



HAL
open science

Mise en place des jonctions adhérentes lors de la différenciation entérocytaire et rôles de p120ctn dans l'homéostasie intestinale

Nicolas Chartier

► **To cite this version:**

Nicolas Chartier. Mise en place des jonctions adhérentes lors de la différenciation entérocytaire et rôles de p120ctn dans l'homéostasie intestinale. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2007. Français. NNT: . tel-00992066

HAL Id: tel-00992066

<https://theses.hal.science/tel-00992066>

Submitted on 16 May 2014

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE I
ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

THESE

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : BIOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

Nicolas CHARTIER

Le 25 Septembre 2007

**Mise en place des jonctions adhérentes
lors de la différenciation entérocytaire
et rôles de p120ctn dans l'homéostasie intestinale**

Composition du jury :

Président : M. Xavier Ronot, Professeur

Rapporteurs : Mme Michèle Kedinger, Directeur de recherche
Mme Martine Pinçon-Raymond, Directeur de recherche

Examineurs : Mme Muriel Jacquier-Sarlin, Maître de conférence
M. Frédéric André, Maître de conférence
M. Marc Block, Professeur

Thèse préparée au sein de l'équipe
Dynamique des Systèmes d'Adhérence et Différenciation (DYSAD)
Institut Albert Bonniot , Centre de Recherche INSERM/ UJF U823
Université Joseph Fourier Grenoble I

Résumé

Au cours de la différenciation des cellules épithéliales de l'intestin, les cellules reçoivent et intègrent des signaux de la part de leur environnement, aboutissant à des modifications de leur morphologie et de l'expression des gènes. Les cellules intestinales modulent notamment leur capacités d'adhérence à la matrice extracellulaire et aux cellules voisines par le biais de complexes protéiques associées respectivement aux intégrines et aux cadhérines.

En utilisant la lignée cellulaire d'adénocarcinome colique humain HT-29, nous étudions la mise en place des jonctions adhérentes accompagnant la différenciation entérocytaire et nous soulignons l'importance de différents facteurs dans les étapes successives de maturation de ces jonctions. Ainsi, nous montrons que la laminine 5 est capable d'induire une augmentation d'expression de la E-cadhérine et permet d'initier la mise en place des jonctions adhérentes par un mécanisme dépendant de l'adhérence cellule-matrice extracellulaire: en activant les intégrines $\alpha3\beta1$ et $\alpha6\beta4$, la laminine 5 induit une augmentation transitoire de l'activité de la PI3 Kinase qui active à son tour la GTPase monomérique Rac1 et son variant Rac1b. Nous montrons que la maturation des jonctions adhérentes est ensuite favorisée par l'émergence de radeaux lipidiques au sein desquels la E-cadhérine et la p120ctn interagissent de façon préférentielle. Le recrutement des protéines des jonctions adhérentes dans ces microdomaines est dépendant de l'activité de Rac1 et conduit à l'apparition de marqueurs de différenciation entérocytaire.

Dans une seconde partie, nous étudions le rôle spécifique de la p120ctn dans la régulation de l'homéostasie des cellules intestinale. Nous montrons que l'augmentation du pool cytoplasmique de p120ctn induit une baisse de prolifération des cellules HT-29 suite à l'interaction de p120ctn avec le complexe cycline E /cdk2. Cette association se traduit par une augmentation de la stabilité de la cycline E et conduit à des défauts de duplication des centrosomes. Des effets similaires sont observés dans les cellules cancéreuses et pourraient être à l'origine du développement tumoral.

Abstract

During intestinal differentiation, epithelial cells modify their shape and genes activities in response to environmental signals. In particular, intestinal cells modulate their cell-matrix and cell-cell adhesion through protein complexes associated with integrins and cadherins respectively.

Using the human adenocarcinoma cell line HT-29, we study adherens junction's formation along enterocytic differentiation and we highlight key factors implicated in the successive steps that allow the maturation of these junctions. We show that laminine 5 induces an increase in E-cadherin expression and allows the initiation of adherent junction's assembly through cell -matrix adhesion: laminine 5 - dependent activation of $\alpha3\beta1$ and $\alpha6\beta4$ integrins induces a transitional activation of PI3 Kinase that activates monomeric GTPases Rac1 and its variant Rac1b. Then we show that adherens junction maturation is favoured by lipid rafts emergence. p120ctn interacts preferentially with E-cadherin in lipid rafts and their recruitment into this fraction is Rac1-dependent. Furthermore this process is correlated with epithelial cell differentiation.

In a second part, we describe a new function of p120ctn in intestinal cells homeostasis. We show that the increase in p120ctn cytoplasmic level induces a downregulation of HT-29 cells proliferation. This effect result from the interaction of p120ctn with the cyclin E / cdk2 complex in the centrosome which leads to cyclin E overexpression. This process leads to centrosome overduplication , a phenomenon often observed in tumor cells.

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein de l'équipe de la Dynamique des Systèmes d'Adhérence et Différenciation (ex - Laboratoire d'Etude de la Différenciation et de l'Adhérence Cellulaires), dirigé par le Professeur Marc Block. Je le remercie de m'avoir accordé sa confiance en m'accueillant au sein de cette équipe.

Je remercie chaleureusement le Docteur Muriel Jacquier-Sarlin qui a co-dirigé ces travaux. J'ai conscience d'avoir bénéficié d'une formation exceptionnelle à ses côtés. Sa disponibilité, ses précieux conseils, sa motivation communicative et sa joie de vivre m'ont permis de me développer dans un environnement chaleureux et humain.

Je souhaite également remercier sincèrement le Professeur Xavier Ronot d'avoir accepté de présider cette thèse ainsi que les Docteurs Michèle Kedinger, Martine Pinçon-Raymond et Frédéric André pour avoir accepté d'évaluer ces travaux.

Les travaux présentés ici reflètent l'implication et le soutien d'un groupe soudé. A ce titre je remercie vivement les Docteurs Christiane Marie, Michèle Lainé et Géraldine Pawlak ainsi que Benjamin et Monica pour leur aide au quotidien et leurs conseils. J'adresse également toute ma reconnaissance à Geneviève Tavernier, Christiane Oddou et Brigitte Peyrusse pour leur implication et leur aide précieuse dans la réalisation et la présentation de ces travaux.

Je remercie sincèrement l'ensemble de l'équipe LEDAC /DYSAD pour les conseils, les nombreux goûters plus ou moins improvisés et l'ambiance de travail agréable distillés au cours de ces quelques années. Je pense notamment aux étudiants avec qui j'ai partagé de bons moments au sein du bureau : Angélique (demain j'arrête !), Adeline et Cédric (compagnon nocturne de l'institut).

Je n'oublie pas tous mes camarades étudiants et thésards de l'IAB avec qui j'ai pu partager des moments souvent hilarants, parfois sérieux mais toujours sincères. Je pense particulièrement à Cyrille (petite interrogation surprise et orale), Eric (geek attitude), Cyril (monchu), Yannick (swiss 3T3), Angeline (so fashion), Sabrina (Aïd Saïd), Junior, Fred, Seb, Elodie et les « anciens » : Marlène et Jérôme (pour leur sagesse). De vraies amitiés se sont créées en dehors du travail, que les années et la distance ne pourront pas entailler.

Je remercie sincèrement mes parents et l'ensemble de ma famille pour avoir toujours respecté et encouragé mes choix au cours des années, avec une pensée particulière pour ma grand-mère, Madeleine, qui a toujours cru en moi.

Merci également à la famille Mangournet pour leur accueil et leur soutien, il est rare de rencontrer des personnes aussi gentilles.

Et enfin, un remerciement spécial à Marie pour sa patience et sa compréhension. Sans toi cette période n'aurait pas été aussi douce, merci de tout mon cœur ! 1001, 1002, 1003.....

Sommaire

LISTE DES ABBREVIATIONS.....p.1

AVANT-PROPOS.....p.3

INTRODUCTION.....p.4

I. L'EPITHELIUM INTESTINAL.....p.5

I.1. Fonction et structure de l'intestin

I.1.1. Une surface d'échange optimisée

I.1.2. Les types de cellules intestinales différenciées

I.1.2.a Les cellules de Paneth

I.1.2.b Les cellules sécrétrices de mucus (cellules en Gobelet)

I.1.2.c Les cellules entéroendocrines

I.1.2.d Les entérocytes

I.1.3. Morphologie et fonctions des entérocytes

I.2. Développement de l'intestin et renouvellement de l'épithélium intestinal

I.2.1. Origine embryonnaire de l'intestin

I.2.2. Un renouvellement continu chez l'adulte

II. DE LA CELLULE SOUCHE A LA CELLULE EPITHELIALE DIFFERENCIEE....p.11

II.1. Mécanismes de prolifération cellulaire

II.1.1. Le cycle cellulaire : généralités

II.1.2. Régulation de la prolifération cellulaire

II.1.2.a Les complexes cyclines/cdks : régulateurs de la progression du cycle cellulaire

II.1.2.b La cycline E

II.1.2.c Les inhibiteurs de cyclines/Cdks : les freins du système

II.2. La différenciation épithéliale intestinale

II.2.1. De la prolifération à la différenciation cellulaire

II.2.1.a Rôle des facteurs diffusibles

II.2.1.b Régulation de facteurs de transcription spécifiques

II.2.2. Une spécialisation cellulaire en plusieurs étapes

III. SYSTEMES D'ADHERENCES ET REGULATION DU RENOUVELLEMENT DE L'EPITHELIUM INTESTINAL.....p.22

III.1. L'adhérence cellule-matrice extracellulaire

III.1.1. La lame basale

- III.1.1.a *Composition de la lame basale*
- III.1.1.b *Répartition des composants de la lame basale*
- III.1.2. Les intégrines : Un lien entre adhérence et signalisation
 - III.1.2.a *Structure des intégrines*
 - III.1.2.b *Diversité des complexes et spécificité d'interactions*
 - III.1.2.c *Activation des intégrines*
- III.1.3. Les complexes d'adhérence cellule-matrice dans l'intestin
 - III.1.3.a *Les adhérences focales*
 - III.1.3.b *Les hémidesmosomes*
- III.1.4. Rôles des intégrines dans la régulation des cellules intestinales
 - III.1.4.a. *Signalisation médiée par les intégrines*
 - III.1.4.b. *Régulation de la prolifération cellulaire par les intégrines*
 - III.1.4.c. *Intégrines et différenciation épithéliale*

III.2. L'adhérence cellule-cellule

- III.2.1. Les jonctions adhérentes
 - III.2.1.a *Les cadhérines*
 - III.2.1.b *Structure de la E-cadhérine*
 - III.2.1.c *Les caténines*
- III.2.2. Régulation dynamique des jonctions adhérentes
 - III.2.2.a *Régulation de l'expression et de l'adressage des différents composants des jonctions adhérentes*
 - III.2.2.b *Assemblage et maintien dynamique des jonctions adhérentes: rôles des caténines et des protéines G monomériques*
 - III.2.2.c *Régulation du désassemblage des jonctions adhérentes*
- III.2.3. Jonctions adhérentes et homéostasie intestinale
 - III.2.3.a *Contrôle de la prolifération cellulaire par les jonctions adhérentes*
 - III.2.3.b *Les jonctions adhérentes dans la différenciation entérocytaire*

III.3 Signalisations croisée entre les deux types d'adhérences : existence d'un dialogue intracellulaire

- III.3.1. Régulation des cadhérines par les intégrines
- III.3.2. Régulation des intégrines par les cadhérines

OBJECTIFS.....p.69

MODELE CELLULAIRE.....p.72

RESULTATS.....p.75

Partie 1 : Mise en place des jonctions adhérentes lors de la différenciation entérocytaire précoce des cellules HT-29.....p.76

I – Rôle de la signalisation induite par la laminine 5.....p.77

I.1. Approche du sujet et problématique

I.2. Article 1: “Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells”

I.3. Discussion

I.3.1. La laminine 5 induit une augmentation des contacts intercellulaires

I.3.2. L'effet de la laminine 5 est transmis par les intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha3\beta1$

I.3.3. Signalisation via la PI3K et rac 1b

I.3.4. La laminine 5 : une étape de la différenciation ?

II – Mécanismes de recrutement de la p120ctn au sein des jonctions adhérentes.....p.86

II.1. Approche du sujet et problématique

II.2. L'interaction entre la p120ctn et la E-cadhérine est liée à la formation de microdomaines lipidiques de type « rafts » et à la régulation des Rho-GTPases au cours de la différenciation entérocytaire

II.2.1. La p120ctn et la E-cadhérine s'associent aux radeaux lipidiques lors de la différenciation des cellules HT-29

II.2.2. La p120ctn s'associe avec la E-cadhérine principalement au niveau des radeaux lipidiques

II.2.3. La différenciation des cellules HT-29 est caractérisée par une activation antagoniste des GTPases RhoA et Rac1

II.2.4. Le recrutement de p120ctn dans les radeaux lipidiques est nécessaire à la différenciation des cellules HT-29

III.3. Discussion

III.3.1. Radeaux lipidiques et différenciation

III.3.2. Recrutement des composants des jonctions adhérentes dans les radeaux lipidiques

III.3.3. Régulation des GTPases RhoA et Rac1 au cours de la différenciation

Partie 2 : Rôles de la p120ctn dans l'homéostasie des cellules HT-29.....p.101

I- Problématique et expériences préliminaires

II- Article 2: “Cdk2/cyclin E complex is involved in p120ctn-dependent cell growth control: a new role for p120ctn in cancer”

III- Discussion

III.1. La p120ctn régule négativement la prolifération des cellules HT-29

III.2. La p120ctn interagit avec le complexe cdk2 / cycline E

III.3. Le complexe p120ctn / cycline E / cdk2 est localisé au niveau des centrosomes

III.4. Rôles de la p120ctn dans la prolifération de cellules normales et cancéreuse

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....p.112

MATERIEL ET METHODES.....p.120

BIBLIOGRAPHIE.....p.125

Liste des abbrévations

ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AP	Alcaline Phosphatase
APC	Adenomatous Polyposis Coli
Apo A IV	Apolipoprotéine A IV
ARF	ADP-Ribosylation Factor
ARN	Acide RiboNucléique
Arp2/3	Actin related protein 2/3
b-HLH	basic-Helix Loop Helix
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BP	Bullous Pemphigoid
CAM	Cell Adhesion Molecules
CBD	Catenin-Binding Domain de la E-cadhérine
Cdc42	Cell division control protein 42
Cdk	Cyclin-dependant-kinase
Cdx2	Caudal type homeobox transcription factor 2
Cip	CDK-interacting proteins
CLIP 170	Cytoplasmic linker protein 170
CTF	C-terminal fragment de la E-cadhérine
DKK1	Dkkopf homologue 1
EC	Domaine extracellulaires de la E-cadhérine
EFA 6	Exchange Factor of ARF 6
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-R	Epidermal Growth Factor-Receptor
ELF-3	E74-Like Factor 3
Eph	Ephrin
ERK	Extracellular signal Regulated Signal
FAK	Focal Adhesion Kinase
Fbw7	F-box and WD40 domain protein 7
GAP	GTPases Activating Proteins
GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors
GDP	Guanosine Di-Phosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GGA	Golgi-localized, gamma ear-containing, ARF-binding protein
Grab-2	Growth factor receptor binding protein-2
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
HES	Hairy/Enhancer of Split
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIEC	Human Intestinal Epithelial Cells
HNF-4	Hepatic Nuclear Factor-4
IFABP	Intestinal Fatty Acid Binding Protein
IGF	Insulin Growth Factor
ILK	Integrin Linked Kinase
Ink	Inhibitor of cyclin-dependant kinase
IQGAP	IQ motif containing GTPase activating protein
JMD	Domaine juxtamembranaire de la E-cadhérine
JNK	Jun amino-terminal kinase

Kip	Kinase-interacting protein
KLF	Krüppel-Like-Factors
LEF	Lymphoid Enhancer-binding Factor
LN5	Laminine 5
LPH	Lactase-Phlorizin Hydrolase
MAGI	Membrane-associated guanylate kinase inverted
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MEC	Matrice Extracellulaire
MEK	MAPK / ERK Kinase
MLC	Myosin Light Chain
MLCK	Myosin Light Chain Kinase
MPF	Maturating Promoting Factor
Muc2	Mucin 2
NFκB	Nuclear Factor kappa B
Ngn-3	Neurogénine-3
p120ctn	p120 caténine
PDGF-R	Platelet Derived Growth Factor-Receptor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphate
PIP₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate
PKB	Protéine Kinase B
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTPμ	Protein Tyrosine Phosphatase μ
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rb	Retinoblastoma
RhoA	Ras homolog A
ROCK	Rho-activated Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
SH2	Src Homology 2
Shc	Src homologue and collagen
SI	Saccharase Isomaltase
Skp2	S-phase kinase-associated protein 2
Sox 9	SRY-Box 9
SP1	Specificity Protein 1
TCF	T-Cell Factor
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
THRα-1	Thyroid Hormone Receptor alpha 1
Tiam 1	T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WASP	Wiskott Aldrich Syndrome Protein
Wnt	Wingless Type
WT1	Wilm's Tumor 1
ZO	Zonula Occludens

Avant-propos

Un organisme pluricellulaire est composé de différents organes, eux-mêmes formés au cours du développement embryonnaire par la spécialisation de tissus. Ces organes hautement spécialisés sont compartimentés au sein de l'organisme permettant d'individualiser et d'optimiser chacune des fonctions nécessaires à la survie. Il est donc nécessaire que la cellule œuf issue de la fécondation des gamètes puisse, au cours de ses divisions successives, donner naissance à des cellules filles capables de former un tissu spécifique, ce processus est appelé différenciation cellulaire.

La différenciation cellulaire peut être programmée génétiquement par la cellule mais dépend également en grande partie de l'environnement de la cellule. En envoyant des signaux à la cellule non-différenciée, les molécules diffusibles, les facteurs de croissance, les protéines de la matrice extracellulaire ainsi que les cellules voisines vont induire des cascades de signalisations intracellulaires responsables de l'activation des gènes de différenciation et de l'extinction de certains gènes nécessaires au maintien des cellules dans un état non-différencié. Chaque cellule en cours de différenciation doit donc intégrer un grand nombre de signaux jouant sur l'arrêt de la prolifération cellulaire et la mise en place de marqueurs spécifiques du type cellulaire différencié. La communication avec le milieu environnant nécessite l'expression de récepteurs transmembranaires capables de former des complexes protéiques recrutant des molécules structurales et enzymatiques permettant d'initier des voies de signalisation différentes selon le type d'engagement.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont eu pour but de définir les facteurs permettant la mise en place de complexes d'adhérences intercellulaires, les jonctions adhérentes, au cours de la différenciation épithéliale dans un modèle de cellules intestinales humaines.

INTRODUCTION

I. L'EPITHELIUM INTESTINAL

I.1. Fonction et structure de l'intestin

I.1.1. Une surface d'échange optimisée

L'intestin, dont la fonction physiologique majeure est l'absorption de nutriments du milieu extérieur vers le milieu intérieur, est l'exemple même d'un organe hautement spécialisé. La structure de l'intestin adulte est optimisée afin d'obtenir la surface d'échange la plus importante possible (figure 1). Chez l'homme l'intestin grêle, responsable de l'absorption des nutriments, mesure 7 mètres de longueur, sa paroi est composée d'une multitude de replis macroscopiques d'environ 1 cm appelés valvules conniventes ou valvules de Kerckring, chacune possédant d'innombrables petites évaginations de 0,5 à 1 mm de hauteur : les villosités intestinales. Ces villosités comprennent deux compartiments distincts, les cryptes et les villi. L'acquisition d'une surface d'échange maximale est visible jusqu'au niveau cellulaire. En effet, l'épithélium intestinal, en contact direct avec le milieu extérieur (lumière intestinale) est composé d'une monocouche de cellules épithéliales dont une majorité de cellules très différenciées, les entérocytes, présentent à leur surface des protrusions membranaires appelées microvillosités mesurant de 1 à 2 μm de hauteur. On estime ainsi que l'intestin grêle représente une surface totale équivalente à celle d'un terrain de tennis, soit environ 250 m^2 . La monocouche de cellules épithéliales repose sur une matrice extracellulaire spécialisée appelée lame basale, sécrétée par les cellules du mésenchyme et les cellules épithéliales elles-mêmes, séparant l'épithélium de la couche inférieure composée du tissu conjonctif et des vaisseaux sanguins et lymphatiques, appelée lamina propria.

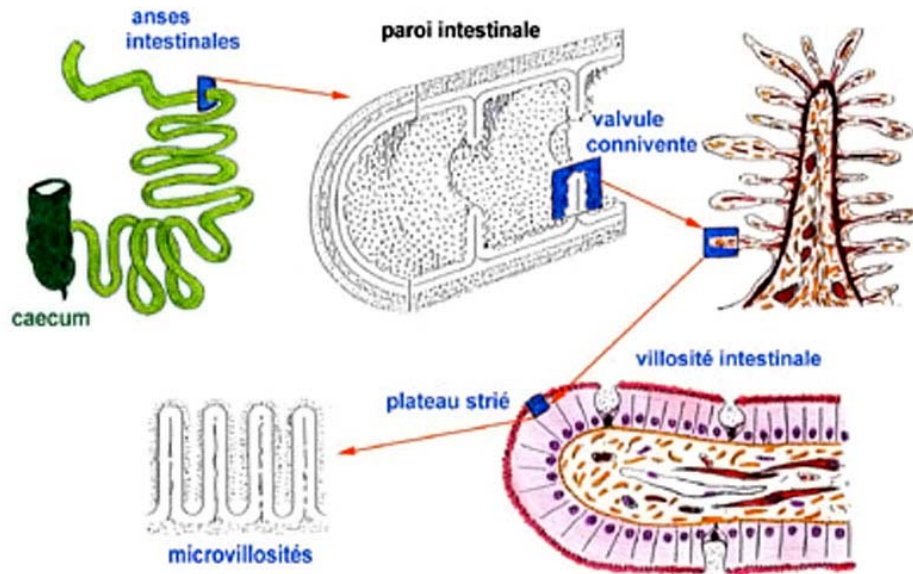


Figure 1 : Organisation de l'intestin

Schématisation des différents niveaux de repliements de l'épithélium intestinal (d'après N.Vacheret)

En plus de son rôle d'absorption des nutriments par les cellules entérocytaires, l'épithélium intestinal doit servir de barrière entre le milieu extérieur et le milieu interne sous-jacent, en particulier contre l'infiltration d'agents pathogènes. Bien que le tube intestinal soit habité par une importante quantité de bactéries non pathogènes composant la flore intestinale nécessaire à la dégradation et à l'assimilation des aliments, il représente également une niche potentielle pour de nombreuses bactéries pathogènes. L'infiltration de ces pathogènes est limitée par la présence au niveau des cellules intestinales différenciées de systèmes protéiques membranaires capables de former des jonctions intercellulaires imperméables aux molécules et aux microorganismes de l'environnement. Ces complexes protéiques adhésifs sont assemblés au cours de la différenciation des entérocytes et leur absence permet aux pathogènes de traverser la barrière épithéliale et d'activer le système immunitaire de la muqueuse, provoquant ainsi des inflammations.

I.1.2. Les types de cellules intestinales différenciées

L'épithélium digestif est composé de quatre types cellulaires qui exercent des fonctions différentes et sont regroupées en deux familles : les cellules absorbantes (représentant 80% des cellules totales) et les cellules sécrétrices. Les différences de fonctions entre ces types cellulaires se traduisent au niveau génétique mais également au niveau morphologique (figure 2).

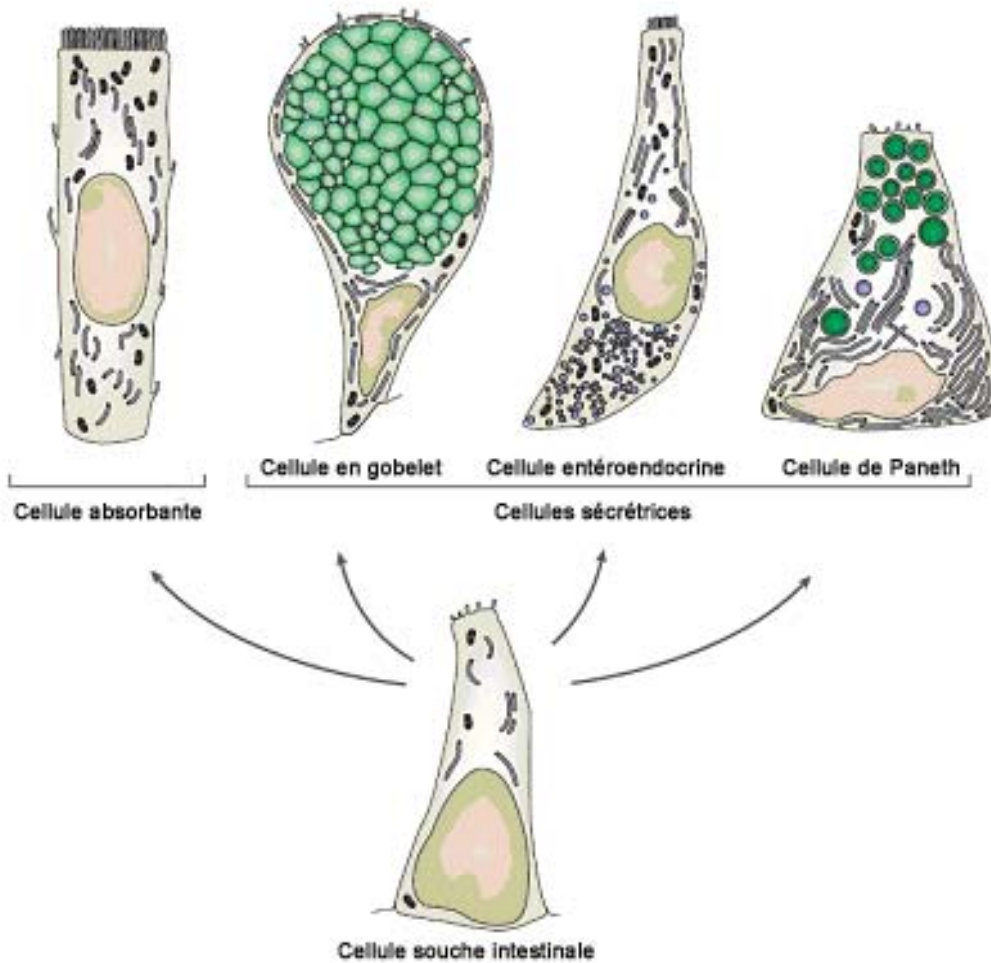


Figure 2 : Différenciation terminale des cellules de l'intestin
(Crosnier et al, 2006)

1.1.2.a Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth sont les seules cellules à se différencier en migrant vers le bas des cryptes. Elles sont caractérisées par la présence de nombreuses granules de sécrétion dans leur cytoplasme et produisent des protéines solubles telles que des facteurs de croissance, des protéines de la matrice extracellulaire et des peptides antimicrobiens. Ces cellules jouent en effet un rôle important dans la réponse immunitaire innée au niveau de l'intestin (Elphick & Mahida, 2005).

1.1.2.b Les cellules sécrétrices de mucus (cellules en Gobelet)

Ces cellules sont spécialisées dans la sécrétion du mucus, enrichi en protéines hautement glycosylées appelées mucines. Le mucus a pour fonction de protéger la muqueuse intestinale en formant une couche continue à la surface des cellules épithéliales, il facilite le transit et

forme une première barrière face aux microorganismes présents dans la lumière intestinale. La morphologie particulière de ces cellules reflète la grande quantité de vésicules de sécrétion responsable du relargage continu des mucines. Elles sont assez peu représentées au niveau de l'intestin grêle mais leur nombre augmente dans le colon.

1.1.2.c Les cellules entéroendocrines

Ces cellules sont également de type sécrétoire : elles produisent des hormones et des neuropeptides comme la somatostatine, la sérotonine et le glucagon, permettant de réguler le métabolisme des cellules intestinales.

1.1.2.d Les entérocytes

Représentant 80% des cellules totales de l'épithélium intestinal, l'entérocyte tient un rôle majeur dans la fonction de l'épithélium intestinal. Sa fonction première est l'absorption des nutriments : lipides, glucides, peptides, vitamines et sels minéraux présents dans la lumière du tube digestif. Les entérocytes assurent également les étapes finales de la digestion de ces nutriments grâce à la présence d'enzymes capables de prendre en charge et de dégrader les sucres et les lipides dès leur contact avec la membrane plasmique. Enfin, la présence de complexes d'adhérences stables au niveau de leurs membranes latérales permet d'assurer l'imperméabilité de l'épithélium en créant une barrière entre le milieu extérieur et le milieu intérieur, favorisant ainsi le transport sélectif des nutriments et empêchant le passage de microorganismes indésirables. Au niveau du côlon, les cellules assurant les mêmes fonctions que les entérocytes sont appelées colonocytes.

Les travaux développés lors de ce doctorat s'intéressent plus particulièrement à la différenciation entérocytaire, c'est pourquoi le phénotype et la fonction de ces cellules seront décrits plus précisément dans cette introduction.

I.1.3. Morphologie et fonctions des entérocytes

Les entérocytes sont des cellules polarisées : leur pôle basal est ancré à la matrice extracellulaire sous-jacente à l'épithélium via des complexes protéiques impliquant les intégrines et leur pôle apical, dédié à l'absorption des nutriments, présente une bordure en brosse constituée de microvillosités destinées à augmenter la surface d'échange avec le milieu extérieur. Cette membrane est riche en radeaux lipidiques regroupant un grand nombre de protéines spécifiques servant au transport actif de certains nutriments, comme les transporteurs de sucres de la famille GLUT. De plus le pôle apical est riche en enzymes

permettant de finaliser la digestion telles que la Saccharase Isomaltase (SI) ou l'Alcaline Phosphatase (AP) dont l'activité peut servir de marqueur de différenciation entérocytaire.

Le cytosquelette joue un rôle déterminant dans la structure et la fonction des entérocytes. En effet, les complexes d'interaction avec la matrice cellulaire ou avec les cellules voisines sont associés au cytosquelette d'actine et de filaments intermédiaires. L'actine forme par exemple des fibres de stress au niveau des complexes d'adhérence cellule-matrice et fort un réseau sous-cortical au niveau des contacts intercellulaires. Plus que de simples points d'ancrages, ces complexes jouent un rôle dans l'activation de diverses voies de signalisations et permettent de réguler par exemple les processus de prolifération ou de différenciation entérocytaire en fonction de l'environnement cellulaire. Les microvillosités sont également dépendantes du cytosquelette d'actine qui, en se polymérisant de façon rectiligne sous la membrane plasmique, la pousse de façon à former ces excroissances. Au niveau de cette bordure en brosse les filaments d'actines sont réticulés par une protéine spécifique, la villine qui peut elle aussi servir de marqueur de différenciation. Le cytosquelette de microtubules est également important puisqu'il permet le transport vésiculaire antérograde des protéines synthétisées par l'entérocyte vers la membrane plasmique mais également le transport rétrograde de vésicules contenant les nutriments à diriger vers le pôle basal pour les envoyer vers la circulation sanguine ou lymphatique.

I.2. Développement de l'intestin et renouvellement de l'épithélium intestinal

I.2.1. Origine embryonnaire de l'intestin

Chez l'être humain, à l'inverse des rongeurs, l'organogénèse de l'intestin est achevée bien avant la naissance, aux alentours de la 13^{ème} semaine de développement embryonnaire (Trier & Moxey, 1979). Après 22 semaines de gestation, les cellules absorbantes de l'embryon sont semblables aux cellules d'un adulte. La muqueuse intestinale des vertébrés a pour origine l'endoderme, responsable de la formation de l'épithélium et le mésoderme qui donne naissance au tissu conjonctif sous-jacent et au muscle lisse qui compose la sous-muqueuse. Le remodelage de la muqueuse et la formation des villi débute vers la 9^{ème} semaine de développement : des cellules mésenchymateuses se regroupent sous l'épithélium alors pluristratifié et le mésenchyme envoie des projections à l'intérieur de cet épithélium, formant alors le tissu conjonctif. Puis l'épithélium devient progressivement monostatifé depuis l'apex des villi jusqu'à leur base et après 10 semaines, seules les zones intervillaires demeurent pluristratifiées. Ce n'est qu'à 12 semaines que les cryptes sont formées, créant un

lumen entouré de cellules indifférenciées en monocouche (Montgomery et al, 1999).. L'utilisation de souris chimères a permis de mettre en évidence la clonalité des cryptes adultes, en effet les cryptes deviennent monoclonales peu de temps après la naissance chez la souris et au cours du développement chez l'homme (Griffiths et al, 1988; Ponder et al, 1985). Les villi étant constitués de cellules provenant de 4 à 6 cryptes différentes, sont composés d'une population de cellules polyclonales (Maiuri et al, 1991).

I.2.2 Un renouvellement continu chez l'adulte

Après le développement embryonnaire et tout au long de la vie de l'individu, l'épithélium intestinal se renouvelle continuellement. Comme dans tous les tissus à renouvellement rapide, il est impératif que la quantité de cellules qui naissent soit équivalente au nombre de cellules qui se différencient puis disparaissent afin de préserver la structure du tissu, c'est l'homéostasie tissulaire. Dans l'intestin grêle, la prolifération de cellules progénitrices, la différenciation et la mort cellulaires sont physiquement compartimentées et ont lieu respectivement dans les cryptes et les villi (figure 3).

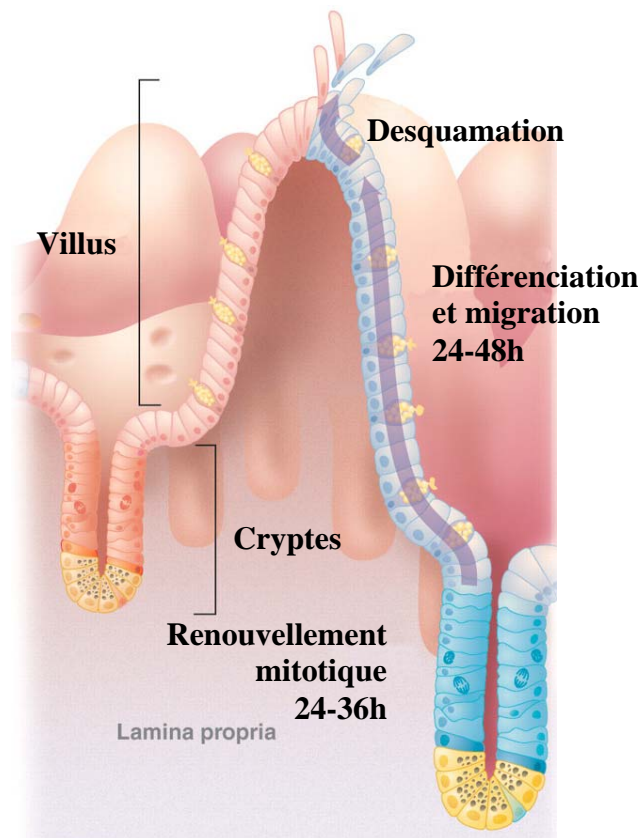


Figure 3 : Structure de l'épithélium intestinal

La monocouche de cellule épithéliale occupe deux compartiments distincts : les cryptes et les villi. (Radtke & Clevers, 2005)

Chaque organisme adulte possède au sein des tissus à renouvellement rapide des cellules multipotentes indifférenciées capables de donner les différents types cellulaires composant ce tissu, ce sont les cellules souches adultes (Coulombel, 2003). Dans le cas de l'épithélium intestinal adulte, les cellules souches ont été localisées dans les cryptes (4 à 6 par cryptes) et correspondraient précisément à la quatrième position en partant du bas des cryptes (Potten, 1998). Elles réalisent des divisions asymétriques, donnant ainsi naissance à une nouvelle cellule souche indifférenciée et une cellule prédifférenciée dite progénitrice. Les cellules progénitrices réalisent alors rapidement 3 à 4 divisions puis se différencient en cellules absorbantes (entérocytes), entéroendocrines ou sécrétrices de mucus lors de leur migration en cohorte vers le haut des villi. A l'apex des villi, ces cellules perdent ensuite leurs capacités d'adhérence à la lame basale, se détachent et meurent par anoïkis (mort cellulaire programmée induite par le détachement des cellules de leur substrat (Frisch & Francis, 1994)). L'épithélium intestinal s'auto-renouvelle ainsi de façon continue chez l'individu adulte, les cellules mettant de 4 à 6 jours à migrer depuis la base des cryptes vers l'apex des villi. Il apparaît donc que les cryptes représentent le compartiment prolifératif tandis que la régulation de la différenciation épithéliale a lieu dans les villi. La séparation physique de ces deux processus pourtant intimement liés fait de l'épithélium intestinal un système idéal permettant l'étude des différents mécanismes moléculaires régulant la prolifération et la différenciation.

II. DE LA CELLULE SOUCHE A LA CELLULE EPITHELIALE DIFFERENCIÉE

Pour assurer l'homéostasie d'un tissu aussi dynamique que l'épithélium intestinal, les cellules souches réalisent constamment des divisions asymétriques sous le contrôle des voies Wnt et Notch (Crosnier et al, 2006). Puis les cellules filles progénitrices prolifèrent à leur tour avant leur différenciation terminale en cellules des lignées absorbantes ou sécrétoires. La prolifération cellulaire, en assurant aux cryptes un réservoir de cellules indifférenciées, est donc un processus clé de la fonctionnalité de l'épithélium intestinal.

II.1. Mécanismes de prolifération cellulaire

II.1.1. Le cycle cellulaire : généralités

De sa formation par division d'une cellule mère jusqu'à sa propre division en deux cellules filles, une cellule effectue un cycle cellulaire complet. Bien que la durée du cycle soit variable

selon les tissus, il s'effectue toujours en quatre phases successives: la phase G1, la phase S, la phase G2 et la mitose (figure 4).

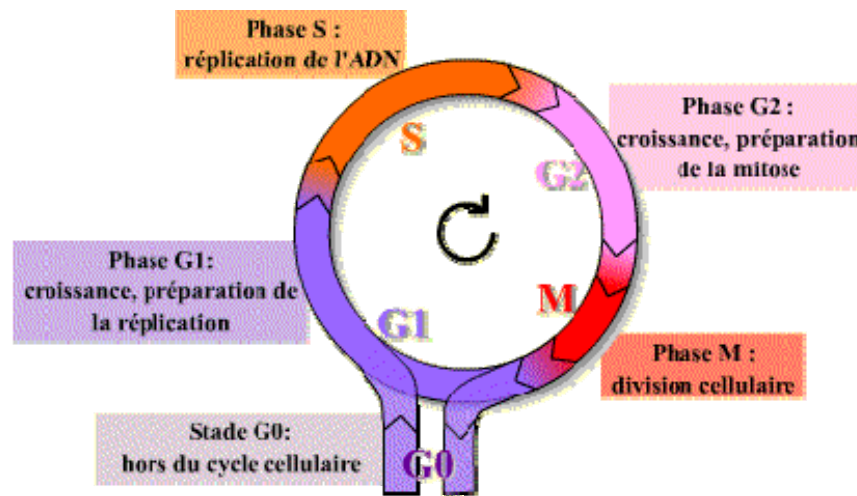


Figure 4 : Les phases du cycle cellulaire

Durant la phase G1 la cellule reçoit des signaux de son environnement et les intègre afin de s'orienter vers la division ou vers un stade quiescent, la phase G0. Si tous ces signaux sont en faveur d'une prolifération, le volume de la cellule augmente car elle produit le matériel protéique nécessaire au bon déroulement de la phase S. Durant la phase S (phase de Synthèse de l'ADN), l'ADN est répliqué à l'identique et les centrosomes sont dupliqués. Puis, après la phase de préparation et de croissance G2, la cellule entame la mitose au cours de laquelle les chromosomes dupliqués, les centrosomes et le matériel épigénétique sont distribués équitablement entre les deux cellules filles. La mitose est elle-même subdivisée en 4 phases : la prophase lors de laquelle les chromosomes se condensent, les centrosomes s'éloignent l'un de l'autre, le fuseau mitotique se forme et l'enveloppe nucléaire disparaît. Puis la métaphase qui correspond à l'alignement au niveau de la plaque équatoriale des chromosomes reliés au fuseau mitotique par les kinétochores. Vient ensuite l'anaphase lors de laquelle les deux chromatides-sœurs de chaque chromosome se séparent. Chaque chromatide devient ainsi un chromosome "fils" indépendant. Un lot de chromatides migre vers un pôle, pendant que l'autre lot migre vers le pôle opposé de la cellule. Enfin, en télophase, les enveloppes nucléaires se reforment autour des deux lots de chromosomes, et les deux cellules filles s'individualisent par contraction d'un anneau centrale d'actomyosine : c'est la cytotélorèse. Après un cycle de division, la plupart des cellules de l'organisme entrent en phase G0, qui est un stade de non division, on parle alors de cellules quiescentes. Cette étape est nécessaire à la mise en place de

la différenciation, les cellules doivent en effet arrêter de cycler pour se différencier. Dans le cas des cellules souches, les cellules filles peuvent cependant garder la capacité de proliférer activement et débutent alors un nouveau cycle en phase G1.

II.1.2. Régulation de la prolifération cellulaire

Cette succession des différentes phases du cycle cellulaire doit être très finement régulée. En effet la cellule doit continuellement vérifier qu'elle est apte à se diviser et notamment que les deux cellules filles ne comporteront pas d'anomalies génétiques. Pour cela, le passage d'une phase à l'autre est régulé par des couples de protéines appelés cyclines et cyclines-dépendant-kinases (Cdk) et chaque étape importante du cycle est soumise à un ou plusieurs points de contrôles (« check points »).

II.1.2.a Les complexes cycline/Cdks : régulateurs de la progression du cycle cellulaire

Dès le début des années 70, des expériences d'injection de cytoplasmes d'ovocytes de Xénope ont démontré la présence d'un facteur cytoplasmique alors appelé MPF (Maturing Promoting Factor) capable d'induire la maturation d'un second ovocyte (Masui & Markert, 1971; Schorderet-Slatkine & Drury, 1973). Ce facteur s'est avéré être en fait un hétérodimère formé d'une sérine / thréonine kinase, la cyclin-dépendant-kinase (Cdk), associée à une sous-unité régulatrice nommée cycline (Gautier et al, 1989; Gautier et al, 1988). A ce jour, on a recensé chez l'homme une dizaine de Cdks et une vingtaine de cyclines, mais seuls quelques complexes, dont l'expression varie au cours des différentes phases, sont directement impliqués dans la régulation des événements indispensables au bon déroulement du cycle cellulaire (figure.5). Ainsi, l'activité des complexes Cdk4 / cycline D et Cdk6 / cycline D est maximale en fin de phase G1 et permet notamment la transcription des gènes nécessaires à la transition G1/S en phosphorylant la protéine Rb qui libère alors le facteur de transcription E2F. La transition G1/S et la progression dans la phase S sont assurées par les couples Cdk2 / cycline E et Cdk2 / cycline A, leur activité permet entre autres de déclencher et d'entretenir la réplication de l'ADN, induit la duplication des centrosomes et inhibe la dégradation de la cycline B, qui peut alors s'accumuler. Le complexe Cdk1 / cycline B dirige ensuite la transition G2/M et permet la bonne progression de la mitose.

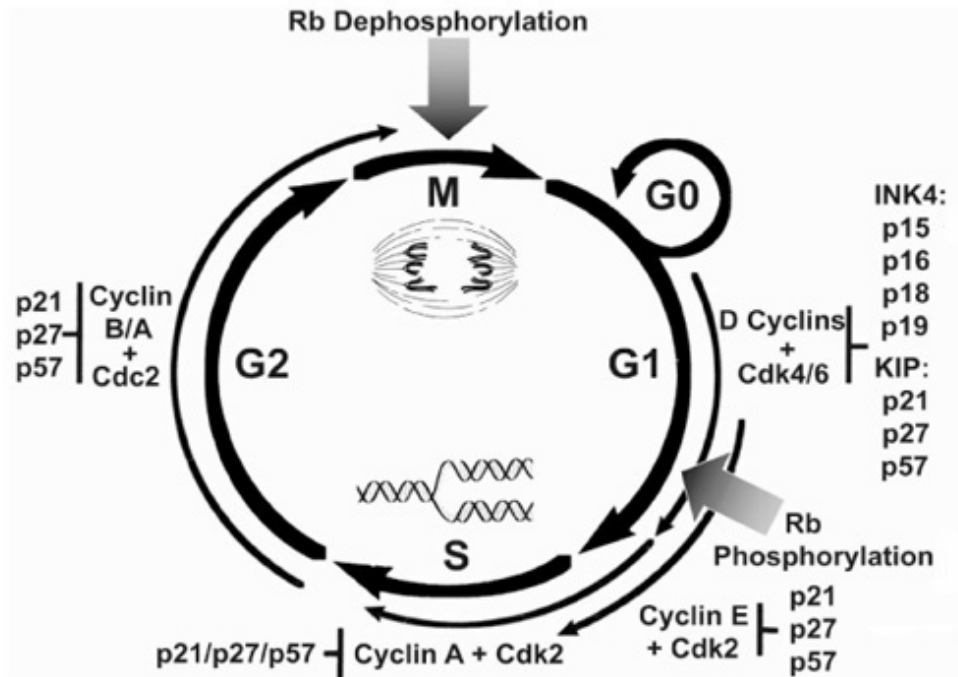


Figure 5 : Les complexes Cdk / cyclines et leurs inhibiteurs au cours du cycle cellulaire
d'après (Donovan & Slingerland, 2000)

II.1.2.b La cycline E :

Les expériences traitant de la prolifération cellulaire réalisées au cours de ce doctorat se sont focalisées sur la régulation de la cycline E, c'est pourquoi dans la suite de cette introduction, cette cycline sera décrite avec plus de précisions.

L'ARN messager de la cycline E est exprimé de façon croissante au cours de phase G1 pour atteindre son maximum en fin de G1. Son expression protéique ainsi que son association à Cdk2 est nécessaire au passage du point de restriction de fin de phase G1, avant lequel les cellules ont besoin de facteurs de croissance pour progresser dans le cycle, et après lequel elles peuvent proliférer indépendamment des stimuli mitogéniques. Des cellules dans lesquelles la cycline E est absente ou incapable d'activer la Cdk2 ne peuvent donc pas entrer en phase S (Ohtsubo et al, 1995). Au cours de la phase S, le complexe cycline E / Cdk2 est également indispensable à l'initiation de la réplication de l'ADN en permettant la transcription de gènes cibles du facteur E2F (Furstenthal et al, 2001; Krude et al, 1997). De plus, l'activité du couple cycline E/ Cdk2 au cours de la phase S est impliquée dans la duplication des centrosomes, permettant ainsi de coordonner le cycle de réplication de l'ADN et celui des centrosomes (Hinchcliffe et al, 1999; Matsumoto et al, 1999). Le complexe cycline E/CDK-2 phosphoryle la thréonine 199 de la chaperonne nucléophosmine/B23 (NPM)

alors localisée au niveau des centrioles non dupliquées ce qui a pour effet de dissocier la nucléophosmine des centrioles et permettre leur duplication (Okuda et al, 2000).

Durant la dernière moitié de la phase S la cycline E est finalement dégradée par le système ubiquitine/protéasome suite à l'autophosphorylation de la cycline E sur la thréonine 380 et à sa dissociation du complexe (Clurman et al, 1996; Won & Reed, 1996). Deux protéines à domaine F-box ont été décrites pour lier l'ubiquitine à la cycline E : Skp2 et Fbw7, des mutations dans l'une ou l'autre de ces protéines entraînant une accumulation de cycline E (Bai et al, 1996; Strohmaier et al, 2001). Le niveau d'expression de la cycline E reste ensuite très faible au cours des phases G2 et M puis croit à nouveau dans les cellules filles proliférantes en cours de phase G1. Des modifications d'expression et d'activité de la cycline E sont observées dans un grand nombre de cancers (Keyomarsi & Herliczek, 1997) et peuvent provoquer le développement tumoral en favorisant la polyploïdie et les instabilités génomiques (Kawamura et al, 2004).

II.1.2.c Les inhibiteurs de cyclines/Cdks : les freins du système

L'arrêt de la signalisation dépendante des complexes cycline/Cdk est finement régulé par l'expression de protéines inhibitrices de Cdks. Ces protéines appartiennent à deux familles : la famille Cip/Kip composée de p21, p27, p57 qui inhibent les complexes Cdk2, Cdk4/6 /cyclines et retardent la progression de G1 à S, et la famille Ink (p15, p16, p18, p19) qui inhibent la formation de complexes Cdk4/6 avec la cycline D (Sherr & Roberts, 1999) (fig. 5).

Dans le cas de l'épithélium intestinal, les protéines de la famille Cip/Kip régulent à la fois l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'induction de la différenciation. Des travaux réalisés avec la lignée cellulaire intestinale humaine Caco-2 ont démontré que l'expression de p21 est impliquée dans l'arrêt de prolifération des cellules en G1 puis les protéines p27 et p57 permettent la mise en place et la maintien d'une différenciation entérocytaire (Deschenes et al, 2001).

II.2. La différenciation épithéliale intestinale

La fonction même de l'intestin repose sur la capacité des cellules intestinales à absorber les nutriments, sécréter du mucus et former une barrière vis-à-vis du milieu extérieur. Pour cela, les cellules progénitrices amplifiées dans la partie supérieure des cryptes représentent un vivier de cellules fonctionnelles en devenir qui vont devoir se spécialiser dans l'une ou l'autre de ces fonctions. La différenciation cellulaire vers l'un des quatre types de cellule nécessite la

régulation coordonnée de gènes spécifiques et l'arrêt de la signalisation activant la prolifération.

II.2.1. De la prolifération à la différenciation cellulaire

II.2.1.a Rôle des facteurs diffusibles

Il a été démontré que le maintien d'une prolifération active au sein des cryptes dépend de l'activation de la voie Wnt (Crosnier et al, 2006). Les protéines de la famille Wnt sont des molécules diffusibles qui se fixent aux récepteurs transmembranaires Frizzled exprimés par les cellules cibles. L'activation de ces récepteurs régule alors la dégradation de la β -caténine dans le cytoplasme (Giles et al, 2003). Lorsque la voie Wnt est activée, la β -caténine cytoplasmique n'est pas dégradée. Elle est transloquée vers le noyau où elle interagit avec le facteur de transcription TCF/LEF et induit la transcription de gènes cibles favorisant la prolifération cellulaire comme c-myc, c-jun ou la cycline D1 (figure 6). Inversement, Lorsque la voie Wnt n'est pas activée, la β -caténine est prise en charge par un complexe de « dégradation » composé de APC (Adenomatous Polyposis Coli), de l'axine et d'une E3 ubiquitine-ligase qui dirigent la β -caténine vers le protéasome où elle est dégradée. Dans ce cas, le facteur TCF/LEF réprime l'activité de ses gènes cibles en s'associant à des corépresseurs comme groucho. Au sein de l'épithélium intestinal, la signalisation Wnt régule ainsi l'homéostasie par un système on/off : elle est active dans les cellules proliférantes des cryptes et s'éteint au cours de la différenciation épithéliale le long du villus (Gregorieff et al, 2005).

Un ensemble de travaux portant sur l'étude de modèles animaux reflète clairement l'importance de la voie Wnt au sein de l'épithélium intestinal. Ainsi, la délétion du gène Tcf 4 chez la souris provoque la disparition des cellules intestinales proliférantes, réduit le nombre de villi et induit la mort des animaux peu de temps après leur naissance (Korinek et al, 1998). De même, l'expression forcée d'un inhibiteur de la voie Wnt, DKK1 (dickkopf homologue 1) provoque la disparition des cryptes et réduit la taille et le nombre des villi (Pinto et al, 2003). A l'inverse, l'activation ectopique de cette même voie suite à des mutations dans la protéine APC conduit à l'apparition de cryptes géantes et de polypes intestinaux. Ces mutations peuvent être l'origine de nombreuses tumeurs colorectales chez l'homme (Morin et al, 1997; Sansom et al, 2004).

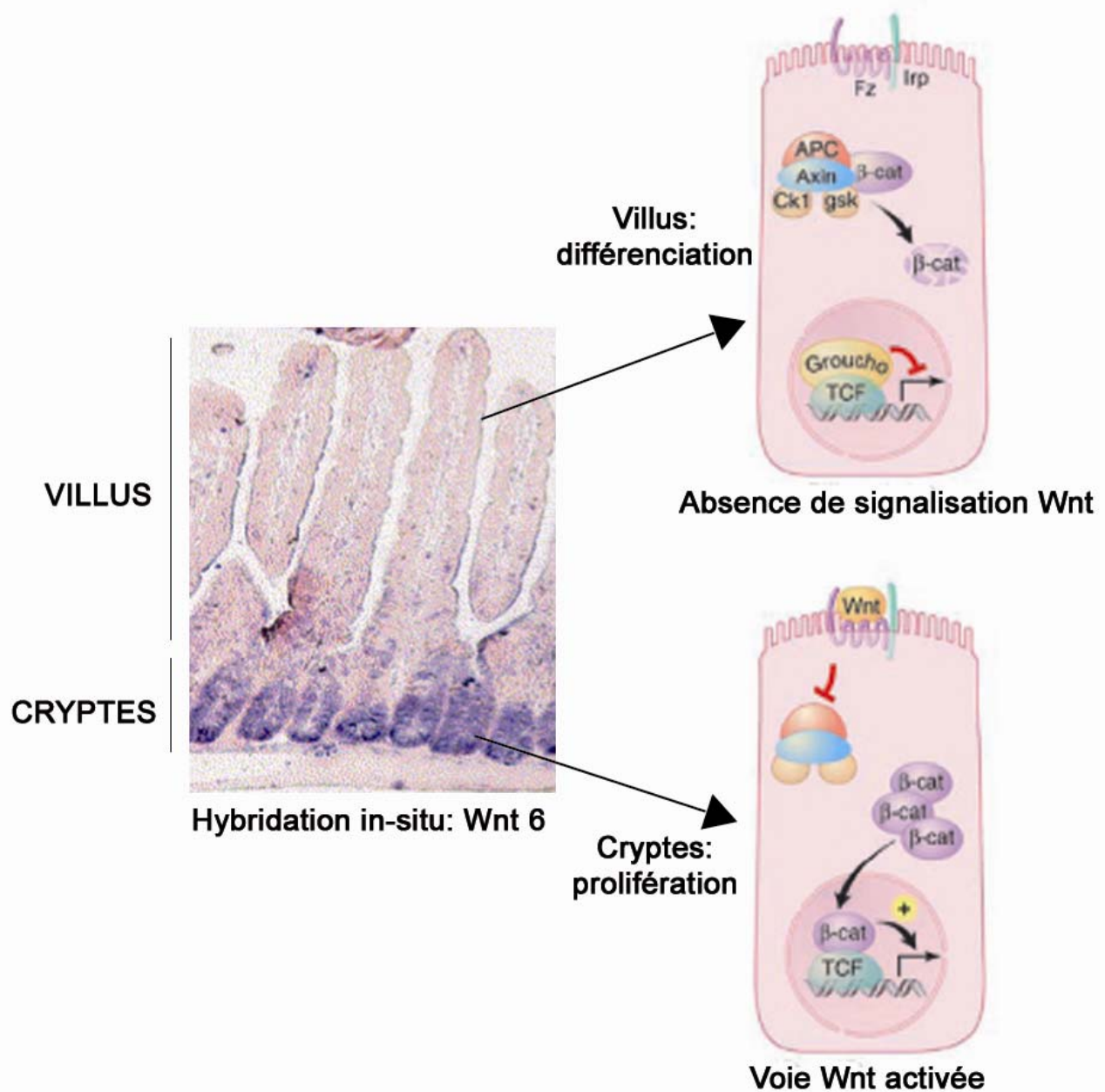


Figure 6 : La voie Wnt régule l'état prolifératif des cellules intestinales.
(Gregorieff et al, 2005; Radtke & Clevers, 2005)

Au niveau des villi, la prolifération des cellules intestinales est inhibée par l'expression d'un autre facteur diffusible: BMP (Bone Morphogenetic Protein). Les cellules du mésenchyme sous-jacent à l'épithélium expriment BMP2 et BMP4 qui vont alors contre la signalisation de la voie Wnt (He et al, 2004). Au niveau des cryptes, les cellules dans lesquelles Wnt est activée sécrètent un inhibiteur de BMP, noggin, qui permet aux cellules de continuer à proliférer. Le maintien de deux compartiments fonctionnellement distincts, l'un prolifératif,

l'autre quiescent, repose donc sur la présence de deux familles de facteurs diffusibles antagonistes qui s'autorégulent respectivement (figure7).

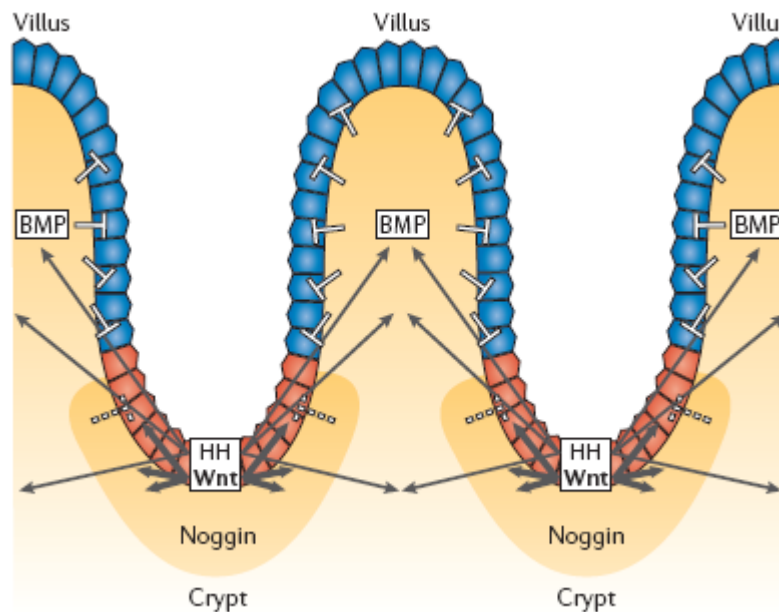


Figure 7 : Un jeu d'inhibiteurs croisés permet la séparation fonctionnelle des cryptes et des villi.
(Crosnier et al, 2006)

II.2.1.b Régulation de facteurs de transcription spécifiques

L'opposition entre les facteurs diffusibles Wnt et BMP permet donc la régulation de l'état prolifératif ou différencié des cellules intestinales. Les deux voies aboutissent à la régulation de l'expression et de l'activation de facteurs de transcription spécifiques permettant de remodeler le pattern des gènes transcrits au sein du noyau. Ainsi, certains facteurs de transcription, exprimés dans les cryptes, vont être capables d'activer des gènes favorisant la prolifération cellulaire tandis que d'autres facteurs vont être exprimés et activés préférentiellement au niveau des villi, assurant la transcription de gènes clés de la différenciation intestinale.

Parmi les facteurs de transcription favorisant la prolifération cellulaire et le maintien des cellules dans un état indifférencié, on peut distinguer le complexe TCF/LEF qui est l'effecteur direct de la voie Wnt. Comme discuté précédemment, son activation assure la transcription des gènes codant pour la cycline D1 et les proto-oncogènes c-jun et c-myc (He et al, 1998; Nateri et al, 2005; Tetsu & McCormick, 1999). Le facteur c-myc permet entre autres de réprimer l'expression de p21, un inhibiteur des cyclines de la famille Kip/Cip (Hermeking et

al, 1995). D'autres acteurs comme le facteur de transcription c-myb semblent jouer un rôle décisif dans le maintien d'une prolifération active au sein des cryptes. En effet, des souris exprimant des protéines c-myb mutées présentent des défauts de prolifération dus à la baisse d'expression de la cycline E1 (Malaterre et al, 2007). Au contraire, l'expression constitutive de c-myb inhibe la différenciation de cellules épithéliales du colon (Ramsay et al, 2005).

Plus récemment il a été démontré que le facteur de transcription Sox 9, connu pour favoriser la formation du cartilage et le développement des gonades, est également exprimé au niveau des cryptes en réponse à la voie Wnt (Blache et al, 2004). Son expression empêche la différenciation entérocytaire en inhibant la transcription des gènes codant pour Cdx2 et Muc2.

Cdx2 (Caudal type homeobox transcription factor 2) est un facteur de transcription à homéodomaines spécifique de l'intestin exprimé au niveau des villi et capable d'induire un phénotype d'entérocyte mature lorsqu'il est surexprimé (Lorentz et al, 1997). Il appartient à un ensemble de facteurs de transcription capables d'inhiber la prolifération cellulaire intestinale et d'assurer la différenciation entérocytaire. En effet, la surexpression de Cdx2 dans les cellules HT-29 réduit leur prolifération de 50 % (Mallo et al, 1998). Son activation permet de plus la transcription de gènes nécessaires à la différenciation entérocytaire dont des enzymes comme la sucrase-isomaltase et la lactase-phlorizin hydrolase (LPH) (Guo et al, 2004). Le taux de la protéine Cdx2 est régulé par la Cdk2 et p27 : sa phosphorylation par la Cdk2 augmente sa dégradation par le protéasome tandis que p27, en interagissant directement avec Cdx2, pourrait inhiber la Cdk2 et ainsi permettre de stabiliser l'expression du facteur de transcription (Boulangier et al, 2005).

Les facteurs de transcription KLF-4 et KLF-5 (Krüppel-Like-Factors) sont également impliqués dans cette régulation de l'homéostasie intestinale (McConnell et al, 2007). En effet, le gène codant pour KLF-5 est régulé par la voie Wnt (Ziemer et al, 2001) et l'expression de la protéine est restreinte aux cellules proliférantes des cryptes. Au contraire la protéine KLF-4 est fortement exprimée dans les cellules différenciées, au niveau des villi. En recrutant p53 sur le promoteur du gène de p21, KLF-4 permet l'arrêt de la prolifération cellulaire (Zhang et al, 2000). De plus KLF-4 induit la différenciation des cellules intestinales en activant la transcription des gènes de la chaîne $\alpha 1$ de laminine et de l'alcaline phosphatase (Hinnebusch et al, 2004; Piccinni et al, 2004). De façon intéressante, les effets opposés de ces deux protéines peuvent être associés au fait que les deux protéines s'autorégulent, KLF-5 inhibe l'expression de KLF-4 tandis que KLF-4 effectue un rétrocontrôle positif sur sa propre expression (Dang et al, 2002; Mahatan et al, 1999).

L'expression des facteurs Hepatic Nuclear Factor-4 (HNF-4) α et γ est également associée à la différenciation des cellules intestinales. Les facteurs HNF-4 sont capables de se fixer à un élément de réponse présent au niveau de gènes impliqués dans la différenciation entérocytaire comme l'apolipoprotéine A IV (Archer et al, 2005; Sauvaget et al, 2002). L'expression de HNF-4 γ est par ailleurs restreinte aux villi tandis que HNF-4 α est exprimé tout au long de l'axe crypte-villus. Toutefois, l'accumulation nucléaire du facteur HNF-4 α pourrait être favorisée au niveau des villi par l'engagement de la E-cadhérine (Peignon et al, 2006).

Cette régulation fine et progressive de l'expression et de l'activation de facteurs de transcription le long de l'axe crypte-villus souligne le lien étroit existant entre l'arrêt de la prolifération et la mise en place d'un programme de différenciation des cellules intestinales.

II.2.2. Une spécialisation cellulaire en plusieurs étapes

Nous avons vu que la voie Wnt/ β -caténine permet de réguler la prolifération des cellules souches et des progéniteurs au sein des cryptes. En parallèle de ce système on/off, les cellules progénitrices doivent peu à peu se spécialiser pour donner l'un des quatre types de cellules différenciées présent au sein de l'épithélium intestinal. Comment des cellules souches identiques peuvent-elles produire des types cellulaires si différents fonctionnellement et morphologiquement ? Le mécanisme proposé repose sur une inhibition latérale entre les précurseurs des deux types de lignées, sécrétrices et absorbantes, impliquant des facteurs de transcription de type b-HLH (basic-Helix Loop Helix).

L'orientation vers les différents types de l'épithélium digestif se décide en quatre étapes (Figure 8): tout d'abord l'expression du gène Math-1, codant pour un facteur de transcription de type b-HLH, individualise la lignée sécrétrice (qui est Math-1 positive) de la lignée absorbante (Math-1 négative). L'invalidation du gène Math-1 chez la souris conduit à l'obtention d'un épithélium composé à 100% d'entérocytes (Yang et al, 2001). La régulation d'expression de Math-1 est elle-même régulée par la voie Notch. L'activation de la voie Notch induit l'expression du répresseur de transcription HES (Hairy/Enhancer of Split) dans les cellules de la lignée absorbante qui va alors inhiber l'expression de Math-1. Des souris mutantes délétées du gène HES meurent précocement et leur intestin est majoritairement composé de cellules sécrétrices (Jensen et al, 2000).

La distinction entre les cellules entéroendocrines et sécrétrices de mucus, toutes deux Math-1 positives, repose également sur l'expression différentielle d'un autre facteur de transcription

de type b-HLH : la neurogénine-3 (ngn-3), exprimée uniquement dans les cellules entéroendocrines, son invalidation menant à l'absence de celles-ci (Jenny et al, 2002).

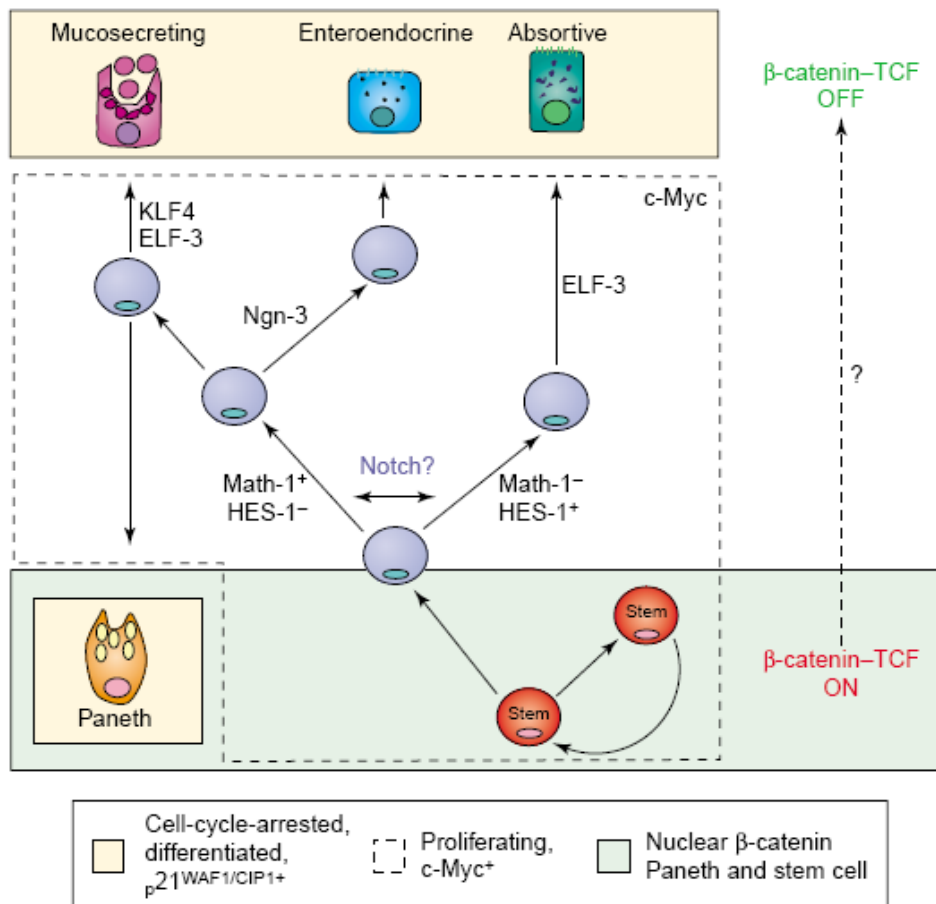


Figure 8 : Spécification des cellules intestinales différenciées
(Sancho et al, 2003)

Suite à ces inhibitions latérales, les cellules progénitrices prédifférenciées peuvent utiliser des voies identiques lors de leurs dernières étapes de différenciation, c'est le cas du facteur ELF-3 (E74-Like Factor 3), exprimé à la fois dans la spécification tardive des cellules mucosécrétrices et dans les entérocytes.

Le cas des cellules de Paneth est unique puisque ce sont les seules cellules à se différencier en migrant vers le bas des cryptes. Il a été montré que leurs progéniteurs intègrent différemment le signal Wnt, qui contrairement au schéma établi précédemment permet leur maturation en activant notamment l'expression des Ephrines B et de leurs récepteurs. Chez des souris Eph B3 ^{-/-}, les cellules de Paneth ne migrent plus seulement vers le bas mais dans toutes les directions, ce qui souligne leur rôle dans cette spécification singulière (Batlle et al, 2002).

Les facteurs diffusibles comme Wnt, BMP ou noggin représentent des facteurs environnementaux externes permettant de réguler finement l'expression de gènes clés de la prolifération ou de la différenciation épithéliale, contribuant ainsi au bon renouvellement de l'épithélium intestinal. Toutefois les cellules épithéliales sont également capables d'assembler des complexes d'adhérence leur permettant d'explorer et de communiquer avec leur environnement. En adhérant à la matrice extracellulaire sous-jacente et en créant des contacts étroits avec leurs voisines, les cellules épithéliales peuvent ainsi compléter et réguler les signaux provenant des facteurs diffusibles précédemment cités.

III.SYSTEMES D'ADHERENCES ET REGULATION DU RENOUVELLEMENT DE L'EPITHELIUM INTESTINAL

Il existe deux grands types d'adhérences cellulaires, l'adhérence cellule-matrice et l'adhérence cellule-cellule. Les cellules épithéliales adhèrent à une matrice extracellulaire spécialisée appelée lame basale par le biais de complexes protéiques appelés hemidesmosomes et adhérences focales localisés à leur pôle basal. Ces complexes sont constitués de protéines transmembranaires de la famille des intégrines associées à des protéines intracellulaires structurales et régulatrices. Les adhérences intercellulaires, présentes à la membrane latérale des cellules, sont de quatre types : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes. Elles impliquent différentes protéines transmembranaires : les cadhérines pour les desmosomes et les jonctions adhérentes, les occludines au niveau des jonctions serrées et les connexines pour les jonctions communicantes. Comme dans le cas des jonctions cellules-matrices, ces récepteurs interagissent dans le cytoplasme avec diverses protéines adaptatrices ou de signalisation.

La capacité qu'ont ces systèmes d'adhérence à moduler la signalisation intracellulaire en fonction de l'environnement immédiat de la cellule et le fait que leur composition et leur force d'engagement varient au cours de la différenciation démontrent que ces complexes d'adhérence sont directement impliqués dans la régulation du renouvellement épithélial au sein de l'intestin (Beaulieu, 1999; Carroll et al, 1988; Kedinger et al, 1998; Stutzmann et al, 2000).

III.1. L'adhérence cellule-matrice extracellulaire

III.1.1. La lame basale

III.1.1.a Composition de la lame basale

La lame basale sépare les cellules épithéliales du tissu conjonctif. Elle est divisée en deux couches qui diffèrent par leur composition moléculaire et leur densité aux électrons : la lamina lucida, immédiatement adjacente aux cellules épithéliales et la lamina densa qui repose sur le tissu conjonctif (lamina propria).

Cette matrice extracellulaire est composée de macromolécules synthétisées par les cellules épithéliales elles-mêmes et par les cellules du tissu conjonctif (figure 9). On retrouve notamment divers types de collagènes, différentes isoformes de laminine, de fibronectine, de nidogène et des protéoglycanes associées en réseau bidimensionnel (Aumailley & Krieg, 1996; Simon-Assmann et al, 1995).

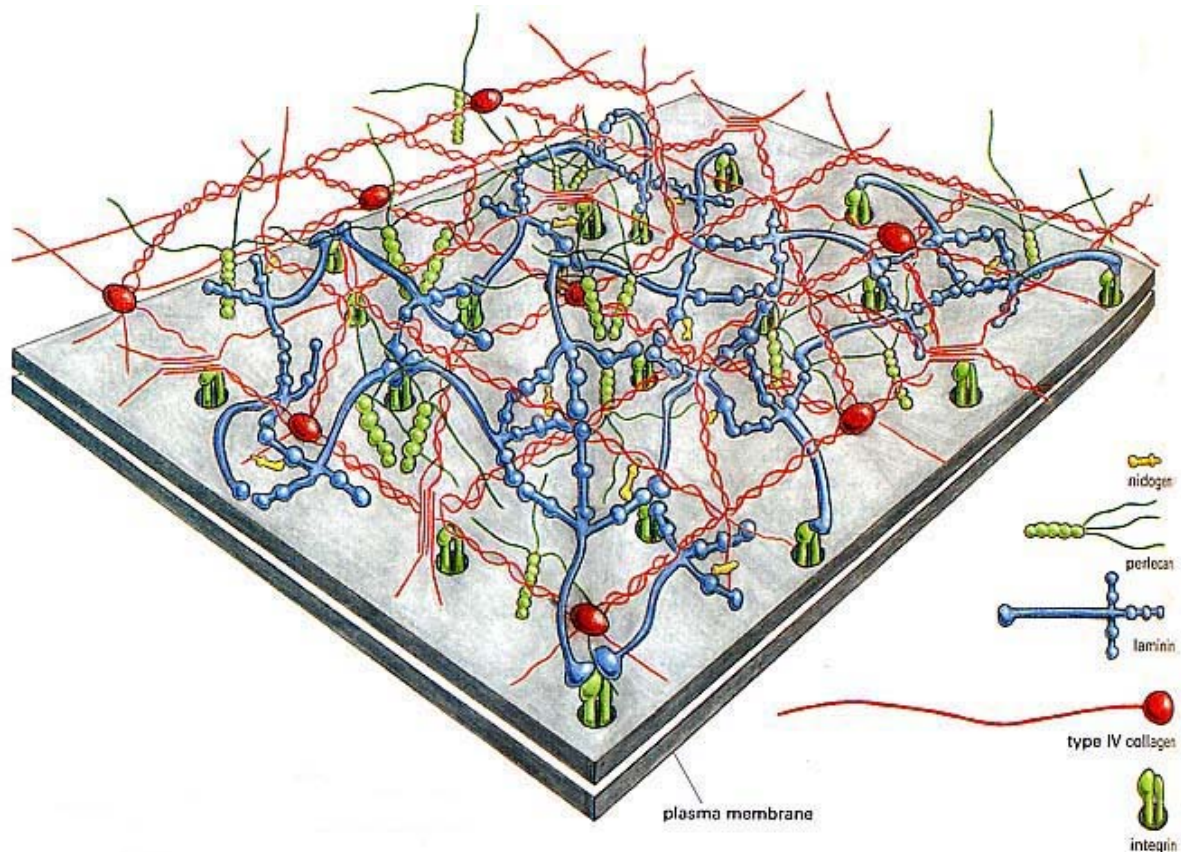


Figure 9 : Composition moléculaire de la lame basale de l'épithélium intestinal
(d'après Molecular Biology of the Cell)

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes de l'organisme et sont retrouvées dans la plupart des matrices extracellulaires. Ce sont des glycoprotéines fibreuses composées de trois chaînes polypeptidiques alpha (α) associées entre elles par des ponts disulfures et formant une triple hélice plus ou moins longue selon le type de collagène. On distingue une

vingtaine de types de collagènes différents selon la nature des chaînes α qui le constituent, ces différents types pouvant être tissu-spécifiques. Au niveau de la lame basale de l'épithélium intestinal, on retrouve principalement le collagène de type IV dont l'isoforme la plus abondante chez l'adulte est composée de deux chaînes $\alpha 1(IV)$ et d'une chaîne $\alpha 2(IV)$. Le collagène IV appartient à la famille des collagènes non fibrillaires puisque sa triple hélice est interrompue par des segments non-hélicoïdaux et qu'il contient un domaine globulaire à son extrémité C-terminale. Le réseau de fibres de collagène IV est formé par interaction entre les extrémités des molécules et par agrégation latérale des domaines en triple hélice. Au sein de la matrice extracellulaire, le réseau de collagène IV constitue une charpente permettant l'assemblage des autres macromolécules de la lame basale et interagit directement avec les cellules épithéliales par le biais des intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ (Vandenberg et al, 1991).

Des expériences d'immunolocalisation sur coupes de petit intestin humain ont également montré la présence de collagène de type VII au sein de l'épithélium intestinal adulte (Leivo et al, 1996; Lohi et al, 1996). Ce collagène, de type fibrillaire, principalement décrit dans l'épithélium stratifié de la peau où il est un composant majeur des ancrs fibrillaires, résulte de l'association de 3 chaînes $\alpha 1$. Localisé au niveau de la lamina densa, le collagène VII permet de créer un lien fort entre le tissu conjonctif et la membrane basale en interagissant avec les autres isoformes de collagènes et les laminines présentes au niveau de la lamina lucida. Des mutations dans le gène codant pour la chaîne $\alpha 1$ sont à l'origine de graves maladies de la peau appelées épidermolyses bulleuses dans lesquelles l'épiderme des patients se dissocie de la matrice extracellulaire et forme des bulles (Ryynanen et al, 1991).

La matrice extracellulaire est également riche en laminines, glycoprotéines constituées de trois chaînes α , β et γ associées entre elles par des ponts disulfures (Burgeson et al, 1994; Mercurio, 1995). On distingue à ce jour quinze isoformes de laminines résultant de l'assemblage des trois chaînes $\alpha\beta\gamma$ parmi 5 chaînes α , trois chaînes β et trois chaînes γ (Koch et al, 1999b; Libby et al, 2000; Timpl & Brown, 1996), dont quatre isoformes décrites pour être exprimées dans l'épithélium intestinal : la laminine 1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$), la laminine 2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$), la laminine 5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) et la laminine 10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$) (Teller & Beaulieu, 2001; Turck et al, 2005). Les laminines présentent une structure en forme de croix asymétrique dont les bras courts sont formés par les extrémités amino-terminales de chacune des chaînes, comportant des domaines globulaires impliqués dans les interactions avec les intégrines et les autres composants de la matrice. Les extrémités carboxy-terminales s'assemblent en hélice α super enroulée, formant le bras long de la croix (Paulsson et al, 1985; Sasaki et al, 1988). La chaîne

α , plus longue, comporte cinq micro-domaines globulaires (G1 à G5) à son extrémité C-terminale, eux aussi impliqués dans les interactions avec les intégrines (Beck et al, 1990).

La matrice extracellulaire est également composée d'autres types de molécules plus ubiquitaires comme la fibronectine, sécrétée par les fibroblastes du tissu conjonctif, et capable d'interagir avec les intégrines via un motif consensus RGD (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). Les protéoglycanes comme le perlecan, constitués d'une charpente protéique axiale à laquelle sont fixées des chaînes polysaccharidiques, sont également présents en grande quantité et permettent de former un gel hydrophile propice à la diffusion de molécules solubles tout en facilitant les interactions entre les protéines de la lame basale.

III.1.1.b Répartition des composants de la lame basale

Dans l'épithélium intestinal, la répartition des composants de la lame basale n'est pas uniforme le long de l'axe cryptovillaire. En effet, si les isoformes de laminines varient au cours du développement embryonnaire (Simo et al, 1991; Simon-Assmann et al, 1995), il existe également une variation spatiale de ces isoformes chez l'adulte (Figure 10). Les laminines 1 et 2 sont essentiellement présentes au niveau des cryptes alors que les laminines 5 et 10 sont localisées au niveau des villi (Basora et al, 1997). Le profil d'expression de la laminine 5 forme un gradient depuis la base des villi jusqu'à l'apex, en corrélation avec l'avancement de la différenciation des cellules entérocytaires. Des études sur la lignée humaine HT-29 ont révélé que cette laminine 5 peut être directement sécrétée par les cellules en cours de différenciation (Gout et al, 2001; Orian-Rousseau et al, 1998). Contrairement au collagène IV qui est exprimé de façon homogène de la crypte au villus, le collagène VII n'est retrouvé qu'au niveau des villi où il colocalise avec la laminine 5 (Leivo et al, 1996). Cette répartition spatiale suggère que la matrice extracellulaire, selon sa composition en macromolécules, va activer des voies de signalisation différentes qui peuvent réguler les processus de prolifération et différenciation intestinales (Turck et al, 2005).

III.1.2. Les intégrines : Un lien entre adhérence et signalisation

L'adhérence des cellules épithéliales à la matrice extracellulaire s'effectue principalement par l'intermédiaire des intégrines. Ces récepteurs transmembranaires, découverts au milieu des années 80 (Hynes, 1987), ont depuis fait l'objet d'une multitude de travaux qui ont permis de démontrer que ces protéines présentent des fonctions bien plus importantes et complexes que celle d'une simple fixation cellulaire. Ils sont en effet capables de transmettre un signal de

l'extérieur de la cellule vers l'intérieur mais également du cytoplasme vers le milieu extracellulaire, générant ainsi des voies de signalisation bidirectionnelles.

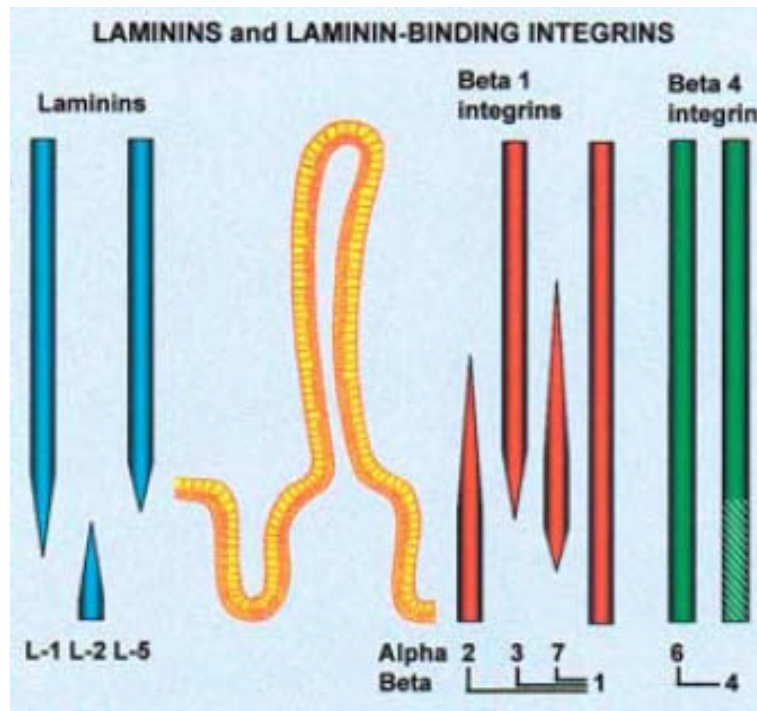


Figure 10 : Répartition spatiale des différentes isoformes de laminine et des intégrines associées le long de l'axe crypte-villus
(Beaulieu, 1999)

III.1.2.a Structure des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs membranaires de type I constitués de deux sous-unités α et β associées de façon non-covalente. A ce jour on dénombre chez les mammifères 18 sous-unités α et 8 sous-unités β pouvant se combiner en 24 hétérodimères différents et capables de fixer un répertoire spécifique de récepteurs cellulaires, de protéines de la matrice extracellulaire ou de ligands solubles. Une sous-unité d'intégrine peut-être divisée en trois grands domaines : un large domaine extracellulaire se terminant par une tête globulaire où résident les sites de fixation au ligand et aux cations divalents, un domaine transmembranaire d'une vingtaine d'acides aminés hydrophobes permettant l'ancrage de la protéine dans la membrane et un domaine cytoplasmique court (excepté pour la sous-unité $\beta 4$). Ce dernier domaine interagit avec de nombreuses protéines cytoplasmiques pouvant être associées au cytosquelette et/ou être impliquées dans l'activation de voies de signalisation intracellulaires.

III.1.2.b Diversité des complexes et spécificité d'interactions

Il est possible d'attribuer trois fonctions majeures aux intégrines : l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire, l'ancrage du cytosquelette et la mise en place d'une signalisation bidirectionnelle. L'implication des intégrines dans chacune de ces fonctions est variable selon le type de tissu étudié et les sous-unités impliquées. Ainsi, chaque hétérodimère est capable de reconnaître une ou plusieurs molécules cibles avec des affinités différentes. On peut ainsi distinguer plusieurs sous-familles en fonction de la sous-unité β impliquée, la sous-unité α apportant la spécificité vis-à-vis du ligand (Figure 11).

Les intégrines à sous-unité $\beta 1$ sont les plus représentées, tant en nombre d'hétérodimères différents qu'en terme de distribution d'expression de ces récepteurs. Elles reconnaissent la plupart des protéines de la MEC : la fibronectine et la vitronectine au niveau d'un motif RGD conservé, ainsi que les laminines et les collagènes. Au niveau de l'épithélium intestinal l'intégrine $\alpha 7\beta 1$, spécifique des laminines mais également les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$, capables d'interagir avec les laminines, les collagènes et la fibronectine, sont exprimées. L'importance de cette sous-famille a été démontrée par la réalisation de souris déficientes pour la sous-unité $\beta 1$ chez lesquelles les embryons hétérozygotes présentent une létalité précoce à 4,5 jours postcoïtum (Fassler & Meyer, 1995). De façon surprenante, la délétion conditionnelle de la sous-unité $\beta 1$ dans l'intestin de souris ne modifie pas les capacités d'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire mais induit une hyperprolifération due à une dérégulation de la voie Hedgehog (Jones et al, 2006). Ces résultats suggèrent que contrairement à d'autres tissus comme l'épiderme ou l'épithélium mammaire, les intégrines à sous-unité $\beta 1$ jouent dans l'épithélium intestinal un rôle préférentiel dans la transduction du signal et ont peu d'effets sur l'adhérence cellulaire. D'autres types d'hétérodimères doivent donc assurer en partie l'adhérence des cellules intestinales à la matrice extracellulaire.

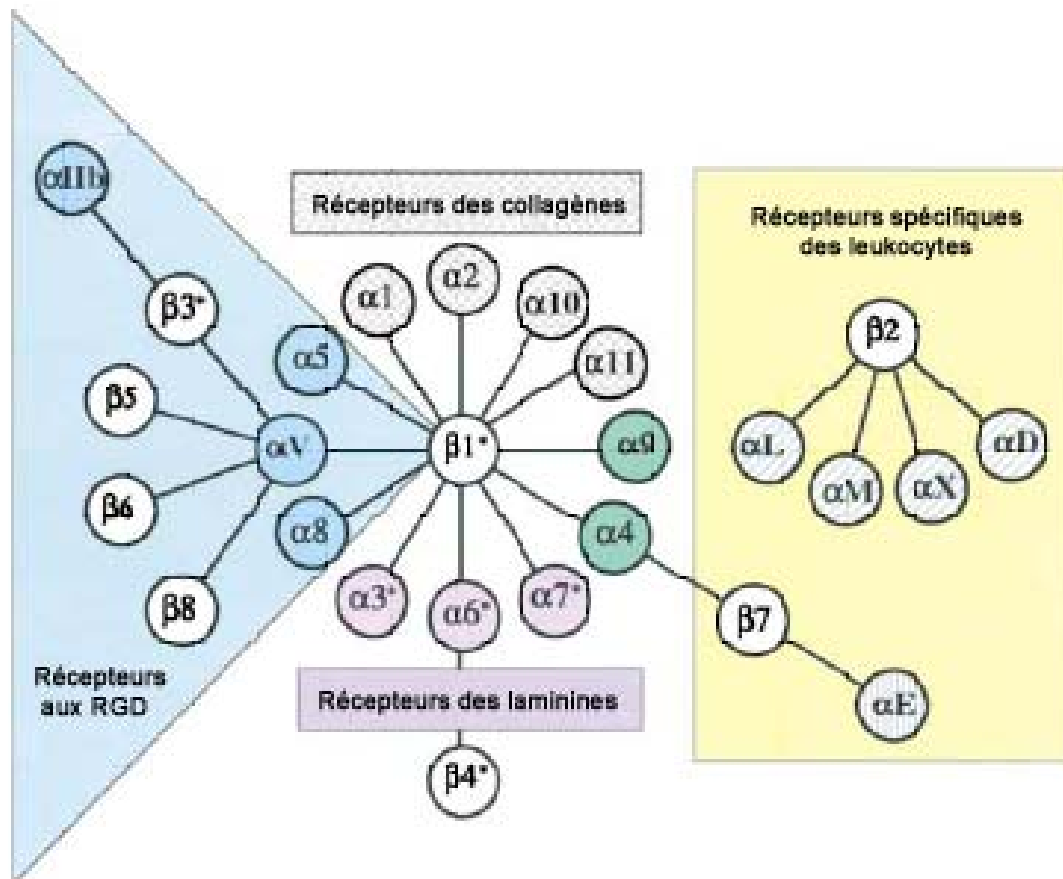


Figure 11 : Diversité des hétérodimères d'intégrines
(Hynes, 2002)

Les cellules épithéliales intestinales expriment également l'intégrine $\alpha_6\beta_4$, un hétérodimère unique puisque la sous-unité β_4 possède un domaine cytoplasmique beaucoup plus long que les autres sous-unités β . Cette intégrine participe à la formation de structures d'adhérence spéciales appelées hémidesmosomes qui permettent l'ancrage des cellules épithéliales à la lame basale en interagissant spécifiquement avec les laminines et plus particulièrement avec la laminine 5 (Giancotti, 1996). La délétion du domaine cytoplasmique de la sous-unité β_4 chez la souris induit la perte des hémidesmosomes et des défauts d'adhérence et de prolifération cellulaire (Murgia et al, 1998), révélant l'importance de cette intégrine pour la cohésion de l'épithélium. Les travaux de l'équipe de JF Beaulieu ont révélé la présence dans l'intestin d'un variant de cette sous-unité β_4 , appelée β_4A_{ctd-} , dépourvue d'extrémité COOH-terminale dans sa partie cytoplasmique (Basora et al, 1999). Ce variant est capable d'interagir avec la sous-unité α_6 mais l'intégrine perd sa faculté d'association avec la laminine 5. Il est exprimé dans les cellules peu différenciées au niveau des cryptes tandis que la forme non

tronquée est exprimée au niveau des villi, dans les cellules pleinement différenciées, en adéquation avec le profil d'expression de la laminine 5.

Le répertoire d'intégrines exprimées varie donc en fonction de l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales, en adéquation avec la présence de molécules de la lame basale, suggérant une régulation réciproque entre les intégrines et la matrice extracellulaire (figure 10).

Deux autres famille d'intégrines, à sous-unités $\beta 2$ et $\beta 7$ sont exprimées seulement par les cellules leucocytaires et leur permettent de créer des contacts avec d'autres cellules, notamment avec les cellules endothéliales en reconnaissant différentes protéines de la famille des CAM (Cell Adhesion Molecules).

III.1.2.c Activation des intégrines

L'intérêt porté à l'étude des intégrines provient en partie de leur capacité à transmettre un signal bidirectionnel : de l'extérieur de la cellule vers le cytoplasme (outside-in) mais aussi de l'intérieur vers l'extérieur (inside-out) (Hynes, 2002; Longhurst & Jennings, 1998). La plupart des intégrines présentes à la surface cellulaire ne sont pas constitutivement actives mais sont exprimées dans un état inactif qui ne leur permet pas d'interagir avec leur ligand ou d'initialiser une signalisation. L'activation du site d'interaction avec le ligand est couplée à des changements conformationnels à distance au niveau de la partie cytoplasmique. Les changements peuvent être induits par le recrutement de protéines cytoplasmiques comme la taline ou d'autres activateurs (Tadokoro et al, 2003) (tableau 2). Ce type de régulation fait partie de la signalisation « inside-out » et diffère de la plupart des autres récepteurs pour lesquels le terme « activation » correspond à la capacité accrue du récepteur à transmettre un signal suite à la fixation de son ligand. Dans le cas des intégrines, cette activation se traduit par un changement de conformation des deux sous-unités permettant alors leur interaction avec les ligands extracellulaires (Calderwood, 2004) (figure 12).

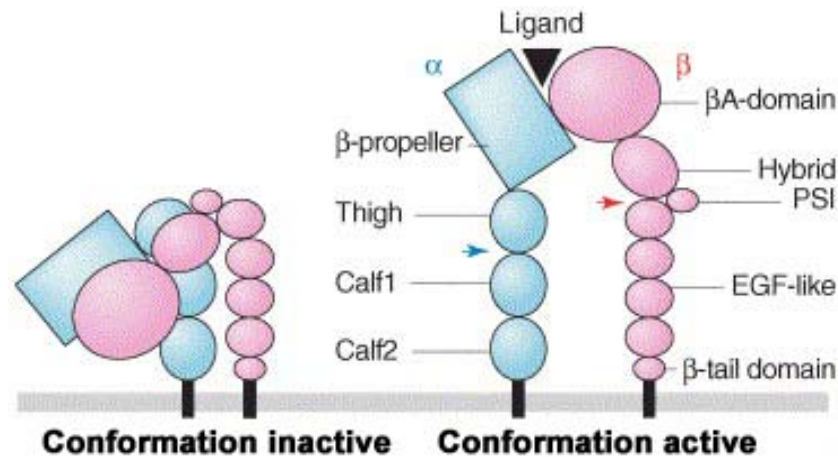


Figure 12 : Modifications conformationnelles des intégrines
(Mould & Humphries, 2004)

La résolution par cristallographie de la structure des domaines extracellulaires de l'intégrine $\alpha\beta3$ a permis de mieux comprendre les modifications de conformations qui ont lieu lors de l'activation des intégrines (Xiong et al, 2001). Brièvement, dans leur conformation inactive, les domaines extracellulaires des intégrines sont repliés en un point appelé « genou » et les têtes globulaires sont orientées vers la membrane cellulaire, empêchant leur interaction avec la matrice extracellulaire. La fixation au niveau des domaines cytoplasmiques d'un activateur des intégrines comme la taline, va permettre de dissocier les interactions entre les deux domaines cytoplasmiques α et β et induire leur écartement. Ces modifications vont alors provoquer l'extension des domaines extracellulaires en dépliant les « genoux », permettant ainsi aux têtes globulaires d'être orientées vers leur substrat.

Réciproquement, la liaison d'un ligand extracellulaire peut aussi favoriser la séparation des domaines cytoplasmiques, autorisant leur interaction avec des molécules structurales et de signalisation (signalisation outside-in). Il existe donc un équilibre allostérique entre ces deux types de signalisation qui contrôlent l'activation des intégrines et la réponse biologique associée. Cet équilibre est également modulé par un autre mécanisme qui repose sur le regroupement des molécules au sein de complexes d'adhérences (Li et al, 2001).

III.1.3. Les complexes d'adhérence cellule-matrice dans l'intestin

Les intégrines ayant fixé leur ligand se regroupent latéralement et recrutent des protéines cytoplasmiques pour former des complexes d'adhérence. Dans l'épithélium, on distingue principalement deux types de complexes selon le type d'intégrines impliquées. Les hétérodimères à sous-unité $\beta1$ et $\beta3$ forment des adhérences focales tandis que l'intégrine

$\alpha 6 \beta 4$ est impliquée dans les hémidesmosomes (figure 13). Dans les deux cas les complexes représentent des points de convergence de différentes voies de signalisation intracellulaires agissant dans des processus comme la migration, la prolifération, la différenciation et l'expression génique.

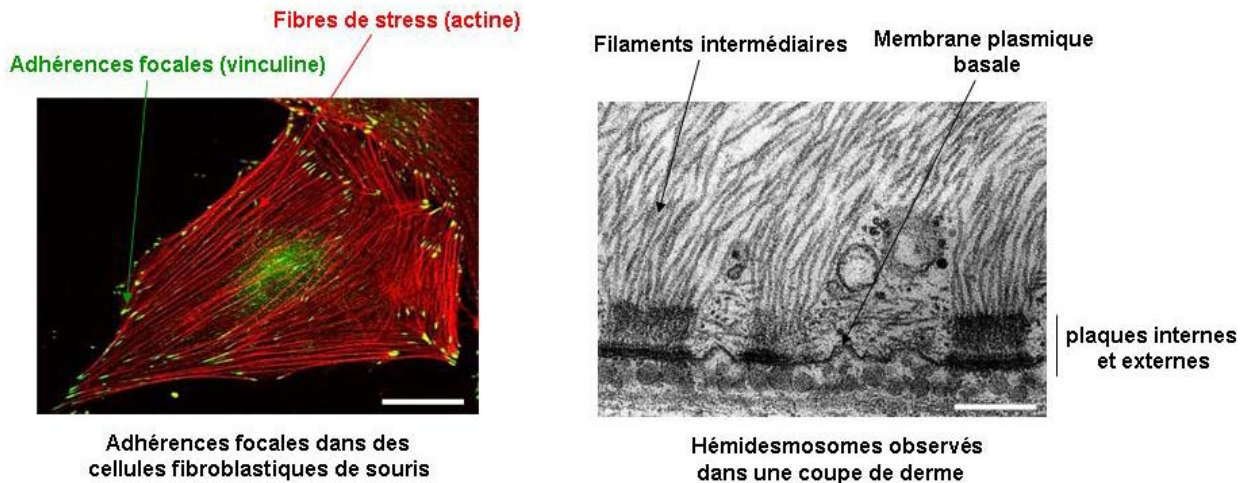


Figure 13 : Observation des adhérences focales et des hémidesmosomes

Gauche : Les adhérences focales de cellules fibroblastes embryonnaires de souris ont été immunomarquées pour la vinculine et pour l'actine et observées en microscopie à épifluorescence. Echelle = 10 μ m (Angélique Million-Frémillon, DYSAD, Grenoble).

Droite : Observation en microscopie électronique des plaques d'hémidesmosomes présents à la base de kératinocytes sur une coupe de derme. Echelle = 100 nm.

III.1.3.a Les adhérences focales

Les adhérences focales sont formées par regroupement de complexes focaux, structures impliquant principalement les intégrines à sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$. Ce sont les structures d'adhérence les mieux caractérisées. Elles s'organisent sous-forme de plaques à l'extrémité des fibres de stress d'actine (figure 15). Le pont moléculaire entre la matrice extracellulaire et les microfilaments d'actine s'effectue par l'intermédiaire de protéines associées au cytosquelette et capables d'interagir avec le domaine cytoplasmique des intégrines comme la taline et l' α -actinine (Horwitz et al, 1986). Elles sont alors capables de recruter d'autres protéines et on connaît aujourd'hui plus de 50 protéines associées de manière stable ou transitoire aux adhérences focales (tableau 1). Ces protéines peuvent être regroupées en trois catégories : les protéines structurales, responsables de l'architecture des adhérences focales, souvent associées aux microfilaments d'actine; les protéines adaptatrices comme Grab-2 (Growth factor receptor binding protein-2) ou Shc (Src homologue and collagen), impliquées dans les interactions protéines – protéines, elles participent à l'assemblage du complexe et les protéines de signalisation, pouvant être des protéines tyrosine kinases comme la FAK (Focal

Adhesion Kinase), des sérine-thréonine kinases comme l'ILK (Integrin Linked Kinase), des régulateurs des protéines G monomériques ou des phosphatases (Hannigan et al, 1996; Schaller et al, 1995).

De plus, les intégrines sont associées à d'autres protéines transmembranaires au sein de complexes supra-moléculaires qui peuvent alors être le site d'une signalisation croisée entre plusieurs récepteurs. Parmi ces partenaires on peut distinguer la famille des récepteurs aux facteurs de croissance comme l'EGF-R ou le PDGF-R, la famille des tetraspanines (Hemler, 2003) ainsi que des transporteurs et des canaux ioniques.

Diverses études ont révélé que les adhérences focales agissent comme des récepteurs de l'élasticité et de la densité de la matrice (Geiger & Bershadsky, 2002; Katsumi et al, 2004), suggérant qu'elles sont donc capables de transmettre des signaux intracellulaires d'amplitude et de nature différente selon le type de matrice avec lesquelles les intégrines sont engagées.

Localisation	Protéines associées
Extracellulaire	Collagène, fibronectine, heparane sulfate, laminine, proteoglycane, vitronectine
Transmembranaire	Intégrines, récepteur LAR-PTP, layilin, syndecane-4
Cytoplasmique	<p>Structurales : Actine, α-actinine, EAST, ezrin, filamine, fimbrine, kindling, lasp-1, LIM nebullette, MENA, moesine, nexiline, paladine, parvine, profiline, ponsine, radixine, taline, tensine, tenuine, VASP, vinculine, vinexine.</p> <p>Protéines de signalisation :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tyrosine kinases : Abl, Csk, FAK, Pyk2, Src - Sérine/thréonine kinases : ILK, PAK, PKC - Phosphatases : SHP-2, PTP-1B, ILKAP - Régulateurs des GTAses monomériques : ASAP-1, DLC-1, Graf, PKL, PSGAP, RC-GAP72 - Autres : calpaïne II, PI3-K, PLCγ <p>Adaptatrices : p130Cas, caveoline-1, Crk, CRP, cten, DOCK180, DRAL, FRNK, Grb7, Hic-5, LIP1, LPP, Mig-2, migfiline, paxilline, PINCH, syndesmos, syntenine, tes, Trip 6, zyxine</p>

Tableau 1 : Composants des adhérences focales
D'après (Lo, 2006)

III.1.3.b Les hémidesmosomes

Les hémidesmosomes sont des structures d'adhérence particulières dans lesquelles l'intégrine $\alpha6\beta4$ interagit par son domaine extracellulaire avec la laminine 5 et est reliée au cytosquelette interne de filaments intermédiaires (figure 14). Du côté intracellulaire, les différentes protéines sont agrégées sous forme de plaques visibles en microscopie électronique. On distingue la plaque interne, composée des protéines HD1/plectine et BP230 (Bullous Pemphigoid 230), assurant le lien avec les cytokératines et la plaque externe composée de l'intégrine $\alpha6\beta4$ et de la protéine transmembranaire BP180. Cette structure interagit avec la laminine 5 présente dans la lame basale au niveau de la lamina lucida. Le tout est ancré au tissu conjonctif inférieur par le biais de longues ancres fibrillaires composées de collagène VII.

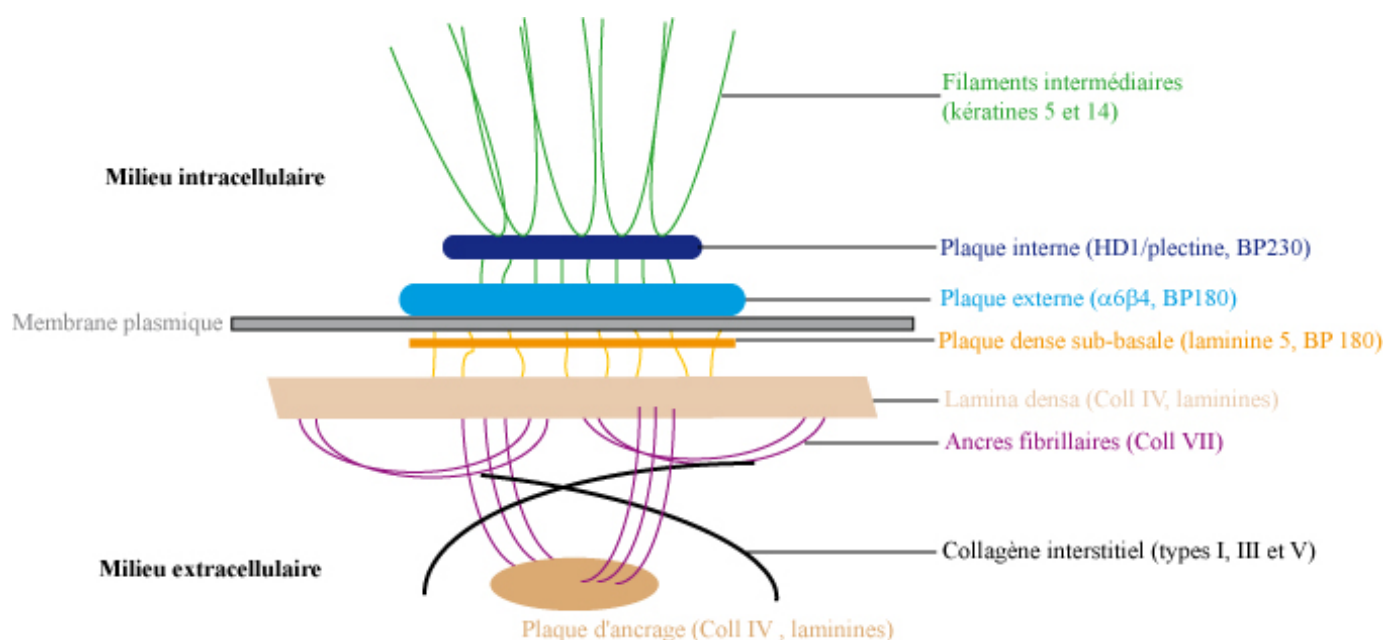


Figure 14 : Structure schématique d'un hémidesmosome
(Nievers et al, 1999)

Toutefois, il est peu probable que ce type d'hémidesmosome classique (de type I) soit présent au sein de l'épithélium intestinal, en effet, malgré la présence au niveau des villi de l'intégrine $\alpha6\beta4$, de la laminine 5, de HD1/plectine et de collagène IV et VII, des études ont montré que les protéines BP 180 et BP 230 sont absentes de l'intestin (Orian-Rousseau et al, 1996). Il est donc admis que l'épithélium intestinal comporte des hémidesmosomes de type II

dans lesquels $\alpha\beta4$ interagit simplement avec HD1/plectine (Fontao et al, 1999) et il est probable que ces structures ne puissent être pleinement actives qu'au niveau des villi puisque les cryptes ne contiennent qu'un variant inactif de la sous-unité $\beta4$ et que la laminine 5 n'est pas exprimée à ce niveau (Basora et al, 1999). Il existe donc une corrélation entre la présence d'hémidesmosomes actifs et l'état de différenciation des cellules intestinales dans l'intestin, soulignant le rôle des composants de la lame basale et l'importance de la transmission des signaux par les intégrines dans la mise en place d'un phénotype différencié.

III.1.4. Rôles des intégrines dans la régulation des cellules intestinales

III.1.4.a. Signalisation médiée par les intégrines

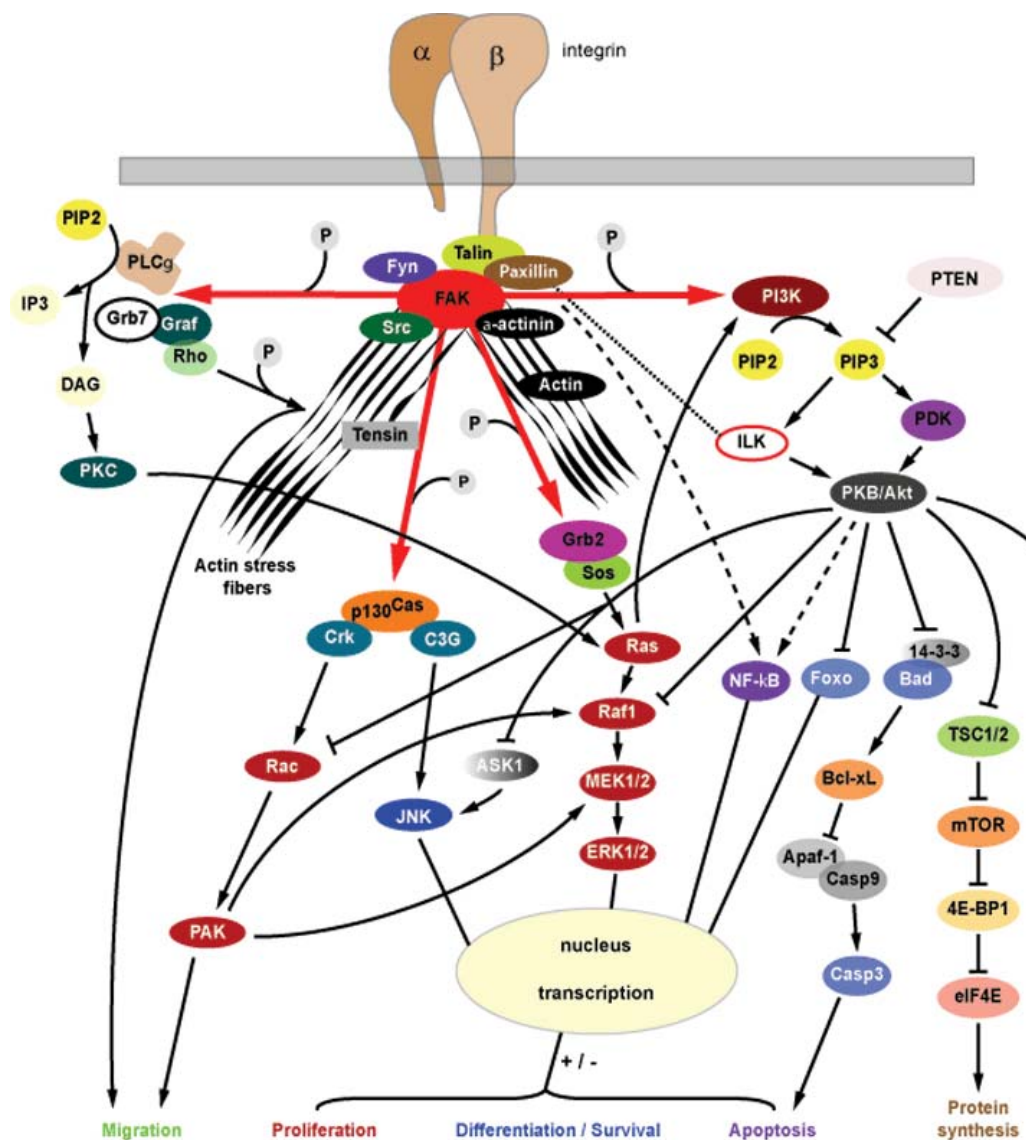


Figure 15 : Représentation schématique de la signalisation par les intégrines

L'activation de la FAK est un élément central de la signalisation médiée par les intégrines (figure 15). Suite à l'activation des intégrines, la FAK est recrutée à la membrane où elle va s'autophosphoryler. Les tyrosines phosphorylées de la FAK représentent alors des sites d'interaction pour un grand nombre de protéines à domaine SH2 (Src Homology 2). Elle permet alors de contrôler de multiples voies de signalisation régulant la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que le cytosquelette (Gilcrease, 2007; Hanks & Polte, 1997). La régulation de ces différentes voies passe par l'activation d'autres kinases comme la PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) et l'ILK mais également par la régulation des GTPases monomériques de la famille Rho.

La PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) est capable de transformer le phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphate (PIP₂), un composant constitutif des membranes plasmiques, en phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate (PIP₃), un second messenger intracellulaire impliqué dans les différents processus cellulaires décrits précédemment (Cantley, 2002). Activée par la FAK au sein des adhérences focales elle favorise la migration et la survie cellulaire dépendante de l'adhérence cellulaire (Reiske et al, 1999). Dans des kératinocytes, l'interaction entre la laminine 5 et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ active la PI3K qui favorise ensuite l'étalement et la migration dépendante de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ (Nguyen et al, 2000). En activant la kinase AKT (ou PKB, Protéine Kinase B), la PI3K permet également la survie de fibroblastes en les protégeant de l'apoptose (Xia et al, 2004). Elle peut également être activée au niveau des contacts cellule-cellule au sein des jonctions adhérentes (voir paragraphe III.2.2).

Les intégrines permettent également le recrutement des GTPases monomériques de la famille Rho. Ces petites protéines d'une vingtaine de kilodaltons ont la capacité de passer d'une forme inactive à une forme active selon qu'elles fixent respectivement le GDP (Guanosine Di-Phosphate) ou le GTP (Guanosine Tri-Phosphate) (figure 16). Elles sont activées par des GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) qui facilitent l'échange du GDP en GTP et inactivées par des GAP (GTPases Activating Proteins) qui hydrolysent le GTP en GDP. Les Rho-GTPases peuvent être inhibées par des GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) qui séquestrent la protéine sous sa forme inactivée, liée au GDP. Lorsqu'elles sont activées, les Rho-GTPases régulent alors l'activité de protéines effectrices dont une majorité contrôle la polymérisation du cytosquelette d'actine (Tapon & Hall, 1997). Ainsi, lorsque Rac1, Cdc42 et RhoA sont activées, elles induisent respectivement la formation de lamellipodes, filopodes et fibres de stress (Nobes & Hall, 1995). Elles permettent ainsi à la

cellule de répondre aux stimuli externes en adaptant la morphologie cellulaire à la nature de la matrice extracellulaire.

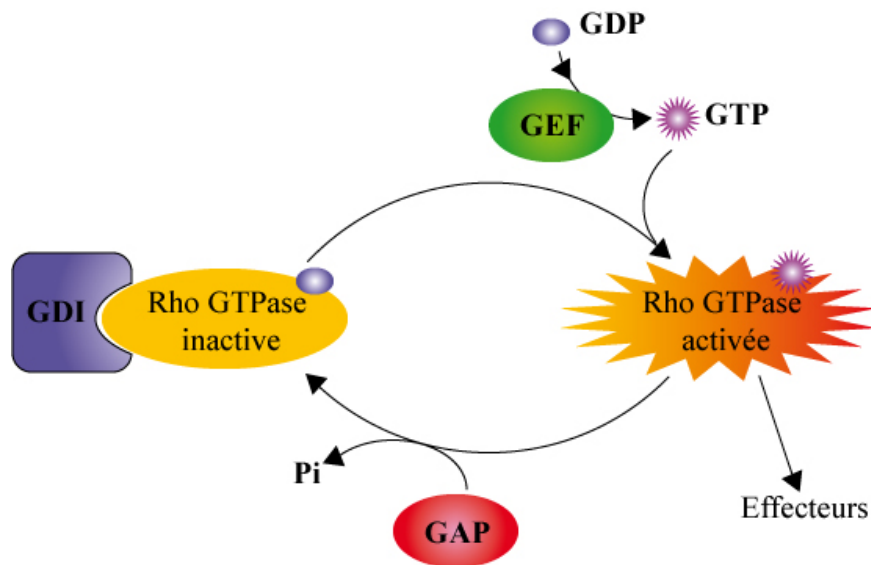


Figure 16 : Cycle d'activation des Rho-GTPases

III.1.4.b. Régulation de la prolifération cellulaire par les intégrines

Il est connu depuis longtemps que les cellules non cancéreuses ont besoin de développer des interactions avec un support solide pour proliférer (Folkman & Moscona, 1978). Le décollement des cellules entraîne d'ailleurs un arrêt du cycle cellulaire en G1 (Stoker et al, 1968) et peut induire l'anoïkis (Frisch & Francis, 1994). Inversement, le développement tumoral est associé à une perte de la dépendance de la croissance et de la survie à l'ancrage cellulaire. Les études menées ces dernières années suggèrent qu'il n'existe pas un seul point de contrôle dépendant des intégrines, mais que plusieurs étapes nécessiteraient un ancrage à la matrice extracellulaire et que cela implique différentes voies de signalisation. Cette signalisation conduit notamment à la biosynthèse des cyclines (D et E). En modulant la réponse des cellules aux facteurs de croissances, les intégrines permettent donc de contrôler la prolifération en fonction de l'environnement cellulaire.

La plupart des intégrines favorisent la prolifération cellulaire en interagissant avec la signalisation dépendante des récepteurs aux facteurs de croissance aboutissant à l'activation de la voie de signalisation Ras - ERK (Extracellular signal Regulated Signal). La protéine ERK est activée suite à une cascade de différentes kinases et est transloquée vers le noyau où elle induit l'expression des cyclines D et E (Hulleman et al, 1999; Schwartz & Assoian,

2001). Les intégrines sont capables d'activer la voie ERK de différentes façons : les hétérodimères à sous-unité $\beta 1$ pouvant réguler la voie ERK en activant la FAK tandis que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ recrute directement la protéine adaptatrice Shc (Src homologue and collagen) qui se lie à Grb-2 (Growth factor receptor binding protein-2) et peut alors activer la voie Ras-ERK.

Toutefois, le contrôle de la prolifération par les intégrines n'est pas toujours dépendant de la voie ERK. En effet, l'activation de la PI3K par les intégrines induit l'activation de l'ILK (Integrin Linked Kinase) qui inactive la GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3) en la phosphorylant. L'absence d'activité de GSK-3 favorise la transcription de la cycline D1 de deux façons puisque la cycline D1 phosphorylée par GSK-3 est normalement dégradée mais aussi car l'inactivation de la GSK-3 permet la libération de la β -caténine dans le cytoplasme et favorise ainsi la transcription des gènes cibles du complexe β -caténine/TCF dont le gène de la cycline D1 (D'Amico et al, 2000; Oloumi et al, 2004).

Une autre voie impliquant l'activation de la GTPase Rac, permet la translocation de NF κ B et l'activation de JNK (Jun amino-terminal kinase), tous deux régulant positivement les gènes prolifératifs (Guo & Giancotti, 2004).

L'effet positif des intégrines sur la prolifération cellulaire passe également par le contrôle de la dégradation des inhibiteurs de cyclines p21 et p27. Cette dégradation n'étant pas observée dans des cellules où la signalisation dépendante des intégrines est bloquée (Roovers & Assoian, 2000).

Toutefois, des études contradictoires indiquent que les intégrines peuvent également réguler négativement la progression du cycle cellulaire. De façon surprenante, la délétion de $\beta 1$ mène à une hyperprolifération des cellules intestinales chez la souris (Jones et al, 2006). Les hyperplasies observées dans les souris $\beta 1^{-/-}$ sont déficientes en facteurs Hedgehogs, suggérant que le contrôle de la prolifération des cellules intestinales de la crypte nécessite l'expression $\beta 1$ -dépendante de Hedgehog. De même, l'utilisation d'un anticorps bloquant l'interaction entre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la fibronectine dans des cellules de carcinome colique humain induit une augmentation d'expression des cyclines E et A ainsi qu'une augmentation de l'activité kinase des complexes Cdk2 / cycline E et Cdk2 /cycline A (Gong et al, 1998). La surexpression de la sous-unité $\beta 1$ dans des cellules de carcinome hépatique inhibe l'expression de *skp2*, une protéine composant le complexe E3-ubiquitine ligase responsable

de la dégradation de l'inhibiteur de cycline p27, provoquant ainsi l'augmentation du taux de p27 et la réduction de la prolifération cellulaire (Fu et al, 2007).

Les intégrines à sous-unités $\beta 4$ sont aussi capables de réguler la prolifération cellulaire, en effet, la surexpression de $\beta 4$ dans des cellules de carcinome colique RKO induit une augmentation du taux de la protéine p21 (Clarke et al, 1995). Ces résultats sont en accord avec des travaux réalisés chez des souris exprimant une sous-unité $\beta 4$ dépourvue de domaine cytoplasmique et chez lesquelles une augmentation de la protéine p27 a été observée (Murgia et al, 1998).

La complexité de la signalisation par les intégrines est sans doute à l'origine de ces données contradictoires. Selon les tissus analysés, le caractère transformé ou non des cellules, le type d'hétérodimère impliqué et la présence d'une signalisation commune avec d'autres récepteurs, les intégrines semblent pouvoir moduler différemment la prolifération cellulaire. Une hypothèse intéressante est que l'occupation des intégrines par leur ligand pourrait réguler leurs effets sur le cycle cellulaire (Liang et al, 2003). Les intégrines engagées avec leur ligand participeraient positivement à la prolifération cellulaire tandis que les intégrines non-engagées l'inhiberaient, ainsi la présence et la quantité de ligand extracellulaire serait primordiale dans cette régulation, soulignant l'importance de la composition de la matrice extracellulaire. Pour exemple, la prolifération de myoblastes primaires cultivés sur de la fibronectine est activée par la surexpression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, un récepteur classique de la fibronectine, tandis qu'elle est inhibée par la surexpression d' $\alpha 6\beta 1$, récepteur des laminines (Sastry et al, 1999). Dans le cas de l'épithélium intestinal, la différence de composition de la matrice extracellulaire entre les cryptes et les villi pourrait donc être partiellement responsable de la régulation de l'état prolifératif des cellules épithéliales.

III.1.4.c. Intégrines et différenciation épithéliale

Les intégrines ne contrôlent pas seulement la prolifération des cellules épithéliales mais peuvent également réguler leur différenciation. Depuis la fin des années 80, différentes études consistant notamment à bloquer l'interaction entre les protéines de la matrice extracellulaire et les intégrines ont mis en évidence cette régulation de la différenciation dans différents systèmes épithéliaux. Ainsi, le blocage de l'intégrine $\alpha 6$ ou de la chaîne α de la laminine inhibe la polarisation de cellules épithéliales rénales (Klein et al, 1988). De même, l'addition d'un anticorps bloquant l'interaction ou la reconnaissance de la laminine 1 dans une coculture

de cellules épithéliales et fibroblastiques intestinales bloque l'expression de la lactase, un marqueur de différenciation apicale (Simo et al, 1992). Plusieurs travaux sur les cellules épithéliales mammaires ont également permis de démontrer que l'adhérence à différents composants de la lame basale stimule la synthèse de protéines du lait comme la caséine (Li et al, 1987).

Dans le cas de l'épithélium intestinal, la répartition différentielle des macromolécules de la lame basale ainsi que l'expression des différents hétérodimères d'intégrines le long de l'axe crypte-villus suggère que les intégrines exprimées majoritairement au sein des villi sont impliquées dans la différenciation entérocytaire. Ainsi, la culture des cellules Caco-2 sur des matrices enrichies en laminine 5, laminine 2 ou collagène IV induit l'augmentation d'expression de l'apolipoprotéine IV, un marqueur de la différenciation entérocytaire (Peignon et al, 2006). La différenciation va dépendre de la nature des l'intégrines engagées mais également d'une modulation de l'activité de ces intégrines.

L'intégrine $\alpha 2\beta 1$, exprimée au niveau des cryptes, semble favoriser la prolifération cellulaire au détriment de la différenciation. En effet, un anticorps bloquant la sous-unité $\alpha 2$ inhibe la prolifération cellulaire mais favorise l'apparition de marqueurs de différenciation entérocytaire tels que les activités phosphatase alcaline et dipeptidyl dipeptidase dans les cellules Caco-2 (Basson et al, 2000). Toutefois des travaux également réalisés sur des cellules Caco-2 mais cultivées cette fois en matrice 3D ont démontré que l'inhibition d' $\alpha 2$ par des anticorps bloquant ou des ARN antisens inhibe leur différenciation (Zhang et al, 2003). Les différences observées entre ces deux travaux peuvent en partie être expliquées par les conditions de culture différentes, en effet il est de plus en plus clair que les cultures en 2D ou en 3D induisent des voies de signalisation différentes. Le travail de Zhang et collaborateurs a également mis en évidence un rôle de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ dans la différenciation de ces cellules. En effet, cette intégrine n'est pas exprimée dans les cellules Caco-2 peu différenciées mais son expression augmente avec la différenciation, en accord avec sa localisation au niveau des villi. Dans les cellules HT-29, l'expression de $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ ne varient pas au cours de la différenciation, tout du moins lors des étapes précoces de différenciation, mais leur activité est modifiée. En effet, notre équipe a pu mettre en évidence que l'adhérence cellulaire au collagène IV est dépendante de $\alpha 2\beta 1$ dans les cellules indifférenciées puis devient $\alpha 3\beta 1$ dépendante au cours de la différenciation. Ce switch dans l'activation différentielle des intégrines dépend de la sécrétion de laminine 5 par les cellules et nécessite la baisse d'activité de RhoA (Gout et al, 2001). Il semble donc que l'effet des intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ sur la

différenciation entérocytaire puisse être variable selon le type cellulaire étudié et la composition de la matrice cellulaire.

Les travaux de Basora et collaborateurs ont également permis d'associer l'expression de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ à la différenciation des cellules intestinales puisque cette intégrine est exprimée préférentiellement au niveau des villi et que son expression est corrélée à celle de la sucrase isomaltase (Basora et al, 1997).

Les intégrines à sous-unité $\alpha 6$ sont également impliquées dans la différenciation puisque le blocage de cette sous-unité inhibe l'apparition de marqueurs de différenciation entérocytaire des cellules Caco-2 (Basson et al, 2000).

Si le lien entre l'adhérence à la matrice extracellulaire et les capacités de différenciation des cellules épithéliales est clairement établi, les mécanismes intracellulaires par lesquelles les cellules se différencient suite à l'activation des intégrines restent encore très peu décrits.

Il semble toutefois que les intégrines sont capables de moduler l'expression et l'activité de facteurs nucléaires de différenciation. En effet, la culture de cellules Caco2-TC7 sur une matrice de laminine 1 induit l'expression du facteur de transcription spécifique de l'intestin Cdx 2 et la différenciation entérocytaire, marquée par l'augmentation de l'expression et de l'activité de la sucrase isomaltase (Lorentz et al, 1997). De plus, il a été montré que la transcription du gène de la sucrase isomaltase induite par Cdx2 peut être inhibée dans des cellules Caco-2 traitées avec un inhibiteur de la voie p38 / MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Houde et al, 2001). Il est donc suggéré que l'interaction des intégrines à la matrice extracellulaire provoque l'activation de la FAK (Focal Adhesion Kinase) induisant l'activation de la PI3K et de la voie p38 / MAPK pour aboutir à l'expression et l'activation de Cdx2 (Turck et al, 2006). Comme nous l'avons vu dans le précédent chapitre l'activation de la FAK peut favoriser la prolifération cellulaire et le passage de G1 à S en activant la voie Erk mais peut donc également inhiber la progression du cycle cellulaire en favorisant l'activation de la voie p38 / MAPK. Il est possible que le type d'intégrine et de matrice extracellulaire à l'origine de l'activation de la FAK puisse recruter des partenaires différents au sein des complexes d'adhérence et ainsi initier des signalisations opposées (figure 17).

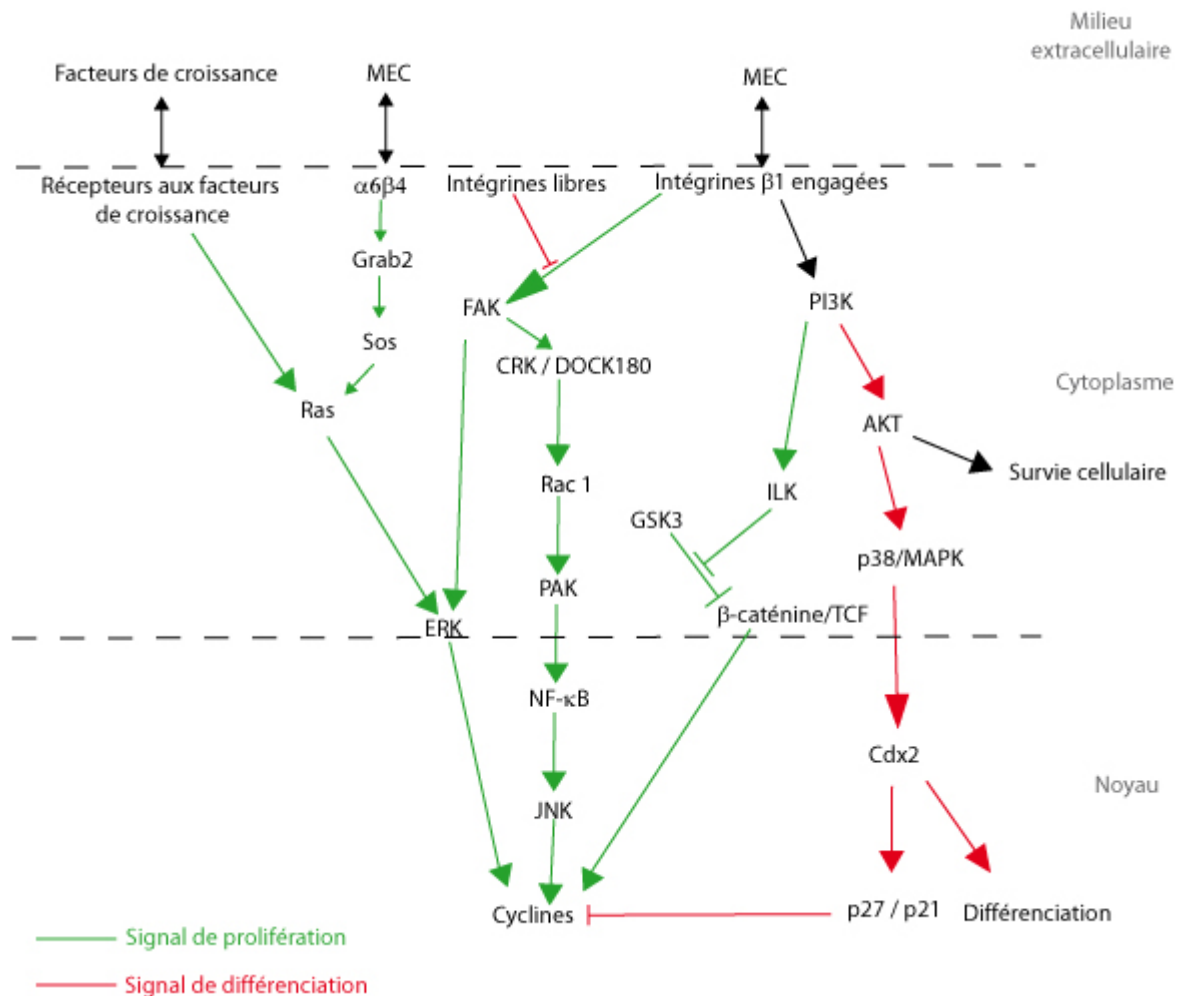


Figure 17 : Régulation de la balance prolifération /différenciation par les intégrines

III.2. L'adhérence cellule-cellule

Tout comme l'adhérence à la matrice extracellulaire, l'adhérence entre les cellules épithéliales est un processus indispensable au bon fonctionnement de l'épithélium intestinal. La présence de jonctions intercellulaires, reliées au cytosquelette permettent aux cellules intestinales d'assurer l'étanchéité de l'épithélium et de contrôler le passage sélectif des nutriments à travers les entérocytes. De plus ces jonctions servent de barrière de protection contre les microorganismes présents dans la lumière intestinale. La déstabilisation ou la perte de ces jonctions est impliquée dans diverses pathologies intestinales comme les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) et un grand nombre de cancers du tube digestif (Birchmeier et al, 1995; Hirohashi & Kanai, 2003). Les complexes d'adhérences intercellulaires épithéliaux, au même titre que les complexes impliquant les intégrines,

recrutent au niveau du cytoplasme un grand nombre de protéines structurales et enzymatiques, assurant la régulation de la jonction en elle-même et permettant la transduction de signaux intracellulaires. Selon les protéines impliquées, on peut distinguer du pôle apical au pôle basal 4 types de structures distinctes : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes (figure 18).

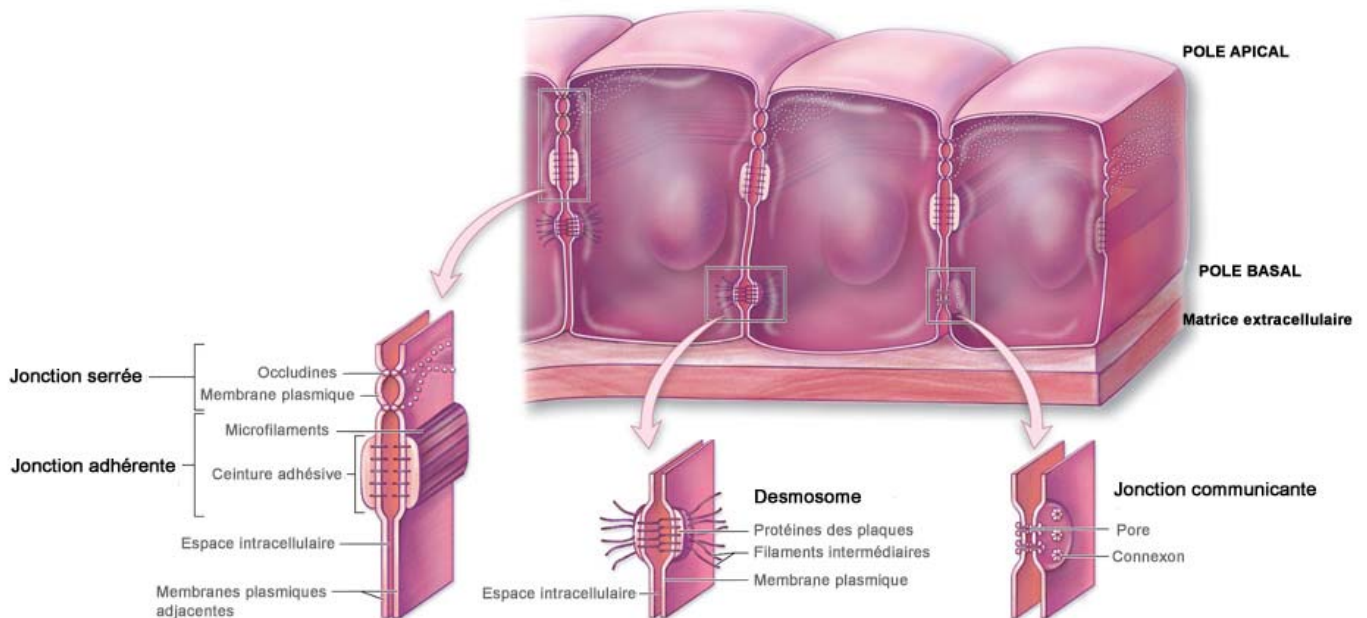


Figure 18 : Localisation des différents complexes d'adhérence intercellulaire dans un épithélium monostratifié (d'après the Mc Graw Hill Companies, Inc)

Les jonctions serrées sont essentiellement composées de protéines transmembranaires appelées occludines et claudines, liées dans le cytoplasme aux filaments d'actine par le biais de protéines structurales comme les protéines ZO (Zonula Occludens) ou Discs Large (Schneeberger & Lynch, 2004).

Les cadhérines, constituants transmembranaires des jonctions adhérentes, sont également connectées au cytosquelette d'actine par le biais de protéines intracellulaires : les caténines. Avec les jonctions serrées, les jonctions adhérentes créent une frontière entre le pôle apical et le pôle baso-latéral en formant une ceinture tout autour de la cellule. Cette polarisation permet entre autres le maintien de certaines enzymes digestives au pôle apical. La structure moléculaire et la dynamique des jonctions adhérentes seront plus précisément développées dans la suite de cette introduction (III.2.1.).

Les desmosomes impliquent des cadhérines spécifiques appelées desmogléines et desmocollines reliées aux filaments intermédiaires par les protéines de la plaque desmosomale : les plakoglobines et les plakophilines, ayant une structure proche des caténines

(Kottke et al, 2006). Ces jonctions en forme de « boutons pression » sont reliées les unes aux autres par les filaments intermédiaires et participent au maintien de la structure cellulaire.

Les jonctions communicantes sont les plus basales et permettent la diffusion de molécules entre deux cellules voisines. Elles sont composées de connexines pouvant former des hexamères appelés connexons capables de s'associer pour former un canal perméable aux ions et aux petites molécules entre deux cellules voisines (Evans et al, 2006).

La répartition baso-apicale de ces différents complexes assure le maintien d'une polarité cellulaire au sein de l'épithélium et les protéines intracellulaires impliquées jouent de nombreux rôles dans la régulation de la prolifération, la différenciation et la morphologie cellulaire.

III.2.1. Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes résultent de l'assemblage en un complexe dynamique d'une protéine transmembranaire, la E-cadhérine, capable de former des interactions de type homophiliques avec d'autres molécules de E-cadhérine portées par les cellules voisines. Les domaines cytoplasmiques des cadhérines peuvent recruter des protéines structurales, jouant également un rôle dans la signalisation intracellulaire : les caténines (figure 19). Les jonctions adhérentes interagissent de façon dynamique avec le cytosquelette d'actine et avec les microtubules par le biais des caténines et de protéines associées au cytosquelette comme la vinculine, la paxilline ou CLIP 170 et APC dans le cas des microtubules (Perez-Moreno et al, 2003). Un grand nombre de protéines à activité enzymatique sont également décrites pour réguler l'assemblage et la dynamique de ces jonctions telles que des kinases comme src, fyn, fer et la PI3K ainsi que des régulateurs de l'actine comme Arp2/3, VASP et les GTPases monomériques Rho, Rac et Cdc42. Selon leur dynamique et leur force d'engagement avec les cellules voisines, les jonctions adhérentes sont également à l'origine d'une signalisation intracellulaire, passant notamment par la régulation des caténines, du cytosquelette d'actine et de la PI3K. Ces jonctions sont donc particulièrement importantes puisqu'elles permettent de contrôler la spécificité, la formation et la maintenance des contacts intercellulaires (Gumbiner et al, 1988; Takeichi, 1990) et assurent une transmission d'information depuis l'environnement extracellulaire proche vers le cytoplasme (Gumbiner, 2000).

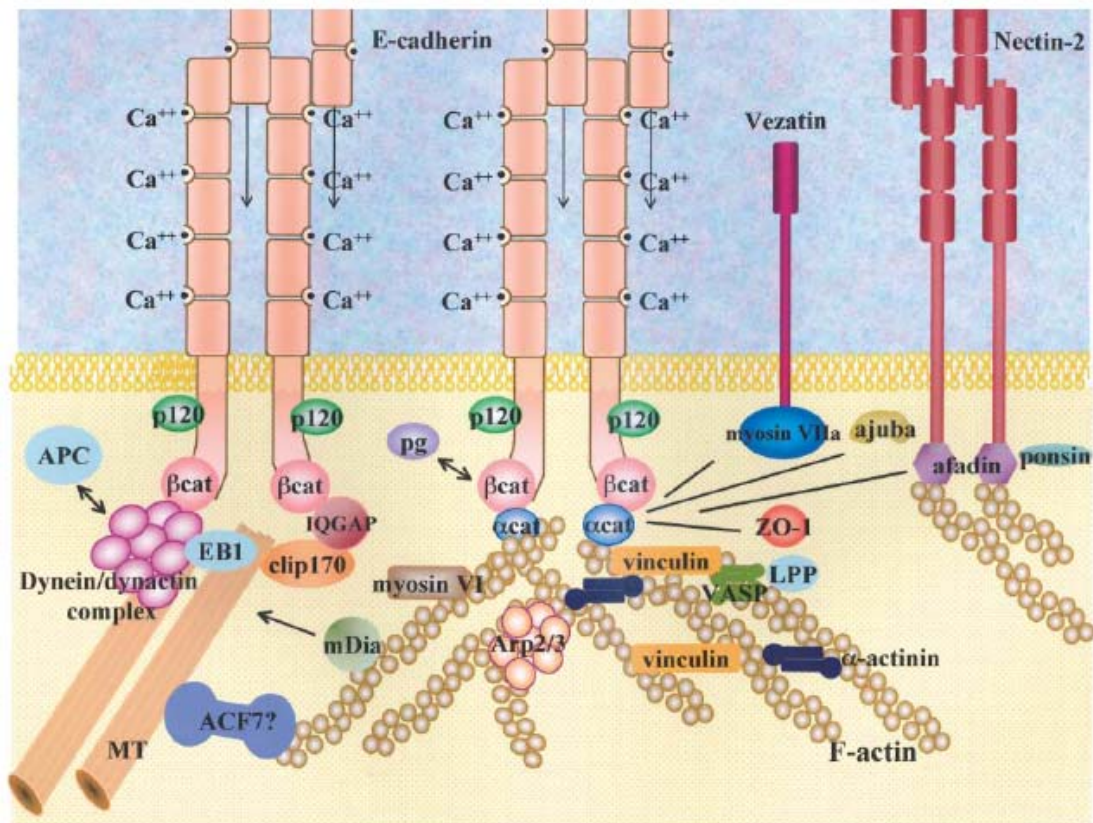


Figure 19 : Structure schématique et composition d'une jonction adhérente
(Perez-Moreno et al, 2003)

III.2.1.a Les cadhérines

Les cadhérines représentent la famille de récepteurs de l'adhérence intercellulaire les mieux caractérisées. Ce sont des protéines transmembranaires de type I caractérisées par la présence de motifs cadhérine répétés dans leur partie extracellulaire (motifs EC) permettant de former des interactions homophiliques dépendantes du calcium avec les cadhérines d'une cellule voisine. Le nombre de ces motifs ainsi que la nature des domaines intracellulaires permet de classer les cadhérines en 6 groupes distincts (Nollet et al, 2000).

- les cadhérines classiques, dites de type I, sont les premières découvertes et les plus décrites (Hyafil et al, 1981). Elles possèdent 5 motifs EC et comprennent entre autres la E-cadhérine, la N-cadhérine et la P-cadhérine. Toutes peuvent interagir indirectement avec le cytosquelette d'actine en formant des jonctions adhérentes dans différents tissus : la E-cadhérine étant spécifique des épithéliums, la N-cadhérine des neurones et la P-cadhérine du placenta.
- Les cadhérines de type II possèdent un motif extracellulaire EC1 différent des cadhérines classiques, présentant 2 tryptophanes impliqués dans l'interaction homophile. Elles interagissent également avec le cytosquelette d'actine. L'une des

plus étudiées est la VE-cadhérine (Vascular Endothelial cadhérine), présente dans les endothéliums des parois des vaisseaux sanguins.

- Les cadhérines desmosomales comprennent la desmocolline et la desmogléine, elles sont localisées dans les desmosomes des cellules épithéliales et interagissent avec les filaments intermédiaires (Koch et al, 1990; Mechanic et al, 1991).
- La famille des protocadhérines possèdent 6 motifs EC mais n'ont qu'une activité adhésive modérée. Elles jouent un rôle important dans les jonctions synaptiques du système nerveux des mammifères (Kohmura et al, 1998).
- La T-cadhérine est une cadhérine de type I inhabituelle puisqu'elle est dépourvue des domaines transmembranaire et cytoplasmique. Elle est exprimée dans le système nerveux et semble jouer un rôle dans la guidance axonale des neurones (Ranscht & Dours-Zimmermann, 1991).
- Différents récepteurs possédant des domaines de type cadhérines ont également été regroupés sous le nom de cadhérines atypiques. On distingue parmi celles-ci la cadhérine 7TM, possédant 7 domaines transmembranaires ou encore les cadhérines FAT, exprimées lors du développement embryonnaire.

III.2.1.b Structure de la E-cadhérine

Dans l'épithélium intestinal, la cadhérine majoritaire est la E-cadhérine, initialement décrite sous le nom d'uvomoruline (Hyafil et al, 1981) et représentant le prototype des cadhérines de type I. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur polypeptidique contenant une séquence signal à son extrémité N-terminale qui est clivée lors de la maturation. Cette étape est nécessaire à l'acquisition des propriétés d'adhérence (Ozawa & Kemler, 1990). La protéine mature, d'une taille de 120 kDa est caractérisée par la présence de 5 motifs de 110 acides aminés au niveau de son domaine extracellulaire, les motifs EC1 à EC5 (figure 20). Le motif EC1, le plus distant de la membrane plasmique, contient une séquence très conservée His-Ala-Val (HAV), essentiel à la reconnaissance et à l'interaction homophile entre deux cadhérines (Blaschuk et al, 1990). Les motifs EC sont séparés les uns des autres par des sites d'interaction avec le calcium. Des études de cristallographie aux rayons X sur la E et la C-cadhérine ont démontré que la liaison de 3 ions calcium à chacune de ces charnières permet de rigidifier la structure entre chacun des domaines et la protège la molécule de la dégradation par des protéases (Boggon et al, 2002; Nagar et al, 1996). Deux cadhérines exprimées à la surface d'une même cellule sont capable d'interagir ensemble, on parle d'interaction en *cis*, à différencier des interactions en *trans* formées par deux cadhérines présentes sur deux cellules

voisines. Ces interactions en *trans* nécessitent tout d'abord une dimérisation en *cis* qui repose sur le logement d'un résidu tryptophane (Trp2) d'une cadhérine dans une poche hydrophobe intramoléculaire au niveau de la séquence HAV d'une autre cadhérine (Blaschuk et al, 1990; Nose et al, 1990; Shapiro et al, 1995). Toutefois, d'autres études viennent contredire cette hypothèse en démontrant que ce résidu Trp2 reste logé dans la poche HAV de sa propre molécule (Koch et al, 1999a; Pertz et al, 1999) ou qu'il est impliqué dans les interactions en *trans* (Boggon et al, 2002). Les interactions en *trans* semblent dépendre plus particulièrement des sites calciques présents entre chaque motif EC. Des analyses biophysiques ont permis de développer un modèle selon lequel la force de cohésion entre les cadhérines est proportionnelle au nombre de domaines EC qui interagissent ensemble (Gooding et al, 2004; Zhu et al, 2003).

La partie C-terminale intracellulaire de la E-cadhérine est divisée en deux domaines fonctionnels qui interagissent avec les caténines. Le domaine juxtamembranaire (JMD), très conservé entre les différentes cadhérines, interagit avec la p120ctn (Yap et al, 1998) et le domaine C-terminal, appelé catenin-binding domain (CBD), interagit avec la β -caténine et la γ -caténine (plakoglobine) (Nagafuchi & Takeichi, 1988; Ozawa et al, 1990).

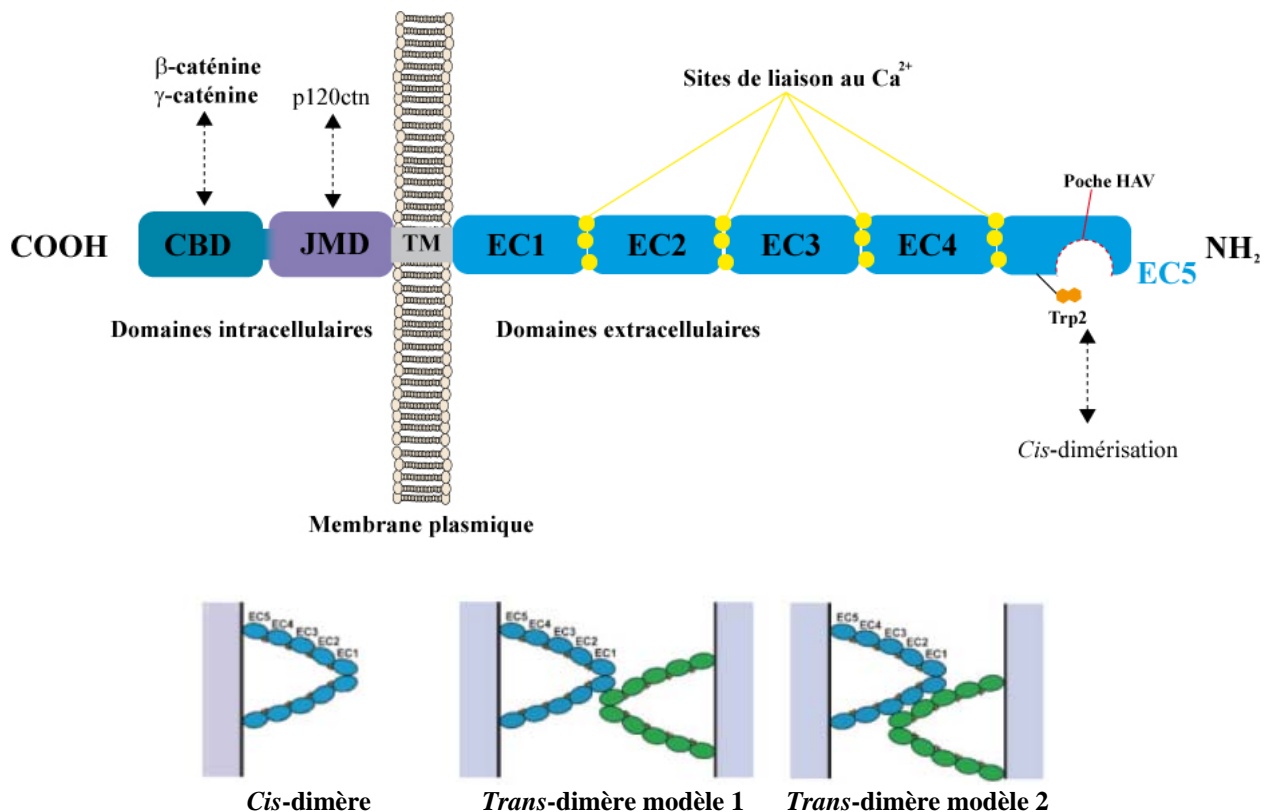


Figure 20 : Structure de la E-cadhérine et modèles de *cis* et *trans* dimérisation.
 CBD = Catenin Binding Domain; JMD = Domaine Juxtamembranaire; EC = Domaine extracellulaire
 TM = Domaine transmembranaire; HAV = motif His-Ala Val
 Modèles de *cis* et *trans* dimérisation d'après (Gooding et al, 2004)

III.2.1.c Les caténines

Les caténines sont des protéines cytoplasmiques appartenant à la famille des protéines à domaines Armadillo. Cette famille de protéines structurales est caractérisée par la présence de multiples répétitions de 45 acides aminés appelés domaines Armadillo impliqués dans des interactions protéines – protéines (Hatzfeld, 1999). Les membres de la famille Armadillo sont retrouvés à diverses localisations au sein de la cellule et les caténines sont d'ailleurs capables d'effectuer la navette entre la membrane plasmique et le noyau où elles exercent des fonctions distinctes. Les caténines ne sont donc pas de simples protéines adaptatrices mais peuvent être à l'origine de la régulation de diverses voies de signalisation intracellulaires (Perez-Moreno & Fuchs, 2006).

Au sein des jonctions adhérentes, on peut distinguer 3 caténines majeures :

- la β -caténine se fixe au domaine Catenin-Binding-Domain (CBD) de la E-cadhérine via ses 12 domaines armadillo. Cette association, qui a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, est nécessaire au transport de la E-cadhérine nouvellement synthétisée vers la membrane (Chen et al, 1999). Elle assure également la liaison du complexe avec le cytosquelette d'actine en se liant à l' α -caténine (Aberle et al, 1994). L'affinité de l'interaction entre la E-cadhérine et la β -caténine est augmentée suite à la phosphorylation de sérines au niveau du CBD de la E-cadhérine tandis qu'elle est diminuée par la phosphorylation de la tyrosine 654 de la β -caténine suite à l'activation des récepteurs aux facteurs de croissance (Huber & Weis, 2001). Lorsqu'elle n'est pas associée à la E-cadhérine, la β -caténine est normalement prise en charge par le complexe APC / axine /GSK3 dans le cytoplasme et dégradée par le protéasome ou, lorsque la voie Wnt est activée, elle s'associe avec le facteur de transcription TCF 4 et active alors la transcription de gènes pro-prolifératifs (Bienz, 2005).
- L' α -caténine joue un rôle central dans l'assemblage des jonctions adhérentes en assurant le lien entre le complexe E-cadhérine/ β -caténine et le cytosquelette d'actine polymérisée (Rimm et al, 1995). L' α -caténine est présente sous forme d'un homodimère en solution mais est capable de former un hétérodimère en interagissant avec la β -caténine via un domaine d'environ 200 acides aminés dans sa partie N-terminale ; le site d'interaction avec l'actine étant localisé dans sa partie C-terminale (Pokutta et al, 2002; Pokutta & Weis, 2000). L' α -caténine interagit également avec différentes protéines associées à l'actine comme la vinculine, l' α -actinine et les formines permettant ainsi de coordonner la dynamique de l'actine au niveau des jonctions (Knudsen et al, 1995; Kobiela et al, 2004; Watabe-Uchida et al, 1998). Toutefois, l'équipe de W.J Nelson a démontré récemment que les liaisons de l' α -

caténine à la β -caténine et à l'actine étaient mutuellement exclusives, soulignant des contacts et une association plus dynamiques que les modèles précédemment établis (Drees et al, 2005; Yamada et al, 2005).

- La p120 caténine (p120ctn) fut originalement décrite comme étant un substrat de la tyrosine kinase src (Reynolds et al, 1989). Possédant 9 répétitions de domaines Armadillo, elle peut s'associer à la plupart des cadhérines de type I et de type II via leur domaine juxtamembranaire (Finnemann et al, 1997; Reynolds et al, 1996; Yap et al, 1998). Le gène codant pour la p120ctn possède 4 sites différentiels d'initiation de la transcription et son ARN peut être épissé au niveau de 3 exons différents A, B et C (figure 21). Cette diversité dans la régulation transcriptionnelle du gène est à l'origine des 48 isoformes différentes décrites à ce jour, dont l'expression est tissu-spécifique. L'isoforme 1A est par exemple retrouvée dans les cellules motiles comme les fibroblastes tandis que l'isoforme 3A est associée aux cellules de type épithéliales, formant des contacts intercellulaires stables. Ces observations suggèrent que ces différentes isoformes exercent des fonctions variables. Cette diversité de fonction est amplifiée par les variations de localisation de p120ctn qui navigue entre la membrane plasmique, le cytoplasme et le noyau, mais également par son état de phosphorylation. Selon sa localisation subcellulaire, la p120ctn peut en effet interagir avec des partenaires structuraux ou enzymatique pouvant jouer pour elle un rôle d'effecteur puisqu'elle ne possède pas d'activité enzymatique propre.

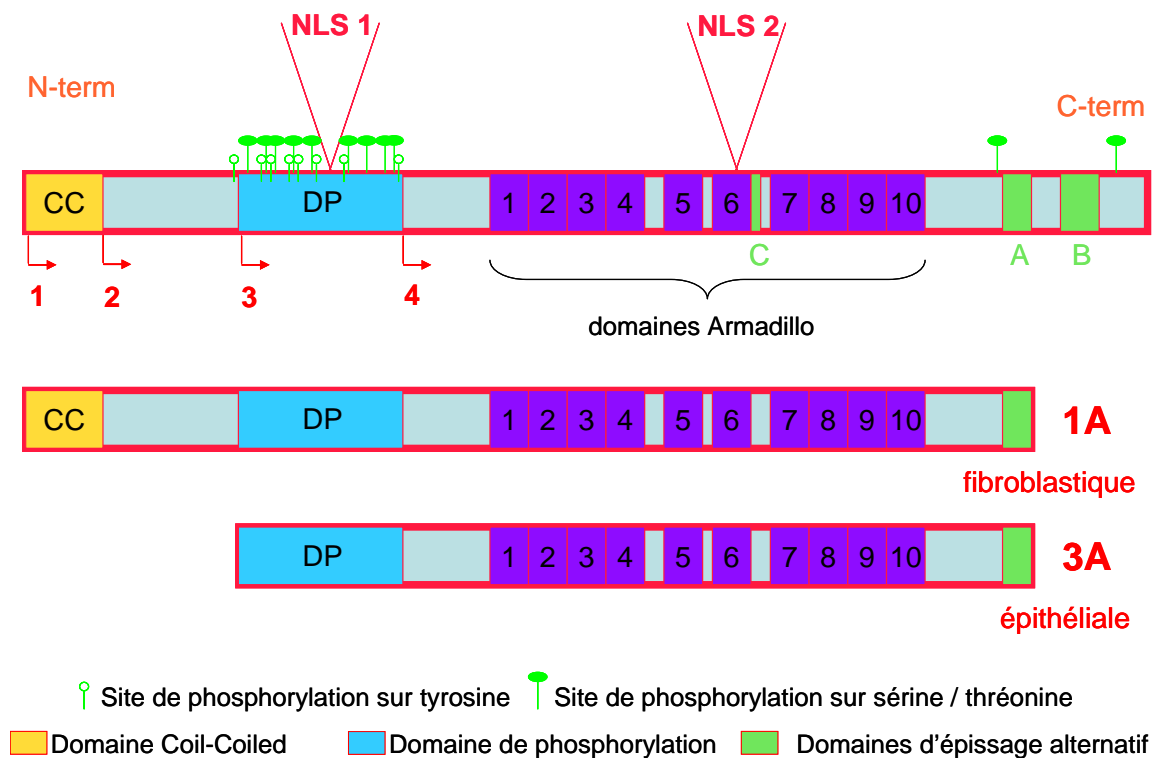


Figure 21 : Structure et isoformes de la p120ctn

Au niveau des membranes plasmiques, le partenaire majeur de la p120ctn est la E-cadhérine, toutefois son rôle au sein des jonctions adhérentes semble varier selon le type cellulaire étudié et reste controversé. D'une part p120ctn est capable de protéger la E-cadhérine de la dégradation en la stabilisant à la membrane plasmique et renforce le regroupement latéral des cadhérines, favorisant ainsi la maturation des jonctions adhérentes (Davis et al, 2003; Davis & Reynolds, 2006; Ireton et al, 2002; Xiao et al, 2003). D'autre part l'association de p120ctn aux cadhérines peut également réguler négativement l'adhérence intercellulaire (Aono et al, 1999; Ohkubo & Ozawa, 1999; Ozawa & Kemler, 1998). Il est possible que les différences observées soient dépendantes de l'état de phosphorylation de la p120ctn. En effet, la délétion de la partie N-terminale de la protéine induit une agrégation dépendante des cadhérines dans les cellules Colo-205 (Aono et al, 1999), or cette partie N-terminale présente un domaine de régulation riche en résidus sérine, thréonine et tyrosine phosphorylables par des kinases présentes au sein des jonctions (Reynolds & Roczniak-Ferguson, 2004). La phosphorylation de la p120ctn sur tyrosine s'effectue après son interaction avec la E-cadhérine et induit la déstabilisation des jonctions adhérentes dans des cellules transformées par v-src (Ozawa & Ohkubo, 2001).

Lorsque la p120ctn n'est pas associée à la E-cadhérine elle est relarguée dans le cytoplasme et, contrairement à la β -caténine, n'est pas dégradée. D'ailleurs, à ce jour, on ne lui connaît aucun mécanisme de dégradation. A ce niveau, elle a été décrite pour réguler l'activité des protéines G monomériques Rho A, Rac1 et Cdc 42 (figure 22). La p120ctn inhibe Rho A en agissant comme un Rho-GDI et active Rac1 et Cdc 42 par le biais de Vav 2, un facteur d'échange des Rho-GTPases (Anastasiadis, 2007). Cela a pour effet d'induire une morphologie cellulaire caractéristique appelée phénotype dendritique présentant de longues protrusions membranaires lorsque la p120ctn est surexprimée dans des cellules fibroblastiques (Anastasiadis et al, 2000; Grosheva et al, 2001; Noren et al, 2000). Sa surexpression dans des cellules épithéliales provoque un phénotype moins accentué avec seulement une augmentation en nombre et en taille des lamellipodes.

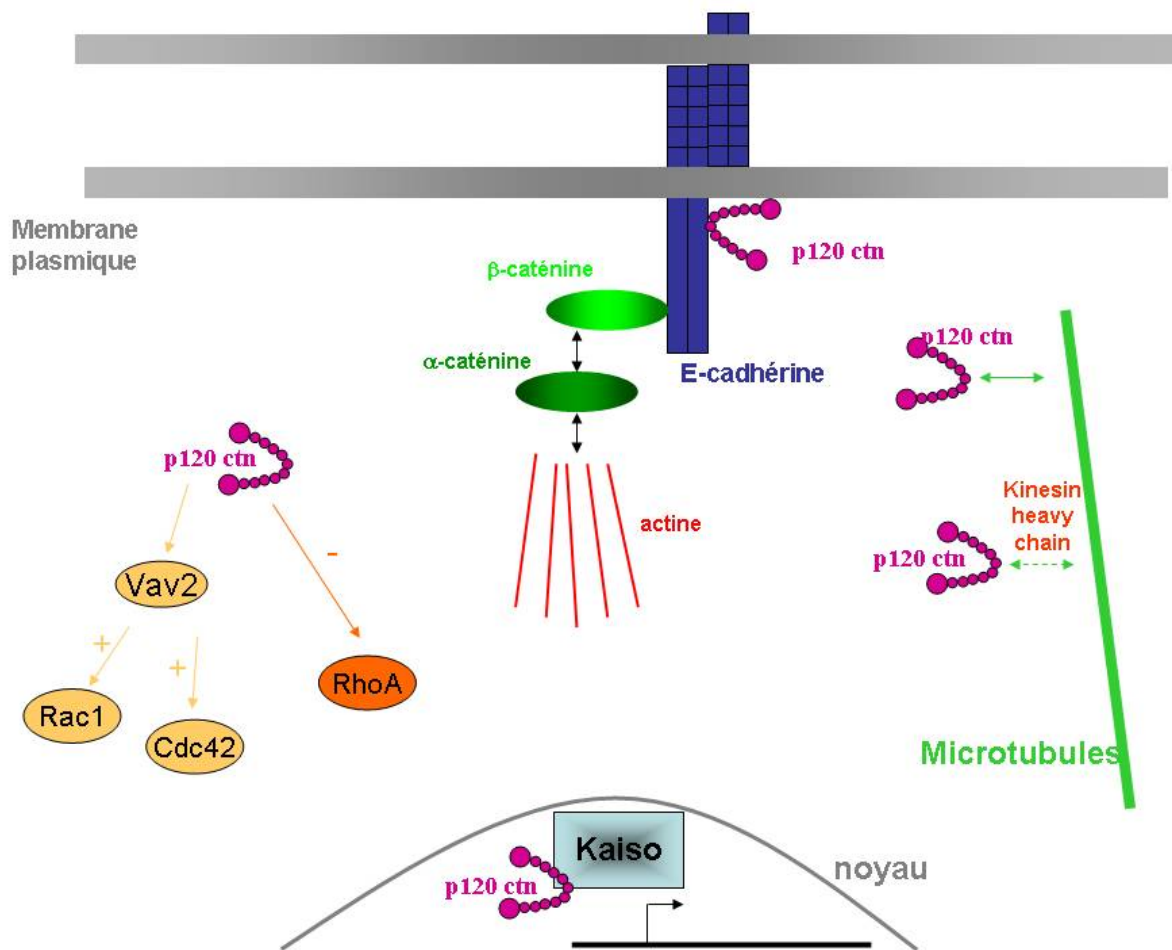


Figure 22 : Partenaires et localisations cellulaires de la p120ctn

La capacité de la p120ctn à réguler les Rho-GTPases a longtemps été séparée de sa capacité d'interaction avec les cadhérines, les deux processus semblant mutuellement exclusifs. Toutefois une étude récente a montré que la capacité de la p120ctn à inhiber RhoA pourrait dépendre de son interaction avec la protéine p190RhoGAP au niveau des jonctions adhérentes, suggérant que la p120ctn est capable d'inhiber Rho tout en interagissant avec la E-cadhérine (Wildenberg et al, 2006).

Il a également été démontré que la p120ctn peut interagir avec le cytosquelette de microtubules soit directement soit par le biais des chaînes lourdes de kinésines (Chen et al, 2003; Franz & Ridley, 2004; Yanagisawa et al, 2004). Sa colocalisation avec la E-cadhérine au niveau de vésicules le long des microtubules laisse penser qu'elle participe au trafic et à l'adressage des cadhérines vers la membrane plasmique. En accord avec sa localisation au niveau des microtubules en interphase, la p120ctn a également été observée dans les

centrosomes de cellules mitotiques, toutefois, sa fonction au niveau de cet organite reste encore à élucider (Franz & Ridley, 2004; Rocznik-Ferguson & Reynolds, 2003).

Enfin, comme la β -caténine, la p120ctn est capable d'interagir dans le noyau avec les facteurs de transcriptions Kaiso et Glis 2 (Daniel & Reynolds, 1999; Hosking et al, 2007). En se fixant au niveau du promoteur de ses gènes cibles, Kaiso réprime leur transcription. L'interaction de p120ctn à Kaiso l'empêche de se lier à l'ADN et lève ainsi la répression génique. Certains gènes dont la répression est levée par l'interaction p120ctn-Kaiso, comme les gènes codant pour la cycline D1, la matrilysin ou encore le facteur de transcription siamois, sont également des cibles dont la transcription est activée par le complexe β -caténine/TCF/Lef, soulignant ainsi une convergence des deux voies dans la régulation génique (Park et al, 2006; Park et al, 2005; Spring et al, 2005).

Il apparaît donc que les caténines, plus que de simples protéines adaptatrices permettant l'assemblage des jonctions adhérentes, sont des protéines capables de moduler localement la force de cohésion des liaisons entre cadhérines, la polymérisation du cytosquelette d'actine ainsi que la transcription des gènes. Elles sont donc un maillon essentiel de la chaîne de signalisation permettant aux cellules de réagir à leur environnement immédiat.

III.2.2. Régulation dynamique des jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes présentent une dynamique importante et continue, leur mise en place progressive ainsi que leur maintien à la membrane repose sur une régulation de l'expression et de l'interaction de chacun des composants. La dynamique des contacts est assurée en partie par les petites protéines G qui régulent la polymérisation du cytosquelette d'actine de façon dépendante des caténines. Des modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations jouent également un rôle important dans le turn-over de ces protéines et dans le désassemblage des complexes.

III.2.2.a Régulation de l'expression et de l'adressage des différents composants des jonctions adhérentes

L'expression de la E-cadhérine est indispensable à la formation d'un épithélium fonctionnel. Des embryons de souris homozygotes pour la délétion de la E-cadhérine meurent au stade implantatoire car elles n'arrivent pas à former de trophoctoderme ni de blastocœle (Larue et al, 1994). Il est cependant possible que la E-cadhérine soit nécessaire dans les étapes

antérieures mais que l'expression du gène maternel assure la présence de la protéine jusqu'à ce stade. Toutefois, la perte transitoire et contrôlée d'expression de la E-cadhérine est nécessaire au développement embryonnaire en permettant les mouvements des différents feuillets embryonnaires lors de la gastrulation, on parle alors de transition épithélio-mésenchymateuse car les cellules perdent leur phénotype épithélial au profit d'un phénotype mésenchymateux plus migratoire et invasif. D'un point de vue pathologique, l'inhibition de la transcription du gène codant pour la E-cadhérine est un élément précoce dans le développement tumoral intestinal puisque qu'elle favorise l'invasion de la sous-muqueuse par les cellules épithéliales transformées. La transcription de la E-cadhérine doit donc être contrôlée positivement dans les cellules épithéliales et négativement dans les cellules non-épithéliales ou migratoires. La régulation positive de la transcription du gène de la E-cadhérine est assurée par la fixation de différents facteurs de transcription au niveau d'une région riche en GC et d'une boîte CCAAT sur son promoteur. Ces régions contiennent deux sites de fixation à AP-2, un facteur de transcription positif de la E-cadhérine (Behrens et al, 1991). D'autres facteurs comme WT1 (Wilm's tumor 1), sp1 (specificity protein 1) et HNF-4 α (Hepatic Nuclear Factor 4 α) favorisent également la transcription du gène de la E-cadhérine (Faraldo et al, 1997; Hosono et al, 2000; Parviz et al, 2003). Au contraire, certains facteurs de transcription exprimés lors des transitions épithélio-mésenchymateuses, répriment la transcription de la E-cadhérine en se fixant aux sites E-box présents sur le promoteur. Ce sont des protéines à doigt de Zinc comme snail/slug et les protéines zeb ou des protéines de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix) comme E12/47 (Bolos et al, 2003; Cano et al, 2000; Guaita et al, 2002) souvent surexprimées dans les tumeurs. L'expression de snail dans des cellules MDCK induit également un changement dans le type d'isoforme de p120ctn exprimé, en favorisant la transcription de l'isoforme 1 et en inhibant celle de l'isoforme 3 (Ohkubo & Ozawa, 2004). Bien que la régulation de la transcription du gène de la p120ctn reste peu connue, cette étude suggère qu'un même facteur peut-être responsable de l'inhibition de la transcription de la E-cadhérine et de la transcription ciblée d'une isoforme pro-migratoire de p120ctn, il est donc possible que les deux gènes partagent des séquences promotrices similaires.

La régulation transcriptionnelle de la β -caténine a été beaucoup moins étudiée que sa régulation post-traductionnelle, toutefois le clonage de la séquence des promoteurs des gènes murins et humains de la β -caténine ont mis en évidence la présence de sites de fixation aux facteurs AP1 et TCF/LEF, soulignant un possible rétrocontrôle positif de la voie Wnt/ β -

caténine (Li et al, 2004). Plus récemment, l'étude de souris déficientes pour le récepteur à l'hormone thyroïdienne $\text{THR}\alpha\text{-1}$ a également montré que l'hormone thyroïdienne T3 et son récepteur $\text{THR}\alpha\text{-1}$, dont l'expression est accentuée au niveau des cryptes intestinales, induisent directement la transcription de la β -caténine et assurent ainsi la prolifération des cellules progénitrices au sein de l'épithélium intestinal (Plateroti et al, 2006).

Une fois synthétisée, la E-cadhérine doit s'associer avec la β -caténine au niveau du réticulum endoplasmique afin d'être dirigée vers la membrane plasmique (Chen et al, 1999). La formation des vésicules à clathrine pour le trafic basolatéral des cadhérines dépend alors des protéines adaptatrices AP-1 et GGA dont le recrutement au niveau de l'appareil de Golgi nécessite l'activation de la GTPase ARF (ADP-Ribosylation Factor) (Shinotsuka et al, 2002). L'insertion de la E-cadhérine dans la membrane plasmique est ensuite facilitée par la présence de protéines comme le complexe Sec 6/8 qui délimite le site d'accrochage des vésicules au niveau de la membrane apico-latérale (Grindstaff et al, 1998) et le complexe syntaxine 4-SNARE qui permet l'interaction et la fusion des vésicules à ces sites spécifiques (Bryant & Stow, 2004).

III.2.2.b Assemblage et maintien dynamique des jonctions adhérentes: rôles des caténines et des protéines G monomériques

La mise en place des jonctions adhérentes au cours de la différenciation épithéliale nécessite le recrutement successif des différents acteurs et peut être divisé en plusieurs étapes depuis l'apparition de contacts primaires jusqu'à l'obtention d'une jonction mature (figure 23 et 24). Les premières étapes de formation sont caractérisées par la formation d'extensions membranaires, les filopodes et les lamellipodes, permettant à deux cellules voisines d'établir des contacts primaires. Cela implique une régulation locale de la polymérisation de l'actine, assurée par le contrôle de l'activation des protéines G monomériques de la famille Rho. Les caténines régulent ensuite le recrutement de différentes protéines structurales et enzymatiques permettant de renforcer les contacts, sous forme de jonctions adhérentes immatures punctiformes dans un premier temps, puis de jonctions adhérentes matures.

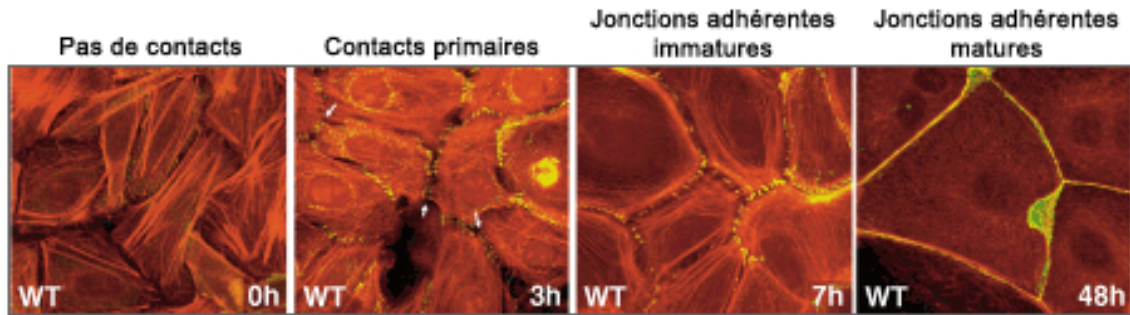


Figure 23 : Cinétique de formation des jonctions adhérentes

Des kératinocytes primaires de souris sont placés en milieu riche en calcium pendant 0, 3, 7 et 48h afin de former des jonctions adhérentes, puis sont fixés et marqués pour l'actine (rouge) et la E-cadhérine (vert). (Vasioukhin et al, 2001)

L'établissement des jonctions adhérentes est un processus séquentiel associé à une activation des GTPases monomériques ciblée dans le temps et l'espace. Lors de la formation des premiers contacts intercellulaires Rac1 est recrutée et activée à ces sites de façon dépendante de la phosphoinositide-3-Kinase (PI3K) (Ehrlich et al, 2002; Kovacs et al, 2002a; Noren et al, 2001). Rac 1 permet alors l'activation de Arp2/3 au niveau des contacts qui induit la formation d'actine branchée et donc de lamellipodes nécessaires au rapprochement physique des deux cellules adjacentes (Kovacs et al, 2002b). Cdc42 est également activée lors de ces premières étapes et permet la formation de filopodes favorisant eux-aussi l'interaction entre les cellules voisines. Il est intéressant de noter qu'à ce stade, la p120ctn qui est capable d'activer Rac1 et Cdc42 n'est pas encore associée à la E-cadhérine et pourrait donc participer à l'activation de ces deux GTPases. Toutefois cette régulation semble varier selon le type cellulaire étudié puisque l'activation de Rac1 dans des kératinocytes provoque le désassemblage des jonctions adhérentes en favorisant l'endocytose des cadhérines (Akhtar & Hotchin, 2001).

Ensuite, le complexe E-cadhérine / β -caténine pourrait être recruté par la nectine, une autre protéine transmembranaire capable de former des trans-dimères, retrouvée dans les jonctions adhérentes et présente plus tôt aux contacts (Tachibana et al, 2000). La nectine interagit par sa partie cytoplasmique avec l'afadine, une protéine se liant à l'actine et qui interagit elle-même avec l' α -caténine. L' α -caténine stabilise alors le complexe E-cadhérine/ β -caténine à la membrane en remodelant le cytosquelette sous forme de câbles d'actine radiale (Adams et al, 1998). Des mutations dans le gène de l' α -caténine ou l'utilisation de drogues empêchant la polymérisation de l'actine fragilisent les contacts intercellulaires (Vasioukhin et al, 2000). La démonstration récente que seuls les homodimères d' α -caténine peuvent interagir avec l'actine

polymérisée suggère que selon son engagement avec la β -caténine, l' α -caténine peut entrer en compétition avec le complexe Arp2/3/Wasp, responsable de la polymérisation branchée de l'actine, et ainsi inhiber la formation de lamellipodes (Drees et al, 2005). L' α -caténine inhibe ainsi la polymérisation branchée de l'actine au profit d'une polymérisation linéaire sous corticale en recrutant notamment au niveau des jonctions d'autres nucléateurs de l'actine : les formines et les protéines Vasp/Ena (Kobiela et al, 2004; Krause et al, 2003; Vasioukhin et al, 2000). Ces forts câbles d'actine sous-corticale permettent alors un ancrage solide du complexe des jonctions adhérentes à la membrane. A ce niveau l'activation de Rac1 et de Cdc42 est associée à l'inhibition de IQGAP, un effecteur de Rac1 qui déstabilise le complexe des jonctions adhérentes en rentrant en compétition avec l' α -caténine pour la fixation à la β -caténine (Kuroda et al, 1998).

Dans une dernière étape, le recrutement de la p120ctn au niveau du domaine juxtamembranaire de la E-cadhérine favorise le regroupement latéral des complexes et permet ainsi la maturation des jonctions (Yap et al, 1998). A ce stade, la p120ctn associée à la E-cadhérine pourrait être dans l'incapacité d'inhiber localement RhoA. En effet, l'activation de RhoA et de son effecteur la Rho-activated Kinase (ROCK), permet l'augmentation de contractilité du cytosquelette d'actine et favorise ainsi la force de cohésion de la jonction (Shewan et al, 2005).

La régulation de l'activité de la phosphoinositide-3-Kinase (PI3K) est également un processus dynamique important dans la mise en place des jonctions adhérentes. En effet, son activation est nécessaire au renforcement des premiers contacts intercellulaires puisque l'inhibition de la PI3K supprime l'agrégation de cellules MDCK et l'adhérence cadhérine dépendante (Kovacs et al, 2002a; Sander et al, 1998). Le modèle avancé actuellement indique que la formation des premiers trans-dimères de E-cadhérine induit l'activation de la tyrosine kinase c-src qui va alors phosphoryler la PI3K (McLachlan et al, 2007; Pang et al, 2005). La PI3K phosphorylée peut alors interagir avec la β -caténine et activer localement Vav 2 et Tiam 1, deux facteurs d'échange de Rac1, permettant ainsi l'activation de Rac1 au niveau des jonctions adhérentes (Fukuyama et al, 2006; Pece et al, 1999; Xie & Bikle, 2007).

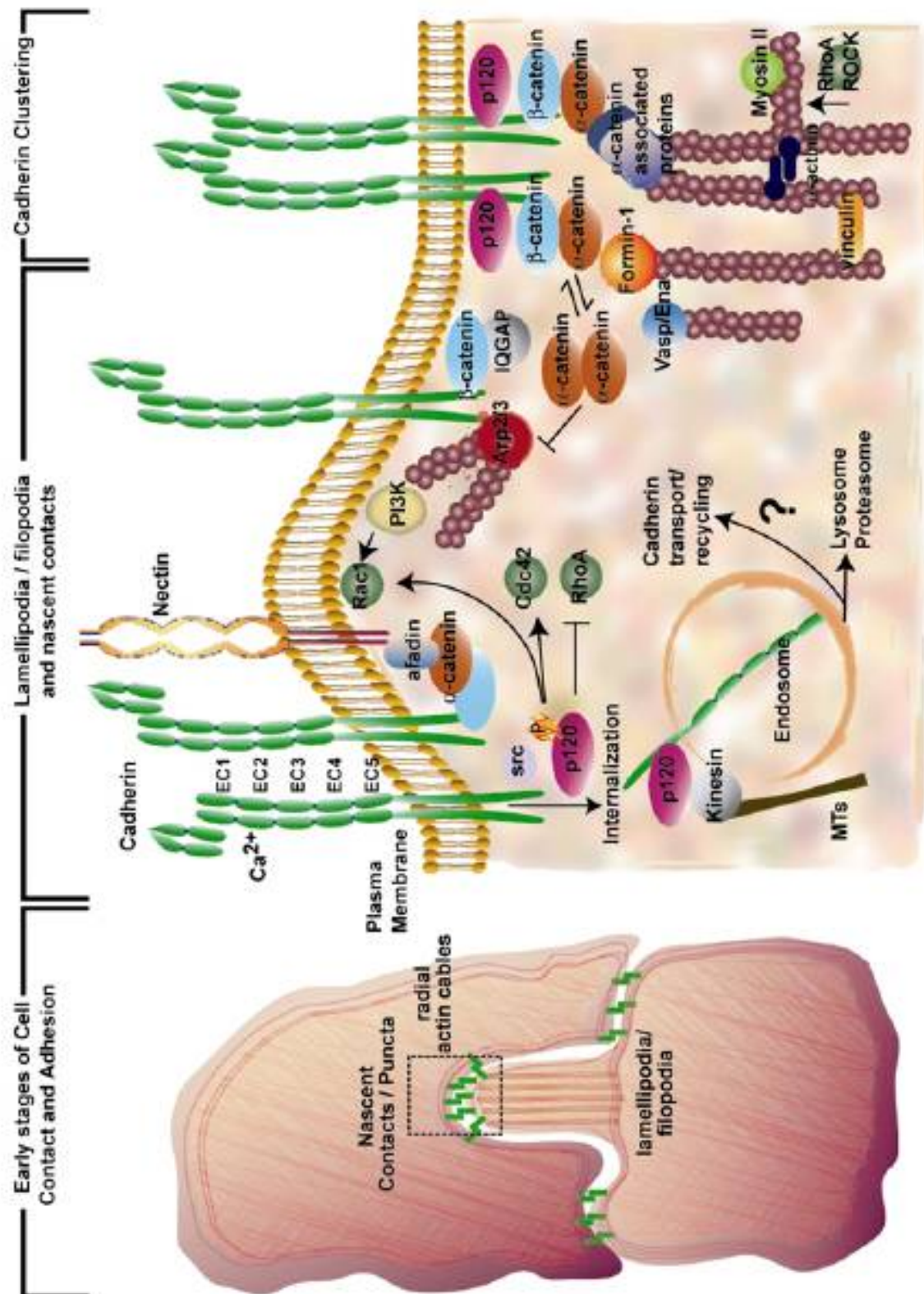


Figure 24 : Régulation dynamique de l'assemblage des jonctions adhérentes
(Perez-Moreno & Fuchs, 2006)

Toutefois des expériences contradictoires indiquent qu'en réponse à certains facteurs de croissance comme le TGF- β , la PI3K pourrait être impliquée dans le désassemblage des jonctions adhérentes (Vogelmann et al, 2005) et que son activation est nécessaire à la transition épithélio-mésenchymateuse (Larue & Bellacosa, 2005). Ces résultats sont en accord avec des travaux portant sur le rôle de PTEN, une phosphatase dont l'activité est antagoniste à celle de la PI3K puisque PTEN déphosphoryle le PIP₃ pour former du PIP₂. En effet, la liaison de PTEN à la β -caténine via la protéine structurale MAGI-1b permet la stabilisation des jonctions adhérentes en régulant subtilement le niveau de PIP₃ à la membrane (Kotelevets et al, 2001; Kotelevets et al, 2005). De plus, la surexpression de PTEN ou l'inhibition chimique de la PI3K par la Wortmanin dans les cellules Caco-2 et HT-29 provoque l'augmentation d'activité de l'alcaline phosphatase et de la sucrase isomaltase, deux marqueurs de différenciation entérocytaire (Wang et al, 2001).

Il semble donc que la PI3K soit activée par les tous premiers contacts intercellulaires et, qu'en activant Rac1, elle induise une boucle de contrôle positif sur l'assemblage des jonctions adhérentes. Toutefois son activité doit ensuite être régulée et contrebalancée par l'activité de PTEN afin de ne pas déstabiliser les jonctions en réponse à divers facteurs de croissance.

La formation des jonctions adhérentes repose donc sur un recrutement séquentiel et localisé de différentes protéines capables de s'associer au complexe, de le stabiliser à la membrane plasmique et de modifier sa force de cohésion avec le cytosquelette d'actine.

III.2.2.c Régulation du désassemblage des jonctions adhérentes

Le désassemblage des jonctions adhérentes dépend principalement de l'internalisation de la E-cadhérine par endocytose, de sa dégradation et de la perte d'interaction avec les caténines et le cytosquelette d'actine, ces processus étant parfois intimement liés et régulés par le jeu de kinases/phosphatases. Le démantèlement des jonctions, suivi de l'internalisation des différents composants est notamment observé en réponse aux facteurs de croissance comme le HGF, le VEGF, l'IGF ou l'EGF, dont les récepteurs peuvent être colocalisés avec les jonctions adhérentes. L'activation de ces récepteurs tyrosine kinase induit la phosphorylation des différents composants des jonctions (cadhérines et caténines), modifiant ainsi la charge de ces molécules et donc, leurs interactions dans le complexe.

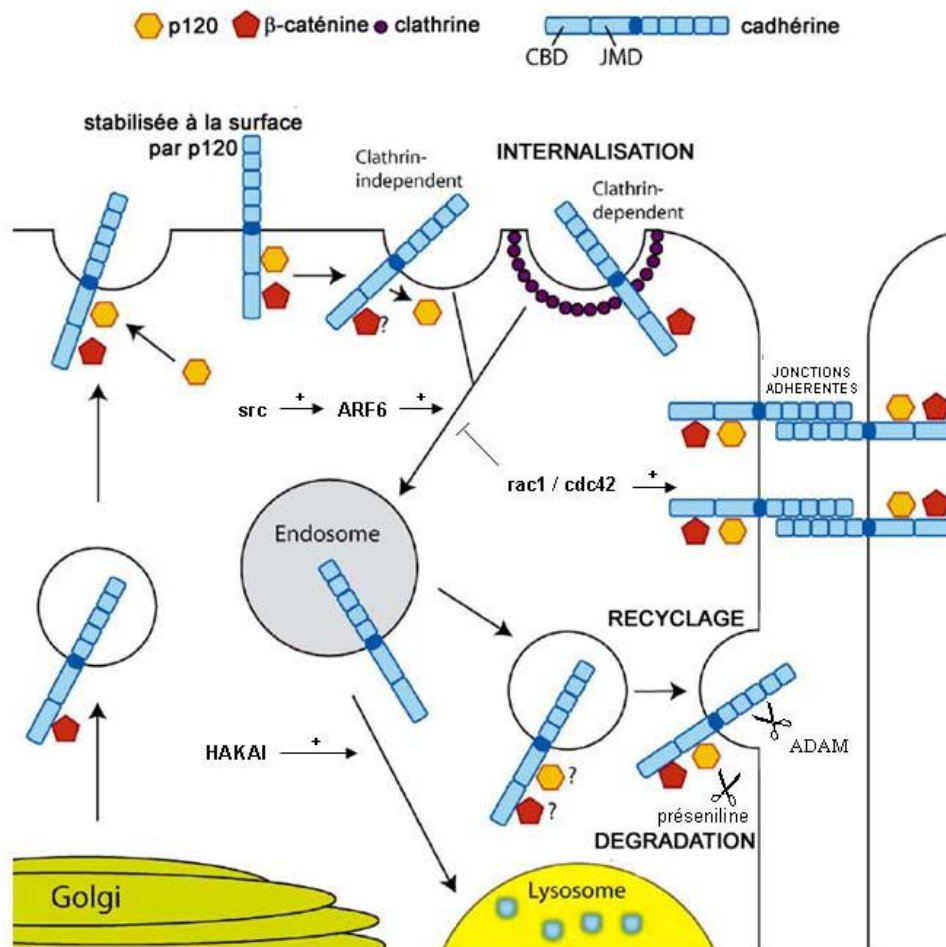


Figure 25 : Régulation dynamique du taux de cadhérines membranaire : endocytose et recyclage
(Xiao et al, 2007)

La E-cadhérine membranaire a une demi-vie d'environ 5 heures (Shore & Nelson, 1991). Elle subit une endocytose continue et est internalisée dans des vésicules à clathrine ou à cavéoles (Hinchcliffe et al, 1999; Lu et al, 2003). Cette internalisation permet de réguler la dynamique des contacts intercellulaires en recyclant le pool de E-cadhérines membranaires. Ce type de recyclage est moins rapide dans les cellules où les contacts sont bien établis et est très dynamique dans les cellules mobiles ou suite à la rupture des contacts intercellulaires (Kamei et al, 1999). Les GTPases ARF6, Rac1 et Cdc42 sont impliquées dans la régulation de cette endocytose (Izumi et al, 2004; Palacios et al, 2001), l'activation de ARF6 suite à l'activation de v-src induisant l'internalisation de la E-cadhérine tandis que Rac1 et Cdc42 activée protègent les cadhérines membranaires de l'endocytose en favorisant leur association avec le cytosquelette d'actine (figure 25). L'activation de src induit la phosphorylation sur tyrosine de la E-cadhérine, cette phosphorylation permet sa mono-ubiquitination par Hakai,

une E3-ubiquitine ligase, favorisant ainsi son internalisation et probablement sa dégradation dans les lysosomes (Fujita et al, 2002). L'interaction avec la p120ctn permet toutefois de protéger la E-cadhérine de son internalisation et de sa dégradation en entrant en compétition avec Hakai et avec la preseniline1/ γ -secretase, responsable de la protéolyse du domaine cytoplasmique de la E-cadhérine (Baki et al, 2001; Fujita et al, 2002; Xiao et al, 2007). Il est cependant difficile de déterminer le rôle des phosphorylations de p120ctn dans le désassemblage des jonctions. En effet, elle peut être phosphorylée sur tyrosine suite à l'activation de src, Fer ou du récepteur à l'EGF, toutefois différentes études montrent des résultats contradictoires quand à l'effet de ces phosphorylations sur sa liaison à la E-cadhérine (Alema & Salvatore, 2007). L'activation de src, ainsi que d'autres tyrosines kinases comme Fer, Fyn ou les récepteurs tyrosine kinase induisent également la phosphorylation de la β -caténine et inhibent son interaction avec la E-cadhérine et l' α -caténine (Roura et al, 1999) ce qui a pour effet de déstabiliser les jonctions et favorise la migration cellulaire (Andre et al, 1999). De plus, la E-cadhérine possède au niveau du site de liaison à la β -caténine une séquence « PEST » qui correspond à un signal de dégradation par le protéasome (Huber et al, 2001), la perte d'interaction entre les deux protéines pourrait alors faciliter la dégradation de la E-cadhérine. L'utilisation d'inhibiteurs du protéasome induit d'ailleurs une augmentation d'expression de la E-cadhérine (Fouquet et al, 2004; Tsukamoto & Nigam, 1999).

L'expression des protéines ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) inhibe également l'adhérence intercellulaire dépendante des cadhérines. Ces protéases transmembranaires sont capables de dégrader de nombreux récepteurs transmembranaires dont les cadhérines en coupant leur domaine extracellulaire sur un site proche de leur domaine membranaire. Elles divisent ainsi la E-cadhérine totale de 120 kDa en deux: un fragment C-terminal intracellulaire nommé CTF (C-terminal fragment) de 38 kDa et un fragment extracellulaire de 80 kDa (Maretzky et al, 2005). Ainsi, les protéines ADAM 9, 10 et 15 ont été décrites pour inhiber l'adhérence intercellulaire et favoriser la migration de différentes cellules épithéliales lors des transitions épithélio-mésenchymateuses (Hirao et al, 2006; Mosnier et al, 2006; Wild-Bode et al, 2006). Les protéines ADAM sont donc impliquées dans l'invasion et le développement tumoral de nombreux tissus (Mochizuki & Okada, 2007), il est alors possible de détecter des fragments de cadhérines circulant dans le sérum de patients atteints de cancers (Shirahama et al, 1996).

III.2.3. Jonctions adhérentes et homéostasie intestinale

La mise en place progressive des jonctions adhérentes est une étape clé du processus de différenciation entérocytaire. Au niveau de l'épithélium intestinal, elles sont peu présentes dans le compartiment prolifératif des cryptes, elles sont ensuite maturées lors des étapes précoces de différenciation entérocytaire puis permettent à leur tour la maturation et le maintien des cellules différenciées. La signalisation dépendante de ces jonctions permet de contrôler l'homéostasie cellulaire en fonction de l'environnement proche.

III.2.3.a Contrôle de la prolifération cellulaire par les jonctions adhérentes

Lorsque les cadhérines sont engagées dans les contacts intercellulaires, elles sont capables de réguler le caractère prolifératif des cellules par un processus appelé inhibition de contact. Ce lien entre les cadhérines et la prolifération cellulaire a été établi grâce à l'étude de lignées cancéreuses ayant perdu l'expression de la E-cadhérine. Contrairement à des cellules non transformées exprimant la E-cadhérine, ces cellules continuent de proliférer bien après qu'elles aient atteint la confluence. L'inhibition de contact est par ailleurs restaurée suite à la réintroduction de la E-cadhérine par transfection. (Navarro et al, 1991; St Croix et al, 1998).

Au sein des jonctions adhérentes la E-cadhérine séquestre la β -caténine à la membrane, ce qui a pour effet de diminuer la quantité de β -caténine cytoplasmique capable d'interagir avec TCF et réduit ainsi l'activation des gènes des cyclines par le complexe β -caténine/TCF/LEF (Gottardi et al, 2001; Mariadason et al, 2001). Cette inhibition n'a pas lieu dans les cryptes intestinales puisque l'expression de la E-cadhérine est réduite dans les cryptes d'intestin humain fœtal et adulte (Escaffit et al, 2005). Cette présence réduite dans les cellules indifférenciées serait due aux forts taux d'expression des facteurs de transcription Snail et E12/24, qui répriment le gène de la E-cadhérine et favoriseraient ainsi la prolifération des cellules précurseurs au sein des cryptes.

De plus, les jonctions adhérentes répriment la prolifération cellulaire en favorisant l'expression des inhibiteurs de cyclines. En effet, l'expression de la E-cadhérine dans les cellules HIEC-6 indifférenciées naturellement dépourvues de E-cadhérine inhibe la croissance cellulaire en favorisant l'expression précoce de l'inhibiteur de cyclines p21 (Escaffit et al, 2005). Au contraire l'utilisation d'un anticorps bloquant la E-cadhérine inhibe l'expression de p27 et restaure la prolifération de cellules de cancer thyroïdiens confluentes (Motti et al, 2005). Cette régulation du taux de cycline par les cadhérines peut en partie être

attribuée à l'inhibition de la voie β -caténine/TCF/LEF mais semble également dépendre de l'activation de la PI3K au sein des jonctions adhérentes. En effet, l'utilisation d'un anticorps bloquant dirigé contre la E-cadhérine inhibe la phosphorylation de AKT, un effecteur de la PI3K, et active alors la prolifération cellulaire par la voie MEK/ERK dans les cellules Caco-2. La restauration par le calcium des contacts dépendants des cadhérines permet au contraire l'activation de AKT, inhibe la voie MEK/ERK et arrête la prolifération cellulaire (Laprise et al, 2004). De plus, la voie PI3K /AKT activée par les cadhérines permet également d'activer la voie p38/MAPK capable d'induire l'expression du facteur de différenciation intestinale Cdx 2 (Houde et al, 2001; Laprise et al, 2002). Or l'activité de Cdx 2 permet la transcription des gènes codant pour les inhibiteurs de cyclines p21 et p27, favorisant ainsi l'arrêt de la prolifération cellulaire (Bai et al, 2003; Boulanger et al, 2005). La prolifération cellulaire est également inhibée par la p120ctn puisque sa surexpression dans des cellules hépatiques cancéreuses régule négativement les taux de cycline D1 et de survivine (Nong et al, 2006)

Toutefois, les effets de la E-cadhérine sur la prolifération cellulaire de cellules normales non transformées sont variables en fonction de la densité cellulaire. En effet, une étude sur des cellules normales NRK52-E issue de reins de rat montre que la E-cadhérine est capable de favoriser la prolifération des cellules lorsqu'elles sontensemencées à une densité moyenne, c'est-à-dire avant l'étape d'inhibition de contact discutée précédemment. Cette capacité dépend de l'activation de Rac1 par la p120ctn (Liu et al, 2006).

Il est également possible que les caténines influent sur le déroulement du cycle cellulaire en interagissant avec le fuseau de microtubule et les centrosomes lors de la mitose. En effet différentes études ont montré que la β -caténine et la p120ctn colocalisent avec les microtubules et les centrosomes (Franz & Ridley, 2004; Kaplan et al, 2004). La réduction du taux de β -caténine par siRNA dans les cellules Hela provoque l'apparition de fuseaux mitotiques monoastreaux pouvant donc provoquer des défauts de mitose et /ou des arrêts de croissance cellulaire. La fonction de la β -caténine à ce niveau reste méconnue. Elle pourrait toutefois servir de protéine adaptatrice afin de former des complexes permettant la duplication correcte des centrosomes et la formation d'un fuseau bipolaire. Dans le cas de la p120ctn, sa colocalisation avec les microtubules en interphase et avec les centrosomes en mitose est mutuellement exclusive avec sa capacité à réguler les Rho-GTPases, ce qui laisse penser qu'elle occupe à ce niveau une fonction particulière. Des travaux récents montrent notamment que la p120ctn est capable de réguler la stabilité des microtubules dans les cellules Neuro-2a,

déficientes en cadhérines, la diminution de p120ctn par siRNA fragilisant les microtubules tandis que sa surexpression les rend résistants au nocodazole (Ichii & Takeichi, 2007).

III.2.3.b Les jonctions adhérentes dans la différenciation entérocytaire

La régulation négative de la voie β -caténine/TCF par les cadhérines permet de contrôler l'arrêt de prolifération mais joue également un rôle dans la synthèse de marqueurs de différenciation entérocytaire. En effet, la mise en place des jonctions adhérentes représente en elle-même une étape de la différenciation puis la signalisation via les cadhérines, une fois les jonctions établies, peut également permettre la maturation de la différenciation entérocytaire. La seule expression de la E-cadhérine dans des cellules de type fibroblastiques induit d'ailleurs la formation de cellules adhérentes et polarisées (McNeill et al, 1990).

L'engagement des cadhérines induit des voies de signalisation menant à la régulation de l'expression de divers facteurs de transcription assurant la spécialisation entérocytaire. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'activation de la PI3-Kinase au sein des jonctions adhérentes permet l'expression du facteur de transcription Cdx2 en activant la voie AKT/p38/MAPK. L'inhibition de la PI3-Kinase induisant la perte de marqueurs de différenciation entérocytaires comme la sucrase isomaltase, la villine et la formation d'une bordure en brosse dans les cellules Caco-2 (Laprise et al, 2002). Une récente étude indique d'ailleurs que la régulation entre les cadhérines et les facteurs de transcription Cdx peut-être bidirectionnelle puisque l'expression de Cdx1 et de Cdx2 dans les cellules Colo-205 induit une agrégation cellulaire dépendante des cadhérine en maintenant la β -caténine et la p120ctn dans un état déphosphorylé (Ezaki et al, 2007). Il également été démontré que les contacts médiés par les cadhérines sont à l'origine de l'accumulation du facteur de transcription HNF-4 α (Hepatic Nuclear Factor 4 α) dans les cellules Caco-2 (Peignon et al, 2006). La capacité d'HNF-4 α à se fixer au promoteur du gène de l'apolipoprotéine apoA IV et d'activer sa transcription est alors augmentée. Or apoA IV est un marqueur de la différenciation entérocytaire exprimé et sécrété au niveau des villi et impliquée dans diverses fonctions digestives dont le métabolisme de lipides plasmatiques. De même, l'expression de la E-cadhérine dans des cellules Caco-2 indifférenciées induit la transcription des gènes de l'alcaline phosphatase et de l'IFABP (Intestinal Fatty Acid Binding Protein) (Mariadason et al, 2001).

La polarité apico-basale des cellules est également un marqueur morphologique de la différenciation épithéliale. En régulant le cytosquelette d'actine via l'activation des petites

GTPases, les jonctions adhérentes assurent en partie la mise en place et le maintien de cette structure polarisée au niveau de l'épithélium intestinal. Le recrutement et l'activation de Rac1 et Cdc 42 au niveau des jonctions permet de réguler localement la polymérisation de l'actine et assure la mise en place de la ceinture d'actine apicale des cellules épithéliales.

L'engagement des cadhérines est également impliqué dans la régulation de l'assemblage des jonctions serrées au niveau des membranes apico-latérales. En effet, l'expression dans les cellules MDCK de EFA 6, un facteur d'échange pour la GTPase ARF6, accélère le recrutement des protéines ZO-1 et des occludines à la membrane plasmique après ajout de calcium dans le milieu de culture et renforce l'interaction protéines et le cytosquelette d'actine (Luton et al, 2004). Les auteurs démontrent que l'engagement des cadhérines précède la formation des jonctions serrées et est responsable de l'augmentation d'expression de la protéine EFA 6 endogène. Des hépatocytes dépourvus de E-cadhérine et de β -caténine membranaire présentent également un retard dans le remodelage des membranes apicales sans toutefois présenter de défauts dans la formation des jonctions serrées. Le manque de jonctions adhérentes provoque tout de même la perturbation du trafic de la protéine transmembranaire dipeptidyl peptidase IV : cette protéine est normalement dirigée vers la membrane baso-latérale avant d'être envoyée vers la membrane apicale mais dans les cellules dépourvues de jonctions adhérentes, elle est directement envoyée vers le pôle apical (Theard et al, 2007). Les jonctions adhérentes semblent donc participer au trafic de certaines protéines apicales dans les cellules épithéliales.

L'effet des jonctions adhérentes sur la différenciation entérocytaire est donc double : la mise en place des jonctions s'accompagne d'un remodelage du cytosquelette d'actine permettant de modifier morphologiquement la cellule épithéliale tout en induisant la transcription de protéines nécessaires à la fonction de la cellule intestinale différenciée (figure 26).

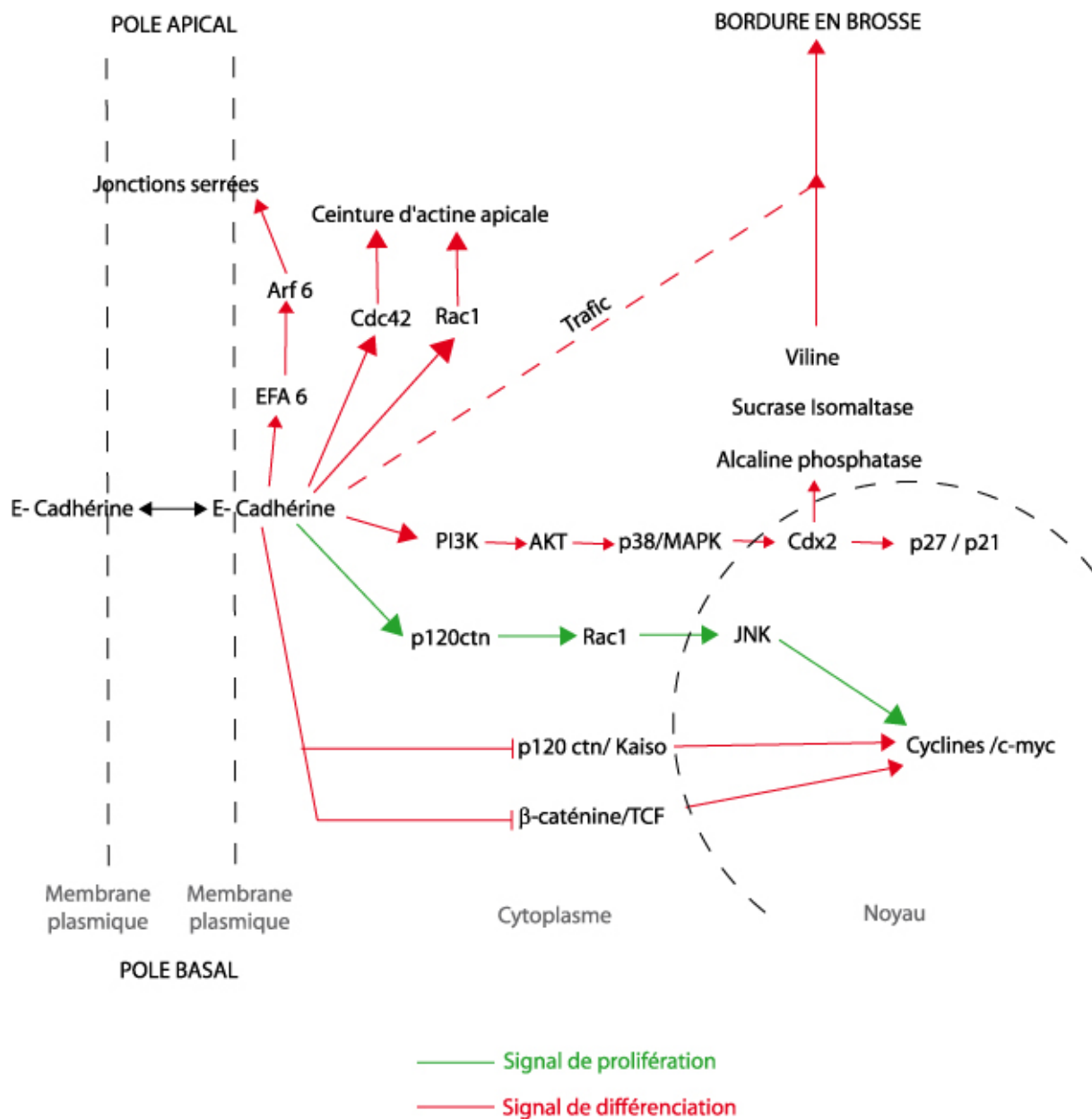


Figure 26 : Régulation de la balance prolifération / différenciation par les jonctions adhérentes

III.3 Signalisations croisée entre les deux types d'adhérences : existence d'un dialogue intracellulaire

Les chapitres précédents montrent qu'au sein d'un épithélium unistratifié, une cellule peut réguler sa morphologie et certaines fonctions primordiales comme la prolifération et la différenciation en intégrant les signaux venant à la fois des contacts avec la matrice extracellulaire et des contacts intercellulaires. Les deux types de jonctions partagent des

effecteurs et des voies de signalisation intracellulaires communes et ont toutes deux la capacité de réguler l'activation des GTPases monomériques. De plus, au niveau de l'épithélium intestinal, les changements de composition de la matrice extracellulaire dans les villi coïncide avec la maturation des jonctions adhérentes, suggérant une régulation croisée entre les deux systèmes. Des études réalisées sur différents modèles cellulaires ont permis de mettre en avant certains mécanismes de cette régulation réciproque entre intégrines et cadhérines.

III.3.1. Régulation des cadhérines par les intégrines

Selon le type cellulaire étudié et les matrices extracellulaires utilisées, l'activation des intégrines est capable de réguler les contacts intercellulaires soit positivement soit négativement. Des travaux portant sur la migration des cellules de la crête neurale au cours du développement ont notamment permis de mettre en évidence ce type de crosstalk entre les intégrines à sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ et la N-cadhérine (Monier-Gavelle & Duband, 1997). Il est maintenant admis que ce type de signalisation croisée joue un rôle important dans la différenciation cellulaire et à l'inverse, dans le développement cancéreux.

Lors des transitions épithélio-mésenchymateuses, les capacités d'étalement et de migration des cellules augmentent tandis que les contacts intercellulaires sont désassemblés (Thiery, 2002). L'activation de différentes kinases intracellulaires, notamment src et FAK semble être à l'origine du démantèlement des jonctions adhérentes dans ce cas (Avizienyte & Frame, 2005). Dans les cellules KM12C, l'activation de la FAK par l'intégrine $\alpha v \beta 1$ et sa phosphorylation par src permettent d'activer la voie ERK/MAPK. Il en résulte une accumulation de phospho-MLC (Myosin Light Chain) en périphérie cellulaire provoquant l'augmentation de la contractilité du cytosquelette d'actomyosine et la délocalisation de la E-cadhérine vers le cytoplasme (Avizienyte et al, 2002). Au contraire, l'inhibition de la voie ERK ou de la MLCK (Myosin Light Chain Kinase) restaure la E-cadhérine membranaire.

De plus, la signalisation médiée par les intégrines est également capable d'influer sur le taux d'expression des protéines des jonctions adhérentes. En effet, l'ILK (Integrin Linked Kinase), associée aux intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ au sein des adhérences focales, régule négativement l'adhérence intercellulaire en induisant l'expression de snail, un facteur de répression pour le gène de la E-cadhérine, et en favorisant l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine /TCF /LEF (Oloumi et al, 2004). La surexpression de l'ILK dans les cellules intestinales de rat

IEC induit à la fois une baisse d'expression de la E-cadhérine et l'augmentation d'assemblage de la fibronectine (Wu et al, 1998).

Toutefois le rôle négatif de l'ILK dans l'adhérence intercellulaire peut-être spécifique d'un type cellulaire donné puisque la présence de la protéine entière est nécessaire à la formation de jonctions adhérentes dans des kératinocytes (Vespa et al, 2005). Dans ces cellules, l'augmentation de concentration en calcium provoque la délocalisation de l'ILK des adhérences focales vers les sites de contacts intercellulaires primaires avec une cinétique correspondant à la mise en place des jonctions adhérentes. Ainsi, selon sa localisation l'ILK pourrait exercer des fonctions totalement opposées probablement en recrutant des partenaires différents.

De même selon les conditions de culture l'activation de la FAK peut réguler positivement l'adhérence intercellulaire. Suite à l'activation chimique de la PKC dans des cellules MDCK cultivées sous de faibles concentrations de calcium, la FAK est phosphorylée et permet la mise en place de contacts dépendants des nectines, à l'origine de l'engagement des cadhérines (Ozaki et al, 2007). Les auteurs démontrent que l'activation de la PKC dans ce contexte a lieu en aval de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ et en amont de la FAK.

Différentes études démontrent également que les intégrines sont capables de favoriser la mise en place de jonctions adhérentes en réponse à une matrice spécifique dans différents systèmes cellulaires. Ainsi la culture de cellules Caco-2 sur laminine 5 ou collagène IV induit un renforcement des jonctions adhérentes et la polarisation cellulaire de façon dépendante des intégrines à sous-unité $\beta 1$ et $\alpha 6$ (Schreider et al, 2002). L'effet positif de la laminine 5 a par ailleurs été observé dans des kératinocytes dans lesquels l'activation de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ par la matrice ou par un anticorps renforce les contacts médiés par les cadhérines de façon dépendante de la PI3K et de cdc42 (Hintermann et al, 2005). Il est possible que les effets différents des matrices extracellulaires soient dus à leur capacité variable à activer les Rho-GTPases. En effet, sur de la fibronectine ou de la laminine 1, Tiam 1, un facteur d'échange de Rac1, est capable d'activer Rac1 qui induit alors une perte de mobilité des cellules MDCK et l'augmentation des contacts intercellulaires (Sander et al, 1998). En revanche, sur collagène, l'activation de Rac1 par Tiam1 résulte dans l'augmentation de la motilité cellulaire et la perte d'adhérence intercellulaire. Tout comme dans les kératinocytes, l'activité de la PI3K est nécessaire à l'activation de la Rho-GTPase par Tiam 1.

Ainsi, Chen et Gumbiner proposent un modèle selon lequel l'activation de src et FAK par les intégrines favorise la motilité cellulaire et inhibe l'adhérence intercellulaire tandis que l'activation de la PI3K favorise la mise en place des jonctions adhérentes (figure 27).

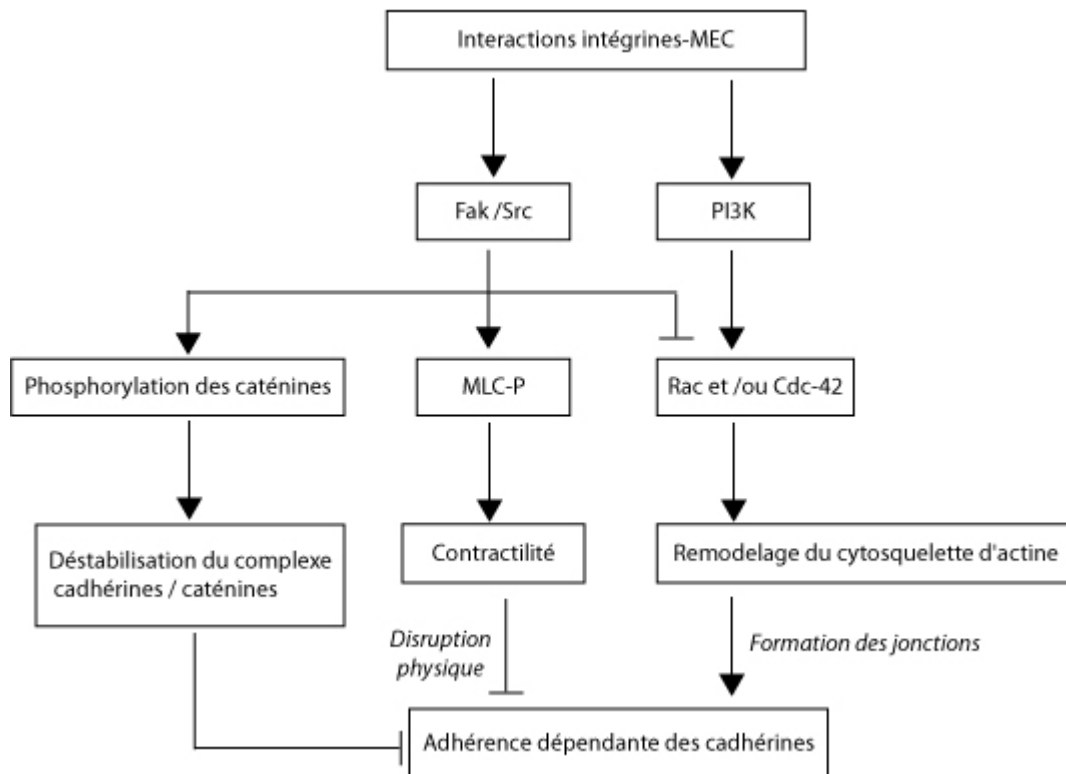


Figure 27 : Régulation des contacts intercellulaires cadhérines-dépendants par la signalisation des intégrines (Chen & Gumbiner, 2006)

Le contrôle des jonctions adhérentes par les intégrines ne nécessite pas forcément une signalisation intracellulaire à distance mais peut-être accompli suite au rapprochement physique des intégrines avec les cadhérines. En effet, l'intégrine $\alpha3\beta1$ peut être localisée au niveau des membranes latérales où elle forme un complexe avec la tétraspanine CD151, la E-cadhérine et la β -caténine (Chattopadhyay et al, 2003). Les auteurs proposent que l'augmentation d'expression et le recrutement de la tyrosine phosphatase PTP μ au niveau de ce complexe stabilise l'interaction entre les cadhérines et les caténines. Ce type de localisation de l'intégrine $\alpha3\beta1$ est en accord avec le fait que cette intégrine est capable de former des interactions homophiliques (Sriramarao et al, 1993).

III.3.2. Régulation des intégrines par les cadhérines

Même si peu de données sont disponibles concernant la modulation de l'adhérence dépendante des intégrines par les cadhérines, certains systèmes, comme la différenciation des kératinocytes indiquent que ce type de régulation peut avoir lieu.

Les kératinocytes se différencient au sein de l'épithélium pluristratifié de la peau et leur différenciation est associée à la formation de contacts intercellulaires forts accompagnés du détachement de la lame basale des kératinocytes en cours de maturation. Contrairement à l'épithélium intestinal, le détachement des cellules de la lame basale est donc une étape nécessaire à la différenciation (Green, 1977; Watt et al, 1993). L'ajout de calcium dans le milieu de culture de kératinocytes induit leur différenciation *in-vitro* suggérant que l'engagement des cadhérines peut être impliqué dans cette différenciation.

En accord avec ce qui peut être observé dans les kératinocytes, Wu et al. (Wu et al, 2006) ont démontré que la surexpression de la E-cadhérine dans des cellules mammaires cancéreuses inhibe l'adhérence à la fibronectine et induit la diminution d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$.

Au contraire l'expression de la T-cadhérine dans des cellules de carcinome cutané est associée à la stabilisation de l'intégrine $\beta 1$ à la surface de la cellule et inhibe son internalisation par endocytose (Mukoyama et al, 2007).

La régulation des complexes d'adhérences au cours de la différenciation cellulaire est donc un phénomène complexe reposant à la fois sur la régulation de l'expression des différents composants au cours du temps, sur leur capacité à interagir avec des partenaires cytoplasmiques et sur l'activation de voies de signalisation intracellulaire. L'étude de la mise en place et de la régulation des complexes d'adhérence intercellulaires comme les jonctions adhérentes est primordiale puisque ces adhérences sont souvent dérégulées au cours du développement tumoral, aboutissant à l'augmentation du potentiel invasif et métastatique des cellules épithéliales. La progression tumorale est considérée à juste titre comme une dédifférenciation des cellules puisqu'elles retrouvent la capacité de se multiplier indépendamment des contacts cellulaires, il est donc nécessaire de connaître précisément chaque étapes de la différenciation épithéliale afin de pouvoir comparer et identifier les protéines responsables de la carcinogénèse.

OBJECTIFS

Les travaux développés au cours de ce doctorat ont eu pour but d'étudier les jonctions adhérentes dans le cadre de la différenciation entérocytaire des cellules HT-29. Deux processus différents ont été abordés :

Dans un premier temps, j'ai cherché à préciser le rôle de la matrice extracellulaire dans la formation des jonctions adhérentes au cours de la différenciation entérocytaire. En effet, des travaux réalisés avant mon arrivée au laboratoire ont permis de mettre en parallèle la mise en place de contacts intercellulaires dépendants des cadhérines et la capacité des cellules HT-29 à sécréter de la laminine 5 lors de leur différenciation précoce (Gout et al, 2004), suggérant une signalisation croisée entre l'adhérence des cellules à la laminine 5 et l'adhérence intercellulaire. La première partie de ces travaux a donc consisté à analyser l'effet de la laminine 5 seule sur les jonctions adhérentes en répondant aux diverses questions soulevées par ces premières observations : la laminine 5 est-elle directement responsable de cette mise en place des jonctions adhérentes ? Si oui, quel est le mécanisme mis en jeu et quels sont les acteurs membranaires et intracellulaires impliqués dans cette signalisation ? Enfin, quel est le statut des jonctions adhérentes ainsi formées ?

Le premier article présenté dans ce manuscrit permet de répondre à ces questions.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux autres facteurs pouvant moduler la force de cohésion des jonctions adhérentes en nous focalisant plus particulièrement sur la p120ctn. Cette caténine est recrutée tardivement au sein des jonctions adhérentes et assurerait leur renforcement en favorisant le rapprochement latéral des cadhérines (Yap et al, 1998). Afin d'identifier les mécanismes responsables de son recrutement au sein des jonctions adhérentes, nous avons voulu étudier la mise en place de radeaux lipidiques au cours de la différenciation des cellules HT-29. En effet, ces zones enrichies en lipides spécifiques permettent le regroupement de diverses protéines membranaires et sont associées à la mise en place des jonctions (Causeret et al, 2005). Nous proposons ainsi de situer l'apparition de lipides rafts et le recrutement de la p120ctn dans la cascade d'évènements menant à la différenciation entérocytaire précoce des cellules HT-29.

Enfin, partant du constat que la β -caténine est un acteur central de la régulation de l'homéostasie cellulaire au niveau de l'intestin, nous avons souhaité étudier le rôle de la p120ctn dans ce même mécanisme. En effet, la p120ctn est proche de la β -caténine à la fois dans sa structure mais également dans ses diverses localisations subcellulaires, et pourrait donc être impliquée dans la régulation de la différenciation ou la prolifération cellulaire. En

surexprimant la p120ctn couplée à la GFP dans les cellules HT-29, nous avons modifié la balance entre la E-cadhérine et la p120ctn et observons des modifications dans la croissance cellulaire. Cette dernière partie s'attache donc à élucider la fonction et les partenaires potentiels de la p120ctn dans la régulation de la prolifération.

MODELE CELLULAIRE

Les travaux présentés dans cette étude ont été réalisés à partir des cellules HT-29 issues d'un adénocarcinome de côlon humain (Fogh & Trempe, 1975). Ces cellules présentent la particularité de pouvoir se différencier en cellules entérocytaires ou absorbantes *in-vitro* suite à différents traitements :

- par modification de la source de carbone présente dans le milieu de culture (substitution du glucose par du galactose) (Pinto et al, 1982; Wice et al, 1985; Zweibaum et al, 1985).
- par l'utilisation de drogues anti-cancéreuses comme le 5-fluorouracile, le méthotrexate et la suramine (Lesuffleur et al, 1991; Rabenandrasana et al, 1990),
- par l'ajout de facteurs de croissances ou d'hormones comme l'Epidermal Growth Factor (EGF), l'insuline ou la triiodothyronine ou de régulateurs de voies de signalisation comme le butyrate de sodium (Siavoshian et al, 2000) et la forskoline (Cohen et al, 1999).

Dans le cas de notre étude, nous avons choisi d'induire la différenciation des cellules HT-29 en modifiant le métabolisme des glucides, induite par l'absence de glucose dans le milieu de culture qui est substitué par du galactose (Pinto et al, 1982) (Figure 28). En fonction des conditions de culture des cellules HT-29 nous disposons de :

- Cellules non différenciées : lignée parentale HT-29 cultivée en présence de glucose.
- Cellules en différenciation : lignée HT-29 cultivée en présence de galactose (HT-29 Gal).
- Cellules différenciées : cellules HT-29 adaptées pendant plusieurs semaines (50 jours) en absence de glucose (Huet et al, 1987).

L'état de différenciation des cellules HT-29 a été apprécié par des critères morphologiques et à l'aide de différents marqueurs enzymatiques et antigéniques. Au cours de leur différenciation, la croissance des cellules HT-29 est ralentie, elles se polarisent et forment des dômes cellulaires compacts. Des microvillosités apparaissent au niveau de leurs membranes apicales formant une bordure en brosse riches en marqueurs de différenciation comme la villine, une protéine structurale capable de lier l'actine et en diverses enzymes impliquées dans la digestion et le transport des aliments comme la sucrase isomaltase (Pinto et al, 1982), l'alcaline phosphatase (Chantret et al, 1988) ou la dipeptidyl peptidase IV. L'expression de ces enzymes est régulée par des facteurs de transcription spécifiques à l'intestin comme *cdx2*, dont l'expression et l'activité du gène sont augmentées en phase précoce de différenciation (Domon-Dell et al, 2002).

Grâce à ce modèle d'étude, nous avons pu aborder l'étude des modifications des propriétés d'adhérence qui surviennent au stade précoce de la différenciation épithéliale et

caractériser le rôle la p120ctn dans la prolifération et la mise en place de la différenciation cellulaire.

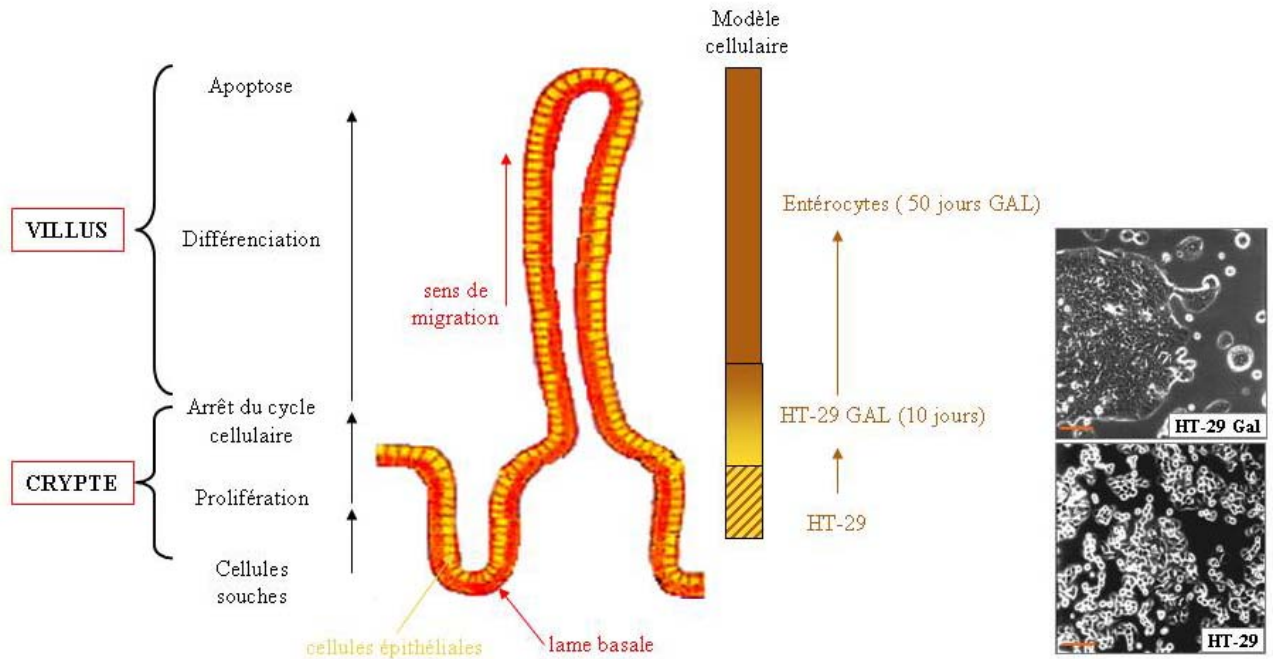


Figure 28: Comparaison du modèle cellulaire HT-29 avec la physiologie de l'épithélium intestinal.

Les cellules de carcinôme colique HT-29 sont utilisées comme modèle de différenciation entérocytaire. L'observation en microscopie à contraste de phase montre les différences morphologiques entre les cellules HT-29 indifférenciées et les cellules HT-29 cultivées 10 jours en milieu de différenciation (HT-29 GAL). Barre d'échelle = 100µm.

RESULTATS

Partie 1

**Mise en place des jonctions adhérentes lors de la
différenciation entérocytaire précoce des cellules HT-29**

I – Rôle de la signalisation induite par la laminine 5

I.1. Approche du sujet et problématique

Plusieurs études soulignent l'existence d'une régulation réciproque entre l'adhérence des cellules épithéliales à la matrice extracellulaire et la mise en place de leurs contacts intercellulaires (Chen & Gumbiner, 2006). Toutefois les effets de la matrice extracellulaire sur les jonctions adhérentes restent variables selon le type de matrice étudiée, les récepteurs impliqués et surtout le type cellulaire utilisé. Il est donc délicat de discerner le rôle de chaque composant et les voies de signalisations impliquées dans cette régulation.

Des travaux précédemment réalisés au laboratoire sur la lignée cellulaire HT-29 ont mis en évidence des modifications de propriétés d'adhérence (cellules-matrice extracellulaire et cellules-cellules) et de composition de la matrice extracellulaire lors de leur différenciation entérocytaire induite par culture dans un milieu où le glucose est remplacé par du galactose (milieu GAL). En effet, après 2 jours de culture en milieu GAL, les cellules HT-29 sécrètent et déposent de la laminine 5 (LN5) (Gout et al, 2001; Orian-Rousseau et al, 1998). Cette sécrétion s'accompagne de changements dans l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire, l'intégrine $\alpha3\beta1$ devenant le récepteur majoritaire du collagène IV au dépend de l'hétérodimère $\alpha2\beta1$. De façon intéressante, la préculture sur laminine 5 permet d'optimiser l'adhérence des cellules HT-29 au collagène IV via l'intégrine $\alpha3\beta1$, soulignant le fait que la laminine 5 puisse activer préférentiellement $\alpha3\beta1$. Ce changement de récepteur n'est pas dû à une modification du niveau d'expression ou de localisation des intégrines. Il est associé à une modulation de l'état d'activation de l'intégrine $\alpha3\beta1$ qui s'accompagne d'une diminution intracellulaire de RhoA-GTP et qui exerce un effet trans-dominant sur d'autres intégrines, en particulier, $\alpha2\beta1$ (Gout et al, 2001; Hodiola-Dilke et al, 1998). À des stades plus avancés de la différenciation, l'expression de l'intégrine $\alpha2\beta1$ s'éteint suite à sa perte de fonction. Ces observations sont en corrélation avec le patron d'expression des intégrines le long de l'axe crypte-villus; en effet, la distribution $\alpha2\beta1$ est restreinte à la crypte et complémentaire à celle d' $\alpha3\beta1$ localisée au pôle basolatéral des cellules du villus (Beaulieu, 1997).

Parallèlement à ces modifications de l'adhérence cellules-matrice extracellulaire, les cellules forment des dômes et se regroupent en amas denses. Ces modifications morphologiques résultent de la mise en place de jonctions adhérentes matures caractérisées par un complexe tripartite composé de la E-cadhérine associée à la β -caténine et à la p120^{ctn}, interagissant plus fortement avec le cytosquelette d'actine (Gout et al, 2004). Il est donc possible que la laminine 5 puisse jouer un rôle dans le renforcement des jonctions adhérentes lors de la différenciation des cellules HT-29.

En s'appuyant sur les faits que :

- 1) *In vivo*, l'expression de la laminine 5 est restreinte au villus, site de différenciation et de polarisation des cellules entérocytaires.
- 2) la différenciation des cellules HT-29 en absence de glucose est associée à une surproduction de laminine 5 jouant un rôle primordial dans l'établissement de complexes d'adhérence cellule-matrice extracellulaire,

nous avons voulu tester l'implication de cette matrice extracellulaire dans l'établissement des jonctions adhérentes et la différenciation entérocytaire.

I.2. Article 1: "Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells"

Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells

Nicolas T. Chartier^{1,*}, Michèle Lainé^{1,*}, Stéphanie Gout¹, Géraldine Pawlak¹, Christiane A. Marie¹, Paulo Matos², Marc R. Block¹ and Muriel R. Jacquier-Sarlin^{1,‡}

¹Laboratoire d'Etude de la Différenciation et de l'Adhérence Cellulaires, UMR UJF/CNRS 5538, Institut Albert Bonniot, Faculté de Médecine de Grenoble, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex, France

²Centro de genética Humana, Instituto Nacional de Saúde 'Dr Ricardo Jorge' Avenida Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal

*These authors contributed equally to this work

‡Author for correspondence (e-mail: jacquier-sarlin@ujf-grenoble.fr)

Accepted 16 September 2005

Journal of Cell Science 119, 31-46 Published by The Company of Biologists 2006

doi:10.1242/jcs.02698

Summary

Human intestinal cell differentiation is mediated by signaling pathways that remain largely undefined. We and others have shown that cell migration and differentiation along the crypt-villus axis is associated with temporal and spatial modulations of the repertoire, as well as with the function of integrins and E-cadherins and their substrates. Cross-talk between integrin and cadherin signaling was previously described and seems to coordinate this differentiation process. Here, we report that engagement of α_6 and, to a lesser extent, α_3 integrin subunits after HT-29 cell adhesion on laminin 5 increases the expression of E-cadherin, which then organizes into nascent adherens junctions. We further identify that phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) activation plays a key role in this cross-talk. Indeed, integrin-dependent adhesion on laminin 5 stimulates PI 3-kinase activity. Immunofluorescence and

immunoprecipitation experiments revealed that activated PI 3-kinase is recruited at cell-cell contacts. Using LY294002, an inhibitor of PI 3-kinase activity, we found that this activation is essential for E-cadherin connection with the cytoskeleton and for biogenesis of adherens junctions. Finally, we demonstrated that PI 3-kinase could signal through Rac1b activation to control adherens junction assembly. Our results provide a mechanistic insight into integrin-cadherin cross-talk and identify a novel role for PI 3-kinase in the establishment of adherens junctions.

Key words: Adhesion-mediated signaling, Adherens junctions, Integrins, Extracellular matrix, E-cadherin, Rac 1, Phosphoinositide 3-kinase

Introduction

Epithelial cells are characterized by particular features that include polarized morphology and specialized cell-cell contacts. They are separated from the connective tissue by the basement membrane, which is a network of extracellular matrix (ECM) polymers consisting of several laminin isoforms, type IV collagen and proteoglycans (Aumailley and Krieg, 1996; Beaulieu, 1997; Simon-Assmann et al., 1995; Timpl, 1996). Interactions between cells and the basement membrane modulate cell polarity, migration, proliferation, differentiation and cell survival (Folkman and Moscona, 1978; Gumbiner, 1996). These interactions are mainly mediated by integrins, which are a family of $\alpha\beta$ heterodimeric cell-surface receptors that cluster to form adhesive cell-ECM contacts called focal adhesions (Folkman and Moscona, 1978; Garratt and Humphries, 1995; Hynes, 1992). By contrast, homophilic Ca^{2+} -dependent cell-cell interactions are mediated by cadherins at the plasma membrane that assemble into cell junction sites called adherens junctions (Geiger and Ayalon, 1992; Takeichi, 1990). Both focal adhesions and adherens junctions organize similarly. They are connected to the actin cytoskeleton through a submembrane plaque, which consists of anchor and signaling proteins (Critchley, 2000; Kemler,

1993). The formation of these adhesion complexes has been described to involve several interdependent temporal steps: starting with the establishment of initial contacts (cell-ECM or cell-cell contacts), followed by their maturation into larger complexes mediating strong adhesion (Gumbiner, 1996; Miyamoto et al., 1995).

It is now well accepted that these adhesion complexes are also preferential sites for signal transduction. One such signaling pathway involves the Rho family of monomeric GTP-binding proteins, which cycle between an active GTP-bound state and an inactive GDP-bound state (Barry et al., 1997; Clark et al., 1998; del Pozo et al., 2000; Price et al., 1998; Ren et al., 1999). Upon integrin-mediated adhesion, Rho-family members, which include Cdc42, Rac1 and RhoA, regulate the actin cytoskeleton and promote the formation of filopodia, lamellipodia and stress fibers, respectively (Allen et al., 1998; Hotchin and Hall, 1995; Hotchin and Hall, 1996; Nobes and Hall, 1995; Nobes and Hall, 1999; Ridley et al., 1992). However, it has become clear that the functions of these three proteins extend far beyond the remodeling of the actin network and include the regulation of motility, polarity, microtubule dynamics, cellular trafficking and cell adhesion (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Lately, it has been

described that cadherin engagement can also activate Rac in Madine-Darby Canine Kidney (MDCK) and Chinese Hamster Ovary (CHO) cells transfected with various cadherin isoforms (Nakagawa et al., 2001; Noren et al., 2001). Two reports have indicated that phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) was required for full Rac activation in this latter pathway. Signaling by PI 3-kinase is activated by a variety of extracellular stimuli, including growth factors and hemopoietic cytokines (Athie et al., 2000; Wymann and Pirola, 1998). Betson et al. demonstrated that epidermal growth factor (EGF) receptor signaling participates in the stimulation of Rac activity in keratinocytes upon junction formation (Betson et al., 2002). The cross-talk between cadherins and growth factor receptors might be analogous to the cross-talk between integrins and growth factor receptors that regulates cell survival and proliferation (Giancotti and Ruoslahti, 1999) and might provide a link between integrin and cadherin signaling.

Signaling cross-talk between cadherins and integrins has been extensively investigated during some pathological processes including tumor progression (reviewed by Christofori, 2003). A correlation has been well established between breakage of intercellular junctions and loss of E-cadherin at the cell surface on the one hand and enhanced cell motility, invasiveness *in vitro* (Behrens et al., 1993; Vermeulen et al., 1995) or tumor progression *in vivo* (Perl et al., 1998; Toyoyama et al., 1999) on the other hand. Conversely, little is known about the mechanisms involved in the regulation of cadherin-mediated cellular interactions during embryonic development or cell differentiation (reviewed by Gumbiner, 1996). However, it has been described that, in migrating neural crest cells, β_1 and β_3 integrins are at the origin of a cascade of signaling events that ultimately control the surface distribution and activity of N-cadherin (Monier-Gavelle and Duband, 1997). Finally, in Caco-2 cells, integrins mediate functional cell polarization through complexes of E-cadherin and actin (Schreider et al., 2002); the signaling events that lead to this cross-talk have yet to be unraveled.

Since cell migration and differentiation along the crypt-villus axis are associated with dynamic modulations of the repertoire and function of adhesion receptors as well as their substrates (Beaulieu, 1997), intestinal epithelial cells provide a powerful paradigm for exploring integrin-cadherin cross-talk during renewal of the adult small intestine. In previous reports, we demonstrated that early enterocytic differentiation of the human adenocarcinoma cell line HT-29 is characterized by changes in the cell-adhesive properties and by laminin 5 secretion (Gout et al., 2004; Gout et al., 2001). Laminins represent the most abundant glycoproteins of the basement membrane and display the highest variability in their spatial and temporal expression either during intestinal development or in the adult (Simon-Assmann et al., 1994; Simon-Assmann et al., 1998; Teller and Beaulieu, 2001). Beside their fundamental role in organizing the basement membrane network, laminins promote several cellular processes such as adhesion, growth, polarization, differentiation and gene expression (Baker et al., 1996; Colognato and Yurchenco, 2000; De Arcangelis et al., 1996; Lampe et al., 1998; Vachon and Beaulieu, 1995). The distinct biological activities of laminins depend on both the isoform type and the repertoire of laminin receptors expressed.

The observation that laminin 5 is expressed both *in vivo* and

in vitro during intestinal cell differentiation suggests that this matrix protein could participate in the differentiation process. Accordingly, in this study, we addressed the potential contribution of laminin 5-integrin interactions in the initiation of HT-29 cell differentiation and the resulting signaling events involved in this process. Here, we report that engagement of α_6 and, to a lesser extent, α_3 integrin subunits after HT-29 cell adhesion on laminin 5 increases the expression of E-cadherin, which organizes into nascent adherens junctions. Moreover, we showed that laminin 5 binding to integrins mediated a PI 3-kinase-dependent activation of Rac1b that is involved in the assembly of adherens junctions, an initial step in enterocyte differentiation.

Results

Laminin 5 induces E-cadherin-mediated intercellular adhesion of HT-29 cells

It has previously been reported that human colon carcinoma cells synthesize laminin 5 (Gout et al., 2004; Oriant-Rousseau et al., 1998). Indeed, we have previously shown that HT-29 cells cultured for ten days in the differentiating medium produced a fivefold higher amount of laminin 5 than cells cultured in standard medium (Gout et al., 2001). Therefore, we hypothesized that laminin 5 could mimic the effect of the differentiating medium, and initiate HT-29 cell differentiation. Morphological changes associated with modification of intercellular junctions rapidly occur during HT-29 cell differentiation (Gout et al., 2004). Observed under phase contrast, HT-29 cells grow as homogenous cell layers with well-defined intercellular junctions. By contrast, HT-29 cells cultured in the differentiating medium for 10 days (HT-29 Gal) adopt a multicellular spheroid configuration leaving large cell-free spaces (Fig. 1A) owing to an increase in cell-cell adhesiveness. HT-29 cells cultured for 24 hours on laminin 5 in standard medium (HT-29 LN5) already adopt a compact organization similar to those observed for the differentiating cells, suggesting that laminin 5 might actually participate in this process. Therefore, using an *in vitro* cell aggregation assay, we compared the ability of HT-29 cells and of HT-29 cells cultured for 48 hours on laminin 5 to establish cell-cell contacts (Fig. 1B). We found that, in the presence of Ca^{2+} , HT-29 cells spread on culture plastic aggregated poorly compared with HT-29 cells cultured on laminin 5 (Fig. 1B, upper panel). Laminin 5-induced aggregation of HT-29 cells was inhibited by depletion of extracellular cation (EDTA) as well as by E-cadherin-blocking antibodies (HECD1; Fig. 1B, lower panel). These observations indicated that culture of HT-29 cells on laminin 5 favored intercellular adhesion mediated by E-cadherin as observed during enterocyte differentiation.

Upregulation of E-cadherin expression upon laminin 5-integrin interactions

To address further the role of laminin 5 in the regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion, we studied the expression of E-cadherin in HT-29 cells grown on this matrix protein. We observed that the total amount of E-cadherin protein gradually increased to reach a plateau after 24 hours of culture on laminin 5 (Fig. 2A). Thereby, we subsequently used this time of culture in the following experiments. Using purified laminin 5, we showed that the effect of laminin 5 on

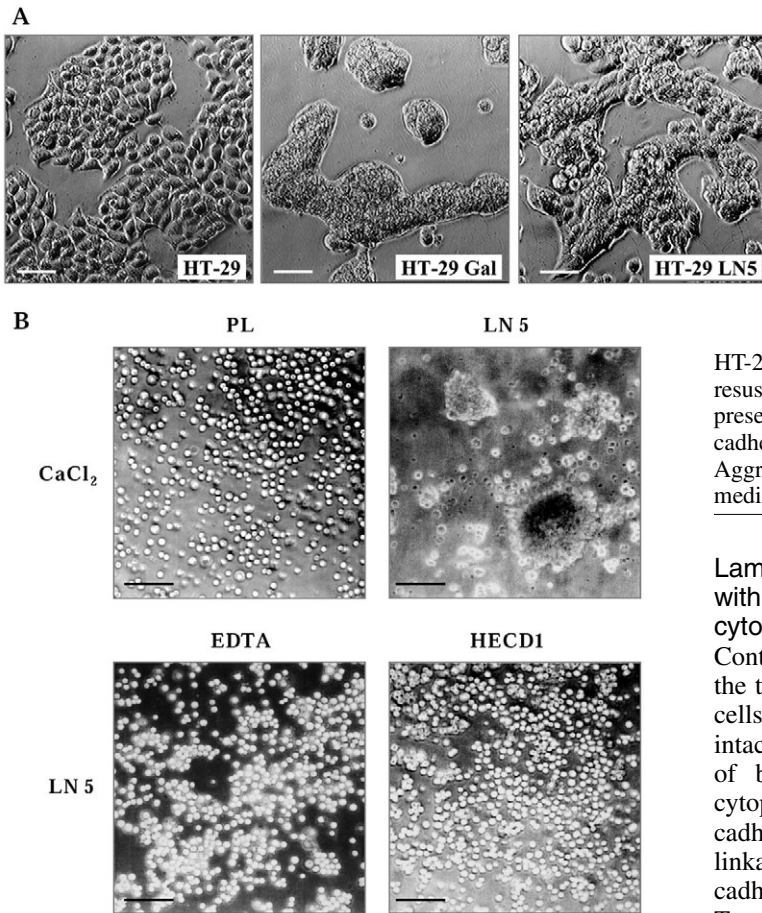


Fig. 1. Laminin 5 induces E-cadherin-mediated intercellular adhesion in HT-29 cells. (A) Morphological changes: phase-contrast images of HT-29 cells grown in standard medium (HT-29), in differentiating medium for 10 days (HT-29 Gal), or on laminin 5 matrix in standard medium for 24 hours (HT-29 LN 5). Bars, 100 μ m.

(B) Cell aggregation assays. Upper panel: HT-29 cells grown on plastic (PL) or laminin 5 matrix (LN 5) for 48 hours were resuspended in PBS containing 10 mM HEPES + 2 mM CaCl_2 . Suspensions were incubated for 60 minutes at 37°C in a gyratory shaker at 75 rpm. Cell aggregation was observed under phase contrast with a Zeiss Axiovert 135 inverted microscope. Lower panel:

HT-29 cells grown for 48 hours on laminin 5 matrix were resuspended in PBS containing 10 mM HEPES + 2 mM CaCl_2 in the presence of 4 mM EDTA or 10 μ g/ml blocking anti-human E-cadherin (HECd1) antibody and then assayed for cell aggregation. Aggregation of HT-29 cells cultured on laminin 5 matrix was mediated by E-cadherin. Bars, 100 μ m.

Laminin 5-mediated cell-cell interaction is correlated with the association of E-cadherin with the actin cytoskeleton together with β -catenin but not p120^{ctn}

Contrary to what was observed for E-cadherin, we found that the total amount of β - and p120 catenins expressed in HT-29 cells did not vary during the culture on laminin 5 (Fig. 3). In intact cells, stable adherens junctions require the recruitment of both β -catenin and p120^{ctn} on distinct sites of the cytoplasmic domain of E-cadherin, and a linkage of the cadherin-catenin complexes to the actin cytoskeleton. This linkage can be assayed by the decreased solubility of the cadherin-catenin complex in Triton X-100 (Hinck et al., 1994). To examine the presence of actin-associated E-cadherin in HT-29 cells grown on laminin 5, we looked at the distribution of E-cadherin, β - and p120 catenins into Triton-insoluble (TI) and Triton-soluble (TS) fractions. As shown in Fig. 4A, E-cadherin was more abundant in the TS fraction in HT-29 cells. Scanning of autoradiograms showed that the proportion of E-cadherin in the TI fraction was only about 10% (HT-29). After 24 hours of culture on laminin 5 (HT-29 LN5), E-cadherin levels increased in the cytoskeleton-associated fraction and reached 33%. Similar results were obtained with β -catenin. Quantitative analysis performed on five independent experiments indicated a 3.2- and 3-fold increase in E-cadherin and β -catenin association with the actin cytoskeleton (TI fraction), respectively. These results were fairly consistent with the well-known 1:1 stoichiometric association of these proteins in adherens junctions. By contrast, the fraction of p120^{ctn} associated with the actin cytoskeleton did not vary with the conditions of culture (Fig. 4A). The subcellular distribution of E-cadherin was further characterized by confocal analysis. Confocal Z axis imaging showed that E-cadherin was not concentrated into apicolateral cell junctions in control HT-29 cells, conversely to what was observed in HT-29 cells cultured on laminin 5 (Fig. 4B, upper panel). With those cells, the junctions were also enriched in F-actin that was fairly colocalized with E-cadherin (Fig. 4B, medium and lower panels), as revealed by the merge yellow signal. These experiments indicate that the gain in cell adhesion observed in HT-29 cells cultured on laminin 5 is accompanied by the engagement of E-cadherin and its redistribution together with actin at the cell-cell contacts.

E-cadherin expression is dose dependent, reaching a maximum around 5 μ g/ml and then gradually declining (Fig. 2B).

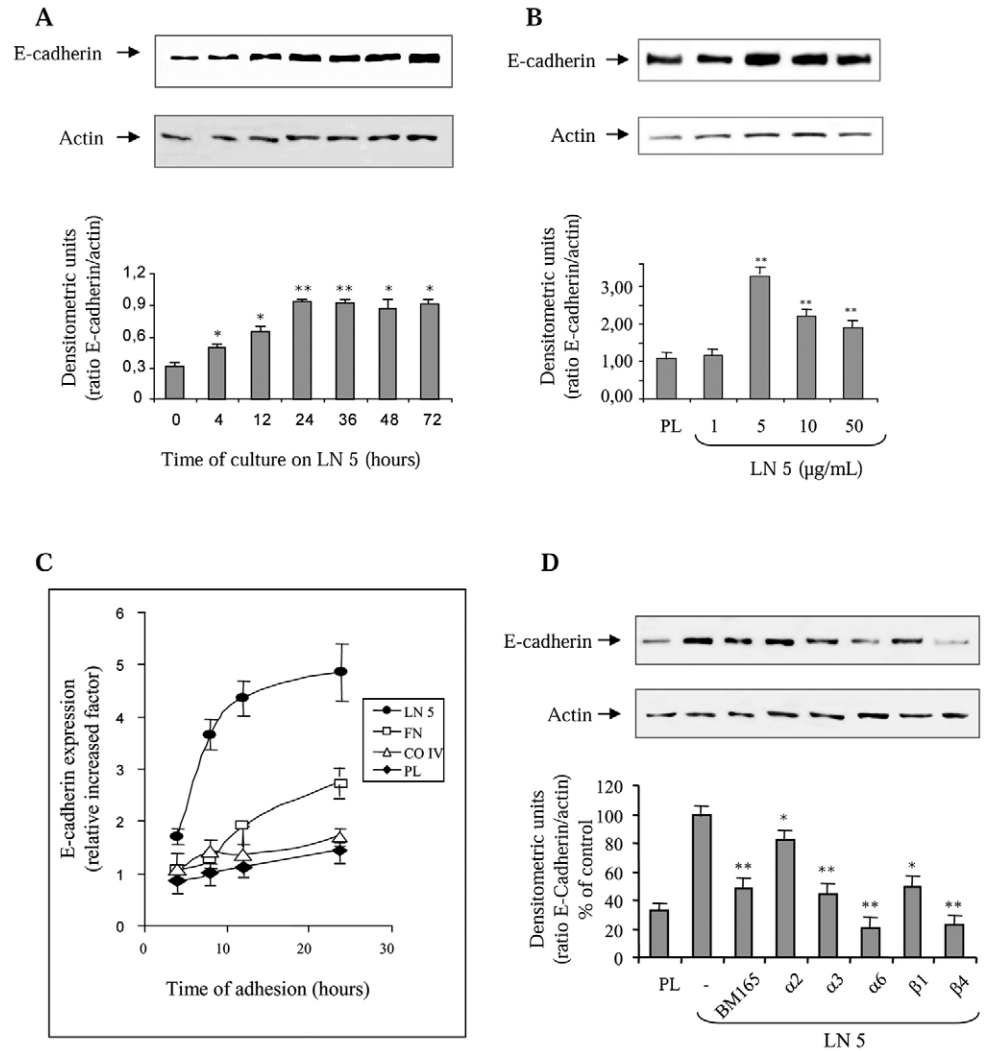
To determine whether upregulation of E-cadherin was specifically induced by laminin 5, we grew HT-29 cells for 24 hours on different ECM proteins, and the amount of E-cadherin in the cell lysates was estimated. Fig. 2C shows that laminin 5 was able to induce a significant and rapid increase in E-cadherin expression over a period of 24 hours. Culture on fibronectin allowed a limited and slower increase in E-cadherin levels whereas the kinetics of E-cadherin expression induced by other ECM proteins was similar to the one observed on plastic.

Adhesion of epithelial cells to laminin 5 mainly involves $\alpha_3\beta_1$ and $\alpha_6\beta_4$ integrins. To establish further the involvement of laminin 5 in the control of E-cadherin upregulation, we carried out similar experiments in the presence of functional blocking antibodies directed against laminin 5 (α_3 chain) or the α_2 , α_3 , α_6 , β_1 and β_4 integrin subunits (Fig. 2D). The laminin 5-mediated increase in E-cadherin expression was completely inhibited by antibodies blocking α_6 and β_4 integrins. Whereas antibodies blocking α_3 and β_1 integrins inhibited the E-cadherin upregulation by 56% and 44%, respectively, no significant effect of the α_2 -subunit-blocking antibody was observed. The laminin 5 α_3 -subunit-blocking antibody also inhibited the expression of E-cadherin by 55%. Altogether, these results demonstrate that the interaction of laminin 5 with the integrin receptors $\alpha_6\beta_4$ and, to a lesser extent, $\alpha_3\beta_1$ increases the expression of E-cadherin.

Fig. 2. Laminin 5 increases the expression of E-cadherin in HT-29 cells. (A) Upper panel: western blot analysis of the total amount of E-cadherin during the time course of HT-29 cell culture onto laminin 5 matrix. Expression of actin was used as a loading control. Lower panel: the band densitometry was normalized with actin to allow quantification. Data indicate a significant increase in E-cadherin expression during the first 24 hours of culture. Data represent mean \pm s.e.m. of three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01, as determined by Student's *t*-test.

(B) Upper panel: western blot analysis of the total amount of E-cadherin after 24 hours of culture onto various concentrations of purified laminin 5. Expression of actin was used as a loading control. Lower panel: the band densitometry was normalized with actin to allow quantification. Data indicate a dose-dependent induction of E-cadherin expression. Data represent mean \pm s.e.m. of three independent experiments. ** P <0.01, as determined by Student's *t*-test. (C) ECM proteins differentially increase expression of E-cadherin. HT-29 cells were grown for various times (0–24 hours) on plastic (PL) or different ECM proteins used at 10 μ g/ml (FN, fibronectin; CO IV, collagen type IV; LN 5, laminin 5). Cell lysates were assayed for E-cadherin expression, using actin as an internal control. The density ratio

of E-cadherin:actin is expressed as a relative factor of the value obtained from HT-29 cells in suspension (mean \pm s.e.m. of three independent experiments). (D) Increase in E-cadherin expression is mediated by laminin 5-integrin interactions. Western blot analysis of the total amount of E-cadherin in HT-29 cells cultured for 24 hours on plastic (PL) or 5 μ g/ml purified laminin 5 (LN5) in the presence of mAbs directed against integrin subunits at a concentration of 10 μ g/ml: P4C10 (anti- β_1), ASC8 (anti- β_4), BHA2.1 (anti- α_2), P1B5 (anti- α_3) and GoH3 (anti- α_6) or laminin 5 (α_3 chain), with a 1/10 diluted BM165 mAb (from cell culture supernatant). Expression of actin was used as a control. Band densitometry was normalized with actin to allow quantification and the % of control (i.e. laminin 5-induced E-cadherin expression without mAbs) was reported on the histogram. Data represent mean \pm s.e.m. of three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01, as determined by Student's *t*-test. Laminin 5-mediated increase in E-cadherin expression was dependent on $\alpha_6\beta_4$ and $\alpha_3\beta_1$ integrins.



Integrin-dependent cell adhesion to laminin 5 activates PI 3-kinase

Recent data suggest a potential role for PI 3-kinase in the regulation of actin cytoskeleton dynamics and E-cadherin- β -catenin complexes (reviewed by Goodwin et al., 2003). Additionally, this kinase has been described as an intermediate of some integrin-mediated signaling pathways (Braga et al., 1997; Khwaja et al., 1997). Consequently, PI 3-kinase could be a mediator of the integrin-cadherin cross-talk. To test this hypothesis in intestinal epithelial cells, we used a lipid kinase assay to estimate PI 3-kinase activation directly by different ECM components (Fig. 5). Briefly, endogenous PI 3-kinase was immunoprecipitated with an anti-p85 regulatory subunit antibody and its activity was visualized by the synthesis of

phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate [PtdIns(3,4,5) P_3] (Vanhaesebroeck et al., 2001). When the cells were cultured for 24 hours on laminin 5, the pulled-down proteins showed a significant increase in PI 3-kinase enzymatic activity compared with cells cultured on collagen type IV, fibronectin or plastic (Fig. 5A). The PI 3-kinase activity was inhibited by the presence of 20 μ M LY294002 during the enzymatic assay (data not shown). To demonstrate further that spreading of HT-29 cells on laminin 5 induced the activation of PI 3-kinase, we tested the effect of the anti-laminin 5 α_3 subunit blocking mAb (BM165) on PI 3-kinase activation. The laminin 5-dependent increase in PtdIns(3,4,5) P_3 synthesis was completely abolished when cells were cultured on laminin 5 in the presence of BM165 (Fig. 5A).

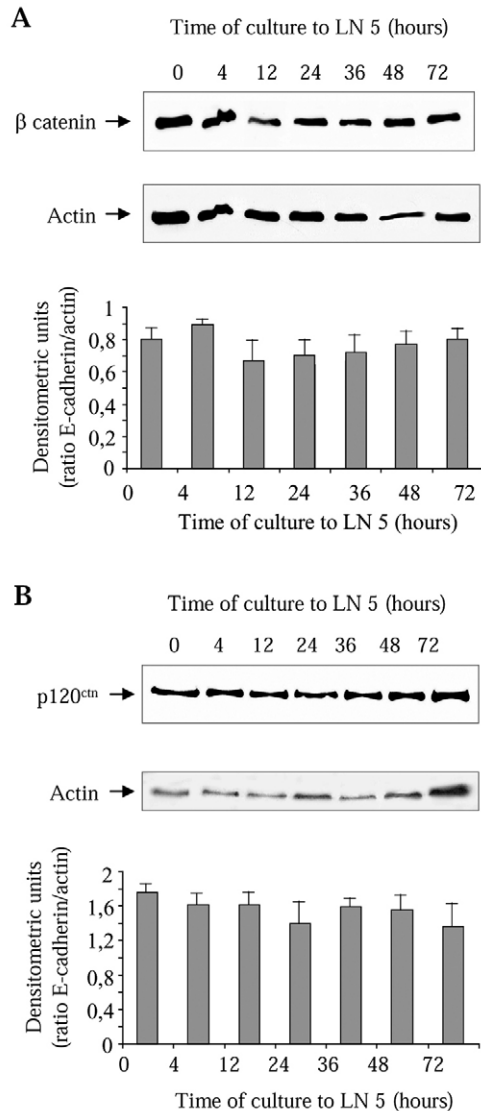


Fig. 3. Laminin 5 does not modulate expression of β -catenin and p120^{ctn} in HT-29 cells. Western blot analysis of the total amount of β -catenin (A) and p120^{ctn} (B) during the time course of HT-29 cell culture onto laminin 5 matrix. Expression of actin was used as a loading control. Lower panel: the band densitometry was normalized with actin to allow quantification. Data indicate no significant variation in β -catenin or p120^{ctn} expression. Data represent mean \pm s.e.m. of three independent experiments. *P* values determined by Student's *t*-test were not significant.

Time-course experiments performed on HT-29 cells cultured on laminin 5 indicated that the PI 3-kinase activity gradually increased to reach a maximum at 24 hours of adhesion. For longer incubation times, this enzymatic activity fell rapidly (Fig. 5B). Similar assays were performed on collagen IV and fibronectin. Whatever the time of adhesion tested on these ECM proteins, there was no variation in the PtdIns(3,4,5)*P*₃ production (data not shown). Altogether, these data suggested that laminin 5 specifically induces the activation of PI 3-kinase in HT-29 cells.

Both integrin and cadherin engagements have been

described to signal through PI 3-kinase. Furthermore, culture on laminin 5 results in both integrin and cadherin engagement. To determine the respective contribution of integrin and E-cadherin receptors in the induction of PI 3-kinase activity, PI 3-kinase assays were performed after 24 hours of cell adhesion onto laminin 5 in the presence of blocking antibodies raised against specific integrin subunits or E-cadherin (Fig. 5C). Blocking E-cadherin ligation by either antibody or Ca²⁺ chelation with EGTA did not abolish laminin 5-dependent activation of PI 3-kinase activity in our biological system. Conversely, the mAbs blocking α_6 and β_1 inhibited the laminin 5-induced PI 3-kinase activity by approximately 96% and 73%, respectively. By contrast, the α_3 mAb had no significant effect. These observations suggested a major involvement of integrin receptors in laminin 5-dependent PI 3-kinase activation. Moreover, activation of PI 3-kinase is probably mediated by the binding of laminin 5 to $\alpha_6\beta_4$ integrin since it has been reported previously that α_6 associates preferentially with β_4 compared with β_1 when both subunits are expressed in the same cell (Lee et al., 1992; Lotz et al., 1990). Therefore, the inhibition of PI 3-kinase activity by the anti- β_1 mAb is probably associated with a global inhibition of cell adhesion under these conditions, although we cannot exclude the participation of $\alpha_6\beta_1$ integrin. We also observed a decrease in PI 3-kinase activity when cells were maintained in suspension (data not shown). Taken together, these data indicate that, in HT-29 cells, laminin 5 binding to α_6 -containing integrin results in the activation of PI 3-kinase.

PI 3-kinase controls E-cadherin-dependent cell-cell adhesion

The combined observations that laminin 5 upregulates E-cadherin expression, favors its linkage to the cytoskeleton and activates PI 3-kinase activity suggested that PI 3-kinase signaling upon integrin ligation might affect E-cadherin availability and recruitment at cell-cell contacts. Consistent with this idea, we found that the inhibition of PI 3-kinase by LY294002 (50 μ M) had no effect on E-cadherin expression in HT-29 cells cultured on plastic (not shown) but abolished laminin 5-induced upregulation of E-cadherin expression (Fig. 6A). The effect of LY294002 was almost maximal at 50 μ M (and did not significantly increase at higher concentrations such as 100 μ M), a dose previously described to provide a 100% blockade of PI 3-kinase in all cells. The role played by PI 3-kinase signaling in laminin 5-dependent E-cadherin upregulation was confirmed by expression of a dominant-negative construct of the p85 subunit, lacking the inter-SH2 domain (Δ p85; Fig. 6B, upper panel). Whereas cells expressing the vector alone show an increase in E-cadherin expression when cultured on laminin 5, cells expressing the dominant-negative p85 (Δ p85) present similar levels of E-cadherin on plastic and on laminin 5 (Fig. 6B, lower panel). Western blots performed on TS and TI fractions of HT-29 cells cultured 24 hours on plastic or laminin 5 indicated that inhibition of PI 3-kinase resulted in a significant reduction in the proportion of E-cadherin linked to the cytoskeleton (Fig. 6C, upper panel). The association between E-cadherin and the actin cytoskeleton was also assessed by immunofluorescence in cells expressing the vector alone or Δ p85 (Fig. 6C, lower panel). In HT-29 cells infected by an empty vector, E-cadherin and F-actin strongly colocalized at cell-cell contacts after 24

hours of culture on laminin 5; by contrast, in HT-29 cells expressing $\Delta p85$, cell interactions were weaker and E-cadherin/actin colocalisation was decreased. Taken together, these results indicate that PI 3-kinase participates in the regulation of E-cadherin expression and favors its association with the cytoskeleton.

Laminin 5 promotes direct interaction between PI 3-kinase and E-cadherin

Agonist activation of PI 3-kinase frequently involves the translocation of this enzyme to the plasma membrane where it can gain access to its lipid substrates (reviewed by Wymann and Pirola, 1998). Thus, it was tempting to speculate that a similar mechanism might underlie PI 3-kinase activation upon adhesion to laminin 5. Analysis of PI 3-kinase distribution after HT-29 cell fractionation indicated that the p85 regulatory subunit of PI 3-kinase was distributed in both the cytosol and at the membrane in cells cultured on plastic. Culture on laminin 5 induced a significant redistribution of PI 3-kinase at the cell membrane (Fig. 7, upper panel). The membrane shift in PI 3-kinase localization was further confirmed by confocal immunofluorescence performed on HT-29 cells labeled with antibodies raised against E-cadherin (green) and the p85 regulatory subunit of PI 3-kinase (red). In subconfluent HT-29 cells cultured on plastic, E-cadherin was detected at the sites of cell-cell contacts, whereas p85 staining was mostly cytoplasmic (Fig. 7, middle panel) without any colocalization with E-cadherin. When the cells were cultured on laminin 5, p85 was still partially localized in the cytoplasm, but was also clearly located at the sites of cell-cell contacts with a significant colocalization with E-cadherin. This pattern was only observed in confluent cells in which E-cadherins are engaged. The colocalization of E-cadherin and PI 3-kinase suggested a possible interaction between these proteins. This association was assayed after 24 hours of culture on plastic or on laminin 5, by co-immunoprecipitation performed with whole-cell lysates of HT-29 cells (Fig. 7, lower panel). E-cadherin-p85 association in HT-29 cells was enhanced when cells were cultured on laminin 5. These findings suggest that the $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ signal is being generated in a spatially confined region of the E-cadherin contact zones, namely in the nascent adherens junctions before the association of the cadherin-catenin complexes with the cytoskeleton.

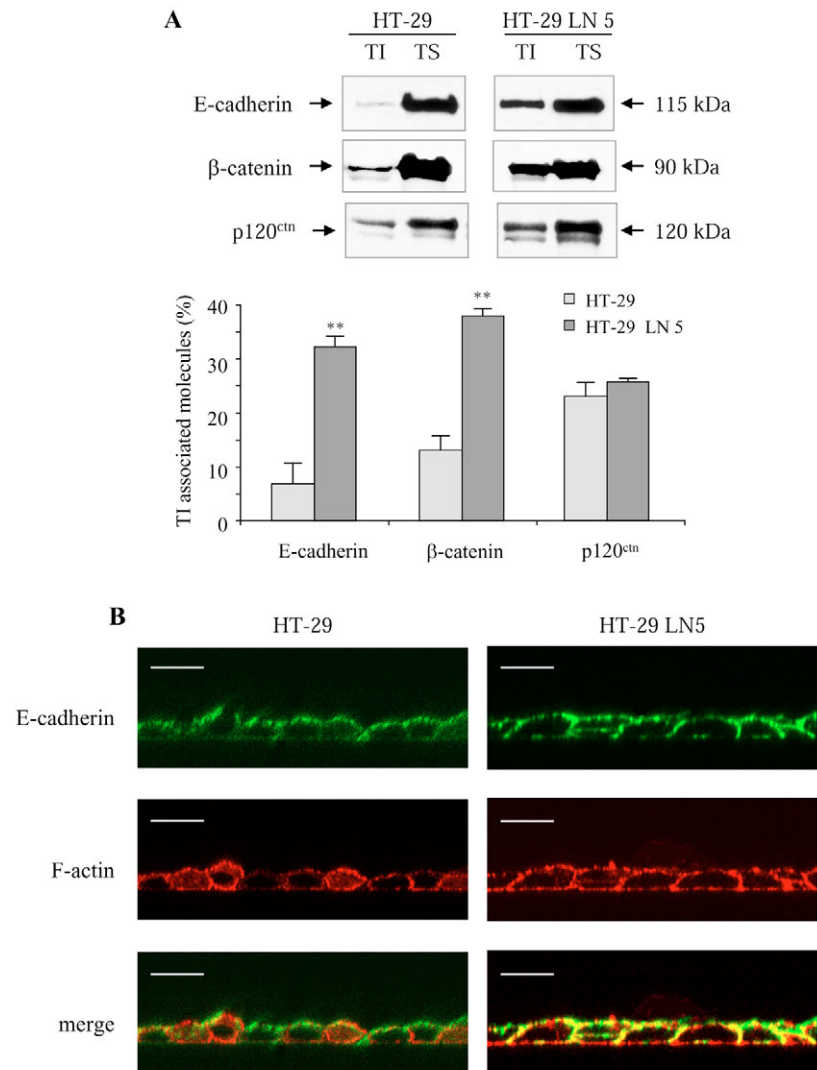


Fig. 4. Culture of HT-29 cells on laminin 5 triggers E-cadherin accumulation at cell-cell contacts and colocalization with actin. (A) Western blot analysis of E-cadherin, p120^{ctn} and β -catenin distribution in Triton-soluble fractions (TS) and Triton-insoluble fractions (TI) obtained from lysates of HT-29 cells cultured in standard medium (HT-29) or on laminin 5 matrix for 24 hours (HT-29 LN 5). Histograms showing the percentage of molecules associated with the TI fraction were determined by densitometry of the blots visualized by chemiluminescence (Amersham ECL reagents) using the Image Master VDS-CL (Amersham-Pharmacia Biotech) imaging device. The data were compiled from five independent experiments; error bars represent mean \pm s.e.m. The proportion of E-cadherin and β -catenin associated with the cytoskeleton is increased in HT-29 cells cultured on laminin 5 matrix. (B) Reconstituted images along the Z axis from a series of optical sections. HT-29 cells grown in standard medium (left panels, HT-29) or on laminin 5 matrix for 24 hours (right panels, HT-29 LN 5) were immunostained with anti-E-cadherin (green) and TRITC-conjugated phalloidin (red), and analyzed by confocal microscopy as described under the Materials and Methods. In HT-29 LN 5 cells, E-cadherin was localized to the apicolateral membrane in association with the actin cytoskeleton. Bars, 16 μ m.

PI 3-kinase signaling controls the biogenesis of adherens junctions

Using the specific PI 3-kinase inhibitor LY294002 (50 μ M), we further assayed the role of PI 3-kinase in the biogenesis of adherens junctions in HT-29 cells. We performed E-cadherin and F-actin staining in a two-step experiment in which adherens junctions of HT-29 cells cultured for 24 hours on laminin 5 were disrupted by chelating extracellular Ca^{2+} with EGTA and were subsequently allowed to re-assemble upon restoration of extracellular Ca^{2+} (Pece et al., 1999), in the absence or presence of LY294002 (Fig. 8). In control cells, E-cadherin colocalized with F-actin (panel A). After EGTA treatment for 30 minutes, cells adopted a more rounded shape

with some spaces between cells; E-cadherin staining formed a diffuse ring at the cell periphery and cortical actin was mostly depolymerized and, therefore, poorly stained with TRITC-conjugated phalloidin (panel B). Following an incubation period of 60 minutes with Ca^{2+} , E-cadherin redistributed at the sites of cell-cell contacts and was colocalized with F-actin while the cells reacquired their epithelial shape (panel C), suggesting that adherens junctions were being reformed. In LY294002- and EGTA-treated cells, we noticed a drastic effect on E-cadherin staining that was weaker and remained partially diffuse in the cytoplasm (panel D compared with panel B). Cortical actin was partly depolymerized and Ca^{2+} restoration neither stimulated actin polymerization nor favored cell epithelial shape: E-cadherin staining was still weaker and diffuse (panel E compared with panel C). By contrast, the addition of the PI 3-kinase inhibitor on pre-existing cell-cell contacts (i.e. not disrupted by EGTA), neither affected E-cadherin nor F-actin expression and localization (data not shown). We concluded that PI 3-kinase activity was probably required for the biogenesis of E-cadherin-mediated cell-cell contacts rather than for the maintenance of pre-existing adherens junctions.

PI 3-kinase acts upstream of Rac1 in the laminin 5-integrin signaling pathway

Recent studies support the view that E-cadherin engagement coincides with an increase in Rac1 activity that depends on PI 3-kinase (Nakagawa et al., 2001; Pece et al., 1999). To test whether this pathway could be generalized to HT-29 cells, we first determined the impact of PI 3-kinase activity on Rac1 activation (Rac-GTP) by pull-down assays. A GST fusion protein containing the CRIB domain of PAK was used to isolate active GTP-bound Rac in lysates from cells cultured on laminin 5 or plastic, respectively (Fig. 9). Using anti-Rac1 antibodies, we observed a slight but reproducible increase in the GTP-bound Rac1 fraction during the first 24 hours of culture on laminin 5 before reaching a plateau. Conversely, after 72 hours of culture on plastic, we were not able to detect any significant increase in the amount of activated Rac1 (Fig. 9A, upper panel). The anti-Rac1 mAb recognizes both Rac1 and Rac1b, a spliced variant that was predominantly identified in skin and epithelial tissues from the intestinal tract (Jordan et al., 1999). Hence, we performed the experiment with an antibody directed against the specific 19 amino acid stretch of Rac1b. We observed an important rise in Rac1b-GTP after 24 hours of culture on

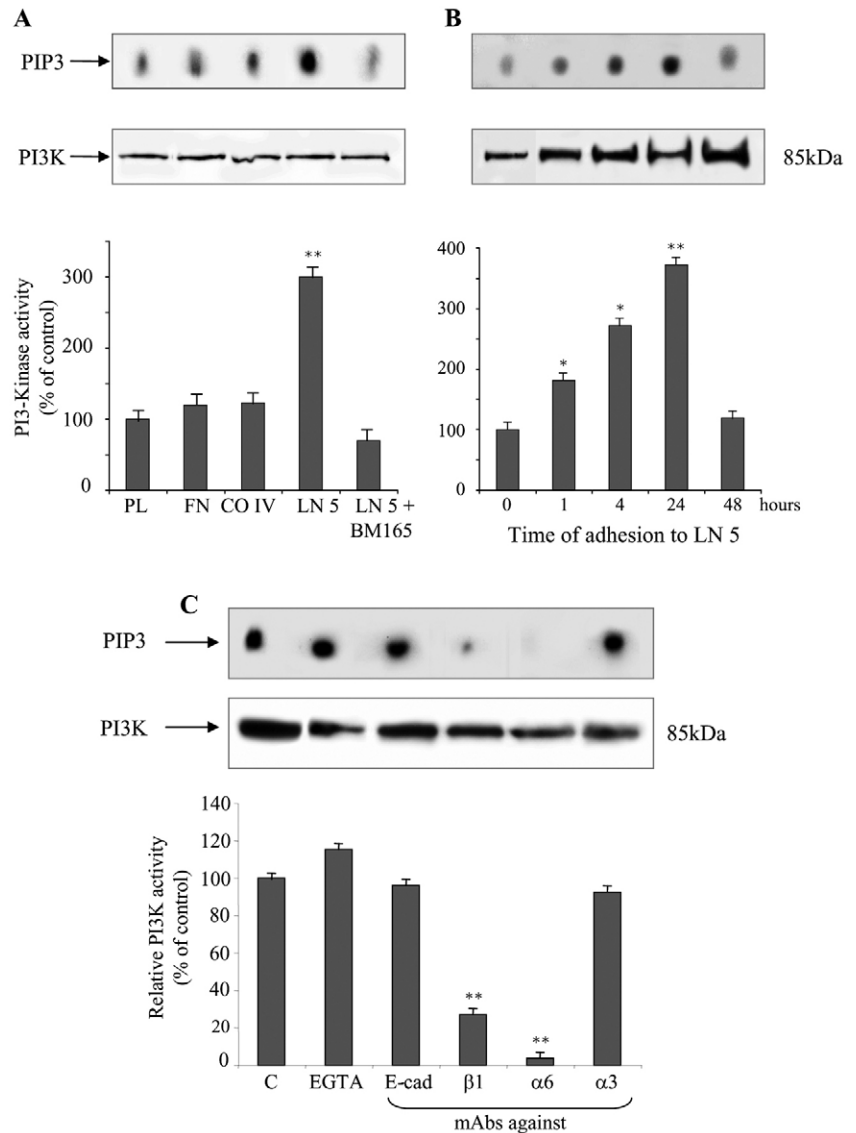
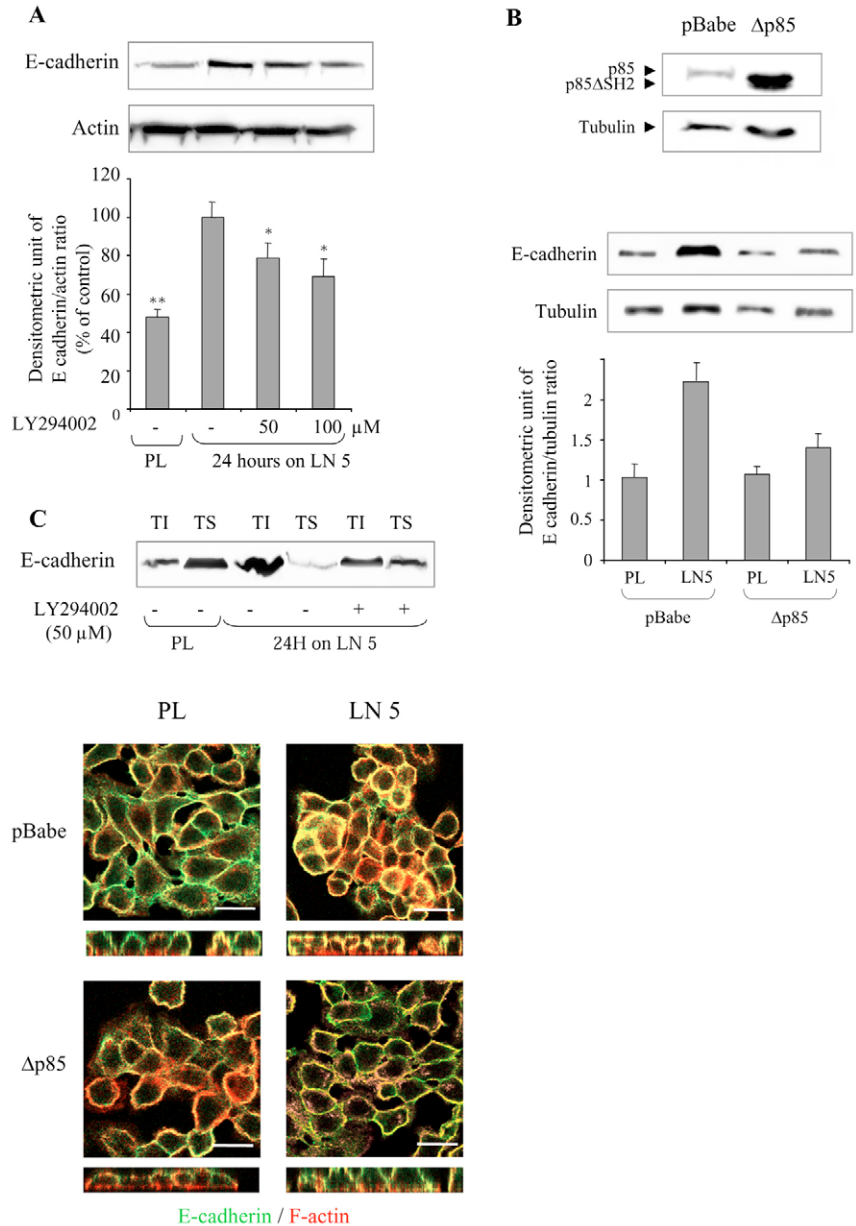


Fig. 5. Laminin 5-induced activation of PI 3-kinase in HT-29 cells. (A) Effect of different ECM proteins on PI 3-kinase activity. HT-29 cells were allowed to adhere for 24 hours to dishes uncoated (PL) or coated with purified laminin 5 (LN 5), collagen IV (CO IV), or fibronectin (FN) at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. To test the specificity of the interaction with laminin 5, HT-29 cells were preincubated with the anti- $\alpha 3$ chain of laminin 5 BM165 at a concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and then allowed to adhere to laminin 5. (B) Time course of PI 3-kinase activation by laminin 5 matrix. HT-29 cells were allowed to adhere for 1, 4, 24 or 48 hours to dishes coated with laminin 5 matrix. In (A) and (B), total cell lysates were prepared and equivalent amounts of proteins were used in immunoprecipitation and kinase assays. Western blots performed on immunoprecipitated p85 subunit were carried out as controls. Phosphorylated lipids were resolved by thin layer chromatography. The amount of radiolabeled $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ (PIP3) was determined for each condition by densitometry with ImageQuant software. Data represent the average of percentage of control activity (mean \pm s.e.m. of three to four independent experiments) and one representative chromatogram is shown. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, as determined by Student's *t*-test. (C) HT-29 cells were incubated with 2 mM EGTA or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of integrin or E-cadherin-specific antibodies and allowed to adhere to plates coated with laminin 5 matrix for 24 hours. mAbs specific for $\alpha 3$ (P1B5), $\alpha 6$ (GoH3) or $\beta 1$ (P4C10) integrin subunits and E-cadherin (HECD1) were used at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Total cell lysates were prepared and equivalent amounts of proteins were subjected to immunoprecipitation and kinase assays as described previously. ** $P < 0.01$, as determined by Student's *t*-test.

Fig. 6. PI 3-kinase inhibition interferes with E-cadherin expression and its association with the cytoskeleton. (A) HT-29 cells grown for 24 hours on laminin 5 matrix (LN 5) were treated with increasing concentrations of LY294002 as indicated and then lysed. Whole-cell lysates were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting for E-cadherin. Expression of actin was used for normalization. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, as determined by Student's *t*-test. (B) Upper panel: whole lysates of HT-29 cells expressing the vector alone (pBabe) or $\Delta p85$ were subjected to immunoblotting for p85. Expression of tubulin was used as a loading control. Lower panel: HT-29 cells expressing the vector alone (pBabe) or $\Delta p85$ grown on plastic or laminin 5 matrix for 24 hours were lysed, then analyzed for E-cadherin expression by western blotting. The band densitometry was normalized with tubulin to allow quantification. The results are representative of three independent experiments. (C) Upper panel: HT-29 cells grown for 24 hours on plastic (PL) or laminin 5 matrix (LN 5) treated with (+) or without (-) 50 μM LY294002 were lysed and then the Triton-soluble (TS) fraction and the Triton-insoluble (TI) fraction (i.e. cytoskeleton-associated proteins) were separated by SDS-PAGE and immunoblotted for E-cadherin. The results are representative of at least three independent experiments. Lower panel: HT-29 cells expressing vector alone (pBabe) or $\Delta p85$ were grown on plastic or laminin 5 matrix for 24 hours. E-cadherin and F-actin were detected by immunofluorescence using HECD1 antibody and TRITC-conjugated phalloidin, respectively. Optical sections were performed using a confocal microscope. Bars, 50 μm .



laminin 5 followed by a plateau, similarly to what was observed with the anti-Rac1 antibody (Fig. 9A, upper middle panel). This indicated that laminin 5 predominantly activates the Rac1b isoform in HT-29 cells. Western blots performed in parallel showed no differences in the total Rac content in the cell lysates; however, Rac1 expression in HT-29 cells was higher than Rac1b (Fig. 9A, lower middle panel). Finally, to evaluate whether PI 3-kinase controls Rac1b activation upon laminin 5-cell adhesion, we carried out Rac1b-GTP pull-down assays under conditions of PI 3-kinase inhibition (Fig. 9B). Treatment with LY294002 at concentrations that efficiently inhibited E-cadherin expression and biogenesis of adherens junctions also inhibited laminin 5-mediated increase in Rac1b-GTP. This indicated that PI 3-kinase acts upstream of Rac1b in the laminin 5-integrin signaling pathway.

It is noteworthy that the extra 19 amino acid long domain of Rac1b appears to confer selectivity towards downstream Rac

signaling targets. In particular, it was found that Rac1b could neither stimulate the formation of lamellipodia nor the activation of the protein kinase JNK (Matos et al., 2003). Consequently, we looked at the distribution of Rac1b in HT-29 cells. We found that Rac1b was mainly distributed as distinct spots at the cell surface and that adhesion to laminin 5 concentrated these structures at cell-cell contacts (Fig. 9C).

Using the specific PI 3-kinase inhibitor LY294002 (50 μM), we further assayed the role of PI 3-kinase-mediated activation of Rac1b in the biogenesis of adherens junctions in HT-29 cells (Fig. 10). In control cells, we found that Rac1 was mainly distributed as distinct spots at cell-cell contacts (panel A). After an incubation of 30 minutes in EGTA, the cells rounded and Rac1 was no longer distributed at cell-cell junctions and some punctuated staining was observed in the cytosol (panel B). Following a period of 60 minutes in Ca^{2+} to restore E-cadherin activity, Rac1 redistributed at the sites of cell-cell contacts

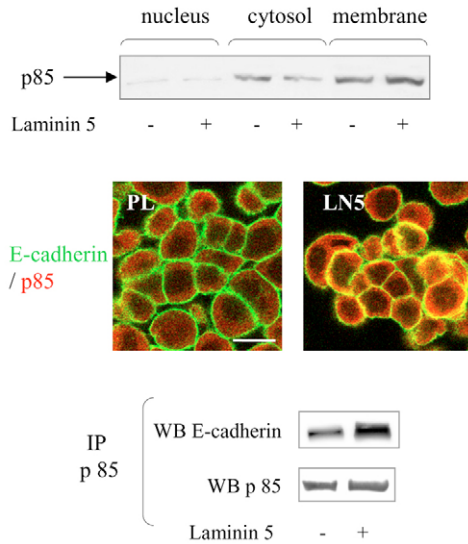


Fig. 7. PI 3-kinase associates with E-cadherin complexes upon cell adhesion on laminin 5. Upper panel: western blot analysis of the distribution of the p85 regulatory subunit of PI 3-kinase. HT-29 cells grown for 24 hours on plastic (PL) or laminin 5 matrix (LN 5) were fractionated as described under the Materials and Methods, to separate nuclear-, cytosolic- and membrane-enriched fractions, then analyzed by western blot using an anti-p85 antibody. The blot shown is representative of four independent experiments. Middle panel: HT-29 cells grown for 24 hours on plastic (PL) or laminin 5 matrix (LN 5) were immunostained with anti-E-cadherin (green) and anti-p85 (red) antibodies and analyzed by confocal microscopy on optical sections. Bar, 30 μ m. Lower panel: the p85 subunit of PI 3-kinase was immunoprecipitated (IP) from 500 μ g of proteins from whole-cell lysates of HT-29 cells cultured for 24 hours on plastic or laminin 5 matrix. Proteins of the immunoprecipitates were solubilized into Laemmli's buffer and resolved by SDS-PAGE before western blotting (WB) to determine the amount of PI 3-kinase and E-cadherin in the immunoprecipitates. The blot shown is representative of three independent experiments.

where adherens junctions were being reformed (panel C). However, in LY294002- and EGTA-treated cells, Ca^{2+} could not restore the original distribution of Rac1. The staining was weaker and remained diffuse all over the cell, similar to what was observed in the absence of Ca^{2+} (panel E).

These findings demonstrate that cell adhesion on laminin 5 is sufficient to activate Rac1b signaling through PI 3-kinase stimulation. Rac1b accumulates at the cell-cell contacts where it may participate in the laminin 5-mediated biogenesis of adherens junctions in HT-29 cells.

Discussion

Laminin 5 and upregulation of E-cadherin

Laminin 5 has been described to promote gap junction assembly and intercellular communication in three different cultured cell populations through $\alpha_3\beta_1$ engagement (Lampe et al., 1998). In many cell types, the assembly of gap junctions, tight junctions or desmosomes depends on cell-cell adhesions mediated by cadherins (Cerejido et al., 2000; Fujimoto et al., 1997; Jongen et al., 1991; Musil and Goodenough, 1990). Therefore, it is conceivable that interactions of integrin with laminin 5 could trigger the assembly of adherens junctions.

Culture of HT-29 cells on laminin 5 leads to a threefold increase in the total amount of E-cadherin and thereby favors E-cadherin-mediated cell aggregation. Indeed, it has been demonstrated that a twofold increase in the neural cell adhesion molecule N-CAM (which is also involved in homophilic binding), resulted in a >30-fold increase in the rate of aggregation (Hoffman and Edelman, 1983). The mechanism responsible for E-cadherin upregulation is under investigation. However, our data indicate that it partly depends on PI 3-kinase activation. We showed that activated PI 3-kinase is recruited to the plasma membrane at sites of cadherin-mediated cell adhesion. At this stage, PI 3-kinase is associated with E-cadherin, possibly indirectly through β -catenin (Goodwin et al., 2003; Woodfield et al., 2001). This interaction might stabilize β -catenin binding to E-cadherin, which is usually disrupted by presenilin. Presenilin plays a role in the E-cadherin degradation process and binds the E-cadherin cytoplasmic domain (Baki et al., 2001).

Using antibodies that block integrin subunits, we found that laminin 5 upregulation of E-cadherin expression was predominantly mediated by $\alpha_6\beta_4$ and to a lesser extent by $\alpha_3\beta_1$, the two major receptors for laminin 5. The lower participation of $\alpha_3\beta_1$ to the process might be explained by the fact that, in HT-29 cells, activation of $\alpha_3\beta_1$ is not constitutive but is activated by the secreted laminin 5 (Gout et al., 2001). Furthermore, in keratinocytes, $\alpha_6\beta_4$ activation antagonized $\alpha_3\beta_1$ integrin-mediated adhesion and relocated this integrin from sites of basal clustering where it displayed increased conformational activation to cell-cell contacts (Russell et al., 2003). This process might also occur in HT-29 cells. The more effective contribution of $\alpha_6\beta_4$ to the regulation of E-cadherin expression and function when HT-29 cells adhere onto laminin 5 is in agreement with the work of Hintermann and colleagues: in their system, the integrin $\alpha_6\beta_4$ can stimulate cell-cell aggregation, increase colony size in plated HaCaT keratinocytes, and upregulate E-cadherin localization at cell-cell contacts (Hintermann et al., 2005). This effect was mediated by an increase in erbB-2 and PI 3-kinase activity, which in turn inhibits $\alpha_3\beta_1$ -controlled keratinocyte hypotaxis on laminin 5 (Hintermann et al., 2001). Thus, binding to laminin 5 through $\alpha_3\beta_1$ in focal contacts or $\alpha_6\beta_4$ in hemidesmosomes transmits distinct molecular signals, which support cell migration and static adhesion respectively (Goldfinger et al., 1999; Nguyen et al., 2000b). By favoring both adherens junction-controlled cell-cell adhesion and hemidesmosome-mediated stable cell-ECM interactions, the integrin $\alpha_6\beta_4$ appeared to be a key integrin in the control of epithelial cell motility. This property might be required to maintain cellular polarity and cohesion during epithelial cell migration along the crypt-villus axis. In this context, disruption of the *Lama3* gene, which encodes the α_3 subunit of laminin 5 in mice, reveals abnormalities in survival and late-stage differentiation of epithelial cells (Ryan et al., 1999). It has been suggested that the resulting hemidesmosome alterations (consecutive to the discontinuity in protein localization of $\alpha_6\beta_4$ and BP230) affect the stability of cell-cell junctions. The phenotype obtained in these mice was similar to a lethal variant of the human disease epidermolysis bullosa, JEB-G, whose clinical features include mechanical fragility of the skin, oral erosions, gastrointestinal and genitourinary tract involvement, hypoplastic hemidesmosomes and high morbidity (Fine et al.,

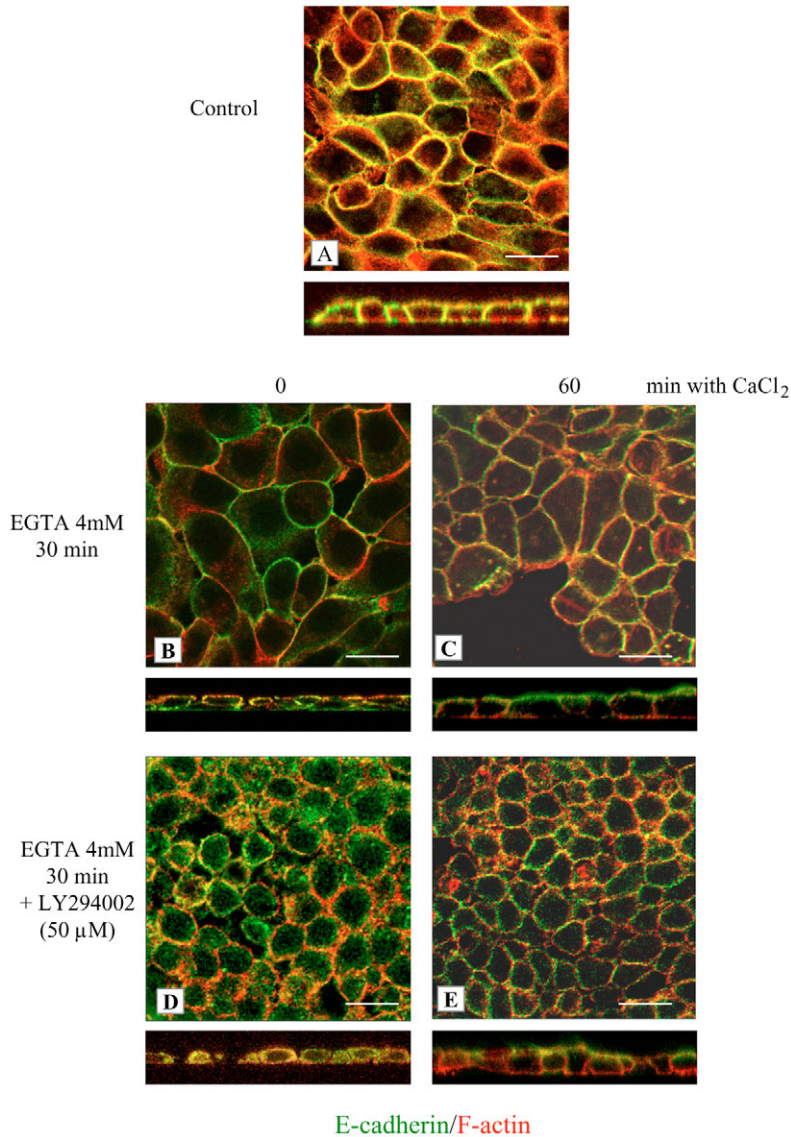


Fig. 8. PI 3-kinase signaling is necessary for adherens junction biogenesis. HT-29 cells were cultured for 24 hours on laminin 5 matrix and subsequently treated with 4 mM EGTA for 30 minutes in the absence or presence of 50 μ M LY294002. The EGTA-containing medium was then replaced with Ca^{2+} -containing medium for 60 minutes. Cells were fixed and stained with anti-E-cadherin (green) and TRITC-conjugated phalloidin (red) before confocal microscopy analysis on optical sections. Bars, 25 μ m.

1991). JEB-G can be caused by additive mutations in genes encoding laminin chains (*LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*) or collagen XVII, thus suggesting that combined alterations of different isoforms of matrix proteins might suppress compensation of each other for the cell organization and function, thus leading to this pathology (Castiglia et al., 2001; Floeth and Bruckner-Tuderman, 1999). However, no direct reports on defects in cadherin-mediated adherens junctions in mice or humans with null defects in laminin 5 have been published, probably because other ECM proteins and receptor signaling pathways might control in vivo expression and localization of E-cadherin at adherens junctions. By contrast, the half-life of junctional proteins in cultured epithelial cells is

about 5 hours (Shore and Nelson, 1991). The assembly of newly synthesized proteins into the junction must balance this rapid turnover. By efficiently regulating the expression of E-cadherin, laminin 5 might favor assembly of cell-cell adhesion complexes.

Laminin 5 and adherens junction assembly

Initial cell-cell contacts are formed by the engagement of two opposing E-cadherin- β -catenin complexes at the tips of filipodia and/or lamellipodia projections. Then anchoring of cadherin-catenin complexes to the cortical actin cytoskeleton promotes clustering and stabilization of the junction proteins to form adjacent puncta organized as a zipper-like structure, which later 'zips' to seal the membranes into mature epithelial-sheet adherens junctions (Vaezi et al., 2002; Vasioukhin et al., 2000). The cytosolic protein p120^{ctn} interacts with the membrane-proximal domain of classical cadherins and has been suggested to participate in the zipper stage by regulating cadherin clustering (Yap et al., 1998).

Using biochemical analysis and confocal microscopy, we have shown that, after 24 hours of culture on laminin 5, E-cadherin colocalizes with actin at the apicolateral side of the cells where adherens junctions take place. This observation suggests that laminin 5 is not only involved in the control of E-cadherin expression, but also mediates signaling that controls post-translational events. Indeed, involvement of ECM proteins in the reinforcement of E-cadherin-actin complexes has been described in Caco-2 cells (Schreider et al., 2002). In HT-29 cells, our results suggest that laminin 5 favors the formation of stable punctum corresponding to the immature E-cadherin- β -catenin complexes anchored to the actin cytoskeleton but not mature junctions. The parallel increase in both β -catenin and E-cadherin associated with the actin cytoskeleton is consistent with the well-known stoichiometric interaction between these proteins and correlates with the fact that β -catenin to E-cadherin association is required for the transport of the newly synthesized E-cadherin to the plasma membrane (Chen et al., 1999). By contrast, association of p120^{ctn} with the cytoskeleton did not vary with the conditions of culture, suggesting that this catenin is not recruited to adherens junctions at this stage. This hypothesis is further confirmed by co-immunoprecipitation experiments showing that only 8% of total p120^{ctn} is complexed to E-cadherin (even upon adhesion to laminin 5), and correlates with the inability of these junctions to seal the membranes into epithelial sheets, thus leading to biotin diffusion (data not shown).

How does PI 3-kinase control assembly of adherens junctions?

PI 3-kinases are known to play a central role in several cellular processes, including mitogenic signaling, cell survival, cytoskeletal remodeling, as well as metabolic control and

vesicular trafficking (reviewed by Wymann and Pirola, 1998). Adhesion to laminin 5 through $\alpha_3\beta_1$ activates PI 3-kinase and regulates cell spreading and migration (Choma et al., 2004; Enserink et al., 2004). This effect could be modulated by $\alpha_6\beta_4$ adhesion (Nguyen et al., 2000a; Russell et al., 2003). Our data clearly indicate that laminin 5- and $\alpha_6\beta_4$ -mediated activation of PI 3-kinase is further required for adherens junction biogenesis in HT-29 cells. This fits with previous studies indicating that the α_6 integrin subunit associated with β_4 rather than β_1 when these subunits are expressed in the same cell (Lee et al., 1992; Lotz et al., 1990) and that the PI 3-kinase pathway is better activated by $\alpha_6\beta_4$ than $\alpha_6\beta_1$ or other β_1 integrins (Shaw et al., 1997). Our findings that PI 3-kinase activity regulates the recruitment of F-actin at cell-cell contacts and the connection of E-cadherin with the cytoskeleton are consistent with other data (Laprise et al., 2002; Somasiri et al., 2000). However, this process is usually attributed to cadherin ligation (Kovacs et al., 2002; Laprise et al., 2002; Nakagawa et al., 2001). Recent studies suggest that cadherin ligation alone is not sufficient and that additional cooperating signals from

tyrosine kinase receptors are required (Betson et al., 2002; Pang et al., 2005).

Small Rho-GTPases have distinct functions during assembly of adherens junctions

Integrin-mediated adhesion to laminin 5 induces signaling pathways that regulate the activities of Rho GTPases, which in turn control actin dynamics. Depending on the type of integrins and ECM proteins, various G proteins can be activated (reviewed by Etienne-Manneville and Hall, 2002). For example, laminins 10 and 11 are more active than fibronectin in promoting cell migration by regulating $\alpha_3\beta_1$ -dependent Rac activation by the p130cas-crkII-DOCK180 pathway (Gu et al., 2001). By contrast, cells adhering to fibronectin develop stress fibers and focal contacts by regulating integrin-dependent Rho activation. On laminin 5, $\alpha_3\beta_1$ -dependent activation of Rac1 contributes to the formation of stable lamellipodia necessary for cell migration (Choma et al., 2004). In keratinocytes, deposit of laminin 5 induces a change in signaling from a Rho- to a PI 3-kinase-dependent pathway (Nguyen et al., 2000a).

This switch has already been described to participate in organization of adherens junctions (Kovacs et al., 2002; Pece et al., 1999). Here, we have shown that Rac1b activation is triggered by integrin ligation rather than by engagement of cadherins. Rac1b was discovered in human tumors as an alternative splice variant of Rac1 (Jordan et al., 1999). Since Rac1b is unable to interact with Rho-GDI, it is constitutively associated with membranes (Matos et al., 2003). This localization leaves the Rac1b variant in a favorable spatial position to become activated by exchange factors, such as Tiam1. We

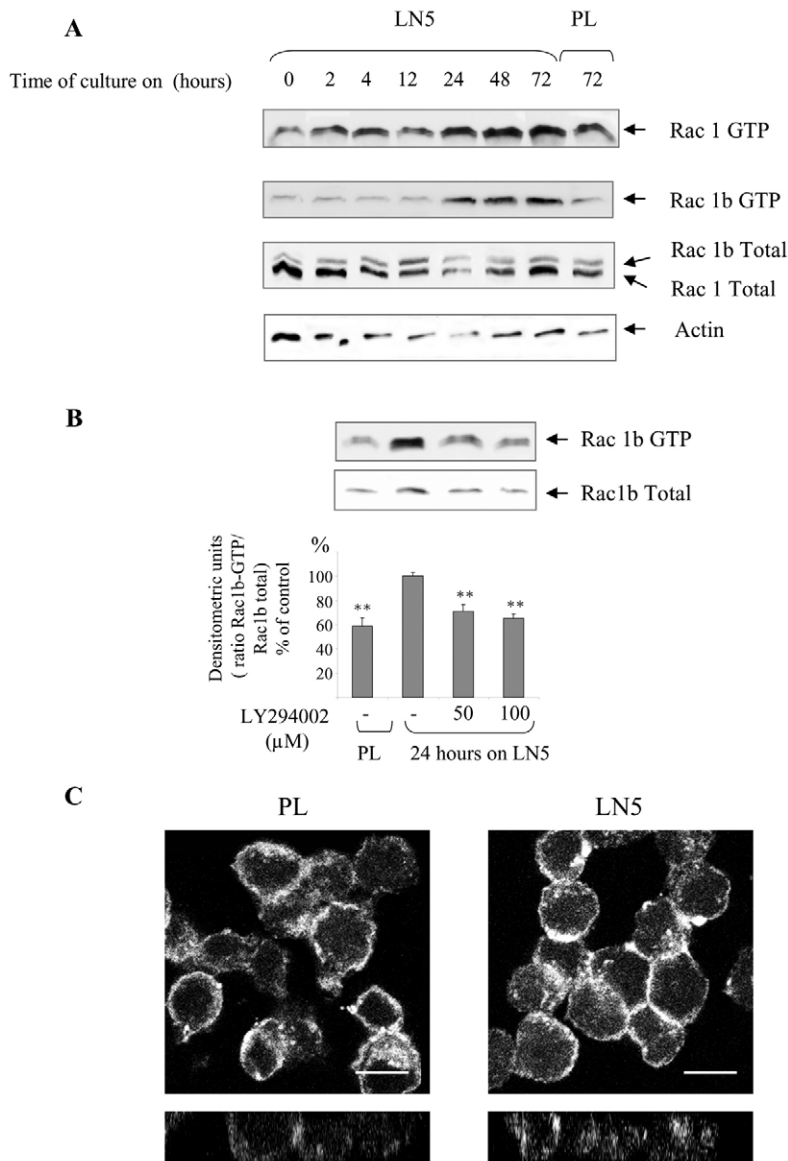


Fig. 9. Rac1b activation is dependent on PI 3-kinase. Time course of Rac1 and Rac1b activation by laminin 5 matrix. GST-PAK-CRIB specifically pulls down GTP-loaded Rac. Lysates were prepared from HT-29 cells cultured on laminin 5 matrix (LN5) for various time periods (0-72 hours) or for 72 hours on plastic (PL). The amount of Rac1-GTP (upper panel) and Rac1b-GTP (upper middle panel) were estimated by pulling down the GTP-loaded proteins with GST-PAK-CRIB, followed by a western blot analysis with antibodies specific for Rac1 and Rac1b. Samples of the whole-cell lysates were also fractionated to determine the total levels of Rac1 and Rac1b (lower middle panel). Expression of actin was used as a loading control (lower panel). (B) Analysis of Rac1b activation upon inhibition of PI 3-kinase by LY294002: HT-29 cells were grown for 24 hours on laminin 5 matrix in the presence of increasing concentrations of LY294002 (0-100 μ M). Then, the level of Rac1b-GTP was estimated as described above. Lower panel: the band densitometry was determined and the ratio of Rac1b-GTP to total Rac1b was used to allow quantification on the histogram. Results are representative of four experiments. ** $P < 0.01$, as determined by Student's *t*-test. (C) Subcellular distribution of Rac1b: HT-29 cells grown for 24 hours on plastic or laminin 5 matrix were fixed and stained with anti-Rac1b antibodies before confocal microscopy analysis on optical sections. Bars, 16 μ m.

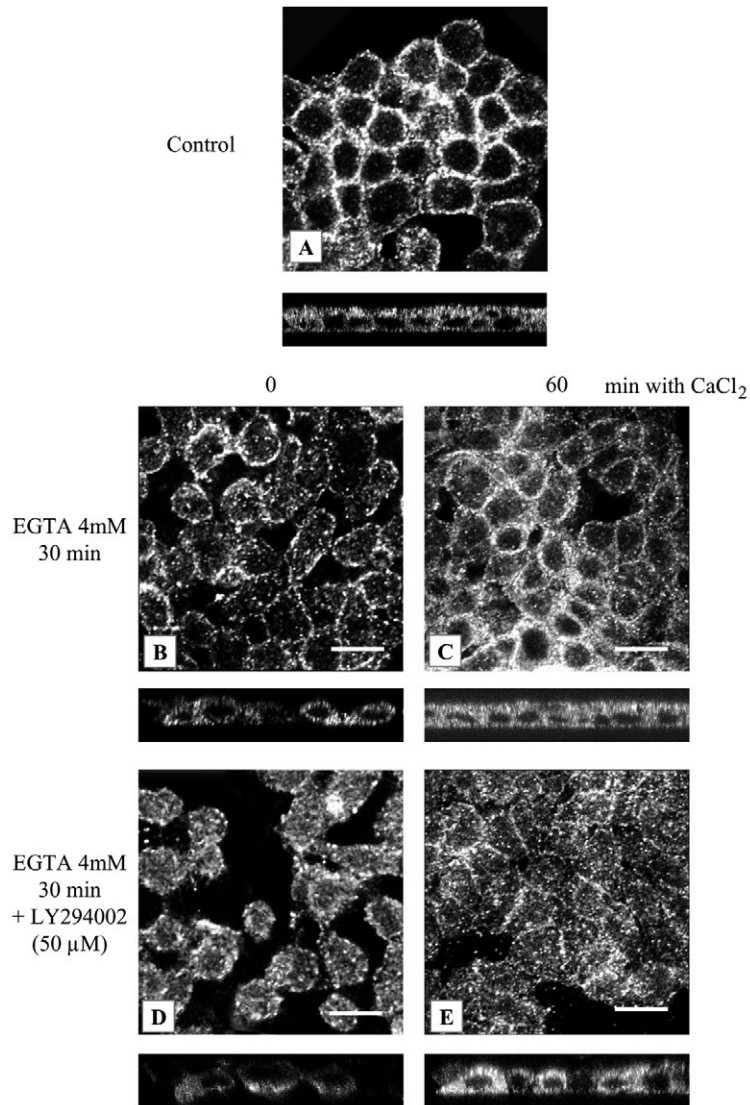


Fig. 10. Rac1 localization at nascent cell-cell contacts is dependent on PI 3-kinase signaling. HT-29 cells were cultured for 24 hours on laminin 5 matrix and then treated with 4 mM EGTA for 30 minutes in the absence or presence of 50 μ M LY294002. The EGTA-containing medium was then replaced by Ca^{2+} -containing medium for 60 minutes. Cells were fixed and stained for Rac1 before confocal microscopy analysis on optical sections. Bars, 25 μ m.

demonstrated that, upon adhesion to laminin 5, Rac1b is redistributed at cell-cell contacts where adherens junctions organize. Rac1b is not involved in lamellipodia formation but is activated in the presence of low stimuli, which fail to activate Rac1 (Matos et al., 2003). In this way, our data suggest that, whereas a more persistent activation of Rac1 by PI 3-kinase can be involved in lamellipodia formation, a transient activity of this kinase upon integrin engagement might specifically control adherens junction assembly through the activation of Rac1b.

Role of PI 3-kinase in intestinal cell differentiation

Data presented by Laprise et al. (Laprise et al., 2002) suggest that PI 3-kinase plays a crucial role in the control of differentiation since the inhibition of PI 3-kinase in Caco-2/15

cells represses sucrase-isomaltase and villin protein expression, both of which are markers of enterocytic differentiation. However, in HT-29 cells, laminin 5, which activates PI 3-kinase, is unable to induce full cell differentiation (data not shown). This discrepancy might be explained by the fact that contrary to HT-29 cells, Caco-2 cells at confluence produce laminin 1, which has been previously described to induce both enterocytic differentiation (Basson et al., 1996; De Arcangelis et al., 1996; Vachon and Beaulieu, 1995) and PI 3-kinase activation (Shaw et al., 1997). The HT-29 cell model indicates that, although necessary, PI 3-kinase signaling is not sufficient for full differentiation, which requires additional factors. The view that PI 3-kinase only initiates the early stages of cell differentiation is consistent with the transient activation of this lipid kinase by laminin 5. Wang et al. showed that PI 3-kinase inhibition through overexpression of the antagonist phosphatase PTEN or through wortmannin treatment resulted in enterocytic differentiation (Wang et al., 2001). Indeed, during differentiation of HT-29 cells induced by glucose starvation, we also observed a rapid decrease in PI 3-kinase activity yet these cells produced laminin 5 (data not shown). Therefore, a precise temporal regulation of PI 3-kinase seems to be required during the whole enterocytic differentiation process. Sustained activation of PI 3-kinase might contribute to pathogenicity (e.g. cancer) by favoring cell survival, a function also associated with PI 3-kinase through the serine/threonine kinase Akt [or protein kinase B (PKB) (Kulik et al., 1997; Marte and Downward, 1997; Murga et al., 1998)]. This finely regulated equilibrium in PI 3-kinase activation during epithelial cell differentiation might be assumed by the PTEN–MAGI-1b signalosome (Kotelevets et al., 2005). Indeed, targeting of PTEN to adherens junctions by MAGI-1b and the resulting local downregulation in the $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ pool play a crucial role in preventing both disruption of junctional complexes and induction of tumor cell invasion.

In conclusion, our results demonstrate that, whereas laminin 5 does not appear to play a major role in enterocyte differentiation, its interaction with integrins controls the biogenesis of adherens junctions. For the first time, we have shown that this process is specifically regulated by PI 3-kinase and involves the activation of Rac1b, a splice variant of the small GTPase Rac1. Thus, PI 3-kinase seems to be a major link in the integrin-cadherin cross-talk in HT-29 cells.

Materials and Methods

Cell culture

The human colon adenocarcinoma HT-29 cell line (kindly provided by J. Marvaldi, Université Aix-Marseille, Marseille, France) was routinely cultured at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 25 mM glucose (Invitrogen) and supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin and streptomycin (standard medium). The medium was changed every day to avoid glucose exhaustion, which leads to differentiation. The differentiation of HT-29 cells was initiated by replacing the standard medium for glucose-free DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% dialyzed fetal calf serum, 5 mM galactose, 15 mM HEPES, selenous acid (10^{-2} μ g/ml), penicillin and streptomycin. This medium (Gal-medium or differentiating medium) was changed every day. The cells were

harvested in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 1 mM EDTA and 0.05% trypsin (w/v).

ECM preparation and coating

Glass coverslips and tissue culture dishes were coated with laminin 5 using either one of the following methods, which generated equivalent results. (1) A431 epidermoid cells were cultured to confluence on various surfaces at 37°C to allow for the deposit of laminin 5, then cells were removed as previously described (Wayner et al., 1993; Weitzman et al., 1993). Briefly, confluent monolayers were sequentially extracted with 1% (v/v) Triton X-100 in PBS, followed by 2 M urea in 1 M NaCl. All extraction buffers contained protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 2 mM N-ethylmaleimide). Plates were washed in PBS, incubated with 1% bovine serum albumin (BSA), and stored at -20°C. (2) Laminin 5 purified from the culture medium of human SCC25 cells was kindly provided by P. Rousselle (Institut de Biologie et Chimie des Proteines, Lyon, France) (Kantengwa et al., 1997; Rousselle and Aumailley, 1994; Rousselle et al., 1991). Except otherwise stated, the first method was used preferentially to prepare large numbers of surfaces. Human collagen type IV from placenta was obtained from Life Technologies. Human plasma fibronectin was purified according to a previously described method (Engvall and Ruoslahti, 1977). Coating of plastic Petri dishes was performed by overnight incubation with ECM proteins (10 µg/cm²) at 4°C.

Antibodies and reagents

Antibody directed against the p85 regulatory subunit of PI 3-kinase was obtained from Upstate Biotechnology. Anti-human E-cadherin monoclonal antibody (mAb) HEC11 was purchased from Takara Biochemicals. Anti-Rac1 mAb was obtained from Upstate Biotechnology and anti-Rac1b antibody was produced as described previously (Matos et al., 2003). The function-blocking anti-integrin mAbs used were BHA2.1 against α₂ integrin, GoH3 against α₆ integrin, PIB5 against human α₃ integrin, P4C10 against β₁ integrin, and ASC8 against β₄ integrin (all from Chemicon). Other mAbs were anti-α₃ laminin chain BM165 (Rousselle and Aumailley, 1994; Rousselle et al., 1991) and goat anti-IgG2a (Immunotech). Polyclonal antibody against actin, mAb against β-tubulin and tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated phalloidin were purchased from Sigma-Aldrich. Alexa- or horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibodies were from Molecular Probes and Biorad, respectively. Phosphatase and protease inhibitor cocktails as well as the specific PI 3-kinase inhibitor LY294002 were purchased from Calbiochem. Phosphatidylinositol and phosphatidylserine were purchased from Sigma-Aldrich.

Retrovirus production and infection

The pSG5Δp85 construct encoding the dominant-negative PI 3-kinase regulatory subunit was kindly provided by B. Vanhaesebroeck (Ludwig Institute for Cancer Research, London, UK). The Δp85 cDNA was subcloned into the pBabe retroviral expression vector. Amphotropic retrovirus stocks were obtained by transient transfection [using the transfection reagent Exgen (Euromedex)] of the retroviral vector DNAs into Phoenix packaging cells (gift from C. Bagnis, EFS, Marseille, France). Target HT-29 cells were infected in the presence of 4 µg/ml polybrene (Sigma Aldrich) then cultured in medium containing 2 µg/ml puromycin (BD bioscience) to select for virus-infected cells. Following selection, cells were pooled, expanded and tested for the expression of Δp85 by western blotting, using antibodies to the p85 regulatory subunit of PI 3-kinase.

Cell aggregation assay

Cell-cell adhesion was qualitatively evaluated in an aggregation assay based on Bracke et al. (Bracke et al., 1993). Briefly, HT-29 cells grown on plastic or laminin 5 for 48 hours were detached by incubation in 10 mM Hepes-buffered saline solution (HBSS) containing 0.01% trypsin and 2 mM CaCl₂ for 10 minutes at 37°C [conditions previously described to maintain E-cadherin integrity (Takeichi, 1977)]. After trypsinization, single cell suspensions were made by trituration with a needle. Cell viability assessed by Trypan Blue dye exclusion was greater than 95%. Cells were washed twice in HBSS + 2 mM CaCl₂ and resuspended at 5 × 10⁵ cells per well in 500 µl of HBSS + 2 mM CaCl₂ in the presence or absence of 10 µg/ml anti-E-cadherin antibody (HECD1) or 4 mM EDTA as indicated. Aggregation assays were performed at 37°C in a gyratory shaker at 75 rpm for 60 minutes in 24-well non-tissue-culture-treated plates that had been blocked with PBS, 2% BSA for 30 minutes at 37°C to prevent attachment of cells to the plastic. Cell aggregation was evaluated by observation of cell clusters under phase contrast microscopy.

In vitro PI-3 kinase assay and lipid analysis

Immunoprecipitation of p85 was carried out with 10⁷ cells lysed for 15 minutes on ice with 1 ml of RIPA buffer (50 mM Hepes, pH 7.4, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS) containing phosphatase and protease inhibitor cocktails. Lysates were clarified by centrifugation for 10 minutes at 8000 g at 4°C. Lysates (500 µg protein) were precleared with protein A-Sepharose (Amersham-Pharmacia Biotech) and then incubated overnight with anti-p85 antibodies (0.5 µg/ml). After capture by protein A-Sepharose beads and three

washes with PBS, half of the immunocomplexes was tested immediately for in vitro PI 3-kinase activity, and the other half was analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with relevant antibodies.

Immunoprecipitates were suspended in 30 µl of PI 3-kinase activity buffer (0.5 mM EDTA, 100 mM NaCl and 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, plus 50 µM ATP and 10 mM MgCl₂) and incubated with a mixture of phosphatidylinositol/phosphatidylserine vesicles (30 µg/60 µg) and 15 µCi of [³²P]ATP (3000 Ci/mmol from Amersham Pharmacia Biotech) for 30 minutes at 37°C with shaking. The reaction was stopped by the addition of 80 µl of 1.2 N HCl and 400 µl of a 1:1 mixture of chloroform and methanol. Lipids extracts were separated by thin layer chromatography on Silica Gel G plates (Merck) previously coated with 1% (w/v) potassium oxalate, 2 mM EDTA in a mixture of water and methanol (90:60 v/v). Chromatograms were developed for 2 hours in chloroform, methanol (90:70 v/v) and 3 M ammoniac. The radioactive spots were visualized by a PhosphorImager 445 SI (Molecular Dynamics) after 1 hour exposure and quantified by ImageQuant software.

Western blot analysis

Cells were grown to confluence and lysed with a buffer made of 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and supplemented with 1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µM pepstatin, 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂ for 15 minutes on ice. Protein concentrations in lysates were determined using the copper reduction/bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce Chemical Co) according to the manufacturer's instructions. Proteins (50 µg in SDS-β-mercaptoethanol sample buffer) were resolved on 10% polyacrylamide gels, transferred onto PVDF membranes (Hybond-C super; Amersham), and blocked in 5% fat-free dry milk in 0.1% Tween 20 in PBS for 1 hour at room temperature. After overnight incubation at 4°C with primary antibodies diluted in the blocking solution, blots were washed in PBS, 0.1% Tween 20 and then incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (dilution of 1:3000) for 1 hour at room temperature before extensive washes. The blots were visualized by chemiluminescence (Amersham ECL reagents) using the Image Master VDS-CL device (Amersham-Pharmacia Biotech) and quantified with Image J software from NIH. Primary antibodies were used at the following dilutions: anti-p85 (1:2000), anti-Rac1 (1:1000), anti-Rac1b (1:1000), anti-human E-cadherin (1:1000) and anti-actin (1:100).

Subcellular fractionations

10⁷ cells were lysed in 1 ml of hypotonic buffer (0.34 M saccharose, 1 mM EDTA pH 7.4) by 40 passages through a dounce homogenizer and subsequent centrifugation for 15 minutes at 500 g at 4°C. The pellet corresponded to the nuclear fraction. The supernatant was withdrawn and further centrifuged for 40 minutes at 60,000 g at 4°C. The supernatant was assimilated to the cytosol and the pellet containing membranes was resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.2, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM MgCl₂, and containing protease inhibitor cocktail.

Soluble and cytoskeletal fractions were prepared essentially as described by Nelson and coworkers (Hinck et al., 1994). The cells were rinsed in PBS supplemented with 1 mM CaCl₂ and homogenized in CSK buffer (50 mM NaCl, 10 mM PIPES, pH 6.8, 3 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 300 mM sucrose) supplemented with 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 0.5 mM sodium vanadate and 20 µM phenylarsine oxide for 10 minutes at 4°C with gentle rocking. After centrifugation for 10 minutes at 15,000 g at 4°C, the supernatant constituted the Triton-soluble (TS) fraction. The pellet was triturated in the same volume of SDS buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 1% SDS) and boiled at 100°C for 10 minutes. After centrifugation for 10 minutes at 15,000 g at 4°C, the cleared supernatant constituted the Triton-insoluble (TI) fraction. This fraction usually contained 5-8-fold less protein than the TS fraction, as determined by BCA assay. Protein amounts corresponding to the same number of cells were routinely analyzed.

Immunofluorescence microscopy

Cells grown on glass coverslips were fixed with 3% paraformaldehyde, 2% sucrose for 10 minutes at 37°C and further permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 15 minutes at room temperature. Cells were washed twice with PBS containing 3% fat-free dried milk and 0.1% Tween 20, and blocked in 10% goat serum in PBS for 1 hour at room temperature to reduce background before staining. Cells were then stained for 1 hour at 37°C with the primary antibody diluted in the blocking solution, washed three times with PBS containing 0.1% Tween 20 and incubated with a secondary antibody coupled to AlexaFluor488 or AlexaFluor546 (used at the dilution of 1:500) for 45 minutes at 37°C. Coverslips were permanently mounted with Mowiol (Calbiochem). Fluorescence photomicrographs were taken using a confocal laser-scanning microscope (Zeiss LSM 510). Primary antibodies were used at the following dilutions: anti-human E-cadherin (1:500), anti-p85 (1:100), anti-Rac1 (1:200) and anti-Rac1b (1:100).

Co-immunoprecipitation experiments

The cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Hepes, pH 7.4, 10 mM EDTA, 150

mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing protease inhibitor cocktails for 15 minutes on ice. The cell lysates (500 µg of protein) were incubated 2 hours at 4°C with 2 µg of IgG2a isotype coupled to protein A-Sepharose (Amersham-Pharmacia Biotech). After a 10 minute centrifugation at 15,000 g, the supernatants were incubated overnight at 4°C with 2 µg of antibodies raised against p85 and immobilized on protein A-Sepharose. Beads were washed four times with the lysis buffer, and bound proteins were eluted from the beads by boiling in 20 µl of SDS-PAGE Laemmli's sample buffer for 5 minutes. The samples were analyzed by western blot.

Inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell contacts

Cells (80% confluence) were cultured for 24 hours on plastic or laminin 5. Adherens junctions were then disrupted by treatment with 4 mM EGTA for 30 minutes at 37°C. Intercellular contacts were subsequently allowed to re-establish by restoration of the extracellular Ca²⁺ concentration by replacing the EGTA-containing medium with fresh medium [1.8 mM CaCl₂ (Pece et al., 1999; Volberg et al., 1986)]. In some experiments, LY294002 (50 µM) was added in the EGTA-containing medium. After the selected time of Ca²⁺ restoration, the cells were fixed for subsequent immunofluorescence studies.

Rac1-GTP pull-down assays

Pull-down assays, using the glutathione S-transferase (GST)-PAK-Rac-binding domain (CRIB) fusion protein (GST-PAK-CRIB) (kindly provided by C. Gauthier-Rouviere, CRBM, CNRS/INSERM, Montpellier, France) were performed essentially as described (Sander et al., 1998). One 10 cm dish of confluent HT-29 cells was used per data point. Cells were rapidly washed in ice-cold PBS and lysed in a buffer containing 1% Triton, 50 mM Tris, pH 7.2, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA and a protein inhibitor mixture. Lysates were centrifuged for 10 minutes at 17,000 g at 4°C, and samples were taken from the supernatant to estimate the total protein concentration. GST-PAK-CRIB fusion bound to Sepharose beads (50 µl) was added to 2 mg of cell lysate proteins and incubated for 1 hour at 4°C. Beads were washed four times in lysis buffer, and bound proteins were eluted in Laemmli's sample buffer at 95°C for 5 minutes. GTP-bound Rac1 was analyzed by SDS-PAGE using a 12% polyacrylamide gel, transferred onto a PVDF membrane, and probed with anti-Rac1 mAb and anti-Rac1b polyclonal antibodies. Whole-cell lysates were run in parallel.

Statistical analysis

All the experiments were performed at least three times. For statistical analysis of data, Student's *t*-test was used. Values are expressed as mean ± s.e.m. Data were considered statistically significant at a *P* value of <0.01(**) or <0.05 (*).

We thank C. Oddou and B. Peyrusse for their excellent technical assistance, C. Racaud-Sultan for helpful comments and discussions, P. Rousselle for providing laminin 5 and BM165 antibody, and P. Jordan for providing Rac1b antibody. This work was supported by CNRS and the University Joseph Fourier (Grenoble, France). N.T.C. and S.G. are the recipients of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

References

Allen, W. E., Zicha, D., Ridley, A. J. and Jones, G. E. (1998). A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J. Cell Biol.* **141**, 1147-1157.

Athie, M. V., Flotow, H., Hilyard, K. L. and Cantrell, D. A. (2000). IL-12 selectively regulates STAT4 via phosphatidylinositol 3-kinase and Ras-independent signal transduction pathways. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1425-1434.

Aumailley, M. and Krieg, T. (1996). Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. *J. Invest. Dermatol.* **106**, 209-214.

Baker, S. E., Hopkinson, S. B., Fitchmun, M., Andreason, G. L., Frasier, F., Plopper, G., Quaranta, V. and Jones, J. C. (1996). Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J. Cell Sci.* **109**, 2509-2520.

Baki, L., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Georgakopoulos, A., Wen, P., Cui, W., Shioi, J., Koo, E., Ozawa, M., Friedrich, V. L., Jr et al. (2001). Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2381-2386.

Barry, S. T., Flinn, H. M., Humphries, M. J., Critchley, D. R. and Ridley, A. J. (1997). Requirement for Rho in integrin signalling. *Cell Adhes. Commun.* **4**, 387-398.

Basson, M. D., Turowski, G. and Emenaker, N. J. (1996). Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. *Exp. Cell Res.* **225**, 301-305.

Beaulieu, J. F. (1997). Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog. Histochem. Cytochem.* **31**, 1-78.

Behrens, J., Vakaet, L., Friis, R., Winterhager, E., Van Roy, F., Mareel, M. M. and Birchmeier, W. (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**, 757-766.

Batson, M., Lozano, E., Zhang, J. and Braga, V. M. (2002). Rac activation upon cell-cell contact formation is dependent on signaling from the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 36962-36969.

Bracke, M. E., Vyncke, B. M., Bruyneel, E. A., Vermeulen, S. J., De Bruyne, G. K., Van Larebeke, N. A., Vlemminck, K., Van Roy, F. M. and Mareel, M. M. (1993). Insulin-like growth factor I activates the invasion suppressor function of E-cadherin in MCF-7 human mammary carcinoma cells in vitro. *Br. J. Cancer* **68**, 282-289.

Braga, V. M., Machesky, L. M., Hall, A. and Hotchin, N. A. (1997). The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* **137**, 1421-1431.

Castiglia, D., Posteraro, P., Spirito, F., Pinola, M., Angelo, C., Puddu, P., Meneguzzi, G. and Zambruno, G. (2001). Novel mutations in the LAMC2 gene in non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa: effects on laminin-5 assembly, secretion, and deposition. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 731-739.

Cereijido, M., Shoshani, L. and Contreras, R. G. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**, G477-G482.

Chen, Y. T., Stewart, D. B. and Nelson, W. J. (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**, 687-699.

Choma, D. P., Pumiglia, K. and DiPersio, C. M. (2004). Integrin alpha3beta1 directs the stabilization of a polarized lamellipodium in epithelial cells through activation of Rac1. *J. Cell Sci.* **117**, 3947-3959.

Christofori, G. (2003). Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *EMBO J.* **22**, 2318-2323.

Clark, E. A., King, W. G., Brugge, J. S., Symons, M. and Hynes, R. O. (1998). Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J. Cell Biol.* **142**, 573-586.

Colognato, H. and Yurchenco, P. D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* **218**, 213-234.

Critchley, D. R. (2000). Focal adhesions – the cytoskeletal connection. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 133-139.

De Arcangelis, A., Neuville, P., Boukamel, R., Lefebvre, O., Kedinger, M. and Simon-Assmann, P. (1996). Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J. Cell Biol.* **133**, 417-430.

del Pozo, M. A., Price, L. S., Alderson, N. B., Ren, X. D. and Schwartz, M. A. (2000). Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *EMBO J.* **19**, 2008-2014.

Engvall, E. and Ruoslahti, E. (1977). Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer* **20**, 1-5.

Enserink, J. M., Price, L. S., Methi, T., Mahic, M., Sonnenberg, A., Bos, J. L. and Tasken, K. (2004). The cAMP-Epac-Rap1 pathway regulates cell spreading and cell adhesion to laminin-5 through the alpha3beta1 integrin but not the alpha6beta4 integrin. *J. Biol. Chem.* **279**, 44889-44896.

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.

Fine, J. D., Bauer, E. A., Briggaman, R. A., Carter, D. M., Eady, R. A., Esterly, N. B., Holbrook, K. A., Hurwitz, S., Johnson, L., Lin, A. et al. (1991). Revised clinical and laboratory criteria for subtypes of inherited epidermolysis bullosa. A consensus report by the Subcommittee on Diagnosis and Classification of the National Epidermolysis Bullosa Registry. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**, 119-135.

Floeth, M. and Bruckner-Tuderman, L. (1999). Digenic junctional epidermolysis bullosa: mutations in COL17A1 and LAMB3 genes. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 1530-1537.

Folkman, J. and Moscona, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* **273**, 345-349.

Fujimoto, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Kuraoka, A., Ohokuma, A. and Shibata, Y. (1997). Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J. Cell Sci.* **110**, 311-322.

Garratt, A. N. and Humphries, M. J. (1995). Recent insights into ligand binding, activation and signalling by integrin adhesion receptors. *Acta Anat.* **154**, 34-45.

Geiger, B. and Ayalon, O. (1992). Cadherins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 307-332.

Giancotti, F. G. and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-1032.

Goldfinger, L. E., Hopkinson, S. B., deHart, G. W., Collawn, S., Couchman, J. R. and Jones, J. C. (1999). The alpha3 laminin subunit, alpha6beta4 and alpha3beta1 integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. *J. Cell Sci.* **112**, 2615-2629.

Goodwin, M., Kovacs, E. M., Thoreson, M. A., Reynolds, A. B. and Yap, A. S. (2003). Minimal mutation of the cytoplasmic tail inhibits the ability of E-cadherin to activate Rac but not phosphatidylinositol 3-kinase: direct evidence of a role for cadherin-activated Rac signaling in adhesion and contact formation. *J. Biol. Chem.* **278**, 20533-20539.

Gout, S., Marie, C., Laine, M., Tavernier, G., Block, M. R. and Jacquier-Sarlin, M. (2004). Early enterocytic differentiation of HT-29 cells: biochemical changes and strength increases of adherens junctions. *Exp. Cell Res.* **299**, 498-510.

Gout, S. P., Jacquier-Sarlin, M. R., Rouard-Talbot, L., Rousselle, P. and Block, M. R. (2001). RhoA-dependent switch between alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins is induced by laminin-5 during early stage of HT-29 cell differentiation. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3268-3281.

Gu, J., Sumida, Y., Sanzen, N. and Sekiguchi, K. (2001). Laminin-10/11 and fibronectin

- differentially regulate integrin-dependent Rho and Rac activation via p130(Cas)-CrkII-DOCK180 pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 27090-27097.
- Gumbiner, B. M.** (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-357.
- Hinck, L., Nathke, I. S., Papkoff, J. and Nelson, W. J.** (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J. Cell Biol.* **125**, 1327-1340.
- Hintermann, E., Bilban, M., Sharabi, A. and Quaranta, V.** (2001). Inhibitory role of alpha 6 beta 4-associated erbB-2 and phosphoinositide 3-kinase in keratinocyte haptotactic migration dependent on alpha 3 beta 1 integrin. *J. Cell Biol.* **153**, 465-478.
- Hintermann, E., Yang, N., O'Sullivan, D., Higgins, J. M. and Quaranta, V.** (2005). Integrin alpha6beta4-erbB2 complex inhibits haptotaxis by up-regulating E-cadherin cell-cell junctions in keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 8004-8015.
- Hoffman, S. and Edelman, G. M.** (1983). Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5762-5766.
- Hotchin, N. A. and Hall, A.** (1995). The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J. Cell Biol.* **131**, 1878-1865.
- Hotchin, N. A. and Hall, A.** (1996). Regulation of the actin cytoskeleton, integrins and cell growth by the Rho family of small GTPases. *Cancer Surv.* **27**, 311-322.
- Hynes, R. O.** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
- Jongen, W. M., Fitzgerald, D. J., Asamoto, M., Piccoli, C., Slaga, T. J., Gros, D., Takeichi, M. and Yamasaki, H.** (1991). Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J. Cell Biol.* **114**, 545-555.
- Jordan, P., Brazao, R., Boavida, M. G., Gespach, C. and Chastre, E.** (1999). Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* **18**, 6835-6839.
- Kantengwa, S., Baetens, D., Sadoul, K., Buck, C. A., Halban, P. A. and Rouiller, D. G.** (1997). Identification and characterization of alpha 3 beta 1 integrin on primary and transformed rat islet cells. *Exp. Cell Res.* **237**, 394-402.
- Kemler, R.** (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* **9**, 317-321.
- Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennstrom, S., Warne, P. H. and Downward, J.** (1997). Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J.* **16**, 2783-2793.
- Kotelevets, L., van Hengel, J., Bruyneel, E., Mareel, M., van Roy, F. and Chastre, E. G.** (1997). Implication of the MAGI-1b/PTEN signalosome in stabilization of adherens junctions and suppression of invasiveness. *FASEB J.* **19**, 115-117.
- Kovaacs, E. M., Ali, R. G., McCormack, A. J. and Yap, A. S.** (2002). E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. *J. Biol. Chem.* **277**, 6708-6718.
- Kulik, G., Klippel, A. and Weber, M. J.** (1997). Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol. Cell Biol.* **17**, 1595-1606.
- Lampe, P. D., Nguyen, B. P., Gil, S., Usui, M., Olerud, J., Takada, Y. and Carter, W. G.** (1998). Cellular interaction of integrin alpha3beta1 with laminin 5 promotes gap junctional communication. *J. Cell Biol.* **143**, 1735-1747.
- Laprise, P., Chailier, P., Houde, M., Beaulieu, J. F., Boucher, M. J. and Rivard, N.** (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.* **277**, 8226-8234.
- Lee, E. C., Lotz, M. M., Steele, G. D., Jr and Mercurio, A. M.** (1992). The integrin alpha 6 beta 4 is a laminin receptor. *J. Cell Biol.* **117**, 671-678.
- Lotz, M. M., Korzelius, C. A. and Mercurio, A. M.** (1990). Human colon carcinoma cells use multiple receptors to adhere to laminin: involvement of alpha 6 beta 4 and alpha 2 beta 1 integrins. *Cell Regul.* **1**, 249-257.
- Marte, B. M. and Downward, J.** (1997). PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 355-358.
- Matos, P., Collard, J. G. and Jordan, P.** (2003). Tumor-related alternatively spliced Rac1b is not regulated by Rho-GDP dissociation inhibitors and exhibits selective downstream signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 50442-50448.
- Miyamoto, S., Akiyama, S. K. and Yamada, K. M.** (1995). Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* **267**, 883-885.
- Monier-Gavelle, F. and Duband, J. L.** (1997). Cross talk between adhesion molecules: control of N-cadherin activity by intracellular signals elicited by beta1 and beta3 integrins in migrating neural crest cells. *J. Cell Biol.* **137**, 1663-1681.
- Murga, C., Laguigne, L., Wetzker, R., Cuadrado, A. and Gutkind, J. S.** (1998). Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 19080-19085.
- Musil, L. S. and Goodenough, D. A.** (1990). Gap junctional intercellular communication and the regulation of connexin expression and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 875-880.
- Nakagawa, H., Miki, H., Ito, M., Ohashi, K., Takenawa, T. and Miyamoto, S.** (2001). N-WASP, WAVE and Mena play different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia. *J. Cell Sci.* **114**, 1555-1565.
- Nguyen, B. P., Gil, S. G. and Carter, W. G.** (2000a). Deposition of laminin 5 by keratinocytes regulates integrin adhesion and signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 31896-31907.
- Nguyen, B. P., Ryan, M. C., Gil, S. G. and Carter, W. G.** (2000b). Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 554-562.
- Nobes, C. D. and Hall, A.** (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- Nobes, C. D. and Hall, A.** (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* **144**, 1235-1244.
- Noren, N. K., Niessen, C. M., Gumbiner, B. M. and Burridge, K.** (2001). Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J. Biol. Chem.* **276**, 33305-33308.
- Orian-Rousseau, V., Aberdam, D., Rousselle, P., Messent, A., Gavrilovic, J., Meneguzzi, G., Kedinger, M. and Simon-Assmann, P.** (1998). Human colonic cancer cells synthesize and adhere to laminin-5. Their adhesion to laminin-5 involves multiple receptors among which is integrin alpha2beta1. *J. Cell Sci.* **111**, 1993-2004.
- Pang, J. H., Kraemer, A., Stehbens, S. J., Frame, M. C. and Yap, A. S.** (2005). Recruitment of phosphoinositide 3-kinase defines a positive contribution of tyrosine kinase signaling to E-cadherin function. *J. Biol. Chem.* **280**, 3043-3050.
- Pece, S., Chiariello, M., Murga, C. and Gutkind, J. S.** (1999). Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 19347-19351.
- Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H. and Christofori, G.** (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* **392**, 190-193.
- Price, L. S., Leng, J., Schwartz, M. A. and Bokoch, G. M.** (1998). Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1863-1871.
- Ren, X. D., Kiouss, W. B. and Schwartz, M. A.** (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* **18**, 578-585.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410.
- Rousselle, P. and Aumailley, M.** (1994). Kalinin is more efficient than laminin in promoting adhesion of primary keratinocytes and some other epithelial cells and has a different requirement for integrin receptors. *J. Cell Biol.* **125**, 205-214.
- Rousselle, P., Lunstrum, G. P., Keene, D. R. and Burgesson, R. E.** (1991). Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J. Cell Biol.* **114**, 567-576.
- Russell, A. J., Fincher, E. F., Millman, L., Smith, R., Vela, V., Waterman, E. A., Dey, C. N., Guide, S., Weaver, V. M. and Marinkovich, M. P.** (2003). Alpha 6 beta 4 integrin regulates keratinocyte chemotaxis through differential GTPase activation and antagonism of alpha 3 beta 1 integrin. *J. Cell Sci.* **116**, 3543-3556.
- Ryan, M. C., Lee, K., Miyashita, Y. and Carter, W. G.** (1999). Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **145**, 1309-1323.
- Sander, E. E., van Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F. and Collard, J. G.** (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Cell Biol.* **143**, 1385-1398.
- Schreider, C., Peignon, G., Thenet, S., Chambaz, J. and Pincon-Raymond, M.** (2002). Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin-actin complexes. *J. Cell Sci.* **115**, 543-552.
- Shaw, L. M., Rabinovitz, L., Wang, H. H., Toker, A. and Mercurio, A. M.** (1997). Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* **91**, 949-960.
- Shore, E. M. and Nelson, W. J.** (1991). Biosynthesis of the cell adhesion molecule uverolulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 19672-19680.
- Simon-Assmann, P., Duclos, B., Orian-Rousseau, V., Arnold, C., Mathelin, C., Engvall, E. and Kedinger, M.** (1994). Differential expression of laminin isoforms and alpha 6-beta 4 integrin subunits in the developing human and mouse intestine. *Dev. Dyn.* **201**, 71-85.
- Simon-Assmann, P., Kedinger, M., De Arcangelis, A., Rousseau, V. and Simo, P.** (1995). Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia* **51**, 883-900.
- Simon-Assmann, P., Lefebvre, O., Bellissent-Waydelich, A., Olsen, J., Orian-Rousseau, V. and De Arcangelis, A.** (1998). The laminins: role in intestinal morphogenesis and differentiation. *Annu. New York Acad. Sci.* **859**, 46-64.
- Somasiri, A., Wu, C., Ellichuk, T., Turley, S. and Roskelley, C. D.** (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for adherens junction-dependent mammary epithelial cell spheroid formation. *Differentiation* **66**, 116-125.
- Takeichi, M.** (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 237-252.
- Teller, I. C. and Beaulieu, J. F.** (2001). Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **2001**, 1-18.
- Timpl, R.** (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 618-624.
- Toyoyama, H., Nuruki, K., Ogawa, H., Yanagi, M., Matsumoto, H., Nishijima, H., Shimotakahara, T., Aikou, T. and Ozawa, M.** (1999). The reduced expression of E-cadherin, alpha-catenin and gamma-catenin but not beta-catenin in human lung cancer. *Oncol. Rep.* **6**, 81-85.
- Vachon, P. H. and Beaulieu, J. F.** (1995). Extracellular heterotrimeric laminin promotes differentiation in human enterocytes. *Am. J. Physiol.* **268**, G857-G867.
- Vaezi, A., Bauer, C., Vasioukhin, V. and Fuchs, E.** (2002). Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Dev. Cell* **3**, 367-381.

- Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P. C., Woscholski, R., Parker, P. J. and Waterfield, M. D.** (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 535-602.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. and Fuchs, E.** (2000). Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**, 209-219.
- Vermeulen, S. J., Bruyneel, E. A., Bracke, M. E., De Bruyne, G. K., Vennekens, K. M., Vleminckx, K. L., Berx, G. J., van Roy, F. M. and Mareel, M. M.** (1995). Transition from the noninvasive to the invasive phenotype and loss of alpha-catenin in human colon cancer cells. *Cancer Res.* **55**, 4722-4728.
- Volberg, T., Geiger, B., Kartenbeck, J. and Franke, W. W.** (1986). Changes in membrane-microfilament interaction in intercellular adherens junctions upon removal of extracellular Ca²⁺ ions. *J. Cell Biol.* **102**, 1832-1842.
- Wang, Q., Wang, X., Hernandez, A., Kim, S. and Evers, B. M.** (2001). Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to HT29 and Caco-2 intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* **120**, 1381-1392.
- Wayner, E. A., Gil, S. G., Murphy, G. F., Wilke, M. S. and Carter, W. G.** (1993). Epiligrin, a component of epithelial basement membranes, is an adhesive ligand for alpha 3 beta 1 positive T lymphocytes. *J. Cell Biol.* **121**, 1141-1152.
- Weitzman, J. B., Pasqualini, R., Takada, Y. and Hemler, M. E.** (1993). The function and distinctive regulation of the integrin VLA-3 in cell adhesion, spreading, and homotypic cell aggregation. *J. Biol. Chem.* **268**, 8651-8657.
- Woodfield, R. J., Hodgkin, M. N., Akhtar, N., Morse, M. A., Fuller, K. J., Saqib, K., Thompson, N. T. and Wakelam, M. J.** (2001). The p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase is associated with beta-catenin in the cadherin-based adhesion complex. *Biochem. J.* **360**, 335-344.
- Wymann, M. P. and Pirola, L.** (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**, 127-150.
- Yap, A. S., Niessen, C. M. and Gumbiner, B. M.** (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J. Cell Biol.* **141**, 779-789.

I.3. Discussion

Les expériences menées dans cette étude démontrent que la culture des cellules HT-29 sur la laminine 5 induit un renforcement des contacts intercellulaires. Les contacts sont favorisés par l'augmentation du taux de E-cadhérine et son association accrue avec le cytosquelette d'actine. L'effet de la laminine 5 passe par le recrutement des intégrines $\alpha6\beta4$ et à un moindre niveau $\alpha3\beta1$. L'activation de ces récepteurs induit une augmentation transitoire de l'activité de la PI3K qui se traduit par l'augmentation de la forme active de Rac1b, un variant d'épissage de la Rho-GTPase Rac1. Au niveau des contacts intercellulaires, l'activation de Rac1b pourrait alors contrôler la polymérisation de l'actine et favoriser son association avec le complexe des jonctions adhérentes.

I.3.1. La laminine 5 induit une augmentation des contacts intercellulaires

Nous avons montré que l'augmentation des contacts intercellulaire induit par la laminine 5 dépend de la E-cadhérine dont le taux d'expression est augmenté dès 4 heures de culture sur cette matrice (article, figures 1 et 2A). L'analyse du taux d'ARNm de la E-cadhérine au cours d'une cinétique de culture sur laminine 5 indique que cette augmentation n'est pas due à une régulation transcriptionnelle du gène de la E-cadhérine puisque son ARNm ne varie pas entre les deux types de supports (figure 29).

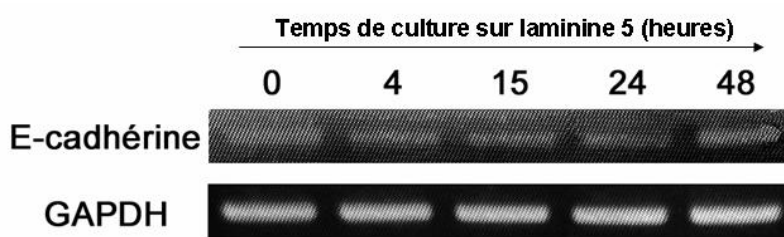


Figure 29 : Transcription de la E-cadhérine sur laminine 5

Les ARNm de cellules HT-29 cultivées de 0 à 48 h sur laminine 5 sont extraits dans 1 mL de Trizol et les taux d'ARNm de la E-cadhérine sont observés par RT-PCR semi-quantitative. Les taux d'expression de la GAPDH sont utilisés comme contrôle interne.

Il est donc plus vraisemblable que l'augmentation du taux protéique résulte de la stabilisation de la E-cadhérine au sein des complexes naissants suite à son association à la β -caténine et au cytosquelette d'actine (article, figure 4). L'effet est spécifique de la laminine 5 puisque la culture sur fibronectine et collagène IV n'induit pas d'augmentation aussi rapide du taux de E-cadhérine (article, figure 2C). Cela souligne une différence potentielle dans la régulation des jonctions adhérentes par la matrice extracellulaire entre les cellules HT-29 et

Caco-2. Tandis que les cellules HT-29 sécrètent de la laminine 5 au cours de leur différenciation entérocytaire, les Caco-2 n'en produisent quasiment pas (Orian-Rousseau et al, 1998). Toutefois les contacts intercellulaires des cellules Caco-2 peuvent être régulés positivement à la fois par la laminine 5 et le collagène IV (Schreider et al, 2002) tandis que la culture des cellules HT-29 sur le collagène IV seul ne semble pas avoir d'effet sur les jonctions adhérentes. Dans les deux cas, la signalisation est médiée pas les intégrines à sous-unité $\beta 1$ et $\alpha 6$ mais l'intégration du signal au niveau intracellulaire implique peut-être des acteurs différents.

I.3.2. L'effet de la laminine 5 est transmis par les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$

Les hétérodimères $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$ sont les récepteurs de la laminine 5 majoritairement exprimés par les cellules HT-29 : l'utilisation d'anticorps bloquant contre ces intégrines abolit l'augmentation d'expression de la E-cadhérine induite par la LN5 (article, figure 2D).

En accord avec nos résultats, l'effet positif de la laminine 5 sur la mise en place des jonctions adhérentes a également été décrit dans d'autres systèmes cellulaires, comme dans les kératinocytes (Hintermann et al, 2005). Dans ce cas l'adhérence des kératinocytes à la laminine 5 via l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est couplée au récepteur aux facteurs de croissance Erb2 inhibe la migration orientée des cellules et favorise la mise en place des contacts intercellulaires. Au contraire, l'activation de $\alpha 3\beta 1$ par un anticorps stimule la migration de ces mêmes cellules sur la laminine 5. De même, des expériences réalisées sur des cellules cancéreuses de peau cultivées en agrégats indiquent que la laminine 5 peut être impliquée dans la dispersion des cellules par le biais de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ (Kawano et al, 2001). Il apparaît donc que selon le type d'hétérodimère activé la laminine 5 puisse engendrer des signaux et des régulations intracellulaires différentes. Toutefois, dans notre cas, les deux types d'intégrine sont impliqués dans le même processus menant à l'augmentation des contacts dépendants des cadhérines. On peut imaginer que cette régulation repose sur deux phases successives impliquant les deux types d'hétérodimères : tout d'abord l'activation de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ par la laminine 5 pourrait permettre aux cellules dispersées de migrer les unes vers les autres et augmenter ainsi la probabilité de se rencontrer pour former des contacts primaires. Dans une seconde étape, l'engagement des intégrines $\alpha 6\beta 4$ pourrait stabiliser les cellules ayant formé des contacts primaires, inhiber leur migration et ainsi favoriser la maturation des jonctions et la stabilisation de la E-cadhérine à la membrane. Afin de valider

ou d'infirmier cette hypothèse, il serait intéressant de suivre l'activation de chacune de ces intégrines au cours d'une cinétique de culture des cellules HT-29 sur laminine 5. De plus il est possible que la présence en quantités variables de la laminine 5 dans la matrice extracellulaire puisse réguler différemment l'activation de l'une ou l'autre des intégrines. En effet nous montrons que l'effet de la laminine 5 sur l'expression de la E-cadhérine est dose-dépendant avec un pic d'activité à 5 $\mu\text{g/mL}$ (article, figure 2B). A des concentrations supérieures, l'augmentation de la E-cadhérine induite par la laminine 5 est moins prononcée, suggérant qu'à de trop fortes concentrations la laminine 5 pourrait favoriser la migration cellulaire au détriment de l'adhérence intercellulaire.

I.3.3. Signalisation via la PI3K et Rac 1b

Nos résultats indiquent que l'activation transitoire de la PI3K permet de réguler la formation des jonctions adhérentes par le biais de Rac1 et de son variant Rac1b. Certaines études indiquent que l'engagement des cadhérines induit l'activation de Rac et de cdc42 par une signalisation de type outside-in impliquant la PI3K, résultant dans la régulation locale de la polymérisation du cytosquelette d'actine (Fukuyama et al, 2006; Goodwin et al, 2003; Kovacs et al, 2002a). Nous montrons ici que cette maturation peut également être contrôlée par une signalisation de type inside-out transmise par la PI3K. L'expérience de GTP-pull down suivie d'une révélation de Rac1 par Western Blot nous indique que le taux de Rac1-GTP est augmenté après 24 heures de culture sur laminine 5 (article, figure 9) ce qui correspond à la cinétique d'activation de la PI3K. Nous nous sommes également intéressés au comportement du variant d'épissage de Rac1, Rac1b qui possède un insert de 19 acides aminés supplémentaires et est reconnu par notre anticorps dirigé contre Rac1. Rac1b a été décrit pour être préférentiellement exprimée dans les cancers du sein et du colon, et est capable d'échanger rapidement le GDP par de GTP de façon indépendante des GTPase-Exchange factors (GEFs) lui permettant ainsi d'être activée plus rapidement que Rac1 (Jordan et al, 1999; Matos et al, 2003). Toutefois l'action de GTPase-activating proteins (GAPs) peut inhiber l'activité de Rac1b et ainsi moduler son action dans les cellules (Fiegen et al, 2004). L'utilisation d'un anticorps dirigé spécifiquement contre ce variant nous indique qu'il est également fortement activé après 24 heures de culture sur laminine 5. Cette activation dépend de la PI3K puisque l'utilisation du LY294002 inhibe totalement l'augmentation du taux de Rac1b-GTP sur laminine 5 (article, figure 9B). Il est possible que la PI3K favorise l'activation de Rac1b en inhibant des GAPs. De plus, nous montrons que Rac1b est recrutée au niveau des

jonctions intercellulaires lors de leur formation sur laminine 5 ce qui indique que cette protéine est un bon candidat pour la régulation positive des jonctions en aval de la signalisation par la PI3K.

Toutefois une étude publiée récemment présente Rac1b comme un régulateur négatif de la formation des jonctions dans des cellules de tumeurs colorectales humaines (Esufali et al, 2007). En surexprimant Rac1b ou en diminuant son expression par si RNA, les auteurs montrent qu'il est capable d'induire la transcription, dépendante de Tcf/LEF, de gènes oncogéniques et provoque une baisse du taux de E-cadhérine par le biais du facteur de transcription Slug, responsable de la répression du gène de la E-cadhérine. Ces résultats en apparence contradiction avec nos travaux peuvent s'expliquer de deux manières : les auteurs réalisent ici des expériences de surexpression de Rac1b alors que nous observons la régulation de la protéine endogène. Les effets de Rac1b pourraient donc être variables selon son niveau d'expression : en faible quantité elle favoriserait la formation des jonctions adhérentes mais lorsqu'elle est surexprimée, son effet sur la répression des gènes par Slug pourrait l'emporter et ainsi inhiber la formation des jonctions. De plus, il est possible que dans notre cas, l'effet de Rac1b sur les jonctions soit dû au caractère transitoire de son activation par la PI3K. La régulation des Rho-GTPases semble en effet être variable selon l'étape de la mise en place des jonctions (Braga et al, 2000). Ainsi différentes études ont montré que l'activation transitoire de Rac1 est nécessaire à la formation des jonctions, toutefois son activation constitutive peut au contraire être associée à la migration cellulaire et à la perte des contacts intercellulaires (Chu et al, 2004; Quinlan, 1999; Sander et al, 1998). Le cas de l'activité de Rac1b est peut-être semblable, devant être augmentée lors de l'initiation des contacts puis inhibée. Bien que Rac1b soit capable d'être activée facilement et incapable de lier les Rho-GDI, son activation doit être finement régulée, notamment par les GAPs, afin de générer des signaux distincts. Les expériences de surexpression peuvent donc modifier un équilibre très fin et être intégrées par la cellule comme une activation à long terme.

I.3.4. La laminine 5 : une étape de la différenciation ?

Plusieurs paramètres laissent penser que la laminine 5 est capable de favoriser la différenciation entérocytaire : *in-vivo* elle est majoritairement présente au niveau des villi, où les cellules intestinales se différencient, de plus les cellules HT-29 sécrètent de la laminine 5 au cours de leur différenciation induite *in-vitro*. Nous montrons ici que la laminine 5 favorise l'expression de la E-cadhérine ainsi que la mise en place des jonctions adhérentes, un

processus nécessaire à la différenciation et à la polarisation des cellules épithéliales. Toutefois la culture sur laminine 5 ne permet pas le recrutement de p120ctn au niveau du complexe, son association avec le cytosquelette d'actine n'étant pas augmentée (article, figure 4). Or le recrutement de p120ctn au niveau des jonctions adhérentes permet le renforcement et la maturation des jonctions en favorisant le rapprochement latéral des dimères de cadhérines. Il semble donc que la laminine 5 favorise la mise en place des contacts mais pas leur maturation. La réalisation d'un test de perméabilité de la monocouche cellulaire en présence ou non de laminine 5 nous indique que les contacts intercellulaires formés sur cette matrice sont perméables à la biotine-FITC (figure 30). En effet, la biotine diffuse du pôle apical vers le pôle basal des cellules HT-29 cultivées sur plastique comme sur laminine 5 alors qu'elle reste localisée au pôle apical dans des cellules différenciées 10 jours en milieu GAL.

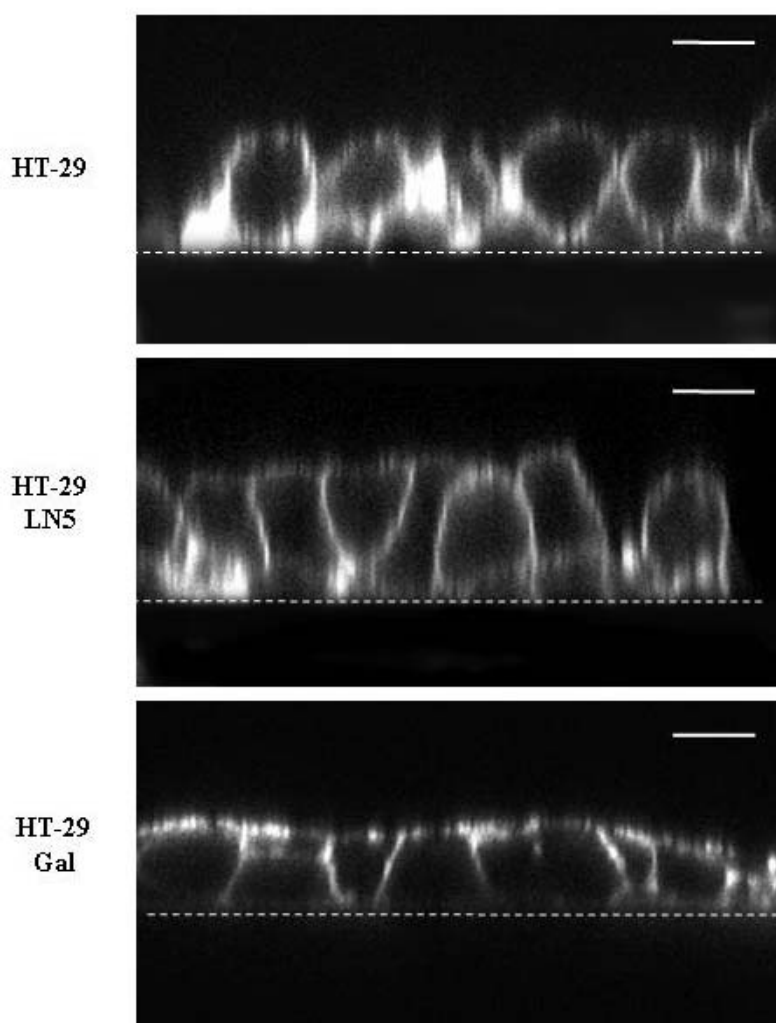


Figure 30 : Test de perméabilité de la monocouche de cellules HT-29

Les cellules HT-29 cultivées 48h sur plastique ou LN5 ou différenciées durant 10 jours en milieu GAL sont incubées avec de la biotine, fixées et marquées à l'extravidine-TRITC avant observation au microscope confocal selon l'axe Z. Echelle = 20µm.

De plus certains résultats complémentaires nous ont permis de conclure que la laminine 5 n'induit pas une différenciation entérocytaire totale. En effet, la différenciation des cellules HT-29 en milieu GAL est normalement accompagnée de la modification de certains marqueurs comme la phosphatase alcaline dont l'activité augmente au cours des 10 premiers jours de différenciation et la villine qui, d'une localisation diffuse dans les cellules, se relocalise aux bordures en brosses des cellules différenciées. Or ces marqueurs ne sont pas modifiés après 96 heures de culture sur laminine 5. L'activité de la phosphatase alcaline reste équivalente à celle des cellules HT-29 cultivées sur plastique et l'observation en microscopie confocale du marquage de la villine indique qu'elle est distribuée de façon uniforme au sein des cellules cultivées sur laminine 5 (figure 31).

Nous avons donc montré que la laminine 5 participe au processus de différenciation entérocytaire en favorisant la mise en place des jonctions intercellulaires dépendantes des cadhérines. Toutefois ce processus ne représente qu'une étape précoce de la différenciation entérocytaire. D'autres facteurs doivent être nécessaires pour favoriser les dernières étapes de maturation des jonctions et induire l'expression de marqueurs de différenciation entérocytaires. Nos résultats montrent notamment que la p120ctn, qui est recrutée au sein des jonctions adhérentes lors de la différenciation en milieu GAL, ne l'est pas lors de la culture sur laminine 5. Il est donc possible que le recrutement de la p120ctn au sein des jonctions adhérentes, évènement nécessaire à leur maturation, représente une étape ultérieure importante de la différenciation entérocytaire.

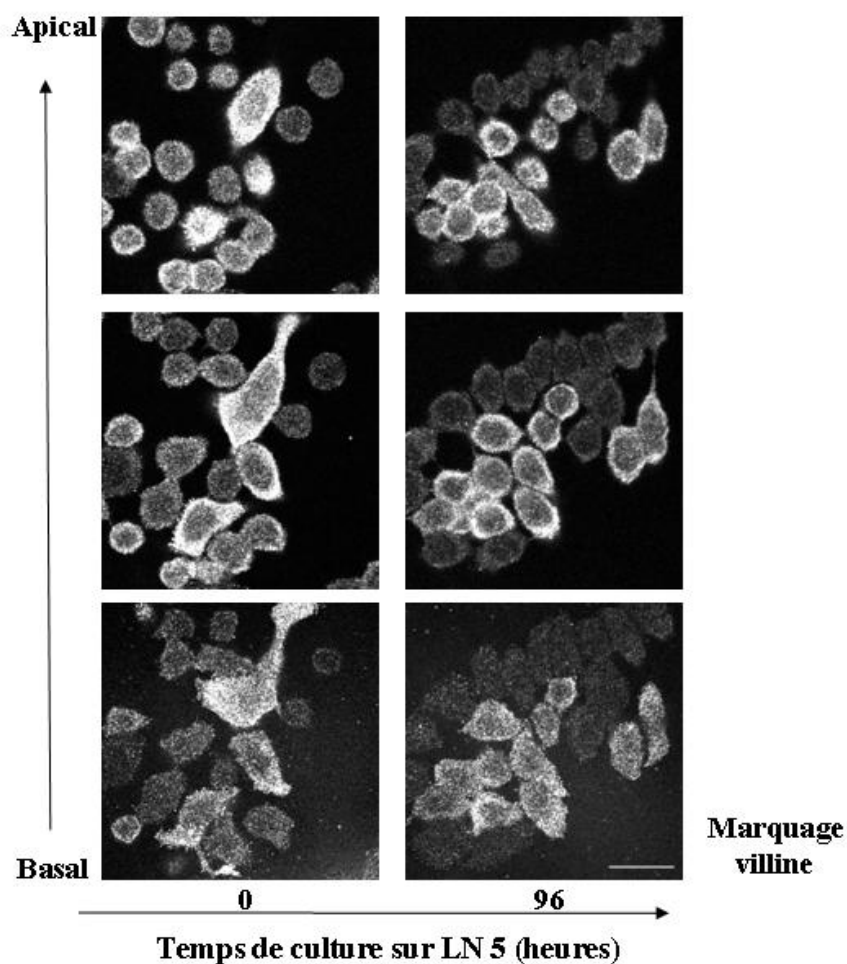
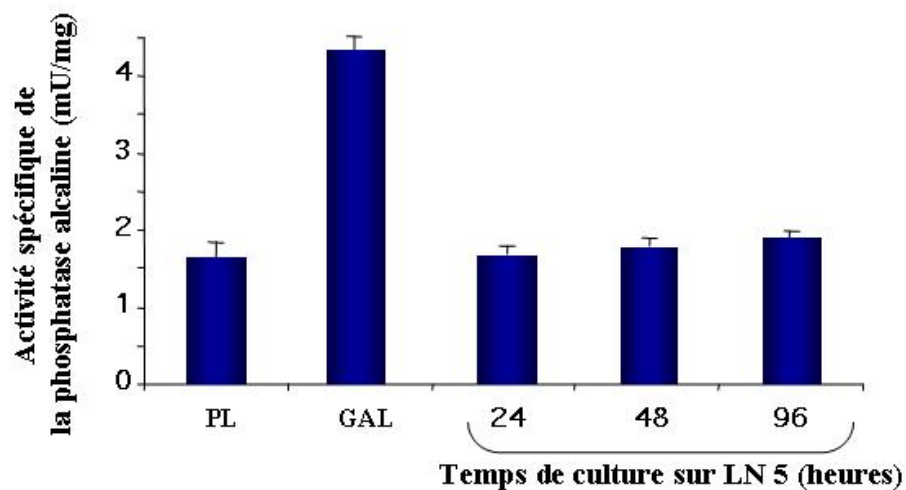


Figure 31 : La culture sur laminine 5 n'induit pas de modifications des marqueurs de différenciation des cellules HT-29

Histogramme : les cellules HT-29 cultivées 48h sur plastique ou de 24 à 96 h sur LN5 et des cellules différenciées durant 10 jours en milieu GAL sont lysées et l'activité de la phosphatase alcaline endogène sur le pNPP est mesurée par absorbance à 405 nm.

Photos : la localisation apicale de la villine a été analysée par immunofluorescence et observation au microscope confocal dans les cellules HT-29 cultivées 0 ou 96 h sur LN5. Echelle = 50µm

II – Mécanismes de recrutement de la p120ctn au sein des jonctions adhérentes

II.1. Approche du sujet et problématique

La différenciation des cellules intestinales s'accompagne d'un remodelage du cytosquelette d'actine associé à la mise en place des structures d'adhérence. Cette étape est nécessaire pour le maintien de l'architecture tissulaire et la fonction de l'épithélium. Dans ce contexte, nous avons montré qu'il existait une signalisation croisée entre intégrines et cadhérines lors de ce processus. *In vivo* comme *in vitro*, la sécrétion de la laminine 5 coïncide avec le déclenchement de la différenciation cellulaire. Cependant, si cette étape conduit bien à la formation de jonctions adhérentes dites « immatures », elle n'est pas suffisante pour induire pleinement le processus de différenciation. Pour assurer efficacement sa fonction, l'entérocyte doit regrouper au pôle apical les transporteurs et les enzymes impliqués dans l'absorption et la digestion des nutriments (sucrase isomaltase, aminopeptidase et phosphatase alcaline...) dans des structures particulières appelées radeaux lipidiques (Fantini et al, 2000). Des structures similaires sont également observées au niveau basolatéral, à l'endroit où se forment les jonctions intercellulaires (Nusrat et al, 2000). La taille et la composition de ces radeaux lipidiques sont très variables, ils servent de plateforme pour concentrer les molécules de signalisation (comme les protéines G monomériques) à un endroit précis de la membrane plasmique et favoriser le rassemblement de protéines ancrées à la membrane. Par conséquent, ces « radeaux lipidiques » pourraient faciliter la signalisation cellulaire, l'import et le trafic des protéines (Niethammer et al, 2002; van Deurs et al, 2003). Ces micro-domaines ne sont pas figés dans la membrane, mais ils sont capables de se déplacer latéralement. Ce déplacement est sensible à la teneur en cholestérol de la membrane. Cette dernière affecte également les propriétés d'adhérence et de signalisation des intégrines suggérant un rôle important de ces micro-domaines dans la régulation de la fonction de ces récepteurs (Leitinger & Hogg, 2002). Plus récemment, l'importance de ces radeaux lipidiques a été soulignée dans le contrôle de la dynamique d'assemblage des jonctions adhérentes (Causeret et al, 2005).

Nous envisageons que la maturation des jonctions adhérentes (caractérisée par le recrutement de p120ctn) nécessite leur regroupement au sein de ces microdomaines. Ces derniers permettraient le recrutement spatio-temporel de molécules de signalisation ou de régulateurs nécessaires à la maturation des jonctions adhérentes et à leur rôle d'activateurs de

voies de signalisation impliquées dans la différenciation. Parmi les acteurs de ce « signalosome » p120ctn pourrait jouer un rôle important.

II.2. L'interaction entre la p120ctn et la E-cadhérine est liée à la formation de microdomaines lipidiques de type « rafts » et à la régulation des Rho-GTPases au cours de la différenciation entérocytaire.

II.2.1. La p120ctn et la E-cadhérine s'associent aux radeaux lipidiques lors de la différenciation des cellules HT-29

Afin d'étudier l'effet potentiel des radeaux lipidiques dans la formation des jonctions adhérentes, nous avons tout d'abord vérifié la présence de ces structures au cours d'une cinétique de différenciation précoce des cellules HT-29 en milieu GAL (figure 32). Pour cela nous avons d'abord utilisé une approche biochimique visant à suivre l'évolution d'expression d'un marqueur de ces microdomaines : la flotilline (Bickel et al, 1997; Volonte et al, 1999). L'analyse de son expression par Western-blot indique qu'elle augmente de façon continue entre 4 et 10 jours de différenciation. Ces résultats ont été confirmés par une approche d'immunofluorescence basée sur l'affinité de toxine cholérique à lier les gangliosides GM1 dont la présence est enrichie au niveau des radeaux lipidiques. L'observation de cellules HT-29 cultivées 0, 4 ou 10 jours en milieu de différenciation et marquées par la toxine cholérique couplée au FITC indique que les radeaux lipidiques se regroupent en patch au niveau des contacts cellulaires dès le 4ème jour de différenciation, en accord avec l'augmentation d'expression de la flotilline.

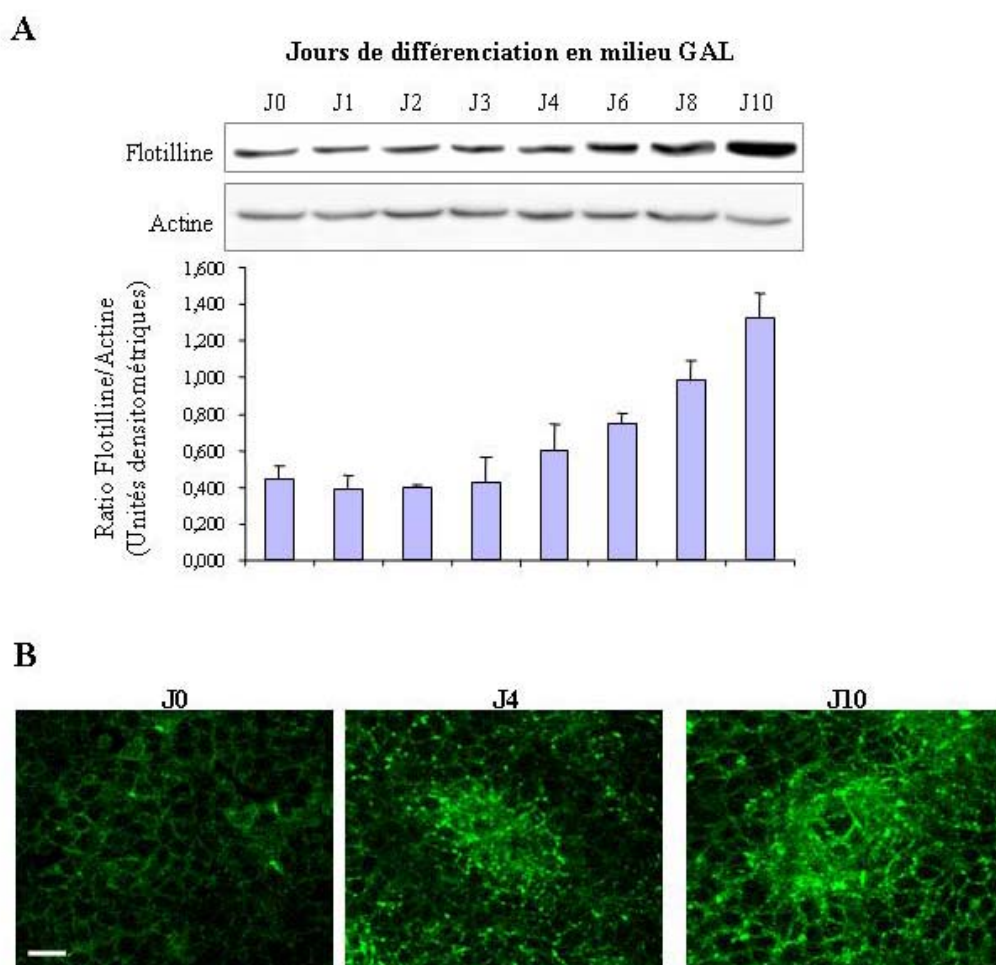


Figure 32 : Formation de radeaux lipidiques de type « rafts » au cours de la différenciation entérocytaire des cellules HT-29.

A. Les cellules HT-29 cultivées de 0 à 10 jours en milieu de milieu de différenciation GAL. Après lyse cellulaire, l'expression de la flotilline est déterminée par Western-Blot.

B. Les cellules HT-29 cultivées 0, 4 ou 10 jours en milieu de milieu de différenciation GAL sont perméabilisées et fixées avant d'être marquées par la toxine cholérique-FITC et observées par microscopie confocale. Echelle = 100µm.

La période d'émergence des radeaux lipidiques correspondant aux événements de mise en place et de maturation des jonctions adhérentes, nous avons isolé ces domaines et analysé leur contenu en E-cadhérine et p120ctn. Les radeaux lipidiques étant insolubles dans des détergents non ioniques, nous les avons séparé en lysant les cellules dans du Triton X-100 puis en fractionnant les lysats totaux sur un gradient de sucrose (Figure 33).

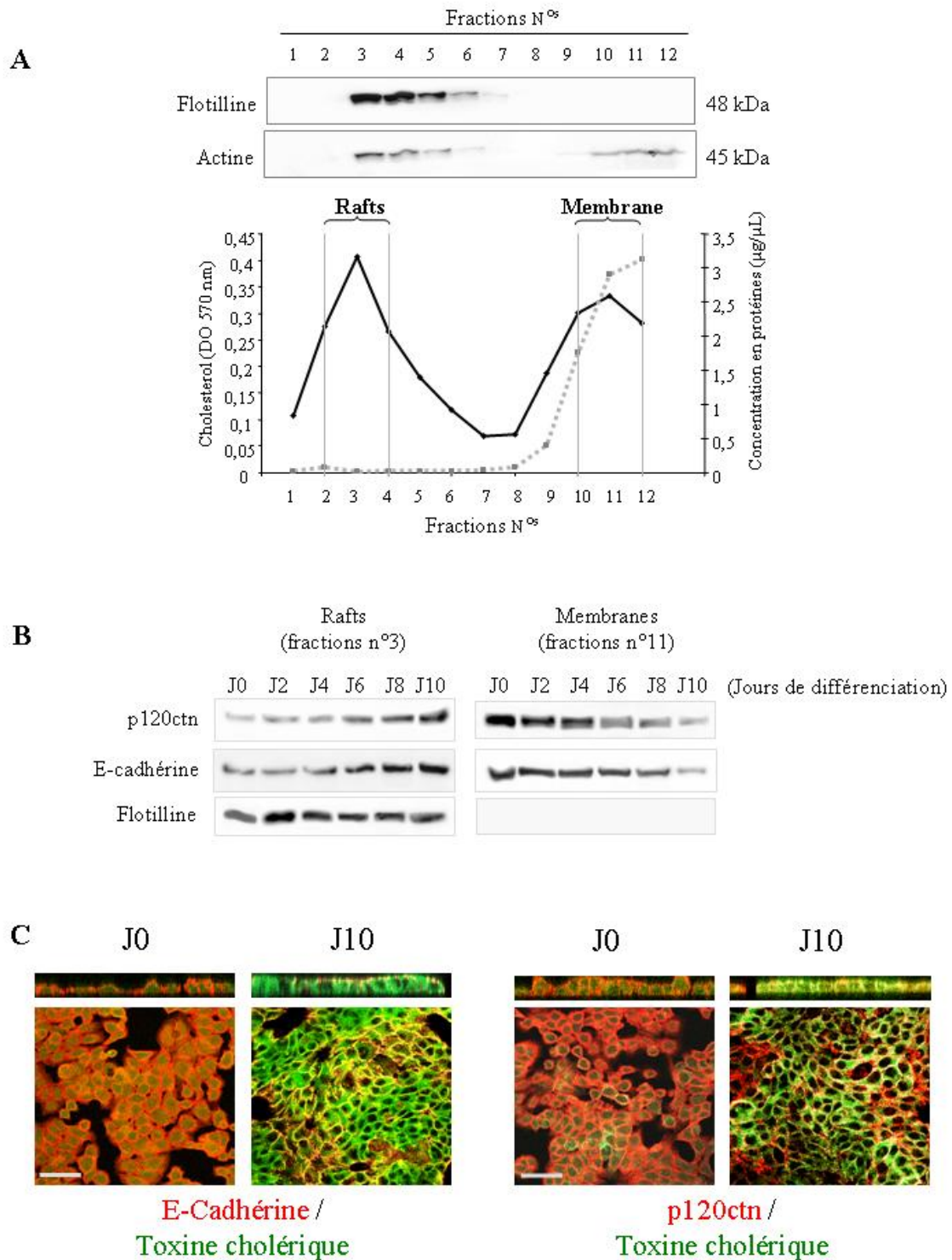


Figure 33 : La E-cadhérine et la p120ctn sont recrutées dans les radeaux lipidiques au cours de la différenciation des cellules HT-29

A. Le lysat total de cellules HT-29 est fractionné par centrifugation sur un gradient discontinu de sucrose. La quantité de cholestérol et de protéines totales sont dosées et la présence de la flotilline et de l'actine dans chacune des fractions est analysée par Western-blot.

B. Les quantités de p120ctn, E-cadhérine et flotilline sont analysées par western-blot dans les fractions de radeaux lipidiques et de membranes de cellules HT-29 différenciées de 0 à 10 jours en milieu GAL.

C. Les cellules HT-29 indifférenciées ou différenciées 10 jours en milieu GAL sont perméabilisées, fixées et immunomarquées pour la E-cadhérine et la p120ctn. Les radeaux lipidiques sont marqués par la toxine cholérique-FITC. Les cellules sont observées par microscopie confocale. Echelle = 100µm.

L'analyse de la quantité totale de protéines suite au fractionnement de cellules HT-29 différenciées durant 10 jours indique qu'une grande partie de ces protéines sont présentes dans les fractions 9 à 12, correspondant aux protéines solubles dans le détergent (Figure 33A). Cependant, la présence de deux pics de concentrations importantes de cholestérol souligne l'existence d'un second pool de membranes plus légères et contenant peu de protéines. La présence de la flotilline au sein de ces fractions (fractions 3 à 5) confirme qu'elles contiennent des radeaux lipidiques.

L'évolution du niveau d'expression de la E-cadhérine et de p120ctn dans les fractions enrichies en radeaux lipidiques (fractions n° 3) ou en membranes (fractions n° 11) au cours d'une cinétique de différenciation des cellules HT-29 a été analysée par Western-blot (Figure 33B). La présence de E-cadhérine dans les fractions de radeaux lipidiques augmente progressivement à partir de 4 jours de différenciation. Cette augmentation se fait aux dépens de la fraction membranaire, où le niveau d'expression de la E-cadhérine diminue progressivement au cours de la différenciation. La p120ctn est recrutée plus tardivement dans les radeaux lipidiques puisque son niveau d'expression dans cette fraction augmente après 6 jours de différenciation. Comme pour la E-cadhérine, l'augmentation de la p120ctn dans les fractions de radeaux lipidiques correspond à une perte d'expression dans la fraction enrichie en membranes. De plus, l'analyse par microscopie confocale de la localisation de la p120ctn et de la E-cadhérine indique qu'elles sont colocalisées avec les radeaux lipidiques (mis en évidence par un marquage à la CTx-FITC) au niveau des membranes apico-latérales des cellules HT-29 différenciées (Figure 33C). Cette colocalisation n'a pas lieu dans les cellules HT-29 indifférenciées.

Ces résultats indiquent que la E-cadhérine et la p120ctn sont progressivement recrutées au sein des radeaux lipidiques au cours de la différenciation entérocytaire des cellules HT-29.

II.2.2. La p120ctn s'associe avec la E-cadhérine principalement au niveau des radeaux lipidiques

Le recrutement de la p120ctn est un évènement tardif dans la mise en place des jonctions adhérentes accompagnant la différenciation entérocytaire (Chartier et al, 2006; Gout et al, 2004). Elle permet la maturation des jonctions en favorisant le rapprochement latéral des cadhérines ainsi que l'association du complexe au cytosquelette d'actine. Les radeaux lipidiques étant également associés au cytosquelette d'actine, il est possible que la localisation de la p120ctn et de la E-cadhérine au sein de ces structures corresponde à la maturation des

jonctions adhérentes caractérisée par le recrutement de la p120ctn au niveau du domaine juxtamembranaire de la E-cadhérine.

Nous avons donc analysé l'interaction de la p120ctn et de la E-cadhérine au sein des fractions enrichies en radeaux lipidiques ou en membranes plasmiques par des expériences d'immunoprécipitation (figure 34).

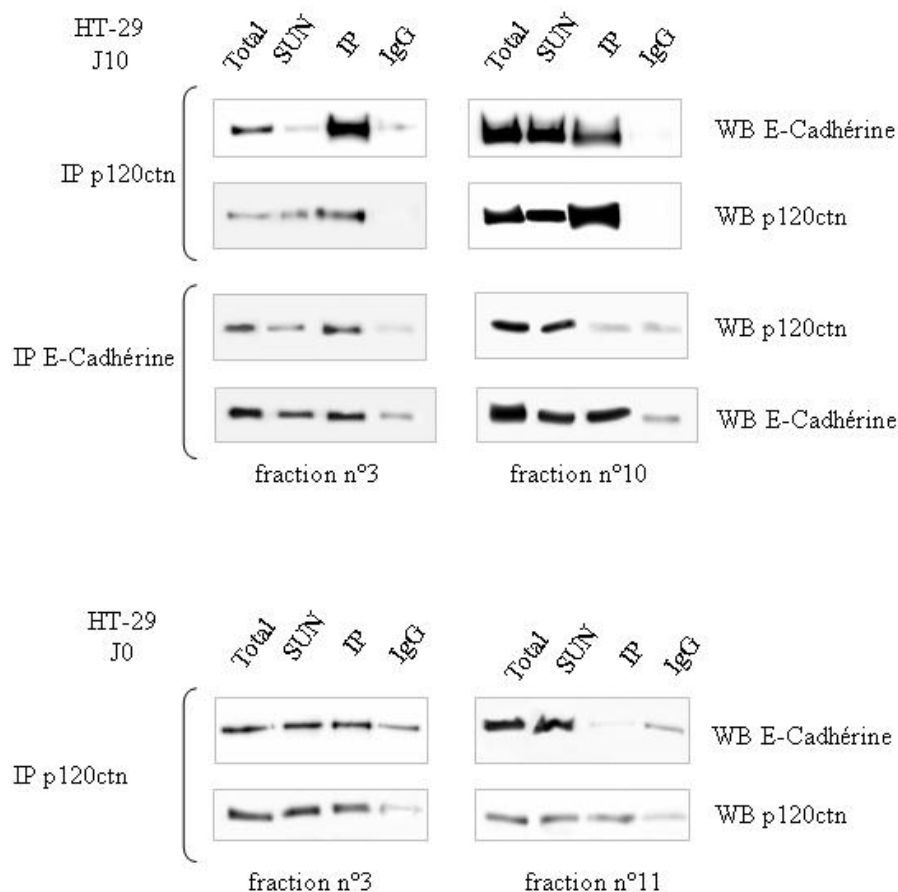


Figure 34 : La E-cadhérine et la p120ctn interagissent préférentiellement au sein des radeaux lipidiques

La p120ctn est immunoprécipitée à partir de fractions de radeaux lipidiques (fractions 3) ou de membrane plasmique (fraction 10 et 11) de cellules HT-29 indifférenciées (HT-29 J0) ou différenciées 10 jours en milieu GAL (HT-29 J10) et la quantité de E-cadhérine co- immunoprécipitée est analysée par Western-blot. L'immunoprécipitation de la E-cadhérine et la détection de la p120ctn est également réalisée sur les fractions 3 et 10 de cellules HT-29 différenciées.

Dans les cellules HT-29 indifférenciées (HT-29 J0), la E-cadhérine est co-immunoprécipitée avec la p120ctn seulement dans la fraction de radeaux lipidiques (panneau du bas). Toutefois, les expériences précédentes montrent que ces fractions sont peu nombreuses à J0 et le nombre de complexe p120ctn/E-cadhérine est donc restreint à ce stade en comparaison de la quantité totale de p120ctn. L'expérience similaire réalisée sur des cellules différenciées indique que le nombre de complexe P120ctn/E-cadhérine dans la fraction contenant les radeaux lipidiques augmente significativement. De plus, une analyse quantitative par densitométrie de la quantité

de E-cadhérine co-immunoprécipitée indique qu'elle est supérieure d'un facteur 2 dans les fractions de radeaux lipidiques par rapport au reste des membranes plasmiques. Cette augmentation est confirmée par l'immunoprécipitation de la E-cadhérine qui entraîne plus de p120ctn dans les fractions contenant les radeaux lipidiques que dans celles enrichies en membrane.

Il apparaît donc que la p120ctn est recrutée dans les jonctions adhérentes principalement au niveau des radeaux lipidiques formés lors de la différenciation entérocytaire. Ces résultats ont été confirmés par des expériences d'élimination des radeaux lipidiques par endocytose ou par déplétion et oxydation du cholestérol en traitant les cellules HT-29 différenciées à l'Amphotéricine B (A.B), la Cholestérol Oxydase (C.O) ou la Méthyl-Cyclo Dextrine (C.D) respectivement (figure 35).

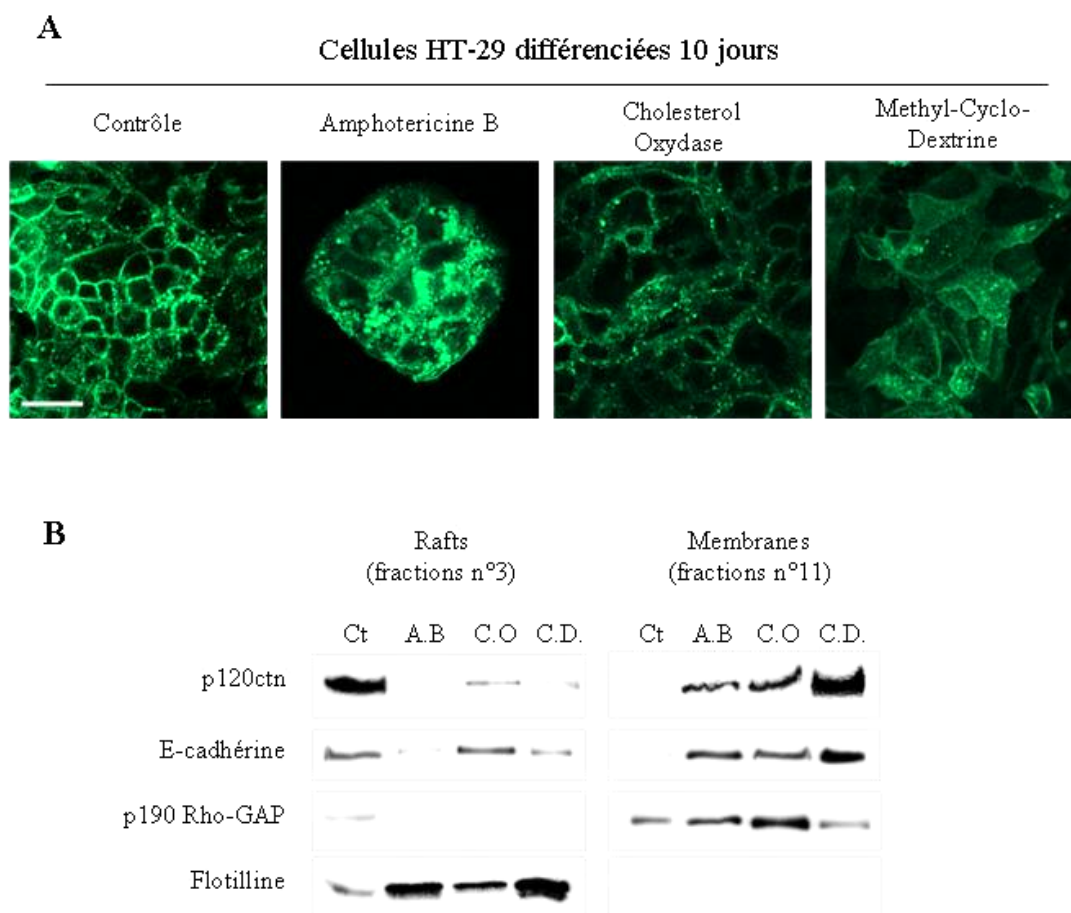


Figure 35 : La disruption des radeaux lipidiques dans les cellules HT-29 différenciées provoque la relocalisation de la E-cadhérine, de la p120ctn et de p190 Rho-GAP dans les membranes plasmiques

Les cellules HT-29 différenciées durant 10 jours sont traitées ou non par des drogues déstabilisant les radeaux lipidiques : l'amphotéricine B 25 µg/mL (A.B), la cholestérol oxydase 2 unités /mL (C.O) et la methcyclodextrine 4 mM (C.D). Puis les cellules sont perméabilisées, fixées et les radeaux lipidiques sont marqués par la toxine cholérique-FITC avant observation au microscope confocal (A) Echelle= 100µm. Les taux de p120ctn, E-cadhérine, p190 Rho-GAP et flotilline sont également analysés dans les fractions enrichies en radeaux lipidiques ou en membranes plasmiques , avec ou sans traitement (B).

Le marquage des cellules HT-29 différenciées par la toxine cholérique couplée au FITC confirme l'efficacité de ces drogues sur l'organisation de ces radeaux lipidiques (figure 35 A). Ces trois types de traitement induisent également la perte de recrutement de la E-cadhérine et de la p120ctn dans les radeaux lipidiques puisque ces protéines sont retrouvées principalement au niveau des membranes plasmiques (figure 35 B). Cet effet est plus important pour la p120ctn qui est une protéine cytoplasmique que pour la E-cadhérine qui est transmembranaire. C'est également le cas pour p190 Rho-GAP, une autre protéine cytoplasmique, recrutée par p120ctn au niveau des jonctions adhérentes et qui participe à la régulation des protéines G monomériques au niveau de ces complexes en inhibant RhoA (widelberg et al ;, 2006).

II.2.3. La différenciation des cellules HT-29 est caractérisée par une activation antagoniste des GTPases RhoA et Rac1

Le recrutement de la p190 Rho-GAP avec la p120ctn au sein des radeaux lipidiques suggère qu'elle puisse participer à la régulation des GTPases monomériques au sein des jonctions adhérentes dans le cadre de la différenciation entérocytaire des cellules HT-29. Nous avons donc mesuré les activités de RhoA et de Rac1 par GST-pull-down au cours d'une cinétique de 10 jours de différenciation des cellules HT-29 (figure 36).

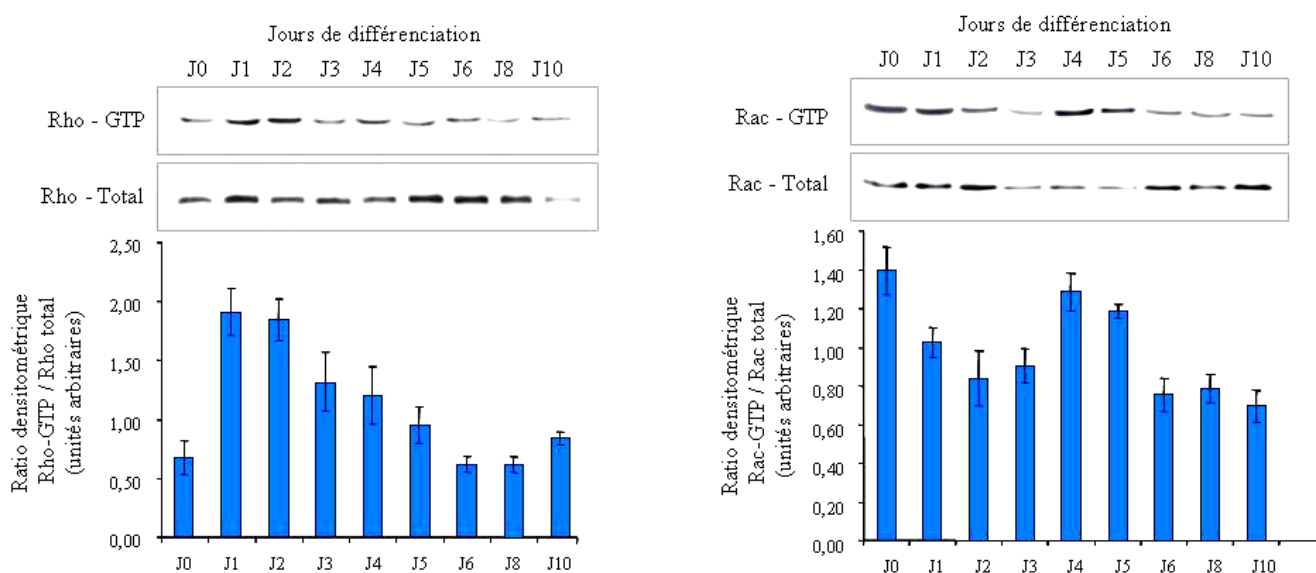


Figure 36 : Activation des GTPases RhoA et Rac1 au cours de la différenciation des cellules HT-29

Les taux de RhoA-GTP et Rac1-GTP sont analysés par GST-pull down à partir de lysats totaux de cellules HT-29 différenciées de 0 à 10 jours en milieu GAL. Le taux d'activation de chacune des protéines est quantifié par détection des protéines RhoA et Rac1 totales par Western-blot et densitométrie en utilisant le logiciel Image J.

Le niveau de RhoA-GTP augmente rapidement au cours des deux premiers jours de différenciation puis retombe à son niveau de base après 6 jours. Parallèlement les taux de Rac1-GTP diminuent progressivement les 3 premiers jours de différenciation puis constituent un pic à 4 et 5 jours avant de se stabiliser à un niveau plus faible de 6 à 10 jours de différenciation. Le pic d'activation de Rac1 correspond à différents phénomènes observés lors de la différenciation des cellules HT-29 comme l'augmentation d'activité de la phosphatase alcaline ou la relocalisation apicale de la villine (Gout et al, 2004). De plus cette période correspond également à l'émergence des radeaux lipidiques ainsi qu'au recrutement dans ces domaines de la E-cadhérine et de la p120ctn.

Afin de préciser le rôle de l'activation de Rac1 lors de la différenciation entérocytaire, nous avons établi une lignée cellulaire stable de HT-29 exprimant le mutant constitutivement inactif de Rac1 (HT-29 RacN17). Bien que ces cellules présentent des microdomaines (mis en évidence par un marquage à la CTx-FITC et par la distribution de la flotilline, figure 37), nous n'avons pas détecté de p120ctn, de E-cadhérine ou de p190 Rho-GAP dans les fractions enrichies en radeaux lipidiques préparées à partir des cellules HT-29 RacN17 cultivées 10 jours en milieu de différenciation. Au contraire ces protéines se retrouvent dans les radeaux lipidiques des cellules HT-29 différenciées (fractions n°3 et 4) (figure 37 A).

De plus, l'analyse par microscopie confocale de la localisation de la E-cadhérine et de la p120ctn indique que ces deux protéines ne colocalisent pas avec la toxine cholérique – FITC dans les cellules HT-29 Rac N17 différenciées (figure 37 B). Ces résultats indiquent que l'activité de Rac1 est nécessaire au recrutement de la E-cadhérine et de p120ctn dans les radeaux lipidiques mais n'est pas indispensable à la formation de radeaux lipidiques accompagnant la différenciation des cellules HT-29.

II.2.4. Le recrutement de p120ctn dans les radeaux lipidiques est nécessaire à la différenciation des cellules HT-29

L'expression d'un dominant négatif de Rac1 empêche le recrutement des protéines des jonctions adhérentes et leur maturation au sein des radeaux lipidiques. Or il est admis que la formation des jonctions adhérentes est un évènement primordial de la différenciation entérocytaire. Nous avons donc analysé la capacité des cellules HT-29 RacN17 à se différencier (figure 38). Pour cela nous avons suivi l'évolution de 2 marqueurs de la différenciation entérocytaire : l'activité phosphatase alcaline et l'expression et la distribution de la villine.

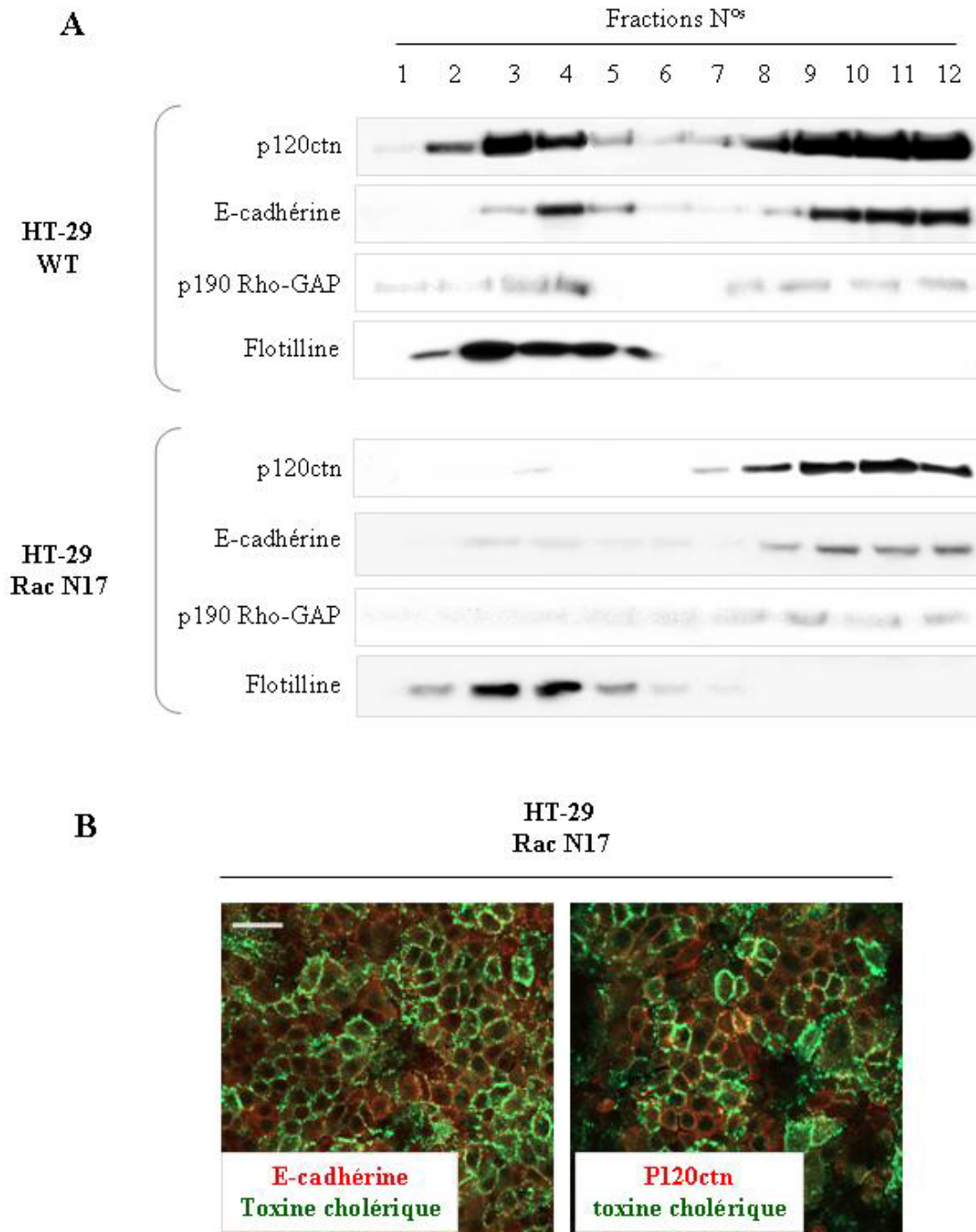


Figure 37 : L'activité de Rac1 est nécessaire au recrutement de la E-cadhérine, de la p120ctn et de p190 Rho-GAP au sein des radeaux lipidiques

A. Les lysats de cellules HT-29 sauvages (HT-29 WT) ou exprimant le dominant négatif RacN17 (HT-29 Rac N17) sont fractionnés sur gradient de sucrose discontinu et la quantité de p120ctn, E-cadhérine, p190 Rho-GAP et flotilline dans chacune des fractions est analysée par Western-blot.

B. Les cellules HT-29 Rac N17 différenciées 10 jours en milieu GAL sont perméabilisées, fixées et immunomarquées pour la E-cadhérine et la p120ctn. Les radeaux lipidiques sont marqués par la toxine cholérique-FITC et les cellules sont observées par microscopie confocale. Echelle = 100µm.

L'activité de la phosphatase alcaline augmente régulièrement au cours de la cinétique de différenciation des cellules HT-29 contrôles ou RacN17. Cependant pour la lignée HT-29 Rac N17 l'augmentation de l'activité phosphatase alcaline est retardée et diminuée d'environ 50% par rapport à la lignée HT-29 (figure 38 A). Concernant l'expression et la localisation apicale de la villine, nous avons observé une augmentation de son expression dans des lysats totaux de cellules HT-29 contrôles en cours de différenciation (WT) tandis que son niveau d'expression reste stable dans les cellules HT-29 Rac N17 (figure 38 B). De plus, l'analyse par microscopie confocale de la localisation de la villine révèle une redistribution de cette protéine au pôle apical des cellules HT-29 WT. Ce phénomène n'est pas observé dans les cellules HT-29 Rac N17 (figure 38 C). Ces résultats indiquent que le recrutement de p120ctn et son association avec la E-cadhérine dans les radeaux lipidiques, suite à l'activation de Rac1 est nécessaire à l'initiation de la différenciation des cellules HT-29.

III.3. Discussion

III.3.1. Radeaux lipidiques et différenciation

Le regroupement de protéines spécialisées au sein des radeaux lipidiques accompagne la différenciation de différents types cellulaires et permettent à ces cellules d'assurer des fonctions variées. Par exemple, lors de la maturation des lymphocytes T, les récepteurs immunitaires se regroupent au sein de radeaux lipidiques (Alonso & Millan, 2001); la formation de la gaine de myéline par les oligodendrocytes dépend également de la présence de microdomaines lipidiques (Simons et al, 2000) et la différenciation des monocytes en macrophages repose sur la quantité de GM1 présente à la membrane (Moreno-Altamirano et al, 2007). Nos résultats indiquent que la différenciation des cellules HT-29 s'accompagne de l'émergence et de la réorganisation des radeaux lipidiques à la membrane plasmique. Les gangliosides GM1 marqués par la toxine cholérique sont présents de façon uniforme dans les membranes plasmiques des cellules indifférenciées et se réorganisent en patches à partir de 4 jours de différenciation (figure 32). La présence de microdomaines lipidiques dans les entérocytes différenciées est bien connue et décrite principalement au niveau des bordures en brosse. Un grand nombre de protéines sont ainsi recrutées et regroupées au pôle apical des cellules. C'est le cas d'enzymes assurant la digestion des nutriments absorbés comme la sucrase isomaltase, le dipeptidyl peptidase IV ou les aminopeptidases N et A et de protéines transmembranaires impliquées dans le transport comme l'échangeur $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 3 ou des canaux ioniques (Danielsen & Hansen, 2003).

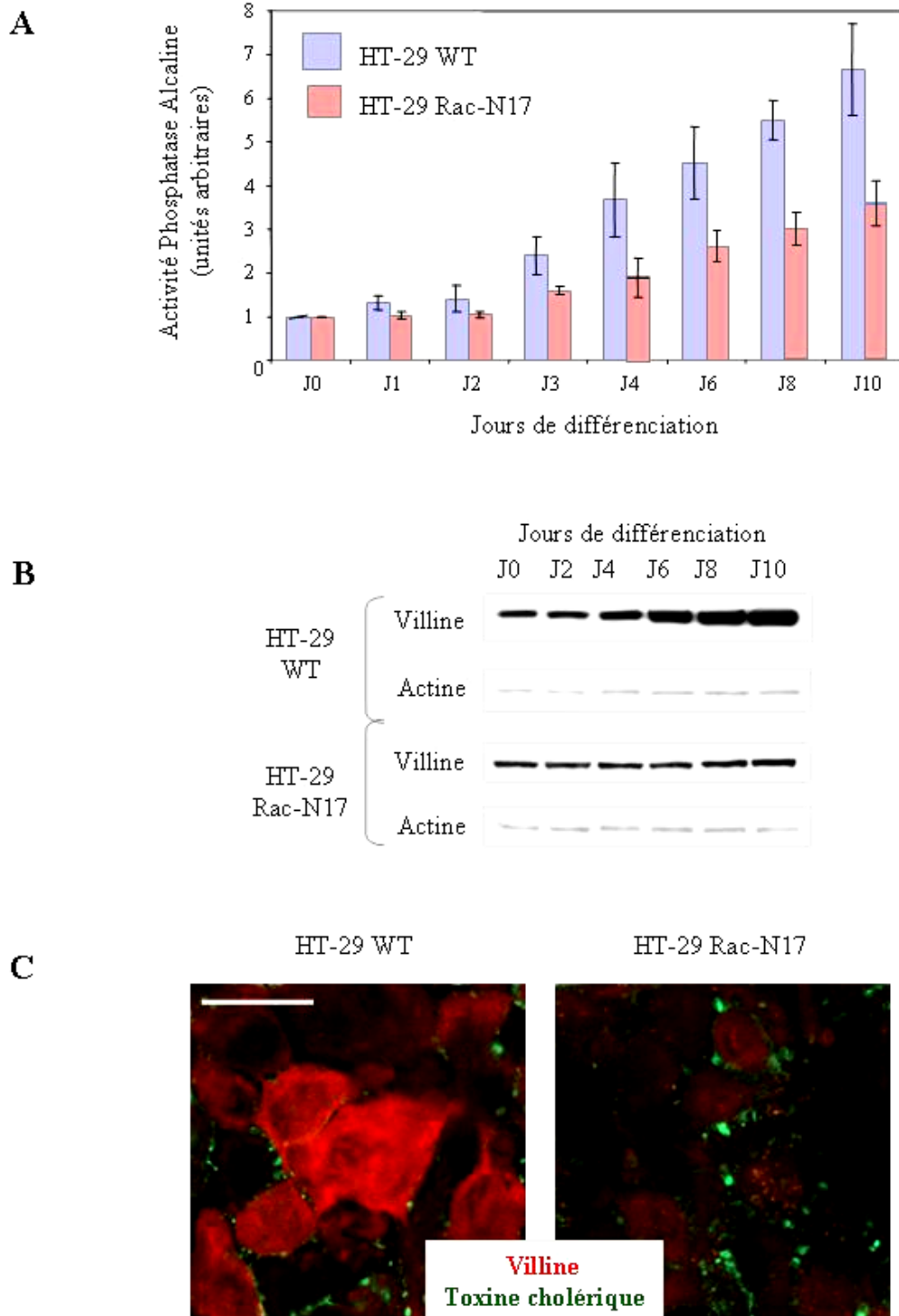


Figure 38 : L'activité de Rac1 favorise l'apparition de marqueurs de différenciation entérocytaire

A. Les cellules HT-29 WT ou HT-29 Rac N17 cultivées de 0 à 10 jours en milieu de différenciation GAL sont lysées et l'activité de la phosphatase alcaline endogène sur le pNPP est mesurée par absorbance à 405 nm.

B. L'expression de la villine est mesurée par Western-blot dans les lysats totaux de cellules HT-29 WT ou HT-29 Rac N17 de 0 à 10 jours en milieu de différenciation GAL. La détection de l'actine sert de contrôle interne.

C. Les cellules HT-29 WT ou HT-29 Rac N17 différenciées 10 jours en milieu GAL sont perméabilisées, fixées et immunomarquées pour la villine. Les radeaux lipidiques sont marqués par la toxine cholérique-FITC et les cellules sont observées par microscopie confocale. Echelle = 50µm.

La flottiline, dont la localisation évolue de vésicules intracellulaires comme le complexe de golgi ou des endolysosomes vers les radeaux lipidiques de la membrane plasmique pourrait participer au transport ou au recyclage de ces diverses protéines au pôle apical des cellules (Liu et al, 2004) .

L'observation des cellules HT-29 différenciées indiquent que ces radeaux lipidiques ne sont pas seulement formés à la membrane apicale des cellules mais peuvent également être localisés au niveau des membranes latérales, dans les zones de contacts intercellulaires. Les travaux de Nusrat et al., ont montré que des compartiments analogues aux radeaux lipidiques jouaient un rôle dans l'organisation des jonctions serrées et donc dans la perméabilité paracellulaire des cellules épithéliales (Nusrat et al, 2000). D'autre part, l'expression de la flottiline, est augmentée lors de la formation de contacts cellules-cellules dans les fibroblastes 3T3 (Lopez-Casas & del Mazo, 2003).

III.3.2. Recrutement des composants des jonctions adhérentes dans les radeaux lipidiques

Nos résultats indiquent que la E-cadhérine et la p120ctn colocalisent avec les radeaux lipidiques formés au niveau baso-latéral (figure 33). La purification de fractions enrichies en radeaux lipidiques a permis de confirmer ce résultat mais permet également de préciser la cinétique de recrutement de ces deux protéines au sein des microdomaines : la E-cadhérine est recrutée après 4 jours de différenciation et la p120ctn, plus tardivement, après 6 jours. Ces résultats sont en accord avec ce qui a pu être décrit dans les myoblastes où la N-cadhérine, une fois engagée et associée au cytosquelette d'actine peut être localisée dans des radeaux lipidiques, ce qui favorise la stabilité des jonctions adhérentes et la formation d'un complexe de signalisation intracellulaire (Causeret et al, 2005). Les précédents travaux développés au laboratoire ont montré qu'à 4 jours de différenciation des cellules HT-29, la E-cadhérine est déjà associée au cytosquelette d'actine et impliquée dans des interactions homophiliques (Chartier et al, 2006; Gout et al, 2004). Son association aux radeaux lipidiques à ce stade de différenciation est donc cohérente. Alors que les travaux sur les myoblastes indiquent que la localisation de la N-cadhérine dans ces microdomaines n'a pas d'effets sur son association aux caténines, nos résultats indiquent que l'association de p120ctn avec la E-cadhérine se fait essentiellement au niveau de ces structures une fois que les deux protéines sont recrutées. (figure 34). Ces contradictions peuvent être expliquées par le fait que la p120ctn peut également interagir avec la E-cadhérine en dehors des radeaux lipidiques, mais avec une

affinité moindre. De plus il a été montré que la p120ctn présente une meilleure affinité pour la E-cadhérine que pour la N-cadhérine (Anastasiadis & Reynolds, 2001), la régulation de l'interaction entre les deux types de cadhérines et la p120ctn est donc probablement différente. Toutefois, dans les deux cas, la localisation au sein des radeaux lipidiques des composants des jonctions adhérentes est associée à une stabilisation de ces complexes d'adhérence. Les radeaux lipidiques sont également capables de recruter d'autres protéines comme des protéines de signalisation au sein du complexe, ce qui pourrait favoriser leur renforcement ou leur dynamique. Ainsi, il a été démontré que la PI3K et Akt2 pouvait être localisée dans radeaux lipidiques de la bordure en brosse de cellules intestinales (Li et al, 2004). Or nous avons montré que la PI3kinase jouait un rôle important dans la mise en place des jonctions adhérentes ; et d'autres travaux ont montré qu'elle servait d'intermédiaire dans l'activation de voies de signalisation impliquées dans la différenciation intestinale (Rivard laprise).

Nous montrons ici qu'une autre protéine de signalisation, la protéine p190 Rho-GAP est présente avec la E-cadhérine et la p120ctn dans les fractions enrichies en radeaux lipidiques des cellules HT-29 différenciées. Son recrutement au niveau des jonctions adhérentes est dépendante de la p120ctn ainsi que de l'activation de Rac1 et permet l'inhibition locale de Rho A (Wildenberg et al, 2006). La p190 Rho-GAP est donc au centre d'une régulation antagoniste des GTPases monomériques, favorisant l'inhibition de RhoA suite à l'activation de Rac1 (Nimnual et al, 2003).

III.3.3. Régulation des GTPases RhoA et Rac1 au cours de la différenciation

Les GTPases monomériques de la famille Rho tiennent des rôles importants dans la formation des jonctions adhérentes en régulant la polymérisation de l'actine au niveau des jonctions (Braga, 2000). Ainsi, l'activité de Rac1 est nécessaire aux premiers stades de formation des jonctions adhérentes et assure la formation de filopodes permettant aux cellules voisines de créer les premiers contacts intercellulaires (Kovacs et al, 2002b). L'activation plus tardive de RhoA permet quand à elle le renforcement des jonctions et le rapprochement latéral des cadhérines en favorisant la contraction du cytosquelette d'actomyosine via son effecteur ROCK (Shewan et al, 2005). Les jonctions adhérentes, une fois formées sont également capables d'activer Rac1 qui va alors permettre d'assurer un rétrocontrôle positif sur les contacts intercellulaires en les stabilisant (Kovacs et al, 2002a).

Nous avons donc suivi l'activation des GTPases RhoA et Rac1 au cours de la différenciation des cellules HT-29 en milieu privé de glucose afin de discerner leur rôle dans

la différenciation entérocytaire et plus particulièrement dans la mise en place et le maintien des jonctions adhérentes (figure 36). Nos résultats indiquent que l'activation des deux GTPases est successive et exclusive : dans un premier temps, le taux de Rac 1 activé est fort tandis que celui de RhoA est faible, cette étape pourrait correspondre à la mise en place des contacts primaires par le biais des filopodes induits par Rac1. Ensuite le taux de rac1-GTP chute lors du second jour de différenciation tandis que celui de RhoA augmente, reflétant le renforcement des contacts intercellulaires. Un tel enchaînement dans l'activation de ces deux GTPases a également été observé dans les cellules myoblastiques C2C12 lors de la mise en place des contacts dépendants de la N-cadhérine (Comunale et al, 2007). Dans notre système, l'activation de Rac1 présente un second pic à 4 et 5 jours de différenciation, en même temps que le taux de RhoA chute. Cette seconde activation de Rac 1 est particulièrement intéressante et pourrait correspondre à un signal de maintien et de renforcement des jonctions adhérentes activé par l'interaction homophile des cadhérines elles-mêmes. De plus, c'est à cette période que la E-cadhérine puis la p120ctn et la p190 Rho-GAP sont progressivement recrutées au sein des radeaux lipidiques, ainsi l'activation de Rac1 pourrait favoriser la formation des radeaux lipidiques et/ou le recrutement des ces protéines à leur niveau. L'analyse de la lignée HT-29 RacN17 montre que l'expression du dominant négatif de Rac1 n'altère pas la formation des radeaux lipidiques, en revanche, elle perturbe le recrutement de la E-cadhérine, de la p120ctn et de la p190 Rho-GAP à leur niveau (figure 37). L'activité de Rac1 est donc nécessaire à la localisation des protéines des jonctions adhérentes dans les radeaux lipidiques. De façon intéressante, il a été démontré que lorsqu'elle est active, Rac1 est également présente à la membrane basale de cellules NIH 3T3 dans des domaines lipidiques enrichis en cholestérol (del Pozo et al, 2004). Il est donc possible que sa localisation dans des radeaux lipidiques au niveau des membranes apico-latérales facilite le recrutement des protéines des jonctions adhérentes. De plus, l'expression de Rac N17 retarde et inhibe l'apparition de marqueurs de différenciation comme l'activité de la phosphatase alcaline ou la localisation apicale de la villine (figure 38). Il est possible que cet effet résulte de l'incapacité de ces cellules à recruter les protéines des jonctions adhérentes au sein des rafts. En effet, la formation de jonction adhérentes stables et matures est impliquée dans les étapes ultérieures de différenciation entérocytaires comme la polarisation baso-apicale (Schreider et al, 2002). Nos résultats suggèrent que l'interaction entre la p120ctn et la E-cadhérine, qui a lieu préférentiellement au sein des radeaux lipidiques, pourrait être une étape favorisant la différenciation entérocytaire en aval de l'activation de Rac1.

Partie 2

Rôles de la p120ctn dans l'homéostasie des cellules HT-29

I- Problématique et expériences préliminaires :

Les composants des jonctions adhérentes peuvent être impliqués dans la régulation de l'homéostasie intestinale. En effet, l'expression de la E-cadhérine au niveau des villosités est associée à l'arrêt de la prolifération cellulaire et la mise en place de la différenciation entérocytaire. La β -caténine joue également un rôle central dans la régulation de la balance prolifération / différenciation puisque sa localisation cytoplasmique au sein des cryptes induit la transcription de gènes prolifératifs comme la cycline D1 ou c-myc par le complexe TCF/LEF. Au contraire, son recrutement à la membrane et son interaction avec la E-cadhérine participent à l'arrêt de la prolifération et à la différenciation cellulaire.

Les travaux présentés dans la première partie de ce manuscrit suggèrent que la p120ctn est également impliquée dans la régulation de la différenciation entérocytaire puisque la différenciation des cellules HT-29 est corrélée avec le recrutement de p120ctn au sein des jonctions. Il est donc possible qu'au même titre que la β -caténine, la protéine p120ctn puisse influencer plus ou moins directement la balance prolifération / différenciation et participer ainsi au contrôle de l'homéostasie intestinale.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons surexprimé la p120ctn-3A, décrite pour être l'isoforme épithéliale de la p120ctn, dans les cellules HT-29 (figure 39).

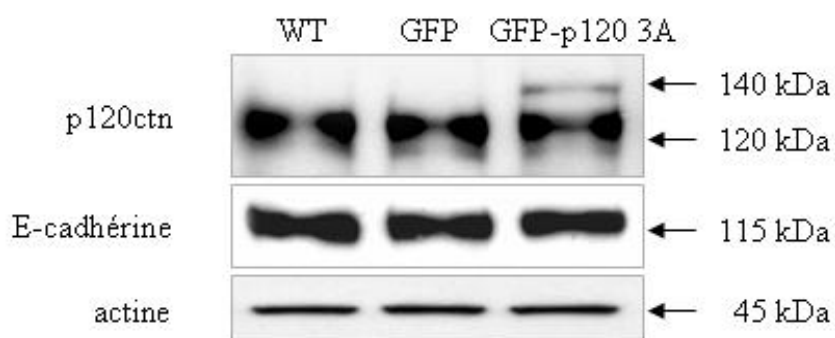


Figure 39 : surexpression de la p120ctn dans les cellules HT-29

Les taux de p120ctn, E-cadhérine et de l'actine sont observés par Western-Blot à partir de lysats totaux de cellules HT-29 sauvages ou surexprimant la GFP ou la GFP-p120ctn.

L'effet de cette surexpression sur l'apparition de marqueurs de différenciation entérocytaire a ensuite été testé et comparé aux cellules HT-29 indifférenciées ou différenciées après 10 jours de culture en milieu GAL (figure 40). Ces premiers résultats indiquent que les cellules qui surexpriment la p120ctn ne présentent pas d'augmentation d'activité de la phosphatase alcaline par rapport aux cellules contrôles. De plus le marquage de la villine par

immunofluorescence indique que sa localisation au pôle apical n'est pas augmentée dans les cellules HT-29 GFP-p120ctn, contrairement à ce qui a lieu dans les cellules HT-29 différenciées. Il semble donc que la surexpression de la p120ctn ne permette pas, à elle seule, l'expression de marqueurs de la différenciation entérocytaire au sein des cellules HT-29.

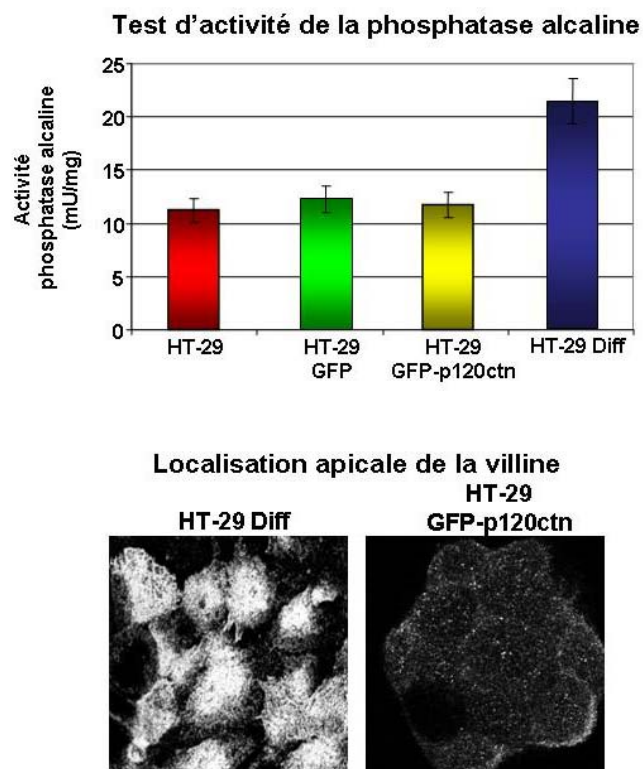


Figure 40: Effet de la surexpression de la p120ctn-3A sur l'apparition de marqueurs entérocytaires.
 Histogramme : l'activité spécifique de l'alkaline phosphatase est mesurée dans les cellules HT-29 sauvages indifférenciées (HT-29) ou différenciées 10 jours en milieu GAL (HT-29 Diff) ainsi que dans des cellules surexprimant la GFP (HT-29 GFP) et la GFP-p120ctn 3A (HT-29 GFP-p120ctn).
 Photos : la localisation apicale de la villine est analysée par immunofluorescence et observation au microscope confocal dans les cellules HT-29 différenciées 10 jours en milieu GAL (HT-29 Diff) ou surexprimant la GFP-p120ctn 3A (HT-29 GFP-p120ctn).

Toutefois, les cellules HT-29 sauvages expriment la p120ctn endogène à un niveau de base important. Si l'effet de la p120ctn sur la différenciation entérocytaire nécessite son interaction avec la E-cadhérine, la surexpression effectuée dans ces expériences n'a probablement aucune influence du fait que le taux de p120ctn endogène est suffisant pour interagir avec la E-cadhérine membranaire. L'extinction de l'expression de la p120ctn par l'utilisation de siRNA dirigé contre la p120ctn pourrait nous permettre de mieux répondre à cette question, ces expériences sont actuellement en cours.

Cependant, si la p120ctn ne semble pas avoir d'effets sur la différenciation entérocytaire, il est possible que, comme la β -caténine, elle puisse être impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire. En effet, des études récentes suggèrent que la localisation cytoplasmique de la p120ctn peut être associée à d'autres fonctions que l'adhérence ou la migration cellulaires. Ainsi, la surexpression de p120ctn induit une réduction de la prolifération de cellules d'hépatocarcinome humain en provoquant la baisse d'expression de la survivine et de la cycline D1 (Nong et al, 2006). De plus, dans les cellules mammaires cancéreuses la p120ctn est localisée dans les centrosomes lors de la mitose (Franz & Ridley, 2004). Le rôle de p120ctn dans les centrosomes n'a pas été identifié. Chacune de ces études a été réalisée dans des cellules cancéreuses où l'expression de la E-cadhérine est réduite, et dans lesquelles la balance entre le taux de cadhérines et le taux de p120ctn est dérégulée, menant à l'augmentation du taux cytoplasmique de p120ctn.

En surexprimant la p120ctn dans les cellules HT-29, nous perturbons également cette balance E-cadhérine/p120ctn. Il est donc possible que ce système présente des modifications dans la régulation de la prolifération cellulaire.

Cdk2/ cyclin E complex is involved in p120ctn-dependent cell growth control: a new role for p120ctn in cancer

N.T Chartier, C.I Oddou, M.G Lainé, B. Ducarouge, C.A Marie, M.R. Block and M.R. Jacquier-Sarlin*

From : 1: Centre de Recherche Inserm U823 Institut Albert Bonniot. *Equipe de la Dynamique des Systèmes d'Adhérence et de la Différenciation, Site Santé BP 170 La Tronche 38042 Grenoble, France* ; 2 : *Université Joseph Fourier, Grenoble 38000, France.*

* To whom correspondence should be addressed

Tel.: (+33) 476-54-95-52; Fax: (+33) 476-54-94-25

E-mail: jacquier-sarlin@ujf-grenoble.fr

Running title: p120ctn and cell cycle regulation.

Key words: p120ctn, centrosome, cyclin E, cancer, cell cycle, adhesion.

The abbreviations used are: p120ctn (p120catenin), cdk2 (cyclin-dependent-kinase 2), NPM (Nucleophosmin), GFP (Green Fluorescent Protein), CIN (chromosome instability).

Abstract

Depending on its cellular localization, p120ctn can participate in various processes such as cadherin dependent cell-cell adhesion, actin cytoskeleton remodeling and intracellular trafficking. Recent studies also indicate that p120ctn could regulate cell proliferation and contact inhibition. This report describes a new function of p120ctn in the regulation of cell cycle progression. Overexpression of p120ctn isoform 3A (p120ctn-3A) in human colon adenocarcinoma cells (HT-29) results in cytoplasm accumulation of the protein, as observed in many tumors. This cytoplasmic increase is correlated with a reduction in proliferation and inhibition of DNA synthesis. Under these conditions, experiments on synchronized cells revealed a prolonged S-phase associated with cyclin E stabilization. Both confocal microscopy and biochemical analysis showed that cyclin E and cdk2 colocalized with p120ctn in centrosomes during mitosis. These proteins are associated in a functional complex evidenced by co-immunoprecipitation experiments and the emergence of Thr¹⁹⁹-phosphorylated nucleophosmin/B23. Such post-translational modification of this centrosomal target has been shown to trigger the initiation of centrosome duplication. Therefore, p120ctn-mediated accumulation of cyclin E in centrosomes may participate in abnormal amplification of centrosomes and the inhibition of DNA replication, thus leading to aberrant mitosis and polyploidy. Since these modifications are often observed in cancer, p120ctn may represent a new therapeutic target for future therapy.

Introduction

E-cadherin is the main epithelial cell-cell adhesion molecule. Its loss of function or expression is observed during tumor progression and contributes to tumor cell invasion and metastasis (1, 2). The molecular basis for this epithelial phenotype “gatekeeper” function of E-cadherin is still unclear. The intracellular domain of E-cadherin interacts directly with β -catenin and p120 catenin (p120ctn) via distinct conserved binding domains. These interactions are necessary for dynamically regulating cell-cell adhesion by modulating events such as cadherin clustering and the connection with actin cytoskeleton, or by controlling cadherin endocytosis and metabolic stability (reviewed in (3)). Loss of E-cadherin might induce signaling by catenins released from the cell membrane. Indeed, β -catenin that is released from the membrane is rapidly degraded in the cytoplasm, or under the activation of the Wnt signaling pathway acts as an oncogenic transcription cofactor (4). In contrast, p120ctn level is not altered in cadherin deficient cells but the protein mislocalizes in the cytoplasm and/or the nucleus (5, 6). Abnormal localization of p120ctn in breast or colon carcinomas is prognostic for aggressive diseases (7, 8). In the cytoplasm, p120ctn has key roles in modulating Rho GTPases and thereby cytoskeletal and cell cycle functions (9). In the nucleus, p120ctn can interact with the transcription factor Kaiso and relieves its gene repression activity (10, 11). Mechanisms underlying the trafficking of p120ctn to and from these various locations are not elucidated. However, the recently described binding of p120ctn to kinesin and microtubules would affect both the targeting and the activity of p120ctn (12-14). Consistent with its interphasic microtubule localization, endogenous p120ctn was also found localized to the centrosomes and the mitotic spindle during mitosis in MDA-MB-231

breast adenocarcinoma cells (13). This peculiar localization suggests an implication of this catenin in cell cycle regulation.

Cell cycle progression is achieved through transient expression of cyclins that interact with cyclin-dependent kinases (cdk). It has been demonstrated that cyclin E is involved in both S phase entry and centrosome duplication. Cyclin E interacts with cdk2 and this complex phosphorylates several targets including nucleophosmin whose phosphorylated form is required for centrosome duplication (15). Cyclin E overexpression in human cancer cells increases the frequency of centrosome hyperamplification and by this way favors chromosome instability, emphasizing the importance of understanding the regulatory mechanism governing the faithful centrosome duplication in cells (16).

In the present study, we used the HT-29 human colon carcinoma cell line to examine the expression and function of p120ctn when the balance between E-cadherin and p120ctn was modified. We have shown that mislocalized p120ctn can interact with the cdk2-cyclin E complex within the centrosome leading to the stabilization of cyclin E levels. This effect was correlated with the inhibition of DNA replication, a delayed S phase, hyperamplification of centrosomes and finally polyploidy. Altogether, our observations revealed a new functional interaction and mechanism by which p120ctn may participate in tumor initiation and/or progression of colorectal carcinoma.

MATERIAL AND METHODS

Cell Culture

The human colon adenocarcinoma HT-29 cell line was cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in DMEM containing 25 mM glucose (Invitrogen/Gibco, Cergy Pontoise, France) and supplemented with 10% FCS, penicillin and streptomycin.

Antibodies and reagents

Monoclonal antibody against p120ctn (clone 98) and GFP were purchased from BD Biosciences/Transduction Laboratories (Pont de Claix, France). Anti-actin polyclonal antibodies (Cat. No.A2066), anti-BrdU (Clone BU-33), β -tubulin (Clone 2.1) and γ -tubulin (Clone GTU-88) monoclonal antibodies were obtained from Sigma Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). Anti-human E-cadherin (Clone HECD1) monoclonal antibody was obtained from Takara Biochemicals (Cambrex Bio Science, Paris, France). Polyclonal antibody directed against Aurora-A kinase was purchased from Calbiochem (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France), monoclonal anti-human cyclin E (Clone HE12) was from Upstate Biotechnology (Chemicon International, UK). Polyclonal anti-cdk2 antibody was purchased from BD Bioscience/Pharmingen and polyclonal antibody recognizing Nucleophosmin phosphorylated on Threonine 199 was from Cell signaling (Ozyme, Saint Quentin en Yveline, France). Alexa-conjugated goat anti-mouse secondary antibody was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Horse Radish Peroxydase-conjugated goat anti-mouse (1:3000) was from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France), donkey anti-rabbit (1:20000) and control IgG2A antibodies were from Jackson Immunoresearch (Immunotech, Marseille, France). Mouse and Rabbit Trueblot antibodies used as secondary antibodies (1:1000) in immunoprecipitation experiments were from eBioscience (Cliniscience, Montrouge, France). Nocodazole and Aphidicolin were purchased from Sigma Aldrich. MG132 was from Calbiochem.

Western Blot Analysis

Cells were lysed and extracts processed as previously described (17).. Primary antibodies dilutions were 1:1000 for p120ctn, GFP, cdk 2, E-cadherin, cyclin E and nucleophosmin , and 1:250 for Aurora A and actin.

Plasmids and cells transfections

The p120-3A cDNA (gift of PR. Albert B. Reynolds, Vanderbilt University) was extracted from PRc/RSV p120-3A plasmid by EcoRI and KpnI digestions and subcloned in pEGFP-C3 plasmid (BD bioscience). GFP-p120 3A cDNA and control GFP cDNA were amplified by PCR from pEGFP-C3 constructs and cloned into pEF6/V5/His-TOPO plasmid (InVitrogen). HT-29 cells were transfected with 1 µg of plasmid DNA using Lipofectamine 2000™ (InVitrogen) according to the manufacturer's instructions and seeded at one cell per well in a 96-well plates before selection with 5 µg/mL Blastiscidin . In this study, the HT-29 GFP-p120ctn cells represent the average of two independent clones.

Immunofluorescence microscopy

Cells grown on glass coverslips were treated as previously described.(17). Antibodies dilutions were: anti-β-tubulin (1:200), anti-γ-tubulin (1:500), anti- cyclin E, anti-cdk2 and anti-nucleophosmin (1:100) and 1:1000 for secondary antibodies.

Immunoprecipitations

Cells were lysed in 10 mM PIPES pH 6,8 ; 100 mM NaCl ; 300 mM sucrose ; 3 mM MgCl₂ 0,5% NP 40 and protease inhibitor cocktail for 10 min on ice. Extracts were immunoprecipitated using anti-cdk2 antibody and processed as described previously (17)

Cell numeration

Cells were seeded in 24-wells plates at $2 \cdot 10^4$ cells per well, trypsinized after the indicated times and mixed with Trypan blue solution (Sigma Aldrich) (1:1) to count living cells. All experiments were reproduced at least three times.

Caspase activity test

$1.6 \cdot 10^3$ cells were seeded in each well of a 96-wells plate and cell death was analyzed after the indicated times using Apo-One homogeneous Caspase 3/7 assay (Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturer's instructions. Fluorescence emission was quantified using a Fluoroskan Ascent (Thermo Fischer Scientific, Cergy Pontoise, France). All experiments were performed in triplicates.

BrdU incorporation and staining

Cells were exposed to BrdU (5 μ M) for 15 minutes at 37°C before trypsinization. After centrifugation the cell pellet was resuspended in 100 μ L of Glucose 1g/L in PBS, brought to 10^6 /mL with 70% ethanol and fixed for 30 minutes at 4°C. After centrifugation (1000 g, 10 min) cells were resuspended in 1mL PBS-Glucose, allowed to rehydrate 4 hours at 4°C and HCl 4N (1:1) was added for 15 minutes at RT. After centrifugation (1000 g, 10 min) cells were washed successively in 2 mL of PBS containing 0,1 M Sodium Tetraborate, 0.5% Tween 20, 0.5% BSA and in 2 mL of PBS-BSA-Tween (PBT). The pellet was incubated with anti-BrdU antibody (1:10) for 30 minutes at RT and then with Alexa 546 coupled antibody (1:500) for 30 minutes at RT. After washes with PBT, cells were analyzed by flow cytometry (Facstar, BD Bioscience).

Cell cycle analysis

2.10⁶ cells were fixed in 1 mL of cold absolute ethanol for 30 minutes at RT and left overnight in ethanol at 4°C. After centrifugation, pellet was resuspended for 20 min at 37°C in 1 mL of Propidium Iodide staining solution (50 µg/mL Propidium Iodide, 0.1% NP 40, 0.1 mg/mL RNase A in PBS) and stored at 4°C. Cells were then centrifuged (260 g, 5min) and resuspended in PBS before flow cytometry analysis (Facstar, BD Bioscience).

Centrosomes preparation

Cell centrosomal fractions were purified from 10⁸ cells pretreated 16 hours with 50 ng/mL nocodazole using a sucrose gradient according to the original protocol developed by Bornens and Moudjou (18). Fractions (500 µL) were collected from the bottom, numbered from 1 to 13; the remaining solution was collected as fraction 14.

Statistical analyses

All experiments were performed at least three times and student's *t* test was used for statistical analysis. Values are expressed as mean ± standard error of the mean and were considered statistically significant with a P value < 0.02.

RESULTS

Cytoplasmic localization of p120ctn after overexpression in HT-29 cells.

Cadherin deficiency does not significantly alter p120ctn levels but releases it in the cytoplasm and/or the nucleus where p120ctn is thought to promote cell migration, invasion and metastasis (19). To investigate the cellular roles of p120ctn in addition to cell adhesion, we modified the E-cadherin/p120ctn balance by overexpressing p120ctn in HT-29 human colon adenocarcinoma cell line.

HT-29 cells were stably transfected with the isoform 3A of p120ctn fused to GFP (Green Fluorescent Protein). Expression level of the construct was determined by Western-blotting (Figure 1A). In addition to the endogenous p120ctn (band around 120 kDa), anti-p120ctn antibody revealed in the GFP-p120ctn transfected HT-29 cells, an additional band of approximately 140 kDa corresponding to the expected size for the fusion protein (upper panel). Although transfection only resulted in a weak increase in the expression of p120ctn, GFP detection indicated that the GFP-p120ctn construction was not degraded (lower panel). Previous studies have described that p120ctn overexpression can stabilize cadherins at the plasma membrane and therefore increase their expression (5). Surprisingly, E-cadherin expression levels did not show any difference between control, GFP and GFP-p120ctn HT-29 cells. These results were further confirmed by FACS analysis (data not shown).

Analysis of GFP fluorescence by confocal microscopy indicated that while GFP protein was distributed evenly in the nucleus and cytoplasm in HT-29 GFP cells, GFP-p120ctn protein was preferentially localized at the plasma membrane with enhanced signals at cell-cell contacts and in the cytoplasm of HT-29 GFP-p120ctn cells (Figure 1B). Low fluorescence level was detected in the nucleus. The increased cytoplasmic distribution of both endogenous and exogenous p120ctn in HT-29 GFP-p120 cells was further confirmed by Western blotting after cell fractionation (Figure 1C).

These results suggest that in HT-29 cells, a moderate overexpression of p120ctn is sufficient to induce cadherins saturation by p120ctn without altering their expression and favors an increase in the cytoplasmic pool of p120ctn.

Overexpression of p120ctn slows down the progression of HT-29 cells through the cell cycle.

One of the cellular functions that can be regulated by cell adhesion molecules is the progression through the cell cycle (20). In the course of our experiments, we observed a growth delay in HT-29 GFP-p120ctn cells compared to HT-29 GFP cells. While HT-29 GFP cells typically reached confluency 120 hours after plating and formed a cell monolayer, GFP-p120ctn cells stayed in sparse clusters and never grew until full confluency (Figure 2A). To quantify this growth delay, an equal number of HT-29 GFP or HT-29 GFP-p120ctn cells was seeded and growth curves were established by counting alive cells every 24 hours (Figure 2B). During the first 48 hours of culture, the number of living cells increased slowly in HT-29 GFP cells, while this number did not vary in HT-29 GFP-p120ctn cells. After this lag period, the number of living cells increased in both populations although it was still lower in HT-29 GFP-p120ctn cells. Indeed at 96 hours, the number of living HT-29 GFP-p120ctn cells was reduced by 43% compared to HT-29 GFP cells. These data suggest a delayed progression in the cell cycle. Flow cytometry analysis of cells subjected to a short pulse of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation was performed to investigate the effects of p120ctn overexpression on DNA replication. Compared to control cells (HT-29 GFP), HT-29 GFP-p120ctn showed a significant decrease in BrdU incorporation into their nuclei (more than 33%), indicating a reduced rate of DNA replication, that may partly account for their delayed growth (Figure 2C).

Impairment in DNA replication slows down S phase progression. Thereby, we investigated the effects of p120ctn overexpression on cell cycle progression (Figure 2D). HT-29 GFP and GFP-p120ctn cells were synchronized at G1/S transition by aphidicolin treatment and then released by replacing the medium with complete medium supplemented with fresh serum. Flow cytometry analysis showed that HT-29 GFP cells progressed correctly through the cell cycle: the DNA content was totally duplicated when cells reached G2/M 8-10 hours after the release (75 % of cells were in G2/M) and a complete cycle was observed after 24 hours (Figure 2D, left panel). In contrast, HT-29 GFP-p120ctn cells remained arrested in G1/S up to 8 hours after aphidicolin release (90% of cells were in G1/S; Figure 2D, right panel). Subsequently, these cells progress into S phase but only 16% reached G2/M within 24 hours.

Taken together, these data indicate that the stable overexpression of p120ctn in HT-29 cells induces an overall cell growth reduction by negatively regulating their progression through the cell cycle.

Cyclin E is up-regulated in p120ctn overexpressing cells.

Cyclins and their catalytic subunits, the cyclin-dependent kinases, control cell cycle progression by regulating events that drive the transition between cell cycles phases. Among those the cdk2/cyclin E complex is involved in the G1/S transition and DNA replication (21, 22). The delayed transition observed in HT-29 GFP-p120ctn cells prompt us to examine cyclin E levels and subcellular distributions throughout cell cycle progression (Figure 3A and 3B). Western blotting analyses of cyclin E showed dynamic changes according to the cell cycle phases in HT-29 GFP cells: high cyclin E levels in G1/S-phase synchronized cells (0h) were followed by a sharp decrease after entry into the S and G2/M phases (from 2h to 10h) (Figure 3A, HT-29 GFP). Subsequently, the cyclin concentration increased again and reached a new steady state after re-entering into the G1 phase. In contrast, such a dynamic was not

observed in HT-29 GFP-p120ctn cells: the high level of cyclin E was maintained in these cells during the first 18 hours after aphidicolin release consistent with the observed persistence of the G1/S phase in HT-29 GFP-p120ctn cells (Figure 3A, HT-29 p120ctn). This plateau was followed by a slow decrease in the cyclin E content after S phase entry (from 18h to 24h). At the same time, the levels of cdk2 and p120ctn were constant during the cell cycle (Figure 3A). Confocal microscopy indicated that in asynchronous HT-29 GFP and HT-29 GFP-p120ctn cells, low amount of cyclin E was localized into cytoplasmic patches and nucleus (Figure 3B). After synchronization by aphidicolin, both cell lines displayed a strong nuclear staining for cyclin E. Following entry in S phase and during the G2/M phase (from 6h to 16h), the labeling of cyclin E became weaker and diffuse in the cytoplasm of HT-29 GFP cells (corresponding to the proteolytic degradation of the protein as previously evidenced by Western-blotting experiments). Vesicular cytoplasmic staining of cyclin E reappeared at 24h when cells entered in a new cell cycle (Figure 3B, upper panel). In HT-29 GFP-p120ctn cells, a weak nuclear staining was maintained up to 24h (Figure 3B, lower panel), in agreement with stabilization of the protein level (Figure 3A) and the persistence of cells in G1/S phase (Figure 2D).

The level of cyclin E is strictly regulated throughout the cell cycle by transcriptional and proteolytic mechanisms. Cyclin E is an unstable protein that is rapidly degraded by two different ubiquitin-dependent proteolysis pathways (23). Indeed, inhibition of the 26S proteasome with MG-132 8 hours after aphidicolin release resulted in the accumulation of cyclin E protein similarly to what was observed with HT-29 GFP-p120ctn cells. This suggests that the steady-state level of cyclin E in cells overexpressing p120ctn results from limited degradation of cyclin E (Figure 3C). Post-translational regulation was confirmed by RT-PCR experiments indicating that cyclin E/GAPDH mRNA ratios were similar in both cell types (data not shown).

Taken together, these observations strongly suggest that p120ctn overexpression results in S phase lengthening because of cyclin E level persistence due to impaired proteasome degradation and maintenance into the nucleus.

Cyclin E and p120ctn accumulate at centrosomes in HT-29 GFP-p120ctn cells.

Recently, cyclin E-dependent kinases have been implicated in the control of centrosome duplication, a process associated with their recruitment to this organelle (24). Interestingly, p120ctn was also shown to localize in centrosomes when its cytoplasmic pool was increased for instance in tumor cells (13, 14). The localization of p120ctn at centrosomes was suggested in our model by confocal microscopy on mitotic cells (Figure 4A). Double immunofluorescence analysis of GFP-p120ctn and β -tubulin showed the co-localization of both molecules at the mitotic furrow and centrosomes. Centrosomes from HT-29 GFP and GFP-p120ctn cells were then isolated by centrifugation on sucrose gradient (18). Immunoblot analysis of this fractionated gradient revealed that p120ctn was indeed present in fractions where centrosomes have been reported to sediment together with the centrosomal marker aurora A (Figure 4B).

We then compared the distribution of various endogenous proteins in centrosomal and membrane enriched fractions prepared from HT-29 GFP and HT-29 GFP-p120ctn cells (Figure 4C). Endogenous cyclin E, cdk2 and p120ctn were detected in the centrosomal fractions isolated from HT-29 GFP cells. Moreover, p120ctn overexpression resulted in increased amounts of cyclin E and cdk2 in these fractions when compared to the levels of aurora A used as centrosomal marker. (Figure 4C, histogram). Finally, E-cadherin and actin were only detected in the membrane-enriched fractions, indicating that little contamination if any with membranous or cytoplasmic proteins occurred in our centrosome preparation.

Altogether, our data confirm that p120ctn localizes to centrosomes and suggest the implication of this catenin in cyclin E and cdk2 regulation at this peculiar location.

The cyclin E/cdk2 complex is associated with p120ctn in centrosomes.

According to the former results we hypothesized that the increased level of cyclin E and cdk2 in centrosome could result from their association with p120ctn. A RXL motif is required for stable binding of cyclinE/cdk2 complexes to substrates (25, 26). Sequence analysis of p120ctn revealed the presence of 6 putative RXL motifs on the protein. Confocal analysis demonstrated that GFP-p120ctn co-localized with cyclin E and cdk2 in structures corresponding to centrosomes during mitosis (Figure 5A). To further determine whether p120ctn binds cyclinE/cdk2 complexes during mitosis, cdk2 was immunoprecipitated from synchronized HT-29 GFP and GFP-p120ctn cells, and association with cyclin E and p120ctn was assayed by immunoblotting (Figure 5B). The presence of cyclin E/cdk2/p120ctn complexes was evidenced in both cell types. As expected, normalized to the amount of immunoprecipitated cdk2, the association of p120ctn and cyclin E with cdk2 was respectively 6,5 and 2,5 fold greater in HT-29 GFP-p120ctn cells than in control. One of the main targets of cdk2/cyclin E at centrosomes is nucleophosmin (NPM), a protein that allows centrosome duplication when phosphorylated on Thr 199. Staining of HT-29 GFP-p120ctn cells with an antibody recognizing phospho-NPM (Thr 199) indicated that the phosphorylated protein was present in the cytoplasm and the centrosome of dividing cells (Figure 5C). The levels of phospho-NPM were then detected by Western-blotting in centrosomal and total fractions of HT-29 GFP or GFP-p120ctn cells (Figure 5D). Nucleophosmin was more phosphorylated in HT-29 GFP-p120ctn than in control cells suggesting that the increased recruitment of cdk2/cyclin E complex was functionally associated with the augmentation of its phosphorylation activity within the centrosomes.

P120ctn-mediated deregulation of cyclin E is associated with centrosome amplification and genomic instability.

P120ctn stabilization of cyclin E might also alter centrosome duplication since various reports indicated that cyclin E upregulation is often associated with such defect and genetic instability (16). To address this question, we immunomarked centrosomes with anti γ -tubulin and compared centrosome profiles of HT-29 GFP versus HT-29 GFP-p120ctn cells under confocal microscopy. While almost all dividing HT-29 GFP cells contained two centrosomes we reproducibly detected centrosome amplifications in HT-29 GFP-p120ctn cells (Figure 6A). Quantification revealed that the frequency of centrosome amplification in wild type HT-29 cells was low (< 2%) and the increase in the frequency of centrosome amplification in HT-29 GFP cells (<4%) was poorly significant. Conversely, more than 12% of HT-29 GFP-p120ctn cells showed a pronounced amplification of centrosomes (Figure 6B, left panel). Statistical analysis indicated that these cells displayed three to eight centrosomes with a peak of the histogram distribution at four centrosomes per cell (56%) (Figure 6B, right panel).

Observation by phase contrast microscopy showed an increasing number of multinucleated cells in HT-29 GFP-p120ctn (Figure 6C) indicating that p120ctn-mediated cyclin E overexpression was translated into mitosis dysfunctions and genetic instability. According to the time of culture, we noticed a decline in the percentage of these cells, a process which was correlated with an increase in caspase 3 activity (Figure 6D). These observations suggested that an apoptotic pathway was involved in the elimination of these multinucleated cells *in vitro*. Therefore, p120ctn overexpression induces centrosome amplification, and polynucleation, events that depend on impaired cyclin E proteolysis.

DISCUSSION

E-cadherin expression is frequently down-regulated in many tumors thus leading to the accumulation of cytoplasmic and/or nuclear catenins. Recently, Nong et al., described that overexpression of p120ctn in hepatoma cells can recruit β -catenin to membrane and cytoplasm while inhibiting cell proliferation by downregulating survivin and cyclin D1 expression (27). Wildenberg and al. have shown that the lack of p120ctn in NIH 3T3 allows these cells to proliferate in the absence of serum and reveals that p120ctn is involved in the regulation of cell contact inhibition (28). Moreover, the conditional knockdown of p120ctn in mouse epidermis leads to hyperplasia through NF κ B activation (29). The generation of stable cell lines overexpressing p120ctn allowed us to modify the E-cadherin/p120ctn balance thus leading to mislocalization of p120ctn which evidenced an unexpected role for p120ctn in cell cycle progression. It relies on cyclin E stabilization leading to its overexpression and accumulation in centrosomes together with p120ctn and cdk2 where they form a functional ternary complex. These data are consistent with a previous report that described p120ctn targeting in centrosomes of breast tumor cell (13). However the underlying mechanism is still unclear. Chun Shik Park and al. (26) have shown that β -catenin could interact directly with cdk2 via RXL motifs present in armadillo repeat domains. *In-Silico* analysis of p120ctn sequence has revealed that it contains 6 RXL motifs (data not shown) that could be involved in a p120ctn/cdk2 interaction.

Cyclin E plays an essential role in fundamental biological processes such as cell cycle control, DNA replication, apoptosis, and DNA repair (30). Therefore, its expression must be finely regulated throughout the cell cycle (31). We found that cyclin E down regulation was impaired in cells overexpressing p120ctn and accumulated in centrosomes suggesting that p120ctn protects it from proteasome degradation. In CHO cells the expression of CG-NAP/D,

an anchoring protein which localizes in centrosomes throughout the cell cycle, causes centrosome amplification by recruiting an abnormal high level of cyclin E-cdk2 complexes (32). In these cells, we found that endogenous p120ctn also colocalises with centrosomes (data not shown). Similarly to CG-NAP/D, it is possible that p120ctn recruits cyclin E-cdk2 complexes at centrosomes or alternatively modifies cyclin E association with cdk inhibitors, processes that have been described to strictly regulate the cyclin E-cdk2 activity (22). Whereas cyclin E overexpression is known to accelerate G1/S transition in different cell lines (33, 34), we observed a delay in S-phase progression associated with reduced proliferation of HT-29 cells overexpressing p120ctn in good agreement with other reports (33-36). This paradox can be explained by the role(s) played by cdks in regulating DNA replication (37). Indeed, high cyclin E-cdk2 activity was found to interfere with the assembly of prereplication complexes (preRC) leading to defects in replication initiation and possibly fork movement thereby slowing down the S phase (36).

Overduplication of centrosomes can occur during prolonged S-phases, when DNA replication is impaired and in primary tumors or cancer cell lines (38, 39). In many cases, a strong link between centrosome amplification and cyclin E overexpression was described (32, 40). Our data revealed that the number of centrosomes is increased in cells that overexpress p120ctn. Nucleophosmin (NPM)/B23, a chaperonin abundantly found in the nucleolus was identified as the primary target of cdk2/cyclin E in the initiation of centrosome duplication (15, 41). We noticed an increase in nucleophosmin phosphorylation on Threonin 199 strongly suggesting that the p120ctn-mediated cdk2/cyclin E complex is active in centrosomes and may be directly responsible for centrosome amplification. P120ctn-mediated elevated levels of cyclin E could affect processes involved in the faithful duplication and segregation of chromosomes and may generate chromosome instability (CIN) as described by Lengauer (42). This hypothesis fits with the significant levels of aneuploidy observed in both fibroblasts and

epithelial cells upon cyclin E ectopic expression (35). Interestingly, as for tumoral cells, overexpression of p120ctn in normal rat intestinal cells (IEC) leads to a reduction of proliferation and an increase in cyclin E expression which accumulates together with p120ctn in centrosomes. These effects correlate with the apparition of p120ctn positive polyploid cells (Supplementary data 1). It thus appears that changes in protein stability might be the major reason for cyclin E dependent effects of p120ctn overexpression in our biological system (normal and tumoral cells) and may explain the chromosome instability observed in many human colorectal cancers (43). Indeed, cyclin E was found overexpressed in several solid tumors (reviewed in (44)), this appeared to be a prognostic marker for poor outcome in breast cancer, and correlates with increased tumor progression (45). Our observations suggest that the frequency of p120ctn-mediated polyploidy in normal cells may represent an early phenomenon that could contribute to tumor initiation. *Ex vivo*, HT-29 cells expressing these supernumerary centrosomes represent only 10-15% of the total population. However this population remains constant, reflecting equilibrium between new cells that acquired this phenotype and aged cells that died (after 140h of culture, around 15% of cells died by a caspase-dependent process). *In vivo*, the situation is quite different since the number of cells presenting an abnormal duplication of chromosomes increases with tumor progression (46).

Recent reports support a significant relationship between deregulation of cyclin E protein levels and the development of human cancers (47). It would be interesting to analyze the expression and the distribution of p120ctn in these tumors in order to determine whether this catenin is the primary cause of cyclin E up-regulation. A study performed in the breast cancer cell line MDA-MB-468 indicated a link between cyclin E and adhesive properties evidenced by changes in adhesion associated genes expression (48). Surprisingly, although cyclin E overexpression is associated with an aggressive phenotype it significantly decreased the invasive potential of MDA-MB-468 cells compared to control clones. Interaction of

p120ctn with cyclin E-cdk2 complex may modulate catenin capacity to regulate Rho-GTPases activities responsible for cytoskeletal reorganization and therefore impaired migration. Recent report from Bellovin et al. (8) performed on 557 tumors, indicated that p120ctn expression was sustained in the majority of colorectal carcinomas and that its cytoplasmic localization was a statistically significant indicator of advanced disease. Interestingly, there were relatively few tumors that exhibited a loss of p120ctn expression (5.4%).

Mechanistically, p120ctn seems to contribute to invasiveness and tumor progression via various independent ways consisting in (i) p120ctn association-dependent regulation of mesenchymal cadherin levels (49); (ii) p120ctn-mediated regulation of Rho GTPases (9);(iii) p120ctn-dependent release of kaiso-mediated repression of gene expression (50). All together, our results provide new arguments for the importance of p120ctn in cancer progression: on one hand its centrosomal distribution could contribute to aberrant centrosome duplication and cell cycle progression, both leading to genomic instability; on the other hand its cytoplasmic localization could increase invasiveness and migration. Since these modifications are often observed in cancer, p120ctn may represent a new therapeutic target for future therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Géraldine Pawlak and Xavier Renot for their constructive critics, Alexei Grichine and Brigitte Peyrusse for their excellent technical assistance for confocal microscopy and the reprography artwork.

Grant support: Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer (Comité de Savoie). N. Chartier is the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

REFERENCES

1. Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001;3:289-93.
2. 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.
3. Reynolds AB, Carnahan RH. Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15:657-63.
4. Waltzer L, Bienz M. The control of beta-catenin and TCF during embryonic development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18:231-46.
5. Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, *et al.* Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* 2000;148:189-202.
6. van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, van Roy F. Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7980-5.
7. Sarrio D, Perez-Mies B, Hardisson D, *et al.* Cytoplasmic localization of p120ctn and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from preinvasive to metastatic lesions. *Oncogene* 2004;23:3272-83.
8. Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL, Mercurio AM. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Res* 2005;65:10938-45.
9. Anastasiadis PZ. p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:34-46.
10. Daniel JM, Reynolds AB. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol* 1999;19:3614-23.
11. van Roy FM, McCrea PD. A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? *Nat Rev Cancer* 2005;5:956-64.
12. Chen X, Kojima S, Borisy GG, Green KJ. p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol* 2003;163:547-57.
13. Franz CM, Ridley AJ. p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubule binding and Rho GTPase regulation. *J Biol Chem* 2004;279:6588-94.
14. Yanagisawa M, Kaverina IN, Wang A, Fujita Y, Reynolds AB, Anastasiadis PZ. A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function. *J Biol Chem* 2004;279:9512-21.
15. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, *et al.* Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 2000;103:127-40.
16. Kawamura K, Izumi H, Ma Z, *et al.* Induction of centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression. *Cancer Res* 2004;64:4800-9.
17. Chartier NT, Laine M, Gout S, *et al.* Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. *Journal of cell science* 2006;119:31-46.
18. Bornens M, Moudjou M. Studying the composition and function of centrosomes in vertebrates. *Methods Cell Biol* 1999;61:13-34.
19. Reynolds AB, Roczniak-Ferguson A. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene* 2004;23:7947-56.
20. Pugacheva EN, Roegiers F, Golemis EA. Interdependence of cell attachment and cell cycle signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:507-15.

21. Sauer K, Lehner CF. The role of cyclin E in the regulation of entry into S phase. *Prog Cell Cycle Res* 1995;1:125-39.
22. Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:676-84.
23. Won KA, Reed SI. Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Embo J* 1996;15:4182-93.
24. Lacey KR, Jackson PK, Stearns T. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2817-22.
25. Adams PD, Sellers WR, Sharma SK, Wu AD, Nalin CM, Kaelin WG, Jr. Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol* 1996;16:6623-33.
26. Park CS, Kim SI, Lee MS, *et al.* Modulation of beta-catenin phosphorylation/degradation by cyclin-dependent kinase 2. *J Biol Chem* 2004;279:19592-9.
27. Nong CZ, Pan LL, He WS, Zha XL, Ye HH, Huang HY. P120ctn overexpression enhances beta-catenin-E-cadherin binding and down regulates expression of survivin and cyclin D1 in BEL-7404 hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2006;12:1187-91.
28. Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, *et al.* p120-Catenin and p190RhoGAP Regulate Cell-Cell Adhesion by Coordinating Antagonism between Rac and Rho. *Cell* 2006;127:1027-39.
29. Perez-Moreno M, Davis MA, Wong E, Pasolli HA, Reynolds AB, Fuchs E. p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin. *Cell* 2006;124:631-44.
30. Mazumder S, DuPree EL, Almasan A. A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4:65-75.
31. Ekholm SV, Zickert P, Reed SI, Zetterberg A. Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. *Mol Cell Biol* 2001;21:3256-65.
32. Nishimura T, Takahashi M, Kim HS, Mukai H, Ono Y. Centrosome-targeting region of CG-NAP causes centrosome amplification by recruiting cyclin E-cdk2 complex. *Genes Cells* 2005;10:75-86.
33. Ohtsubo M, Roberts JM. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 1993;259:1908-12.
34. Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 1994;14:1669-79.
35. Spruck CH, Won KA, Reed SI. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* 1999;401:297-300.
36. Ekholm-Reed S, Mendez J, Tedesco D, Zetterberg A, Stillman B, Reed SI. Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *J Cell Biol* 2004;165:789-800.
37. Woo RA, Poon RY. Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* 2003;2:316-24.
38. Fukasawa K. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett* 2005;230:6-19.
39. Balczon R, Bao L, Zimmer WE, Brown K, Zinkowski RP, Brinkley BR. Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* 1995;130:105-15.
40. Hinchcliffe EH, Li C, Thompson EA, Maller JL, Sluder G. Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* 1999;283:851-4.

41. Tarapore P, Okuda M, Fukasawa K. A mammalian in vitro centriole duplication system: evidence for involvement of CDK2/cyclin E and nucleophosmin/B23 in centrosome duplication. *Cell Cycle* 2002;1:75-81.
42. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386:623-7.
43. Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:695-701.
44. Akli S, Keyomarsi K. Cyclin E and its low molecular weight forms in human cancer and as targets for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2003;2:S38-47.
45. Porter PL, El-Bastawissi AY, Mandelson MT, *et al.* Breast tumor characteristics as predictors of mammographic detection: comparison of interval- and screen-detected cancers. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:2020-8.
46. Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, *et al.* Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:1978-83.
47. Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 2005;24:2776-86.
48. Berglund P, Landberg G. Cyclin e overexpression reduces infiltrative growth in breast cancer: yet another link between proliferation control and tumor invasion. *Cell Cycle* 2006;5:606-9.
49. Yanagisawa M, Anastasiadis PZ. p120 catenin is essential for mesenchymal cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness. *J Cell Biol* 2006;174:1087-96.
50. Kelly KF, Spring CM, Otchere AA, Daniel JM. NLS-dependent nuclear localization of p120ctn is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression. *Journal of cell science* 2004;117:2675-86.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Overexpressed p120ctn accumulates in the cytoplasm

(A) Wild-type HT-29 cells (HT-29 WT) were transfected with pEF6-GFP (HT-29 GFP) or pEF6-GFP-p120ctn (HT-29 GFP-p120ctn). Expression levels of p120ctn, GFP and E-cadherin were analyzed by Western-blotting whole cell lysates. Actin blotting was used as a loading control. (B) GFP or GFP-p120ctn HT-29 cells cultured for 48h on coverslips were fixed in 3% paraformaldehyde before confocal microscopy analysis, bar is 50 μ m. (C) Total GFP or GFP-p120ctn cell lysates were separated in cytoplasmic and membrane associated fractions and detection of endogenous and exogenous p120ctn was achieved by Western-Blotting.

Figure 2. Overexpression of p120ctn slows down HT-29 cell proliferation.

(A) HT-29 GFP and HT-29 GFP-p120ctn cells were cultured for 120 hours and observed under phase contrast microscopy, bar is 50 μm . (B) HT-29 GFP and HT-29 GFP-p120ctn cells were seeded at 2.10^4 cells per well, grown for the indicated times and living cells were then counted using trypan blue solution. Each point is the mean \pm s.e. of three independent experiments. (C) BrdU incorporation assay. 5 μM BrdU was added for 15 minutes to the culture medium of 24 hours pre-cultured HT-29 GFP (dark grey line) or HT-29 GFP-p120ctn (grey line) cells. After fixation and BrdU immunostaining, positive cells were counted using a Becton Dickinson Facstar flow cytometer. Control cells that were not treated with BrdU were used as negative control (black line). (D) HT-29 GFP (left panel) or HT-29 GFP-p120ctn (right panel) cells were synchronized at G1/S transition with Aphidicolin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 24h) and released in fresh medium for the indicated time. DNA content was then analyzed by FACS after iodure propidium staining. Histograms indicate the percentage of cells in G1, S and G2/M phases.

Figure 3. Cyclin E protein is stabilized by p120ctn overexpression.

(A) Asynchronized HT-29 GFP or HT-29 GFP-p120ctn cells (asy) or cells synchronized at G1/S transition with Aphidicolin blockade and released in fresh medium for indicated times were lysed. Total lysates were analyzed for cyclin E, cdk2, p120ctn and actin expression by Western-blotting. Histograms represent the densitometric ratio of cyclin E to actin levels (mean \pm s.e. of three independent experiments). (B) In parallel the cells were immunostained for cyclin E and analyzed by confocal microscopy. Bar is 50 μm . (C) G2/M enriched GFP cells were treated or not with the indicated concentrations of proteasome inhibitor MG132. Then total cell lysates were analyzed for cyclin E and cdk2 expression by Western-blotting. Actin staining was used as a loading control.

Figure 4. P120ctn localizes to the mitotic furrow and the centrosomes in mitotic HT-29 cells.

(A) HT-29 GFP (upper panels) and HT-29 GFP-p120ctn cells (lower panels) were grown for 48 hours on coverslips, fixed with 3% paraformaldehyde and immunostained for β -tubulin before confocal microscopy observation. DNA was stained in blue with DAPI. Chosen fields are representative of mitotic cells in each condition. Bar is 10 μ m. (B) Centrosomes fractions were enriched from mitotic HT-29 GFP-p120ctn cells using a discontinuous sucrose gradient (see material and methods). Antibodies against p120ctn and Aurora A were used for Western-blotting analyses of each collected fractions. (C) Centrosomes and cell membranes enriched fractions obtained from the previously described discontinuous sucrose gradient were analyzed by Western-Blotting using antibodies against p120ctn, cyclin E, cdk2, aurora A, E-cadherin and actin. Histograms represent the densitometric ratio of p120ctn, cyclin E and cdk2 to Aurora A levels in centrosomal fractions (mean \pm s.e. of three independent experiments).

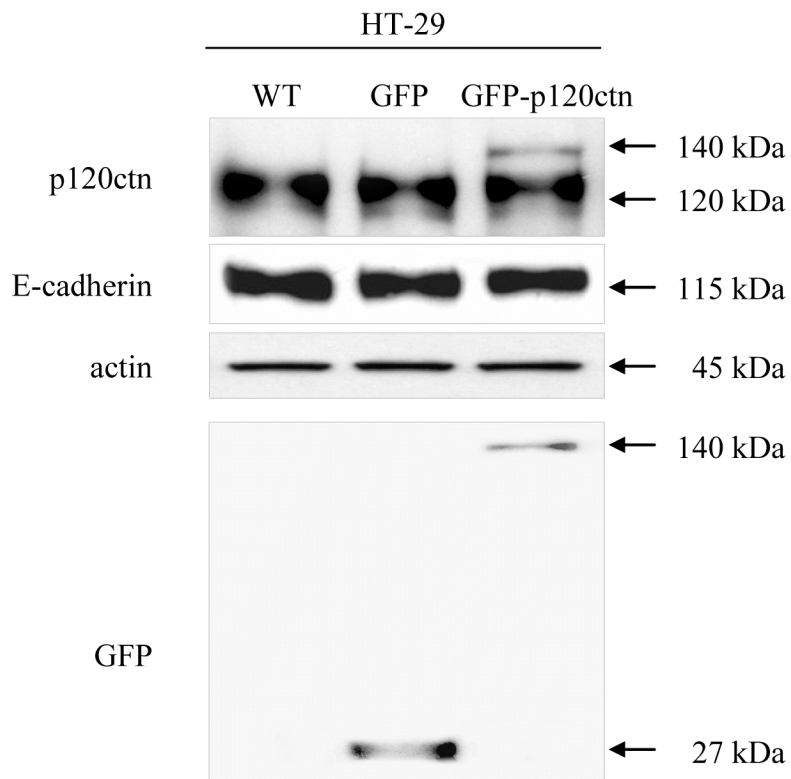
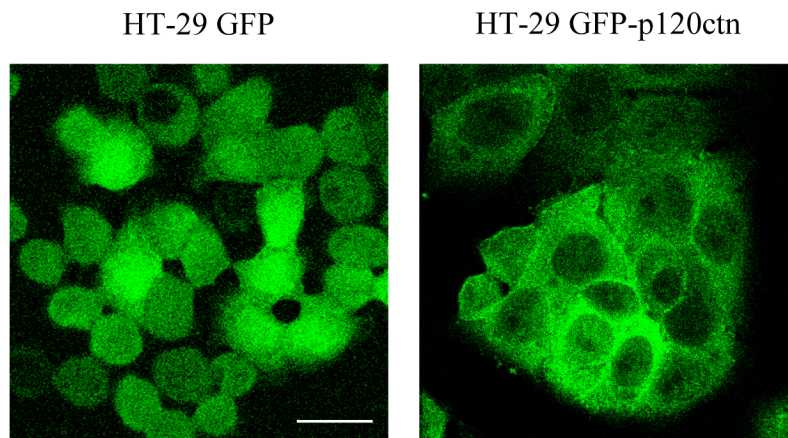
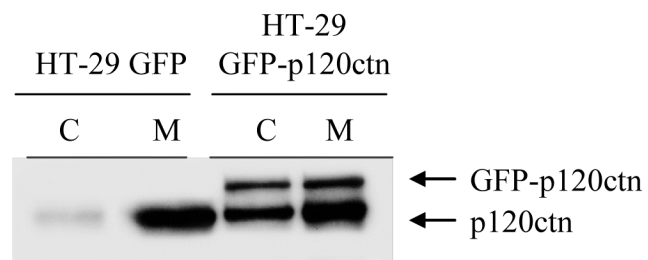
Figure 5. P120ctn interacts with the cdk2 / cyclin E complex.

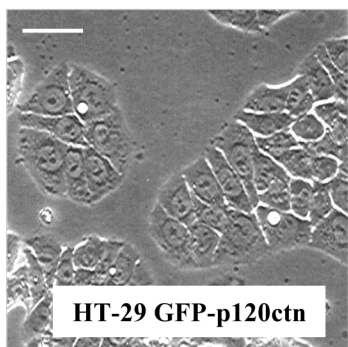
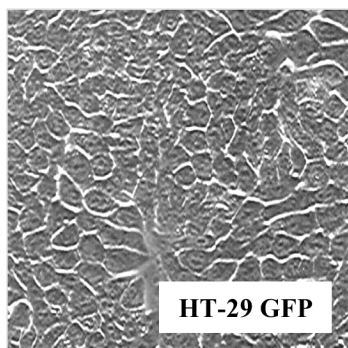
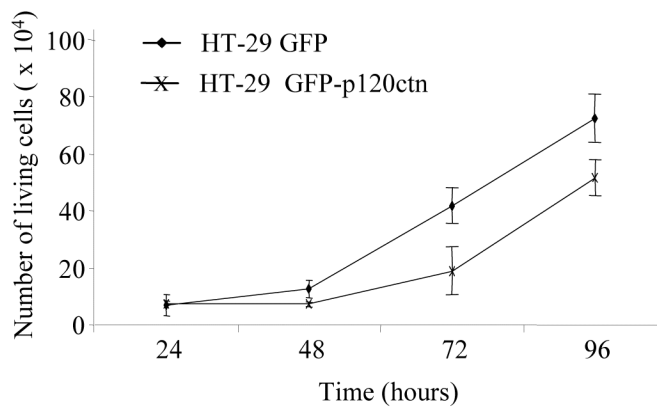
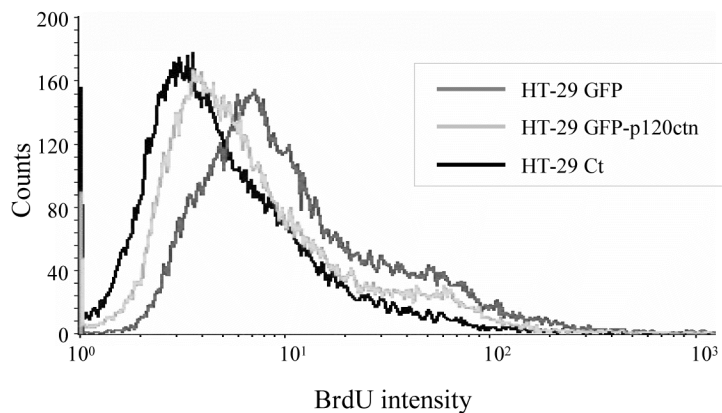
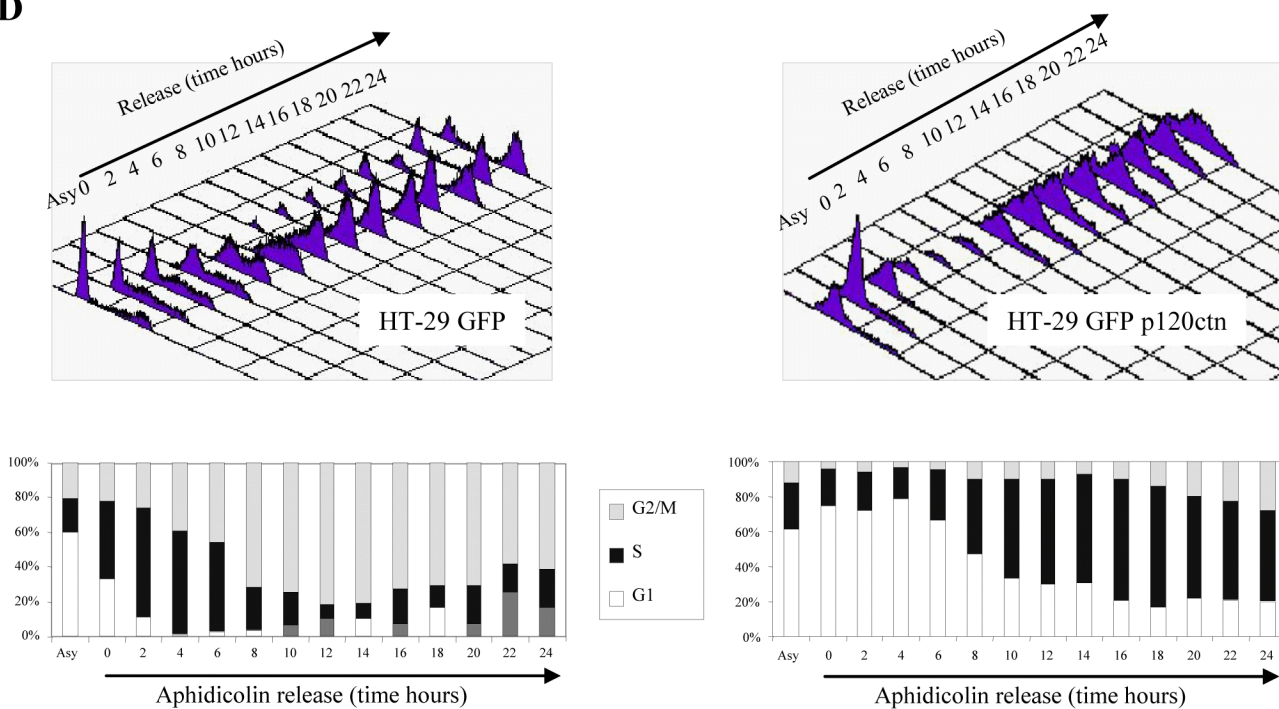
HT-29 GFP-p120ctn cells were grown for 48 hours on coverslips, fixed with 3% paraformaldehyde and immunostained for cyclin E and cdk2 (A) or phospho-nucleophosmin (C) before confocal microscopy analysis. DNA was stained in blue with DAPI. Bar is 10 μ m. (B) HT-29 GFP or GFP-p120ctn cells were synchronized at G1/S transition with Aphidicolin and released in fresh medium for 6 hours. Cdk2 was immunoprecipitated from total cell lysates and levels of p120ctn, cyclin E and cdk2 were detected by western blotting. Histograms represent the densitometric ratio of cyclin E and p120ctn to immunoprecipitated cdk2 levels. This experiment was reproduced at least three times. (D) Centrosomes-enriched and total fractions from HT-29 GFP and GFP-p120ctn cells were analyzed by Western-

Blotting using antibodies against nucleophosmin phosphorylated on threonin 199 (upper panel). Coomassie blue staining of the transferred membrane was used as a loading control (bottom panel).

Figure 6. P120ctn overexpression leads to overduplication of centrosomes and polyploidy.

(A) HT-29 GFP-p120ctn cells were grown for 48 hours on coverslips, fixed with 3% paraformaldehyde and immunostained for γ -tubulin before confocal microscopy observation. Bar is 10 μ m. (B) The number of centrosomes per mitotic cell was then quantified under confocal microscopy. Multipolar mitotic cells were represented as the percentage of total mitotic cells (n=200). Student's *t* test, * P<0.02 (left panel). Histogram showing the repartition of HT-29 GFP-p120ctn cells with supernumerary centrosomes. (n=200) (right panel). (C) Poly nuclear HT-29 GFP-p120 cells were observed under phase contrast microscopy after 48 hours of culture. (D) Caspase 3/7 activity was analysed using Apo-One homogeneous assay (Promega) in HT-29 GFP or HT-29 GFP-p120ctn cells according to the manufacturer's instructions. Fluorescence emission at 527 nm was quantified using a Fluoroskan Ascent (Thermo scientific). All experiments were performed in triplicates.

A**B****C****Figure 1**

A**B****C****D****Figure 2**

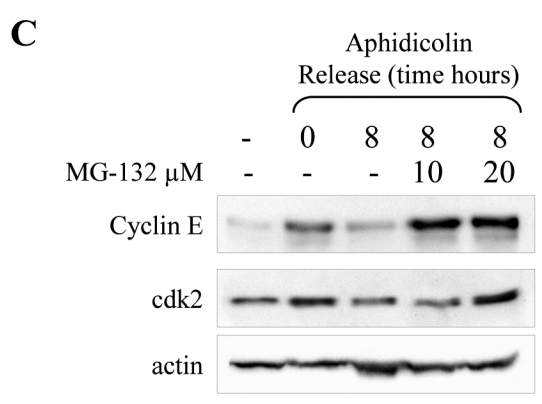
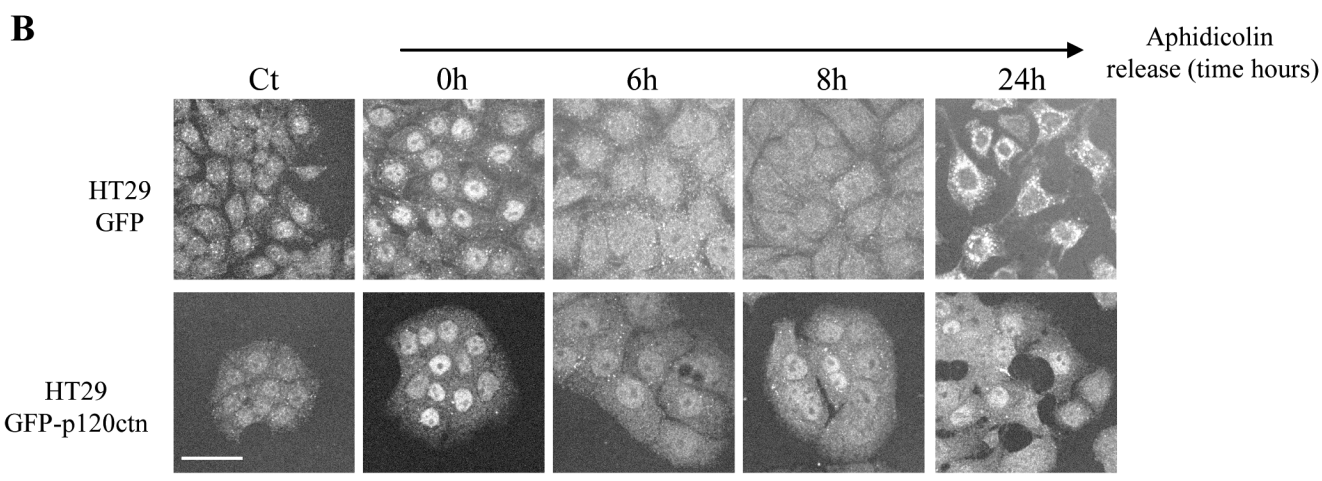
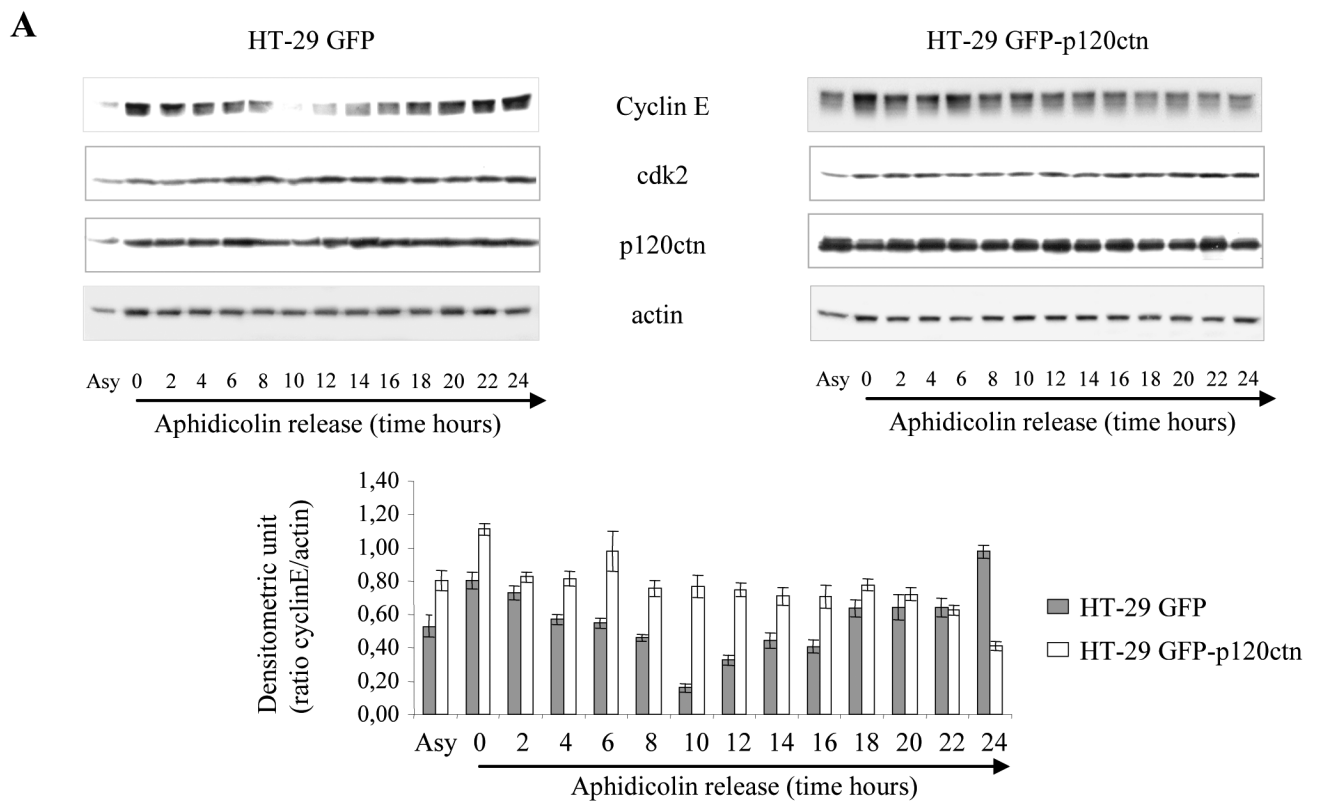


Figure 3

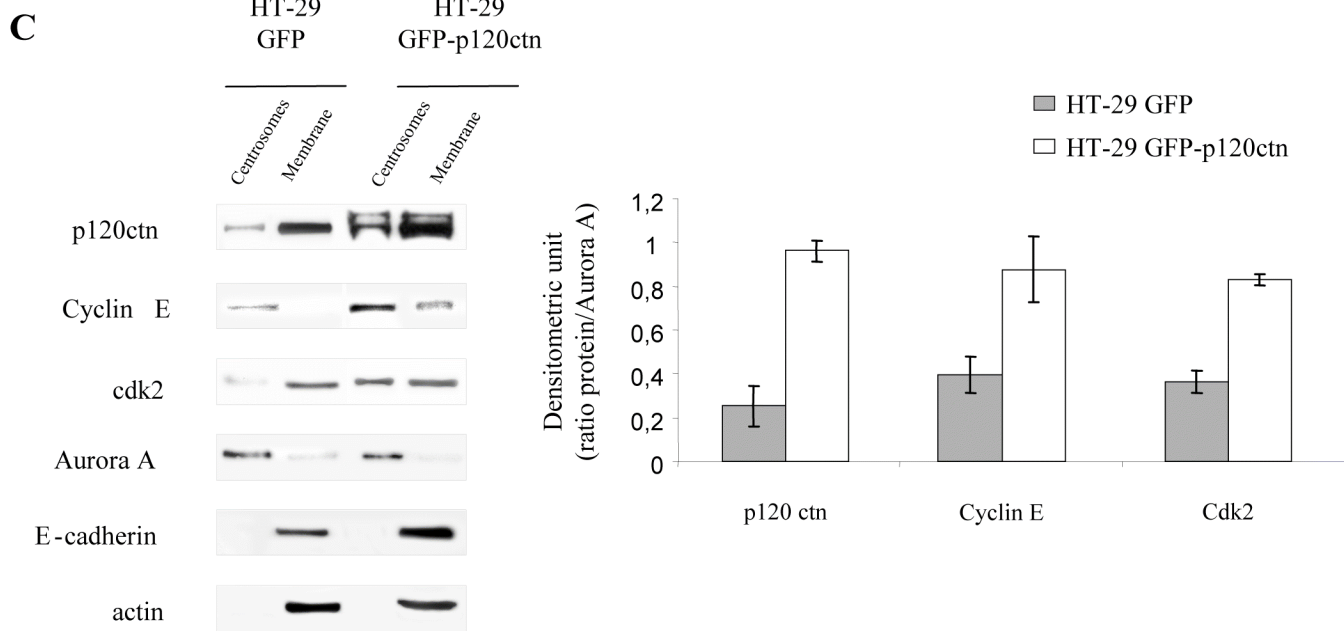
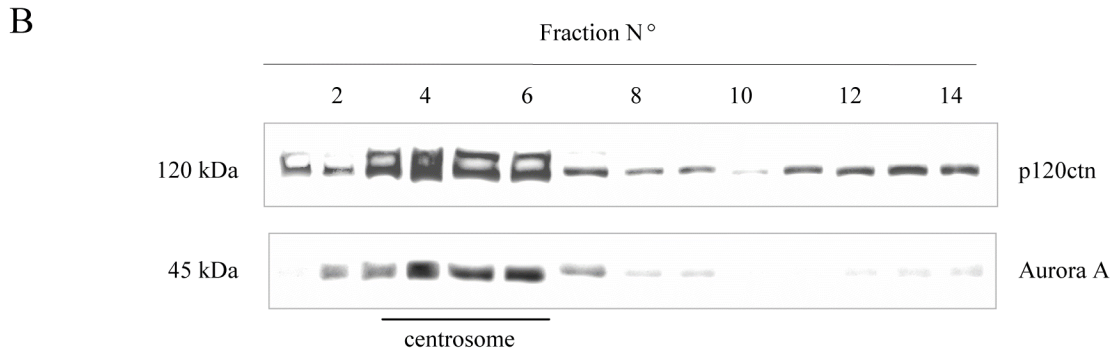
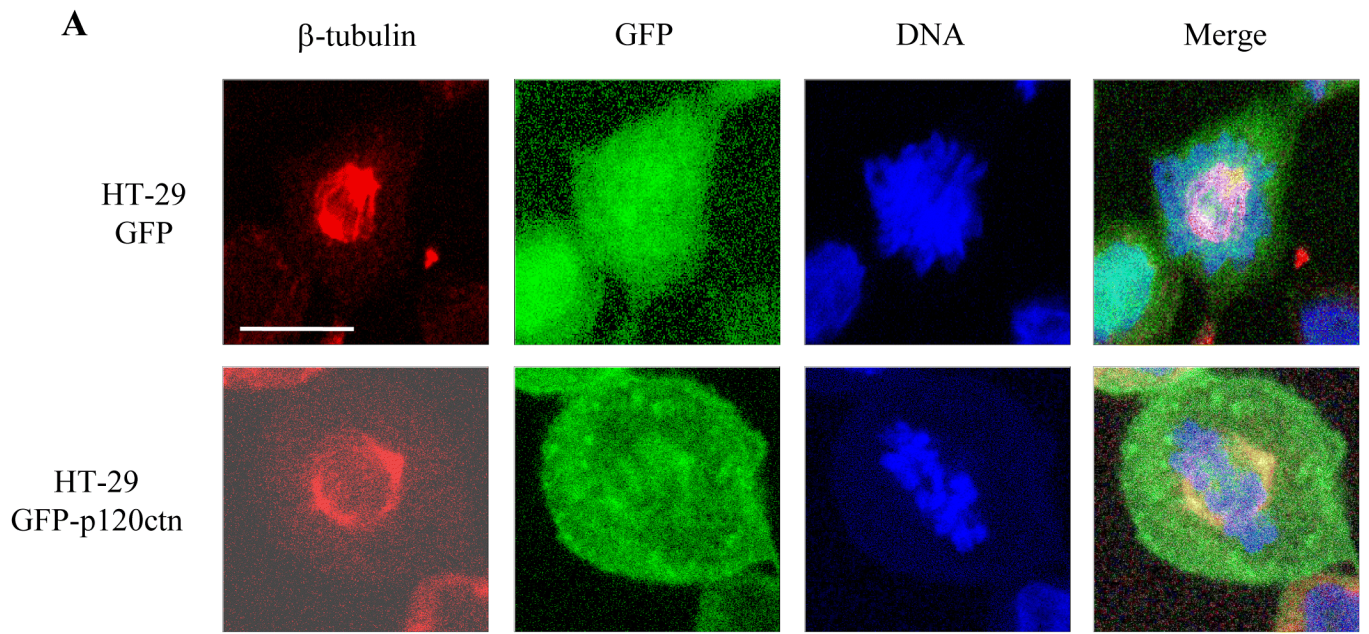


Figure 4

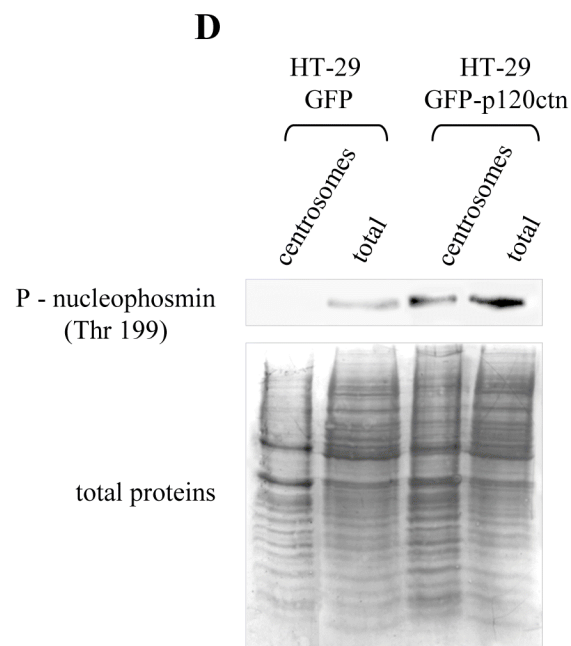
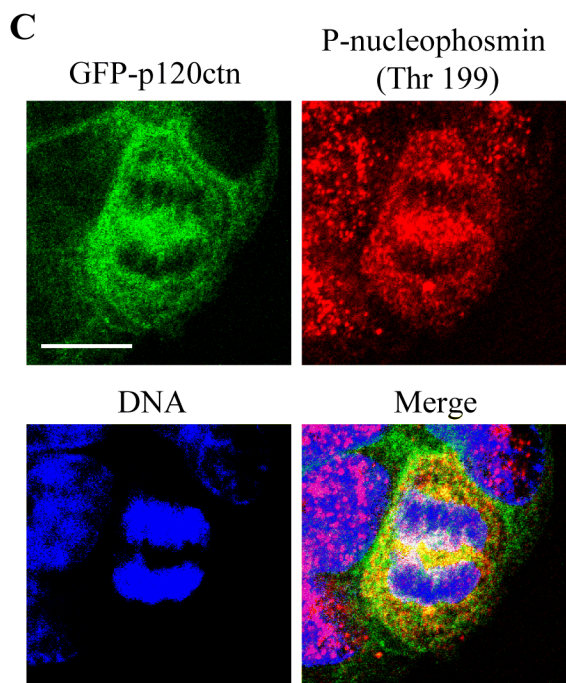
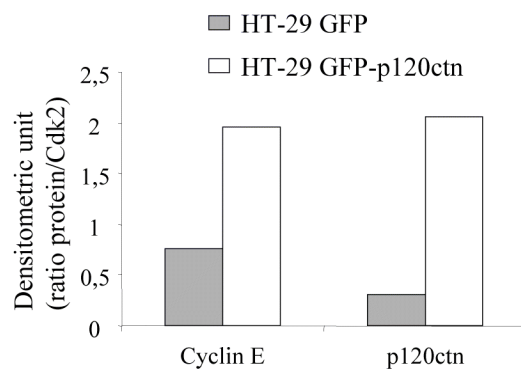
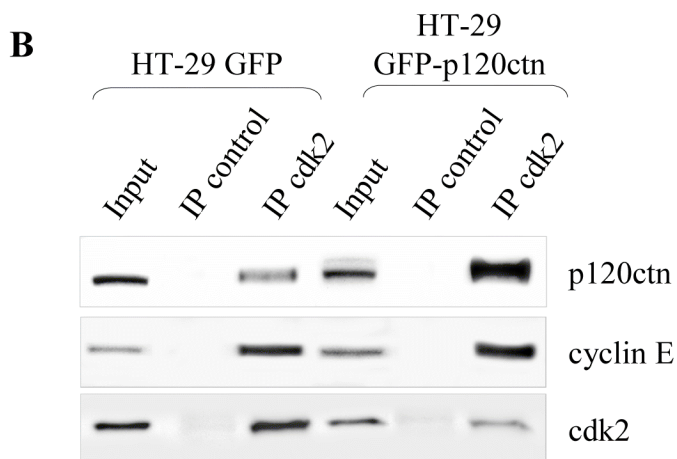
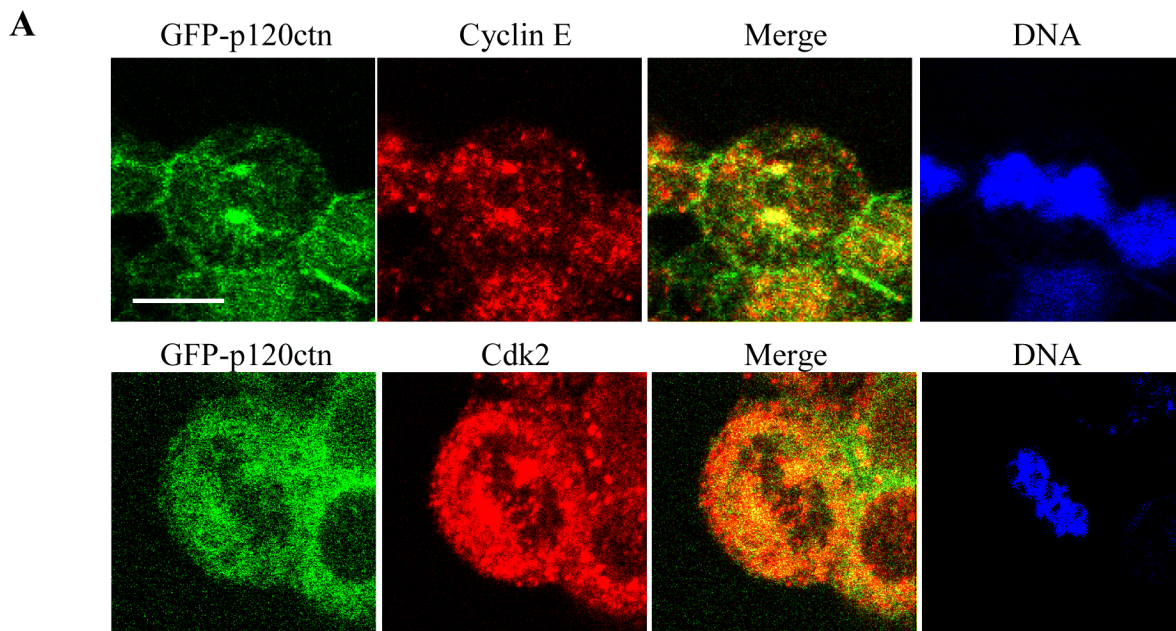


Figure 5

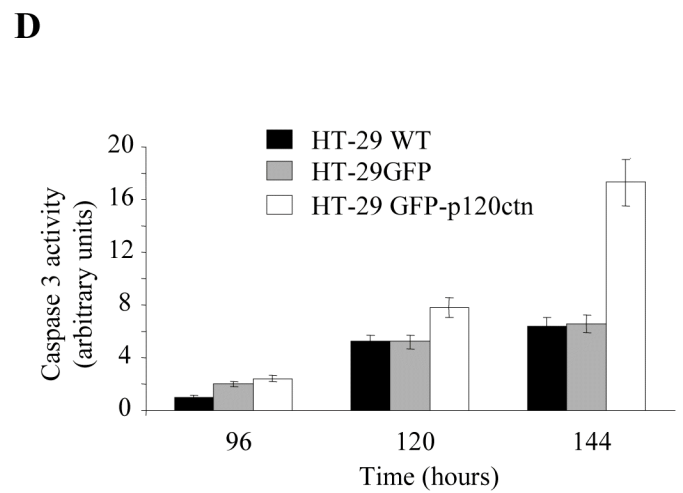
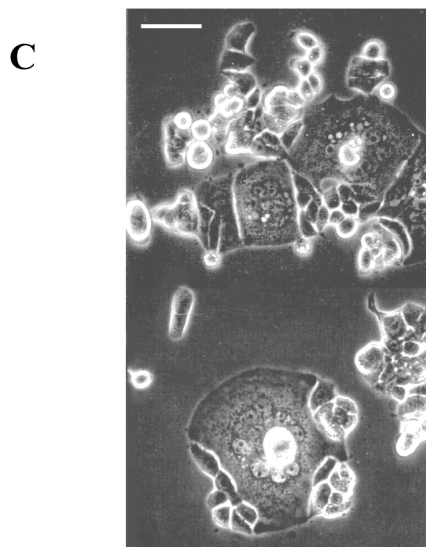
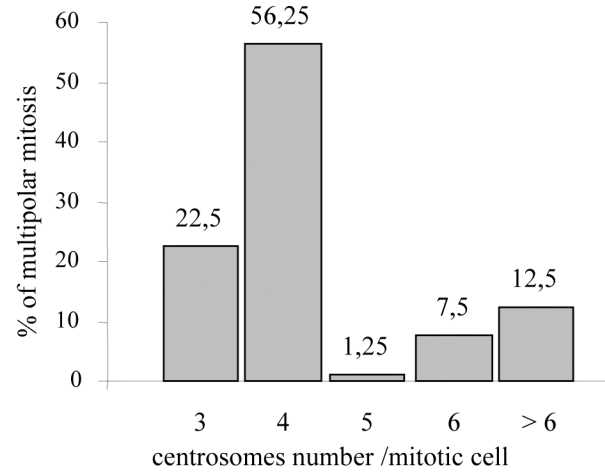
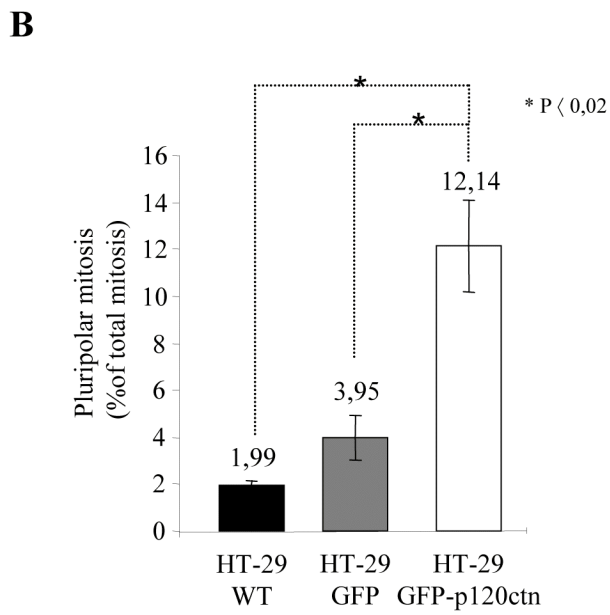
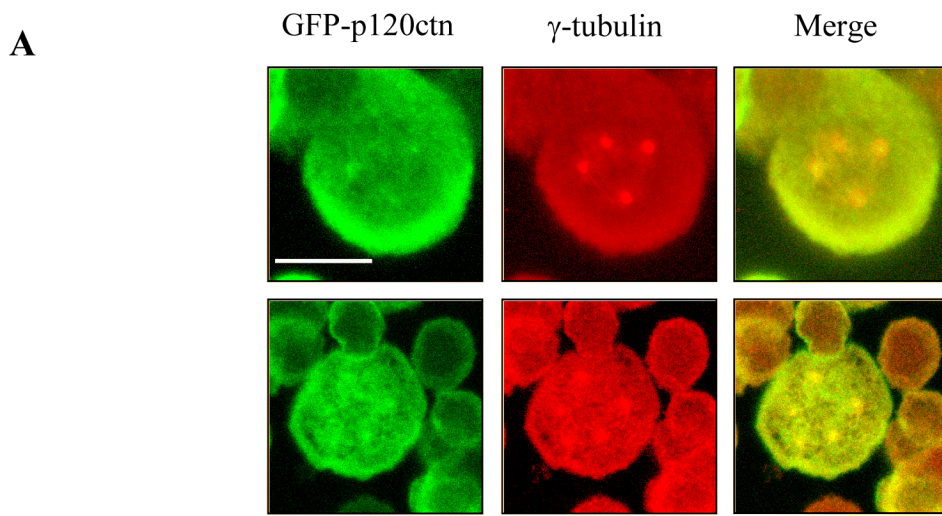


Figure 6

III- Discussion

Ces travaux montrent que la surexpression de la p120ctn dans les cellules HT-29 provoque l'augmentation du taux cytoplasmique de la protéine qui est alors capable de moduler la prolifération cellulaire. Nous montrons que les cellules HT-29 surexprimant la p120ctn présentent un retard de croissance et de synthèse de l'ADN. Nous proposons que ces effets sont liés à l'interaction de la p120ctn avec le complexe Cdk2/cycline E. Cette association a lieu préférentiellement au sein des centrosomes où le complexe Cdk2/cycline E alors stabilisé induit la phosphorylation de la nucléophosmine et provoque la duplication anormale des centrosomes. Ces cellules présentent alors en mitose des fuseaux pluripolaires qui pourraient être à l'origine d'instabilités génomiques.

III.1. La p120ctn régule négativement la prolifération des cellules HT-29

Nos résultats indiquent que la surexpression de la p120ctn réduit d'environ 40% la prolifération des cellules HT-29 après 96 heures par rapport aux cellules contrôles (article, figure 2). Les expériences de synchronisation à l'aphidicoline indiquent que cette réduction peut être attribuée à un retard dans le déroulement du cycle cellulaire, puisque les cellules HT-29 GFP-p120ctn présentent un délai dans l'entrée en phase S et un allongement de cette phase. En effet la durée de la phase S passe d'environ 6 heures dans les cellules contrôles à plus de 12 heures dans les cellules surexprimant la p120ctn (article, figure 2D). Nous montrons que ce retard est corrélé au niveau d'expression de la cycline E. Au lieu d'être rapidement dégradée au cours de la phase S comme c'est le cas dans les cellules contrôles, la cycline E reste stable jusqu'à 18 heures après le relargage des cellules HT-29 GFP-p120ctn en milieu ne contenant plus d'aphidicoline (article, figure 3A). Le délai observé dans les cellules surexprimant la p120ctn pourrait donc dépendre d'un défaut de dégradation de la cycline E puisqu'une telle augmentation est observée suite au blocage du protéasome par le MG132 (article, figure 3C). L'analyse des taux d'ARNm de la cycline E dans les cellules sauvages et surexprimant la p120ctn indiquent que cette régulation est bien post-transcriptionnelle, en effet ces taux sont identiques entre les deux types cellulaires synchronisés ou non (figure 41).

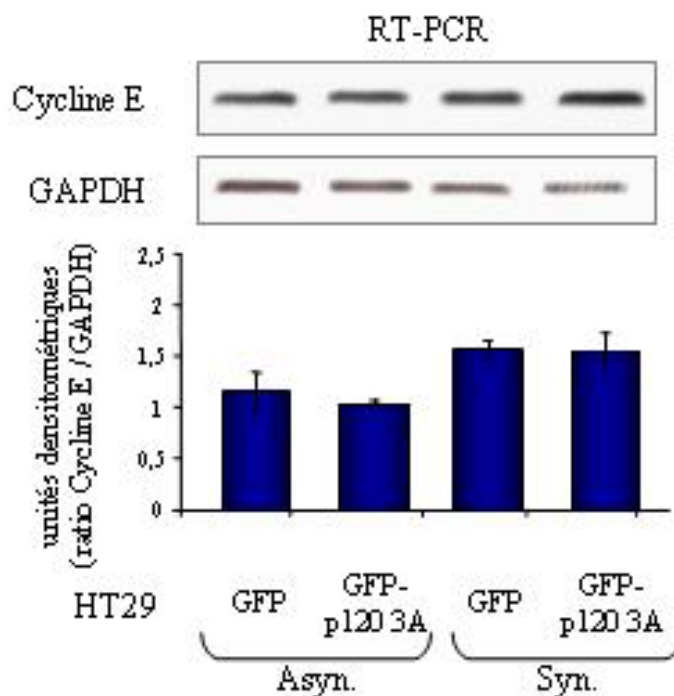


Figure 41 : Les taux d'ARNm de cycline E sont identiques dans les cellules HT-29 et HT-29 GFP-p120ctn
 Les ARNm de cellules HT-29 GFP ou GFP-p120ctn ysynchronisées ou non en phase G1/S par blocage à l'aphidicoline ont été extraits dans 1 mL de Trizol. Les taux d'ARNm de la cycline E sont observés par RT-PCR semi-quantitative. Les taux d'expression de la GAPDH sont utilisés comme contrôle interne.

Des effets comparables de la p120ctn ont récemment pu être observés dans d'autres systèmes par différentes équipes. En effet, la surexpression de la p120ctn dans des cellules hépatiques cancéreuses est capable d'inhiber l'expression de la cycline D et de la survivine, provoquant ainsi une baisse de prolifération d'environ 20% (Nong et al, 2006). Si l'effet final sur le cycle cellulaire est identique, la régulation du taux de cycline D dans cette étude est inverse à la régulation du taux de cycline E observée dans notre système. Toutefois, cette étude a été réalisée sur des cellules non-synchronisées et les auteurs observent donc le niveau de cycline D d'une population totale, dans différentes phases du cycle cellulaire. Il est possible qu'une majorité de ces cellules soient bloquée en phase S où la cycline D n'est plus exprimée, comme c'est le cas pour les cellules HT-29. Cela expliquerait la baisse apparente de cycline D qui est plutôt exprimée en début de phase G1.

A l'inverse, l'invalidation conditionnelle du gène codant pour la p120ctn dans la peau de souris induit une hyperprolifération des cellules dermiques (Perez-Moreno et al, 2006). Dans ce cas, c'est la perte d'inhibition de Rho A par la p120ctn qui conduit à l'activation de la voie NFκB et ainsi à l'augmentation de la prolifération cellulaire. L'inhibition de RhoA est également avancée pour expliquer la perte d'inhibition de contact de cellules NIH3T3 suite à l'invalidation de la p120ctn (Wildenberg et al, 2006). Dans les cellules HT-29 surexprimant la

p120ctn, des expériences de GST-pull down nous ont révélé que le taux global de Rho A-GTP ne varie pas (figure 42), il est donc peu probable que ce type de mécanisme soit impliqué dans la régulation du taux de cycline observé. Toutefois il est possible que l'activation de Rho A par la p120ctn soit très localisée dans la cellule et que l'observation d'un taux global ne permette pas de le distinguer.

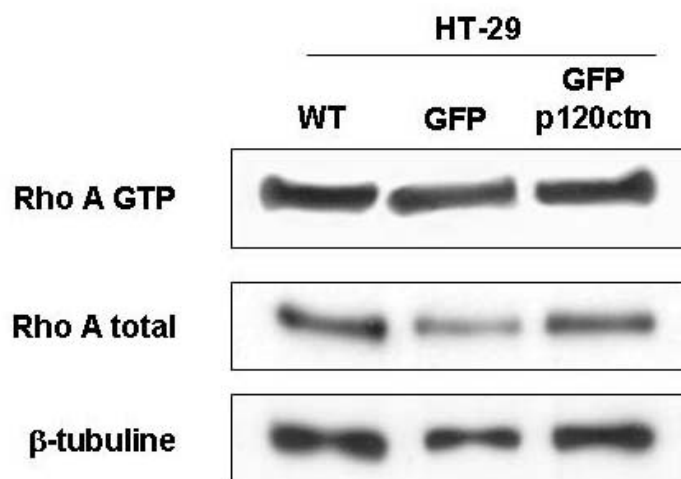


Figure 42 : L'activation de RhoA est identique dans les cellules HT-29 WT, GFP et GFP-p120ctn.
Les taux de RhoA-GTP sont analysés par GST-pull down à partir de lysats totaux de cellules HT-29 sauvages (WT) ou exprimant la GFP ou la GFP-p120ctn. La détection de la protéine Rho A totale permet d'évaluer le taux d'activation de la protéine.

Nous proposons un autre mécanisme dans lequel la p120ctn stabilise le taux de cycline E en interagissant avec le complexe Cdk2 / cycline E.

III.2. La p120ctn interagit avec le complexe Cdk2 / cycline E

Le retard de dégradation de la cycline E durant le cycle cellulaire des cellules HT-29 GFP-p120ctn suggère que la surexpression de la p120ctn inhibe un ou plusieurs des mécanismes responsables de cette dégradation. Il est connu que l'interaction de la cycline E avec la kinase qui lui est associée, Cdk2, la protège de la dégradation par le protéasome (Mazumder et al, 2004). L'immunoprécipitation de la Cdk2 dans les cellules HT-29 sauvages et HT-29 GFP-p120ctn montre que la Cdk2 interagit de façon plus importante avec la cycline E lorsque la p120ctn est surexprimée (article, figure 5B). De plus, la p120ctn est co-immunoprécipitée avec le complexe, de façon également plus importante lorsqu'elle est surexprimée. Ces résultats montrent que la p120ctn, la cycline E et la Cdk2 sont présentes au sein d'un même complexe dans les cellules HT-29. Même si une preuve directe d'interaction avec l'une ou l'autre de ces protéines n'est pas démontrée, des travaux portant sur la β -caténine permettent

d'élaborer des pistes intéressantes. En effet, des expériences réalisées à la fois *in-vitro* et *in-vivo* ont révélé que la β -caténine est capable d'interagir directement avec Cdk2 et qu'elle peut être phosphorylée par les couples Cdk2 / cycline A et Cdk2 / cycline E (Park et al, 2004). L'interaction de la β -caténine avec Cdk2 dépend de motifs « RXL » présents au niveau des répétitions de domaines Armadillo sur la caténine. Nous avons pu vérifier par analyse de la séquence de la p120ctn-3A, qu'elle possède également 5 de ces répétitions « RXL » au niveau de ces domaines Armadillo (figure 43). Il est donc probable qu'elle interagisse avec Cdk2 par le biais d'un ou plusieurs de ces motifs et que cette interaction stabilise la cycline E au sein du complexe. De plus, il est possible qu'au même titre que la β -caténine, la p120ctn puisse être phosphorylée par le complexe Cdk2 / cycline E.

p120 caténine 3A	ARM 1	257-294	PPPPNWRQPE LPEVIAMLGFRLLDAVKSNAAYLQHLQCY
	ARM 2	297-336	DKVKTDR RKL KGIPVLVGLLDHPKKEVHLGACGALKNISF
	ARM 3	340-374	QDNKIAIKNCDGVPALV RLL RKARDMDLTEVITGT
	ARM 4	375-415	LWNLSSHDSIKMEIVDHALH ALTDEVIIPHSGWEREPEDED
	ARM 5	433-472	LRNVSSERSEAR RKL RECDGLVDALIFIVQAEIGQKDSDS
	ARM 6	482-523	LRNL SYQVHREIPQAERYQEAPNVANNTGPHAASCFCGAKKG
	ARM 7	546-586	ARGYELLFQPEVVRIVISLLKESKTPAILEASAGAIQNLCA
	ARM 8	593-632	RYIRLSALRQEKALSADLLTNEHERVKA ASGAL RNL AV
	ARM 9	633-673	DARNKELIGKHAIPNLVKNLPGGQQNSSWNFSEDTVISILN
	ARM 10	674-719	TINEVIAENLEAAKKLRETQGIKLVLINK SGNRSEKEVRAAALVL

Figure 43 : Séquence peptidique des domaines Armadillo de la p120ctn-3A

III.3. Le complexe p120ctn / cycline E / Cdk2 est localisé au niveau des centrosomes

En accord avec des résultats précédents montrant que la p120ctn peut être localisée au niveau des centrosomes lors de la mitose de cellules de carcinome mammaire (Franz & Ridley, 2004), nous montrons ici par immunofluorescence et par biochimie que la p120ctn est également présente dans les centrosomes des cellules HT-29 (article, figure 4). De plus, la surexpression de GFP-p120ctn permet d'augmenter la présence du complexe Cdk2 / cycline E à ce niveau.

Il a été démontré que de la p120ctn recombinante peut interagir directement avec les microtubules lors de tests de co-précipitation *in-vitro* (Yanagisawa et al, 2004). Elle peut également interagir par son domaine N-terminal avec les chaînes lourdes de kinésines (Chen et al, 2003; Yanagisawa et al, 2004). Il a donc été proposé qu'elle participe au trafic de la E-cadhérine vers la membrane plasmique. De la même façon, la p120ctn pourrait également recruter à ce niveau le complexe Cdk2 / cycline E et, lors de la formation du fuseau mitotique, l'ensemble du complexe serait redirigé vers les centrosomes.

La cible majeure du complexe Cdk2 / cycline E est la nucléophosmine, qui, lorsqu'elle est phosphorylée sur sa thréonine 199 permet la duplication des centrosomes (Tarapore et al, 2002). Nos résultats indiquent que le taux de nucléophosmine phosphorylée augmente dans les cellules surexprimant la p120ctn, ce qui a pour conséquence une duplication anormale des centrosomes (article, figure 5 et 6). Cela indique que le complexe Cdk2 / cycline E recruté aux centrosomes est fonctionnel. Une fois encore, il est intéressant de constater le parallèle avec la β -caténine. En effet, l'inhibition d'expression de la β -caténine par siRNA dans les cellules Hela provoque un phénomène inverse à la surexpression de p120ctn, c'est-à-dire l'apparition de fuseaux mitotiques tronqués, ne présentant qu'un seul pôle mitotique (Kaplan et al, 2004). Sachant que ces deux caténines interagissent avec le complexe Cdk2 / cycline E, il est possible qu'elles aient un rôle commun permettant la duplication des centrosomes.

III.4. Rôles de la p120ctn dans la prolifération de cellules normales et cancéreuses

La duplication anormale des centrosomes est un phénomène souvent observé lors du développement tumoral (Fukasawa, 2005). Les cellules présentant plus de deux centrosomes ont en effet plus de risque de séparer les lots de chromosomes de façon non équitable entre les cellules filles. Elles génèrent ainsi fréquemment des instabilités génomiques à l'origine de graves dysfonctionnements cellulaires qui, s'ils ne sont pas détectés ou réparés par les cellules, entraînent la mise en place d'une tumeur. Ce type d'instabilité est fréquente dans les cancers colorectaux (Masramon et al, 2006).

Nous montrons ici que la surexpression de la p120ctn aboutit à l'augmentation d'un facteur 6 du nombre de cellules présentant plus de deux centrosomes (article, figure 6). En culture, ces cellules finissent par mourir par apoptose mais il a été démontré que les cellules présentant des centrosomes supplémentaires peuvent survivre au sein de certaines tumeurs solides et que leur nombre augmente au cours de la tumorigénèse, probablement du fait d'un environnement différent (Lingle et al, 2002). Une étude portant sur l'analyse de 557 tumeurs colorectales humaines a par ailleurs révélé que la p120ctn est présente au niveau du cytoplasme de cellules ayant perdu l'expression de la E-cadhérine et que cette localisation correspond à des cancers avancés et agressifs (Bellovin et al, 2005). Il est possible que suite à la perte d'expression de la E-cadhérine, la p120ctn cytoplasmique favorise l'apparition de cellules avec des centrosomes surnuméraires et soit à l'origine d'instabilités génomiques aggravantes pour le développement de la tumeur.

Toutefois la p120ctn contrôle également la prolifération de cellules non-cancéreuses. En effet, en surexprimant la p120ctn dans la lignée de cellules intestinales normales de rat IEC,

nous obtenons des résultats similaires aux cellules HT-29 (figure 44). Leur prolifération est diminuée et la p120ctn est présente avec la cycline E dans des fractions de centrosomes. De plus, comme pour les cellules HT-29, les IEC surexprimant la p120ctn présentent un nombre important de cellules plurinuclées.

D'un point de vue plus physiologique il est possible que la présence de p120ctn, même en faible quantité, dans le cytoplasme de cellules saines participe au recrutement du complexe Cdk2/ cycline E au sein du centrosome lors de la phase S et induise ainsi sa duplication. La p120ctn servirait alors de protéine adaptatrice et stabilisatrice pour le complexe. De plus, cette activité serait facilitée au niveau des cellules indifférenciées des cryptes intestinales où la E-cadhérine est peu exprimée et les jonctions adhérentes formées ne sont pas matures.

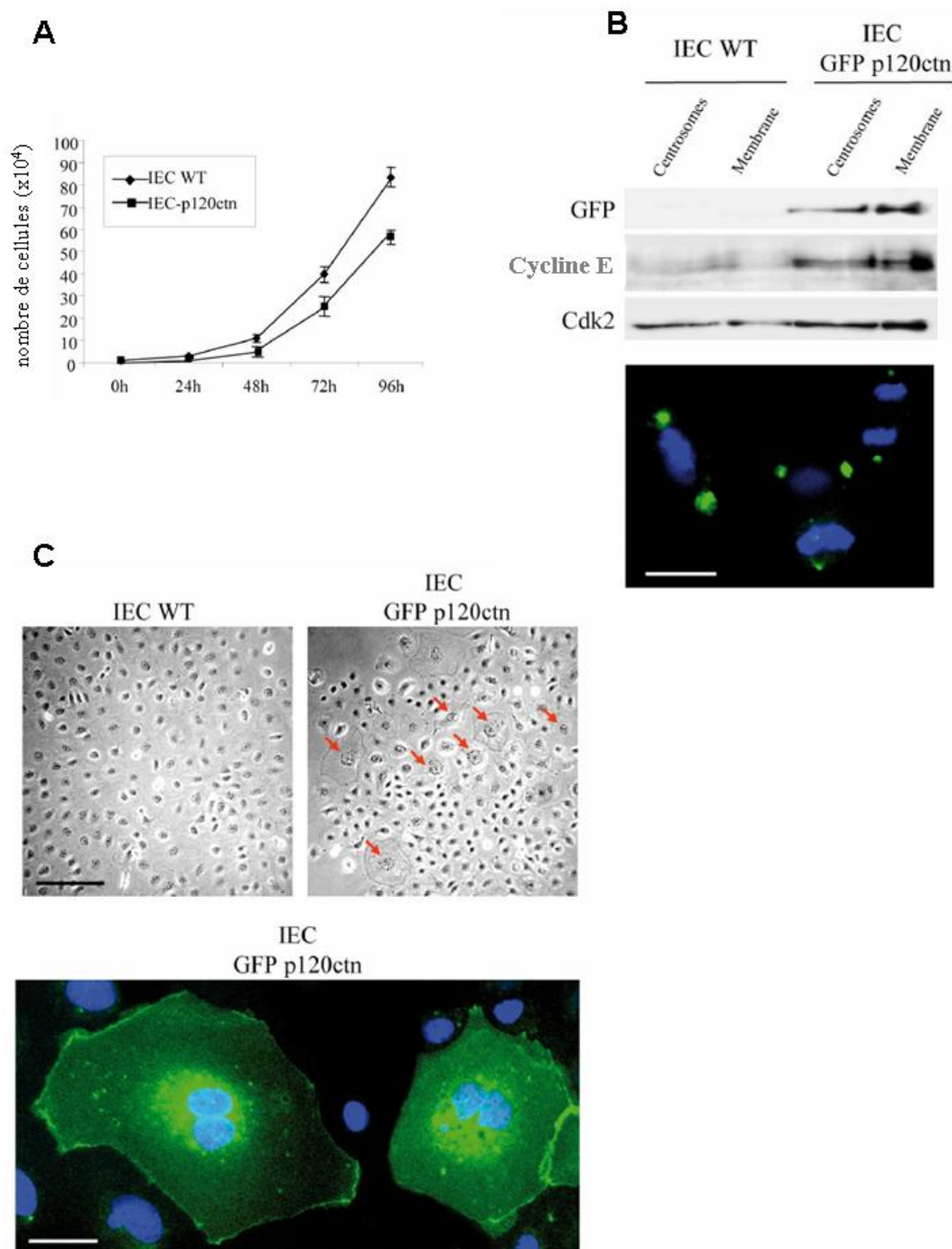


Figure 44 : Surexpression de la p120ctn dans les cellules IEC

Des cellules IEC sauvages (IEC-WT) ont été transfectées par la GFP-p120ctn et une lignée stable a été établie. **A.** Les IEC sauvages ou surexprimant la GFP-p120ctn ensemencées à $2 \cdot 10^4$ cellules par puits sont cultivées de 0 à 96 h et les cellules vivantes sont comptées par exclusion au bleu trypan toutes les 24 h.

B. Des fractions de centrosomes et de membranes ont été isolées à partir de cellules IEC-WT et IEC GFP-p120ctn en mitose par un gradient discontinu de sucrose. Les fractions sont ensuite analysées par Western-blot en utilisant des anticorps dirigés contre la GFP, la cycline E et la Cdk2. *Photo* : Les cellules IEC GFP-p120 sont observées par microscopie à épifluorescence. Echelle = 10µm.

C. *Panneau du haut* : Les cellules IEC-WT et IEC GFP-p120ctn cultivées pendant 48 h sont observées en microscopie à contraste de phase. Un nombre important de cellules IEC GFP-p120ctn sont plus grandes et présentent deux noyaux ou plus (flèches rouges). *Panneau du bas* : les cellules IEC GFP-p120ctn cultivées 48h sur lamelles sont fixées et observées par microscopie à épifluorescence. Echelle = 10µm.

**CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES**

Conclusion Générale

Nos travaux ont permis de décrire une partie des mécanismes de régulation assurant la mise en place des jonctions adhérentes au cours de la différenciation entérocytaire précoce des cellules HT-29. Nous avons ainsi pu mettre en évidence différents facteurs impliqués dans des stades successifs de maturation des jonctions (figure 45).

Nous savions qu'aux premiers jours les cellules HT-29 interagissent avec le collagène IV via l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (Gout et al, 2001). Puis la laminine 5, qui est sécrétée par les cellules HT-29 dès le début de leur différenciation en milieu privé de glucose, permet d'activer une signalisation croisée entre les intégrines et les cadhérines. L'activation des intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$ induit l'activation transitoire de la PI3K qui va alors activer la GTPase monomérique Rac1 et son variant Rac1b. Cette signalisation aboutit à une augmentation du taux de E-cadhérine qui est stabilisée à la membrane et interagit de façon plus importante avec le cytosquelette d'actine. Nous montrons que cette première étape induite par la laminine 5 lors des 3 premiers jours de différenciation permet la mise en place des jonctions adhérentes mais n'entraîne pas leur maturation, caractérisée par le recrutement de la p120ctn. De même, la laminine 5 seule n'induit pas d'augmentation de marqueurs de différenciation entérocytaires connus des cellules HT-29.

Dans les étapes ultérieures de différenciation, nous avons mis en évidence l'émergence de radeaux lipidiques et leur réorganisation aux contacts cellulaires. Nous montrons que le recrutement et l'interaction de la p120ctn avec la E-cadhérine a lieu principalement au niveau de ces radeaux lipidiques après 5 à 6 jours de différenciation. Une seconde période d'activation de Rac1 est nécessaire à ce recrutement des protéines des jonctions adhérentes au sein des radeaux lipidiques et induit l'apparition de marqueurs de différenciation entérocytaire : l'activité de la phosphatase alcaline augmente et la villine se relocalise au niveau des bordures en brosse.

Ces résultats, bien qu'étant obtenus *in-vitro* sur un modèle de lignée cellulaire, reflètent ce qui peut avoir lieu lors de la migration et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales le long de l'axe crypte-villus. En effet différentes expériences d'immunohistochimie réalisées par d'autres équipes montrent que les facteurs mis en jeu dans ce modèle ne sont présents qu'au sein des villi et coïncident avec l'état de différenciation. Ainsi, la laminine 5 et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ ont été montrées pour être exprimées majoritairement au sein des villi (Beaulieu, 1999). De même, l'apparition de radeaux lipidiques est observée au niveau des cellules en cours de différenciation dans les villi (Li et al, 2004).

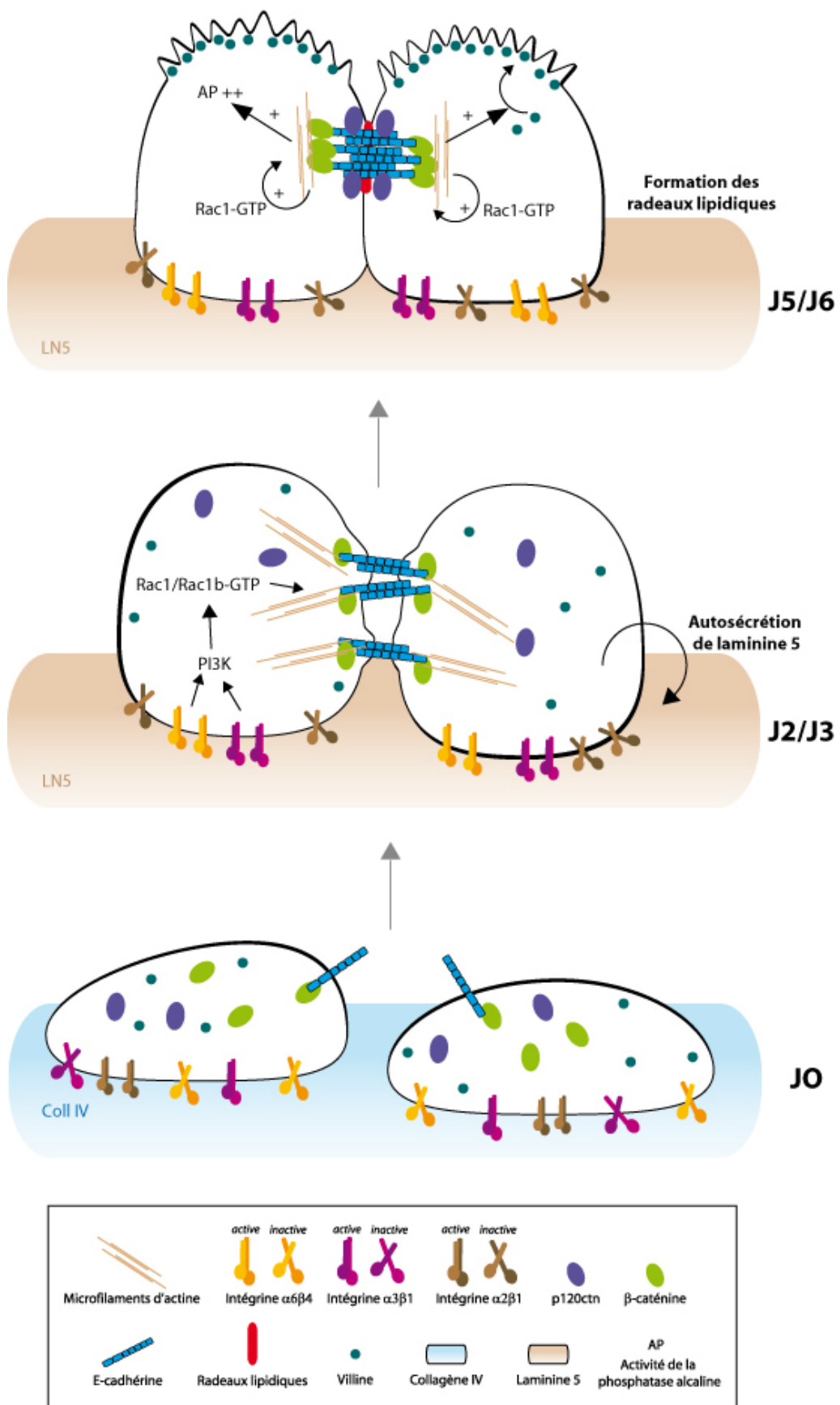


Figure 45 : Schématisation de la mise en place des jonctions adhérentes lors de la différenciation entérocytaire précoce des cellules HT-29

Ces résultats permettent donc de mieux comprendre la formation des jonctions adhérentes et d'appréhender les dysfonctionnements d'adhérence et de migration cellulaires observés lors de pathologies comme le cancer ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, dans lesquelles les jonctions intercellulaires sont souvent dérégulées.

Dans une seconde partie, nos résultats démontrent que la p120^{ctn}, proche de la β -caténine dans sa structure, dans ses fonctions et dans ses diverses localisations est capable de réguler l'homéostasie des cellules HT-29. Il semble qu'elle puisse jouer un rôle à la fois dans la différenciation, puisque son recrutement au sein des jonctions adhérentes associées aux radeaux lipidiques est accompagné de l'apparition de facteurs de différenciation. Cette fonction de p120^{ctn} dans la différenciation entérocytaire est physiologique puisque ce sont des niveaux endogènes de p120^{ctn} qui permettent cela, sa surexpression n'ayant pas d'impact sur la différenciation. Toutefois, nous montrons que la surexpression de la p120^{ctn} entraîne un déséquilibre entre la fraction associée aux cadhérines et la fraction cytoplasmique en augmentant le taux de p120^{ctn} cytoplasmique. Cette augmentation provoque des défauts de prolifération cellulaires par un mécanisme qui n'a jamais été décrit auparavant : la p120^{ctn} est capable d'interagir avec le complexe cycline E/ Cdk2 et stabilise ainsi le niveau de cycline E. Cette interaction a lieu préférentiellement au sein des centrosomes ce qui a pour effet d'induire une duplication anormale des centrosomes et des défauts de mitoses (figure 46).

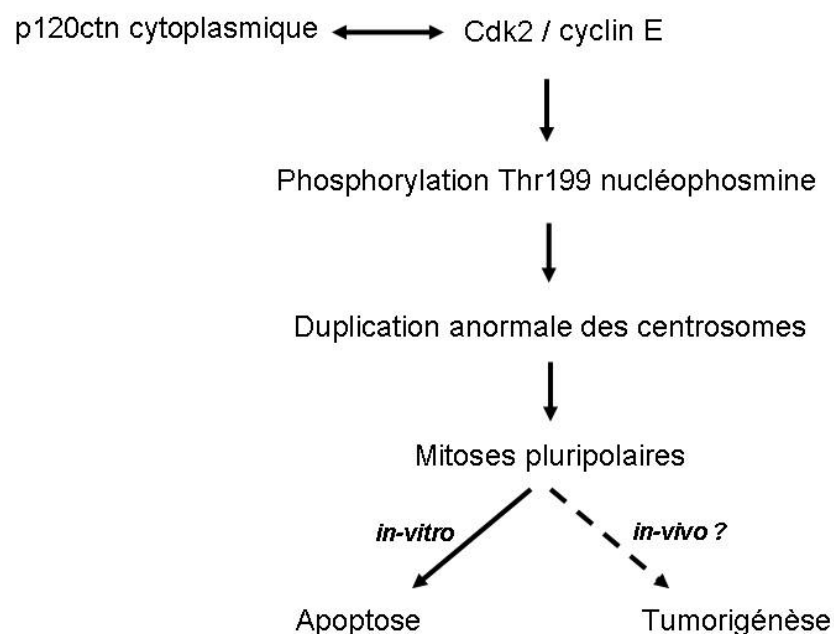


Figure 46 : Effets de la surexpression de p120^{ctn} sur la division cellulaire

Ces résultats suggèrent que la localisation cytoplasmique de la p120ctn au niveau des cryptes, où les jonctions adhérentes ne sont pas formées, pourrait participer à la duplication des centrosomes et au contrôle de la prolifération cellulaire. De plus, dans les cancers où la E-cadhérine est dérégulée, la p120ctn cytoplasmique pourrait participer au développement tumoral en favorisant l'instabilité chromosomique due aux défauts de mitoses

Perspectives

Les résultats présentés dans ce manuscrit ont permis de caractériser différentes voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'adhérence cellulaire et de l'homéostasie intestinale. Cependant, la description de ces voies de signalisation n'est pas encore complète et soulève quelques questions auxquelles il faudra s'attacher à répondre dans les études à venir.

Concernant la maturation des jonctions adhérentes au cours de la différenciation intestinale, nous avons montré que cette étape nécessitait une activation transitoire et répétée de Rac1. Le premier pic d'activation est nécessaire pour moduler l'expression et l'engagement des E-cadhérine à la surface cellulaire. Le second serait à l'origine de la maturation de la jonction et participerait à l'initiation de la différenciation cellulaire. Cependant les messagers impliqués dans ces différents signaux n'ont pas été identifiés. Il est possible que cette activation dépende de l'engagement des cadhérines elles-mêmes. Certains travaux ont démontré que l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) suite à l'activation de Rac1 conduit à l'association de la p190 Rho-Gap aux jonctions adhérentes et à la régulation de l'activité des Rho GTPases (Nimnual et al, 2003; Wildenberg et al, 2006). Cette voie de signalisation résulte de l'inactivation, par oxydation de résidus cystéine, d'une phosphatase (Low Molecular Weight Tyrosine Phosphatase). Des résultats préliminaires indiquent qu'il y a une modulation de la production des ROS au cours de la différenciation des cellules HT-29 et que cette production suit le second pic d'activation de Rac1. L'utilisation de drogues inhibant la formation de ROS ou l'ajout d'oxydants comme H₂O₂ au cours d'une cinétique de culture en milieu dépourvu de glucose pourrait permettre de vérifier si cette voie est impliquée dans la différenciation entérocytaire des cellules HT-29. Dans le cas d'une réponse positive, il serait intéressant:

- de caractériser le système générateur de ces ROS. Les cellules épithéliales expriment une NADPH oxydase spécifique, NOX1 qui a été décrite pour participer à la différenciation des cellules intestinales (Geiszt et al, 2003; Perner et al, 2003). Ce complexe pourrait être activé au cours de la différenciation intestinale.
- d'identifier l'état de phosphorylation des protéines des complexes d'adhérence au cours de la maturation des jonctions cellulaires, en particulier de p120ctn et de la E-cadhérine. En effet, les ROS régulant l'état d'activation des protéines phosphatases, on pourrait s'attendre à ce que la maturité des jonctions adhérentes soit contrôlée par une modification de l'état de phosphorylation des protéines qui constituent ces complexes. Cette hypothèse est

renforcée par le fait que dans les signalosomes générés autour de ces complexes d'adhérences, plusieurs protéines kinases sont recrutées comme src, fer ou fyn qui ont pour substrat les caténines (Piedra et al, 2003). Plusieurs travaux mentionnent des résultats contradictoires sur le rôle de la phosphorylation des protéines de jonctions dans la stabilité de ces complexes (Alema & Salvatore, 2007). Ces différences pourraient résulter d'études portant sur des stades différents de maturation des jonctions.

Nos travaux tendent à prouver que le recrutement de p120ctn au niveau des jonctions intercellulaires joue un rôle important dans l'initiation de la différenciation cellulaire. Nous avons tenté de confirmer ces résultats en surexprimant p120ctn dans les cellules HT-29. Cependant le niveau de p120ctn endogène étant déjà suffisant nous n'avons pas observé de variabilité significative dans la différenciation cellulaire. L'expression du dominant négatif Rac N17 inhibe la localisation de la p120ctn au niveau des radeaux lipidiques et empêche l'apparition de marqueurs de différenciation. Il est donc tout de même possible que la présence de la p120ctn au niveau des radeaux lipidiques puisse être une étape nécessaire à la différenciation. Pour répondre à cette question, nous générons actuellement une lignée de cellules HT-29 dans laquelle l'expression de la p120ctn est inhibée par si RNA. Ainsi il est probable que le siRNA de p120ctn puisse induire le même phénotype que celui des cellules Rac N17.

Nous avons par ailleurs démontré que la p120ctn est capable de réguler la prolifération des cellules HT-29 en interagissant avec le complexe cycline E / cdk2. Il serait intéressant de localiser les sites d'interaction de la p120ctn avec le complexe. Pour cela, l'une des premières expériences à réaliser consisterait à muter les domaines « LXR » décrits pour être nécessaires à l'interaction avec Cdk2 et présents au niveau des domaines Armadillo de p120ctn. Des manipulations d'interaction de ces mutants avec la cdk2 *in-vitro* puis leur expression dans les cellules HT-29 pourraient affiner notre vision de cette voie.

La découverte de cette nouvelle interaction entre la p120ctn et le complexe cycline E / cdk2 ouvre également des voies intéressantes dans l'étude du rôle de la p120ctn au niveau des cryptes intestinales. La E-cadhérine n'étant pas exprimée au niveau des cryptes, la p120ctn cytoplasmique pourrait alors être un acteur de la prolifération cellulaire, au même titre que la β -caténine. Afin de répondre à cette question, nous envisageons d'étudier l'effet de l'inhibition ou de la surexpression de p120ctn sur la formation de l'épithélium intestinal. En effet, la lignée de cellules pluripotentes IEC 17 associée en culture organotypique avec un mésenchyme intestinal embryonnaire est capable de former un épithélium complet présentant une morphologie de cryptes et de villi (Kedinger et al, 1986). Nous sommes actuellement en

cours de génération des lignées IEC surexprimant la p120ctn ou le siRNA spécifiquement dirigé contre la p120ctn. La taille et l'organisation des cryptes et des villi formés seront alors analysées. Ce travail sera réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr. Danielle Douhailly.

De plus l'interaction p120ctn / cycline E / cdk2 présente un intérêt non négligeable dans l'étude de la progression tumorale. En effet ces protéines sont dérégulées lors de la tumorigénèse : la cycline E est retrouvée surexprimée dans les cancers épithéliaux (Mazumder et al, 2004) et l'observation de tumeurs colorectales humaines a démontré que la p120ctn est souvent retrouvée dans le cytoplasme à des stades avancés (Bellovin et al, 2005). Il serait intéressant de comparer l'expression et la présence au sein d'un même complexe de ces deux protéines dans échantillons de tissus sains ou cancéreux.

MATERIEL ET METHODES

Cette partie reprend les conditions expérimentales qui n'ont pas déjà été décrites dans les publications.

Différenciation des cellules HT-29

Les cellules HT-29 sont cultivées dans un milieu de différenciation composé de DMEM dépourvu de glucose, additionné de galactose 5mM, d'Hepes 15mM, de pénicilline/streptomycine à 100 u/mL et 0,1 u/mL respectivement et supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal préalablement dialysé contre du PBS. Le milieu est changé tous les jours pendant 10 jours.

Anticorps

ANTICORPS	SPECIFICITE	ORIGINE	FOURNISSEUR	STOCK (mg/mL)	DILUTIONS	
					WB	IF
Anti-flotilline	Flotilline humaine	Souris Monoclonal	BD Transduction Laboratories	0,25	1/1000	nd
Anti- RhoA Sc-179	RhoA humaine	Lapin Polyclonal	Santa Cruz	0,2	1/1000	nd
Anti-p190 Rho GAP	P190 Rho-GAP Humaine	Mouse Monoclonal	BD Transduction Laboratories	0,2	1/500	nd
Anti-villine	Villine	Mouse Monoclonal	Dr S. Robine (Paris)	10	1/2500	1/100

Drogues et réactifs

Afin de déstabiliser les radeaux lipidiques, les cellules HT-29 différenciées sont traitées avec 4 mM de methyl- β -cyclodextrine (Sigma-Aldrich) durant 6 heures ; de la cholestérol oxydase (Calbiochem) à 2 unités /mL durant 2 heures ou de l'Amphotéricine B (Roche) à 25 μ g/mL tout au long de la période de différenciation.

Pour visualiser les radeaux lipidiques en microscopie confocale, la toxine cholérique couplée au FITC (Sigma-Aldrich) est utilisée à 5 μ g/mL

Test de perméabilité intercellulaire

Les cellules sont cultivées en monocouche sur lamelles de verre puis rincées 3 fois avec du PBS. Elles sont ensuite incubées avec une solution composée de biotine à 0,5 mg/mL ; CaCl₂ 0,5mM et MgCl₂ 1mM pendant 30 minutes à température ambiante. Après 4 lavages au PBS /50mM Glycine, les cellules sont fixées dans une solution de PBS / 4 % paraformaldéhyde /

3% sucrose pendant 15 minutes à température ambiante. Après 4 lavages au PBS, les cellules sont incubées 30 minutes à température ambiante dans une solution de blocage composée de PBS/ BSA 3%. La biotine est ensuite révélée par incubation pendant 45 minutes dans une solution composée d'extravidine-TRITC (Sigma Aldrich) diluée au 1/200ème dans du PBS. Après 5 lavages au PBS, les lamelles sont montées sur lame de verre dans du milieu de montage : (33% glycérol /13% Mowiol / 130mM Tris-HCl pH 8,5).

La diffusion transcellulaire du marqueur fluorescent est observée sur des coupes optiques dans le plan x-z réalisées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (Zeiss LSM 510) équipé d'un objectif PlanApo 63X à immersion dans l'huile.

Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline

Pour chaque condition, 10^7 cellules HT-29 sont lysées dans 1 mL de tampon préalablement refroidi, composé de 5 mM Na_2SO_4 , 1 mM TRIS-HCl pH 7.4 supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les cellules sont ensuite raclées avec un « Cellscrapper » et les membranes cellulaires sont cassées par sonication, 30 secondes à 400 joules/watt.sec dans la glace. La concentration en protéines totales du lysat est déterminée par prélèvement de 5 μL de lysat, dosés par micro-BCA (acide bicinchoninique) selon le protocole proposé par le revendeur (Pierce). Puis l'activité de la phosphatase alcaline endogène de 50 et 100 μL de lysat est testée sur 4 mM de paranitrophenol phosphate (pNPP), dans un tampon composé de 50 mM glycine pH 10.5, 1 mM ZnCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 et 5 mM CaCl_2 . La réaction est réalisée pendant 2h à 37°C. La coloration jaune du paranitrophenol (pNP) proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 405 nm.

Mesure de l'activation des GTPases RhoA et Rac1 (GST pull-down)

La précipitation des formes actives de RhoA et Rac1 est réalisée en utilisant respectivement les protéines de fusion glutathion S-transférase (GST)- rhotekin binding domain (GST-RBD) et glutathion S-transférase-Pak (P21 activated kinase) qui lie la forme Rac1-GTP (GST Pak). Environ 10^7 cellules HT-29 sont utilisées pour chaque point de l'expérience. Les cellules sont lavées rapidement au PBS froid et lysées dans 1 mL de tampon contenant 1% Triton, 50 mM Tris, pH 7.2, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les lysats sont ensuite centrifugés 10 minutes à 17000 g à 4°C et un échantillon du surnageant est utilisé pour doser les protéines totales par micro BCA (acide bicinchoninique). Puis les protéines chimères GST-RBD ou GST-Pak liées à des billes de Sepharose (50 μL) sont ajoutées à 2mg

de protéines du lysat cellulaire et incubées 1h à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 4 fois dans le tampon de lyse et les protéines liées sont éluées dans du tampon Laemmli pendant 5 minutes à 95°C. Les protéines RhoA et Rac1 liées au GTP sont ensuite séparées par électrophorèse SDS-PAGE (12 % de polyacrylamide), transférées sur membrane de PVDF et détectées par Western-blot. Les lysats cellulaires totaux sont déposés en parallèle afin de visualiser les quantités totales de RhoA et Rac1.

Isolement de fractions enrichies en radeaux lipidiques

5 x 10⁷ cellules HT-29 sont grattées et resuspendues dans 1,5 mL de tampon A (25 mM HEPES pH 7.4 / 150 mM NaCl / 5 mM EGTA / inhibiteurs de protéases). Puis les noyaux sont éliminés par centrifugation à 800 g durant 10 min à 4°C. Le surnageant post-nucléaire est ensuite solubilisé dans 1,5 mL tampon A / 1% Triton X 100 durant 1 h à 4°C. Puis le lysat est mélangé avec un volume équivalent de sucrose à 80 % dans le tampon A et l'ensemble est placé dans le fond d'un tube en polycarbonate pour ultracentrifugeuse. Un gradient discontinu de sucrose est ensuite créé en rajoutant délicatement 6 mL de sucrose à 38 % puis 3 mL de sucrose 5 % dilué dans le tampon A. Après centrifugation à 38000 rpm durant 16 h dans un rotor SW 41 (Beckman Coulter) à 4°C, des fractions de 1 mL sont collectées depuis le haut du tube. Les fractions 2 à 4 contiennent les radeaux lipidiques et les fractions enrichies en membranes plus lourdes sont retrouvées dans les fractions 8 à 9.

Quantification des ARNm : Reverse-transcription et PCR

Les ARNs totaux de 10⁷ cellules HT-29 ont été extraits dans 1 mL de Trizol (Invitrogen). Afin de déterminer les niveaux de transcrits de la E-cadhérine, la Cycline E et la GAPDH, leur ADN complémentaire a été synthétisé à partir de 2µg d'ARN total en utilisant la reverse transcriptase Superscript (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Puis, les niveaux endogènes d'ADNc ont été amplifiés par PCR semi-quantitative, l'expression de la GAPDH servant de contrôle interne. Les sondes utilisées pour ces PCR sont les suivantes

E-cadhérine: - sens: 5'-CCT TCC TCC CAA TAC ATC TCC C-3'

- antisens : 5'-TCT CCG CCT CCT TCT TCA TC-3'

Cycline E: - sens: 5'-AGT TCT CGG CTC GTC CCA GGA AGA-3'

- antisens: 5'- TCT TGT GTC GCC ATA TAC CGG TCA-3'

GAPDH: - sens: 5'-CGA GAT CCC TCC AAA ATC AAA ATC AA-3'

- antisens: 5'-ATC CAC AGT CTT CTG GGT GG-3'

Les conditions de PCR utilisées sont les suivantes : l'ADNc équivalent à 200ng d'ARN total est amplifié par 22 cycles à une température d'hybridation de 65°C pour la E-cadhérine, 30 cycles à 57°C pour la cycline E, et 20 cycles à 54°C pour la GAPDH. La concentration final en MgCl₂ est de 3 mM et chaque réaction contient 1U de *Taq* DNA polymérase (Bioline, Abcys, Paris).

BIBLIOGRAPHIE

A

- Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R, Hoschuetzky H (1994) Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *Journal of cell science* **107** (Pt **12**): 3655-3663
- Adams CL, Chen YT, Smith SJ, Nelson WJ (1998) Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *The Journal of cell biology* **142**: 1105-1119
- Akhtar N, Hotchin NA (2001) RAC1 regulates adherens junctions through endocytosis of E-cadherin. *Molecular biology of the cell* **12**: 847-862
- Alema S, Salvatore AM (2007) p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue. *Biochimica et biophysica acta* **1773**: 47-58
- Alonso MA, Millan J (2001) The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *Journal of cell science* **114**: 3957-3965
- Anastasiadis PZ (2007) p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochimica et biophysica acta* **1773**: 34-46
- Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, Mariner DJ, Crawford HC, Zheng Y, Reynolds AB (2000) Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nature cell biology* **2**: 637-644
- Anastasiadis PZ, Reynolds AB (2001) Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Current opinion in cell biology* **13**: 604-610
- Andre F, Rigot V, Thimonier J, Montixi C, Parat F, Pommier G, Marvaldi J, Luis J (1999) Integrins and E-cadherin cooperate with IGF-I to induce migration of epithelial colonic cells. *International journal of cancer* **83**: 497-505
- Aono S, Nakagawa S, Reynolds AB, Takeichi M (1999) p120(ctn) acts as an inhibitory regulator of cadherin function in colon carcinoma cells. *The Journal of cell biology* **145**: 551-562
- Archer A, Sauvaget D, Chauffeton V, Bouchet PE, Chambaz J, Pincon-Raymond M, Cardot P, Ribeiro A, Lacasa M (2005) Intestinal apolipoprotein A-IV gene transcription is controlled by two hormone-responsive elements: a role for hepatic nuclear factor-4 isoforms. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **19**: 2320-2334
- Aumailley M, Krieg T (1996) Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. *The Journal of investigative dermatology* **106**: 209-214
- Avizienyte E, Frame MC (2005) Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Current opinion in cell biology* **17**: 542-547

Avizienyte E, Wyke AW, Jones RJ, McLean GW, Westhoff MA, Brunton VG, Frame MC (2002) Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nature cell biology* **4**: 632-638

B

Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ (1996) SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**: 263-274

Bai YQ, Miyake S, Iwai T, Yuasa Y (2003) CDX2, a homeobox transcription factor, upregulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene. *Oncogene* **22**: 7942-7949

Baki L, Marambaud P, Efthimiopoulos S, Georgakopoulos A, Wen P, Cui W, Shioi J, Koo E, Ozawa M, Friedrich VL, Jr., Robakis NK (2001) Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 2381-2386

Basora N, Herring-Gillam FE, Boudreau F, Perreault N, Pageot LP, Simoneau M, Bouatrouss Y, Beaulieu JF (1999) Expression of functionally distinct variants of the beta(4)A integrin subunit in relation to the differentiation state in human intestinal cells. *The Journal of biological chemistry* **274**: 29819-29825

Basora N, Vachon PH, Herring-Gillam FE, Perreault N, Beaulieu JF (1997) Relation between integrin alpha7Bbeta1 expression in human intestinal cells and enterocytic differentiation. *Gastroenterology* **113**: 1510-1521

Basson MD, Emenaker NJ, Sanders MA (2000) Alpha integrin subunits regulate human (Caco-2) intestinal epithelial proliferation and phenotype. *Cell Physiol Biochem* **10**: 27-36

Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H (2002) Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* **111**: 251-263

Beaulieu JF (1999) Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci* **4**: D310-321

Beck K, Hunter I, Engel J (1990) Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *Faseb J* **4**: 148-160

Behrens J, Lowrick O, Klein-Hitpass L, Birchmeier W (1991) The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 11495-11499

Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL, Mercurio AM (2005) Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer research* **65**: 10938-10945

- Bickel PE, Scherer PE, Schnitzer JE, Oh P, Lisanti MP, Lodish HF (1997) Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *The Journal of biological chemistry* **272**: 13793-13802
- Bienz M (2005) beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol* **15**: R64-67
- Birchmeier W, Hulsken J, Behrens J (1995) Adherens junction proteins in tumour progression. *Cancer surveys* **24**: 129-140
- Blaschuk OW, Sullivan R, David S, Pouliot Y (1990) Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Developmental biology* **139**: 227-229
- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L (2002) C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science (New York, NY)* **296**: 1308-1313
- Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A (2003) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of cell science* **116**: 499-511
- Boulanger J, Vezina A, Mongrain S, Boudreau F, Perreault N, Auclair BA, Laine J, Asselin C, Rivard N (2005) Cdk2-dependent phosphorylation of homeobox transcription factor CDX2 regulates its nuclear translocation and proteasome-mediated degradation in human intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **280**: 18095-18107
- Braga V (2000) Epithelial cell shape: cadherins and small GTPases. *Experimental cell research* **261**: 83-90
- Braga VM, Betson M, Li X, Lamarche-Vane N (2000) Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt cadherin-dependent cell-cell adhesion in normal human keratinocytes. *Molecular biology of the cell* **11**: 3703-3721
- Bryant DM, Stow JL (2004) The ins and outs of E-cadherin trafficking. *Trends in cell biology* **14**: 427-434
- Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, Martin GR, Meneguzzi G, Paulsson M, Sanes J, et al. (1994) A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol* **14**: 209-211

C

- Calderwood DA (2004) Integrin activation. *Journal of cell science* **117**: 657-666
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology* **2**: 76-83

- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (New York, NY)* **296**: 1655-1657
- Carroll KM, Wong TT, Drabik DL, Chang EB (1988) Differentiation of rat small intestinal epithelial cells by extracellular matrix. *The American journal of physiology* **254**: G355-360
- Causeret M, Taulet N, Comunale F, Favard C, Gauthier-Rouviere C (2005) N-cadherin association with lipid rafts regulates its dynamic assembly at cell-cell junctions in C2C12 myoblasts. *Molecular biology of the cell* **16**: 2168-2180
- Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A (1988) Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer research* **48**: 1936-1942
- Chartier NT, Laine M, Gout S, Pawlak G, Marie CA, Matos P, Block MR, Jacquier-Sarlin MR (2006) Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. *Journal of cell science* **119**: 31-46
- Chattopadhyay N, Wang Z, Ashman LK, Brady-Kalnay SM, Kreidberg JA (2003) alpha3beta1 integrin-CD151, a component of the cadherin-catenin complex, regulates PTPmu expression and cell-cell adhesion. *The Journal of cell biology* **163**: 1351-1362
- Chen X, Gumbiner BM (2006) Crosstalk between different adhesion molecules. *Current opinion in cell biology* **18**: 572-578
- Chen X, Kojima S, Borisy GG, Green KJ (2003) p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *The Journal of cell biology* **163**: 547-557
- Chen YT, Stewart DB, Nelson WJ (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. *The Journal of cell biology* **144**: 687-699
- Chiarugi P, Pani G, Giannoni E, Taddei L, Colavitti R, Raugei G, Symons M, Borrello S, Galeotti T, Ramponi G (2003) Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *The Journal of cell biology* **161**: 933-944
- Chu YS, Thomas WA, Eder O, Pincet F, Perez E, Thiery JP, Dufour S (2004) Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *The Journal of cell biology* **167**: 1183-1194
- Clarke AS, Lotz MM, Chao C, Mercurio AM (1995) Activation of the p21 pathway of growth arrest and apoptosis by the beta 4 integrin cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry* **270**: 22673-22676

Clurman BE, Sheaff RJ, Thress K, Groudine M, Roberts JM (1996) Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes & development* **10**: 1979-1990

Cohen E, Ophir I, Shaul YB (1999) Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *Journal of cell science* **112 (Pt 16)**: 2657-2666

Comunale F, Causeret M, Favard C, Cau J, Taulet N, Charrasse S, Gauthier-Rouviere C (2007) Rac1 and RhoA GTPases have antagonistic functions during N-cadherin-dependent cell-cell contact formation in C2C12 myoblasts. *Biol Cell*

Coulombel L (2003) [Adult stem cells: seing is not being]. *Med Sci (Paris)* **19**: 683-694

Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J (2006) Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature reviews* **7**: 349-359

D

D'Amico M, Hulit J, Amanatullah DF, Zafonte BT, Albanese C, Bouzahzah B, Fu M, Augenlicht LH, Donehower LA, Takemaru K, Moon RT, Davis R, Lisanti MP, Shtutman M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A, Troussard AA, Dedhar S, Pestell RG (2000) The integrin-linked kinase regulates the cyclin D1 gene through glycogen synthase kinase 3beta and cAMP-responsive element-binding protein-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry* **275**: 32649-32657

Dang DT, Zhao W, Mahatan CS, Geiman DE, Yang VW (2002) Opposing effects of Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) and Kruppel-like factor 5 (intestinal-enriched Kruppel-like factor) on the promoter of the Kruppel-like factor 4 gene. *Nucleic acids research* **30**: 2736-2741

Daniel JM, Reynolds AB (1999) The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Molecular and cellular biology* **19**: 3614-3623

Danielsen EM, Hansen GH (2003) Lipid rafts in epithelial brush borders: atypical membrane microdomains with specialized functions. *Biochimica et biophysica acta* **1617**: 1-9

Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB (2003) A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *The Journal of cell biology* **163**: 525-534

Davis MA, Reynolds AB (2006) Blocked acinar development, E-cadherin reduction, and intraepithelial neoplasia upon ablation of p120-catenin in the mouse salivary gland. *Developmental cell* **10**: 21-31

del Pozo MA, Alderson NB, Kiosses WB, Chiang HH, Anderson RG, Schwartz MA (2004) Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science (New York, NY)* **303**: 839-842

Deschenes C, Vezina A, Beaulieu JF, Rivard N (2001) Role of p27(Kip1) in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* **120**: 423-438

Domon-Dell C, Wang Q, Kim S, Kedinger M, Evers BM, Freund JN (2002) Stimulation of the intestinal Cdx2 homeobox gene by butyrate in colon cancer cells. *Gut* **50**: 525-529

Donovan J, Slingerland J (2000) Transforming growth factor-beta and breast cancer: Cell cycle arrest by transforming growth factor-beta and its disruption in cancer. *Breast Cancer Res* **2**: 116-124

Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI (2005) Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* **123**: 903-915

E

Ehrlich JS, Hansen MD, Nelson WJ (2002) Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Developmental cell* **3**: 259-270

Elphick DA, Mahida YR (2005) Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* **54**: 1802-1809

Escaffit F, Perreault N, Jean D, Francoeur C, Herring E, Rancourt C, Rivard N, Vachon PH, Pare F, Boucher MP, Auclair J, Beaulieu JF (2005) Repressed E-cadherin expression in the lower crypt of human small intestine: a cell marker of functional relevance. *Experimental cell research* **302**: 206-220

Esufali S, Charames GS, Pethe VV, Buongiorno P, Bapat B (2007) Activation of tumor-specific splice variant Rac1b by dishevelled promotes canonical Wnt signaling and decreased adhesion of colorectal cancer cells. *Cancer research* **67**: 2469-2479

Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L (2006) The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *The Biochemical journal* **397**: 1-14

Ezaki T, Guo RJ, Li H, Reynolds AB, Lynch JP (2007) The Homeodomain Transcription Factors Cdx1 and Cdx2 Induce E-cadherin Adhesion Activity by Reducing {beta}- and p120-catenin Tyrosine Phosphorylation. *American journal of physiology*

F

Faraldo ML, Rodrigo I, Behrens J, Birchmeier W, Cano A (1997) Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Molecular carcinogenesis* **20**: 33-47

- Fassler R, Meyer M (1995) Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes & development* **9**: 1896-1908
- Fiegen D, Haeusler LC, Blumenstein L, Herbrand U, Dvorsky R, Vetter IR, Ahmadian MR (2004) Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. *The Journal of biological chemistry* **279**: 4743-4749
- Finkel T (2006) Intracellular redox regulation by the family of small GTPases. *Antioxidants & redox signaling* **8**: 1857-1863
- Finnemann S, Mitrik I, Hess M, Otto G, Wedlich D (1997) Uncoupling of XB/U-cadherin-catenin complex formation from its function in cell-cell adhesion. *The Journal of biological chemistry* **272**: 11856-11862
- Fogh J, Trempe G (1975) New Human Cell Line. In Human Tumour Cells in vitro. New York: Plenum Press: p115
- Folkman J, Moscona A (1978) Role of cell shape in growth control. *Nature* **273**: 345-349
- Fontao L, Stutzmann J, Gendry P, Launay JF (1999) Regulation of the type II hemidesmosomal plaque assembly in intestinal epithelial cells. *Experimental cell research* **250**: 298-312
- Fouquet S, Lugo-Martinez VH, Faussat AM, Renaud F, Cardot P, Chambaz J, Pincon-Raymond M, Thenet S (2004) Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of Anoikis in enterocytes. *The Journal of biological chemistry* **279**: 43061-43069
- Franz CM, Ridley AJ (2004) p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubule binding and Rho GTPase regulation. *The Journal of biological chemistry* **279**: 6588-6594
- Frisch SM, Francis H (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of cell biology* **124**: 619-626
- Fu Y, Fang Z, Liang Y, Zhu X, Prins P, Li Z, Wang L, Sun L, Jin J, Yang Y, Zha X (2007) Overexpression of integrin beta1 inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721 through preventing Skp2-dependent degradation of p27 via PI3K pathway. *J Cell Biochem*
- Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J, Sommer T, Birchmeier W (2002) Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature cell biology* **4**: 222-231
- Fukasawa K (2005) Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer letters* **230**: 6-19
- Fukuyama T, Ogita H, Kawakatsu T, Inagaki M, Takai Y (2006) Activation of Rac by cadherin through the c-Src-Rap1-phosphatidylinositol 3-kinase-Vav2 pathway. *Oncogene* **25**: 8-19

Furthesthal L, Kaiser BK, Swanson C, Jackson PK (2001) Cyclin E uses Cdc6 as a chromatin-associated receptor required for DNA replication. *The Journal of cell biology* **152**: 1267-1278

G

Gautier J, Matsukawa T, Nurse P, Maller J (1989) Dephosphorylation and activation of Xenopus p34cdc2 protein kinase during the cell cycle. *Nature* **339**: 626-629

Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J (1988) Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* **54**: 433-439

Geiger B, Bershadsky A (2002) Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell* **110**: 139-142

Geiszt M, Lekstrom K, Brenner S, Hewitt SM, Dana R, Malech HL, Leto TL (2003) NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91phox in the regulated production of superoxide by phagocytes. *J Immunol* **171**: 299-306

Giancotti FG (1996) Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: charting the path between laminin binding and nuclear events. *Journal of cell science* **109** (Pt 6): 1165-1172

Gilcrease MZ (2007) Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer letters* **247**: 1-25

Giles RH, van Es JH, Clevers H (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1653**: 1-24

Gong J, Ko TC, Brattain MG (1998) Disruption of fibronectin binding to the alpha 5 beta 1 integrin stimulates the expression of cyclin-dependent kinases and DNA synthesis through activation of extracellular signal-regulated kinase. *The Journal of biological chemistry* **273**: 1662-1669

Gooding JM, Yap KL, Ikura M (2004) The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays* **26**: 497-511

Goodwin M, Kovacs EM, Thoreson MA, Reynolds AB, Yap AS (2003) Minimal mutation of the cytoplasmic tail inhibits the ability of E-cadherin to activate Rac but not phosphatidylinositol 3-kinase: direct evidence of a role for cadherin-activated Rac signaling in adhesion and contact formation. *The Journal of biological chemistry* **278**: 20533-20539

Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM (2001) E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *The Journal of cell biology* **153**: 1049-1060

- Gout S, Marie C, Laine M, Tavernier G, Block MR, Jacquier-Sarlin M (2004) Early enterocytic differentiation of HT-29 cells: biochemical changes and strength increases of adherens junctions. *Experimental cell research* **299**: 498-510
- Gout SP, Jacquier-Sarlin MR, Rouard-Talbot L, Rousselle P, Block MR (2001) RhoA-dependent switch between alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins is induced by laminin-5 during early stage of HT-29 cell differentiation. *Molecular biology of the cell* **12**: 3268-3281
- Green H (1977) Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell* **11**: 405-416
- Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destree O, Kielman M, Clevers H (2005) Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* **129**: 626-638
- Griffiths DF, Davies SJ, Williams D, Williams GT, Williams ED (1988) Demonstration of somatic mutation and colonic crypt clonality by X-linked enzyme histochemistry. *Nature* **333**: 461-463
- Grindstaff KK, Yeaman C, Anandasabapathy N, Hsu SC, Rodriguez-Boulan E, Scheller RH, Nelson WJ (1998) Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells. *Cell* **93**: 731-740
- Grosheva I, Shtutman M, Elbaum M, Bershadsky AD (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. *Journal of cell science* **114**: 695-707
- Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, Sancho E, Dedhar S, De Herreros AG, Baulida J (2002) Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *The Journal of biological chemistry* **277**: 39209-39216
- Gumbiner BM (2000) Regulation of cadherin adhesive activity. *The Journal of cell biology* **148**: 399-404
- Guo RJ, Suh ER, Lynch JP (2004) The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer biology & therapy* **3**: 593-601
- Guo W, Giancotti FG (2004) Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 816-826

H

- Hanks SK, Polte TR (1997) Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays* **19**: 137-145
- Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S (1996) Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**: 91-96

- Hatzfeld M (1999) The armadillo family of structural proteins. *International review of cytology* **186**: 179-224
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science (New York, NY)* **281**: 1509-1512
- He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L (2004) BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nature genetics* **36**: 1117-1121
- Hemler ME (2003) Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annual review of cell and developmental biology* **19**: 397-422
- Hermeking H, Funk JO, Reichert M, Ellwart JW, Eick D (1995) Abrogation of p53-induced cell cycle arrest by c-Myc: evidence for an inhibitor of p21WAF1/CIP1/SDI1. *Oncogene* **11**: 1409-1415
- Hinchcliffe EH, Li C, Thompson EA, Maller JL, Sluder G (1999) Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science (New York, NY)* **283**: 851-854
- Hinnebusch BF, Siddique A, Henderson JW, Malo MS, Zhang W, Athaide CP, Abedrapo MA, Chen X, Yang VW, Hodin RA (2004) Enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is a target gene of the gut-enriched Kruppel-like factor. *American journal of physiology* **286**: G23-30
- Hintermann E, Yang N, O'Sullivan D, Higgins JM, Quaranta V (2005) Integrin alpha6beta4-erbB2 complex inhibits haptotaxis by up-regulating E-cadherin cell-cell junctions in keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* **280**: 8004-8015
- Hirao T, Nanba D, Tanaka M, Ishiguro H, Kinugasa Y, Doki Y, Yano M, Matsuura N, Monden M, Higashiyama S (2006) Overexpression of ADAM9 enhances growth factor-mediated recycling of E-cadherin in human colon cancer cell line HT29 cells. *Experimental cell research* **312**: 331-339
- Hirohashi S, Kanai Y (2003) Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer science* **94**: 575-581
- Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, Burridge K (1986) Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature* **320**: 531-533
- Hosking CR, Ulloa F, Hogan C, Ferber EC, Figueroa A, Gevaert K, Birchmeier W, Briscoe J, Fujita Y (2007) The transcriptional repressor Glis2 is a novel binding partner for p120 catenin. *Molecular biology of the cell* **18**: 1918-1927
- Hosono S, Gross I, English MA, Hajra KM, Fearon ER, Licht JD (2000) E-cadherin is a WT1 target gene. *The Journal of biological chemistry* **275**: 10943-10953

Houde M, Laprise P, Jean D, Blais M, Asselin C, Rivard N (2001) Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *The Journal of biological chemistry* **276**: 21885-21894

Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ, Weis WI (2001) The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *The Journal of biological chemistry* **276**: 12301-12309

Huber AH, Weis WI (2001) The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* **105**: 391-402

Huet C, Sahuquillo-Merino C, Coudrier E, Louvard D (1987) Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. *The Journal of cell biology* **105**: 345-357

Hulleman E, Bijvelt JJ, Verkleij AJ, Verrips CT, Boonstra J (1999) Integrin signaling at the M/G1 transition induces expression of cyclin E. *Experimental cell research* **253**: 422-431

Hyafil F, Babinet C, Jacob F (1981) Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* **26**: 447-454

Hynes RO (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**: 549-554

Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-687

I

Ichii T, Takeichi M (2007) p120-catenin regulates microtubule dynamics and cell migration in a cadherin-independent manner. *Genes Cells* **12**: 827-839

Ireton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrisian L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F, Reynolds AB (2002) A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *The Journal of cell biology* **159**: 465-476

Izumi G, Sakisaka T, Baba T, Tanaka S, Morimoto K, Takai Y (2004) Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. *The Journal of cell biology* **166**: 237-248

J

Jenny M, Uhl C, Roche C, Duluc I, Guillermin V, Guillemot F, Jensen J, Kedinger M, Gradwohl G (2002) Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *The EMBO journal* **21**: 6338-6347

Jensen J, Pedersen EE, Galante P, Hald J, Heller RS, Ishibashi M, Kageyama R, Guillemot F, Serup P, Madsen OD (2000) Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nature genetics* **24**: 36-44

Jones RG, Li X, Gray PD, Kuang J, Clayton F, Samowitz WS, Madison BB, Gumucio DL, Kuwada SK (2006) Conditional deletion of beta1 integrins in the intestinal epithelium causes a loss of Hedgehog expression, intestinal hyperplasia, and early postnatal lethality. *The Journal of cell biology* **175**: 505-514

Jordan P, Brazao R, Boavida MG, Gespach C, Chastre E (1999) Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* **18**: 6835-6839

K

Kamei T, Matozaki T, Sakisaka T, Kodama A, Yokoyama S, Peng YF, Nakano K, Takaishi K, Takai Y (1999) Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins. *Oncogene* **18**: 6776-6784

Kaplan DD, Meigs TE, Kelly P, Casey PJ (2004) Identification of a role for beta-catenin in the establishment of a bipolar mitotic spindle. *The Journal of biological chemistry* **279**: 10829-10832

Katsumi A, Orr AW, Tzima E, Schwartz MA (2004) Integrins in mechanotransduction. *The Journal of biological chemistry* **279**: 12001-12004

Kawamura K, Izumi H, Ma Z, Ikeda R, Moriyama M, Tanaka T, Nojima T, Levin LS, Fujikawa-Yamamoto K, Suzuki K, Fukasawa K (2004) Induction of centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression. *Cancer research* **64**: 4800-4809

Kawano K, Katak SS, Murai M, Yao CC, Kramer RH (2001) Integrin alpha3beta1 engagement disrupts intercellular adhesion. *Experimental cell research* **262**: 180-196

Kedinger M, Lefebvre O, Duluc I, Freund JN, Simon-Assmann P (1998) Cellular and molecular partners involved in gut morphogenesis and differentiation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **353**: 847-856

Kedinger M, Simon-Assmann PM, Lacroix B, Marxer A, Hauri HP, Haffen K (1986) Fetal gut mesenchyme induces differentiation of cultured intestinal endodermal and crypt cells. *Developmental biology* **113**: 474-483

Keyomarsi K, Herliczek TW (1997) The role of cyclin E in cell proliferation, development and cancer. *Progress in cell cycle research* **3**: 171-191

Klein G, Langegger M, Timpl R, Ekblom P (1988) Role of laminin A chain in the development of epithelial cell polarity. *Cell* **55**: 331-341

- Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ (1995) Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *The Journal of cell biology* **130**: 67-77
- Kobielak A, Pasolli HA, Fuchs E (2004) Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nature cell biology* **6**: 21-30
- Koch AW, Bozic D, Pertz O, Engel J (1999a) Homophilic adhesion by cadherins. *Current opinion in structural biology* **9**: 275-281
- Koch M, Olson PF, Albus A, Jin W, Hunter DD, Brunken WJ, Burgeson RE, Champlaud MF (1999b) Characterization and expression of the laminin gamma3 chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *The Journal of cell biology* **145**: 605-618
- Koch PJ, Walsh MJ, Schmelz M, Goldschmidt MD, Zimbelmann R, Franke WW (1990) Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *European journal of cell biology* **53**: 1-12
- Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H (1998) Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature genetics* **19**: 379-383
- Kotelevets L, van Hengel J, Bruyneel E, Mareel M, van Roy F, Chastre E (2001) The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for stabilizing intercellular junctions and reverting invasiveness. *The Journal of cell biology* **155**: 1129-1135
- Kotelevets L, van Hengel J, Bruyneel E, Mareel M, van Roy F, Chastre E (2005) Implication of the MAGI-1b/PTEN signalosome in stabilization of adherens junctions and suppression of invasiveness. *Faseb J* **19**: 115-117
- Kottke MD, Delva E, Kowalczyk AP (2006) The desmosome: cell science lessons from human diseases. *Journal of cell science* **119**: 797-806
- Kovacs EM, Ali RG, McCormack AJ, Yap AS (2002a) E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. *The Journal of biological chemistry* **277**: 6708-6718
- Kovacs EM, Goodwin M, Ali RG, Paterson AD, Yap AS (2002b) Cadherin-directed actin assembly: E-cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. *Curr Biol* **12**: 379-382
- Krause M, Dent EW, Bear JE, Loureiro JJ, Gertler FB (2003) Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annual review of cell and developmental biology* **19**: 541-564
- Krude T, Jackman M, Pines J, Laskey RA (1997) Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell* **88**: 109-119
- Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M, Fujii K, Nakamura T, Ookubo T, Izawa I, Nagase T, Nomura N, Tani H, Shoji I, Matsuura Y, Yonehara S, Kaibuchi K (1998) Role of IQGAP1, a

target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin- mediated cell-cell adhesion. *Science (New York, NY)* **281**: 832-835

L

Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, Rivard N (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *The Journal of biological chemistry* **277**: 8226-8234

Laprise P, Langlois MJ, Boucher MJ, Jobin C, Rivard N (2004) Down-regulation of MEK/ERK signaling by E-cadherin-dependent PI3K/Akt pathway in differentiating intestinal epithelial cells. *Journal of cellular physiology* **199**: 32-39

Larue L, Bellacosa A (2005) Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* **24**: 7443-7454

Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R (1994) E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophoblast epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 8263-8267

Le TL, Yap AS, Stow JL (1999) Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *The Journal of cell biology* **146**: 219-232

Leivo I, Tani T, Laitinen L, Bruns R, Kivilaakso E, Lehto VP, Burgeson RE, Virtanen I (1996) Anchoring complex components laminin-5 and type VII collagen in intestine: association with migrating and differentiating enterocytes. *J Histochem Cytochem* **44**: 1267-1277

Lesuffleur T, Kornowski A, Augeron C, Dussaulx E, Barbat A, Laboisie C, Zweibaum A (1991) Increased growth adaptability to 5-fluorouracil and methotrexate of HT-29 subpopulations selected for their commitment to differentiation. *International journal of cancer* **49**: 731-737

Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ (1987) Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 136-140

Li Q, Dashwood WM, Zhong X, Al-Fageeh M, Dashwood RH (2004a) Cloning of the rat beta-catenin gene (Ctnnb1) promoter and its functional analysis compared with the Catnb and CTNNB1 promoters. *Genomics* **83**: 231-242

Li R, Babu CR, Lear JD, Wand AJ, Bennett JS, DeGrado WF (2001) Oligomerization of the integrin alphaIIb beta3: roles of the transmembrane and cytoplasmic domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 12462-12467

- Li X, Leu S, Cheong A, Zhang H, Baibakov B, Shih C, Birnbaum MJ, Donowitz M (2004b) Akt2, phosphatidylinositol 3-kinase, and PTEN are in lipid rafts of intestinal cells: role in absorption and differentiation. *Gastroenterology* **126**: 122-135
- Liang YL, Lei TW, Wu H, Su JM, Wang LY, Lei QY, Zha XL (2003) S-phase delay in human hepatocellular carcinoma cells induced by overexpression of integrin beta1. *World J Gastroenterol* **9**: 1689-1696
- Libby RT, Champliand MF, Claudepierre T, Xu Y, Gibbons EP, Koch M, Burgeson RE, Hunter DD, Brunken WJ (2000) Laminin expression in adult and developing retinae: evidence of two novel CNS laminins. *J Neurosci* **20**: 6517-6528
- Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, D'Assoro AB, Boeneman K, Liu W, Whitehead CM, Reynolds C, Salisbury JL (2002) Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 1978-1983
- Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M, Anderson RG (2004) Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *The Journal of biological chemistry* **279**: 3787-3792
- Liu WF, Nelson CM, Pirone DM, Chen CS (2006) E-cadherin engagement stimulates proliferation via Rac1. *The Journal of cell biology* **173**: 431-441
- Lo SH (2006) Focal adhesions: what's new inside. *Developmental biology* **294**: 280-291
- Lohi J, Leivo I, Tani T, Kiviluoto T, Kivilaakso E, Burgeson RE, Virtanen I (1996) Laminins, tenascin and type VII collagen in colorectal mucosa. *The Histochemical journal* **28**: 431-440
- Longhurst CM, Jennings LK (1998) Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci* **54**: 514-526
- Lopez-Casas PP, del Mazo J (2003) Regulation of flotillin-1 in the establishment of NIH-3T3 cell-cell interactions. *FEBS letters* **555**: 223-228
- Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Kedinger M, Freund JN (1997) Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *The Journal of cell biology* **139**: 1553-1565
- Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T (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
- Luton F, Klein S, Chauvin JP, Le Bivic A, Bourgoin S, Franco M, Chardin P (2004) EFA6, exchange factor for ARF6, regulates the actin cytoskeleton and associated tight junction in response to E-cadherin engagement. *Molecular biology of the cell* **15**: 1134-1145

M

- Mahatan CS, Kaestner KH, Geiman DE, Yang VW (1999) Characterization of the structure and regulation of the murine gene encoding gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4). *Nucleic acids research* **27**: 4562-4569
- Maiuri L, Raia V, Potter J, Swallow D, Ho MW, Fiocca R, Finzi G, Cornaggia M, Capella C, Quaroni A, et al. (1991) Mosaic pattern of lactase expression by villous enterocytes in human adult-type hypolactasia. *Gastroenterology* **100**: 359-369
- Malaterre J, Carpinelli M, Ernst M, Alexander W, Cooke M, Sutton S, Dworkin S, Heath JK, Frampton J, McArthur G, Clevers H, Hilton D, Mantamadiotis T, Ramsay RG (2007) c-Myb is required for progenitor cell homeostasis in colonic crypts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 3829-3834
- Mallo GV, Soubeyran P, Lissitzky JC, Andre F, Farnarier C, Marvaldi J, Dagorn JC, Iovanna JL (1998) Expression of the Cdx1 and Cdx2 homeotic genes leads to reduced malignancy in colon cancer-derived cells. *The Journal of biological chemistry* **273**: 14030-14036
- Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P (2005) ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 9182-9187
- Mariadason JM, Bordonaro M, Aslam F, Shi L, Kuraguchi M, Velcich A, Augenlicht LH (2001) Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer research* **61**: 3465-3471
- Masramon L, Vendrell E, Tarafa G, Capella G, Miro R, Ribas M, Peinado MA (2006) Genetic instability and divergence of clonal populations in colon cancer cells in vitro. *Journal of cell science* **119**: 1477-1482
- Masui Y, Markert CL (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *The Journal of experimental zoology* **177**: 129-145
- Matos P, Collard JG, Jordan P (2003) Tumor-related alternatively spliced Rac1b is not regulated by Rho-GDP dissociation inhibitors and exhibits selective downstream signaling. *The Journal of biological chemistry* **278**: 50442-50448
- Matsumoto Y, Hayashi K, Nishida E (1999) Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr Biol* **9**: 429-432
- Mazumder S, DuPree EL, Almasan A (2004) A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy. *Current cancer drug targets* **4**: 65-75
- McConnell BB, Ghaleb AM, Nandan MO, Yang VW (2007) The diverse functions of Kruppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology. *Bioessays* **29**: 549-557
- McLachlan RW, Kraemer A, Helwani FM, Kovacs EM, Yap AS (2007) E-Cadherin Adhesion Activates c-Src Signaling at Cell-Cell Contacts. *Molecular biology of the cell*

- McNeill H, Ozawa M, Kemler R, Nelson WJ (1990) Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell* **62**: 309-316
- Mechanic S, Raynor K, Hill JE, Cowin P (1991) Desmocollins form a distinct subset of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 4476-4480
- Mercurio AM (1995) Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. *Trends in cell biology* **5**: 419-423
- Mochizuki S, Okada Y (2007) ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer science* **98**: 621-628
- Monier-Gavelle F, Duband JL (1997) Cross talk between adhesion molecules: control of N-cadherin activity by intracellular signals elicited by beta1 and beta3 integrins in migrating neural crest cells. *The Journal of cell biology* **137**: 1663-1681
- Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ (1999) Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology* **116**: 702-731
- Moreno-Altamirano MM, Aguilar-Carmona I, Sanchez-Garcia FJ (2007) Expression of GM1, a marker of lipid rafts, defines two subsets of human monocytes with differential endocytic capacity and lipopolysaccharide responsiveness. *Immunology* **120**: 536-543
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science (New York, NY)* **275**: 1787-1790
- Mosnier JF, Jarry A, Bou-Hanna C, Denis MG, Merlin D, Laboisse CL (2006) ADAM15 upregulation and interaction with multiple binding partners in inflammatory bowel disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **86**: 1064-1073
- Motti ML, Califano D, Baldassarre G, Celetti A, Merolla F, Forzati F, Napolitano M, Tavernise B, Fusco A, Viglietto G (2005) Reduced E-cadherin expression contributes to the loss of p27kip1-mediated mechanism of contact inhibition in thyroid anaplastic carcinomas. *Carcinogenesis* **26**: 1021-1034
- Mould AP, Humphries MJ (2004) Regulation of integrin function through conformational complexity: not simply a knee-jerk reaction? *Current opinion in cell biology* **16**: 544-551
- Mukoyama Y, Utani A, Matsui S, Zhou S, Miyachi Y, Matsuyoshi N (2007) T-cadherin enhances cell-matrix adhesiveness by regulating beta1 integrin trafficking in cutaneous squamous carcinoma cells. *Genes Cells* **12**: 787-796
- Murgia C, Blaikie P, Kim N, Dans M, Petrie HT, Giancotti FG (1998) Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin beta4 cytoplasmic domain. *The EMBO journal* **17**: 3940-3951

N

- Nagafuchi A, Takeichi M (1988) Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *The EMBO journal* **7**: 3679-3684
- Nateri AS, Spencer-Dene B, Behrens A (2005) Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature* **437**: 281-285
- Navarro P, Gomez M, Pizarro A, Gamallo C, Quintanilla M, Cano A (1991) A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *The Journal of cell biology* **115**: 517-533
- Nguyen BP, Gil SG, Carter WG (2000) Deposition of laminin 5 by keratinocytes regulates integrin adhesion and signaling. *The Journal of biological chemistry* **275**: 31896-31907
- Nievers MG, Schaapveld RQ, Sonnenberg A (1999) Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol* **18**: 5-17
- Nimmual AS, Taylor LJ, Bar-Sagi D (2003) Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nature cell biology* **5**: 236-241
- Nobes CD, Hall A (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**: 53-62
- Nollet F, Kools P, van Roy F (2000) Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *Journal of molecular biology* **299**: 551-572
- Nong CZ, Pan LL, He WS, Zha XL, Ye HH, Huang HY (2006) P120ctn overexpression enhances beta-catenin-E-cadherin binding and down regulates expression of survivin and cyclin D1 in BEL-7404 hepatoma cells. *World J Gastroenterol* **12**: 1187-1191
- Noren NK, Liu BP, Burridge K, Kreft B (2000) p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *The Journal of cell biology* **150**: 567-580
- Noren NK, Niessen CM, Gumbiner BM, Burridge K (2001) Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *The Journal of biological chemistry* **276**: 33305-33308
- Nusrat A, Parkos CA, Verkade P, Foley CS, Liang TW, Innis-Whitehouse W, Eastburn KK, Madara JL (2000) Tight junctions are membrane microdomains. *Journal of cell science* **113** (Pt 10): 1771-1781

O

- Ohkubo T, Ozawa M (1999) p120(ctn) binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity. *The Journal of biological chemistry* **274**: 21409-21415
- Ohkubo T, Ozawa M (2004) The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *Journal of cell science* **117**: 1675-1685
- Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Molecular and cellular biology* **15**: 2612-2624
- Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, Knudsen ES, Hofmann IA, Snyder JD, Bove KE, Fukasawa K (2000) Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* **103**: 127-140
- Oloumi A, McPhee T, Dedhar S (2004) Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochimica et biophysica acta* **1691**: 1-15
- Orian-Rousseau V, Aberdam D, Fontao L, Chevalier L, Meneguzzi G, Kedinger M, Simon-Assmann P (1996) Developmental expression of laminin-5 and HD1 in the intestine: epithelial to mesenchymal shift for the laminin gamma-2 chain subunit deposition. *Dev Dyn* **206**: 12-23
- Orian-Rousseau V, Aberdam D, Rousselle P, Messent A, Gavrilovic J, Meneguzzi G, Kedinger M, Simon-Assmann P (1998) Human colonic cancer cells synthesize and adhere to laminin-5. Their adhesion to laminin-5 involves multiple receptors among which is integrin alpha2beta1. *Journal of cell science* **111** (Pt 14): 1993-2004
- Ozaki M, Ogita H, Takai Y (2007) Involvement of integrin-induced activation of protein kinase C in the formation of adherens junctions. *Genes Cells* **12**: 651-662
- Ozawa M, Kemler R (1990) Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin. *The Journal of cell biology* **111**: 1645-1650
- Ozawa M, Kemler R (1998) The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *The Journal of cell biology* **142**: 1605-1613
- Ozawa M, Ohkubo T (2001) Tyrosine phosphorylation of p120(ctn) in v-Src transfected L cells depends on its association with E-cadherin and reduces adhesion activity. *Journal of cell science* **114**: 503-512
- Ozawa M, Ringwald M, Kemler R (1990) Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 4246-4250

P

Palacios F, Price L, Schweitzer J, Collard JG, D'Souza-Schorey C (2001) An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *The EMBO journal* **20**: 4973-4986

Pang JH, Kraemer A, Stehbens SJ, Frame MC, Yap AS (2005) Recruitment of phosphoinositide 3-kinase defines a positive contribution of tyrosine kinase signaling to E-cadherin function. *The Journal of biological chemistry* **280**: 3043-3050

Park CS, Kim SI, Lee MS, Youn CY, Kim DJ, Jho EH, Song WK (2004) Modulation of beta-catenin phosphorylation/degradation by cyclin-dependent kinase 2. *The Journal of biological chemistry* **279**: 19592-19599

Park JI, Ji H, Jun S, Gu D, Hikasa H, Li L, Sokol SY, McCrea PD (2006) Frd1 links Dishevelled to the p120-catenin/Kaiso pathway: distinct catenin subfamilies promote Wnt signals. *Developmental cell* **11**: 683-695

Park JI, Kim SW, Lyons JP, Ji H, Nguyen TT, Cho K, Barton MC, Deroo T, Vleminckx K, Moon RT, McCrea PD (2005) Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Developmental cell* **8**: 843-854

Parviz F, Matullo C, Garrison WD, Savatski L, Adamson JW, Ning G, Kaestner KH, Rossi JM, Zaret KS, Duncan SA (2003) Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nature genetics* **34**: 292-296

Paulsson M, Deutzmann R, Timpl R, Dalzoppo D, Odermatt E, Engel J (1985) Evidence for coiled-coil alpha-helical regions in the long arm of laminin. *The EMBO journal* **4**: 309-316

Pece S, Chiariello M, Murga C, Gutkind JS (1999) Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *The Journal of biological chemistry* **274**: 19347-19351

Peignon G, Thenet S, Schreider C, Fouquet S, Ribeiro A, Dussaulx E, Chambaz J, Cardot P, Pincon-Raymond M, Le Beyec J (2006) E-cadherin-dependent transcriptional control of apolipoprotein A-IV gene expression in intestinal epithelial cells: a role for the hepatic nuclear factor 4. *The Journal of biological chemistry* **281**: 3560-3568

Perez-Moreno M, Davis MA, Wong E, Pasolli HA, Reynolds AB, Fuchs E (2006) p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin. *Cell* **124**: 631-644

Perez-Moreno M, Fuchs E (2006) Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Developmental cell* **11**: 601-612

Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E (2003) Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* **112**: 535-548

- Perner A, Andresen L, Pedersen G, Rask-Madsen J (2003) Superoxide production and expression of NAD(P)H oxidases by transformed and primary human colonic epithelial cells. *Gut* **52**: 231-236
- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J (1999) A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *The EMBO journal* **18**: 1738-1747
- Piccinni SA, Bolcato-Bellemin AL, Klein A, Yang VW, Kedinger M, Simon-Assmann P, Lefebvre O (2004) Kruppel-like factors regulate the Lama1 gene encoding the laminin alpha 1 chain. *The Journal of biological chemistry* **279**: 9103-9114
- Piedra J, Miravet S, Castano J, Palmer HG, Heisterkamp N, Garcia de Herreros A, Dunach M (2003) p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Molecular and cellular biology* **23**: 2287-2297
- Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H (2003) Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes & development* **17**: 1709-1713
- Pinto M, Appay MD, Simon-Assman P, Chevalier G, Dracopoli N, Fogh J, Zweibaum A (1982) Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biol Cell* **44**: 193-196
- Plateroti M, Kress E, Mori JI, Samarut J (2006) Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Molecular and cellular biology* **26**: 3204-3214
- Pokutta S, Drees F, Takai Y, Nelson WJ, Weis WI (2002) Biochemical and structural definition of the I-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. *The Journal of biological chemistry* **277**: 18868-18874
- Pokutta S, Weis WI (2000) Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Molecular cell* **5**: 533-543
- Ponder BA, Schmidt GH, Wilkinson MM, Wood MJ, Monk M, Reid A (1985) Derivation of mouse intestinal crypts from single progenitor cells. *Nature* **313**: 689-691
- Potten CS (1998) Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **353**: 821-830

Q

- Quinlan MP (1999) Rac regulates the stability of the adherens junction and its components, thus affecting epithelial cell differentiation and transformation. *Oncogene* **18**: 6434-6442

R

- Rabenandrasana C, Baghdiguan S, Roccabianca M, Brunet M, Marvaldi J, Fantini J (1990) The concentration of glucose in the culture medium determines the effect of suramin on the growth and differentiation of the human colonic adenocarcinoma cell clone HT29-D4. *Cancer letters* **53**: 109-115
- Radtke F, Clevers H (2005) Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science (New York, NY)* **307**: 1904-1909
- Ramsay RG, Ciznadija D, Sicurella C, Reyes N, Mitchelhill K, Darcy PK, D'Abaco G, Mantamadiotis T (2005) Colon epithelial cell differentiation is inhibited by constitutive c-myc expression or mutant APC plus activated RAS. *DNA and cell biology* **24**: 21-29
- Reiske HR, Kao SC, Cary LA, Guan JL, Lai JF, Chen HC (1999) Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *The Journal of biological chemistry* **274**: 12361-12366
- Reynolds AB, Daniel JM, Mo YY, Wu J, Zhang Z (1996) The novel catenin p120cas binds classical cadherins and induces an unusual morphological phenotype in NIH3T3 fibroblasts. *Experimental cell research* **225**: 328-337
- Reynolds AB, Roczniak-Ferguson A (2004) Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene* **23**: 7947-7956
- Reynolds AB, Roesel DJ, Kanner SB, Parsons JT (1989) Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Molecular and cellular biology* **9**: 629-638
- Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS (1995) Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 8813-8817
- Roczniak-Ferguson A, Reynolds AB (2003) Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. *Journal of cell science* **116**: 4201-4212
- Roovers K, Assoian RK (2000) Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* **22**: 818-826
- Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M (1999) Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **274**: 36734-36740
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science (New York, NY)* **238**: 491-497
- Ryynanen M, Knowlton RG, Parente MG, Chung LC, Chu ML, Uitto J (1991) Human type VII collagen: genetic linkage of the gene (COL7A1) on chromosome 3 to dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *American journal of human genetics* **49**: 797-803

S

Sancho E, Batlle E, Clevers H (2003) Live and let die in the intestinal epithelium. *Current opinion in cell biology* **15**: 763-770

Sander EE, van Delft S, ten Klooster JP, Reid T, van der Kammen RA, Michiels F, Collard JG (1998) Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of cell biology* **143**: 1385-1398

Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, Batlle E, Simon-Assmann P, Clevers H, Nathke IS, Clarke AR, Winton DJ (2004) Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes & development* **18**: 1385-1390

Sasaki M, Kleinman HK, Huber H, Deutzmann R, Yamada Y (1988) Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *The Journal of biological chemistry* **263**: 16536-16544

Sastry SK, Lakonishok M, Wu S, Truong TQ, Huttenlocher A, Turner CE, Horwitz AF (1999) Quantitative changes in integrin and focal adhesion signaling regulate myoblast cell cycle withdrawal. *The Journal of cell biology* **144**: 1295-1309

Sauvaget D, Chauffeton V, Citadelle D, Chatelet FP, Cywiner-Golenzer C, Chambaz J, Pincon-Raymond M, Cardot P, Le Beyec J, Ribeiro A (2002) Restriction of apolipoprotein A-IV gene expression to the intestine villus depends on a hormone-responsive element and parallels differential expression of the hepatic nuclear factor 4alpha and gamma isoforms. *The Journal of biological chemistry* **277**: 34540-34548

Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT (1995) Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *The Journal of cell biology* **130**: 1181-1187

Schneeberger EE, Lynch RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**: C1213-1228

Schorderet-Slatkine S, Drury KC (1973) Progesterone induced maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. Appearance of a 'maturation promoting factor' in enucleated oocytes. *Cell differentiation* **2**: 247-254

Schreider C, Peignon G, Thenet S, Chambaz J, Pincon-Raymond M (2002) Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin--actin complexes. *Journal of cell science* **115**: 543-552

- Schwartz MA, Assoian RK (2001) Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *Journal of cell science* **114**: 2553-2560
- Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development* **13**: 1501-1512
- Shewan AM, Maddugoda M, Kraemer A, Stehbins SJ, Verma S, Kovacs EM, Yap AS (2005) Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Molecular biology of the cell* **16**: 4531-4542
- Shinotsuka C, Waguri S, Wakasugi M, Uchiyama Y, Nakayama K (2002) Dominant-negative mutant of BIG2, an ARF-guanine nucleotide exchange factor, specifically affects membrane trafficking from the trans-Golgi network through inhibiting membrane association of AP-1 and GGA coat proteins. *Biochemical and biophysical research communications* **294**: 254-260
- Shirahama S, Furukawa F, Wakita H, Takigawa M (1996) E- and P-cadherin expression in tumor tissues and soluble E-cadherin levels in sera of patients with skin cancer. *Journal of dermatological science* **13**: 30-36
- Shore EM, Nelson WJ (1991) Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **266**: 19672-19680
- Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, Bonnet C, Cherbut C, Galmiche JP, Blottiere HM (2000) Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* **46**: 507-514
- Simo P, Simon-Assmann P, Arnold C, Kedinger M (1992) Mesenchyme-mediated effect of dexamethasone on laminin in cocultures of embryonic gut epithelial cells and mesenchyme-derived cells. *Journal of cell science* **101** (Pt 1): 161-171
- Simo P, Simon-Assmann P, Bouziges F, Leberquier C, Kedinger M, Ekblom P, Sorokin L (1991) Changes in the expression of laminin during intestinal development. *Development (Cambridge, England)* **112**: 477-487
- Simon-Assmann P, Kedinger M, De Arcangelis A, Rousseau V, Simo P (1995) Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia* **51**: 883-900
- Simons M, Kramer EM, Thiele C, Stoffel W, Trotter J (2000) Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *The Journal of cell biology* **151**: 143-154
- Spring CM, Kelly KF, O'Kelly I, Graham M, Crawford HC, Daniel JM (2005) The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin. *Experimental cell research* **305**: 253-265
- Sriramarao P, Steffner P, Gehlsen KR (1993) Biochemical evidence for a homophilic interaction of the alpha 3 beta 1 integrin. *The Journal of biological chemistry* **268**: 22036-22041

St Croix B, Sheehan C, Rak JW, Florenes VA, Slingerland JM, Kerbel RS (1998) E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *The Journal of cell biology* **142**: 557-571

Stoker M, O'Neill C, Berryman S, Waxman V (1968) Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. *International journal of cancer* **3**: 683-693

Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O, Reed SI (2001) Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* **413**: 316-322

Stutzmann J, Bellissent-Waydelich A, Fontao L, Launay JF, Simon-Assmann P (2000) Adhesion complexes implicated in intestinal epithelial cell-matrix interactions. *Microscopy research and technique* **51**: 179-190

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T (1996) Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *The Biochemical journal* **318** (Pt 2): 379-382

T

Tachibana K, Nakanishi H, Mandai K, Ozaki K, Ikeda W, Yamamoto Y, Nagafuchi A, Tsukita S, Takai Y (2000) Two cell adhesion molecules, nectin and cadherin, interact through their cytoplasmic domain-associated proteins. *The Journal of cell biology* **150**: 1161-1176

Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA (2003) Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science (New York, NY)* **302**: 103-106

Tapon N, Hall A (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Current opinion in cell biology* **9**: 86-92

Tarapore P, Okuda M, Fukasawa K (2002) A mammalian in vitro centriole duplication system: evidence for involvement of CDK2/cyclin E and nucleophosmin/B23 in centrosome duplication. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **1**: 75-81

Teller IC, Beaulieu JF (2001) Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert reviews in molecular medicine* **2001**: 1-18

Tetsu O, McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**: 422-426

Theard D, Steiner M, Kalicharan D, Hoekstra D, van Ijzendoorn SC (2007) Cell Polarity Development and Protein Trafficking in Hepatocytes Lacking E-Cadherin/beta-Catenin-based Adherens Junctions. *Molecular biology of the cell* **18**: 2313-2321

Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**: 442-454

Timpl R, Brown JC (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* **18**: 123-132

Trier JS, Moxey PC (1979) Morphogenesis of the small intestine during fetal development. *Ciba Foundation symposium*: 3-29

Tsukamoto T, Nigam SK (1999) Cell-cell dissociation upon epithelial cell scattering requires a step mediated by the proteasome. *The Journal of biological chemistry* **274**: 24579-24584

Turck N, Gross I, Gendry P, Stutzmann J, Freund JN, Kedinger M, Simon-Assmann P, Launay JF (2005) Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. *Experimental cell research* **303**: 494-503

Turck N, Lefebvre O, Gross I, Gendry P, Kedinger M, Simon-Assmann P, Launay JF (2006) Effect of laminin-1 on intestinal cell differentiation involves inhibition of nuclear nucleolin. *Journal of cellular physiology* **206**: 545-555

V

van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **111**: 241-250

Vandenberg P, Kern A, Ries A, Luckenbill-Edds L, Mann K, Kuhn K (1991) Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins. *The Journal of cell biology* **113**: 1475-1483

Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E (2000) Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**: 209-219

Vasioukhin V, Bowers E, Bauer C, Degenstein L, Fuchs E (2001) Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nature cell biology* **3**: 1076-1085

Vespa A, D'Souza SJ, Dagnino L (2005) A novel role for integrin-linked kinase in epithelial sheet morphogenesis. *Molecular biology of the cell* **16**: 4084-4095

Vogelmann R, Nguyen-Tat MD, Giehl K, Adler G, Wedlich D, Menke A (2005) TGFbeta-induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. *Journal of cell science* **118**: 4901-4912

Volonte D, Galbiati F, Li S, Nishiyama K, Okamoto T, Lisanti MP (1999) Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-

oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. *The Journal of biological chemistry* **274**: 12702-12709

W

Wang Q, Wang X, Hernandez A, Kim S, Evers BM (2001) Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to HT29 and Caco-2 intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* **120**: 1381-1392

Watabe-Uchida M, Uchida N, Imamura Y, Nagafuchi A, Fujimoto K, Uemura T, Vermeulen S, van Roy F, Adamson ED, Takeichi M (1998) alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *The Journal of cell biology* **142**: 847-857

Watt FM, Kubler MD, Hotchin NA, Nicholson LJ, Adams JC (1993) Regulation of keratinocyte terminal differentiation by integrin-extracellular matrix interactions. *Journal of cell science* **106 (Pt 1)**: 175-182

Wice BM, Trugnan G, Pinto M, Rousset M, Chevalier G, Dussaulx E, Lacroix B, Zweibaum A (1985) The intracellular accumulation of UDP-N-acetylhexosamines is concomitant with the inability of human colon cancer cells to differentiate. *The Journal of biological chemistry* **260**: 139-146

Wild-Bode C, Fellerer K, Kugler J, Haass C, Capell A (2006) A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration. *The Journal of biological chemistry* **281**: 23824-23829

Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J, Reynolds AB (2006) p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* **127**: 1027-1039

Won KA, Reed SI (1996) Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *The EMBO journal* **15**: 4182-4193

Wu C, Keightley SY, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Coppolino M, Goicoechea S, McDonald JA, Dedhar S (1998) Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity. *The Journal of biological chemistry* **273**: 528-536

Wu H, Liang YL, Li Z, Jin J, Zhang W, Duan L, Zha X (2006) Positive expression of E-cadherin suppresses cell adhesion to fibronectin via reduction of alpha5beta1 integrin in human breast carcinoma cells. *Journal of cancer research and clinical oncology* **132**: 795-803

X

Xia H, Nho RS, Kahm J, Kleidon J, Henke CA (2004) Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* **279**: 33024-33034

Xiao K, Allison DF, Buckley KM, Kottke MD, Vincent PA, Faundez V, Kowalczyk AP (2003) Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *The Journal of cell biology* **163**: 535-545

Xiao K, Oas RG, Chiasson CM, Kowalczyk AP (2007) Role of p120-catenin in cadherin trafficking. *Biochimica et biophysica acta* **1773**: 8-16

Xie Z, Bikle DD (2007) The recruitment of phosphatidylinositol 3-kinase to the E-cadherin-catenin complex at the plasma membrane is required for calcium-induced phospholipase C-gamma1 activation and human keratinocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry* **282**: 8695-8703

Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA (2001) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science (New York, NY)* **294**: 339-345

Y

Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ (2005) Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**: 889-901

Yanagisawa M, Kaverina IN, Wang A, Fujita Y, Reynolds AB, Anastasiadis PZ (2004) A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function. *The Journal of biological chemistry* **279**: 9512-9521

Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, Zoghbi HY (2001) Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science (New York, NY)* **294**: 2155-2158

Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM (1998) The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *The Journal of cell biology* **141**: 779-789

Z

Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, Kaestner KH, Biggs JR, Kraft AS, Yang VW (2000) The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *The Journal of biological chemistry* **275**: 18391-18398

Zhang X, Cromwell JW, Kunjummen BD, Yee D, Garcia-Aguilar J (2003) The alpha2 and alpha3 integrins are required for morphologic differentiation of an intestinal epithelial cell line. *Surgery* **133**: 429-437

Zhu B, Chappuis-Flament S, Wong E, Jensen IE, Gumbiner BM, Leckband D (2003) Functional analysis of the structural basis of homophilic cadherin adhesion. *Biophysical journal* **84**: 4033-4042

Ziemer LT, Pennica D, Levine AJ (2001) Identification of a mouse homolog of the human BTEB2 transcription factor as a beta-catenin-independent Wnt-1-responsive gene. *Molecular and cellular biology* **21**: 562-574

Zweibaum A, Pinto M, Chevalier G, Dussaulx E, Triadou N, Lacroix B, Haffen K, Brun JL, Rousset M (1985) Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *Journal of cellular physiology* **122**: 21-29