviations: GSC = glioblastoma stem-like cells; PAS = Periodic Acid-Schiff

Introduction

Glioblastomas are the most frequent and malignant primary brain tumours in adults and have a poor prognosis despite surgery and conventional radio-chemotherapy. Histologically, glioblastomas are highly angiogenic and characterized by microvascular proliferations

(Louis *et al.*, 2007). Anti-vascular endothelial growth factor therapy has had significant efficacy in glioblastomas with nearly 50% of responders, but acquired antiangiogenic resistance may occur (Vredenburgh *et al.*, 2007; Kreisl *et al.*, 2009). A better understanding of tumour vascularization is needed to optimize antivascular therapy. Most research has focussed on the role of

angiogenesis involving endothelial cell sprouting and recruitment of new vessels into a tumour from pre-existing vasculature (Ausprunk and Folkman, 1977; Brat and Van Meir, 2001). However, it is known that alternative vascularization mechanisms may occur in brain tumours, resulting in vascular co-option of vessels (Holash *et al.*, 1999), angioblast vasculogenesis (Santarelli *et al.*, 2006), intussusceptive microvascular growth (Kurz *et al.*, 2003) and vasculogenic mimicry. The term vasculogenic mimicry describes the formation of fluid-conducting channels by highly invasive and genetically dysregulated tumour cells. Two distinctive types of vasculogenic mimicry have been reported in tumours. Vasculogenic mimicry of the patterned matrix type in no way resembles blood vessels morphologically: the channels are composed of a basement membrane, lined by tumour cells in their external superficies and no endothelial cells are found on their inner wall despite blood plasma and red blood cells flowing through the channels (Maniotis *et al.*, 1999). In contrast, vasculogenic mimicry of the tubular type may be confused morphologically with endothelial cell-lined blood vessels. Independent observers have previously reported the existence of non-endothelial cell-lined blood channels in tumours (Timar and Toth, 2000; Shirakawa *et al.*, 2002; Folberg and Maniotis, 2004; Van der Schaft *et al.*, 2005) and identified tumour cells as the lining cells of their luminal surface (Liu *et al.*, 2002). Vasculogenic mimicry of the patterned matrix type results in the ability of tumour cells to express endothelium-associated genes that are also involved in embryonic vasculogenesis (Seftor *et al.*, 2002). Such plastic properties could be associated with cancer stem cells, a subpopulation of undifferentiated tumour cells that present with a marked capacity for proliferation, self-renewal, multiple lineage differentiation and tumour initiation (Bonnet and Dick, 1997).

Cancer stem cells have been identified in brain tumours, including glioblastomas (Singh *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2004). The CD133 stem-cell marker has been used prospectively to isolate a small fraction of glioblastoma cells with enhanced stem-cell properties. Vasculogenic mimicry of the patterned matrix type was previously reported in human glioblastoma tissues (Yue *et al.*, 2005) and human glioma cell-line xenografts (Niclou *et al.*, 2008). However, occurrence of vasculogenic mimicry of the tubular type in glioblastomas is still unknown and the vasculogenic capacity of brain tumour stem cells has not been proven. Here, we immunohistochemically analysed human glioblastoma tissues and found non-endothelial cell-lined vessels in a subset of glioblastomas. Combining fluorescent *in situ* hybridization and immunophenotyping, we confirmed that these non-endothelial cell-lined vessels are formed by primary tumour cells. We demonstrated *in vitro* that CD133+ glioblastoma stem-like cells (GSC) were capable of vasculogenesis and vascular smooth muscle-like cell differentiation.

Materials and methods

Glioblastoma tissue preparation

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections (5 µm) from 40 glioblastomas (World Health Organization classification of brain tumours

(Louis *et al.*, 2007) were de-paraffinized twice with xylene. The slides were subsequently hydrated in a series of ethanol solutions (100, 90 and 70%), washed with phosphate-buffered saline and treated with antigen retrieval solution (citrate buffer pH9.0; Dako Cytomation, France) at 96°C for 20 min and then cooled at room temperature for 15 min. Clinical characteristics and sample size of the glioblastoma tissues are shown in Table 1.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry staining we used the Envision+Dual Link System-HRP (DAB +) (Dako Cytomation, France). Slides were incubated for 10 min with 3% hydrogen peroxide in distilled water to block the endogenous peroxidase activity. After three washes with phosphate-buffered saline, they were incubated for 30 min with 5% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline to block non-specific antibody binding. Serial sections were then covered with monoclonal mouse anti-human CD34 or collagen-IV antibody (IgG1, 1:50, Dako Cytomation, France), incubated for 1 h at room temperature, washed in phosphate-buffered saline three times, and incubated subsequently in Envision Polymer for 30 min. Substrate-chromogen solution (DAB) was applied for 5 min and reactions were stopped by distilled water washes. Finally, slides were counterstained with Mayer's haematoxylin for 1 min and cover-slipped with a permanent mounting medium. To highlight matrix-associated vascular channels of glioblastomas, tissues were stained following the Periodic Acid-Schiff (PAS) procedure before counterstaining with Mayer's haematoxylin. These sections were viewed under direct light microscopy.

Fluorescent *in situ* hybridization and immunofluorescence

Sections were immersed for 2 min each in 70, 80 and 100% ethanol and air-dried on a hot plate (45°C) prior to denaturation at 72°C in 70% formamide/2× saline sodium citrate for 5 min. Slides were then placed in 70, 80 and 100% ethanol for 1 min each and then air-dried on a hot plate prior-to-probe application. The *EGFR* fluorescent *in situ* hybridization probe mix (Dako Cytomation, France) was used according to the manufacturer's instructions. The Texas Red-labelled DNA probe that binds to the *EGFR* gene on chromosome 7q11.2 was incubated at 82°C for 5 min and overnight in a humid chamber at 45°C. Following post-hybridization washes with 2× saline sodium citrate, sections were incubated in blocking solution (2% foetal calf serum,

Table 1 Clinical characteristics of glioblastoma tissues

Characteristics	Data
Median age (range)	61.2 (38–85)
M/F	26/14 = 1.8
Median Karnofsky performance Status (range)	80 (30–100)
Median survival (range)	13.3 months (0.5; 185.4)
Chemotherapy	3
Chemotherapy and radiotherapy	19
Radiotherapy	11
Supportive care	7
Biopsy	0
Partial removal	9
Complete removal	31

1% bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100 and 0.05% Tween-20 in phosphate-buffered saline) for 1 h. Monoclonal mouse anti-human α -SMA antibody (IgG2a, 1:50, Dako Cytomation, France) was applied to sections and left overnight at 4°C. Sections were washed three times with phosphate-buffered saline and subsequently incubated with Alexa 488-conjugated goat anti-mouse antibody (1:1000; Molecular Probes, Invitrogen, France) as secondary reagent. Finally, slides were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, France), washed in phosphate-buffered saline and mounted in antifade medium Fluoromount-G (Interchim, France). This method provided clear immunofluorescence staining and fluorescent *in situ* hybridization signals. Slides were examined under a Zeiss AxioImager.Z1 microscope. Fluorescence images were captured using AxioCam MRm camera and analysed with AxioVision Rel. 4.6 software (Carl Zeiss).

Cell cultures

Culture of primary glioblastoma stem-like cells and sphere forming assay

Glioblastoma samples were provided by the local Department of Neurosurgery from patients who had given written and informed consent, as approved by the local research ethics boards at the Salpêtrière Hospital. Histological analyses were done by the Department of Neuropathology. Samples were washed with Hanks' balanced salt solution (Invitrogen, France), dissected, sectioned and enzymatically dissociated with both 5 mg/ml of Trypsin (Sigma-Aldrich, France) and 200 U/ml of DNase (Sigma-Aldrich, France) for 10 min at 37°C. Erythrocytes were lysed using NH₄Cl. The cells were seeded into T75 flasks at 10 000 cells/cm². The culture medium (stem cells medium) consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (Invitrogen, France) supplemented with 20 ng/ml of epidermal growth factor, 20 ng/ml of basic fibroblast growth factor (both from Sigma-Aldrich, France), B27 (1:50; Invitrogen, France) and 1% penicillin–streptomycin. Cultures were incubated in 5% CO₂ at 37°C. After 3 days of culture, CD133 Microbead Kit (Miltenyi Biotech, France) was used to isolate the CD133⁺ tumour cell population according to the manufacturer's instructions. Sorted cells were resuspended in neurosphere medium and maintained in 5% CO₂ at 37°C. Formed primary spheres were harvested, dissociated enzymatically into single cells and plated at a density of 5000 cells/cm² in the presence neurosphere medium. Cultures were fed by changing half of the medium every 3 days. Subsphere-forming assay (also called passage) was repeated every 10 days.

Human cerebral microvascular endothelial cells culture

Immortalized human cerebral microvascular endothelial cells were obtained from Dr Pierre Olivier Couraud (Institut Cochin, France) and cultured with endothelial basal medium EBM-2 (Lonza, France) supplemented with 5% foetal calf serum, 1 ng/ml basic fibroblast growth factor, 10 mM HEPES and 1% penicillin–streptomycin.

Human vascular smooth muscle cells culture

Immortalized human vascular smooth muscle cells were obtained from Dr Luc Mouthon (Institut Cochin, France) and cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum, 10 mM HEPES and 1% penicillin–streptomycin.

U87 cell-line culture

U87 cells were purchased from ATCC and cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum and 1% penicillin–streptomycin.

Primary rat astrocytes culture

Primary rat astrocytes were prepared and cultured as previously described (Etienne-Manneville, 2006).

Lentiviral infection

Green fluorescent protein lentivirus vector construction and virus production were performed by Dr Philippe Ravassard (Pierre and Marie Curie University) as previously described (Russ *et al.*, 2008). Dissociated GSCs were infected with green fluorescent protein-expressing retroviral vector. Labelled cells were selected using a fluorescence-activated cell sorter (FACS Aria, BD Biosciences). The efficiency of transduction was over 80%.

In vitro angiogenesis assay

Vasculogenic tube formation was tested using a commercial Matrigel assay kit (BD Biosciences, France). Green fluorescent protein-expressing GSC were dissociated and resuspended at 6 × 10⁴ cells/ml in endothelial basal medium containing 2% foetal calf serum. Wells of 24-well tissue culture plates were coated with Matrigel (0.1 ml/well, BD Biosciences, France) which was allowed to polymerase at 37°C for 30 min. The indicated cell suspension was then plated at 0.5 ml/well onto the surface of Matrigel and incubated at 37°C. Cells were photographed using Nikon Eclipse TE2000U fluorescence inverted microscope.

Differentiation assay

For neural differentiation, primary glioblastoma spheres were plated onto sterile multiwell glass slide coated with poly-L-ornithine (Sigma-Aldrich, France) in neurosphere medium lacking epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor but supplemented with 10% foetal bovine serum. Cells were fixed after 7 days of differentiation culture with 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with phosphate-buffered saline/0.1% Triton X-100, blocked with phosphate-buffered saline/3% bovine serum albumin for 20 min and immunostained for 1 h with primary antibodies against nestin (1:200; mouse monoclonal IgG1; Santa Cruz Biotechnology, Germany), Sox2 (1:200; mouse monoclonal IgG2a; R&D Systems, France), glial fibrillary acidic protein (1:400; rabbit polyclonal; Dako Cytomation, France) and neuronal class III beta-tubulin-1 (1:500; mouse monoclonal IgG2a; Covance, France). After washes, appropriate secondary antibodies were incubated for 1 h (1:1000; Alexa 594 goat anti-mouse IgG1, Alexa 488 goat anti-mouse IgG2a, Alexa 488 goat anti-rabbit and Alexa 594 goat anti-mouse IgG2a from Molecular Probes, Invitrogen, France). For smooth muscle differentiation, we plated dissociated green fluorescent protein-expressing GSC in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal bovine serum. After 7 days of differentiation culture, cells were fixed sequentially with 4% paraformaldehyde (15 min at room temperature) and methanol (10 min at –20°C). Monoclonal mouse anti-human α -SMA immunostaining was performed as described above. DAPI (Sigma-Aldrich, France) was used for nuclei staining. Slides were mounted in antifade medium Fluoromount-G (Interchim, France) and examined under a Zeiss AxioImager.Z1 microscope.

Western blot

Proteins were run on a Laemmli-type 10% sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted onto nitrocellulose. Blocking of nitrocellulose and immunostaining was performed in a buffer containing 10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5% dry milk and 0.1% Tween-20. The membranes were stained with either the antibodies directed against Nestin (1:5000; VPA5922; AbCyst; France), glial fibrillary acidic protein (1:500; C-19; Santa Cruz Biotechnology, Germany), neuronal class III beta-tubulin-1 (1:5000; Covance; France) or Tubulin (1:2000; MCA77; Serotec, France). Thereafter, the nitrocellulose sheets were incubated with the appropriate secondary antibody horseradish–peroxidase conjugate. The antibody binding was detected using Pierce ECL western blotting substrate according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, France).

Reverse transcriptase–polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from GSC-A, GSC-B, human cerebral microvascular endothelial cells and human vascular smooth muscle cells using RNable (Eurobio, France) and verified by electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer). cDNA was synthesized with 200 units of Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transcriptase (Invitrogen, France) in 15 µl of 1× first-strand buffer (Promega, France) and 2 mmol/l deoxynucleotide triphosphates in the presence of 40 units RNase inhibitor RNasin (Promega), 0.5 µg random primers (Promega) and 1 µg total RNA. Primer sequences synthesized by Invitrogen (France) and used for polymerase chain reaction amplifications are listed in Table 2. The conditions were as follows: 5 min at 94°C for denaturation, followed by 30 s at 94°C, 1 min at 60°C and 1 min 30 s at 72°C for 35 cycles and 7 min at 72°C for final elongation. The reverse transcriptase polymerase chain reaction products were electrophoretically analysed in 1% agarose and visualized by ethidium bromide staining.

Results

We used CD34 staining to identify the endothelium in glioblastoma tissue sections and PAS staining to determine the basement

membrane of tumour blood vessels. Tumour vessels showed positive reaction for CD34 on their luminal surface and PAS-positive reaction in their wall (Fig. 1A). Microvascular proliferations, typically formed by multilayered tufts of endothelial cells, were easily recognized by the CD34–PAS dual staining (Fig. 1B). However, in a subset of glioblastomas, we could find the existence of PAS-positive tubular structures containing red blood cells but lined by CD34⁺ cells in the luminal surface. They varied morphologically from large (Fig. 1C) to small channels (Fig. 1E and G). In order to test if these CD34⁺ cell-lined tubular structures were blood vessels, we immunostained the consecutive histological sections with collagen-IV and found positive reaction in their wall (Fig. 1F and H). A longitudinally sectioned blood vessel with distinctive CD34⁺ and CD34[−] portions was found in one case (Fig. 1D) suggesting a possible anastomosis between CD34⁺ and CD34[−] vessels. These non-endothelial cell-lined vessels were markedly present in several zones of the section in 12.5%, isolated as one or two channels in 45% and totally absent in 42.5% of our glioblastoma tissue series.

We then hypothesized that CD34[−] vessels were lined by tumour cells. We selected paraffin sections from glioblastomas that present several CD34[−] cell-lined vessels (according to our histological analysis) and *EGFR* amplification (according to our Array Comparative Genomic Hybridization (CGHa) database) (Idbaih *et al.*, 2008). We used α -SMA monoclonal antibody to identify vascular smooth muscle cells and fluorescent *in situ* hybridization detection of *EGFR* amplification to identify tumour cells. As shown in Fig. 2A, *EGFR* amplification was detected as double minutes by red hybridization signals in a large proportion of cells present in glioblastoma tissues. α -SMA monoclonal antibody specifically stained vascular smooth muscle cells (Fig. 2B and C). As expected, nuclei of the luminal surface did not harbour *EGFR* amplification in CD34⁺ cell-lined vessels (Fig. 2C). Interestingly, CD34[−] blood vessels were bordered by *EGFR*-amplified cells meaning that they were tumour cells (Fig. 2D). Moreover, some of these tumour cell-lined vessels showed positive α -SMA staining in their wall (Fig. 2E and F) suggesting that they could eventually display the

Table 2 Primers used for reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>CD31</i>	TCCGGATCTATGACTCAGGG	ACAGTTGACCCTCACGATCC
<i>VE-Cadherin</i>	TCCTCTGCATCCTCACTATCACA	GTAAGTGACCAACTGCTCGTGAA
<i>Tie-1</i>	CAAGGTCACACACACGGTGAA	GCCAGTCTAGGGTATTGAAGTAGGA
<i>Tie-2</i>	TACACCTGCCTCATGCTCAG	ATGGCAGACACCATTGTCA
<i>EphA2</i>	ATGGAGCTCCAGGCAGCCCGC	GCCATACGGGTGTGTGAGCCAGC
<i>Laminin 5γ2</i>	AGCAGAAAGCCACGTTGAGT	CAGGGACTTGGTTTTCTCCA
<i>TFPI-1</i>	AGGTTCCCAGCCTTTTTGTT	ATGGATGCATGAATGCAGAA
<i>Desmin</i>	CCAACAAGAACAACGACG	TGGTATGGACCTCAGAACC
α -SMA	CCGACCGAATGCAGAAGGA	ACAGAGATTTGCGTCCGAA
<i>Neuropilin-2</i>	ATGGTTAAAAAGCGCAGGTC	GGACCCCAACTTTGGATT
<i>VEGFR-1</i>	CGCCTTACGGAAGCTCTCT	CCACTCCCTTGAACACGAG
<i>VEGFR-2</i>	CGGAAGAACAATGTAGTCTTTGC	GAACATTTGGAAATCTCTTGC
<i>Endoglin</i>	CACTAGCCAGGTCTCGAAGG	CTGAGGACCAGAAGCACCTC
<i>CD34</i>	CATCACAGAAACGACAGTCAA	ACTCCGCACAGCTGGAGG
<i>GFAP</i>	TCTCTCGGAGTATCTGGAACTG	TTCCCTTCTCTGTCTGAGTCTCA
<i>ALAS</i>	TGCAGTCTCAGGCGAGTCT	TGGCCCAACTTCCATCAT

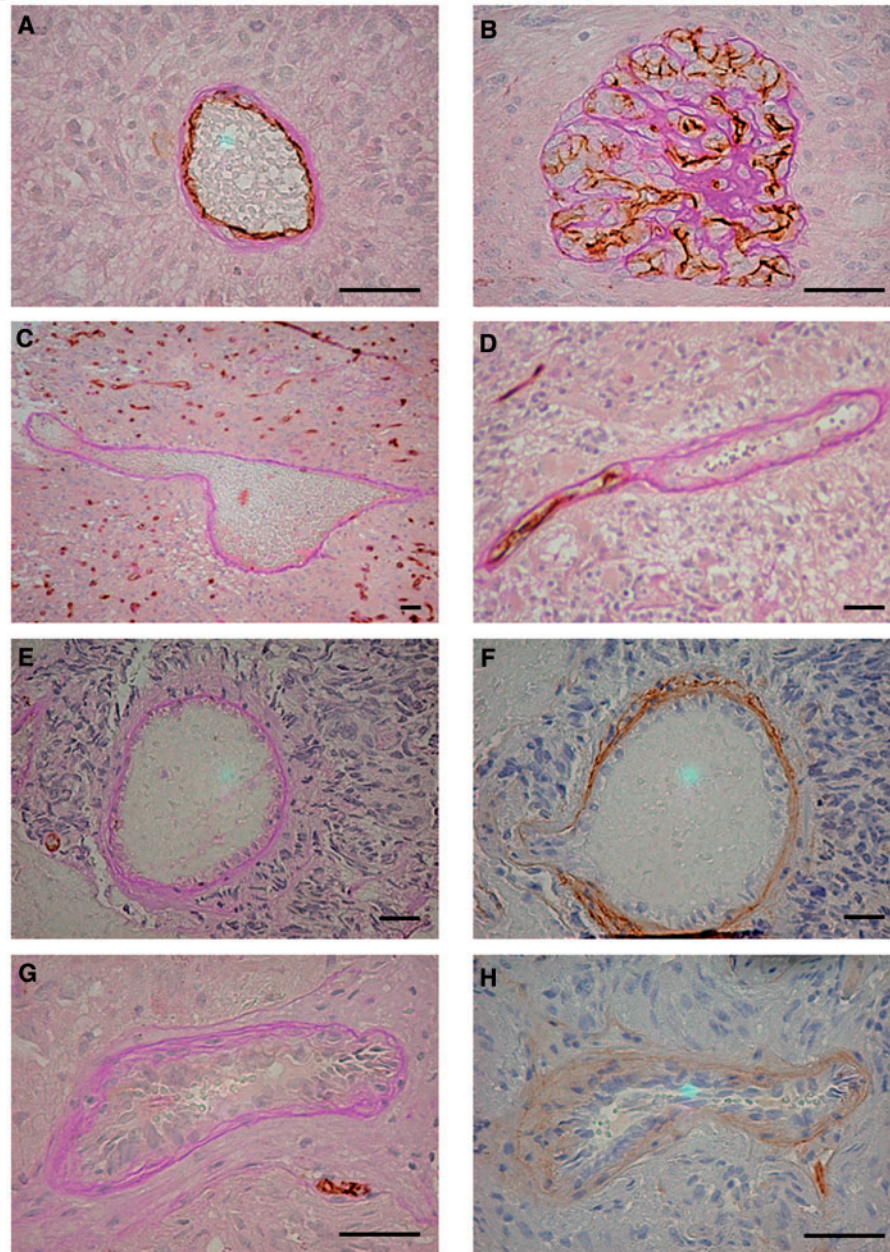


Figure 1 Non-endothelial blood vessels in glioblastoma. Endothelial cells are detected with anti-CD34 immunohistochemistry staining (dark brown) and vascular basement membrane with PAS staining (purple magenta) in (A) tubular blood vessel and (B) microvascular proliferation of glioblastomas. (C) Large vessel containing red blood cells stained positively with PAS but negatively with CD34. (D) Longitudinally sectioned blood vessel presents distinctive CD34⁺ and CD34⁻ portions. (E) and (G) CD34⁻ cell-lined vessels stain with collagen IV in the respective serial sections (F) and (H). Scale bars are 50 μm .

smooth muscle component. Therefore, the non-endothelial cell-lined vessels are channels formed by primary tumour cells.

We established two CD133+ glioblastoma stem-like cell cultures (GSC-A and GSC-B) that demonstrated growth into tumour spheres (Fig. 3A). They were generated from solid primary adult glioblastomas carrying *EGFR* amplification and showed conservative genomic profile in culture (Fig. 3B). Undifferentiated tumour spheres immunostained for Nestin and Sox2 (characteristic neural stem-cell markers) and revealed multilineage potential (expression of glial fibrillary acidic protein for astrocytes and neuronal class III beta-tubulin-1 for neurons) at the differentiation assay (Fig. 3C).

In addition, the ability of GSC to express markers from neural stem-cell lineage was validated by western blot (Fig. 3D).

To investigate the capacity of different GSC to display vasculogenesis *in vitro*, we used 3D Matrigel tube formation assays for direct comparison between GSC-A (derived from glioblastomas that contained tumour cell-lined vessels) and GSC-B (derived from glioblastomas that did not contain tumour cell-lined vessels at the histological analysis). GSC-A underwent a dramatic reorganization and formed efficiently a vasculogenic network of tubular structures within 2 days. In contrast, GSC-B formed hardly any structures even after 7 days (Fig. 4A).

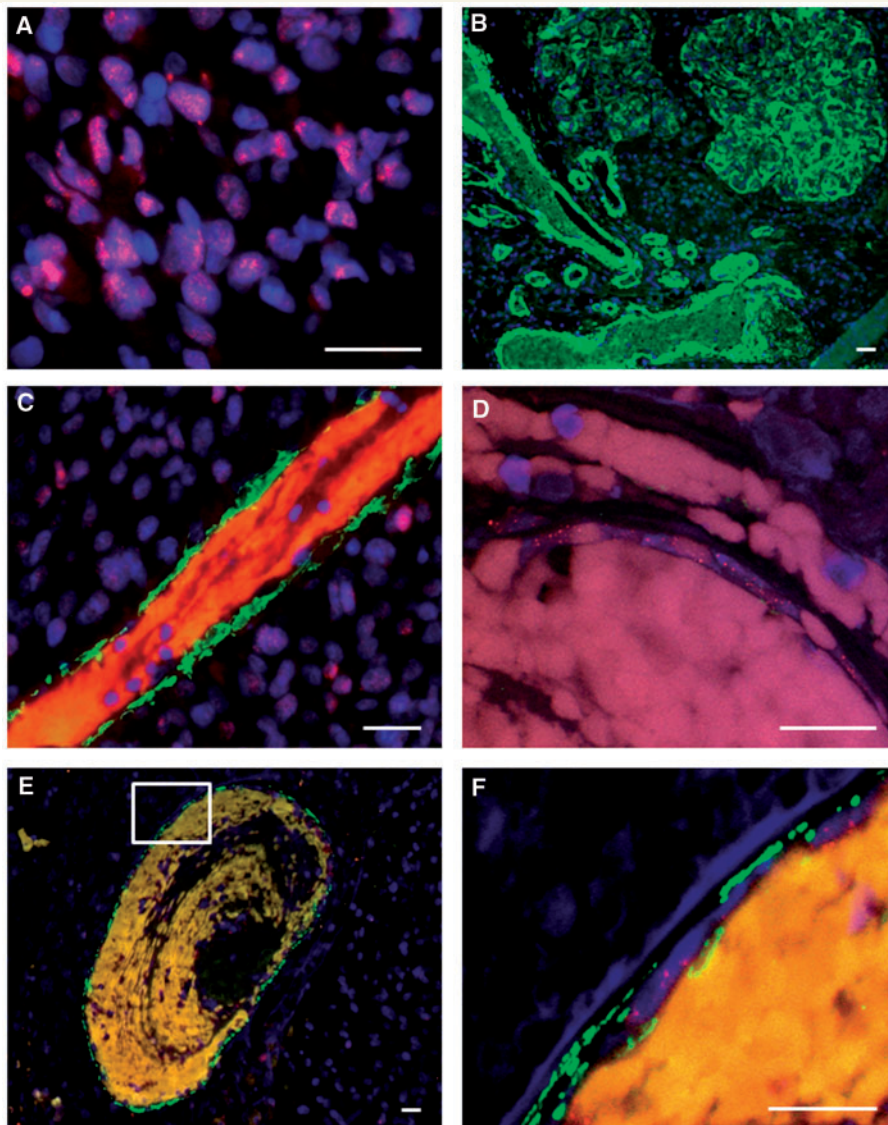


Figure 2 The tubular type vasculogenic mimicry in glioblastoma. (A) Nuclei are stained with DAPI (blue), fluorescent *in situ* hybridization *EGFR* probe (red) label tumour cells carrying *EGFR* amplification as double minutes (display multiple red signals). (B) Vascular smooth muscle cells are detected by anti- α -SMA immunofluorescence staining. (C) Nuclei of the vessel luminal surface do not harbour *EGFR* amplification. (D) Tumour cells carrying *EGFR* amplifications are visible in the luminal surface of a glioblastoma vessel. (E) The wall of an *EGFR* amplified cell-lined blood vessel presents α -SMA staining. Details of area delineated in (E) are enlarged in (F). Scale bars are 25 μ m.

Undifferentiated and dissociated GSC-A were then cultured with 10% foetal calf serum after basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor withdrawal. After cell differentiation, 1% of GSC-A displayed a flattened morphology and showed α -SMA-stained stress fibres (Fig. 4B). We went on to perform semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction and found that several molecules involved in normal vasculogenesis and vasculogenic mimicry phenomenon were expressed in GSC (including EphA2, Laminin 5 γ 2, tissue factor pathway inhibitor-1, Neuropilin-2 and Endoglin) while major endothelial markers (CD34, CD31) were still lacking (Fig. 4C). Laminin 5 γ 2 expression was lower in GSC-B comparing to GSC-A. Vascular

smooth muscle cell markers, α -SMA and Desmin, were expressed in both differentiated GSC.

Discussion

Here we describe, for the first time, the presence of tubular vessels formed by tumour cells in a subset of glioblastomas. Similar structures presented as 'tumour cell-lined sinuses' or 'blood lakes' have been observed in other human tumours (Kellner, 1941; Warren and Shubik, 1966; Radnot and Antal, 1979; Sato *et al.*, 1982; Konerding *et al.*, 1989). However, these reports failed to go

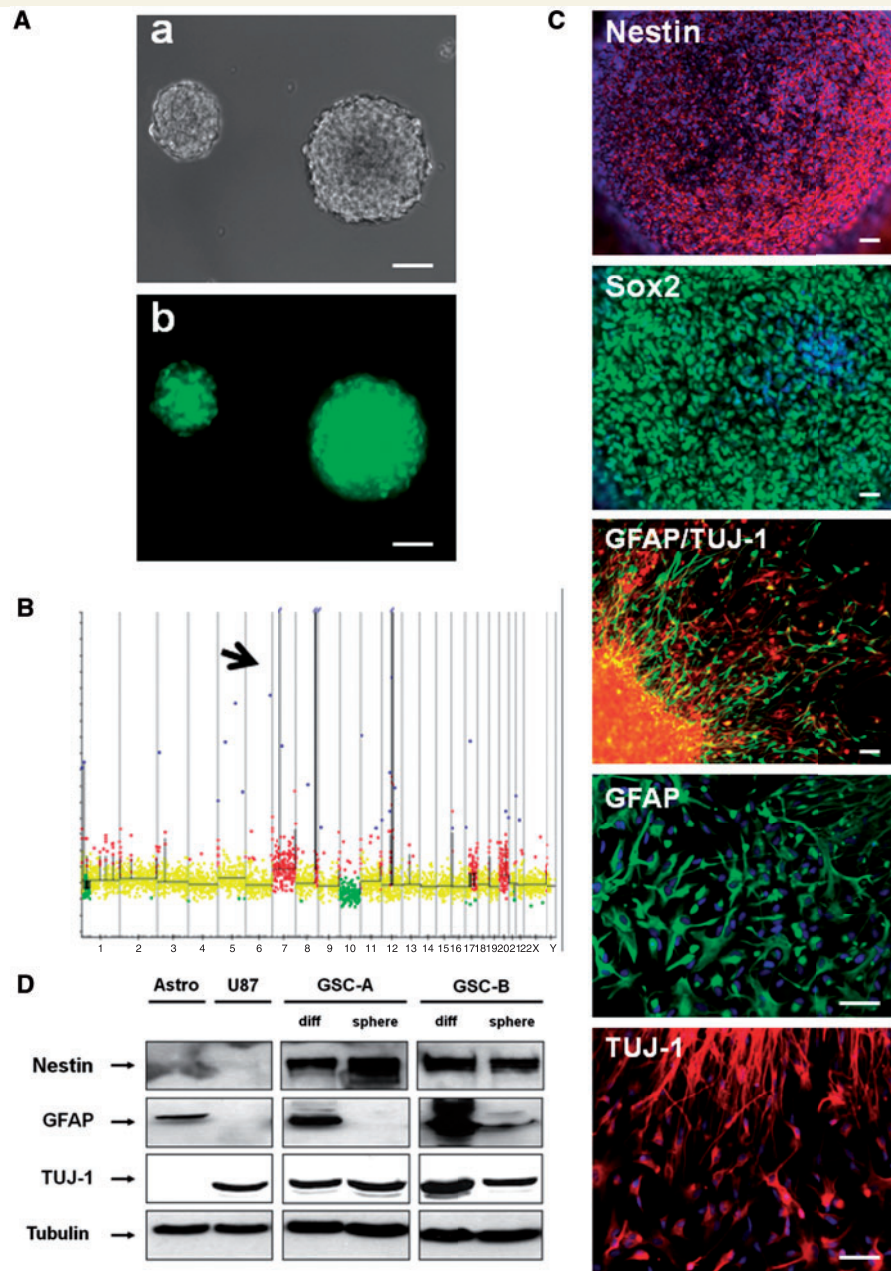


Figure 3 Characterization of glioblastoma stem-like cells. **(A)** Phase contrast (a) and fluorescent (b) microscopy of undifferentiated green fluorescent protein-expressing GSC growing into tumour spheres in neurosphere medium. Phase contrast microscopy of differentiated GSC at the differentiation assay (c). Scale bars are 100 μ m. **(B)** Comparative genomic hybridization of GSC demonstrating tumour genomic alterations. Each bacterial artificial chromosome spotted on the comparative genomic hybridization array is represented by a dot. bacterial artificial chromosomes are ordered on the x-axis according to their position in the genome. For each chromosome the telomere of the short arm is on the left and the telomere of the long arm is on the right. The y-axis corresponds to fluorescence ratio. Yellow, green and red indicate genomic copy number normal, loss and gain, respectively. Genetic alteration includes complete chromosome 10 loss, gain of chromosome 7 with *EGFR* amplification (arrow). **(C)** Immunostaining of tumour cells for neural stem-cell markers (Nestin and Sox2) in the sphere, then astrocytic [glial fibrillary acidic protein (GFAP) in green staining] and neuronal (neuronal class III beta-tubulin-1 in red staining) markers by the differentiated cells around tumour sphere at Day 7. Scale bars are 50 μ m. **(D)** Expression of Nestin, glial fibrillary acidic protein, neuronal class III beta-tubulin-1 and Tubulin by undifferentiated (sphere) and differentiated (diff) GSC were analysed by western blot as described. Extracts from primary rat astrocytes (Astro) and U87 were used as controls. TUJ-1 = neuronal class III beta-tubulin-1.

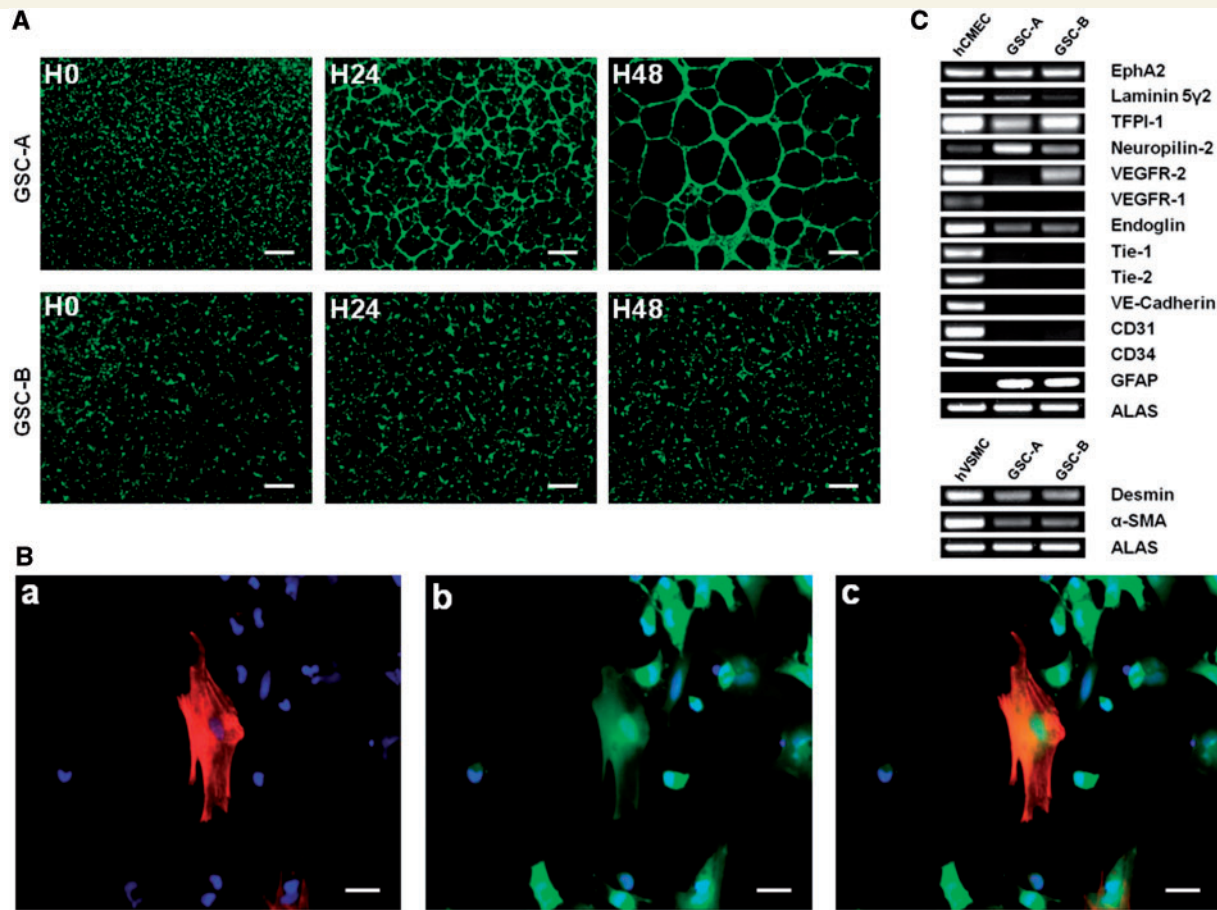


Figure 4 Glioblastoma stem-like cell vasculogenesis. (A) GSC-A and GSC-B are labelled with green fluorescent protein. GSC-A forms tubular structures in 3D culture on Matrigel while green fluorescent protein-expressing GSC-B does not. Scale bars are 250 μm. (B) Green fluorescent protein labelled-GSC-A exhibits a flattened morphology and α-SMA immunofluorescence after differentiation. Scale bars are 20 μm. (C) Expression of endothelial and vascular smooth muscle cell-related genes is measured by semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction in GSC-A and GSC-B compared to human cerebral microvascular endothelial cells and human vascular smooth muscle cells. The housekeeping gene ALAS is used as control.

beyond this phenomenon to prove the vascular nature of these structures, because collections of extravasated erythrocytes could sculpt a path through tumour cells that becomes a conduit for intratumoral blood flow and appears like a blood sinus (Warren and Shubik, 1966; Nasu *et al.*, 1999).

Positive identification of presumptive tumour cell-lined blood vessels in cancers of non-vascular origin should then consider several criteria to argue against the claim that these channels are artefacts (McDonald and Foss, 2000). First, the tubular structures in question must be shown to be blood vessels. Vascular basement membrane, an important structural component of blood vessels, can be identified using immunohistochemistry for collagen-IV as a basal lamina antigen (Franciosi *et al.*, 2007). We showed positive collagen-IV staining in the wall of our tubular structures. Second, the absence of endothelial cell marker is not sufficient. Tumour cells considered to be in contact with the vascular lumen must be positively identified. *EGFR* amplification is one of the most frequent genetic changes in primary glioblastomas (Idbaih *et al.*, 2009) and our GSC showed to contain and maintain *EGFR* amplification, making this a specific marker of tumour cells in

glioblastoma tissues. We identified *EGFR* amplification in the lining-cells of the non-endothelial vessels proving that they were definitely tumour cells. Third, though technically difficult to locate, the interface of tumour cell-lined vessels and endothelial cell-lined vessels would show that the channels are part of the tumour vasculature. We were able to find this interface in one glioblastoma section. Therefore, major criteria are met to provide convincing arguments that the presumptive tubular structures are blood vessels formed by primary tumour cells in glioblastomas.

Several observations reported that tumour cells are located in the walls of tumour blood vessels and form a part of the vessel surface while the remaining part is covered by endothelium. This is known as 'mosaic vessels' where tumour cells undergo intravasation into the lumen and stay temporally in the vessel wall (Chang *et al.*, 2000). The tumour cell-lined vessels that we observed in glioblastomas could be the result of a complete invasion of the vessel wall by tumour cells, perhaps the endpoint of mosaicism. However, from our data we strongly suggest that GSC are capable of forming blood vessels *de novo*. They also have the ability to express endothelium-associated genes including EphA2 (ephrin

receptor), Laminin 5 γ 2 (basement membrane component) and Neuropilin-2 (vascular endothelial growth factor receptor co-receptor). These molecules are required for the formation and maintenance of blood vessels (Serini *et al.*, 2006; Hess *et al.*, 2007; Geretti *et al.*, 2008). At the same time, they are well known to play important roles in nervous system development (Culley *et al.*, 2001; Wilkinson, 2001; Fujisawa *et al.*, 2004). The anatomical structure similarities between the nervous and vascular systems are striking. Over the past decade, it has become apparent that neural and vascular guidance pathways share common signalling mechanisms, including ephrins and neuropilins in particular (Eichmann *et al.*, 2005). It is therefore likely that a subpopulation of glioblastoma cells with neurodevelopmental features makes use of these common neural and vascular patterning tools to develop a proper blood vessel network. Nevertheless, GSCs merely mimic the function of vessels as they do not transdifferentiate into endothelial cells with respect to the lack of major endothelial markers expression. Thus, the term 'tubular vasculogenic mimicry' is appropriate to describe the formation of these vascular channels by tumour cells.

More surprisingly, we found that a fraction of GSC have the capacity to transdifferentiate into smooth muscle-like cells that may constitute part of the tumour cell-lined vessel wall as the essential muscular component. This is consistent with the report that rat foetal brain stem cells can give rise to smooth muscle cells (Tsai *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2009), which have an identical contractile function to vascular smooth muscle cells (Oishi *et al.*, 2002). From our findings, we suggest that GSC are more plastic than previously thought, providing more evidence for their mesenchymal differentiation potential (Tso *et al.*, 2006; Ricci-Vitiani *et al.*, 2008; Rieske *et al.*, 2009).

Traditional anti-vascular therapies aimed at endothelial cells are not effective in blocking tubular network formation by tumour cells (Van der Schaft *et al.*, 2004). Since the vascularization of glioblastomas is heterogeneous, designing a therapeutic approach that targets only angiogenic vessels might result in incomplete therapy. It would be prudent to target tumour cell-lined vessels because they may participate to the antiangiogenic resistance by providing an alternative pathway for glioblastoma vascularization. For instance, Laminin can be a potent target to block both endothelial and non-endothelial tumour vascularization. Down-regulation of Laminin 5 γ 2 resulted in the complete inability of aggressive melanoma cells to form vasculogenic-like networks in tri-dimensional culture (Seftor *et al.*, 2001) which is consistent with the lack of vasculogenic ability in GSC-B that showed low levels of Laminin 5 γ 2 expression.

In conclusion, we describe a new alternative mechanism in glioblastoma vascularization. This finding provides a better comprehension of tumour vascularization and cancer stem-cell plasticity, and has important implications in the treatment strategy. One should evaluate the overall contribution of such tumour cell-formed vessels to glioblastoma blood flow and determine their sensitivity to current antiangiogenic therapies using quantitative methods with appropriate sampling. Also, understanding the influence of the microenvironment in determining the vascular fate of GSC may provide new perspectives on tumour cell plasticity

that could be exploited for novel strategies in cancer differentiation therapy.

Funding

Institut National du Cancer grant (PL 046); Institut de France (Fondation Energie); Association de Recherche contre les Tumeurs Cerebrales (ARTC); Ligue Nationale Contre le Cancer support to S.E.H.

References

- Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977; 14: 53–65.
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730–7.
- Brat DJ, Van Meir EG. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research. *Am J Pathol* 2001; 158: 789–6.
- Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 14608–13.
- Culley B, Murphy J, Babaie J, Nguyen D, Pagel A, Rousselle P, et al. Laminin-5 promotes neurite outgrowth from central and peripheral chick embryonic neurons. *Neurosci Lett* 2001; 301: 83–6.
- Eichmann A, Makinen T, Alitalo K. Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation. *Genes Dev* 2005; 19: 1013–21.
- Etienne-Manneville S. In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. *Methods Enzymol* 2006; 406: 565–78.
- Folberg R, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry. *APMIS* 2004; 112: 508–25.
- Franciosi S, De Gasperi R, Dickstein DL, English DF, Rocher AB, Janssen WG, et al. Pepsin pretreatment allows collagen IV immunostaining of blood vessels in adult mouse brain. *J Neurosci Methods* 2007; 163: 76–82.
- Fujisawa H. Discovery of semaphorin receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development. *J Neurobiol* 2004; 59: 24–33.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004; 64: 7011–21.
- Geretti E, Shimizu A, Klagsbrun M. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis* 2008; 11: 31–9.
- Hess AR, Margaryan NV, Seftor EA, Hendrix MJ. Deciphering the signaling events that promote melanoma tumor cell vasculogenic mimicry and their link to embryonic vasculogenesis: role of the Eph receptors. *Dev Dyn* 2007; 236: 3283–96.
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284: 1994–8.
- Idbaih A, Crinière E, Ligon KL, Delattre O, Delattre JY. Array-based genomics in glioma research. *Brain Pathol* 2009 Mar 3. [Epub ahead of print].
- Idbaih A, Marie Y, Lucchesi C, Pierron G, Manié E, Raynal V, et al. BAC array CGH distinguishes mutually exclusive alterations that define clonogenic subtypes of gliomas. *Int J Cancer* 2008; 122: 1778–86.
- Kellner B. Die Fettmorphologie der Sarkome. *Z Krebsforsch* 1941; 52: 240–46.

- Konerding MA, Steinberg F, Budach V. The vascular system of xenotransplanted tumors—scanning electron and light microscopic studies. *Scanning Microsc* 1989; 3: 327–35.
- Kreisl TN, Kim L, Moore K, Duic P, Royce C, Stroud I, et al. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 740–5.
- Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 2003; 18: 65–70.
- Liu C, Huang H, Donate F, Dickinson C, Santucci R, El Sheikh A, et al. Prostate-specific membrane antigen directed selective thrombotic infarction of tumors. *Cancer Res* 2002; 62: 5470–5.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 11: 97–109.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess AR, Seftor EA, Gardner LMG, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739–52.
- McDonald DM, Foss AJE. Endothelial cells of tumor vessels: Abnormal but not absent. *Cancer Met Rev* 2000; 19: 109–20.
- Nasu R, Kimura H, Akagi K, Murata T, Tanaka Y. Blood flow influences vascular growth during tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 1999; 79: 780–6.
- Niclou SP, Danzeisen C, Eikesdal HP, Wiig H, Brons NH, Poli AM, et al. A novel eGFP-expressing immunodeficient mouse model to study tumor-host interactions. *FASEB J* 2008; 22: 3120–8.
- Oishi K, Ogawa Y, Gamoh S, Uchida MK. Contractile responses of smooth muscle cells differentiated from rat neural stem cells. *J Physiol* 2002; 540: 139–52.
- Radnot M, Antal M. Vessels of intraocular malignant melanomas. *Am J Ophthalmol* 1979; 88: 472–8.
- Ricci-Vitiani L, Pallini R, Larocca LM, Lombardi DG, Signore M, Pierconti F, et al. Mesenchymal differentiation of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ* 2008; 15: 1491–8.
- Rieske P, Golanska E, Zakrzewska M, Piskowski S, Hulas-Bigoszewska K, Wolańczyk M, et al. Arrested neural and advanced mesenchymal differentiation of glioblastoma cells-comparative study with neural progenitors. *BMC Cancer* 2009; 9: 54.
- Russ HA, Bar Y, Ravassard P, Efrat S. In vitro proliferation of cells derived from adult human beta-cells revealed by cell-lineage tracing. *Diabetes* 2008; 57: 1575–83.
- Santarelli JG, Udani V, Yung YC, Cheshier S, Wagers A, Brekken RA, et al. Incorporation of bone marrow-derived Flk-1-expressing CD34+ cells in the endothelium of tumor vessels in the mouse brain. *Neurosurgery* 2006; 59: 374–82.
- Sato T, Takusagawa K, Asoo N, Ajiro F, Shida K, Kumano N, et al. Ultrastructure of the Lewis lung carcinoma. *Eur J Canc Clin Oncol* 1982; 18: 369–76.
- Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LM, Bilban M, et al. Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 2001; 61: 6322–7.
- Seftor EA, Meltzer PS, Schatteman GC, Gruman LM, Hess AR, Kirschmann DA, et al. Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 44: 17–27.
- Serini G, Valdembrì D, Bussolino F. Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp Cell Res* 2006; 312: 651–8.
- Shirakawa K, Wakasugi H, Heike Y, Watanabe I, Yamada S, Saito K, et al. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 99: 821–8.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 5821–8.
- Song Y, Mehta N, Sheh B, Saljoogue F, U HS, Rajasekaran M. Transdifferentiation of rat fetal brain stem cells into penile smooth muscle cells. *BJU Int* 2009; 104: 257–62.
- Timar J, Toth J. Tumor sinuses – vascular channels. *Pathol Oncol Res* 2000; 6: 83–6.
- Tsai RY, McKay RD. Cell contact regulates fate choice by cortical stem cells. *J Neurosci* 2000; 20: 3725–35.
- Tso CL, Shintaku P, Chen J, Liu Q, Liu J, Chen Z, et al. Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 607–19.
- Van der Schaft DW, Hillen F, Pauwels P, Kirschmann DA, Castermans K, Egbrink MG, et al. Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res* 2005; 65: 11520–8.
- Van der Schaft DW, Seftor RE, Seftor EA, Hess AR, Gruman LM, Kirschmann DA, et al. Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1473–7.
- Yokoyama Y, Griffioen AW, Hendrix MJ. Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1473–7.
- Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA, et al. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1253–9.
- Warren BA, Shubik P. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Lab Invest* 1966; 15: 464–78.
- Wilkinson DG. Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 155–64.
- Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2004; 23: 9392–400.
- Yue WY, Chen ZP. Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 997–1002.

ANNEXE TECHNIQUE

MATERIEL ET METHODES

été réalisé grâce au logiciel *Volocity*® 3D couplé à un microscope confocal (Axiovert 200, Zeiss) équipé d'une tête rotative (spinning disk, Yokogawa CSU22, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences). Les images ont été acquises grâce à un objectif à immersion d'huile et enregistrées sur une caméra (C-9100; Hamamatsu Photonics). Les lasers utilisés pour les signaux GFP et Cherry sont de longueur d'ondes respectives 488nm et 543nm.

La photoconversion de Ncad-mEos2 a été réalisée sur ce même microscope en répétant 10 à 20 pulses d'un laser de 405nm à 20% de sa puissance. L'objectif utilisé est un objectif à immersion 63x d'ouverture numérique 1.4.

Les expériences de FRAP ont été réalisées sur ce même microscope. Des zones de 10 à 15µm² ont été éteintes grâce à un pulse de quelques secondes du laser de 488nm à pleine puissance. Les données de FRAP ont été analysées grâce au plugin d'Image J « FRAP profiler ».

Vidéomicroscopie en contraste de phase

Pour analyser les effets des siARNs sur la migration des astrocytes sains et tumoraux, j'ai réalisé des rayures dans des monocouches d'astrocytes ou de cellules de glioblastomes et placé directement ces cellules dans un microscope Zeiss Axiovert 200M équipé d'une chambre thermostatée humide maintenue à 37°C avec 5% de CO₂. Les images ont été acquises grâce à un objectif à sec 10x 0.45-NA et une caméra CCD Hamamatsu ORCA II ER. Les expériences de rescue ont été réalisées grâce à la BioStation IM-Q de Nikon. La migration cellulaire est analysée pendant 24h à raison d'une image prise toutes les 15 à 20 minutes. Les films sont montés grâce au logiciel Image J (W.S. Rasband, ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2005). Enfin, les caractéristiques de migration des cellules sont obtenues grâce à l'analyse manuelle de la trajectoire du noyau de 100 cellules (par condition) se trouvant aux bords de la blessure, grâce au plugin Manual Tracking d'Image J. L'expérience est répétée de 3 à 5 fois.

Immunomarquages

Pour les Western-Blot ou les marquages par immunofluorescence sur cellules fixées, j'ai utilisé les protocoles décrits dans (Camand et al., 2012).

Localisation des protéines au front de migration

Le recrutement des protéines des JAs au front de migration a été quantifié de la manière suivante. Afin d'éviter les marquages faux positifs dus à la formation des ruffles membranaires qui augmentent le volume membranaire et peuvent générer des marquages artéfactuels, j'ai utilisé la GFP ou mCherry comme marqueur de volume. Les cellules sont fixées 8h après initiation de la migration puis marquées par les anticorps appropriés. L'intensité de fluorescence des protéines des JAs est mesurée le long de 3 lignes de 10µm de long tracées au hasard, perpendiculairement au front de migration, et normalisée avec la fluorescence du marqueur de volume le long de ces mêmes traits. Une cellule est dite enrichie en protéines des JAs au front de migration si l'on observe un pic significatif d'intensité au niveau du front de migration, par rapport à un marquage faible dans le cytoplasme proche.

Expériences de colocalisation

Les astrocytes sont nucléofectés avec la Ncad-GFP et la clathrine-mCherry ainsi qu'avec les siARN appropriés 3 jours avant l'initiation de la migration. 8h après le début de migration les cellules sont fixées et les signaux fluorescents sont comparés pour évaluer la

colocalisation des deux protéines. Brièvement, les images sont seuillées et le plugin « Colocalization analysis » d'image J est appliqué. La colocalisation de la clathrine et de la N-cadhérine est quantifiée à l'avant et à l'arrière de la cellule. Ces deux compartiments cellulaires sont définis en évaluant la longueur de la cellule grâce au marquage membranaire de la Ncad et en divisant la cellule en deux parties égales. Pour chacun de ces compartiments le ratio de cadhérine colocalisée avec la clathrine sur le niveau de cadhérine total aux jonctions intercellulaires est calculé.

qPCR et tests d'invasivité des gliomes

Deux sous-groupes de gliomes de grade II présentant des altérations génétiques notables similaires sont définis en fonction de leur apparence diffuse à l'IRM et pendant la chirurgie, par le Dr Capelle du département de neurochirurgie de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière. La présence d'une tumorothèque conservant la plupart des biopsies des gliomes opérés à l'hôpital depuis presque 20 ans permet cette analyse rétrospective. Les échantillons congelés sont collectés et l'ARN total est extrait grâce au kit RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). La qualité des ARN est évaluée par électrophorèse (BioAnalyser 2100, Agilent technologies). Après la transcription inverse réalisée par la MMLV transcriptase inverse (Life Technologies), les ADNc des différents gliomes sont incubés avec des amorces spécifiques du gène codant pour la p120ctn (QuantiTect primer assay *CTNND1* : NM 001331) ou pour d'autres gènes cibles, en présence d'un mélange SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen). Le niveau d'expression d'ALAS1 est utilisé comme contrôle endogène. L'amplification quantitative se déroule dans une machine MX4000 (Stratagene®, Agilent technologies).

Table des anticorps

Anticorps anti-	Espèce	Monoclonal /Polyclonal	Fournisseur	Immunofluorescence: Fixation+dilution	Western Blot (dilution)
<i>β-actine</i>	Souris	Monoclonal	Sigma	x	1/3000
<i>F-Actine (Phalloïdine)</i>		Anticorps secondaire couplé à la Rhodamine	Invitrogen	PFA + 1/400	x
<i>ARF6</i>	Souris	Monoclonal	AbCam	x	1/400
<i>Pan-cadhérine (CH19)</i>	Souris	Monoclonal	Sigma	PFA + 1/100	1/1000
<i>N-cadhérine</i>	Souris	Monoclonal	BD Biosciences	PFA/Méthanol 1/100	1/2000
<i>N-cadhérine</i>	Lapin	Polyclonal	Abcam	Méthanol 1/100	1/1000
<i>α-caténine</i>	Souris	Monoclonal	BD Biosciences	PFA + 1/50	1/250
<i>αE-caténine</i>	Lapin	Monoclonal	Cell signaling	PFA + 1/100	1/1000
<i>αN-caténine</i>	Lapin	Monoclonal	Cell signaling	PFA + 1/100	1/1000
<i>β-caténine</i>	Souris	Monoclonal	BD Biosciences	PFA/Méthanol + 1/100	1/2000
<i>p120-caténine</i>	Souris	Monoclonal	BD Biosciences	PFA + 1/100	1/1000
<i>p120-caténine</i>	Lapin	Polyclonal	Cell signaling	Méthanol + 1/100	1/1000
<i>p120-caténine Y96</i>	Souris	Monoclonal	BD Biosciences	x	1/1000
<i>p120-caténine Y228</i>	Souris	Monoclonal	BD Biosciences	x	1/1000
<i>p120-caténine T310</i>	Souris	Monoclonal	BD Biosciences	PFA + 1/100	1/10 000
<i>Cdc42</i>	Lapin	Polyclonal	Santa-Cruz	x	1/2000
<i>Clathrine</i>	Souris	Monoclonal	Don de Béatrice Brogard	PFA/Méthanol + 1/100	x
<i>EEA1</i>	Souris	Monoclonal	BD Biosciences	PFA + 1/100	x
<i>GFP</i>	Souris	Monoclonal	Roche	PFA + 1/100	1/1000
<i>GM-130</i>	Souris	Monoclonal	BD Biosciences	PFA + 1/100	x
<i>HA</i>	Rat	Monoclonal	Roche	x	1/2000
<i>Myc (9E10)</i>	Souris	Monoclonal	Santa-Cruz	PFA + 1/100	1/1000
<i>Rab11</i>	Souris	Monoclonal	BD Biosciences	PFA + 1/100	x
<i>Rab5</i>	Souris	Monoclonal	BD Biosciences	PFA + 1/100	x
<i>Péricentrine</i>	Lapin	Polyclonal	BabCo	Méthanol/PFA + 1/200	x
<i>PKCι</i>	Souris	Monoclonal	BD Biosciences	x	1/1000
<i>PKCζ</i>	Lapin	Monoclonal	Cell Signaling	PFA/Méthanol + 1/100	1/1000
<i>Sec-6</i>	Souris	Monoclonal	Stressgen	PFA + 1/100	x
<i>α-tubuline</i>	Rat	Monoclonal	Serotec	Méthanol + 1/200	1/3000

Méthanol= Méthanol absolu pendant, à -20°C pendant 5 minutes.

PFA= Paraformaldéhyde 4 %, à température ambiante pendant 10 minutes

Table des drogues

Drogues	Fournisseur	Concentration utilisée	Cible et effets connus
<i>INHIBITEURS</i>			
<i>Brefeldine-A</i>	Sigma	5µg/ml	Antibiotique inhibant le transport des protéines du réticulum endoplasmique au Golgi.
<i>Cycloheximide</i>	Sigma	20µg/ml	Empêche la synthèse protéique en inhibant la traduction
<i>Cytochalasine D</i>	Sigma	0.8µM	Se lie aux extrémités + des filaments d'actine et empêche leur polymérisation
<i>Dynasore</i>	Sigma	80-100µM	Inhibe la dynamine
<i>LiCl</i>	Merck	20mM	Inhibe GSK-3β
<i>ML-7</i>	Merck	10µM	Inhibe la kinase phosphorylant la chaîne légère régulatrice de la myosine (MLCK): inhibe l'activité de la myosine II.
<i>Nocodazole</i>	Sigma	20µM	Inhibe la polymérisation des microtubules
<i>PKCζ PS</i>	Sigma	10µM	Pseudosubstrat myristoylé de PKCζ bloquant son activité
<i>SB415286</i>	Sigma	20 à 50µM	Inhibe GSK-3β
<i>Y27632</i>	Sigma	10µM	Inhibe ROCK
<i>ANTIBIOTIQUES ET ANTIFONGIQUES</i>			
<i>Pen&Strep</i>	Gibco	1/100	
<i>Fungizone (Amphotericin)</i>	Gibco	25µg/ml	

Table des si ARNs

<i>Cible</i> accession number	Séquence dans le sens positif	Diminution d'expression
<i>N-cadhérine</i> AB017695	AGUGGCAGGUAGCUGUUAAdTdT	80%
<i>P120-caténine (rat)</i> NM-001107740.1	Si p120# 1 UCCUAGGAACUCCACdTdT	55%
	Si p120# 2 UGAAGACUGUAAGCCACGGdTdT	80%
<i>P120-caténine (homme)</i> NM_001085458.1	GAGGAUGACCAGCGUAGUAdTdT	99%
<i>ARF6</i> NM_024152	ACGUGGAGACGGUGACGGAdTdT	(Osmani et al., 2010)
<i>αE-caténine</i> NM_001007145	GGAGAUCUGAUGAAGAGCGdTdT	89%
<i>β-caténine</i>	CUAUCAGGAUGACGCGGAAdTdT	70%
<i>GSK-3β</i>	Si GSK3 β # 1 CUUUAGGACAAGCGAUUUAdTdT	55%
	Si GSK3 β # 2 CCACCGAUUACACGUCUAGdTdT	85%

Constructions utilisées

pLifeAct-Cherry : Don de Dr Mathieu Piel (Riedl et al., 2008)

pClathrine-Cherry : Don de Jean-Philippe Grossier

pRK5-myc-Rab5a^{S34N} : construction du laboratoire

pRcCMV-p120-1A-HA: Don de A.B Reynolds (Reynolds et al., 1992), p120 isoforme 1 (souris).

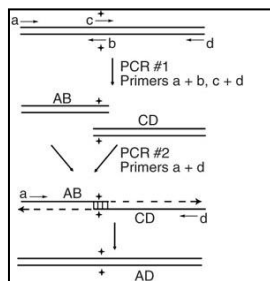
Mutants pRcCMV-p120-1A-HA non phosphorylable (p120^{T310A}) et résistants au sip120#2

Dans un premier temps, j'ai réalisé une mutagenèse dirigée du résidu T310 en remplaçant la thréonine par un résidu alanine dans les plasmides pP120-HA et pP120-GFP ; grâce à l'utilisation des amorces suivantes :

Sens : 5'- GCCCGTCGGACAGGAGCACCCCTCTGACCCTCGA -3'

Antisens : 5'- TCGAGGGTCAGAGGGTGTCTCCTGTCCGACGGGC -3'

Ensuite, aussi bien pour le variant non phosphorylable que pour le plasmide codant pour la p120ctn sauvage, j'ai réalisé une autre mutagenèse dirigée pour rendre ces variants de la p120ctn insensible au siARN si p120#2 utilisé pour réduire la quantité de p120ctn dans les astrocytes (voir tableau siARN pour la séquence du siARN). Pour cela j'ai induit deux mutations silencieuses dans le site ciblé par le sip120#2 via différentes étapes de clonage présentées ci-dessous :



A: 5'-TTGACGTCAATGGGAGTT -3'

B: 5'-CCATTCAATATGCCTCGGCTTACAGTCTTC 3'

C: 5'-GAAGACTGTAAGCCGAGGCATATTGAATGG 3'

D: 5'-GGTACCGTGGCGCTAAATCT-3'

pP120ctn-mEOS2 et pNcad-mEOS2

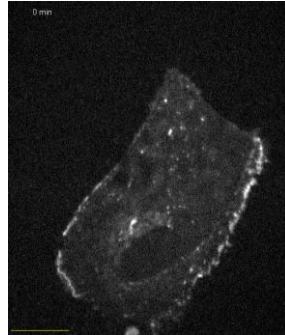
Afin d'obtenir la construction pP120ctn-mEOS2, j'ai utilisé le plasmide pVimentin-mEOS2 (don du Dr Loren Looger (McKinney et al., 2009) ainsi que le plasmide **p120-GFP** (Don du Dr Anne Ridley, p120 isoforme 1 de souris, (Noren et al., 2000)). Tout d'abord j'ai créé le plasmide pmEOS2-N1 vide en digérant par BamH1/Not1 le plasmide **pmCherry-N1** (Clontech) et le plasmide **pVimentin-mEOS2**. Ensuite, grâce à la double digestion EcoR1/SacII des vecteurs pmEOS2-N1 et p120-GFP, j'ai obtenu le vecteur **pP120ctn-mEOS2**.

De même, à partir du plasmide pNcad-GFP (don du Dr Cécile Gauthier-Rouvière, (Mary et al., 2002)) et du plasmide pmEOS2-N1 j'ai obtenu le vecteur **pNcad-mEOS2** en digérant avec le couple d'enzymes AgeI/ApaI.

ANNEXE FILMS

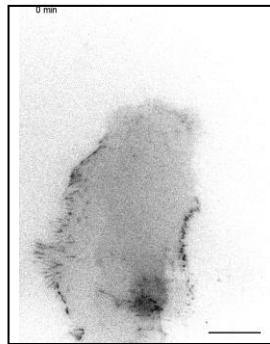
Film 1 : Flux rétrograde de N-cadhérine aux jonctions latérales d'un astrocyte en migration dans un modèle *in vitro* de fermeture de blessure.

La cellule exprimant la Ncad-GFP est en contact à droite et à gauche avec les cellules adjacentes. Elle migre vers le haut de l'image. Noter le treadmilling de la N-cadhérine, particulièrement sur la jonction de droite. Les images sont prises toutes les 12 minutes pendant 6h. Barre d'échelle : 10µm.



Film 2 : Flux rétrograde de N-cadhérine aux jonctions latérales d'un astrocyte en migration dans un modèle *in vitro* de fermeture de blessure.

Astrocyte transfecté avec la Ncad-GFP (fluorescence inversée) en contact à droite et à gauche avec ses cellules adjacentes (jonctions latérales). La cellule migre vers le haut de l'image. Noter le flux rétrograde des jonctions adhérentes pendant la migration. Les images sont prises toutes les 5 minutes, pendant 500 minutes. Barre d'échelle : 10µm.



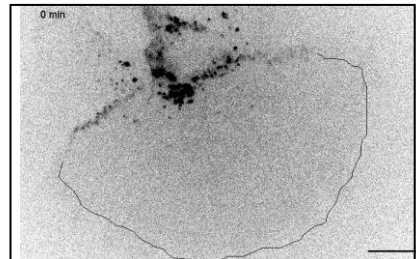
Film 3 : Flux rétrograde de N-cadhérine aux jonctions latérales d'un astrocyte en migration dans un modèle en 3D de migration radiale hors d'un agrégat de cellules.

Astrocyte exprimant la Ncad-GFP en migration hors d'un amas cellulaire, au sein d'une couche de matrigel. Il est en contact en haut et en bas de l'image avec deux autres cellules. Noter le treadmilling de la N-cadhérine particulièrement visible à la jonction du haut. Les images sont prises toutes les 7 minutes pendant 3h. Barre d'échelle : 10µm.



Film 4 : Flux rétrograde de N-cadhérine aux jonctions latérales d'un astrocyte immobile ayant un bord dénué de jonctions adhérentes.

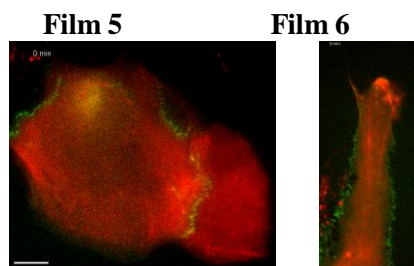
Astrocyte exprimant la Ncad-GFP (fluorescence inversée) étalé sur un micropatron de fibronectine en forme d'îlot où se côtoient quatre astrocytes. Noter un flux rétrograde (ou centripète) de N-cadhérine aux jonctions similaire à celui observé dans les astrocytes en migration. Les images sont prises toutes les 5 minutes pendant 2h30. Le tracé noir représente le bord libre de la cellule. Barre d'échelle : 10µm.



Film 5 et 6: Flux rétrograde des câbles transverses d'actine et de la N-cadhérine dans des astrocytes en migration dans un modèle *in vitro* de fermeture de blessure.

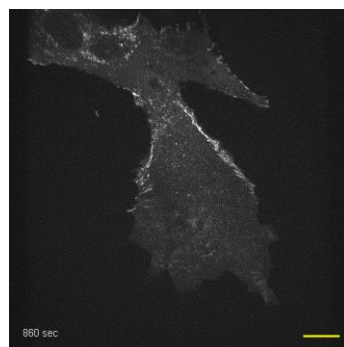
Les cellules exprimant la Ncad-GFP et la lifeAct-mCherry migrent vers le bas de l'image (Film 4) ou vers le haut (Film5). Observer particulièrement dans la cellule de droite du film 5 le flux rétrograde de fibres transverses d'actine jusque vers l'arrière de la cellule. Ce flux rétrograde d'actine est concomitant au flux rétrograde de N-cadhérine à laquelle ces filaments d'actine semblent ancrés.

Les images sont prises toutes les 5 minutes pendant 300 minutes (Film 5) et 2h (Film6). Barres d'échelle : 10µm



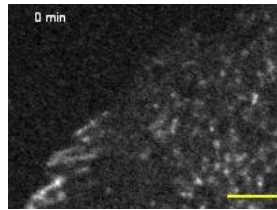
Film 7 : Trafic membranaire polarisé vers le front de migration de la N-cadhérine recyclée.

Astrocyte exprimant la Ncad-GFP migrant (vers le bas de l'image) dans un test de fermeture de blessure *in vitro*. Observer le mouvement rapide des vésicules riches en N-cadhérine de l'arrière de la cellule (haut de l'image) vers l'avant de la cellule (bas de l'image). Les images sont prises toutes les 10secondes pendant 14min et 20s. Barre d'échelle : 10µm.



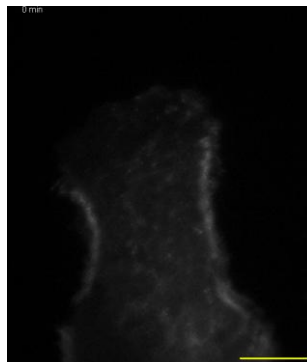
Film 8 : Recrutement de la N-cadhérine du front de migration vers les jonctions latérales en formation lors de la migration cellulaire.

Astrocyte en migration (vers le haut de l'image) dans un test de fermeture de blessure, exprimant la Ncad-mEOS2 non photoconvertie. Noter le recrutement de spots de N-cadhérine du front de migration vers les jonctions en formation sur la gauche de l'image (têtes de flèche grises). Les images sont prises toutes les 3 minutes pendant 2h. Barre d'échelle : 3µm.



Film 9 : Effet de l'inhibition de l'endocytose sur la dynamique de la N-cadhérine pendant la migration.

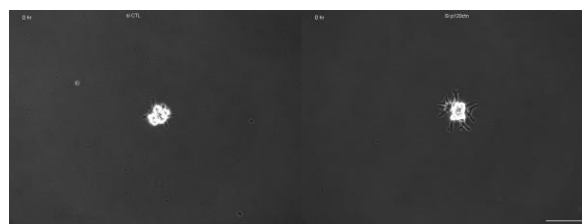
Astrocyte exprimant la N-cadhérine GFP, en migration dans un test de fermeture de blessure. Après 170 minutes de migration dans des conditions standards, un inhibiteur de la dynamine (Dynasore) est ajouté au milieu, à une concentration de 80µM. Observer au bout de 30 minutes l'effet du Dynasore sur la dynamique des JAs. Les JAs à l'avant reculent mais ne sont pas remplacées, laissant une protrusion non adhérente aux cellules voisines, à l'avant. Les images sont prises toutes les 5 minutes pendant 330 minutes au total. Barre d'échelle : 10µm.



Film 10 : Effet de la perte de la p120ctn sur la migration radiale des astrocytes hors d'un amas cellulaire.

Amas cellulaires sphériques d'astrocytes transfectés avec un siCTL (si GFP, gauche) et le sip120#2 (droite) et cultivés dans un milieu dépourvu de sérum mais contenant 20ng/ml d'EGF et de FGF.

Les astrocytes si p120 migrent sur de plus grandes distances que les cellules CTL et se détachent davantage de l'agrégat. Les images sont prises toutes les 15 minutes pendant 10h. Barre d'échelle : 100µm.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, K., and M. Takeichi. 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*. 105:13-9.
- Abercrombie, M., and J.E. Heaysman. 1953. Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. I. Speed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. *Exp Cell Res*. 5:111-31.
- Abercrombie, M., and J.E. Heaysman. 1954. Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. II. Monolayering of fibroblasts. *Exp Cell Res*. 6:293-306.
- Aberle, H., S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler, and H. Hoschuetzky. 1994. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci*. 107 (Pt 12):3655-63.
- Adams, C.L., and W.J. Nelson. 1998. Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol*. 10:572-7.
- Alcantara Llaguno, S., J. Chen, C.H. Kwon, E.L. Jackson, Y. Li, D.K. Burns, A. Alvarez-Buylla, and L.F. Parada. 2009. Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell*. 15:45-56.
- Alema, S., and A.M. Salvatore. 2007. p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue. *Biochim Biophys Acta*. 1773:47-58.
- Alvarez-Buylla, A., and J.M. Garcia-Verdugo. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*. 22:629-34.
- Anastasiadis, P.Z. 2007. p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochim Biophys Acta*. 1773:34-46.
- Anastasiadis, P.Z., S.Y. Moon, M.A. Thoreson, D.J. Mariner, H.C. Crawford, Y. Zheng, and A.B. Reynolds. 2000. Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol*. 2:637-44.
- Anastasiadis, P.Z., and A.B. Reynolds. 2000. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci*. 113 (Pt 8):1319-34.
- Anastasiadis, P.Z., and A.B. Reynolds. 2001. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol*. 13:604-10.
- Aono, S., S. Nakagawa, A.B. Reynolds, and M. Takeichi. 1999. p120(ctn) acts as an inhibitory regulator of cadherin function in colon carcinoma cells. *J Cell Biol*. 145:551-62.
- Araque, A., V. Parpura, R.P. Sanzgiri, and P.G. Haydon. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 22:208-15.
- Arboleda-Estudillo, Y., M. Krieg, J. Stuhmer, N.A. Licata, D.J. Muller, and C.P. Heisenberg. 2010. Movement directionality in collective migration of germ layer progenitors. *Curr Biol*. 20:161-9.
- Arikkath, J., and L.F. Reichardt. 2008. Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 31:487-94.
- Asano, K., C.D. Dunsch, Q. Zhou, J.D. Weimar, D. Bordelon, J.H. Robertson, and T. Pourmotabbed. 2004. Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion. *J Neurooncol*. 70:3-15.
- Asano, K., O. Kubo, Y. Tajika, M.C. Huang, K. Takakura, K. Ebina, and S. Suzuki. 1997. Expression and role of cadherins in astrocytic tumors. *Brain Tumor Pathol*. 14:27-33.
- Bachoo, R.M., E.A. Maher, K.L. Ligon, N.E. Sharpless, S.S. Chan, M.J. You, Y. Tang, J. DeFrances, E. Stover, R. Weissleder, D.H. Rowitch, D.N. Louis, and R.A. DePinho. 2002. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell*. 1:269-77.
- Baldwin, R.M., G.M. Barrett, D.A. Parolin, J.K. Gillies, J.A. Paget, S.J. Lavictoire, D.A. Gray, and I.A. Lorimer. 2010. Coordination of glioblastoma cell motility by PKC ϵ . *Mol Cancer*. 9:233.

- Bao, S., Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, M.W. Dewhirst, D.D. Bigner, and J.N. Rich. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 444:756-60.
- Barami, K., B. Kirschenbaum, V. Lemmon, and S.A. Goldman. 1994. N-cadherin and Ng-CAM/8D9 are involved serially in the migration of newly generated neurons into the adult songbird brain. *Neuron*. 13:567-82.
- Bard, L., C. Boscher, M. Lambert, R.M. Mege, D. Choquet, and O. Thoumine. 2008. A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration. *J Neurosci*. 28:5879-90.
- Battle, E., and D.G. Wilkinson. 2012. Molecular mechanisms of cell segregation and boundary formation in development and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4:a008227.
- Bauer, A., H. Lickert, R. Kemler, and J. Stappert. 1998. Modification of the E-cadherin-catenin complex in mitotic Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem*. 273:28314-21.
- Bauer, H., W. Stelzhammer, R. Fuchs, T.M. Weiger, C. Danninger, G. Probst, and I.A. Krizbai. 1999. Astrocytes and neurons express the tight junction-specific protein occludin in vitro. *Exp Cell Res*. 250:434-8.
- Baum, B., J. Settleman, and M.P. Quinlan. 2008. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 19:294-308.
- Beadle, C., M.C. Assanah, P. Monzo, R. Vallee, S.S. Rosenfeld, and P. Canoll. 2008. The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Mol Biol Cell*. 19:3357-68.
- Beertsen, W., and V. Everts. 1980. Junctions between fibroblasts in mouse periodontal ligament. *J Periodontal Res*. 15:655-68.
- Behrens, J., L. Vakaet, R. Friis, E. Winterhager, F. Van Roy, M.M. Mareel, and W. Birchmeier. 1993. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol*. 120:757-66.
- Beier, D., P. Hau, M. Proescholdt, A. Lohmeier, J. Wischhusen, P.J. Oefner, L. Aigner, A. Brawanski, U. Bogdahn, and C.P. Beier. 2007. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. 67:4010-5.
- Bello, L., V. Lucini, C. Giussani, G. Carrabba, M. Pluderi, F. Scaglione, G. Tomei, R. Villani, P.M. Black, A. Bikfalvi, and R.S. Carroll. 2003. IS20I, a specific alphavbeta3 integrin inhibitor, reduces glioma growth in vivo. *Neurosurgery*. 52:177-85; discussion 185-6.
- Benjamin, J.M., and W.J. Nelson. 2008. Bench to bedside and back again: molecular mechanisms of alpha-catenin function and roles in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol*. 18:53-64.
- Bennett, M.V., J.E. Contreras, F.F. Bukauskas, and J.C. Saez. 2003. New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci*. 26:610-7.
- Berx, G., A.M. Cleton-Jansen, F. Nollet, W.J. de Leeuw, M. van de Vijver, C. Cornelisse, and F. van Roy. 1995. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *Embo J*. 14:6107-15.
- Berx, G., A.M. Cleton-Jansen, K. Strumane, W.J. de Leeuw, F. Nollet, F. van Roy, and C. Cornelisse. 1996. E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene*. 13:1919-25.
- Berx, G., and F. van Roy. 2009. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a003129.

- Birchmeier, W., and J. Behrens. 1994. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*. 1198:11-26.
- Boda-Heggemann, J., A. Regnier-Vigouroux, and W.W. Franke. 2009. Beyond vessels: occurrence and regional clustering of vascular endothelial (VE-)cadherin-containing junctions in non-endothelial cells. *Cell Tissue Res*. 335:49-65.
- Boggon, T.J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B.M. Gumbiner, and L. Shapiro. 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science*. 296:1308-13.
- Boguslavsky, S., I. Grosheva, E. Landau, M. Shtutman, M. Cohen, K. Arnold, E. Feinstein, B. Geiger, and A. Bershadsky. 2007. p120 catenin regulates lamellipodial dynamics and cell adhesion in cooperation with cortactin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:10882-7.
- Boscher, C., and R.M. Mege. 2008. Cadherin-11 interacts with the FGF receptor and induces neurite outgrowth through associated downstream signalling. *Cell Signal*. 20:1061-72.
- Bradbury, M.W. 1985. The blood-brain barrier. Transport across the cerebral endothelium. *Circ Res*. 57:213-22.
- Bralten, L.B., A.M. Gravendeel, N.K. Kloosterhof, A. Sacchetti, T. Vrijenhoek, J.A. Veltman, M.J. van den Bent, J.M. Kros, C.C. Hoogenraad, P.A. Sillevius Smitt, and P.J. French. 2010. The CASPR2 cell adhesion molecule functions as a tumor suppressor gene in glioma. *Oncogene*. 29:6138-48.
- Brasch, J., O.J. Harrison, B. Honig, and L. Shapiro. 2012. Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends Cell Biol*.
- Brugmans, M., J.J. Cassiman, and H. van den Berghe. 1978. Selective adhesion and impaired adhesive properties of transformed cells. *J Cell Sci*. 33:121-32.
- Bruzzone, R., T.W. White, and D.L. Paul. 1996. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem*. 238:1-27.
- Bryant, D.M., M.C. Kerr, L.A. Hammond, S.R. Joseph, K.E. Mostov, R.D. Teasdale, and J.L. Stow. 2007. EGF induces macropinocytosis and SNX1-modulated recycling of E-cadherin. *J Cell Sci*. 120:1818-28.
- Buffo, A., C. Rolando, and S. Ceruti. 2010. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol*. 79:77-89.
- Burk, U., J. Schubert, U. Wellner, O. Schmalhofer, E. Vincan, S. Spaderna, and T. Brabletz. 2008. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep*. 9:582-9.
- Bushong, E.A., M.E. Martone, and M.H. Ellisman. 2004. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci*. 22:73-86.
- Bushong, E.A., M.E. Martone, Y.Z. Jones, and M.H. Ellisman. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*. 22:183-92.
- Cahoy, J.D., B. Emery, A. Kaushal, L.C. Foo, J.L. Zamanian, K.S. Christopherson, Y. Xing, J.L. Lubischer, P.A. Krieg, S.A. Krupenko, W.J. Thompson, and B.A. Barres. 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci*. 28:264-78.
- Cairncross, G., B. Berkey, E. Shaw, R. Jenkins, B. Scheithauer, D. Brachman, J. Buckner, K. Fink, L. Souhami, N. Laperierre, M. Mehta, and W. Curran. 2006. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol*. 24:2707-14.

- Calautti, E., S. Cabodi, P.L. Stein, M. Hatzfeld, N. Kedersha, and G. Paolo Dotto. 1998. Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 141:1449-65.
- Camand, E., F. Peglion, N. Osmani, M. Sanson, and S. Etienne-Manneville. 2012. N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration. *J Cell Sci.* 125:844-57.
- Canel, M., A. Serrels, K.I. Anderson, M.C. Frame, and V.G. Brunton. 2010. Use of photoactivation and photobleaching to monitor the dynamic regulation of E-cadherin at the plasma membrane. *Cell Adh Migr.* 4:491-501.
- Cano, A., M.A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M.J. Blanco, M.G. del Barrio, F. Portillo, and M.A. Nieto. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2:76-83.
- Caswell, P.T., S. Vadrevu, and J.C. Norman. 2009. Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:843-53.
- Cavallaro, U., and G. Christofori. 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* 4:118-32.
- Cavey, M., M. Rauzi, P.F. Lenne, and T. Lecuit. 2008. A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin. *Nature.* 453:751-6.
- Charles, A.C., J.E. Merrill, E.R. Dirksen, and M.J. Sanderson. 1991. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron.* 6:983-92.
- Charrasse, S., F. Comunale, E. Gilbert, O. Delattre, and C. Gauthier-Rouviere. 2004. Variation in cadherins and catenins expression is linked to both proliferation and transformation of Rhabdomyosarcoma. *Oncogene.* 23:2420-30.
- Chen, X., S. Kojima, G.G. Borisy, and K.J. Green. 2003. p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol.* 163:547-57.
- Chen, Y.T., D.B. Stewart, and W.J. Nelson. 1999. Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *J Cell Biol.* 144:687-99.
- Chen, Z.L., X.H. Zhao, J.W. Wang, B.Z. Li, Z. Wang, J. Sun, F.W. Tan, D.P. Ding, X.H. Xu, F. Zhou, X.G. Tan, J. Hang, S.S. Shi, X.L. Feng, and J. He. 2011. microRNA-92a promotes lymph node metastasis of human esophageal squamous cell carcinoma via E-cadherin. *J Biol Chem.* 286:10725-34.
- Chiasson, C.M., K.B. Wittich, P.A. Vincent, V. Faundez, and A.P. Kowalczyk. 2009. p120-catenin inhibits VE-cadherin internalization through a Rho-independent mechanism. *Mol Biol Cell.* 20:1970-80.
- Christiansen, J.J., and A.K. Rajasekaran. 2006. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* 66:8319-26.
- Christofori, G. 2006. New signals from the invasive front. *Nature.* 441:444-50.
- Chu, Y.S., O. Eder, W.A. Thomas, I. Simcha, F. Pincet, A. Ben-Ze'ev, E. Perez, J.P. Thiery, and S. Dufour. 2006. Prototypical type I E-cadherin and type II cadherin-7 mediate very distinct adhesiveness through their extracellular domains. *J Biol Chem.* 281:2901-10.
- Chu, Y.S., W.A. Thomas, O. Eder, F. Pincet, E. Perez, J.P. Thiery, and S. Dufour. 2004. Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *J Cell Biol.* 167:1183-94.
- Ciesiolka, M., M. Delvaeye, G. Van Imschoot, V. Verschuere, P. McCrea, F. van Roy, and K. Vleminckx. 2004. p120 catenin is required for morphogenetic movements involved in

- the formation of the eyes and the craniofacial skeleton in *Xenopus*. *J Cell Sci.* 117:4325-39.
- Claes, A., A.J. Idema, and P. Wesseling. 2007. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol.* 114:443-58.
- Clarke, M.F., J.E. Dick, P.B. Dirks, C.J. Eaves, C.H. Jamieson, D.L. Jones, J. Visvader, I.L. Weissman, and G.M. Wahl. 2006. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 66:9339-44.
- Clay, M.R., and M.C. Halloran. 2010. Regulation of cell adhesions and motility during initiation of neural crest migration. *Curr Opin Neurobiol.* 21:17-22.
- Cleton-Jansen, A.M., D.F. Callen, R. Seshadri, S. Goldup, B. McCallum, J. Crawford, J.A. Powell, C. Settasatian, H. van Beerendonk, E.W. Moerland, V.T. Smit, W.H. Harris, R. Millis, N.V. Morgan, D. Barnes, C.G. Mathew, and C.J. Cornelisse. 2001. Loss of heterozygosity mapping at chromosome arm 16q in 712 breast tumors reveals factors that influence delineation of candidate regions. *Cancer Res.* 61:1171-7.
- Coman, D.R. 1944. Decreased Mutual Adhesiveness, a Property of Cells from Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Res.* 4:625-9.
- Cornell-Bell, A.H., S.M. Finkbeiner, M.S. Cooper, and S.J. Smith. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science.* 247:470-3.
- Cramer, L.P. 1997. Molecular mechanism of actin-dependent retrograde flow in lamellipodia of motile cells. *Front Biosci.* 2:d260-70.
- Cross, D.A., D.R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B.A. Hemmings. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 378:785-9.
- d'Ortho, M.P., H. Stanton, M. Butler, S.J. Atkinson, G. Murphy, and R.M. Hembry. 1998. MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films. *FEBS Lett.* 421:159-64.
- Damsky, C.H., J. Richa, D. Solter, K. Knudsen, and C.A. Buck. 1983. Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell.* 34:455-66.
- Daniel, J.M. 2007. Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochim Biophys Acta.* 1773:59-68.
- Daniel, J.M., and A.B. Reynolds. 1995. The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin. *Mol Cell Biol.* 15:4819-24.
- Davis, M.A., R.C. Ireton, and A.B. Reynolds. 2003. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol.* 163:525-34.
- Davis, M.A., and A.B. Reynolds. 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 Beco, S., C. Gueudry, F. Amblard, and S. Coscoy. 2009. Endocytosis is required for E-cadherin redistribution at mature adherens junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:7010-5.
- De Wever, O., L. Derycke, A. Hendrix, G. De Meerleer, F. Godeau, H. Depypere, and M. Bracke. 2007. Soluble cadherins as cancer biomarkers. *Clin Exp Metastasis.* 24:685-97.
- Delva, E., and A.P. Kowalczyk. 2009. Regulation of cadherin trafficking. *Traffic.* 10:259-67.
- Derksen, P.W., X. Liu, F. Saridin, H. van der Gulden, J. Zevenhoven, B. Evers, J.R. van Beijnum, A.W. Griffioen, J. Vink, P. Krimpenfort, J.L. Peterse, R.D. Cardiff, A. Berns, and J. Jonkers. 2006. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell.* 10:437-49.

- Derycke, L.D., and M.E. Bracke. 2004. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol.* 48:463-76.
- Desai, R.A., L. Gao, S. Raghavan, W.F. Liu, and C.S. Chen. 2009. Cell polarity triggered by cell-cell adhesion via E-cadherin. *J Cell Sci.* 122:905-11.
- Doble, B.W., and J.R. Woodgett. 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 116:1175-86.
- Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell.* 123:903-15.
- Duenisch, P., R. Reichart, U. Mueller, M. Brodhun, R. Bjerkgvig, B. Romeike, J. Walter, C. Herbold, C.R. Regenbrecht, R. Kalff, and S.A. Kuhn. 2010. Neural cell adhesion molecule isoform 140 declines with rise of WHO grade in human gliomas and serves as indicator for the invasion zone of multiform glioblastomas and brain metastases. *J Cancer Res Clin Oncol.* 137:399-414.
- Dupin, I., E. Camand, and S. Etienne-Manneville. 2009. Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity. *J Cell Biol.* 185:779-86.
- Dupin, I., Y. Sakamoto, and S. Etienne-Manneville. 2011. Cytoplasmic intermediate filaments mediate actin-driven positioning of the nucleus. *J Cell Sci.* 124:865-72.
- Dupre-Crochet, S., A. Figueroa, C. Hogan, E.C. Ferber, C.U. Bialucha, J. Adams, E.C. Richardson, and Y. Fujita. 2007. Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol.* 27:3804-16.
- Edelman, G.M., and K.L. Crossin. 1991. Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu Rev Biochem.* 60:155-90.
- Eder, A.M., X. Sui, D.G. Rosen, L.K. Nolden, K.W. Cheng, J.P. Lahad, M. Kango-Singh, K.H. Lu, C.L. Warneke, E.N. Atkinson, I. Bedrosian, K. Keyomarsi, W.L. Kuo, J.W. Gray, J.C. Yin, J. Liu, G. Halder, and G.B. Mills. 2005. Atypical PKC ζ contributes to poor prognosis through loss of apical-basal polarity and cyclin E overexpression in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:12519-24.
- Ekstrand, A.J., N. Sugawa, C.D. James, and V.P. Collins. 1992. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:4309-13.
- El Sayegh, T.Y., P.D. Arora, C.A. Laschinger, W. Lee, C. Morrison, C.M. Overall, A. Kapus, and C.A. McCulloch. 2004. Cortactin associates with N-cadherin adhesions and mediates intercellular adhesion strengthening in fibroblasts. *J Cell Sci.* 117:5117-31.
- El Sayegh, T.Y., A. Kapus, and C.A. McCulloch. 2007. Beyond the epithelium: cadherin function in fibrous connective tissues. *FEBS Lett.* 581:167-74.
- Elia, L.P., M. Yamamoto, K. Zang, and L.F. Reichardt. 2006. p120 catenin regulates dendritic spine and synapse development through Rho-family GTPases and cadherins. *Neuron.* 51:43-56.
- Enterline, H.T., and D.R. Coman. 1950. The ameboid motility of human and animal neoplastic cells. *Cancer.* 3:1033-8.
- Etienne-Manneville, S. 2004. Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic.* 5:470-7.
- Etienne-Manneville, S. 2006. In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. *Methods Enzymol.* 406:565-78.
- Etienne-Manneville, S. 2011. Control of polarized cell morphology and motility by adherens junctions. *Semin Cell Dev Biol.* 22:850-7.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2001a. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell.* 106:489-98.

- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2001b. Integrin-mediated Cdc42 activation controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell*. 106:489-498.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2003a. Cdc42 regulates GSK3 and adenomatous polyposis coli (APC) to control cell polarity. *Nature*. 421:753-756.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2003b. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature*. 421:753-6.
- Etienne-Manneville, S., J.B. Manneville, S. Nicholls, M. Ferenczi, and A. Hall. 2005a. Cdc42 and Par6-PKC ζ regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J. Cell Biol.* 170:895-901.
- Etienne-Manneville, S., J.B. Manneville, S. Nicholls, M.A. Ferenczi, and A. Hall. 2005b. Cdc42 and Par6-PKC ζ regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J Cell Biol.* 170:895-901.
- Even-Ram, S., and K.M. Yamada. 2005. Cell migration in 3D matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 17:524-32.
- Ewald, A.J., A. Brenot, M. Duong, B.S. Chan, and Z. Werb. 2008. Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis. *Dev Cell.* 14:570-81.
- Ewing, C.M., N. Ru, R.A. Morton, J.C. Robinson, M.J. Wheelock, K.R. Johnson, J.C. Barrett, and W.B. Isaacs. 1995. Chromosome 5 suppresses tumorigenicity of PC3 prostate cancer cells: correlation with re-expression of alpha-catenin and restoration of E-cadherin function. *Cancer Res.* 55:4813-7.
- Ezratty, E.J., C. Bertaux, E.E. Marcantonio, and G.G. Gundersen. 2009. Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J Cell Biol.* 187:733-47.
- Faber-Elman, A., A. Solomon, J.A. Abraham, M. Marikovsky, and M. Schwartz. 1996. Involvement of wound-associated factors in rat brain astrocyte migratory response to axonal injury: in vitro simulation. *J Clin Invest.* 97:162-71.
- Farquhar, M.G., and G.E. Palade. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 17:375-412.
- Firtel, R.A., and R. Meili. 2000. Dictyostelium: a model for regulated cell movement during morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 10:421-7.
- Foty, R.A., S.A. Corbett, J.E. Schwarzbauer, and M.S. Steinberg. 1998. Dexamethasone up-regulates cadherin expression and cohesion of HT-1080 human fibrosarcoma cells. *Cancer Res.* 58:3586-9.
- Friedl, P., S. Borgmann, and E.B. Brocker. 2001. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol.* 70:491-509.
- Friedl, P., and D. Gilmour. 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:445-57.
- Friedl, P., and K. Wolf. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 3:362-74.
- Fujita, Y., G. Krause, M. Scheffner, D. Zechner, H.E. Leddy, J. Behrens, T. Sommer, and W. Birchmeier. 2002. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol.* 4:222-31.
- Fukata, M., and K. Kaibuchi. 2001. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:887-97.
- Funamoto, S., R. Meili, S. Lee, L. Parry, and R.A. Firtel. 2002. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell.* 109:611-23.

- Furnari, F.B., T. Fenton, R.M. Bachoo, A. Mukasa, J.M. Stommel, A. Stegh, W.C. Hahn, K.L. Ligon, D.N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R.A. DePinho, and W.K. Cavenee. 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 21:2683-710.
- Gabbiani, G. 1981. The myofibroblast: a key cell for wound healing and fibrocontractive diseases. *Prog Clin Biol Res.* 54:183-94.
- Gaggioli, C., S. Hooper, C. Hidalgo-Carcedo, R. Grosse, J.F. Marshall, K. Harrington, and E. Sahai. 2007. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol.* 9:1392-400.
- Galan, J.M., and R. Haguenaer-Tsapis. 1997. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo J.* 16:5847-54.
- Galli, R., E. Binda, U. Orfanelli, B. Cipelletti, A. Gritti, S. De Vitis, R. Fiocco, C. Foroni, F. Dimeco, and A. Vescovi. 2004. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 64:7011-21.
- Galvez, A.S., A. Duran, J.F. Linares, P. Pathrose, E.A. Castilla, S. Abu-Baker, M. Leitges, M.T. Diaz-Meco, and J. Moscat. 2009. Protein kinase Czeta represses the interleukin-6 promoter and impairs tumorigenesis in vivo. *Mol Cell Biol.* 29:104-15.
- Ganz, A., M. Lambert, A. Saez, P. Silberzan, A. Buguin, R.M. Mege, and B. Ladoux. 2006. Traction forces exerted through N-cadherin contacts. *Biol Cell.* 98:721-30.
- Garrod, D.R., A.J. Merritt, and Z. Nie. 2002. Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol.* 14:537-45.
- Georgiou, M., E. Marinari, J. Burden, and B. Baum. 2008. Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr Biol.* 18:1631-8.
- Giannini, A.L., M. Vivanco, and R.M. Kypta. 2000. alpha-catenin inhibits beta-catenin signaling by preventing formation of a beta-catenin* T-cell factor* DNA complex. *J Biol Chem.* 275:21883-8.
- Giannone, G., R.M. Mege, and O. Thoumine. 2009. Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends Cell Biol.* 19:475-86.
- Giaume, C., and K.D. McCarthy. 1996. Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci.* 19:319-25.
- Giese, A., R. Bjerkvig, M.E. Berens, and M. Westphal. 2003. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol.* 21:1624-36.
- Giese, A., L. Kluwe, B. Laube, H. Meissner, M.E. Berens, and M. Westphal. 1996. Migration of human glioma cells on myelin. *Neurosurgery.* 38:755-64.
- Gilbertson, R.J., and J.N. Rich. 2007. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer.* 7:733-6.
- Gloushankova, N.A., M.F. Krendel, N.O. Alieva, E.M. Bonder, H.H. Feder, J.M. Vasiliev, and I.M. Gelfand. 1998. Dynamics of contacts between lamellae of fibroblasts: essential role of the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4362-7.
- Graff, J.R., J.G. Herman, R.G. Lapidus, H. Chopra, R. Xu, D.F. Jarrard, W.B. Isaacs, P.M. Pitha, N.E. Davidson, and S.B. Baylin. 1995. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res.* 55:5195-9.
- Grosche, J., V. Matyash, T. Moller, A. Verkhratsky, A. Reichenbach, and H. Kettenmann. 1999. Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci.* 2:139-43.
- Grosheva, I., M. Shtutman, M. Elbaum, and A.D. Bershadsky. 2001. p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci.* 114:695-707.

- Groves, M.D., V.K. Puduvalli, C.A. Conrad, M.R. Gilbert, W.K. Yung, K. Jaeckle, V. Liu, K.R. Hess, K.D. Aldape, and V.A. Levin. 2006. Phase II trial of temozolomide plus marimastat for recurrent anaplastic gliomas: a relationship among efficacy, joint toxicity and anticonvulsant status. *J Neurooncol.* 80:83-90.
- Grunwald, G.B., R.S. Pratt, and J. Lilien. 1982. Enzymic dissection of embryonic cell adhesive mechanisms. III. Immunological identification of a component of the calcium-dependent adhesive system of embryonic chick neural retina cells. *J Cell Sci.* 55:69-83.
- Gu, Z., E.H. Noss, V.W. Hsu, and M.B. Brenner. 2011. Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *J Cell Biol.* 193:61-70.
- Guilford, P. 1999. E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today.* 5:172-7.
- Guilford, P., J. Hopkins, J. Harraway, M. McLeod, N. McLeod, P. Harawira, H. Taite, R. Scoular, A. Miller, and A.E. Reeve. 1998. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature.* 392:402-5.
- Gumbiner, B.M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:622-34.
- Gupta, G.P., and J. Massague. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 127:679-95.
- Hadjipanayis, C.G., and E.G. Van Meir. 2009. Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy. *J Mol Med (Berl).* 87:363-74.
- Hajra, K.M., and E.R. Fearon. 2002. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 34:255-68.
- Halassa, M.M., T. Fellin, H. Takano, J.H. Dong, and P.G. Haydon. 2007. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci.* 27:6473-7.
- Hamaguchi, M., N. Matsuyoshi, Y. Ohnishi, B. Gotoh, M. Takeichi, and Y. Nagai. 1993. p60v-src causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *Embo J.* 12:307-14.
- Hardell, L., M. Carlberg, and K. Hansson Mild. 2009. Epidemiological evidence for an association between use of wireless phones and tumor diseases. *Pathophysiology.* 16:113-22.
- Harris, T.J., and M. Peifer. 2005. Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends Cell Biol.* 15:234-7.
- Harris, T.J., and U. Tepass. 2010. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:502-14.
- Hatta, K., and M. Takeichi. 1986. Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature.* 320:447-9.
- Hatzfeld, M. 2005. The p120 family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol.* 84:205-14.
- Hazan, R.B., G.R. Phillips, R.F. Qiao, L. Norton, and S.A. Aaronson. 2000. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol.* 148:779-90.
- Hegi, M.E., A.C. Diserens, T. Gorlia, M.F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J.E. Bromberg, P. Hau, R.O. Mirimanoff, J.G. Cairncross, R.C. Janzer, and R. Stupp. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 352:997-1003.
- Hernandez, M.V., D.P. Wehrendt, and C.O. Arregui. 2010. The protein tyrosine phosphatase PTP1B is required for efficient delivery of N-cadherin to the cell surface. *Mol Biol Cell.* 21:1387-97.

- Hertig, C.M., M. Eppenberger-Eberhardt, S. Koch, and H.M. Eppenberger. 1996. N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. I. Functional role of N-cadherin and impairment of cell-cell contact by a truncated N-cadherin mutant. *J Cell Sci.* 109 (Pt 1):1-10.
- Hidalgo-Carcedo, C., S. Hooper, S.I. Chaudhry, P. Williamson, K. Harrington, B. Leitinger, and E. Sahai. 2011. Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat Cell Biol.* 13:49-58.
- Hinck, L., I.S. Nathke, J. Papkoff, and W.J. Nelson. 1994. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol.* 125:1327-40.
- Hirai, T., and K. Chida. 2003. Protein kinase C ζ (PKC ζ): activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem.* 133:1-7.
- Hirano, S., N. Kimoto, Y. Shimoyama, S. Hirohashi, and M. Takeichi. 1992. Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell.* 70:293-301.
- Hlaihel, C., L. Guilloton, J. Guyotat, N. Streichenberger, J. Honnorat, and F. Cotton. 2010. Predictive value of multimodality MRI using conventional, perfusion, and spectroscopy MR in anaplastic transformation of low-grade oligodendrogliomas. *J Neurooncol.* 97:73-80.
- Holland, E.C., Y. Li, J. Celestino, C. Dai, L. Schaefer, R.A. Sawaya, and G.N. Fuller. 2000. Astrocytes give rise to oligodendrogliomas and astrocytomas after gene transfer of polyoma virus middle T antigen in vivo. *Am J Pathol.* 157:1031-7.
- Hong, S., R.B. Troyanovsky, and S.M. Troyanovsky. 2010. Spontaneous assembly and active disassembly balance adherens junction homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:3528-33.
- Honig, M.G., G.G. Petersen, U.S. Rutishauser, and S.J. Camilli. 1998. In vitro studies of growth cone behavior support a role for fasciculation mediated by cell adhesion molecules in sensory axon guidance during development. *Dev Biol.* 204:317-26.
- Horwitz, A., K. Duggan, C. Buck, M.C. Beckerle, and K. Burridge. 1986. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature.* 320:531-3.
- Horwitz, A.R., and J.T. Parsons. 1999. Cell migration--movin' on. *Science.* 286:1102-3.
- Horwitz, R., and D. Webb. 2003. Cell migration. *Curr Biol.* 13:R756-9.
- Hoshino, T., T. Sakisaka, T. Baba, T. Yamada, T. Kimura, and Y. Takai. 2005. Regulation of E-cadherin endocytosis by nectin through afadin, Rap1, and p120ctn. *J Biol Chem.* 280:24095-103.
- Howarth, A.G., M.R. Hughes, and B.R. Stevenson. 1992. Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *Am J Physiol.* 262:C461-9.
- Hsu, S.N., S. Yonekura, C.Y. Ting, H.M. Robertson, Y. Iwai, T. Uemura, C.H. Lee, and A. Chiba. 2009. Conserved alternative splicing and expression patterns of arthropod N-cadherin. *PLoS Genet.* 5:e1000441.
- Hu, B., B. Shi, M.J. Jarzynka, J.J. Yiin, C. D'Souza-Schorey, and S.Y. Cheng. 2009. ADP-ribosylation factor 6 regulates glioma cell invasion through the IQ-domain GTPase-activating protein 1-Rac1-mediated pathway. *Cancer Res.* 69:794-801.
- Huber, A.H., D.B. Stewart, D.V. Laurents, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2001. The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem.* 276:12301-9.
- Hulpiau, P., and F. van Roy. 2009. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol.* 41:349-69.

- Humbert, P., S. Russell, and H. Richardson. 2003. Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *Bioessays*. 25:542-53.
- Iadecola, C., and M. Nedergaard. 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*. 10:1369-76.
- Iden, S., and J.G. Collard. 2008. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:846-59.
- INTERPHONE. 2010. Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. *Int J Epidemiol*. 39:675-94.
- Inuzuka, H., S. Miyatani, and M. Takeichi. 1991. R-cadherin: a novel Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina. *Neuron*. 7:69-79.
- Ireton, R.C., M.A. Davis, J. van Hengel, D.J. Mariner, K. Barnes, M.A. Thoreson, P.Z. Anastasiadis, L. Matrisian, L.M. Bundy, L. Sealy, B. Gilbert, F. van Roy, and A.B. Reynolds. 2002. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol*. 159:465-76.
- Ishiyama, N., and M. Ikura. 2012. The three-dimensional structure of the cadherin-catenin complex. *Subcell Biochem*. 60:39-62.
- Ishiyama, N., S.H. Lee, S. Liu, G.Y. Li, M.J. Smith, L.F. Reichardt, and M. Ikura. 2010. Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion. *Cell*. 141:117-28.
- Ivanov, D.B., M.P. Philippova, and V.A. Tkachuk. 2001. Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry (Mosc)*. 66:1174-86.
- Iwai, Y., T. Usui, S. Hirano, R. Steward, M. Takeichi, and T. Uemura. 1997. Axon patterning requires DN-cadherin, a novel neuronal adhesion receptor, in the Drosophila embryonic CNS. *Neuron*. 19:77-89.
- Jacinto, A., W. Wood, S. Woolner, C. Hiley, L. Turner, C. Wilson, A. Martinez-Arias, and P. Martin. 2002. Dynamic analysis of actin cable function during Drosophila dorsal closure. *Curr Biol*. 12:1245-50.
- Janda, E., K. Lehmann, I. Killisch, M. Jechlinger, M. Herzig, J. Downward, H. Beug, and S. Grunert. 2002. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol*. 156:299-313.
- Jaulin, F., X. Xue, E. Rodriguez-Boulan, and G. Kreitzer. 2007. Polarization-dependent selective transport to the apical membrane by KIF5B in MDCK cells. *Dev Cell*. 13:511-22.
- Jeanes, A., C.J. Gottardi, and A.S. Yap. 2008. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*. 27:6920-9.
- Jossin, Y., and J.A. Cooper. 2011. Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nat Neurosci*. 14:697-703.
- Jou, T.S., D.B. Stewart, J. Stappert, W.J. Nelson, and J.A. MARRS. 1995. Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:5067-71.
- Kaksonen, M., C.P. Toret, and D.G. Drubin. 2006. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:404-14.
- Kakunaga, S., W. Ikeda, S. Itoh, M. Deguchi-Tawarada, T. Ohtsuka, A. Mizoguchi, and Y. Takai. 2005. Nectin-like molecule-1/TSLL1/SynCAM3: a neural tissue-specific immunoglobulin-like cell-cell adhesion molecule localizing at non-junctional contact sites of presynaptic nerve terminals, axons and glia cell processes. *J Cell Sci*. 118:1267-77.
- Kalluri, R., and R.A. Weinberg. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 119:1420-8.

- Kametani, Y., and M. Takeichi. 2007. Basal-to-apical cadherin flow at cell junctions. *Nat Cell Biol.* 9:92-8.
- Kang, R., J. Wan, P. Arstikaitis, H. Takahashi, K. Huang, A.O. Bailey, J.X. Thompson, A.F. Roth, R.C. Drisdell, R. Mastro, W.N. Green, J.R. Yates, 3rd, N.G. Davis, and A. El-Husseini. 2008. Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation. *Nature.* 456:904-9.
- Kardash, E., M. Reichman-Fried, J.L. Maitre, B. Boldajipour, E. Papusheva, E.M. Messerschmidt, C.P. Heisenberg, and E. Raz. 2010. A role for Rho GTPases and cell-cell adhesion in single-cell motility in vivo. *Nat Cell Biol.* 12:47-53; sup pp 1-11.
- Kawauchi, T., K. Sekine, M. Shikanai, K. Chihama, K. Tomita, K. Kubo, K. Nakajima, Y. Nabeshima, and M. Hoshino. 2010. Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron.* 67:588-602.
- Keirsebilck, A., S. Bonne, K. Staes, J. van Hengel, F. Nollet, A. Reynolds, and F. van Roy. 1998. Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics.* 50:129-46.
- Kelly, B.T., A.J. McCoy, K. Spate, S.E. Miller, P.R. Evans, S. Honing, and D.J. Owen. 2008. A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature.* 456:976-79.
- Kelly, D.E. 1966. Fine structure of desmosomes, hemidesmosomes, and an adepidermal globular layer in developing newt epidermis. *J Cell Biol.* 28:51-72.
- Kim, S.W., J.I. Park, C.M. Spring, A.K. Sater, H. Ji, A.A. Otchere, J.M. Daniel, and P.D. McCrea. 2004. Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin. *Nat Cell Biol.* 6:1212-20.
- Kinch, M.S., G.J. Clark, C.J. Der, and K. Burridge. 1995. Tyrosine phosphorylation regulates the adhesions of ras-transformed breast epithelia. *J Cell Biol.* 130:461-71.
- Ko, K.S., P.D. Arora, and C.A. McCulloch. 2001. Cadherins mediate intercellular mechanical signaling in fibroblasts by activation of stretch-sensitive calcium-permeable channels. *J Biol Chem.* 276:35967-77.
- Kobielak, A., and E. Fuchs. 2004. Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:614-25.
- Koch, A.W., A. Farooq, W. Shan, L. Zeng, D.R. Colman, and M.M. Zhou. 2004. Structure of the neural (N-) cadherin prodomain reveals a cadherin extracellular domain-like fold without adhesive characteristics. *Structure.* 12:793-805.
- Koizume, S., K. Tachibana, T. Sekiya, S. Hirohashi, and M. Shiraishi. 2002. Heterogeneity in the modification and involvement of chromatin components of the CpG island of the silenced human CDH1 gene in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 30:4770-80.
- Koka, V., A. Potti, S.E. Forseen, H. Pervez, G.N. Fraiman, M. Koch, and R. Levitt. 2003. Role of Her-2/neu overexpression and clinical determinants of early mortality in glioblastoma multiforme. *Am J Clin Oncol.* 26:332-5.
- Kolkova, K., V. Novitskaya, N. Pedersen, V. Berezin, and E. Bock. 2000. Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci.* 20:2238-46.
- Kovacs, E.M., R.G. Ali, A.J. McCormack, and A.S. Yap. 2002. E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. *J Biol Chem.* 277:6708-18.
- Kowalczyk, A.P., E.A. Bornslaeger, S.M. Norvell, H.L. Palka, and K.J. Green. 1999. Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int Rev Cytol.* 185:237-302.

- Kowalczyk, A.P., and B.A. Nanes. 2012. Adherens junction turnover: regulating adhesion through cadherin endocytosis, degradation, and recycling. *Subcell Biochem.* 60:197-222.
- Kriegstein, A., and A. Alvarez-Buylla. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.* 32:149-84.
- Kubow, K.E., and A.R. Horwitz. 2011. Reducing background fluorescence reveals adhesions in 3D matrices. *Nat Cell Biol.* 13:3-5; author reply 5-7.
- Kuphal, S., and A.K. Bosserhoff. 2006. Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. *Oncogene.* 25:248-59.
- Ladoux, B., E. Anon, M. Lambert, A. Rabodzey, P. Hersen, A. Buguin, P. Silberzan, and R.M. Mege. 2010. Strength dependence of cadherin-mediated adhesions. *Biophys J.* 98:534-42.
- Lakka, S.S., C.S. Gondi, N. Yanamandra, W.C. Olivero, D.H. Dinh, M. Gujrati, and J.S. Rao. 2004. Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene.* 23:4681-9.
- Lambert, M., D. Choquet, and R.M. Mege. 2002. Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 157:469-79.
- Langevin, J., M.J. Morgan, J.B. Sibarita, S. Aresta, M. Murthy, T. Schwarz, J. Camonis, and Y. Bellaiche. 2005. Drosophila exocyst components Sec5, Sec6, and Sec15 regulate DE-Cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane. *Dev Cell.* 9:365-76.
- Laperriere, N., L. Zuraw, and G. Cairncross. 2002. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol.* 64:259-73.
- Larue, L., M. Ohsugi, J. Hirchenhain, and R. Kemler. 1994. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8263-7.
- Lauffenburger, D.A., and A.F. Horwitz. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 84:359-69.
- Le, T.L., A.S. Yap, and J.L. Stow. 1999. Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol.* 146:219-32.
- Leckband, D., and S. Sivasankar. 2012. Biophysics of cadherin adhesion. *Subcell Biochem.* 60:63-88.
- Leibel, S.A., and G.E. Sheline. 1987. Radiation therapy for neoplasms of the brain. *J Neurosurg.* 66:1-22.
- Leibfried, A., R. Fricke, M.J. Morgan, S. Bogdan, and Y. Bellaiche. 2008. Drosophila Cip4 and WASp define a branch of the Cdc42-Par6-aPKC pathway regulating E-cadherin endocytosis. *Curr Biol.* 18:1639-48.
- Lele, Z., A. Folchert, M. Concha, G.J. Rauch, R. Geisler, F. Rosa, S.W. Wilson, M. Hammerschmidt, and L. Bally-Cuif. 2002. parachute/n-cadherin is required for morphogenesis and maintained integrity of the zebrafish neural tube. *Development.* 129:3281-94.
- Letourneau, P.C., T.A. Shattuck, F.K. Roche, M. Takeichi, and V. Lemmon. 1990. Nerve growth cone migration onto Schwann cells involves the calcium-dependent adhesion molecule, N-cadherin. *Dev Biol.* 138:430-42.
- Li, M., J. Wang, S.S. Ng, C.Y. Chan, M.L. He, F. Yu, L. Lai, C. Shi, Y. Chen, D.T. Yew, H.F. Kung, and M.C. Lin. 2009. Adenosine diphosphate-ribosylation factor 6 is required for epidermal growth factor-induced glioblastoma cell proliferation. *Cancer.* 115:4959-72.
- Ligon, L.A., S. Karki, M. Tokito, and E.L. Holzbaur. 2001. Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nat Cell Biol.* 3:913-7.

- Lim, S.T., K.C. Lim, R.E. Giuliano, and H.J. Federoff. 2008. Temporal and spatial localization of nectin-1 and l-fadin during synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Comp Neurol.* 507:1228-44.
- Lin, C.H., E.M. Espreafico, M.S. Mooseker, and P. Forscher. 1996. Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron.* 16:769-82.
- Lin, C.H., and P. Forscher. 1995. Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron.* 14:763-71.
- Lin, J.H., T. Takano, M.L. Cotrina, G. Arcuino, J. Kang, S. Liu, Q. Gao, L. Jiang, F. Li, H. Lichtenberg-Frate, S. Haubrich, K. Willecke, S.A. Goldman, and M. Nedergaard. 2002. Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J Neurosci.* 22:4302-11.
- Linford, A., S. Yoshimura, R.N. Bastos, L. Langemeyer, A. Gerondopoulos, D.J. Rigden, and F.A. Barr. 2012. Rab14 and Its Exchange Factor FAM116 Link Endocytic Recycling and Adherens Junction Stability in Migrating Cells. *Dev Cell.* 22:952-66.
- Liu, C., J.C. Sage, M.R. Miller, R.G. Verhaak, S. Hippenmeyer, H. Vogel, O. Foreman, R.T. Bronson, A. Nishiyama, L. Luo, and H. Zong. 2011. Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell.* 146:209-21.
- Liu, Y., Q.C. Li, Y. Miao, H.T. Xu, S.D. Dai, Q. Wei, Q.Z. Dong, X.J. Dong, Y. Zhao, C. Zhao, and E.H. Wang. 2009. Ablation of p120-catenin enhances invasion and metastasis of human lung cancer cells. *Cancer Sci.* 100:441-8.
- Liu, Z., J.L. Tan, D.M. Cohen, M.T. Yang, N.J. Sniadecki, S.A. Ruiz, C.M. Nelson, and C.S. Chen. 2010. Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:9944-9.
- Lock, J.G., and J.L. Stow. 2005. Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell.* 16:1744-55.
- Louis, D.N. 2006. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol.* 1:97-117.
- Louis, D.N., H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvet, B.W. Scheithauer, and P. Kleihues. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114:97-109.
- Lu, Z., S. Ghosh, Z. Wang, and T. Hunter. 2003. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell.* 4:499-515.
- Ma, L., J. Young, H. Prabhala, E. Pan, P. Mestdagh, D. Muth, J. Teruya-Feldstein, F. Reinhardt, T.T. Onder, S. Valastyan, F. Westermann, F. Speleman, J. Vandesompele, and R.A. Weinberg. 2010. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol.* 12:247-56.
- Ma, L.W., Z.T. Zhou, Q.B. He, and W.W. Jiang. 2012. Phosphorylated p120-catenin expression has predictive value for oral cancer progression. *J Clin Pathol.* 65:315-9.
- Macpherson, I.R., S. Hooper, A. Serrels, L. McGarry, B.W. Ozanne, K. Harrington, M.C. Frame, E. Sahai, and V.G. Brunton. 2007. p120-catenin is required for the collective invasion of squamous cell carcinoma cells via a phosphorylation-independent mechanism. *Oncogene.* 26:5214-28.
- Maddugoda, M.P., M.S. Crampton, A.M. Shewan, and A.S. Yap. 2007. Myosin VI and vinculin cooperate during the morphogenesis of cadherin cell cell contacts in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol.* 178:529-40.
- Magnus, T., A. Chan, J. Savill, K.V. Toyka, and R. Gold. 2002. Phagocytotic removal of apoptotic, inflammatory lymphocytes in the central nervous system by microglia and its functional implications. *J Neuroimmunol.* 130:1-9.
- Maiden, S.L., and J. Hardin. 2011. The secret life of alpha-catenin: moonlighting in morphogenesis. *J Cell Biol.* 195:543-52.

- Maiden, S.L., and J. Hardin. 2012. The secret life of alpha-catenin: moonlighting in morphogenesis. *J Cell Biol.* 195:543-52.
- Mangold, S., S.K. Wu, S.J. Norwood, B.M. Collins, N.A. Hamilton, P. Thorn, and A.S. Yap. 2011. Hepatocyte growth factor acutely perturbs actin filament anchorage at the epithelial zonula adherens. *Curr Biol.* 21:503-7.
- Manneville, J.B., M. Jehanno, and S. Etienne-Manneville. 2010. Dlg1 binds GKAP to control dynein association with microtubules, centrosome positioning, and cell polarity. *J Cell Biol.* 191:585-98.
- Marambaud, P., P.H. Wen, A. Dutt, J. Shioi, A. Takashima, R. Siman, and N.K. Robakis. 2003. A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell.* 114:635-45.
- Maret, D., E. Gruzglin, M.S. Sadr, V. Siu, W. Shan, A.W. Koch, N.G. Seidah, R.F. Del Maestro, and D.R. Colman. 2010. Surface expression of precursor N-cadherin promotes tumor cell invasion. *Neoplasia.* 12:1066-80.
- Mariner, D.J., P. Anastasiadis, H. Keilhack, F.D. Bohmer, J. Wang, and A.B. Reynolds. 2001. Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120ctn. *J Biol Chem.* 276:28006-13.
- Mariner, D.J., M.A. Davis, and A.B. Reynolds. 2004. EGFR signaling to p120-catenin through phosphorylation at Y228. *J Cell Sci.* 117:1339-50.
- Marks, P.W., and D.J. Kwiatkowski. 1996. Genomic organization and chromosomal location of murine Cdc42. *Genomics.* 38:13-8.
- Martin, K.H., J.K. Slack, S.A. Boerner, C.C. Martin, and J.T. Parsons. 2002. Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science.* 296:1652-3.
- Martin, P., and S.M. Parkhurst. 2003. Development. May the force be with you. *Science.* 300:63-5.
- Martin, P., and S.M. Parkhurst. 2004. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development.* 131:3021-34.
- Martini, F.J., and M. Valdeolmillos. 2010. Actomyosin contraction at the cell rear drives nuclear translocation in migrating cortical interneurons. *J Neurosci.* 30:8660-70.
- Mary, S., S. Charrasse, M. Meriane, F. Comunale, P. Travo, A. Blangy, and C. Gauthier-Rouviere. 2002. Biogenesis of N-cadherin-dependent cell-cell contacts in living fibroblasts is a microtubule-dependent kinesin-driven mechanism. *Mol Biol Cell.* 13:285-301.
- Masai, I., Z. Lele, M. Yamaguchi, A. Komori, A. Nakata, Y. Nishiwaki, H. Wada, H. Tanaka, Y. Nojima, M. Hammerschmidt, S.W. Wilson, and H. Okamoto. 2003. N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites. *Development.* 130:2479-94.
- Massa, P.T., and E. Mugnaini. 1982. Cell junctions and intramembrane particles of astrocytes and oligodendrocytes: a freeze-fracture study. *Neuroscience.* 7:523-38.
- Mathiisen, T.M., K.P. Lehre, N.C. Danbolt, and O.P. Ottersen. 2010. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia.* 58:1094-103.
- Matsukado, Y., C.S. Maccarty, and J.W. Kernohan. 1961. The growth of glioblastoma multiforme (astrocytomas, grades 3 and 4) in neurosurgical practice. *J Neurosurg.* 18:636-44.
- Matsunaga, T., J. Kanzaki, and Y. Hosoda. 1995. Ultrastructure of transitional region of the human eighth cranial nerve. *Acta Otolaryngol Suppl.* 519:149-51.
- Mayerle, J., H. Friess, M.W. Buchler, J. Schnekenburger, F.U. Weiss, K.P. Zimmer, W. Domschke, and M.M. Lerch. 2003. Up-regulation, nuclear import, and tumor growth

- stimulation of the adhesion protein p120 in pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 124:949-60.
- Mayor, R., and C. Carmona-Fontaine. 2010. Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends Cell Biol.* 20:319-28.
- McCrea, P.D., and D. Gu. 2010. The catenin family at a glance. *J Cell Sci.* 123:637-42.
- McEwen, A.E., D.E. Escobar, and C.J. Gottardi. 2012. Signaling from the adherens junction. *Subcell Biochem.* 60:171-96.
- McKinney, S.A., C.S. Murphy, K.L. Hazelwood, M.W. Davidson, and L.L. Looger. 2009. A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nat Methods.* 6:131-3.
- McNeill, H., T.A. Ryan, S.J. Smith, and W.J. Nelson. 1993. Spatial and temporal dissection of immediate and early events following cadherin-mediated epithelial cell adhesion. *J Cell Biol.* 120:1217-26.
- Meng, W., Y. Mushika, T. Ichii, and M. Takeichi. 2008. Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell.* 135:948-59.
- Mitchell, D.A., W. Xie, R. Schmittling, C. Learn, A. Friedman, R.E. McLendon, and J.H. Sampson. 2008. Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma. *Neuro Oncol.* 10:10-8.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1988. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron.* 1:761-72.
- Miyaguchi, K. 2000. Ultrastructure of the zonula adherens revealed by rapid-freeze deep-etching. *J Struct Biol.* 132:169-78.
- Miyashita, Y., and M. Ozawa. 2007a. A dileucine motif in its cytoplasmic domain directs beta-catenin-uncoupled E-cadherin to the lysosome. *J Cell Sci.* 120:4395-406.
- Miyashita, Y., and M. Ozawa. 2007b. Increased internalization of p120-uncoupled E-cadherin and a requirement for a dileucine motif in the cytoplasmic domain for endocytosis of the protein. *J Biol Chem.* 282:11540-8.
- Moreno-Bueno, G., F. Portillo, and A. Cano. 2008. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene.* 27:6958-69.
- Muller, P.A., P.T. Caswell, B. Doyle, M.P. Iwanicki, E.H. Tan, S. Karim, N. Lukashchuk, D.A. Gillespie, R.L. Ludwig, P. Gosselin, A. Cromer, J.S. Brugge, O.J. Sansom, J.C. Norman, and K.H. Vousden. 2009. Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell.* 139:1327-41.
- Munro, H.N., B.S. Baliga, and A.W. Pronczuk. 1968. In vitro inhibition of peptide synthesis and GTP hydrolysis by cycloheximide and reversal of inhibition by glutathione. *Nature.* 219:944-6.
- Nag, S. 2011. Morphology and properties of astrocytes. *Methods Mol Biol.* 686:69-100.
- Nagano, M., D. Hoshino, N. Koshikawa, T. Akizawa, and M. Seiki. 2012. Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *Int J Cell Biol.* 2012:310616.
- Nagy, J.I., D. Patel, P.A. Ochalski, and G.L. Stelmack. 1999. Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience.* 88:447-68.
- Nakada, M., S. Nakada, T. Demuth, N.L. Tran, D.B. Hoelzinger, and M.E. Berens. 2007. Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci.* 64:458-78.
- Nakagawa, S., and M. Takeichi. 1995. Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development.* 121:1321-32.
- Nakopoulou, L., A. Zervas, H. Gakiopoulou-Givalou, C. Constantinides, G. Doumanis, P. Davaris, and C. Dimopoulos. 2000. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, P120ctn in patients with transitional cell bladder cancer. *Anticancer Res.* 20:4571-8.

- Nedergaard, M., B. Ransom, and S.A. Goldman. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26:523-30.
- Neglia, J.P., L.L. Robison, M. Stovall, Y. Liu, R.J. Packer, S. Hammond, Y. Yasui, C.E. Kasper, A.C. Mertens, S.S. Donaldson, A.T. Meadows, and P.D. Inskip. 2006. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst.* 98:1528-37.
- Nern, A., L.V. Nguyen, T. Herman, S. Prakash, T.R. Clandinin, and S.L. Zipursky. 2005. An isoform-specific allele of *Drosophila* N-cadherin disrupts a late step of R7 targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:12944-9.
- Network, T.C.G.A.R. 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 455:1061-8.
- Newman, E.A. 1996. Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium bicarbonate cotransport. *J Neurosci.* 16:159-68.
- Nicole, S., P.S. White, H. Topaloglu, P. Beighon, M. Salih, F. Hentati, and B. Fontaine. 1999. The human CDC42 gene: genomic organization, evidence for the existence of a putative pseudogene and exclusion as a SJS1 candidate gene. *Hum Genet.* 105:98-103.
- Nielsen, S., E.A. Nagelhus, M. Amiry-Moghaddam, C. Bourque, P. Agre, and O.P. Ottersen. 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci.* 17:171-80.
- Nieman, M.T., R.S. Prudoff, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 1999. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol.* 147:631-44.
- Niessen, C.M., and C.J. Gottardi. 2008. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta.* 1778:562-71.
- Niessen, C.M., D. Leckband, and A.S. Yap. 2011. Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev.* 91:691-731.
- Niewiadomska, P., D. Godt, and U. Tepass. 1999. DE-Cadherin is required for intercellular motility during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol.* 144:533-47.
- Noe, V., B. Fingleton, K. Jacobs, H.C. Crawford, S. Vermeulen, W. Steelant, E. Bruyneel, L.M. Matrisian, and M. Mareel. 2001. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci.* 114:111-118.
- Noren, N.K., B.P. Liu, K. Burrige, and B. Kreft. 2000. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol.* 150:567-80.
- Nose, A., K. Tsuji, and M. Takeichi. 1990. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell.* 61:147-55.
- Oberheim, N.A., X. Wang, S. Goldman, and M. Nedergaard. 2006. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci.* 29:547-53.
- Oellers, P., M. Schallenberg, T. Stupp, P. Charalambous, V. Senner, W. Paulus, and S. Thanos. 2009. A coculture assay to visualize and monitor interactions between migrating glioma cells and nerve fibers. *Nat Protoc.* 4:923-7.
- Oh, M., H. Kim, I. Yang, J.H. Park, W.T. Cong, M.C. Baek, S. Bareiss, H. Ki, Q. Lu, J. No, I. Kwon, J.K. Choi, and K. Kim. 2009. GSK-3 phosphorylates delta-catenin and negatively regulates its stability via ubiquitination/proteasome-mediated proteolysis. *J Biol Chem.* 284:28579-89.
- Ohkubo, T., and M. Ozawa. 1999. p120(ctn) binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity. *J Biol Chem.* 274:21409-15.
- Oliveira, C., R. Seruca, and F. Carneiro. 2006. Genetics, pathology, and clinics of familial gastric cancer. *Int J Surg Pathol.* 14:21-33.

- Onishi, M., T. Ichikawa, K. Kurozumi, and I. Date. 2011. Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathol.* 28:13-24.
- Osmani, N., F. Peglion, P. Chavrier, and S. Etienne-Manneville. 2010. Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J Cell Biol.* 191:1261-9.
- Osmani, N., N. Vitale, J.P. Borg, and S. Etienne-Manneville. 2006. Scrib Controls Cdc42 Localization and Activity to Promote Cell Polarization during Astrocyte Migration. *Curr Biol.* 16:2395-405.
- Owens, G.C., E.A. Orr, B.K. DeMasters, R.J. Muschel, M.E. Berens, and C.A. Kruse. 1998. Overexpression of a transmembrane isoform of neural cell adhesion molecule alters the invasiveness of rat CNS-1 glioma. *Cancer Res.* 58:2020-8.
- Palacios, F., L. Price, J. Schweitzer, J.G. Collard, and C. D'Souza-Schorey. 2001. An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *Embo J.* 20:4973-86.
- Palacios, F., J.K. Schweitzer, R.L. Boshans, and C. D'Souza-Schorey. 2002. ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly. *Nat Cell Biol.* 4:929-36.
- Paradies, N.E., and G.B. Grunwald. 1993. Purification and characterization of NCAD90, a soluble endogenous form of N-cadherin, which is generated by proteolysis during retinal development and retains adhesive and neurite-promoting function. *J Neurosci Res.* 36:33-45.
- Pece, S., and J.S. Gutkind. 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.* 275:41227-33.
- Penes, M.C., X. Li, and J.I. Nagy. 2005. Expression of zonula occludens-1 (ZO-1) and the transcription factor ZO-1-associated nucleic acid-binding protein (ZONAB)-MsY3 in glial cells and colocalization at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions in mouse brain. *Eur J Neurosci.* 22:404-18.
- Peng, H., W. Shah, P. Holland, and S. Carbonetto. 2008. Integrins and dystroglycan regulate astrocyte wound healing: the integrin beta1 subunit is necessary for process extension and orienting the microtubular network. *Dev Neurobiol.* 68:559-74.
- Perego, C., C. Vanoni, S. Massari, A. Raimondi, S. Pola, M.G. Cattaneo, M. Francolini, L.M. Vicentini, and G. Pietrini. 2002. Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. *J Cell Sci.* 115:3331-40.
- Perez-Moreno, M., M.A. Davis, E. Wong, H.A. Pasolli, A.B. Reynolds, and E. Fuchs. 2006. p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin. *Cell.* 124:631-44.
- Perez-Moreno, M., C. Jamora, and E. Fuchs. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell.* 112:535-48.
- Perez-Moreno, M., W. Song, H.A. Pasolli, S.E. Williams, and E. Fuchs. 2008. Loss of p120 catenin and links to mitotic alterations, inflammation, and skin cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:15399-404.
- Perl, A.K., P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb, and G. Christofori. 1998. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature.* 392:190-3.
- Petzold, G.C., and V.N. Murthy. 2011. Role of astrocytes in neurovascular coupling. *Neuron.* 71:782-97.
- Phillips, H.S., S. Kharbanda, R. Chen, W.F. Forrest, R.H. Soriano, T.D. Wu, A. Misra, J.M. Nigro, H. Colman, L. Soroceanu, P.M. Williams, Z. Modrusan, B.G. Feuerstein, and K. Aldape. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 9:157-73.

- Piedra, J., S. Miravet, J. Castano, H.G. Palmer, N. Heisterkamp, A. Garcia de Herreros, and M. Dunach. 2003. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol.* 23:2287-97.
- Ponti, A., M. Machacek, S.L. Gupton, C.M. Waterman-Storer, and G. Danuser. 2004. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science.* 305:1782-6.
- Powelka, A.M., J. Sun, J. Li, M. Gao, L.M. Shaw, A. Sonnenberg, and V.W. Hsu. 2004. Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic.* 5:20-36.
- Prag, S., E.A. Lepekhin, K. Kolkova, R. Hartmann-Petersen, A. Kawa, P.S. Walmod, V. Belman, H.C. Gallagher, V. Berezin, E. Bock, and N. Pedersen. 2002. NCAM regulates cell motility. *J Cell Sci.* 115:283-92.
- Prakash, S., J.C. Caldwell, D.F. Eberl, and T.R. Clandinin. 2005. Drosophila N-cadherin mediates an attractive interaction between photoreceptor axons and their targets. *Nat Neurosci.* 8:443-50.
- Prat, A., K. Biernacki, K. Wosik, and J.P. Antel. 2001. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia.* 36:145-55.
- Prokhortchouk, A., B. Hendrich, H. Jorgensen, A. Ruzov, M. Wilm, G. Georgiev, A. Bird, and E. Prokhortchouk. 2001. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev.* 15:1613-8.
- Radice, G.L., H. Rayburn, H. Matsunami, K.A. Knudsen, M. Takeichi, and R.O. Hynes. 1997. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol.* 181:64-78.
- Rappl, A., G. Piontek, and J. Schlegel. 2008. EGFR-dependent migration of glial cells is mediated by reorganisation of N-cadherin. *J Cell Sci.* 121:4089-97.
- Rash, J.E., T. Yasumura, F.E. Dudek, and J.I. Nagy. 2001. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci.* 21:1983-2000.
- Ratcliffe, M.J., L.L. Rubin, and J.M. Staddon. 1997. Dephosphorylation of the cadherin-associated p100/p120 proteins in response to activation of protein kinase C in epithelial cells. *J Biol Chem.* 272:31894-901.
- Raymond, E., A.A. Brandes, C. Dittich, P. Fumoleau, B. Coudert, P.M. Clement, M. Frenay, R. Rampling, R. Stupp, J.M. Kros, M.C. Heinrich, T. Gorlia, D. Lacombe, and M.J. van den Bent. 2008. Phase II study of imatinib in patients with recurrent gliomas of various histologies: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group Study. *J Clin Oncol.* 26:4659-65.
- Regala, R.P., C. Weems, L. Jamieson, A. Khor, E.S. Edell, C.M. Lohse, and A.P. Fields. 2005. Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 65:8905-11.
- Reiss, K., T. Maretzky, A. Ludwig, T. Tousseyn, B. de Strooper, D. Hartmann, and P. Saftig. 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *Embo J.* 24:742-52.
- Reynolds, A.B., J. Daniel, P.D. McCrea, M.J. Wheelock, J. Wu, and Z. Zhang. 1994. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol.* 14:8333-42.
- Reynolds, A.B., L. Herbert, J.L. Cleveland, S.T. Berg, and J.R. Gaut. 1992. p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene.* 7:2439-45.
- Reynolds, A.B., and A. Roczniak-Ferguson. 2004. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene.* 23:7947-56.

- Reynolds, A.B., D.J. Roesel, S.B. Kanner, and J.T. Parsons. 1989. Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol Cell Biol.* 9:629-38.
- Ridley, A.J. 2011. Life at the leading edge. *Cell.* 145:1012-22.
- Ridley, A.J., M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, and A.R. Horwitz. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 302:1704-9.
- Riedl, J., A.H. Crevenna, K. Kessenbrock, J.H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T.A. Holak, Z. Werb, M. Sixt, and R. Wedlich-Soldner. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods.* 5:605-7.
- Rieger, S., N. Senghaas, A. Walch, and R.W. Koster. 2009. Cadherin-2 controls directional chain migration of cerebellar granule neurons. *PLoS Biol.* 7:e1000240.
- Riehl, R., K. Johnson, R. Bradley, G.B. Grunwald, E. Cornel, A. Lilienbaum, and C.E. Holt. 1996. Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron.* 17:837-48.
- Riethmacher, D., V. Brinkmann, and C. Birchmeier. 1995. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:855-9.
- Rimm, D.L., E.R. Koslov, P. Kebriaei, C.D. Cianci, and J.S. Morrow. 1995. Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:8813-7.
- Rintoul, R.C., and T. Sethi. 2002. Extracellular matrix regulation of drug resistance in small-cell lung cancer. *Clin Sci (Lond).* 102:417-24.
- Robel, S., B. Berninger, and M. Gotz. 2011. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci.* 12:88-104.
- Roberts, B.J., A. Pashaj, K.R. Johnson, and J.K. Wahl, 3rd. 2011. Desmosome dynamics in migrating epithelial cells requires the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res.* 317:2814-22.
- Rodriguez, F.J., L.J. Lewis-Tuffin, and P.Z. Anastasiadis. 2012. E-cadherin's dark side: Possible role in tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* 1826:23-31.
- Rorth, P. 2009. Collective cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 25:407-29.
- Rorth, P. 2011. Whence directionality: guidance mechanisms in solitary and collective cell migration. *Dev Cell.* 20:9-18.
- Rouach, N., A. Koulakoff, V. Abudara, K. Willecke, and C. Giaume. 2008. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science.* 322:1551-5.
- Rubin, L.L., D.E. Hall, S. Porter, K. Barbu, C. Cannon, H.C. Horner, M. Janatpour, C.W. Liaw, K. Manning, J. Morales, and et al. 1991. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol.* 115:1725-35.
- Sabe, H. 2003. Requirement for Arf6 in cell adhesion, migration, and cancer cell invasion. *J Biochem.* 134:485-9.
- Sako, Y., A. Nagafuchi, S. Tsukita, M. Takeichi, and A. Kusumi. 1998. Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: corralling and tethering by the membrane skeleton. *J Cell Biol.* 140:1227-40.
- Sameni, M., J. Doseescu, and B.F. Sloane. 2001. Imaging proteolysis by living human glioma cells. *Biol Chem.* 382:785-8.
- Sanai, N., and M.S. Berger. 2008. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery.* 62:753-64; discussion 264-6.
- Sanson, M., M. Napolitano, S. Cartalat-Carel, and S. Taillibert. 2005. [Gliomatosis cerebri]. *Rev Neurol (Paris).* 161:173-81.

- Sarkar, S., R.K. Nuttall, S. Liu, D.R. Edwards, and V.W. Yong. 2006. Tenascin-C stimulates glioma cell invasion through matrix metalloproteinase-12. *Cancer Res.* 66:11771-80.
- Sato, K., T. Watanabe, S. Wang, M. Kakeno, K. Matsuzawa, T. Matsui, K. Yokoi, K. Murase, I. Sugiyama, M. Ozawa, and K. Kaibuchi. 2011. Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC. *Mol Biol Cell.* 22:3103-19.
- Sawaya, R.E., M. Yamamoto, Z.L. Gokaslan, S.W. Wang, S. Mohanam, G.N. Fuller, I.E. McCutcheon, W.G. Stetler-Stevenson, G.L. Nicolson, and J.S. Rao. 1996. Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo. *Clin Exp Metastasis.* 14:35-42.
- Schackmann, R.C., M. van Amersfoort, J.H. Haarhuis, E.J. Vlug, V.A. Halim, J.M. Roodhart, J.S. Vermaat, E.E. Voest, P. van der Groep, P.J. van Diest, J. Jonkers, and P.W. Derksen. 2011. Cytosolic p120-catenin regulates growth of metastatic lobular carcinoma through Rock1-mediated anoikis resistance. *J Clin Invest.* 121:3176-88.
- Schepeler, T., A. Holm, P. Halvey, I. Nordentoft, P. Lamy, E.M. Riising, L.L. Christensen, K. Thorsen, D.C. Liebler, K. Helin, T.F. Orntoft, and C.L. Andersen. 2011. Attenuation of the beta-catenin/TCF4 complex in colorectal cancer cells induces several growth-suppressive microRNAs that target cancer promoting genes. *Oncogene.* 31:2750-60.
- Scherer, H.J. 1940. A Critical Review: the Pathology of Cerebral Gliomas. *J Neurol Psychiatry.* 3:147-77.
- Schipke, C.G., and H. Kettenmann. 2004. Astrocyte responses to neuronal activity. *Glia.* 47:226-32.
- Schnadelbach, O., O.W. Blaschuk, M. Symonds, B.J. Gour, P. Doherty, and J.W. Fawcett. 2000. N-cadherin influences migration of oligodendrocytes on astrocyte monolayers. *Mol Cell Neurosci.* 15:288-302.
- Seals, D.F., and S.A. Courtneidge. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17:7-30.
- Seidel, B., S. Braeg, G. Adler, D. Wedlich, and A. Menke. 2004. E- and N-cadherin differ with respect to their associated p120ctn isoforms and their ability to suppress invasive growth in pancreatic cancer cells. *Oncogene.* 23:5532-42.
- Selbie, L.A., C. Schmitz-Peiffer, Y. Sheng, and T.J. Biden. 1993. Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J Biol Chem.* 268:24296-302.
- Serrels, A., P. Timpson, M. Canel, J.P. Schwarz, N.O. Carragher, M.C. Frame, V.G. Brunton, and K.I. Anderson. 2009. Real-time study of E-cadherin and membrane dynamics in living animals: implications for disease modeling and drug development. *Cancer Res.* 69:2714-9.
- Shan, W.S., H. Tanaka, G.R. Phillips, K. Arndt, M. Yoshida, D.R. Colman, and L. Shapiro. 2000. Functional cis-heterodimers of N- and R-cadherins. *J Cell Biol.* 148:579-90.
- Shapiro, L., and W.I. Weis. 2009. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a003053.
- Sharma, M., and B.R. Henderson. 2007. IQ-domain GTPase-activating protein 1 regulates beta-catenin at membrane ruffles and its role in macropinocytosis of N-cadherin and adenomatous polyposis coli. *J Biol Chem.* 282:8545-56.
- Shaye, D.D., J. Casanova, and M. Llimargas. 2008. Modulation of intracellular trafficking regulates cell intercalation in the Drosophila trachea. *Nat Cell Biol.* 10:964-70.
- Shen, Y., D.S. Hirsch, C.A. Sasiela, and W.J. Wu. 2008. Cdc42 regulates E-cadherin ubiquitination and degradation through an epidermal growth factor receptor to Src-mediated pathway. *J Biol Chem.* 283:5127-37.

- Shewan, A.M., M. Maddugoda, A. Kraemer, S.J. Stehbins, S. Verma, E.M. Kovacs, and A.S. Yap. 2005. Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol Biol Cell*. 16:4531-42.
- Shin, K., V.C. Fogg, and B. Margolis. 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 22:207-35.
- Shin, S., L. Wolgamott, and S.O. Yoon. 2011. Integrin trafficking and tumor progression. *Int J Cell Biol*. 2012:516789.
- Shinjo, K., J.G. Koland, M.J. Hart, V. Narasimhan, D.I. Johnson, T. Evans, and R.A. Cerione. 1990. Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:9853-7.
- Shintani, Y., Y. Fukumoto, N. Chaika, P.M. Grandgenett, M.A. Hollingsworth, M.J. Wheelock, and K.R. Johnson. 2008. ADH-1 suppresses N-cadherin-dependent pancreatic cancer progression. *Int J Cancer*. 122:71-7.
- Silvis, M.R., B.T. Kreger, W.H. Lien, O. Klezovitch, G.M. Rudakova, F.D. Camargo, D.M. Lantz, J.T. Seykora, and V. Vasioukhin. 2011. alpha-catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Sci Signal*. 4:ra33.
- Simard, M., G. Arcuino, T. Takano, Q.S. Liu, and M. Nedergaard. 2003. Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci*. 23:9254-62.
- Singh, S.K., I.D. Clarke, M. Terasaki, V.E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, and P.B. Dirks. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 63:5821-8.
- Singh, S.K., C. Hawkins, I.D. Clarke, J.A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R.M. Henkelman, M.D. Cusimano, and P.B. Dirks. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 432:396-401.
- Slorach, E.M., J. Chou, and Z. Werb. 2011. Zeppol is a novel metastasis promoter that represses E-cadherin expression and regulates p120-catenin isoform expression and localization. *Genes Dev*. 25:471-84.
- Sofroniew, M.V. 2005. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist*. 11:400-7.
- Sofroniew, M.V. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 32:638-47.
- Sofroniew, M.V., and H.V. Vinters. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 119:7-35.
- Soler, A.P., K.R. Johnson, M.J. Wheelock, and K.A. Knudsen. 1993. Rhabdomyosarcoma-derived cell lines exhibit aberrant expression of the cell-cell adhesion molecules N-CAM, N-cadherin, and cadherin-associated proteins. *Exp Cell Res*. 208:84-93.
- Solnica-Krezel, L. 2005. Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation. *Curr Biol*. 15:R213-28.
- Song, H., C.F. Stevens, and F.H. Gage. 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*. 417:39-44.
- Soroceanu, L., T.J. Manning, Jr., and H. Sontheimer. 1999. Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl(-) and K(+) ion channel blockers. *J Neurosci*. 19:5942-54.
- Stairs, D.B., L.J. Bayne, B. Rhoades, M.E. Vega, T.J. Waldron, J. Kalabis, A. Klein-Szanto, J.S. Lee, J.P. Katz, J.A. Diehl, A.B. Reynolds, R.H. Vonderheide, and A.K. Rustgi. 2011. Deletion of p120-catenin results in a tumor microenvironment with inflammation and cancer that establishes it as a tumor suppressor gene. *Cancer Cell*. 19:470-83.
- Stambolic, V., L. Ruel, and J.R. Woodgett. 1996. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol*. 6:1664-8.

- Stehbens, S.J., A.D. Paterson, M.S. Crampton, A.M. Shewan, C. Ferguson, A. Akhmanova, R.G. Parton, and A.S. Yap. 2006. Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *J Cell Sci.* 119:1801-11.
- Steinberg, M.S. 1963. Reconstruction of tissues by dissociated cells. Some morphogenetic tissue movements and the sorting out of embryonic cells may have a common explanation. *Science.* 141:401-8.
- Steinberg, M.S. 2007. Differential adhesion in morphogenesis: a modern view. *Curr Opin Genet Dev.* 17:281-6.
- Stepniak, E., G.L. Radice, and V. Vasioukhin. 2009. Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a002949.
- Stoitzner, P., K. Pfaller, H. Stossel, and N. Romani. 2002. A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J Invest Dermatol.* 118:117-25.
- Strumane, K., G. Berx, and F. Van Roy. 2004. Cadherins in cancer. *Handb Exp Pharmacol:*69-103.
- Strumane, K., A. Bonnomet, C. Stove, R. Vandenbroucke, B. Nawrocki-Raby, E. Bruyneel, M. Mareel, P. Birembaut, G. Berx, and F. van Roy. 2006. E-cadherin regulates human Nanos1, which interacts with p120ctn and induces tumor cell migration and invasion. *Cancer Res.* 66:10007-15.
- Stummer, W., M.J. van den Bent, and M. Westphal. 2011. Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion. *Acta Neurochir (Wien).* 153:1211-8.
- Stupp, R., M.E. Hegi, M.R. Gilbert, and A. Chakravarti. 2007. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol.* 25:4127-36.
- Stupp, R., M.E. Hegi, B. Neyns, R. Goldbrunner, U. Schlegel, P.M. Clement, G.G. Grabenbauer, A.F. Ochsenein, M. Simon, P.Y. Dietrich, T. Pietsch, C. Hicking, J.C. Tonn, A.C. Diserens, A. Pica, M. Hermisson, S. Krueger, M. Picard, and M. Weller. 2010. Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol.* 28:2712-8.
- Sulis, M.L., and R. Parsons. 2003. PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol.* 13:478-83.
- Suter, D.M., L.D. Errante, V. Belotserkovsky, and P. Forscher. 1998. The Ig superfamily cell adhesion molecule, apCAM, mediates growth cone steering by substrate-cytoskeletal coupling. *J Cell Biol.* 141:227-40.
- Suter, D.M., and P. Forscher. 2000. Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol.* 44:97-113.
- Suyama, K., I. Shapiro, M. Guttman, and R.B. Hazan. 2002. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell.* 2:301-14.
- Tachibana, K., H. Nakanishi, K. Mandai, K. Ozaki, W. Ikeda, Y. Yamamoto, A. Nagafuchi, S. Tsukita, and Y. Takai. 2000. Two cell adhesion molecules, nectin and cadherin, interact through their cytoplasmic domain-associated proteins. *J Cell Biol.* 150:1161-76.
- Tai, C.Y., S.P. Mysore, C. Chiu, and E.M. Schuman. 2007. Activity-regulated N-cadherin endocytosis. *Neuron.* 54:771-85.
- Takeichi, M. 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development.* 102:639-55.
- Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 251:1451-5.
- Takeichi, M. 2007. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat Rev Neurosci.* 8:11-20.

- Takeichi, M., K. Hatta, A. Nose, and A. Nagafuchi. 1988. Identification of a gene family of cadherin cell adhesion molecules. *Cell Differ Dev.* 25 Suppl:91-4.
- Takeno, S., T. Noguchi, S. Fumoto, Y. Kimura, T. Shibata, and K. Kawahara. 2004. E-cadherin expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation, Snail overexpression, and clinicopathologic implications. *Am J Clin Pathol.* 122:78-84.
- Tamura, K., W.S. Shan, W.A. Hendrickson, D.R. Colman, and L. Shapiro. 1998. Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron.* 20:1153-63.
- Tanaka, H., E. Kono, C.P. Tran, H. Miyazaki, J. Yamashiro, T. Shimomura, L. Fazli, R. Wada, J. Huang, R.L. Vessella, J. An, S. Horvath, M. Gleave, M.B. Rettig, Z.A. Wainberg, and R.E. Reiter. 2010. Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat Med.* 16:1414-20.
- Taulet, N., F. Comunale, C. Favard, S. Charrasse, S. Bodin, and C. Gauthier-Rouviere. 2009. N-cadherin/p120 catenin association at cell-cell contacts occurs in cholesterol-rich membrane domains and is required for RhoA activation and myogenesis. *J Biol Chem.* 284:23137-45.
- Tenan, M., M. Aurrand-Lions, V. Widmer, A. Alimenti, K. Burkhardt, F. Lazeyras, M.C. Belkouch, P. Hammel, P.R. Walker, M.A. Duchosal, B.A. Imhof, and P.Y. Dietrich. 2010. Cooperative expression of junctional adhesion molecule-C and -B supports growth and invasion of glioma. *Glia.* 58:524-37.
- Tepass, U., K. Truong, D. Godt, M. Ikura, and M. Peifer. 2000. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:91-100.
- Theisen, C.S., J.K. Wahl, 3rd, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 2007. NHERF links the N-cadherin/catenin complex to the platelet-derived growth factor receptor to modulate the actin cytoskeleton and regulate cell motility. *Mol Biol Cell.* 18:1220-32.
- Theveneau, E., L. Marchant, S. Kuriyama, M. Gull, B. Moepps, M. Parsons, and R. Mayor. 2010. Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Dev Cell.* 19:39-53.
- Theveneau, E., and R. Mayor. 2010. Integrating chemotaxis and contact-inhibition during collective cell migration: Small GTPases at work. *Small Gtpases.* 1:113-117.
- Thiery, J.P., and J.P. Sleeman. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:131-42.
- Thomsen, R., and A. Lade Nielsen. 2011. A Boyden chamber-based method for characterization of astrocyte protrusion localized RNA and protein. *Glia.* 59:1782-92.
- Thoreson, M.A., P.Z. Anastasiadis, J.M. Daniel, R.C. Ireton, M.J. Wheelock, K.R. Johnson, D.K. Hummingbird, and A.B. Reynolds. 2000. Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol.* 148:189-202.
- Till, J.E., E.A. McCulloch, and L. Siminovitch. 1964. A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 51:29-36.
- Ting, C.Y., S. Yonekura, P. Chung, S.N. Hsu, H.M. Robertson, A. Chiba, and C.H. Lee. 2005. Drosophila N-cadherin functions in the first stage of the two-stage layer-selection process of R7 photoreceptor afferents. *Development.* 132:953-63.
- Tong, C., T. Ohyama, A.C. Tien, A. Rajan, C.M. Haueter, and H.J. Bellen. 2011. Rich regulates target specificity of photoreceptor cells and N-cadherin trafficking in the Drosophila visual system via Rab6. *Neuron.* 71:447-59.
- Tonn, J.C., and W. Stummer. 2008. Fluorescence-guided resection of malignant gliomas using 5-aminolevulinic acid: practical use, risks, and pitfalls. *Clin Neurosurg.* 55:20-6.
- Trepat, X., M.R. Wasserman, and J.J. Fredberg. 2009. Physical forces during collective cell migration. *Nature Physics.* 5:426 - 430.

- Troyanovsky, R.B., O. Laur, and S.M. Troyanovsky. 2007. Stable and unstable cadherin dimers: mechanisms of formation and roles in cell adhesion. *Mol Biol Cell*. 18:4343-52.
- Troyanovsky, R.B., E.P. Sokolov, and S.M. Troyanovsky. 2006. Endocytosis of cadherin from intracellular junctions is the driving force for cadherin adhesive dimer disassembly. *Mol Biol Cell*. 17:3484-93.
- Tsacopoulos, M., and P.J. Magistretti. 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci*. 16:877-85.
- Uchida, N., Y. Honjo, K.R. Johnson, M.J. Wheelock, and M. Takeichi. 1996. The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol*. 135:767-79.
- Ullian, E.M., S.K. Sapperstein, K.S. Christopherson, and B.A. Barres. 2001. Control of synapse number by glia. *Science*. 291:657-61.
- Ulrich, F., and C.P. Heisenberg. 2008. Probing E-cadherin endocytosis by morpholino-mediated Rab5 knockdown in zebrafish. *Methods Mol Biol*. 440:371-87.
- Utsuki, S., Y. Sato, H. Oka, B. Tsuchiya, S. Suzuki, and K. Fujii. 2002. Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in astrocytomas. *J Neurooncol*. 57:187-92.
- Utton, M.A., B. Eickholt, F.V. Howell, J. Wallis, and P. Doherty. 2001. Soluble N-cadherin stimulates fibroblast growth factor receptor dependent neurite outgrowth and N-cadherin and the fibroblast growth factor receptor co-cluster in cells. *J Neurochem*. 76:1421-30.
- van Hengel, J., and F. van Roy. 2007. Diverse functions of p120ctn in tumors. *Biochim Biophys Acta*. 1773:78-88.
- Van Meir, E.G., C.G. Hadjipanayis, A.D. Norden, H.K. Shu, P.Y. Wen, and J.J. Olson. 2010. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin*. 60:166-93.
- van Roy, F., and G. Berx. 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 65:3756-88.
- van Roy, F.M., and P.D. McCrea. 2005. A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? *Nat Rev Cancer*. 5:956-64.
- Vandewalle, C., J. Comijn, B. De Craene, P. Vermassen, E. Bruyneel, H. Andersen, E. Tulchinsky, F. Van Roy, and G. Berx. 2005. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res*. 33:6566-78.
- Vasioukhin, V. 2012. Adherens junctions and cancer. *Subcell Biochem*. 60:379-414.
- Vasioukhin, V., C. Bauer, L. Degenstein, B. Wise, and E. Fuchs. 2001. Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of alpha-catenin in skin. *Cell*. 104:605-17.
- Vasioukhin, V., C. Bauer, M. Yin, and E. Fuchs. 2000. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell*. 100:209-19.
- Vasioukhin, V., and E. Fuchs. 2001. Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr Opin Cell Biol*. 13:76-84.
- Ventura, R., and K.M. Harris. 1999. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci*. 19:6897-906.
- Verhaak, R.G., K.A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M.D. Wilkerson, C.R. Miller, L. Ding, T. Golub, J.P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B.A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H.S. Feiler, J.G. Hodgson, C.D. James, J.N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P.T. Spellman, R.K. Wilson, T.P. Speed, J.W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C.M. Perou, and D.N. Hayes. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 17:98-110.

- Visvader, J.E. 2011. Cells of origin in cancer. *Nature*. 469:314-22.
- Vleminckx, K., L. Vakaet, Jr., M. Mareel, W. Fiers, and F. van Roy. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*. 66:107-19.
- Volk, T., and B. Geiger. 1984. A 135-kd membrane protein of intercellular adherens junctions. *Embo J*. 3:2249-60.
- Volterra, A., and J. Meldolesi. 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*. 6:626-40.
- von der Hardt, S., J. Bakkers, A. Inbal, L. Carvalho, L. Solnica-Krezel, C.P. Heisenberg, and M. Hammerschmidt. 2007. The Bmp gradient of the zebrafish gastrula guides migrating lateral cells by regulating cell-cell adhesion. *Curr Biol*. 17:475-87.
- Voskuhl, R.R., R.S. Peterson, B. Song, Y. Ao, L.B. Morales, S. Tiwari-Woodruff, and M.V. Sofroniew. 2009. Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci*. 29:11511-22.
- Wahl, J.K., 3rd, Y.J. Kim, J.M. Cullen, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 2003. N-cadherin-catenin complexes form prior to cleavage of the proregion and transport to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 278:17269-76.
- Wang, M., Q. Dong, D. Zhang, and Y. Wang. 2011. Expression of delta-catenin is associated with progression of human astrocytoma. *BMC Cancer*. 11:514.
- Watabe, M., A. Nagafuchi, S. Tsukita, and M. Takeichi. 1994. Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J Cell Biol*. 127:247-56.
- Watanabe, N., and T.J. Mitchison. 2002. Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science*. 295:1083-6.
- Waterman-Storer, C.M., and E.D. Salmon. 1997. Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J Cell Biol*. 139:417-34.
- Webb, D.J., J.T. Parsons, and A.F. Horwitz. 2002. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol*. 4:E97-100.
- Weber, G.F., M.A. Bjerke, and D.W. DeSimone. 2012. A mechanoresponsive cadherin-keratin complex directs polarized protrusive behavior and collective cell migration. *Dev Cell*. 22:104-15.
- Wei, C.J., R. Francis, X. Xu, and C.W. Lo. 2005. Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *J Biol Chem*. 280:19925-36.
- Weidner, K.M., J. Behrens, J. Vandekerckhove, and W. Birchmeier. 1990. Scatter factor: molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells. *J Cell Biol*. 111:2097-108.
- Wen, P.Y., and S. Kesari. 2008. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 359:492-507.
- Wheelock, M.J., C.A. Buck, K.B. Bechtol, and C.H. Damsky. 1987. Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion. *J Cell Biochem*. 34:187-202.
- Wheelock, M.J., and K.R. Johnson. 2003. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 19:207-35.
- Wheelock, M.J., Y. Shintani, M. Maeda, Y. Fukumoto, and K.R. Johnson. 2008. Cadherin switching. *J Cell Sci*. 121:727-35.
- White, D.P., P.T. Caswell, and J.C. Norman. 2007. alpha v beta3 and alpha5beta1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. *J Cell Biol*. 177:515-25.

- Wilby, M.J., E.M. Muir, J. Fok-Seang, B.J. Gour, O.W. Blaschuk, and J.W. Fawcett. 1999. N-Cadherin inhibits Schwann cell migration on astrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 14:66-84.
- Wildenberg, G.A., M.R. Dohn, R.H. Carnahan, M.A. Davis, N.A. Lobdell, J. Settleman, and A.B. Reynolds. 2006. p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell.* 127:1027-39.
- Witcher, M.R., S.A. Kirov, and K.M. Harris. 2007. Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia.* 55:13-23.
- Wittmann, T., and C.M. Waterman-Storer. 2001. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci.* 114:3795-803.
- Wolburg, H., R. Kastner, and G. Kurz-Isler. 1983. Lack of orthogonal particle assemblies and presence of tight junctions in astrocytes of the goldfish (*Carassius auratus*). A freeze-fracture study. *Cell Tissue Res.* 234:389-402.
- Wolf, K., I. Mazo, H. Leung, K. Engelke, U.H. von Andrian, E.I. Deryugina, A.Y. Strongin, E.B. Brocker, and P. Friedl. 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.* 160:267-77.
- Wolf, K., Y.I. Wu, Y. Liu, J. Geiger, E. Tam, C. Overall, M.S. Stack, and P. Friedl. 2007. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol.* 9:893-904.
- Wyckoff, J.B., S.E. Pinner, S. Gschmeissner, J.S. Condeelis, and E. Sahai. 2006. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol.* 16:1515-23.
- Xia, X., J. Brooks, R. Campos-Gonzalez, and A.B. Reynolds. 2004. Serine and threonine phospho-specific antibodies to p120-catenin. *Hybrid Hybridomics.* 23:343-51.
- Xia, X., D.J. Mariner, and A.B. Reynolds. 2003. Adhesion-associated and PKC-modulated changes in serine/threonine phosphorylation of p120-catenin. *Biochemistry.* 42:9195-204.
- Xian, W., K.L. Schwertfeger, T. Vargo-Gogola, and J.M. Rosen. 2005. Pleiotropic effects of FGFR1 on cell proliferation, survival, and migration in a 3D mammary epithelial cell model. *J Cell Biol.* 171:663-73.
- Xiao, K., D.F. Allison, K.M. Buckley, M.D. Kottke, P.A. Vincent, V. Faundez, and A.P. Kowalczyk. 2003. Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol.* 163:535-45.
- Xiao, K., J. Garner, K.M. Buckley, P.A. Vincent, C.M. Chiasson, E. Dejana, V. Faundez, and A.P. Kowalczyk. 2005. p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol Biol Cell.* 16:5141-51.
- Xu, C., N.G. Kim, and B.M. Gumbiner. 2009. Regulation of protein stability by GSK3 mediated phosphorylation. *Cell Cycle.* 8:4032-9.
- Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W.I. Weis, and W.J. Nelson. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell.* 123:889-901.
- Yan, H., D.W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B.A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batanic-Haberle, S. Jones, G.J. Riggins, H. Friedman, A. Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K.W. Kinzler, V.E. Velculescu, B. Vogelstein, and D.D. Bigner. 2009. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 360:765-73.
- Yanagisawa, M., and P.Z. Anastasiadis. 2006. p120 catenin is essential for mesenchymal cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness. *J Cell Biol.* 174:1087-96.
- Yang, J., and R.A. Weinberg. 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 14:818-29.

- Yang, J.Y., C.S. Zong, W. Xia, Y. Wei, M. Ali-Seyed, Z. Li, K. Broglio, D.A. Berry, and M.C. Hung. 2006. MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation. *Mol Cell Biol.* 26:7269-82.
- Yap, A.S., C.M. Niessen, and B.M. Gumbiner. 1998. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol.* 141:779-89.
- Yonemura, S., M. Itoh, A. Nagafuchi, and S. Tsukita. 1995. Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J Cell Sci.* 108 (Pt 1):127-42.
- Yonemura, S., Y. Wada, T. Watanabe, A. Nagafuchi, and M. Shibata. 2010. alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat Cell Biol.* 12:533-42.
- Yoshiura, K., Y. Kanai, A. Ochiai, Y. Shimoyama, T. Sugimura, and S. Hirohashi. 1995. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7416-9.
- Yu, X., and R.C. Malenka. 2003. Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci.* 6:1169-77.
- Zagzag, D., M. Esencay, O. Mendez, H. Yee, I. Smirnova, Y. Huang, L. Chiriboga, E. Lukyanov, M. Liu, and E.W. Newcomb. 2008. Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. *Am J Pathol.* 173:545-60.
- Zamecnik, J. 2005. The extracellular space and matrix of gliomas. *Acta Neuropathol.* 110:435-42.
- Zhang, K., J. Zhang, L. Han, P. Pu, and C. Kang. 2012. Wnt/beta-Catenin Signaling in Glioma. *J Neuroimmune Pharmacol.*
- Zhang, L., J. Huang, N. Yang, S. Liang, A. Barchetti, A. Giannakakis, M.G. Cadungog, A. O'Brien-Jenkins, M. Massobrio, K.F. Roby, D. Katsaros, P. Gimotty, R. Butzow, B.L. Weber, and G. Coukos. 2006. Integrative genomic analysis of protein kinase C (PKC) family identifies PKC ζ as a biomarker and potential oncogene in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 66:4627-35.
- Zhang, Y., S. Sivasankar, W.J. Nelson, and S. Chu. 2009. Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:109-14.
- Zhao, Y., A. Xiao, C.G. diPierro, J.E. Carpenter, R. Abdel-Fattah, G.T. Redpath, M.B. Lopes, and I.M. Hussaini. 2010. An extensive invasive intracranial human glioblastoma xenograft model: role of high level matrix metalloproteinase 9. *Am J Pathol.* 176:3032-49.
- Zhu, H., and L. Luo. 2004. Diverse functions of N-cadherin in dendritic and axonal terminal arborization of olfactory projection neurons. *Neuron.* 42:63-75.