



HAL
open science

Rôle d'EpCAM sur l'activité du réseau d'actomyosine et impact sur le maintien de l'organisation épithéliale

Cécile Gaston

► To cite this version:

Cécile Gaston. Rôle d'EpCAM sur l'activité du réseau d'actomyosine et impact sur le maintien de l'organisation épithéliale. Biologie cellulaire. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP7028 . tel-03348480

HAL Id: tel-03348480

<https://theses.hal.science/tel-03348480>

Submitted on 19 Sep 2021

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.



Université de Paris

Université Paris Diderot

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité ED 562

Institut Jacques Monod, équipe Adhésion cellulaire et mécanique

Rôle d'EpCAM sur l'activité du réseau d'actomyosine et impact sur le maintien de l'organisation épithéliale

Par Cécile Gaston

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par Delphine Delacour

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 18/09/2019

Président du jury	ECHARD Arnaud, DR1, Institut Pasteur
Rapporteur	BLANGY Anne DR1, Centre de Recherche en Biologie cellulaire Montpellier
Rapporteur	ECHARD Arnaud, DR1, Institut Pasteur
Examineur	FAUROBERT Eva, CR1, Université Grenoble Alpes
Examineur	PLASTINO Julie, DR2, Institut Curie
Directrice de thèse	DELACOUR Delphine, DR2, Institut Jacques Monod

Titre : Rôle d'EpCAM sur l'activité du réseau d'actomyosine et impact sur le maintien de l'organisation épithéliale

Résumé :

L'intégrité des épithéliums dépend du contrôle de l'organisation et de l'activité du cytosquelette d'actomyosine afin de maintenir la forme et l'adhérence des cellules en homéostasie, mais aussi en situation de stress. L'actomyosine est régulée par de nombreuses voies de signalisation agissant sur la dynamique de l'actine et/ou l'activité de la myosine, l'une d'entre elles résultant de l'activation de la petite GTPase RhoA. EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) a tout d'abord été décrite comme une molécule d'adhérence calcium-indépendante, spécifique des épithéliums, mais des analyses récentes mettent en doute cette fonction. Dans ce manuscrit, je décris la participation d'EpCAM à la régulation de la contractilité dans les épithéliums, et son importance pour le maintien de la polarité cellulaire. Dans une première étude, nous démontrons qu'EpCAM est nécessaire pour la distribution et l'activité correcte de la myosine-II, afin de contrôler l'intégrité des jonctions et le maintien de la polarité apico-basale dans une monocouche épithéliale. La perte d'EpCAM induit une perte de polarité atypique, aux effets dévastateurs sur l'intégrité de l'épithélium, et qui empire en présence d'un stress mécanique. Dans un deuxième article, nous présentons l'effet de la perte d'EpCAM sur la capacité d'adhérence au substrat et de migration des cellules. Nous avons démontré qu'EpCAM est impliquée dans le recyclage de RhoA activé, permettant la bonne organisation de l'actomyosine pour la mise en place d'une polarité avant-arrière. De manière surprenante, nos expériences indiquent que l'effet d'EpCAM est indépendant de la présence de contacts cellulaires. Nous proposons donc que la fonction d'EpCAM soit révisée en tant que régulateur de la contractilité cellulaire. Ces résultats mettent en lumière l'importance de la régulation spatio-temporelle de RhoA pour la contractilité et les effets de celle-ci sur l'intégrité épithéliale.

Mots-clefs : EpCAM, contractilité cellulaire, RhoA, polarité cellulaire, intégrité épithéliale

Title: Role of EpCAM on the actomyosin cytoskeleton activity and its impact on epithelial organization and maintenance

Abstract:

Epithelial integrity relies on the correct distribution and activity of the actomyosin cytoskeleton to maintain cell shape and junctional adhesion during homeostasis, and even more importantly, under stress. The actomyosin apparatus is regulated by many different signalling pathways targeting either the actin dynamics or myosin activation, one of which is dependent on the small GTPase RhoA. EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) was primarily described as a Ca²⁺-independent cell-cell adhesion molecule that is specific of epithelia, although recent analyses tend to challenge this statement. In this work, we report the involvement of EpCAM in epithelial contractility regulation and its importance for the maintenance of cell polarity. In a first study, we show that EpCAM is required for proper distribution and activity of Myosin-II that controls junctional integrity and the maintenance of apico-basal polarity in an epithelial monolayer. EpCAM depletion leads to an atypical polarity loss with devastating effects on the epithelium integrity, worsening when the epithelial monolayer is subjected to mechanical stress. In a second study, we tackled the issue of EpCAM depletion on the actomyosin apparatus in relation to cell-substrate adhesion and cell migration. We demonstrated that EpCAM is involved in the control of active RhoA recycling, allowing for the correct organization of the actomyosin apparatus and the establishment of front-rear polarity. Surprisingly, our results showed that these effects were cell-autonomous and did not require the presence of cell-cell junctions. We propose that EpCAM function as a cell adhesion molecule is revised to a more general role as a cell contractility regulator. These results bring new light on the spatio-temporal regulation of RhoA-dependent contractility, and its effects on epithelial integrity.

Keywords: EpCAM, cell contractility, RhoA, cell polarity, epithelial integrity

Remerciements

En tout premier, Delphine, merci du fond du cœur pour avoir cru en moi et m'avoir confié ces projets pendant 4 ans. Si j'ai autant appris sous ta tutelle, c'est grâce à tes conseils, ta patience et tes nombreux encouragements, qui m'ont permis de devenir une meilleure scientifique.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury de thèse, qui ont accepté de consacrer de leur énergie à évaluer mon travail. Je compte sur vos conseils pour encore progresser.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe CAM :

Benoit et René-Marc, merci d'avoir accepté que j'entreprenne ma thèse dans votre laboratoire et de m'y avoir accueillie avec bienveillance.

Ensuite, tous les « anciens » qui ont participé à mon intégration dans l'équipe : Jérémy, Grégoire, Thao, Mélina, Vasilica. Mention spéciale à Simon B. pour son sens de l'humour (« Breeh »). Merci Julie, ce fut un plaisir de travailler avec toi sur ce projet de recherche plus « médical ». Merci aussi à Adeline, mes compétences en biologie moléculaire n'auraient jamais (*vraiment jamais*) atteint leur potentiel sans ton aide précieuse.

Merci Estelle, grâce à toi j'ai plongé dans le grand bain de la biophysique (*yes, pun intended*). C'est avec ton aide que je maîtrise désormais les méthodes expérimentales et les langages barbares des physiciens. Merci surtout pour ta gentillesse et ton énergie qui m'ont accompagnées pendant 3 ans.

Je remercie également tous les membres présents de l'équipe : Alex, Joseph, Alison, Marc-Antoine, Sarah, Surabhi, Lakshmi, Tien, Gautham, Jad, Xi Wang, Simon D. B., Victor et Barbara. La science n'est que la partie émergée de l'iceberg, je suis très heureuse de compter nombre d'entre vous parmi mes amis désormais.

Merci aussi à tous les membres de l'équipe Cadoret, votre gentillesse et bonne humeur participe au plaisir de travailler à l'Institut Monod.

Je tiens aussi à remercier Samantha, ma « super coloc ! » pendant mes 3 premières années de thèse. Qui d'autre aurait aussi bien compris l'expérience de doctorante à l'IJM que toi ? Ton soutien m'a été précieux.

Et enfin, je remercie ma famille, et en particulier mes parents, qui m'ont toujours soutenue et encouragée à donner le meilleur de moi-même. Vous avez tout mon amour.

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	7
TABLE DES FIGURES	11
LISTE DES ABREVIATIONS	13
AVANT-PROPOS	15
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION	17
1. ORGANISATION DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL	19
1.1. <i>Organisation tissulaire</i>	19
1.2. <i>Organisation cellulaire</i>	20
2. MAINTIEN DE LA COHESION ÉPITHÉLIALE : LES JONCTIONS CELLULAIRES.....	23
2.1. <i>Jonctions serrées</i>	23
2.2. <i>Jonctions adhérentes</i>	24
a. Structure d'une jonction adhérente	24
b. Dynamique des jonctions adhérentes	26
c. Interactions des jonctions adhérentes avec les complexes de polarité.....	27
2.3. <i>Autres jonctions intercellulaires</i>	28
a. Desmosomes	28
b. Jonctions communicantes	28
2.4. <i>Jonctions avec la matrice extracellulaire : les adhérences focales</i>	29
a. Structure d'une adhérence focale	29
b. Assemblage et maturation des adhérences focales	30
3. CYTOSQUELETTE D'ACTINE ET RESEAU D'ACTOMYOSINE	32
3.1. <i>Bases moléculaires de l'actomyosine</i>	32
3.2. <i>Voies de signalisation qui régulent l'activité de la myosine-II</i>	33
a. Phosphorylation des chaînes légères ou lourdes.....	33
b. Régulation par les petites GTPases.....	34
3.3. <i>Organisation et fonctions du réseau d'actomyosine dans la morphogénèse et l'homéostasie épithéliale</i>	37
a. Morphogénèse de l'épithélium	38
b. Division cellulaire.....	40
c. Fermeture de blessure et extrusion cellulaire	41
4. FONCTION ET REGULATION DE L'ACTOMYOSINE AUX JONCTIONS INTERCELLULAIRES.....	43
4.1. <i>Rôles du réseau d'actomyosine aux jonctions adhérentes</i>	43
a. Recrutement et stabilisation des cadhérines	43
b. Elongation et renforcement de la jonction adhérente sous tension	44

c.	Mécanotransduction aux jonctions adhérentes	45
4.2.	<i>Le réseau d'actomyosine aux jonctions serrées</i>	47
a.	Impact de la contractilité sur la formation des jonctions serrées.....	47
b.	Mécanotransduction aux jonctions serrées.....	47
5.	FONCTION ET REGULATION DU RESEAU D'ACTOMYOSINE LORS DE L'ADHERENCE AU SUBSTRAT ET LA MIGRATION CELLULAIRE	49
5.1.	<i>Adhérence au substrat</i>	49
a.	Mécanisme d'adhérence et étalement.....	49
b.	Effet de la dynamique de l'actine sur l'étalement	50
c.	Impact de la contractilité sur les adhérences focales	50
d.	Mécanotransduction aux adhérences focales	51
5.2.	<i>Mécanisme de la migration cellulaire</i>	52
a.	Processus de migration.....	52
b.	Mise en place de la polarité avant-arrière.....	53
c.	Dynamique de l'actine	53
d.	Impact de la contractilité sur la migration cellulaire	54
5.3.	<i>Les fibres de stress</i>	54
a.	Structure et nomenclature	55
b.	Formation des fibres de stress.....	56
c.	Organisation des fibres de stress pendant l'étalement	57
d.	Participation à la migration cellulaire	58
e.	Les fibres de stress comme mécanotransducteurs.....	58
6.	EPITHELIAL CELL ADHESION MOLECULE (EPCAM) : UNE MOLECULE D'ADHERENCE PAS COMME LES AUTRES ?	60
6.1.	<i>Structure et expression</i>	60
a.	Structure	60
b.	Expression en conditions physiologiques	60
c.	Expression d'EpCAM en conditions pathologiques.....	61
6.2.	<i>EpCAM et les jonctions intercellulaires</i>	62
a.	Adhérence cellulaire médiée par EpCAM	62
b.	EpCAM et les jonctions adhérentes.....	63
c.	EpCAM et les jonctions serrées	64
6.3.	<i>Autres fonctions attribuées à EpCAM</i>	64
a.	Signalisation pro-proliférative	64
b.	EpCAM et la pluripotence.....	65
c.	EpCAM et la migration cellulaire	65
6.4.	<i>EpCAM est une protéine majeure de l'intégrité épithéliale</i>	66
6.5.	<i>EpCAM module la contractilité cellulaire</i>	66
CHAPITRE 2 – PROJET DE THESE		69

CHAPITRE 3 – EPCAM CONDITIONNE L’ORGANISATION DU DOMAINE APICAL DE L’ENTEROCYTE EN MODULANT LA CONTRACTILITE CELLULAIRE : CONSEQUENCES SUR L’ARCHITECTURE ET LA PHYSIOLOGIE DE L’EPITHELIUM INTESTINAL	73
1. PRESENTATION DES RESULTATS.....	75
2. CONTRACTILE FORCES AT TRICELLULAR CONTACTS MODULATE EPITHELIAL ORGANIZATION AND MONOLAYER INTEGRITY	76
3. DISCUSSION.....	109
CHAPITRE 4 – IMPACT D’EPCAM SUR LA DISTRIBUTION ET L’ACTIVITE DE RHOA	113
1. PRESENTATION DES RESULTATS.....	115
2. SPATIO-TEMPORAL MODULATION OF CORTICAL RHOA ZONE CONDITIONS ACTOMYOSIN ACTIVITY IN EPITHELIAL CELLS.....	116
3. DISCUSSION.....	183
CHAPITRE 5 – CONCLUSION	193
1. RESUME DES TRAVAUX.....	195
2. PERSPECTIVES ET TRAVAUX EN COURS	197
2.1. <i>Localisation de RhoA activé aux membranes des endosomes</i>	<i>197</i>
2.2. <i>Cycle de RhoA et trafic intracellulaire</i>	<i>198</i>
2.3. <i>Processus d’activation de RhoA aux jonctions</i>	<i>199</i>
2.4. <i>Effet de l’extinction d’EpCAM sur les autres cytosquelettes</i>	<i>200</i>
2.5. <i>Transport d’EpCAM et impact pour l’intégrité des épithéliums</i>	<i>202</i>
RÉFÉRENCES.....	205
ANNEXES	227
ANNEXE I	229

Table des figures

<u>Figure 1</u> : Organisation tissulaire de l'épithélium intestinal.....	19
<u>Figure 2</u> : Régulation de la polarité apico-basale.....	20
<u>Figure 3</u> : Spécialisation du pôle apical de l'entérocyte : la bordure en brosse.....	22
<u>Figure 4</u> : Modèle des jonctions serrées bicellulaires et tricellulaires.....	24
<u>Figure 5</u> : Modèle d'une jonction adhérente.....	25
<u>Figure 6</u> : Localisation et fonction des Rab GTPases	27
<u>Figure 7</u> : Structure d'une adhérence focale	29
<u>Figure 8</u> : Schéma décrivant la maturation des adhérences focales	31
<u>Figure 9</u> : Schéma décrivant l'actomyosine	33
<u>Figure 10</u> : Régulation de l'activité de la myosine-II	34
<u>Figure 11</u> : Cycle de RhoA.....	35
<u>Figure 12</u> : Distribution et activité de la myosine-II pendant la formation du sillon ventral chez <i>Drosophila melanogaster</i>	39
<u>Figure 13</u> : Distribution et activité de la NM-II lors de la morphogénèse du tube neural.....	40
<u>Figure 14</u> : L'actomyosine pendant la division cellulaire.	41
<u>Figure 15</u> : Mécanismes d'extrusion.....	42
<u>Figure 16</u> : Impact de la tension sur l'élongation des jonctions adhérentes.	45
<u>Figure 17</u> : Mécanotransduction aux jonctions adhérentes.	46
<u>Figure 18</u> : Modèle du « molecular clutch ».....	51
<u>Figure 19</u> : Modèle de la migration cellulaire.....	52
<u>Figure 20</u> : Schéma des différents types de fibres de stress	55
<u>Figure 21</u> : Modèle de la formation des différents types de fibres de stress.....	57
<u>Figure 22</u> : Structure et localisation d'EpCAM.....	60
<u>Figure 23</u> : Organisation de l'épithélium intestinal de patients atteints de CTE	62
<u>Figure 24</u> : Schéma de l'effet d'EpCAM sur la distribution de l'activité contractile aux jonctions .	110
<u>Figure 25</u> : Distribution de la palladine (PLD) dans les cellules contrôles et EpCAM-KO	187
<u>Figure 26</u> : Distribution des myosines-IIA et -IIB dans les cellules contrôles et EpCAM-KO.....	189
<u>Figure 27</u> : Etalement des cellules EpCAM-KO et brisure de symétrie.....	190
<u>Figure 28</u> : Quantification de l'adhérence et l'étalement des cellules sur collagène	191
<u>Figure 29</u> : Schéma récapitulatif	192
<u>Figure 30</u> : Schéma récapitulatif de l'ensemble des résultats	196
<u>Figure 31</u> : Distribution de p115-RhoGEF en microscopie confocale dans les cellules Caco2 contrôle ou EpCAM-KO	198

Figure 32 : Distribution de RhoA activé à la jonction de cellules Caco2 contrôles ou EpCAM-KO ..	199
Figure 33 : Distribution de RhoA activé, EpCAM et Rab11 aux jonctions bicellulaires de cellules Caco2 contrôles ou EpCAM-KO, en microscopie confocale	200
Figure 34 : Distribution de l'α-tubuline en cellule Caco2 contrôle ou EpCAM-KO	201
Figure 35 : Distribution de p115-RhoGEF et de la kératine-19 (K19) en cellule Caco2 contrôle ou EpCAM-KO	202

Liste des abréviations

- ABP : « Actin Binding Protein », protéine se liant à l'actine
- ACTN : α -actinine
- AHPH : « Anillin Homology Plekstrin Homology », construction composée du domaine C-terminal de l'anilline, capable de lier RhoA-GTP
- AJ : « Adherens Junction », jonction adhérente
- ARN : acide ribonucléique
- CAM : « Cell Adhesion Molecule », molécule d'adhérence cellulaire
- CTE : voir DEI
- DEI : Dysplasie Epithéliale Intestinale, en anglais « Congenital Tufting Enteropathy » (CTE)
- Dsc : Desmocoline
- Dsg : Desmogléine
- EHD1 : « Eps15-homology domain-containing protein1 »
- EMT : « epithelial-mesenchymal transition », transition épithélio-mésenchymateuse
- EpCAM : « Epithelial Cell Adhesion Molecule », molécule d'adhérence cellulaire épithéliale, aussi connue sous le nom de Trop1 ou TACSTD1
- FA : « Focal Adhesion », adhérence focale
- FAK : « Focal Adhesion Kinase »
- GAP : « GTPase Activating Protein »
- GDI : « Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor »
- GDP : Guanosine Di-Phosphate
- GEF : « Guanine nucleotide Exchange Factor »
- GFP : « Green Fluorescent Protein », protéine fluorescente verte
- GTP : Guanosine Tri-Phosphate
- MARVELD : « Mal And Related proteins for Vesicle trafficking and membrane Link Domain »
- MDCK : « Madin-Darby Canine Kidney », cellule de rein de chien
- mDia : « mammalian Diaphanous », aussi connue sous « Diaphanous-related formin-1 » (Dia1)
- MEC : matrice extracellulaire
- MEF : « Mouse Embryonic Fibroblast », fibroblaste embryonnaire de souris
- MLCK : « Myosin Light Chain Kinase », kinase de la chaîne légère de la myosine
- MLCP : « Myosin Light Chain Phosphatase », phosphatase de la chaîne légère de la myosine
- MRLC : « Myosin Regulatory Light Chain », chaîne légère régulatrice de la myosine
- MVID : « MicroVillous Inclusion Disease », maladie des inclusions microvillositaires

NM-II : « Non-muscle Myosin-II », myosine-II

PAK : « p21-activated kinase »

pMLC : « phosphorylated Myosin Light Chain », chaîne légère phosphorylée de la myosine

RBD : « Rho-Binding Domain », domaine de liaison aux protéines Rho

RFP : « Red Fluorescent Protein »

ROCK : Rho coiled-coil containing kinase

SF : « stress fiber », fibre de stress

TA : « transverse arc », arc transverse

TJ : « tight junction », jonction serrée

TFM : « Traction Force Microscopy »

tTJ : « tricellular tight junction », jonction tricellulaire

ZA : « zonula adherens »

ZO : « zonula occludens »

Avant-propos

Ma thèse porte sur l'étude des fonctions de la protéine EpCAM. Bien que cette protéine ait été découverte dès les années 1970, peu de travaux étaient consacrés à son analyse fonctionnelle dans le contexte physiologique de l'épithélium jusqu'à ce que sa perte d'expression soit reliée à l'apparition d'une maladie congénitale infantile, la Dysplasie Epithéliale Intestinale (DEI, ou en anglais « Congenital Tufting Enteropathy (CTE) ») (Sivagnanam et al., 2008). En utilisant cette maladie comme modèle d'étude, mon travail de thèse s'est concentré sur l'analyse des fonctions d'EpCAM dans le maintien de l'intégrité épithéliale et la compréhension des mécanismes moléculaires dans lesquels cette protéine est impliquée.

Les premiers chapitres (Introduction : Chapitres 1, 2) introduisent les notions et travaux de la littérature qu'il m'a semblé nécessaire de présenter afin d'apprécier les résultats présentés ainsi que l'évolution de mon projet de thèse.

Les résultats que j'ai obtenus sont répartis en deux chapitres. Le premier (cf. Chapitre 3) décrit l'implication d'EpCAM dans le maintien de la polarité apico-basale de l'entérocyte, au sein d'une monocouche épithéliale pleinement polarisée. Ce travail démontre qu'EpCAM est requise pour réguler la distribution et l'activité contractile dans l'entérocyte. En l'absence d'EpCAM, la mauvaise régulation du cytosquelette d'actomyosine perturbe l'organisation de l'entérocyte et en particulier le positionnement de son domaine apical, responsable de l'absorption des nutriments. Les résultats que nous avons obtenus mettent en évidence l'importance du contrôle de la contractilité cellulaire pour le maintien de l'homéostasie épithéliale et le fait que son dérèglement soit à l'origine des symptômes de la DEI. Ils ont fait l'objet d'une publication (Salomon et al., 2017). Le second chapitre (cf. Chapitre 4) expose les résultats concernant la participation d'EpCAM à l'organisation du cytosquelette d'actomyosine et la régulation de la contractilité cellulaire dans le contexte d'une cellule épithéliale unique, et détaille les répercussions de la perte d'EpCAM sur l'adhérence de la cellule au substrat et la migration cellulaire. En outre, ce travail décrit plus en détail les partenaires fonctionnels d'EpCAM et élargit son rôle, en dehors d'une simple molécule d'adhérence intercellulaire. Ces résultats seront prochainement soumis pour publication.

Enfin, le dernier chapitre (Conclusion) remet en contexte les différents résultats obtenus et permet de discuter de façon plus large de la fonction d'EpCAM sur l'organisation des cellules épithéliales, notamment de comment son impact sur la contractilité cellulaire y participe. À cette fin, les données non encore publiées sont présentées ici. J'y décris entre autres l'impact d'EpCAM sur les mécanismes de régulation de la contractilité via les voies d'endocytose, ainsi que des résultats

préliminaires concernant les mécanismes de régulation de RhoA en cellule unique et aux jonctions intercellulaires.

Chapitre 1 – Introduction

1. Organisation de l'épithélium intestinal

1.1. Organisation tissulaire

Les épithéliums sont des tissus présents à l'interface entre l'extérieur et le milieu intérieur. Ils sont donc responsables de deux fonctions principales : une fonction de barrière face à l'extérieur, et de régulation des échanges entre ces deux espaces. Les épithéliums simples, tels que l'épithélium intestinal ou l'épithélium rénal, sont formés d'une monocouche de cellules reposant sur une lame basale. L'épithélium intestinal est soumis à de nombreux stress, à la fois mécaniques, chimiques et biologiques, causés par la fonction digestive et la présence du microbiote. Afin de maintenir l'épithélium intact et fonctionnel, les cellules épithéliales sont soumises à un contrôle strict de leur prolifération, migration, différenciation et mort cellulaire. Le contrôle de ces processus, ou homéostasie, est notamment facilité par leur séparation dans deux compartiments distincts que sont la crypte et la villosité. La crypte est le compartiment dédié au renouvellement cellulaire, elle contient les cellules-souches intestinales. Les progéniteurs issus de la division des cellules-souches sortent de la crypte et se différencient lors de leur migration le long de la villosité, une structure en digitation permettant d'amplifier la surface capable d'absorber les nutriments. À l'apex de la villosité, les cellules les plus anciennes sont extrudées dans la lumière intestinale (Barker, 2014; Crawley et al., 2014) (**Figure 1**).

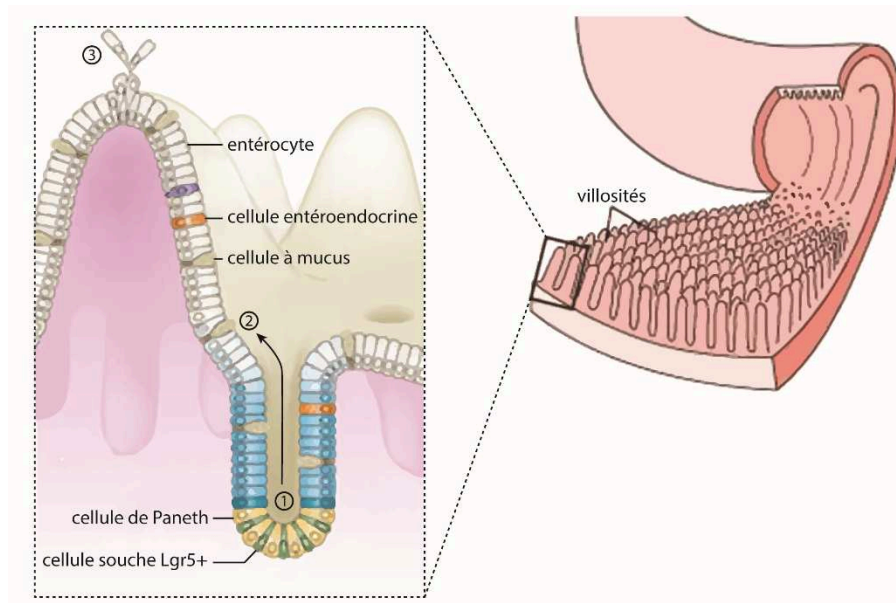


Figure 1 : Organisation tissulaire de l'épithélium intestinal.

Coupe schématique de l'épithélium intestinal, présentant sa structure avec la présence de replis nommés villosités. L'agrandissement montre l'organisation de l'axe crypte-villosité. Les cellules souches à la base des cryptes (1) sont maintenues dans un état prolifératif et indifférencié grâce aux cellules de Paneth. Elles produisent les progéniteurs des différents types cellulaires de l'intestin qui se différencient au cours de leur progression le long de la villosité (2). À l'extrémité de la villosité, les cellules les plus anciennes meurent et sont extrudées dans la lumière intestinale (3). Adapté de Crawley et al., 2014 ; Barker et al., 2014.

1.2. Organisation cellulaire

Afin d'exercer leur fonction de transport dirigé, les cellules des épithéliums simples sont dites polarisées : elles s'organisent en deux domaines distincts selon l'axe apico-basal, chacun comprenant une composition lipidique et protéique différente. Au niveau du domaine apical, des enzymes et transporteurs permettent les échanges avec la lumière de l'organe, pour l'absorption de nutriments et d'eau pendant la digestion par exemple. Le domaine baso-latéral quant à lui, assure la cohésion des cellules à la fois entre elles, par les différents complexes d'adhérence cellule-cellule, ainsi qu'avec la lame basale en établissant des jonctions avec les protéines de la matrice extracellulaire (MEC). L'adressage des protéines vers un pôle ou l'autre dépend de modifications post-traductionnelles, telles que les *N*- ou *O*-glycosylations, ou de la présence de domaines protéiques particuliers, qui sont reconnus par des voies de trafic spécialisées vers l'une ou l'autre direction. La distribution polarisée des lipides est assurée par la régulation spatiale de l'adressage de kinases et de phosphatases des phosphoinositides (Rodriguez-Boulan and Macara, 2014).

Le maintien de l'organisation de la cellule épithéliale selon l'axe apico-basal est dépendant de l'activité des complexes régulateurs de la polarité. Parmi ces complexes se trouvent le complexe Par (Par3, Par6, aPKC), le complexe Crumbs (Crb, PALS1, PATJ) localisé au cortex apical, et le complexe Scribble (Scrb, Dlg, Lgl) spécialisé dans la mise en place du domaine baso-latéral. Ces complexes, par leur action mutuellement exclusive, forment et maintiennent la séparation des deux domaines en terme de composition lipidique et protéique de la membrane plasmique (**Figure 2**). Par exemple, le recrutement de la kinase aPKC par Par6 ou via le complexe Crb permet la phosphorylation et donc l'exclusion des protéines basolatérales présentes dans le domaine apical (Rodriguez-Boulan and Macara, 2014).

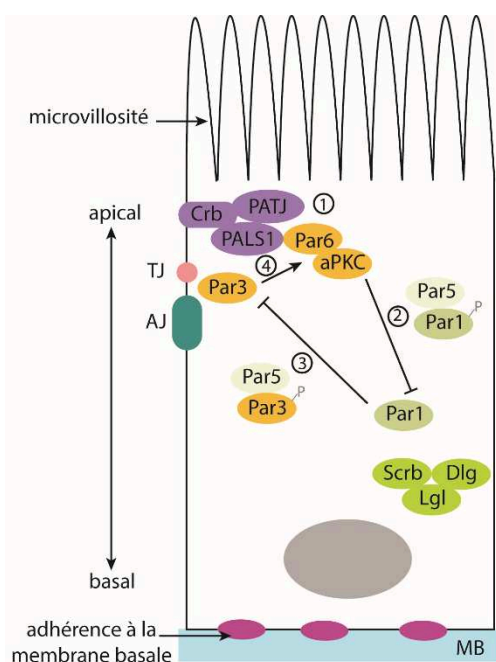


Figure 2 : Régulation de la polarité apico-basale.

L'organisation d'une cellule épithéliale selon l'axe apico-basal dépend de l'activité des complexes régulateurs de la polarité. Le complexe Crumbs (Crb, PALS1, PATJ) recrute les kinases Par6 et aPKC au pôle apical (1). La phosphorylation des protéines du complexe basal Scribble (Scrb, Dlg, Lgl) et de Par1 conduit au recrutement de Par5 et à leur exclusion du cortex apical (2). Réciproquement, la phosphorylation de Par3 l'exclue du cortex basal (3). Chez les vertébrés, Par3 est recrutée aux jonctions serrées et participe au recrutement de aPKC au pôle apical (4). AJ, « adherens junction » ; MB, membrane basale ; TJ, « tight junction ». Inspiré de (Rodriguez-Boulan and Macara, 2014).

Les complexes de polarité participent également à la réorganisation des cytosquelettes d'actine et de microtubules selon l'axe de polarité, afin d'assurer le tri correct des protéines en fonction de leur domaine de destination. Ainsi, Par1b participe à la réorganisation des microtubules et donc au positionnement des endosomes de recyclage, particulièrement important pour le maintien du domaine apical (Rodriguez-Boulan and Macara, 2014). La perturbation des voies de recyclage apical conduit à la perte de l'identité des membranes apicales et du positionnement des protéines et structures associées. C'est par exemple le cas lors l'utilisation d'un dominant négatif de la GTPase associée aux endosomes de recyclage Rab11, qui est responsable de la perte de Crb du cortex apical de l'épiderme chez l'embryon de drosophile (Roeth et al., 2009). Enfin, Il est intéressant de noter que ces complexes participent aussi à la maintenance de l'intégrité physique de l'épithélium, par leur action sur la formation ou la stabilité des jonctions cellulaires (*cf* partie 2.2.c).

Le type cellulaire différencié le plus abondant de l'intestin est l'entérocyte. Son domaine apical présente une architecture particulière, avec la présence d'une bordure en brosse c'est-à-dire un ensemble dense de replis membranaires en forme de doigts, les microvillosités, permettant d'augmenter la surface disponible pour la digestion enzymatique et les échanges de nutriments (**Figure 3**). Les microvillosités sont soutenues par la présence d'un faisceau de 20-30 filaments d'actine, organisés de manière parallèle grâce à différentes protéines capables de se lier et de réticuler les filaments d'actine (en anglais « Actin Binding Protein », ABP). Les ABPs présentes dans les microvillosités ont plusieurs fonctions, a) maintenir la rigidité du faisceau d'actine et sa longueur constante (telles que la villine, EPS8 ou d'autres protéines de coiffe qui limitent la polymérisation de l'actine), b) maintenir une liaison entre le faisceau d'actine et la membrane (*e.g.* l'ézrine et la myosine-IA) et c) permettre l'ancrage du faisceau dans le « terminal web » (*e.g.* la plastine-1, la spectrine, ...). Le « terminal web » est un réseau riche en éléments du cytosquelette, présent dans le cytoplasme apical, et composé essentiellement de filaments d'actomyosine et de filaments intermédiaires (notamment les kératines-8, -18, -19 et -20) qui permet de maintenir la structure des microvillosités et de leur fournir une résistance face aux stimuli mécaniques qu'elles subissent (Delacour et al., 2016).

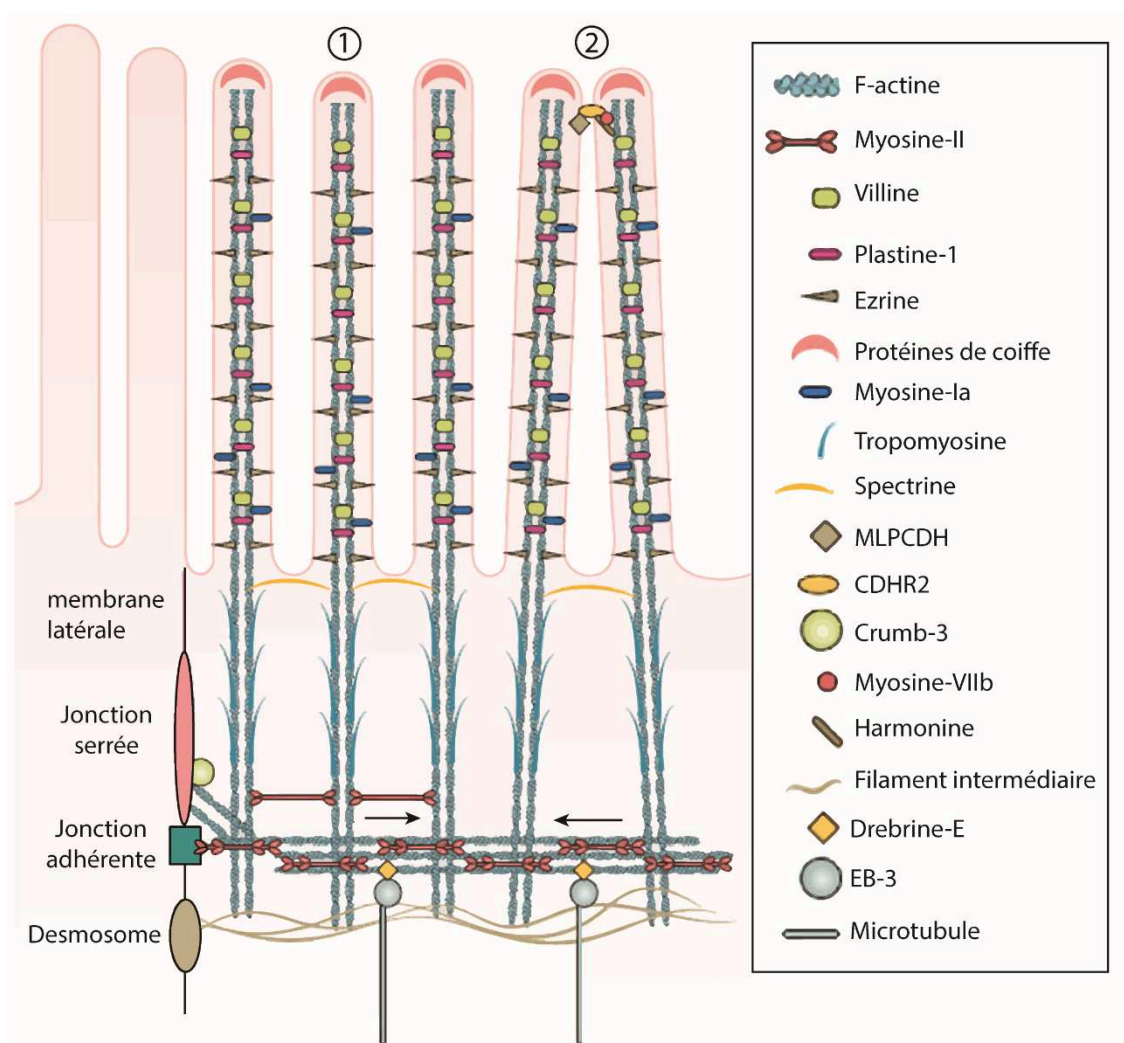


Figure 3 : Spécialisation du pôle apical de l'entérocyte : la bordure en brosse

La bordure en brosse est composée des microvillosités et de leur réseau d'ancrage ou « terminal web ». A la jonction entre la bordure en brosse et le domaine basolatéral se trouvent les complexes de jonctions serrées, jonctions adhérentes et desmosomes. L'organisation d'une microvillosité est détaillée en (1). Les microvillosités sont maintenues en un ensemble compact par l'interaction directe des protocadhérines (2). Les flèches noires indiquent la tension exercée par la myosine-II, participant au maintien de la bordure en brosse. MLPCDH, mucin-like protocadherin ; CDHR2, cadherin-related family member 2 ; EB-3, microtubule-associated protein RP/EB family member 3. Adapté de Delacour et al., 2016.

2. Maintien de la cohésion épithéliale : les jonctions cellulaires

Pour assurer l'intégrité et la cohésion de la monocouche épithéliale, les entérocytes forment de fortes jonctions intercellulaires, ainsi qu'avec la lame basale ou matrice extracellulaire (MEC). Dans un souci de concision, je me focaliserai ici davantage sur les jonctions auxquelles je me suis intéressée au cours de mon travail de thèse, à savoir les jonctions serrées et les jonctions adhérentes pour les jonctions intercellulaires, et les adhérences focales pour les jonctions avec la MEC.

2.1. Jonctions serrées

Les jonctions serrées (en anglais « Tight Junctions », TJs) sont des structures permettant de maintenir fermement en contact les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes. L'apposition des membranes adjacentes dépend de la présence de protéines transmembranaires que sont les claudines et les protéines à domaine MARVEL (« MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link ») à savoir l'occludine, la tricelluline (aussi nommée MARVELD2) et MARVELD3. Celles-ci s'organisent en réseau fibrillaire, visible en microscopie électronique (Staehelein et al., 1969), qui permet de limiter la diffusion des ions et petites molécules entre les cellules (diffusion paracellulaire). Leurs domaines intracellulaires s'associent à des protéines cytosoliques de la plaque jonctionnelle qui relie soit le cytosquelette d'actine, telles que Zonula Occludens (ZO-1, -2 ou -3), soit les microtubules (**Figure 4**). Les jonctions serrées ont pour fonction de limiter la diffusion paracellulaire, mais aussi la diffusion des composants entre le domaine apical et le domaine basolatéral, pour cette raison elles sont considérées comme la barrière entre les deux domaines membranaires (Zihni et al., 2016). La formation des jonctions serrées et l'établissement de la polarité sont des événements liés ; ceci a été décrit notamment par des travaux ayant démontré l'influence du complexe Par3/Par6/aPKC sur le positionnement de la ceinture de jonctions serrées (Zihni et al., 2014), ou encore par l'effet stabilisateur de PatJ sur la localisation de l'occludine et de ZO-3 aux jonctions serrées (Michel et al., 2005).

Au point de contact entre les membranes de trois cellules, les composants des jonctions serrées établissent un contact au niveau apical qui s'étend ensuite le long de la jonction jusqu'au niveau basal, et forment alors des jonctions serrées particulières, appelées jonctions tricellulaires (« tricellular Tight Junctions », tTJs) (Furuse et al., 2014). La tricelluline ainsi que les protéines angulines sont spécifiquement associées aux jonctions tricellulaires et sont nécessaires à leur maintien et fonction. Ainsi, l'extinction de la tricelluline par interférence ARN diminue la résistance transépithéliale de monocouches de cellules de la glande mammaire et de l'intestin, des lignées Eph4 et Caco-2 respectivement (Ikenouchi et al., 2005; Raleigh et al., 2010). De même, l'extinction

de l'anguline-1 (ou lipolysis-stimulated lipoprotein receptor, LSR) conduit à la perte d'accumulation de tricelluline aux contacts tricellulaires et à la diminution de la résistance transépithéliale d'une monocouche de cellules Eph4 (Masuda et al., 2011).

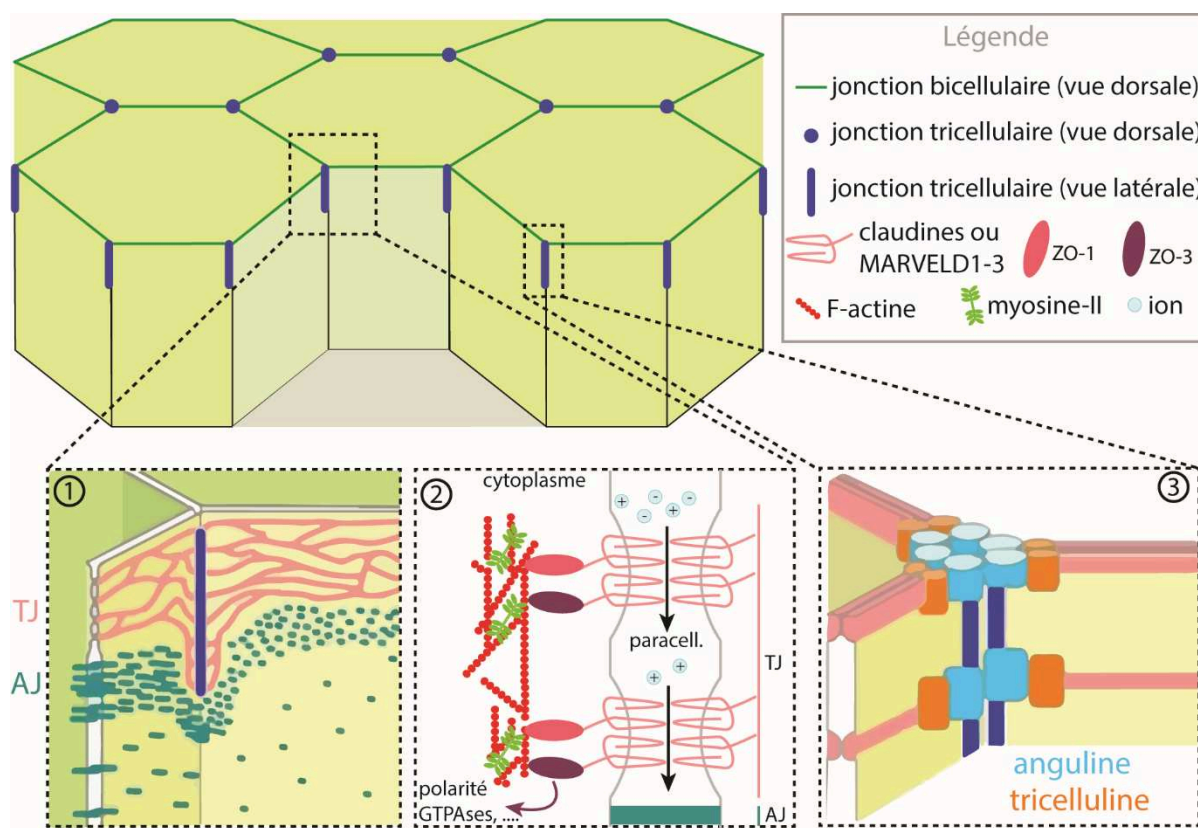


Figure 4 : Modèle des jonctions serrées bicellulaires et tricellulaires. Représentation schématique des jonctions serrées aux contacts bicellulaires (en vert) ou tricellulaires (en bleu) d'une monocouche épithéliale. L'agrandissement (1) montre le positionnement des jonctions serrées au pôle apical comparativement aux jonctions adhérentes médiées par la E-cadhérine, ainsi que la structure en réseau des claudines, qui rejoignent le complexe central au niveau d'un contact tricellulaire (en bleu). Le (2) schématise la structure d'une jonction serrée. Les claudines ou protéines à domaine MARVEL sont associées aux protéines de la plaque jonctionnelle qui relie le cytosquelette et déclenchent des voies de signalisation (flèche violette). La structure en 4 « passages » de la membrane plasmique correspond à celle de la claudine-15, telle que décrite dans (Zihni et al., 2016). Les flèches noires représentent le passage sélectif des ions. Chaque claudine possède une sélectivité propre ; la claudine-15 est permissive aux cations. À droite, (3) modélise l'agencement des angulines et de la tricelluline dans une jonction tricellulaire. TJ, « tight junction » ; AJ, « adherens junction » et paracell., espace paracellulaire. Adapté de (Higashi and Miller, 2017).

2.2. Jonctions adhérentes

a. *Structure d'une jonction adhérente*

Les jonctions adhérentes (ou « Adherens Junctions », AJs) sont formées par l'interaction de protéines transmembranaires d'adhérence cellulaire (ou « Cell Adhesion Molecule », CAM) à la surface de deux cellules adjacentes. La CAM principalement exprimée par les cellules épithéliales est la E-cadhérine. Les domaines extracellulaires des E-cadhérines forment une liaison homophilique en *trans*, en présence de calcium. Lorsqu'une jonction adhérente se forme, la β -caténine se lie au

domaine intracellulaire de la E-cadhérine et recrute l' α -caténine qui s'associe ensuite au cytosquelette d'actine (Desai et al., 2013). Ce complexe minimal est suffisant pour initier la formation d'une jonction (Buckley et al., 2014). Cependant, l' α -caténine peut aussi relier le cytosquelette d'actine via d'autres protéines, telles que la vinculine ou l'EPLIN, aussi nommée LIMA1 (Watabe-Uchida et al., 1998; Abe and Takeichi, 2008) (**Figure 5**). De plus, les jonctions réalisées par la E-cadhérine sont régulées par de nombreuses autres protéines. Par exemple, la caténine p120 participe à la stabilité de la E-cadhérine à la surface cellulaire en limitant son internalisation et sa dégradation (Davis et al., 2003). Une étude de l'association entre la cadhérine exprimée par les cellules endothéliales, VE-cadhérine, et la p120-caténine révèle que leur liaison masque un signal responsable de l'endocytose de la VE-cadhérine dans sa queue cytoplasmique. Ce signal d'endocytose est extrêmement conservé parmi les cadhérines et se trouve aussi dans les séquences de la N- et la E-cadhérine (Nanes et al., 2012).

Enfin, il existe d'autres CAMs présentes aux jonctions adhérentes. Les nectines forment une famille de protéines transmembranaires dont le domaine extracellulaire comprend trois domaines de type immunoglobuline capables de former des *cis*-dimères et *trans*-dimères de manière indépendante du calcium. Le domaine intracellulaire des nectines comprend un motif qui se lie à l'ABP Afadine (**Figure 5**). Le complexe Nectine/Afadine est capable de d'interagir avec le complexe E-cadhérine/ β -caténine pour favoriser la formation de la jonction adhérente ou moduler les jonctions serrées (Tachibana et al., 2000; Takai and Nakanishi, 2003).

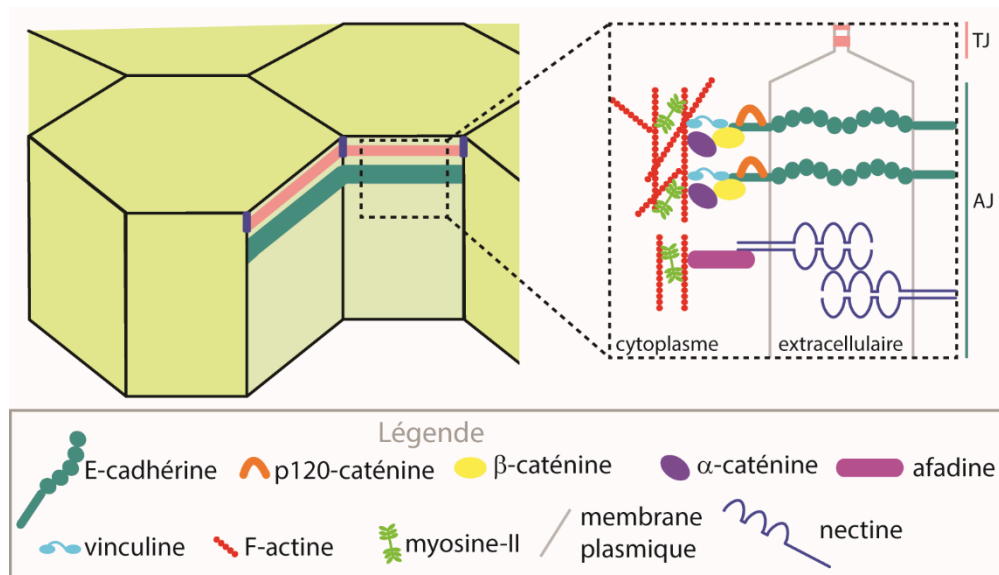


Figure 5 : Modèle d'une jonction adhérente. Représentation schématique d'une jonction adhérente aux contacts bicellulaires d'une monocouche épithéliale. Les E-cadhérines forment des homodimères via leurs domaines extracellulaires. Dans le cytoplasme, la E-cadhérine est associée à la caténine p120 et la β -caténine. Le complexe d'adhérence relie le cytosquelette d'actine par la présence de protéines capables de lier les filaments d'actine (*i.e.* α -caténine, vinculine, ...). TJ, « tight junction » et AJ, « adherens junction ».

b. Dynamique des jonctions adhérentes

La plasticité des jonctions adhérentes, *i.e.* leur capacité à s'adapter à l'environnement cellulaire, est une nécessité pour maintenir l'intégrité des épithéliums face aux différents processus biologiques (division, extrusion, migration cellulaire, ...) qui tendent à la contrarier. Les modèles animaux utilisés pour l'analyse d'événements morphogénétiques en sont des exemples extrêmes ; lors de la convergence-extension qui résulte en l'intercalation des cellules de la bande germinale de la drosophile, les jonctions intercellulaires se réduisent jusqu'à former une intersection entre quatre cellules ou plus, avant que de nouvelles jonctions ne s'établissent (Lecuit and Yap, 2015). Il est maintenant clairement établi que les jonctions adhérentes ne sont pas des structures statiques, et que leurs composants font l'objet d'un renouvellement permanent, via les voies d'endocytose et de recyclage, indispensable à leur fonction (Takeichi, 2014; Brüser and Bogdan, 2017).

Le trafic endosomal est organisé en différents compartiments, contrôlés par l'expression de GTPases spécifiques, nommées Rab (« Ras related protein »). De fait, l'enrichissement des Rab à la membrane des endosomes permet de déterminer leur identité et donc l'étape du trafic dont ils font partie. Par exemple, les endosomes précoces, à l'issue de l'endocytose, sont enrichis en Rab5 ; les endosomes tardifs, dirigés vers les compartiments de dégradation, contiennent Rab7 ; et les endosomes destinés au recyclage sont associés à Rab4, Rab11 ou Rab35 suivant la voie considérée (**Figure 6**) (Stenmark, 2009). La perturbation de l'expression d'une Rab diminue donc l'étape de trafic à laquelle celle-ci est associée. Par exemple, l'utilisation d'une forme dominant-négative de Rab5 (Rab5-DN) perturbe l'internalisation de protéines présentes à la membrane (Ulrich et al., 2005). L'étude menée par Song et al., a ainsi montré que l'emploi de Rab5-DN, conduisant au maintien de l'E-cadhérine et de p120-caténine à la membrane plasmique, limite la plasticité des jonctions adhérentes et arrête l'épibolie du poisson-zèbre (Song et al., 2013). De même, l'expression de Rab5-DN ou de Rab11-DN induit un délai, voire bloque totalement l'étape de fermeture dorsale chez la drosophile, suite à des défauts de remodelage des jonctions de l'amniosera et/ou de l'épiderme de l'embryon (Mateus et al., 2011).

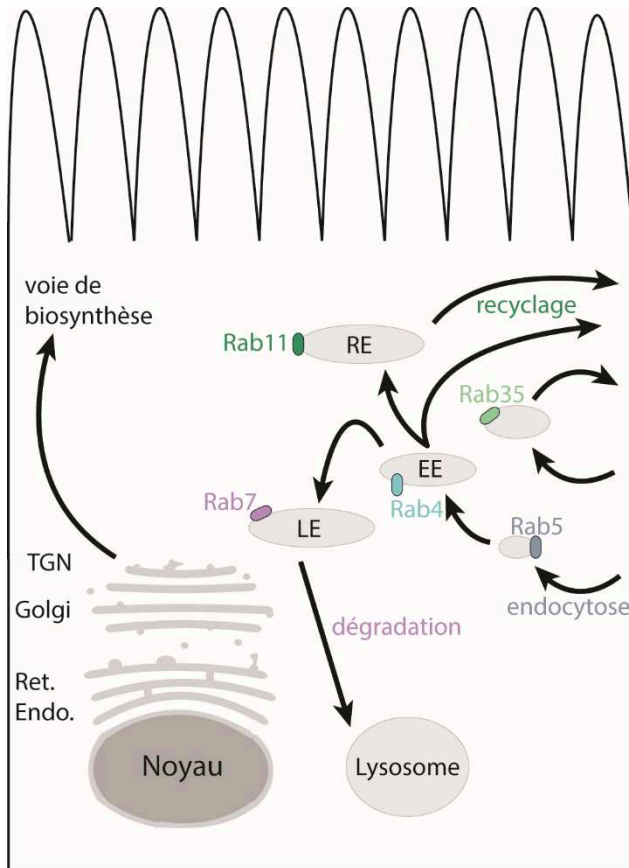


Figure 6 : Localisation et fonction des Rab GTPases. Représentation schématique du transport vésiculaire d'une cellule épithéliale, avec la distribution d'une sélection des Rab GTPases associées aux différentes voies de transport. Rab 5, présent à la membrane plasmique et aux endosomes précoces participe à l'endocytose et la fusion des endosomes. Rab4 marque les endosomes précoces et participe à la voie de recyclage rapide alors que Rab11 participe à une voie de recyclage plus lente, via les endosomes de recyclage. Rab35 marque aussi une voie de recyclage rapide. Rab7 marque les endosomes tardifs et promeut la dégradation de leur contenu en régulant la fusion de ceux-ci avec le lysosome. EE, « early endosome » ; LE, « late endosome » ; RE, « recycling endosome » ; Ret. Endo., réticulum endoplasmique et TGN, « Trans Golgi Network ». Inspiré de (Stenmark, 2009).

La formation et le remodelage des jonctions adhérentes dépendent aussi très fortement du lien entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine au cortex, ainsi que des mécanismes de régulation de la distribution et de l'activité de l'actomyosine. Ces points seront abordés en détail dans la partie 4.1.

c. Interactions des jonctions adhérentes avec les complexes de polarité

Au pôle apical des cellules épithéliales, les complexes de jonctions adhérentes forment une « ceinture » qui maintient une forte unité entre les cellules. Cette « ceinture », nommée *Zonula Adherens* (ZA), communique avec les complexes de polarité pour maintenir la séparation entre les domaines cellulaires mais assure également un rétrocontrôle de l'adhérence cellule-cellule par l'état de polarité cellulaire. Ainsi, la perte d'expression de déterminants de polarité modifie la force ou la localisation des jonctions adhérentes. Par exemple, l'extinction de PALS1 diminue l'expression de la E-cadhérine en surface de cellules MDCK (Wang et al., 2007). De même, le criblage de mutants présentant des défauts de morphogénèse des épithéliums chez la drosophile a révélé que l'extinction de Scribble est responsable de la désorganisation de l'épiderme suite à la perte de polarité des marqueurs apicaux ; cette perte de polarité conduit au positionnement ectopique de la *Zonula Adherens* au niveau basolatéral (Bildler and Perrimon, 2000). Chez les mammifères,

l'extinction de Scribble conduit à la déstabilisation des caténines au cortex et donc à un affaiblissement des jonctions adhérentes (Qin et al., 2005). De même, l'analyse biochimique de cellules MDCK où l'expression de Par1b a été éteinte a montré que cette kinase participe à la liaison entre E-cadhérine et le cytosquelette d'actine ce qui renforce les jonctions adhérentes et participe à la mise en place de la polarité apico-basale des cellules épithéliales (Elbert et al., 2006).

Les complexes de polarité perturbent non seulement l'ancrage des jonctions au cytosquelette mais aussi la dynamique de la E-cadhérine nécessaire à leur remodelage (Brüser and Bogdan, 2017). La E-cadhérine contient des sites de liaison à plusieurs protéines adaptatrices de l'endocytose clathrine-dépendante (telles que AP-2 ou Numb) qui sont des cibles des complexes de polarité. Par exemple, la phosphorylation de Numb par aPKC empêche son association au complexe E-cadhérine/p120-caténine et donc l'endocytose de celui-ci dans la lignée de cellules humaines MCF-7 (Sato et al., 2011).

2.3. Autres jonctions intercellulaires

a. Desmosomes

Deux familles de cadhérines particulières, les desmocollines (Dsc) et desmoglénines (Dsg), forment l'interface d'une jonction, nommée desmosome, rapprochant fortement les membranes de cellules adjacentes et reliant, du côté intracellulaire, le réseau de filaments intermédiaires. La liaison entre les cadhérines desmosomales et les filaments intermédiaires est réalisée par des protéines de la famille Armadillo, telles que les plakoglobines et les plakophilines, qui relient les plakines permettant d'ancrer les filaments intermédiaires (Kowalczyk and Green, 2013). L'ancrage des desmosomes aux filaments intermédiaires permet à ces jonctions de supporter un stress mécanique important sans se rompre ; elles sont particulièrement importantes dans les tissus soumis à de fortes déformations, tels que les épithéliums du cœur ou de la peau. La perte de fonction de la Dsg2, la Dsc2, la plakoglobine ou la desmoplakine entraîne des syndromes divers comprenant une cardiomyopathie (Stahley and Kowalczyk, 2015).

b. Jonctions communicantes

Les jonctions communicantes (ou « gap junction » en anglais) sont des canaux entre les cytoplasmes de deux cellules adjacentes, formés par l'apposition de deux semi-canaux formés par les protéines connexines dans la membrane plasmique. Ces canaux permettent aux cellules d'échanger des ions et petites molécules (< 1kD), les différentes connexines ayant chacune une sélectivité pour des molécules particulières (Evans and Martin, 2002). Les jonctions communicantes

sont décrites comme participant à la synchronisation des cellules dans un tissu, par exemple pour le battement coordonné des cardiomyocytes (Danik et al., 2004).

2.4. Jonctions avec la matrice extracellulaire : les adhérences focales

a. *Structure d'une adhérence focale*

Une cellule s'attache aux protéines de la matrice extracellulaire par l'intermédiaire d'intégrines ; ce sont des récepteurs transmembranaires composés de deux sous-unités α et β , capables de reconnaître plusieurs ligands. Une fois que les intégrines lient leur ligand, elles recrutent de nombreuses protéines au niveau de leur queue cytoplasmique, ce qui conduit à l'assemblage de l'adhérence focale (en anglais « Focal Adhesion », FA) et à sa connexion au cytosquelette d'actine. La structure et composition des adhérences au substrat sont toujours étudiées avec beaucoup d'intérêt, notamment en raison de l'implication de leurs composants cytoplasmiques dans de nombreuses voies de signalisation qui régulent la force de l'adhérence et la migration cellulaire, mais aussi l'organisation du cytosquelette et l'expression de nombreux gènes liés à la prolifération et la mort cellulaire (Vicente-Manzanares and Horwitz, 2011). Kanchanawong et al. ont déterminé l'organisation des adhérences focales dans des fibroblastes embryonnaires murins (cellules MEF ou Mouse Embryonic Fibroblasts) et des cellules humaines d'ostéosarcome U2OS, grâce à l'utilisation d'une technique d'imagerie super-résolutive (**Figure 7**). Ils ont ainsi mis en évidence la stratification des adhérences focales en quatre couches : au plus proche de la membrane plasmique se trouve la couche de signalisation des intégrines, contenant la queue cytoplasmique des intégrines ainsi que la paxilline et la Focal Adhesion Kinase (FAK), suivi d'une couche contenant les protéines responsables de la transmission de forces (telles que la taline ou la vinculine, ...) puis des composants permettant la régulation de l'actine, directement reliés aux filaments du cytosquelette (Kanchanawong et al., 2010).

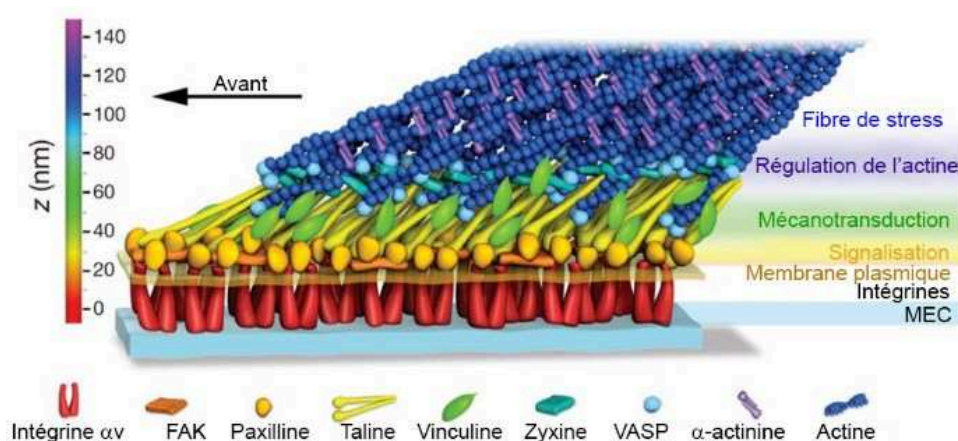


Figure 7 : Structure d'une adhérence focale Schéma modélisant l'architecture en couches fonctionnelles de l'adhérence focale. Modifié de (Kanchanawong et al., 2010).

Il est important de noter que la taille des adhérences focales, qui varie entre $< 1\mu\text{m}$ - $8\mu\text{m}$, dépend de leur état de maturation et ne corrèle pas forcément avec la magnitude des forces que celles-ci transmettent ; de petites adhérences sont capables de transmettre des forces suffisantes pour la migration cellulaire (Beningo et al., 2001; Rape et al., 2011).

b. Assemblage et maturation des adhérences focales

Les adhérences au substrat naissantes, aussi nommées complexes focaux, s'assemblent dans le lamellipode et restent stables pendant environ 1 à 2 minutes avant de se désassembler ou de se stabiliser en adhérences focales plus matures (Zaidel-Bar et al., 2003) (**Figure 8**). En utilisant des constructions de protéines d'adhérence fluorescentes, Zaidel-Bar et al. ont comparé la composition des complexes focaux à celle des adhérences focales au cours du temps ; ils ont mis en évidence que la composition de ces complexes dépend de leur état de maturation (Zaidel-Bar et al., 2003). Ainsi, les complexes focaux sont riches en intégrines, taline, paxilline et signal phosphotyrosine, mais ne contiennent que peu de vinculine, FAK ou α -actinine (ACTN) alors que toutes ces protéines sont présentes à de forts niveaux dans les adhérences focales. La zyxine est notablement absente des complexes focaux (Humphries et al., 2007; Choi et al., 2008; Geiger et al., 2009). Cette étude met aussi en évidence une corrélation négative entre l'accumulation de protéines dans les adhérences focales et le degré de protrusion aux alentours. La paxilline et la taline s'accumulent plus dans les adhérences situées dans une région de faible activité protrusive. Le recrutement de la zyxine, donc le passage de complexe focal à adhérence focale, a lieu immédiatement après des événements de rétraction du lamellipode (Zaidel-Bar et al., 2003). Une étude similaire avec microscopie haute-résolution confirme l'incorporation séquentielle des protéines, notamment celle plus tardive de la zyxine, mais décrit que le désassemblage se fait de manière simultanée pour l'ensemble des protéines des adhérences (Webb et al., 2004). Enfin, Choi et al. ont démontré que l'activité de polymérisation de l'actine dans le lamellipode est nécessaire pour la formation des complexes focaux. L'élongation de ces complexes pendant leur maturation nécessite l'activité de réticulation des filaments d'actine, d' α -actinine et de myosine-II, pour former un faisceau le long duquel l'adhérence peut s'étendre (Choi et al., 2008). L'activité contractile de la myosine-II est aussi largement impliquée dans la maturation des adhérences focales ; ce point est détaillé dans la partie 5.1.

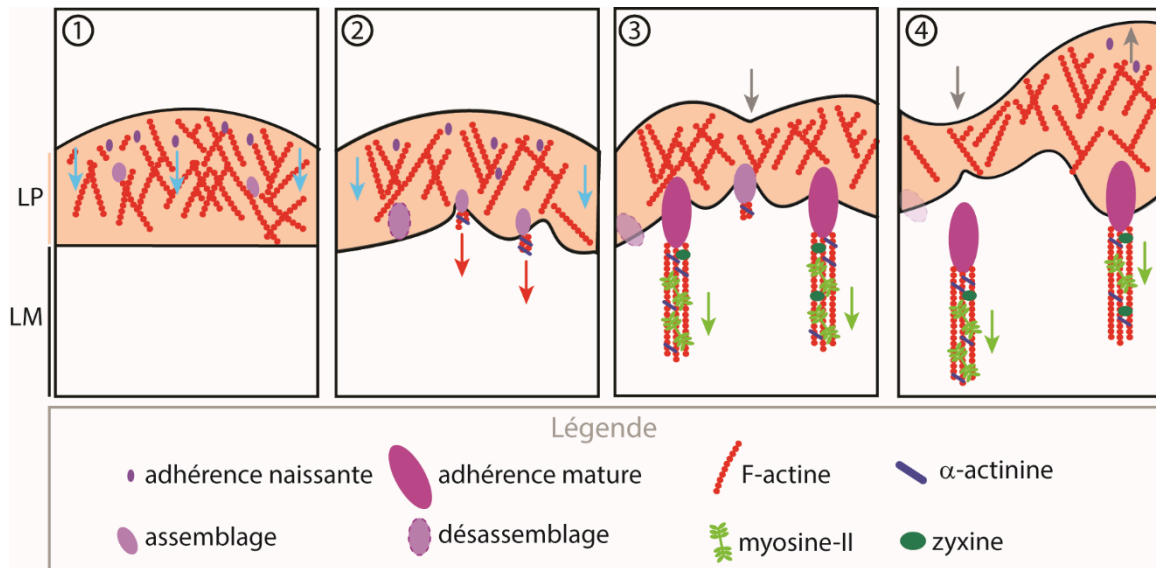


Figure 8 : Schéma décrivant la maturation des adhérences focales. Les adhérences naissantes se forment dans le lamellipode (en orange), où le flot d'actine est élevé (flèches bleues, 1). Lorsqu'elles se retrouvent à la bordure avec la lamelle, zone au flux d'actine plus faible, les complexes focaux se désassemblent sauf s'ils sont stabilisés par des faisceaux d'actine qui peuvent leur servir de matrice (2). Le grossissement des adhérences focales est couplé à l'activité de protrusion ; l'adhérence focale recrute des composants suite aux événements de rétraction du lamellipode (flèche grise). La tension appliquée par la myosine-II sur les fibres d'actine (flèches vertes) favorise aussi la maturation des adhérences (3). Les adhérences matures glissent le long des fibres d'actine ce qui entraîne la rétraction du lamellipode alors que dans les régions avec protrusion de nouvelles adhérences se forment (4). LP, lamellipode ; LM, lamelle. Adapté de <https://www.mechanobio.info/>

3. Cytosquelette d'actine et réseau d'actomyosine

3.1. Bases moléculaires de l'actomyosine

L'actine est présente sous deux formes dans la cellule, une forme globulaire (actine-G, en monomères) et une forme filamenteuse (actine-F). Les filaments d'actine se forment par la nucléation de monomères en un trimère d'actine, à partir duquel une polymérisation efficace peut avoir lieu. Les filaments d'actine sont des structures polarisées, les deux extrémités ayant des propriétés de polymérisation différentes. À l'extrémité barbée l'incorporation de monomères chargés d'ATP est plus rapide qu'à l'extrémité pointue (constante d'association de monomères de $11.6 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ et $1.3 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivement (Pollard, 1986)), ce qui conduit à une élongation dirigée. La nucléation de nouveaux filaments ainsi que leur vitesse d'élongation peuvent être régulées par la présence des ABPs, telles que la profiline ou la formine. La profiline empêche la nucléation spontanée de trimères, qui n'est alors possible qu'en présence de facteurs de nucléation (*e.g.* Arp2/3). La formine favorise l'élongation de l'extrémité barbée et empêche celle de l'extrémité pointue. De nombreuses ABPs participent à la stabilisation des filaments simples ou à celle des structures de plus grande ampleur (faisceaux ou réseaux incluant de nombreux filaments) (Winder and Ayscough, 2005; Blanchoin et al., 2014).

Le cytosquelette d'actine exerce dans la cellule aussi bien un rôle structural (par exemple le maintien de la forme de la cellule) que fonctionnel, en participant à de nombreux processus cellulaires tels que la migration ou la création de l'anneau contractile pendant la cytokinèse. La création de tension au sein d'un faisceau d'actine est dépendante de la présence et de l'activation du moteur moléculaire myosine-II (non-muscle myosin-II, NM-II). NM-II est un hexamère composé de deux chaînes lourdes, deux chaînes légères essentielles et deux chaînes légères régulatrices (myosin regulatory light chain, MRLC). L'extrémité N-terminale de la chaîne lourde contient les sites de liaison à l'actine, ainsi qu'à l'ATP dont l'hydrolyse fournit l'énergie nécessaire au mouvement de la tête globulaire de la myosine-II le long du faisceau d'actine, vers l'extrémité barbée des filaments d'actine. L'extrémité C-terminale permet aux NM-IIs de s'assembler en minifilaments de façon antiparallèle, l'activité des deux têtes globulaires induisant la contraction du filament d'actine associé (**Figure 9**). Il existe trois isoformes de chaînes lourdes de NM-II chez les mammifères, nommées myosine-IIA (NM-IIA), myosine-IIB (NM-IIB) et myosine-IIC (NM-IIC), chacune ayant des propriétés d'hydrolyse de l'ATP et de liaison à l'actine différentes (Vicente-Manzanares et al., 2009). La NM-IIA a la plus forte activité ATPase, elle contracte donc plus rapidement les filaments d'actine. La NM-IIB est plus lente mais a un meilleur rapport cyclique, c'est-à-dire une plus longue durée d'état actif ; elle exerce une tension plus durable sur les filaments d'actine que la NM-IIA (Kovács et

al., 2003; Wang et al., 2003). La NM-IIC étant une isoforme exprimée à un niveau moindre dans de nombreux types cellulaires, il existe peu d'informations sur ses caractéristiques contractiles (Ma et al., 2010).

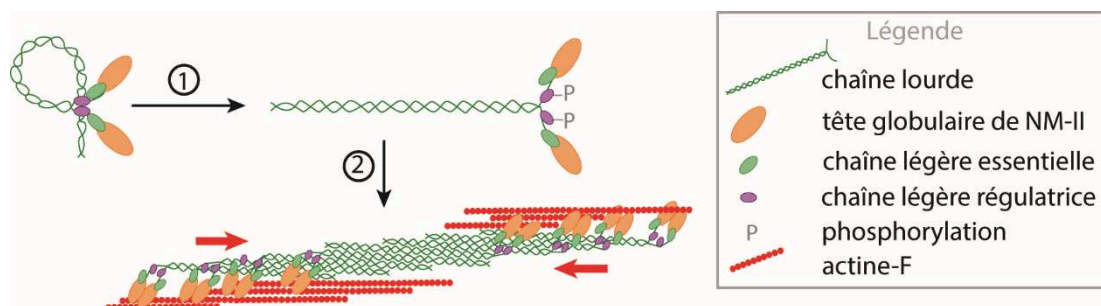


Figure 9 : Schéma décrivant l'actomyosine. Les filaments de myosine sont maintenus en conformation inactive en absence de phosphorylation des chaînes légères régulatrices (1). Suite à ces phosphorylations, les filaments de myosine peuvent polymériser et s'associer sous forme de filaments bipolaires, capables d'exercer une tension (flèches rouges) sur les filaments d'actine (2). Adapté de Vicente-Manzanares et al., 2009.

3.2. Voies de signalisation qui régulent l'activité de la myosine-II

a. *Phosphorylation des chaînes légères ou lourdes*

L'activité de la myosine-II est régulée par la phosphorylation des MRLCs sur la sérine 19 (S19), qui modifie la conformation des têtes de myosine et permet d'augmenter leur activité ATPase donc l'activité contractile de la molécule (Craig et al., 1983). Une deuxième phosphorylation sur la thréonine 18 (T18) a été identifiée dans une expérience *in vitro* sur la myosine-II des muscles lisses (Ikebe et al., 1986) et a par la suite été décrite sur différentes lignées cellulaires en culture (Hirata et al., 2009; Vicente-Manzanares and Horwitz, 2010). La diphosphorylation des MRLCs influence également la capacité d'assemblage des myosines à l'actine (Scholey et al., 1980; Vicente-Manzanares and Horwitz, 2010). Le travail de Watanabe et al., a mis en évidence que les événements de mono- et di-phosphorylation régulent différemment l'activité de la myosine-II ; la diphosphorylation est plus localisée et favorise l'activité contractile de NM-II sur les fibres de stress. Cette étude montre aussi que la déphosphorylation de la myosine-II est nécessaire pour le déplacement des myosines le long des câbles d'actine dans des cellules MDCK (Watanabe et al., 2007).

Plusieurs voies de signalisation conduisent à la phosphorylation des MRLCs, avec différentes kinases pour cibles, dont Myosin Light Chain Kinase (MLCK) ou Rho-associated coiled coil-containing kinase (ROCK). MLCK, la kinase spécifique des MRLCs, est activée par la calmoduline en présence de calcium (Holzapfel et al., 1983). Les autres kinases capables de réguler l'état de phosphorylation des MRLCs, telles que ROCK ou Citron Kinase, agissent aussi, et principalement, par l'inhibition de la phosphatase MLCP (« Myosin Light Chain Phosphatase »), ce qui contribue à maintenir la quantité de

MRLC phosphorylée (**Figure 10**). L'activation des PAKs par Rac ou Cdc42 participent aussi à la phosphorylation directe des MRLCs ou à l'inhibition de la MLCP. Par exemple, PAK2 est capable de phosphoryler les MRLCs sur la Ser19 *in vitro* (Chew et al., 1998), et PAK1 limite l'activité de la MLCP dans des cellules de muscle lisse de l'intestin (Chu et al., 2013). L'activité de la myosine-II peut aussi être négativement régulée par la phosphorylation des chaînes lourdes, qui déstabilise ou empêche l'association des myosines en filaments bipolaires (Vicente-Manzanares et al., 2009). Par exemple, l'association des filaments de myosine-IIA est ainsi limitée par la phosphorylation de la sérine 1943 (Dulyaninova et al., 2005).

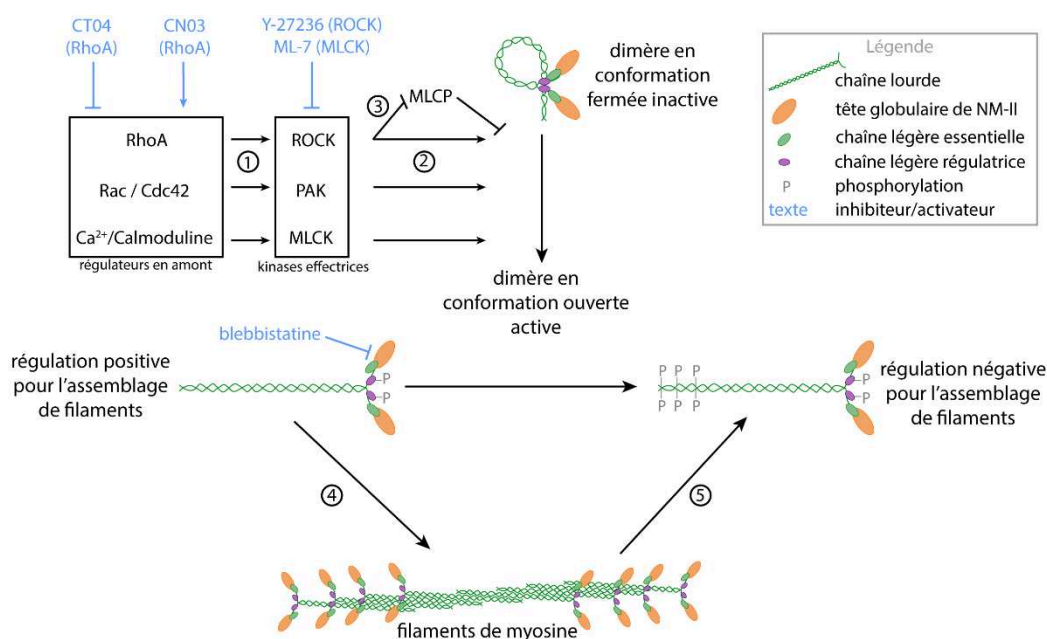


Figure 10 : Régulation de l'activité de la myosine-II

Les petites GTPases (RhoA, Rac, Cdc42, ...) ou la réponse au calcium (calmoduline) activent les kinases responsables de la phosphorylation des chaînes régulatrices de la myosine-II (1). Cette phosphorylation induit un changement de conformation de la myosine-II permettant l'accès aux domaines ATPase et de liaison à l'actine (2). L'activité de ROCK est double, car elle participe à la phosphorylation de la chaîne légère mais aussi à l'inhibition de la MLCP (3). La myosine-II phosphorylée sur les chaînes légères est capable de s'associer à d'autres dimères pour former des filaments (4). L'action des kinases des chaînes lourdes empêche l'association des dimères de myosine-II en filaments bipolaires (5). Les différents inhibiteurs ou activateurs utilisés au cours de ma thèse sont indiqués en bleu. Modifié de (Lecuit et al., 2011).

b. Régulation par les petites GTPases

Les kinases PAK et ROCK sont activées en aval de la signalisation des petites GTPases, Rac1 et RhoA, respectivement. Les petites GTPases sont considérées comme des interrupteurs moléculaires car elles passent d'une conformation active, chargée en GTP, à une forme inactive, chargée en GDP. Les RhoGEFs, « Guanine nucleotide Exchange Factors » (GEFs), catalysent l'échange de GDP en GTP alors que les RhoGAPs, « GTPase-activating proteins » (GAPs), favorisent l'hydrolyse

du GTP en GDP. RhoA peut également être maintenu sous sa forme inactive, séquestré dans le cytoplasme par les RhoGDIs « Rho-specific guanine nucleotide dissociation inhibitors » (**Figure 11**). De fait, la signalisation résultante des petites GTPases dépend autant de la localisation et de l'activité des GEFs et GAPs que de la localisation de la GTPase en elle-même (Hodge and Ridley, 2016).

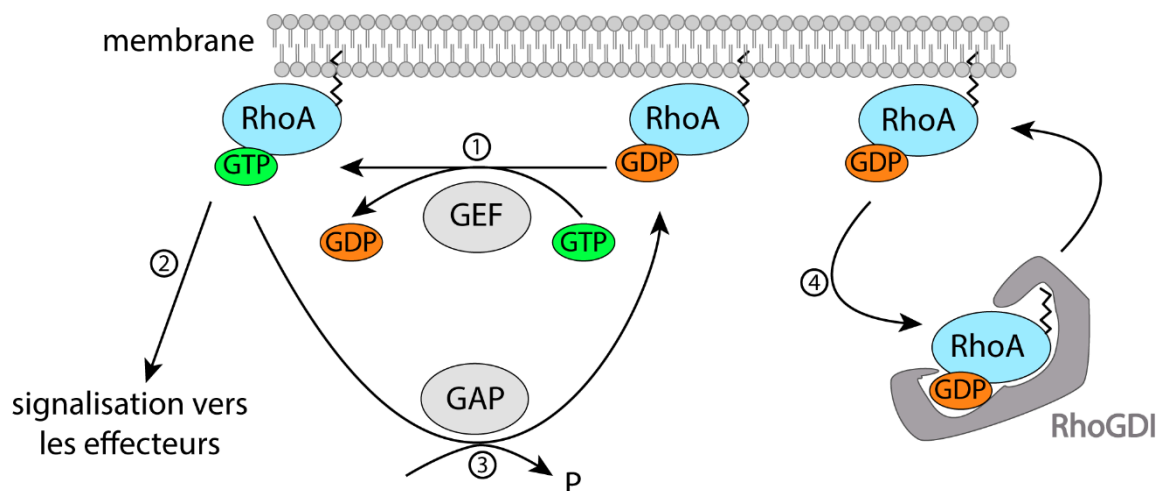


Figure 11 : Cycle de RhoA Les RhoGEFs activent RhoA en catalysant l'échange de GDP en GTP (1) et RhoA activé induit une cascade de signalisation vers ses effecteurs (2). Les RhoGAPs augmentent l'activité GTPase de Rho qui conduit à l'hydrolyse du GTP en GDP et inactive RhoA (3). L'activité de RhoA peut aussi être régulée par l'action des RhoGDI qui le maintiennent sous forme inactive dans un compartiment cytoplasmique (4). Adapté de (Hodge and Ridley, 2016).

Les ROCKs sont des sérine/thréonine kinases, dont il existe deux isoformes chez les mammifères, ROCK1 et ROCK2. Les deux isoformes sont exprimées à des niveaux généralement identiques au cours du développement et dans la plupart des tissus, excepté le thymus et le sang où ROCK1 est fortement exprimée alors que ROCK2 est presque indétectable. Bien que leurs séquences et structures soient relativement proches, notamment pour le domaine kinase et le domaine de liaison à Rho (« Rho-binding domain », RBD), chaque ROCK présente des mécanismes de régulation différents. Les ROCKs sont activées soit par la liaison d'une Rho-GTPase active, qui empêche l'interaction entre le domaine kinase et le domaine d'auto-inhibition (« auto-inhibitory domain », AID) présent en C-terminal, soit par le clivage du domaine AID, sous l'action des caspases par exemple (Coleman et al., 2001; Julian and Olson, 2014). Un modèle pour l'activation de ROCK2 a également été proposé, selon lequel son assemblage en dimère maintiendrait cette kinase en conformation étendue et constitutivement active. L'activation des effecteurs de ROCK2 dépend de leur présence à la bonne distance (qui doit être identique à celle de la conformation étendue) et de la conservation de cette distance pour que ROCK2 atteigne ses substrats depuis son ancrage à la membrane (Truebestein et al., 2015). De plus, les deux ROCKs présentent des distributions

intracellulaires différentes, probablement dues au fait que seul ROCK2 est capable de se lier aux phospholipides (Yoneda et al., 2005).

Identifiés comme partenaire de RhoA (Leung et al., 1995), les ROCKs ont rapidement été décrits comme participant à l'organisation du cytosquelette et à la formation des adhérences focales, grâce à une étude de surexpression dans les cellules HeLa (Leung et al., 1996). Les deux ROCKs ont cependant des effets différents sur le cytosquelette d'actine. L'extinction de ROCK1 via interférence par ARN empêche la formation de fibres de stress dans des fibroblastes de rat, alors que celle de ROCK2 conduit à l'étalement des cellules et la formation de longues extensions à l'arrière, mais sans effet sur les fibres de stress (Yoneda et al., 2005). Plus récemment, l'analyse des fonctions des ROCKs par l'utilisation d'ARNs interférant spécifiques a permis de mettre en évidence que ROCK1 stabilise la ceinture de jonctions adhérentes au pôle apical des cellules épithéliales. En diminuant la présence de p190-RhoGAP à la *Zonula Adherens*, ROCK1 stabilise RhoA et favorise son activité ; cela facilite le recrutement de la F-actine et de la myosine-IIA, et permet de réguler la tension au niveau des jonctions adhérentes (Priya et al., 2017). Dans cette étude, l'extinction de ROCK2 n'a pas eu d'effet sur la stabilité de RhoA ou de l'actomyosine à la *Zonula Adherens*. Lisowska et al., ont également mis en évidence à la fois *in vitro* et *in vivo* que les deux isoformes ont des effets distincts sur les jonctions cellulaires et l'organisation de l'actine dans l'endothélium. La stabilisation du complexe ROCK2/VE-cadhérine/ β -caténine par la protéine-chaperone CCM1 (« cerebral cavernous malformation 1 ») favorise la formation des jonctions adhérentes et maintient l'intégrité de l'endothélium. Au contraire, l'activité de ROCK1 promeut la formation de fibres de stress et la maturation des adhérences focales, et déstabilise les jonctions adhérentes (Lisowska et al., 2018). L'effet différentiel des ROCKs sur l'adhérence au substrat et la migration cellulaire a aussi été caractérisé par Peng et al. ; les auteurs ont observé que la perte de fonction des ROCKs par stratégie shARN empêche la réorganisation de l'actine et la maturation des adhérences focales par deux voies différentes. ROCK1 régule principalement le niveau de phosphorylation de MRLC alors que ROCK2 phosphoryle la cofiline ; leur extinction limite la migration cellulaire, en empêchant la mise en place d'une polarité avant-arrière ou en perturbant la répartition des forces de traction, respectivement (Peng et al., 2019).

De plus, les ROCKs participent aussi à la régulation de nombreuses autres fonctions. Par exemple, l'activation de ROCK1 par la caspase-3 est responsable de la formation de blebs membranaires, ainsi que de la fragmentation du noyau et de l'appareil de Golgi lors de l'apoptose. Les ROCKs ont aussi un effet sur la prolifération et le déroulement de la cytokinèse, mais cet effet semble variable suivant le contexte cellulaire (Julian and Olson, 2014).

L'importance de la contribution des ROCKs est généralement évaluée par l'effet de l'inhibiteur spécifique Y-27632 qui bloque l'activité de ROCKs en se liant au site catalytique de la kinase à la place de l'ATP (Uehata et al., 1997). Plus récemment plusieurs études ont permis d'identifier d'autres molécules inhibitrices plus efficaces (telle que DW1865) ou spécifiques d'une isoforme particulière (Oh et al., 2013; Lee et al., 2014; Feng et al., 2016).

Les p21-activated kinases (PAKs) sont des sérine/thréonine kinases, effectrices de Cdc42 et Rac1. Il en existe 6, répartis en deux groupes du fait de leur structure et modèles d'activation distincts. L'activité des PAKs de groupe I (PAK1-3) est régulée par l'homodimérisation de deux kinases suite à l'interaction entre leurs domaines d'auto-inhibition (AID) et leurs domaines kinase. Quand une petite GTPase active se lie à leurs domaines p21-binding-domain, le domaine AID et le domaine kinase se dissocient et PAK est alors active. Au contraire des PAKs de groupe I, les PAKs de groupe II (PAK4-6) sont constitutivement actives et ne possèdent pas de domaines AID. Le mécanisme de leur extinction n'est pas bien défini à ce jour (Kumar et al., 2017). La signalisation des PAKs est impliquée dans de nombreux processus (transcription, mitose, ...) et particulièrement bien décrite dans le remodelage du cytosquelette d'actine. La filamine-A, Arpc1b (composant du complexe Arp2/3) ou encore LIM-kinase 1 (LIMK1) sont des substrats de PAK1 et leur phosphorylation modifie la nucléation ou la stabilité des filaments d'actine (Kumar et al., 2017). La signalisation due à PAK4 est aussi majoritairement liée au remodelage du cytosquelette d'actine ; en effet, la phosphorylation de LIMK1 par PAK4 induit la perte des fibres de stress et un défaut d'étalement dans les myoblastes C2C12 (Dan et al., 2001). Enfin, plusieurs articles ont montré une interaction entre PAK4 et des RhoGEFs. Sa liaison à la RhoGEF GEF-H1 limite la formation des fibres de stress et la migration cellulaire (Callow et al., 2005; Wells et al., 2010) ; son interaction avec PDZ RhoGEF limite l'activation de RhoA et la formation de fibres de stress, mais participe à la maturation des invadopodes de cellules de mélanome WM-115 (Barac et al., 2004; Nicholas et al., 2019).

3.3. Organisation et fonctions du réseau d'actomyosine dans la morphogénèse et l'homéostasie épithéliale

Le réseau d'actomyosine participant à de nombreuses fonctions cellulaires, cette partie ne détaille que celles que je n'ai pas explorées en détail au cours de ma thèse. L'interaction entre le cytosquelette et les jonctions cellule-cellule, ainsi qu'au niveau des contacts entre la cellule et le substrat sont décrits dans les parties 4 et 5, respectivement.

a. Morphogénèse de l'épithélium

Un tissu acquiert sa structure au cours du processus développemental nommé morphogénèse. Chaque tissu ayant une fonction propre, la morphogénèse recouvre de nombreux événements différents, comme la constriction apicale qui permet la courbure du tissu lors la fermeture du tube neural chez les vertébrés, ou encore le câble d'actine « en cordon de bourse », responsable de la fermeture dorsale de l'embryon de drosophile (Franke et al., 2005). L'actomyosine, par sa capacité à modifier les propriétés mécaniques des cellules et donc leur forme et leur organisation, est un composant majeur de ce processus. Par exemple, les mouvements de convergence-extension de la bande germinale chez la drosophile sont dépendants de la polarité des protéines Zipper et Squash (respectivement chaînes lourde et légère de la myosine-II chez la drosophile) aux jonctions apicales des cellules en cours d'intercalation. Le recrutement de Squash aux jonctions est drastiquement réduit suite à l'inhibition de Rok par Y-27632, conduisant au blocage de l'intercalation (Bertet et al., 2004). Les réarrangements cellulaires ayant lieu lors de l'élongation de l'aile de la drosophile sont aussi dépendants de la tension exercée au niveau des jonctions adhérentes. Celles-ci se réduisent jusqu'au contact entre six cellules, en motif de rosette, et se reforment perpendiculairement à leur position précédente. L'accumulation et la sur-activation de la myosine-II par Rok au niveau de la rosette, conduit à une instabilité des jonctions en formation et empêche leur élongation, ce qui maintient le tissu dans un état non-compact et avec des défauts de la forme cellulaire (Bardet et al., 2013). En outre, les travaux de A. Martin décrivent comment la répartition des forces de tension dans l'embryon de drosophile, induite par la forme allongée de l'œuf, et leur maintien par l'organisation de l'actomyosine, sont responsables de la mise en place de formes tissulaires différentes pendant le développement. Par exemple, les cellules des embryons de forme elliptique sont soumises à une tension plus forte selon l'axe le plus long de l'embryon (axe antéro-postérieur) que selon l'axe court. Cette différence de tension conduit à une accumulation anisotrope de la myosine-II et de ses régulateurs, qui est responsable de la constriction apicale anisotrope des cellules ventrales, provoquant leur ingression selon un sillon orienté (Chanet et al., 2017). Cette équipe a également mis en évidence que la formation de ce sillon ventral est sensible à la répartition de l'activité de la myosine-II en un gradient autour du site d'ingression (Heer et al., 2017) (**Figure 12**).

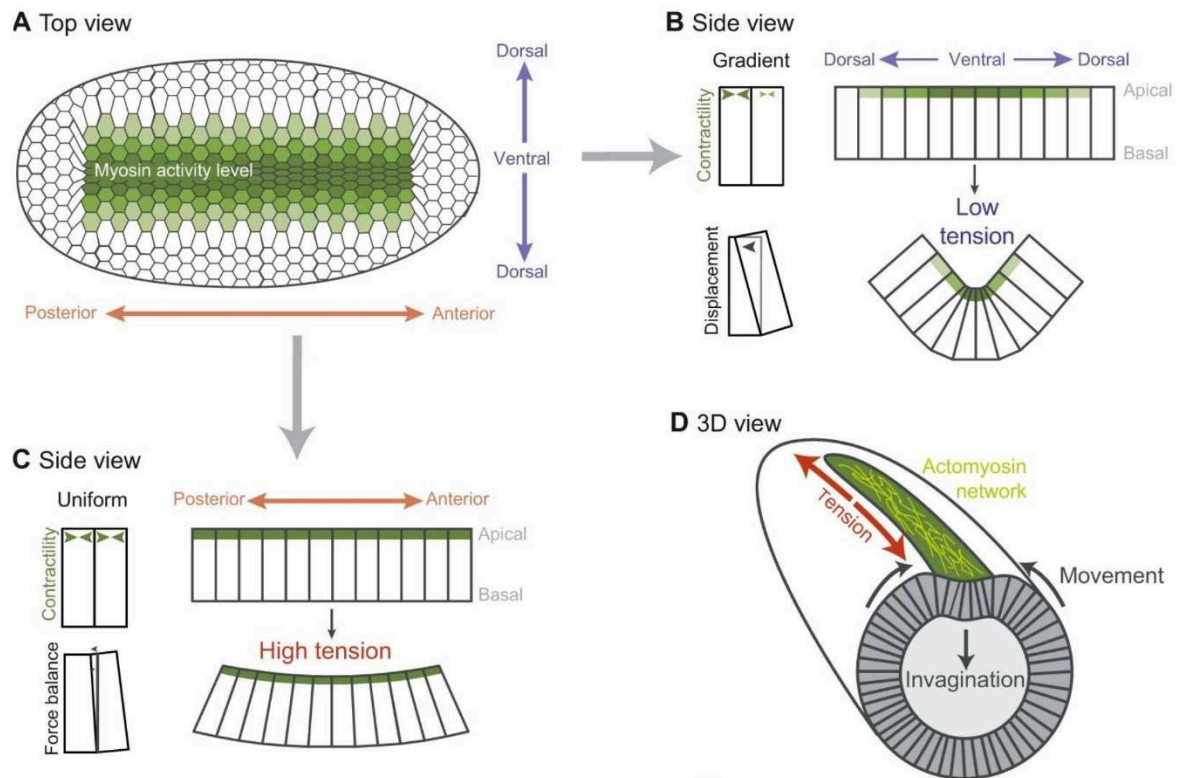


Figure 12 : Distribution et activité de la myosine-II pendant la formation du sillon ventral chez *Drosophila melanogaster* L'activité de la myosine-II est répartie selon un gradient le long de l'axe dorso-ventral (A). L'activité élevée de la myosine-II au niveau ventral, comparativement au niveau dorsal, induit la constriction apicale et l'invagination des cellules ventrales (B). Aucune différence de tension n'a lieu entre les cellules le long de l'axe antéro-postérieur (C), la tension élevée fait que les cellules ne se déforment que très peu dans cet axe. (D) vue en 3D du modèle. Extrait de (Heer and Martin, 2017).

Chez les vertébrés, l'importance de l'activité de la myosine-II et de ROCK a été particulièrement étudiée lors de la morphogénèse du tube neural (**Figure 13**). Nishimura et Takeichi démontrent que l'ABP Shroom3 est capable de se lier à ROCK afin de le recruter aux jonctions apicales et ainsi permettre la constriction apicale nécessaire à la fermeture du tube neural d'embryons de poulet (Nishimura and Takeichi, 2008). L'extinction de la myosine-II est responsable d'un défaut de constriction apicale des cellules de la plaque neurale et des mouvements de convergence-extension nécessaire à la fermeture du tube neural du Xénope (Rolo et al., 2009). De même, la dérégulation de l'activité de RhoA empêche la constriction apicale et l'intercalation des cellules lors de la fermeture du tube neural chez la souris et le Xénope (Brouns et al., 2000; Itoh et al., 2014).

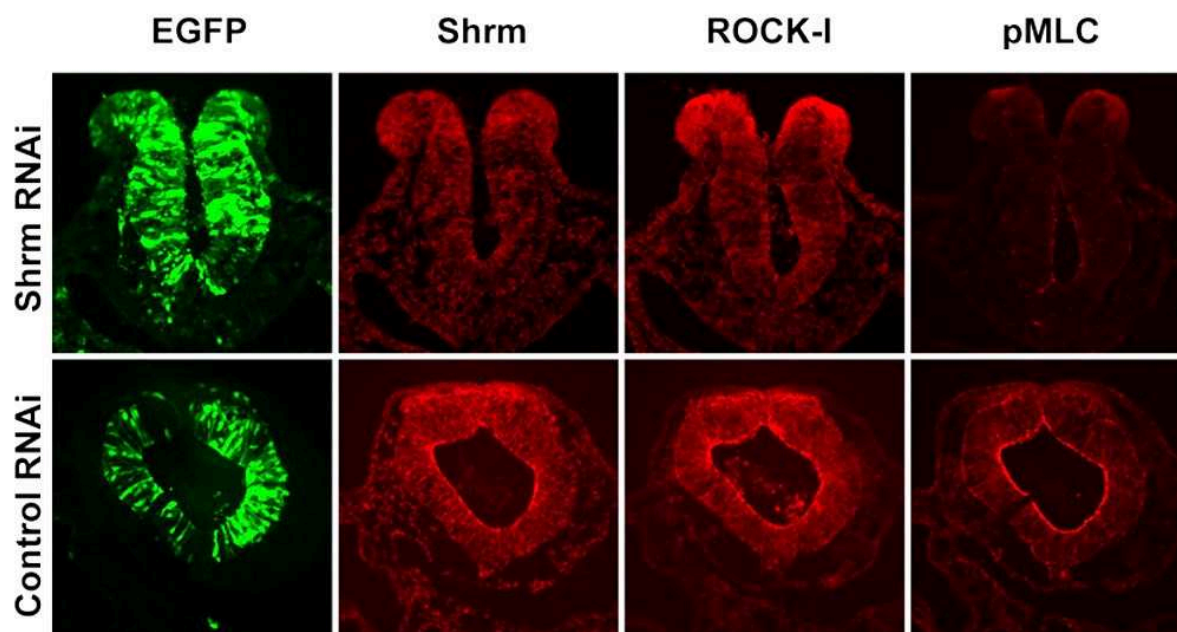


Figure 13 : Distribution et activité de la NM-II lors de la morphogénèse du tube neural. Le recrutement de ROCK aux jonctions apicales des cellules du neuro-épithélium est nécessaire pour l'activation de p-MLC et la fermeture du tube neural dans l'embryon de poulet. Les embryons Shroom3-KO ne recrutent pas ROCK-I et n'activent pas la myosine-II, ce qui résulte en un défaut de fermeture du tube. Extrait de (Nishimura and Takeichi, 2008).

b. Division cellulaire

L'activité contractile de l'actomyosine est impliquée dans la division cellulaire, lors de la mise en place de l'anneau contractile et de la contraction de cet anneau pour effectuer la cytokinèse. L'activation locale de RhoA dans le plan équatorial du fuseau mitotique promeut le recrutement des différents partenaires nécessaires à la formation de l'anneau contractile (formine, ROCK, Citron kinase, ...) et contribue à la communication entre le fuseau mitotique et le cortex cellulaire pour le positionnement du sillon de division (**Figure 14**). Le rôle exact de la myosine-II dans la contraction de l'anneau d'actomyosine n'est pas clairement défini mais plusieurs modèles ont été proposés, soit de glissement des filaments d'actine grâce à l'activité contractile de la myosine-II, soit par son rôle de réticulation des filaments d'actine ou de promotion du désassemblage de ces filaments (Green et al., 2012).

La régulation de la polymérisation et dépolymérisation de l'actine-F est aussi directement responsable du déroulement de l'étape d'abscission, *i.e* la séparation entre les deux cellules-filles (Dambournet et al., 2011; Frémont et al., 2017). Si l'activité de polymérisation d'actine est trop importante, par exemple suite à un défaut de recyclage des régulateurs en amont, son accumulation au pont intercellulaire empêche l'abscission entre les deux cellules-filles (Dambournet et al., 2011). Un deuxième mécanisme de régulation consiste au recrutement de l'oxydo-réductase MICAL1, et à

son maintien sous conformation active par la Rab GTPase Rab35, pour accélérer la dépolymérisation de l'actine-F au niveau du site d'abscission (Frémont et al., 2017).

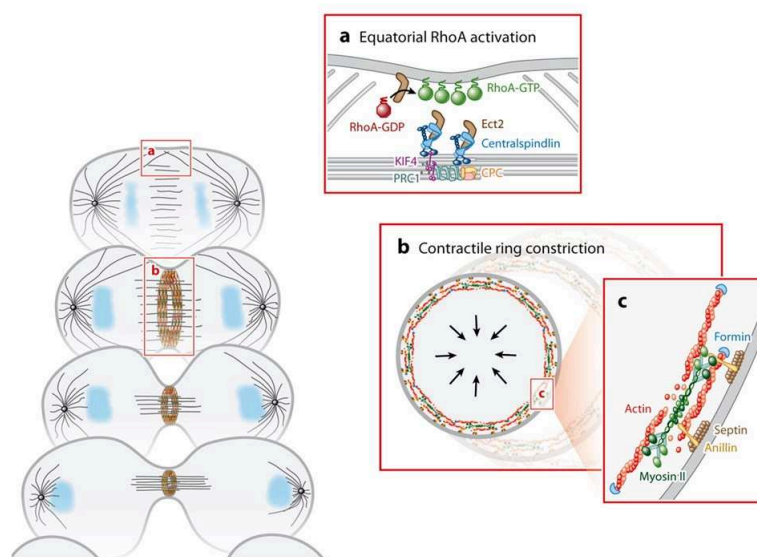


Figure 14 : L'actomyosine pendant la division cellulaire. **a.** Une signalisation RhoA-dépendante permet de positionner l'anneau contractile. **b.** La contraction de cet anneau permet la cytokinèse. **c.** Zoom sur l'organisation moléculaire de l'anneau contractile. Extrait de (Green et al., 2012).

c. Fermeture de blessure et extrusion cellulaire

Dans le cas particulier de l'extrusion suite à la mort cellulaire, les tissus épithéliaux font face au problème de la maintenance de leur fonction de barrière, qui ne doit pas être compromise, alors qu'une cellule doit sortir du tissu. Rosenblatt et al. ont examiné cette situation dans une monocouche épithéliale de cellules MDCK, leur permettant de mettre en évidence la formation d'un câble d'actine par les cellules voisines. En se contractant, ce câble expulse la cellule apoptotique et force le mouvement des cellules voisines pour couvrir l'espace vide, et ainsi maintenir l'épithélium intact (Rosenblatt et al., 2001). Le processus d'extrusion résulte principalement en l'expulsion de cellules vers la lumière des organes, au niveau apical, cependant l'extrusion peut être basale dans certains cas. Par exemple, lors de la morphogénèse de la patte chez la drosophile, l'apoptose basale de cellules génère une tension qui déforme la surface de l'épithélium ce qui produit le repliement du tissu. La modélisation de la morphogénèse de l'épithélium en fonction des événements d'apoptose et de la tension exercée aux jonctions cellulaires prédit que les événements d'apoptose doivent être précisément localisés pour générer la forme correcte du repli, ce qui a été confirmé par l'induction ectopique de repliement dans l'épithélium de l'aile (Monier et al., 2015). Chez les mammifères, l'apoptose basale est souvent décrite dans le contexte de la transition épithélio-mésenchymateuse. Des mutations sur-activant l'oncogène K-Ras sont responsables de l'extrusion basale des cellules,

possiblement via la réduction de la signalisation provenant du récepteur au sphingosine-1-phosphate, S1P2, qui recrute normalement p115-RhoGEF et active RhoA au niveau basal (Gudipaty and Rosenblatt, 2017). La formation d'un câble d'actine contractile existe aussi au niveau multicellulaire : ce mécanisme participe à la fermeture dorsale de l'embryon de drosophile ou à la gastrulation du poisson-zèbre (Rodriguez-Diaz et al., 2008; Behrndt et al., 2012).

Un deuxième mécanisme de fermeture de trou, non-exclusif, consiste en la mise en place d'une activité protrusive polarisée et de la couverture du trou par migration. Ainsi, Wood et al., ont mis en évidence que les deux mécanismes participent à la fermeture dorsale de l'embryon de drosophile, sous contrôle des GTPases RhoA et Cdc42, qui favorisent la formation du câble multicellulaire ou de filopodes, respectivement (Wood et al., 2002).

L'activation de l'un ou l'autre des mécanismes est sensible aux contraintes physiques de l'environnement du trou dans la monocouche épithéliale. Il a récemment été montré que la densité cellulaire influence le mécanisme d'extrusion. En condition de faible densité, l'extrusion est préférentiellement réalisée par migration alors qu'en condition dense, où les cellules sont compactées, l'extrusion se fait par la contraction du câble d'actomyosine (Kocgozlu et al., 2016). Les études réalisées *in vitro* sur des substrats de différentes géométries ont aussi révélé que le mécanisme de fermeture dépend de la courbure formée par les cellules au bord du trou : les courbures négatives (convexes) induisent l'assemblage du câble d'actine et la fermeture du trou par contraction alors que les courbures positives (concaves) favorisent la migration (Ravasio et al., 2015; Begnaud et al., 2016).

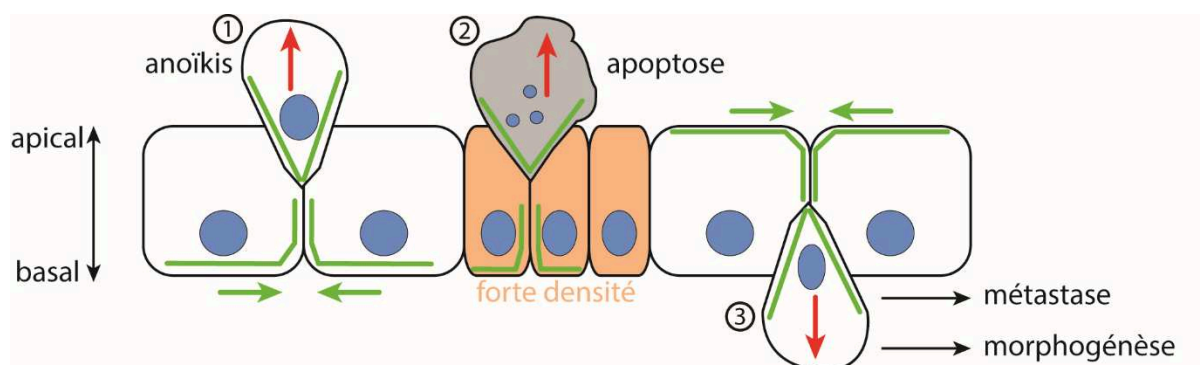


Figure 15 : Mécanismes d'extrusion. L'extrusion apicale de cellule vivante (1) ou morte (2) est réalisée par la formation d'un anneau d'actomyosine dont l'activité contractile (flèches vertes) crée une tension vers le pôle apical (flèche rouge). L'extrusion basale est réalisée par l'accumulation d'actomyosine au pôle apical, ce qui entraîne la constriction apicale de la cellule jusqu'à son extrusion. Ce type d'extrusion a lieu pendant le développement ou en cas de transformation cancéreuse.

4. Fonction et régulation de l'actomyosine aux jonctions intercellulaires

La structure de base des jonctions intercellulaires qui composent la *Zonula Adherens* est décrite en partie 2 (p. 24). Cette partie a pour but de présenter le rôle du cytosquelette d'actomyosine et de la contractilité cellulaire dans l'établissement de ces jonctions, ainsi que leur maintien en homéostasie ou en condition de stress.

4.1. Rôles du réseau d'actomyosine aux jonctions adhérentes

a. *Recrutement et stabilisation des cadhérines*

Lors de l'établissement d'une nouvelle jonction, les CAMs s'accumulent en clusters au niveau du contact entre les deux cellules. Suite à l'engagement des cadhérines et la réorganisation du cytosquelette, le point de contact va ensuite s'étendre pour former une jonction mature (Papusheva and Heisenberg, 2010). Ainsi que précédemment mentionné, la stabilisation des CAMs aux jonctions adhérentes est fortement dépendante du recrutement de leurs différents partenaires, tel que la p120-caténine pour la E-cadhérine, mais elle dépend aussi de la formation et stabilisation de la ceinture d'actine-F et de la génération de forces contractiles à la jonction. L'inhibition d'EPLIN, une protéine de liaison à l'actine, par interférence ARN conduit à la déstabilisation des filaments d'actine à la jonction adhérente et la E-cadhérine y paraît alors en points irréguliers le long d'un contact en zigzag (Abe and Takeichi, 2008). Cet effet est dépendant de la liaison de l'EPLIN à l' α -caténine ; l'importance de l'interaction entre α -caténine et l'actine-F pour la formation des clusters d'E-cadhérine lors de la formation de la jonction adhérente a, par ailleurs, été formellement démontrée par l'utilisation de constructions chimères entre la E-cadhérine et le domaine de liaison à l'actine de α -caténine (Hong et al., 2013). Enfin, l'engagement des cadhérines induit un rétrocontrôle en activant l'activité de réticulation de l'actine de la protéine IQGAP1, un effecteur de Rac1 et Cdc42. L'actine-F ainsi formée stabilise les cadhérines à la jonction adhérente en limitant leur endocytose (Izumi et al., 2004).

L'activité contractile de la myosine-II participe au recrutement et à la dynamique des clusters d'E-cadhérine aux jonctions adhérentes. L'utilisation de drogues modulant l'activité de l'actomyosine telles que la blebbistatine, ML-7 et Y-27632, démontre que le recrutement de la E-cadhérine est dépendant de l'activité contractile de la myosine-II, majoritairement via la signalisation de la voie ROCK qui induit la phosphorylation de la myosine-II aux contacts cellulaires. La myosine-II favorise la formation et/ou la stabilité de câbles d'actine proches de la jonction adhérente, et la E-cadhérine s'accumule en ces points (Shewan et al., 2005). L'interaction entre la

myosine-II et la E-cadhérine est à double sens ; en effet, si la myosine-II favorise l'accumulation de la E-cadhérine aux jonctions, la liaison des E-cadhérines conduit au recrutement de la myosine-II à la jonction en formation (Shewan et al., 2005).

b. Elongation et renforcement de la jonction adhérente sous tension

La maturation et l'élongation des jonctions adhérentes dépendent d'un contrôle précis de la tension qui s'y exerce. Liu et al. ont démontré, en tirant sur une cellule à l'aide d'une micropipette, que le recrutement de la VE-cadhérine augmente lorsque la jonction est sous tension (Liu et al., 2010). Dans la cellule, cette tension étant normalement exercée par l'activité contractile de la myosine-II sous contrôle des ROCKs, les traitements à la blebbistatine ou au Y-27632 diminuent l'extension de la jonction adhérente et la compaction du contact entre les deux cellules (Yamada and Nelson, 2007; Liu et al., 2010). Ces deux articles confirment cependant la nécessité d'un équilibre entre les forces de tension dépendantes de RhoA et la signalisation promue par Rac1 pour l'élongation du contact cellulaire ; ainsi, une tension trop importante brise le contact en formation (Liu et al., 2010).

En effet, les voies de signalisation antagonistes des petites GTPases (Rac/Cdc42 vs RhoA), localisées à différents points de la jonction adhérente, sont toutes les deux nécessaires à l'élongation de la jonction. Lors de la formation du contact initial entre les cellules, Rac1 et Cdc42 favorisent la production de nombreuses protrusions dynamiques ce qui entraîne le recrutement et l'accumulation de la E-cadhérine (Baum and Georgiou, 2011). Rac1 recrute et active également de nombreux facteurs de polymérisation, tels que le complexe Arp2/3 ou la formine-1 ; le réseau d'actine branchée résultant participe à soutenir et élargir la jonction en formation (Kovacs et al., 2002; Kobiela et al., 2004; Verma et al., 2004). Par ailleurs, le complexe Mena/VASP, qui promeut aussi la polymérisation de l'actine aux jonctions adhérentes en formation (Vasioukhin et al., 2000), est recruté à la *Zonula Adherens* par la vinculine lorsque la jonction est sous tension (Leerberg et al., 2014). Le recrutement de Mena/VASP et l'activité de polymérisation de l'actine participent également à un rétrocontrôle positif sur la contractilité de la jonction adhérente (Leerberg et al., 2014). La signalisation contrôlée par la GTPase RhoA, présente aux extrémités du contact, active la myosine-II qui exerce la tension nécessaire à l'extension de la jonction (Yamada and Nelson, 2007).

De plus, la tension exercée par le cytosquelette participe au recrutement et renforcement des complexes d'adhérence (Thomas et al., 2013; Yonemura et al., 2010). Ainsi, le changement de conformation de l' α -caténine sous tension est nécessaire au recrutement de la vinculine, qui stabilise la forme ouverte d' α -caténine à la jonction (Yao et al., 2014; Seddiki et al., 2018). Le

recrutement et l'activation de la vinculine sous tension participe aussi au contrôle du positionnement d'autres ABPs à la jonction adhérente, telles que la zyxine ou VASP (Bertocchi et al., 2017). Enfin, Ito et al. ont récemment montré que des jonctions adhérentes faibles formées par des cellules cancéreuses HT29 peuvent être rétablies et renforcées suite à l'activation de ROCK1 qui permet de recruter la vinculine, et de stabiliser l'actine-F à la jonction en inhibant l'action de la cofiline (Ito et al., 2017).

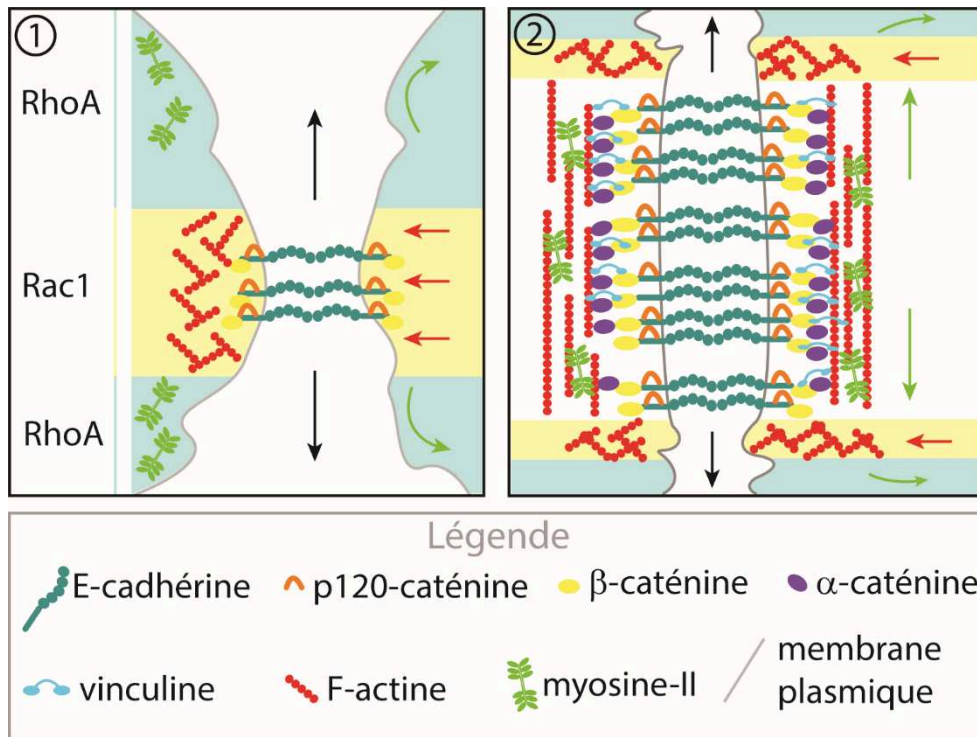


Figure 16 : Impact de la tension sur l'élongation des jonctions adhérentes. La signalisation des RhoGTPases est régulée de manière spatio-temporelle au cours de l'extension d'une jonction adhérente. Le contact initial est favorisé par l'activité de polymérisation et branchement de l'actine de Rac1 qui induit la formation de protrusions (flèches rouges). RhoA est responsable de la tension aux extrémités du contact (flèches vertes) qui participe à l'extension de la jonction adhérente (1). Au fur et à mesure de l'extension de la jonction (flèches noires), RhoA induit le recrutement et l'activation de la myosine-II, et la jonction se renforce avec la formation de câbles d'actomyosine péri-jonctionnels et le recrutement de nouvelles ABPs, telle que la vinculine. L'activité de RhoA et Rac1 diminue à la jonction mature. Inspiré de (Papusheva and Heisenberg, 2010).

c. Mécanotransduction aux jonctions adhérentes

La structure même des jonctions intercellulaires, notamment grâce à leur lien au cytosquelette d'actine, en fait des points de réponse à l'environnement mécanique, soit en résistant soit en se remodelant en fonction des forces qui leur sont appliquées. La transformation de cette information mécanique en signal biochimique se nomme mécanotransduction (**Figure 17**). Plusieurs études ont ainsi montré que les jonctions adhérentes sont capables de répondre à différents stimuli mécaniques, tels que la rigidité du substrat (Ladoux et al., 2010) ou l'application d'une pression à

l'aide d'une bille (le Duc et al., 2010). L'application d'une force à l'aide d'une bille couverte d'une protéine recombinante Fc-E-cadhérine entraîne la rigidification du contact entre la bille et la cellule au cours du temps, grâce au recrutement de la vinculine et l'activation de la myosine-II (le Duc et al., 2010). La démonstration formelle du rôle de la E-cadhérine comme mécanosenseur provient de la génération du rapporteur de tension intracellulaire basé sur un couple de fluorophores de FRET (EcadTSMOD). Borghi et al. ont ainsi montré que la transmission de l'information mécanique aux jonctions adhérentes dépend de la liaison entre le complexe E-cadhérine/ α -caténine et le cytosquelette d'actine (Borghi et al., 2012).

L'intégration de l'information mécanique, réalisée par l'adaptation du cytosquelette ou des jonctions adhérentes elles-mêmes, est particulièrement importante lors des événements de morphogénèse comme ceux décrits dans la partie 3.3. Cependant, elle participe aussi à l'homéostasie des épithéliums, par exemple pour la coordination des cellules lors de la migration collective en milieu confiné (Chen et al., 2018).

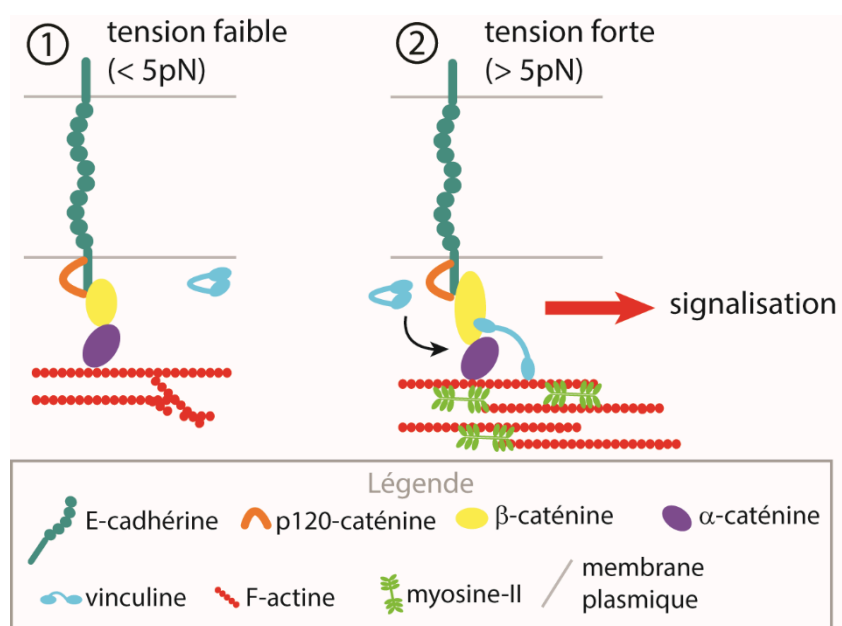


Figure 17 : Mécanotransduction aux jonctions adhérentes. Quand la jonction se trouve sous tension élevée (> 5pN environ, par molécule d' α -caténine), les protéines mécanosensibles à la jonction changent de conformation, activant des voies de signalisation en aval (2). Par exemple, l'extension de l' α -caténine permet le recrutement de vinculine. Inspiré de (Mège and Ishiyama, 2017).

Enfin, la mécanotransduction aux jonctions adhérentes peut modifier le comportement cellulaire en agissant sur d'autres processus que les jonctions cellule-cellule (Yap et al., 2018). Par exemple, la transduction des forces s'exerçant aux niveaux des jonctions adhérentes modifie le contrôle du cycle cellulaire (Benham-Pyle et al., 2015). En effet, les cellules quiescentes d'une monocouche de cellules MDCK entrent à nouveau dans le cycle cellulaire suite à l'application d'un étirement, par translocation et activation de Yap1 et β -caténine dans le noyau. Cet effet de

l'étirement est dépendant de l'engagement des cadhérines dans la mesure où l'expression du mutant E-cadhérine T151 qui ne possède pas de domaine extracellulaire, n'induit ni la translocation et l'activité de la β -caténine, ni la division des cellules (Benham-Pyle et al., 2015).

4.2. **Le réseau d'actomyosine aux jonctions serrées**

a. Impact de la contractilité sur la formation des jonctions serrées

Par leur ancrage au cytosquelette, les jonctions serrées sont sensibles au stress mécanique, et celui-ci influence directement sur leur composition. Ainsi, les protéines ZO-1 et -2 changent de conformation sous tension, permettant le recrutement de l'occludine aux jonctions serrées (Spadaro et al., 2017). La localisation de l'anguline-1 aux jonctions tricellulaires est, elle aussi, sensible au niveau de contractilité qu'elles subissent (Kohno et al., 2017).

b. Mécanotransduction aux jonctions serrées

Tout comme pour les jonctions adhérentes, l'ancrage des jonctions serrées au cytosquelette d'actine, et leur proximité à la membrane plasmique où de nombreux régulateurs se situent, leur permet de répondre aux stress qu'elles reçoivent. Das et al. ont ainsi montré que la coordination de cellules épithéliales HaCaT ou MDCK pendant la migration collective dépend de la régulation de l'activité de la petite GTPase Rac1, par le transport de la merline des jonctions serrées vers le cytoplasme, en réponse aux forces exercées sur les contacts cellule-cellule (Das et al., 2015). Les jonctions serrées régulent la tension dans la monocouche épithéliale, en interagissant avec différents régulateurs en amont de l'activité de myosine-II, tels que des GEFs (Benais-Pont et al., 2003; Oda et al., 2014) et participent aussi au contrôle du niveau de tension appliqué aux jonctions adhérentes (Hatte et al., 2018).

Les jonctions tricellulaires sont des points particuliers d'accumulation de la tension dans les monocouches épithéliales. L'extinction des protéines ZO-1/2 qui cause une augmentation de la tension à la *Zonula Adherens*, conduit à un enrichissement deux fois supérieur de la vinculine et de la forme sous tension d' α -caténine aux jonctions tricellulaires. Choi et al. ont également mis en évidence un mécanisme de réponse à l'élévation de la tension dans l'épithélium dans lequel la protéine d'échaffaudage Afadine et l'ABP Shroom-3 régulent la contractilité causée par ROCK (Choi et al., 2016). En outre, l'extinction de la tricelluline est aussi responsable de la diminution de la tension qui s'exerce aux jonctions tricellulaires, ce qui conduit à des défauts de forme des cellules et à leur réarrangement avec les cellules voisines en motif de rosette autour d'une jonction multicellulaire (Oda et al., 2014).

5. Fonction et régulation du réseau d'actomyosine lors de l'adhérence au substrat et la migration cellulaire

La majorité des études concernant l'adhérence au substrat, l'étalement et la migration cellulaire a été effectuée dans des types cellulaires non-épithéliaux, tels que les MEFs ou les U2OS. Sauf mention contraire, les informations présentées ici ne sont donc pas spécifiques de cellules épithéliales.

5.1. Adhérence au substrat

a. Mécanisme d'adhérence et étalement

L'analyse détaillée de la dynamique des protrusions pendant l'étalement de fibroblastes a permis de mettre en évidence deux types d'étalement : (i) un étalement isotrope où l'ensemble de la périphérie cellulaire augmente, (ii) un étalement anisotrope où l'extension de l'aire cellulaire augmente graduellement par une série de protrusions séparées par des périodes d'inactivité. L'étalement d'un type ou l'autre ne semble pas dépendre de la densité de matrice extracellulaire disponible, et ne modifie pas la mise en place d'une polarité avant-arrière ou la migration cellulaire ayant lieu après l'étalement (Dubin-Thaler et al., 2004). Le modèle d'étalement isotrope a cependant été plus étudié quand il a été mis en évidence que l'événement pouvait alors être découpé en trois phases distinctes, comprenant une phase d'adhérence initiale, puis une séparation claire entre la phase de protrusion et celle dépendant de l'activité contractile (Döbereiner et al., 2004).

La phase d'adhérence initiale correspond à l'engagement des intégrines à la MEC, et à leur accumulation en clusters, ce qui permet leur stabilisation et la poursuite du processus d'étalement. Les clusters d'intégrine entraînent la polymérisation de câbles d'actine et l'application de force à partir de ces points, induisant la maturation des complexes naissants en adhésions focales matures (Wolfenson et al., 2014). Une fois l'adhérence initiale réalisée, la cellule s'étale rapidement par l'utilisation de ses réserves de membrane plasmique, et l'activation de l'exocytose par l'augmentation de la tension membranaire participe à l'extension de l'aire de la cellule (Gauthier et al., 2011). Par la suite, l'étalement est plus lent car la cellule s'étend par des événements périodiques de protrusion/rétraction qui favorisent la création de clusters d'intégrine $\beta 3$ et de paxilline, et sont dépendants de l'activité de MLCK. Il a été suggéré que cette étape de protrusion/rétraction cyclique permette à la cellule de favoriser l'étalement en réponse à la rigidité du substrat, de façon contrôlable par une signalisation locale provenant des ABP (Giannone et al., 2004).

b. Effet de la dynamique de l'actine sur l'étalement

La dynamique de l'actine, indépendamment de l'activité de la myosine-II, est importante pour la maturation des adhérences focales et l'étalement des cellules. L'analyse des étapes précoces de l'étalement des cellules a montré que l'engagement des intégrines dans une adhérence induit la polymérisation de l'actine à partir des clusters d'intégrines (Yu et al., 2011). De plus, le blocage de la polymérisation de la F-actine, par inhibition de l'activité des formines ou interférence par ARN de la formine FHOD1, conduit à la formation de protrusions instables et à la réduction de la maturation des adhérences focales. Ces défauts sont responsables de la perte de coordination des forces de traction exercées par la cellule, et donc à un étalement et une capacité de migration réduits (Iskratsch et al., 2013). L'activité de polymérisation d'actine au niveau des adhérences focales participe également à l'activation des kinases qui y sont présentes, telles que FAK ou Src, ce qui favorise l'adhérence au substrat et l'étalement des cellules (Zhang et al., 2013).

c. Impact de la contractilité sur les adhérences focales

L'utilisation d'interférence ARN contre la myosine-IIA, couplée à un traitement blebbistatine pour inhiber l'activité de la NM-IIA/B résiduelle, a permis de montrer que la formation des adhérences naissantes dans le lamellipode est indépendante de la contractilité générée par la myosine-II (Choi et al., 2008). En revanche, la maturation des complexes focaux en adhérences focales nécessite l'activité de la myosine-II. L'inhibition de la signalisation de ROCK par Y-27632 ou l'extinction de NM-IIA ou -B par interférence ARN inhibe l'élongation des adhérences, qui restent au stade de complexes focaux en périphérie de la cellule (Zaidel-Bar et al., 2003; Vicente-Manzanares et al., 2011). Ces deux articles montrent que la myosine-II est nécessaire à la maturation mais ne découplent pas son rôle de réticulant de l'actine (qui forme un faisceau d'actine que l'adhérence peut utiliser comme matrice) et celui de générateur de tension. Cette question est résolue par Oakes et al., qui montrent que la tension générée par la myosine-II stabilise les adhérences focales lors de leur maturation mais que le faisceau d'actine « matrice » est suffisant pour que celles-ci se forment (Oakes et al., 2012). L'analyse du protéome associé aux intégrines après traitement avec blebbistatine indique cependant que l'activité contractile de la myosine-II favorise le recrutement de la paxilline et la zyxine aux adhérences focales (Schiller et al., 2011). Enfin, Webb et al., ont montré qu'une signalisation FAK/Erk-dépendante active MLCK et favorise le désassemblage rapide des adhérences focales dans des MEFs en condition normale (Webb et al., 2004). Il apparaît donc que l'activité contractile de la NM-II participe à la maturation des adhérences ainsi qu'à leur désassemblage.

d. Mécanotransduction aux adhérences focales

De la même façon qu'aux jonctions cellule-cellule, le couplage entre la MEC et le cytosquelette d'actine au niveau des sites d'adhérence au substrat permettent aux cellules de détecter et répondre aux propriétés mécaniques de celui-ci (géométrie du substrat, rigidité, densité de MEC, ...). Quand les intégrines ne sont pas engagées dans une liaison avec la MEC, les forces exercées par le flot d'actine au niveau du lamellipode ne sont alors pas transmises au substrat. Si les intégrines sont reliées à la MEC, le mouvement du flot d'actine génère alors une force de traction sur le substrat au niveau des adhérences focales (**Figure 18**). De plus, la polymérisation d'actine qui s'y exerce produit une protrusion à l'avant de la cellule en poussant la membrane plasmique (Sun et al., 2016). La description théorique de ce modèle d'embrayage (ou « molecular clutch » en anglais), initialement proposé par Mitchison et al. pour décrire la migration de cellules neurales, a ensuite été démontré au niveau moléculaire par l'équipe de P. Roca-Cusachs (Mitchison and Kirschner, 1988; Elosegui-Artola et al., 2016). Leurs travaux ont mis en évidence que la taline change de conformation à partir d'un seuil de tension, ce qui permet le couplage de l'adhérence focale au cytosquelette. En-dessous de ce seuil, les intégrines relâchent la MEC avant que la taline ne change de conformation et il n'y a alors pas de transmission de l'information mécanique (Elosegui-Artola et al., 2016).

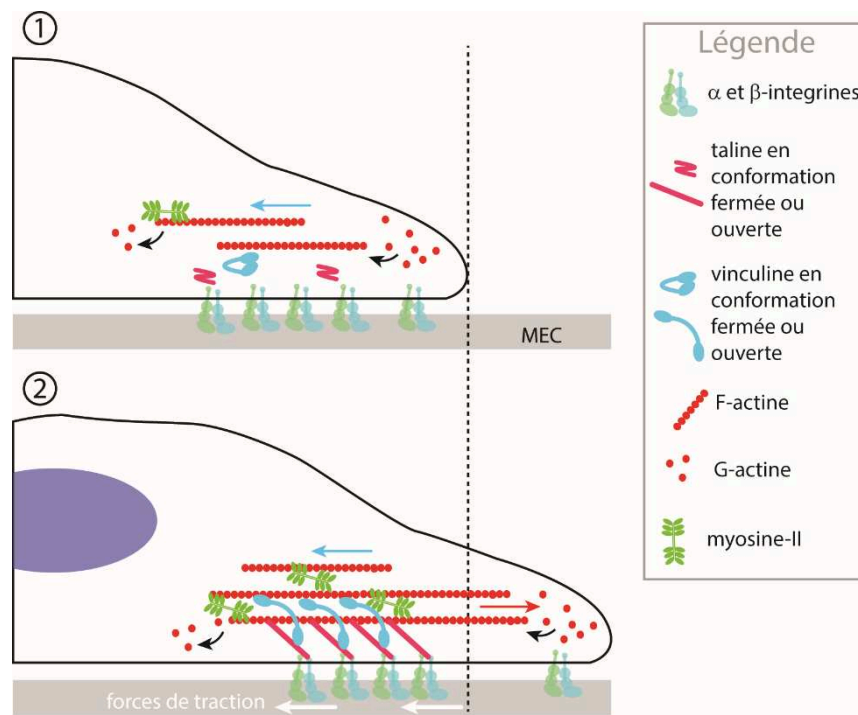


Figure 18 : Modèle du « molecular clutch ». La polymérisation de l'actine dans le lamellipode crée un flot rétrograde (flèche bleue) mais si les intégrines ne sont pas engagées dans une adhérence alors les forces générées par ce flux, ainsi que la traction exercée par la myosine-II, ne sont pas transmises sur le substrat (1). Quand les adhérences focales se forment et que le cytosquelette d'actine est ancré, la polymérisation à l'avant de la cellule produit une force suffisante pour pousser la membrane plasmique vers l'avant (flèche rouge). De plus, les forces générées par l'actomyosine sont transmises en forces de traction sur le substrat via les protéines mécanosensibles taline et vinculine (2). Inspiré de : <https://www.mechanobio.info/cytoskeleton>

dynamics/what-are-lamellipodia-and-lamella/how-do-focal-adhesions-act-as-molecular-clutches-in-lamellipodia/

De nombreuses protéines présentes aux adhérences focales sont capables de déclencher des voies de signalisation en réponse à la rigidité ou la géométrie du substrat. Par exemple les facteurs de transcription YAP/TAZ sont transloqués dans le noyau en réponse à un substrat rigide ou si la cellule peut s'étendre, alors qu'ils sont séquestrés dans le cytoplasme de cellules sur substrat mou ou si la cellule est confinée (Dupont et al., 2011; Zhao et al., 2007). Ces réponses sont particulièrement importantes au cours du développement ; en effet, la rigidité du substrat est capable de déterminer la différenciation d'une cellule-souche dans un lignage ou un autre, ou encore de guider la migration de populations cellulaires pendant la morphogénèse (McBeath et al., 2004; Engler et al., 2006; Barriga et al., 2018).

5.2. Mécanisme de la migration cellulaire

a. *Processus de migration*

La migration cellulaire est généralement décrite en trois étapes : (i) la formation d'une protrusion à l'avant de la cellule, tel qu'un lamellipode ou filopode, accompagné de la formation de complexes focaux, (ii) la stabilisation et maturation des complexes focaux en adhérences à l'avant, et de leur dissolution à l'arrière, et (iii) la contraction de l'arrière pour propulser la cellule vers l'avant (Lauffenburger and Horwitz, 1996) (**Figure 19**). Afin de se déplacer efficacement, la cellule doit donc pouvoir définir un axe de polarité avant-arrière et maintenir ou modifier cette polarité au cours du temps en fonction des stimuli de l'environnement. Le maintien de cette polarité dépend de mécanismes de contrôle précis qui dirigent à la fois l'activité des RhoGTPases mais aussi l'organisation des cytosquelettes d'actine et de microtubules et l'axe du trafic vésiculaire, pour recycler de l'arrière vers l'avant les composants des adhérences focales par exemple.

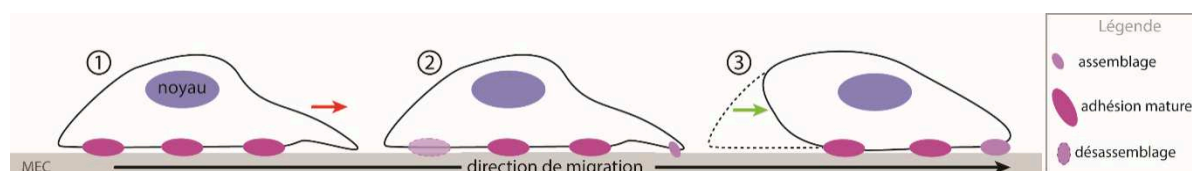


Figure 19 : Modèle de la migration cellulaire. La cellule définit un axe de polarité avant-arrière, et étend une protrusion à l'avant (flèche rouge) (1). La signalisation Rac-dépendante favorise aussi l'assemblage de nouvelles adhérences à l'avant, alors que les adhérences plus anciennes à l'arrière sont défaits (2). La contraction de l'arrière (flèche verte) propulse le corps cellulaire vers l'avant (3).

b. Mise en place de la polarité avant-arrière

La polarité du cytosquelette qui s'établit est dépendante de la régulation spatiale des petites GTPases. Le modèle classique indique que les GTPases Cdc42 et Rac1 promeuvent la formation de la protrusion à l'avant alors que RhoA participe à la contraction de l'arrière de la cellule (Ridley et al., 2003). Cao et al. ont récemment mis en évidence un mécanisme de double échange de partenaires protéiques, induit par la signalisation de l'EGF, qui conduit à l'activation de Rac1 à l'avant de la cellule alors que l'activité de RhoA est facilitée à l'arrière par la séquestration de la RhoGAP DLC1 (Cao et al., 2015). L'action antagoniste de ces GTPases est d'autant plus forte que chacune peut réguler négativement les activateurs ou effecteurs de l'autre. Rac est ainsi capable d'activer p190-RhoGAP pour limiter l'activité de RhoA (Nimnual et al., 2003).

La localisation et l'activité des RhoGTPases sont régulées par diverses modifications post-traductionnelles, tel que l'ajout de groupes lipidiques par palmitoylation ou prenylation, qui favorisent leur ancrage à la membrane plasmique. La phosphorylation des GTPases elles-mêmes, ou de leurs GEFs, GAPs ou GDIs, est aussi capable de modifier leur localisation, ou leur activité (Hodge and Ridley, 2016). Par exemple, la phosphorylation de la RhoGEF GEF-H1 (aussi nommé ARHGEF2) sur la sérine 885 entraîne sa liaison aux protéines 14-3-3 et sa relocalisation sur les microtubules (Zenke et al., 2004). La répartition polarisée des différentes kinases et phosphatases dépend des interactions et boucles de régulation entre les RhoGTPases et les complexes de polarité (Iden and Collard, 2008). Par3 s'associe à la RacGEF TIAM1 et permet de stabiliser le réseau de microtubules permettant une migration dirigée et la réponse chimiotactique de fibroblastes de souris (Pegtel et al., 2007). La phosphorylation de l'adaptateur Numb par aPKC est aussi responsable du recyclage correct des intégrines à l'avant de la cellule (Nishimura and Kaibuchi, 2007).

c. Dynamique de l'actine

La polymérisation de l'actine à l'avant de la cellule est promue par l'activité de Rac1 et Cdc42 à l'aide de nombreux effecteurs. Par exemple, IQGAP1/2 en se liant à Cdc42 inhibe son activité GTPase ce qui maintient Cdc42 couplé au GTP et donc actif (Swart-Mataraza et al., 2002). IQGAP1 participe ensuite à la formation de faisceaux d'actine soit directement, soit en favorisant l'activité de Arp2/3 ou de la formine Dia1 (Fukata et al., 1997; Watanabe et al., 2015), responsables de la polymérisation et réticulation de l'actine nécessaires pour la formation de lamellipodes ou filopodes. Cdc42 est aussi capable de s'associer à la formine FMNL2 permettant son activation au lamellipode et une dynamique correcte de la protrusion (Block et al., 2012). De plus l'activité de FMNL2 et 3 permise par Cdc42 renforce la structure et l'organisation des filaments d'actine dans le

lamellipode, lui permettant d'exercer des forces nécessaires à la migration cellulaire (Kage et al., 2017). Il est également bien établi que Rac1 active les complexes WAVE et Arp2/3 pour produire des lamellipodes à l'avant de la cellule (Steffen et al., 2004; Koestler et al., 2013). Par ailleurs, l'actine-F exerce un rétrocontrôle positif sur l'activité de Rac1 via la RhoGEF PLEKHG3, ce qui permet de maintenir l'axe de polarité de la cellule et la polymérisation de l'actine à l'avant (Nguyen et al., 2016). A l'arrière de la cellule, la signalisation induite par RhoA favorise la contractilité de la myosine-II, ce qui déstabilise les filaments d'actine. En effet, la tension exercée par la myosine-II peut courber le filament d'actine jusqu'à ce qu'il casse (Murrell and Gardel, 2012).

d. Impact de la contractilité sur la migration cellulaire

L'activité de la myosine-II n'est pas nécessaire à la dynamique de l'actine dans le lamellipode (Ponti et al., 2004), cependant la contractilité cellulaire participe à la migration des cellules. En effet, plusieurs études ont montré que l'inhibition de la contractilité de la myosine-II, par un traitement avec la blebbistatine ou par interférence à l'ARN, réduit fortement la polarisation et la migration cellulaire.

Il est intéressant de noter que les isoformes de myosine-II sont réparties différemment au cours de la migration cellulaire ; la myosine-IIA est située vers l'avant et favorise la dynamique des protrusions alors que la myosine-IIB participe à la rétraction de l'arrière de la cellule (Vicente-Manzanares et al., 2008, 2011; Kuragano et al., 2018). De plus, les deux isoformes participent aussi à la génération de tension au niveau des adhérences focales, qui facilite leur formation et/ou leur stabilisation, ainsi que précédemment mentionné en partie 5.1. Pasapera et al. ont récemment mis en évidence que la signalisation dépendante de Rac1 participe au recrutement et à la phosphorylation de la myosine-IIA aux adhérences focales, ce qui favorise leur assemblage et leur propriété de mécanosenseurs (Pasapera et al., 2015). La myosine-IIB est au contraire impliqué dans la stabilisation des adhérences focales et des structures d'actine à l'arrière de la cellule (Vicente-Manzanares et al., 2011). L'analyse par microscopie ultra-résolutive a par ailleurs mis en évidence que les deux isoformes de myosine peuvent polymériser en hétérofilaments, cependant les deux isoformes sont généralement séparées au niveau cellulaire, sûrement à cause de leurs propriétés de liaison à l'actine différentes (Beach et al., 2014).

5.3. Les fibres de stress

Bien qu'elles aient été observées dès le début de la culture cellulaire *in vitro* (Buckley and Porter, 1967), l'existence de fibres de stress comme une structure pertinente et non un artéfact de

culture est bien plus récent, et leur fonction exacte est toujours sujet à controverse suivant le contexte cellulaire. Cette partie a pour objectif de synthétiser l'importante littérature concernant la structure, formation et fonction des fibres de stress, notamment pendant les processus d'étalement et de migration.

a. Structure et nomenclature

Les fibres de stress (en anglais « stress fibers », SFs) sont des faisceaux formés d'une vingtaine de filaments d'actine, liés entre eux par différentes ABP telles que la fascine, la filamine ou l' α -actinine. Il existe trois types de fibres de stress, classifiées selon leur localisation, leur composition et leur lien avec les adhésions focales. Les fibres de stress ventrales (vSFs) sont liées à une adhésion focale à chaque extrémité, et décorées de myosine-II, ce qui leur permet d'exercer une tension sur le substrat. Les arcs transverses (en anglais « transverse arcs », TA), aussi décorés de myosine-II, sont capables d'activité contractile, mais ils ne sont pas directement reliés à la MEC. Enfin, les fibres radiales, aussi nommées dorsales (dSFs) sont orientées perpendiculairement au bord de la cellule et croissent à partir d'une adhésion focale vers la partie dorsale de la cellule (**Figure 20**). Elles contiennent une forte quantité d' α -actinine mais pas de myosine-II et ne sont donc pas capables d'exercer elles-mêmes une activité contractile. Cependant, elles transmettent la tension créée par la contraction des arcs transverses, ce qui génère des forces sur le substrat, et sont donc aussi catégorisées comme des fibres de stress (Tojkander et al., 2012; Lee et al., 2018).

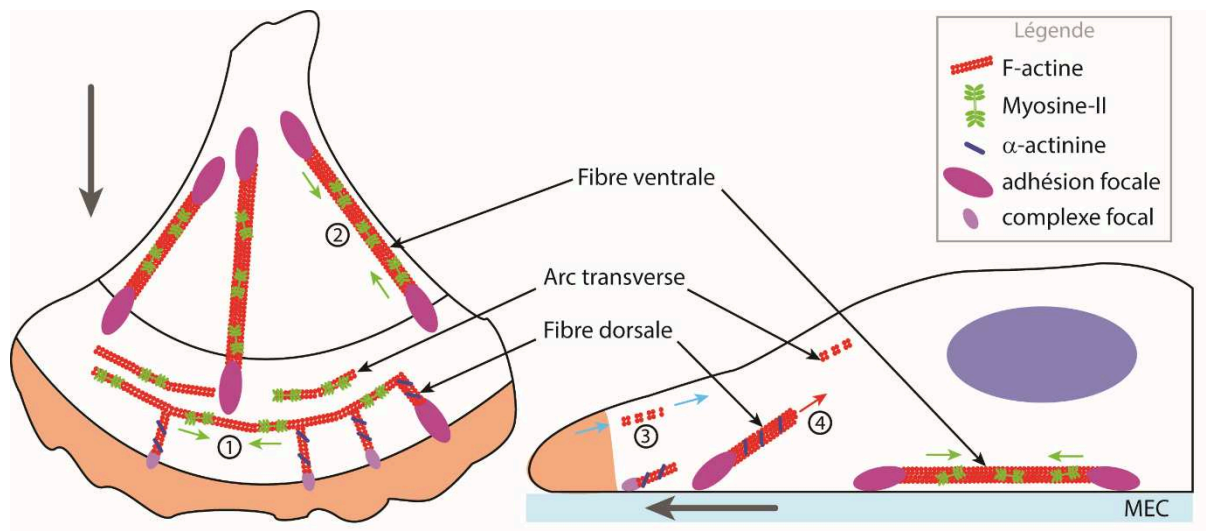


Figure 20 : Schéma des différents types de fibres de stress Les différents types de fibres de stress sont présentés en vue dorsale (à gauche) ou transverse (à droite). Les arcs transverses ainsi que les fibres ventrales, riches en myosine-II, sont capables d'activité contractile (flèches vertes) (1, 2). Les arcs transverses se forment par accumulation de filaments d'actine et de myosine due au flot rétrograde (flèches bleues) (3). La polymérisation qui s'exerce au niveau des adhésions focales permet aux fibres dorsales de s'allonger jusqu'à relier les arcs transverses (4). L'axe avant-arrière de la cellule est pointé par les flèches grises. La zone orange délimite le lamellipode. Inspiré de : <https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-are-stress-fibers/>

b. Formation des fibres de stress

Une première étude analysant la formation des fibres de stress dans des cellules U2OS a décrit que les fibres dorsales grandissent à partir des adhérences focales, sous l'action de polymérisation de la formine mDia1 (Hotulainen and Lappalainen, 2006). Plus récemment, Kovac et al. ont montré que la formation des fibres dorsales dans les U2OS dépend de l'activité de Rac1 à l'avant de la cellule et nécessite α -actinine-1. Par ailleurs, les auteurs ont testé l'effet des inhibiteurs de l'activité de la myosine-II sur la formation des fibres dorsales, et concluent que celles-ci sont insensibles à une réduction de la contractilité cellulaire (Kovac et al., 2013). L'élongation et le renforcement des fibres dorsales est réalisé grâce au complexe VASP qui est recruté par la palladine ; celle-ci participe aussi à leur connexion correcte aux arcs transverses (Gateva et al., 2014).

L'observation des arcs transverses montrent qu'ils se forment par advection de minifilaments d'actine et de myosine-II entraînés par le flot rétrograde (Hotulainen and Lappalainen, 2006). La formation des arcs transverses dépend de l'activité du complexe Arp2/3 et de la contractilité cellulaire (Hotulainen and Lappalainen, 2006). Par la suite, l'analyse du rôle des différentes isoformes de la tropomyosine a mis en évidence que la formine mDia2 produit une partie des minifilaments d'actine présents au lamellipode, qui s'associent ensuite à la tropomyosine-4. Les minifilaments décorés de tropomyosine-4 recrutent de la myosine-II, contrairement à ceux formés par mDia1, qui sont décorés d' α -actinine. Les deux populations de filaments s'assemblent ensuite bout à bout à la frontière entre le lamellipode et la lamelle où ils s'accumulent, suite au ralentissement du flux causé par la présence des adhérences focales (Tojkander et al., 2011). La modélisation des stress exercés dans le lamellipode par la présence des adhérences focales à la frontière avec la lamelle suggère d'ailleurs que leur présence ralentit le flux et favorise l'organisation parallèle des filaments, ce qui faciliterait leur assemblage (Shemesh et al., 2009). Les fibres ventrales peuvent se former par la jonction de deux fibres dorsales. Lorsque plusieurs arcs transverses fusionnent, ceux-ci sont alors capables de générer une force suffisante sur les fibres de stress dorsales qui y sont liées pour stopper la polymérisation au niveau des adhérences focales et induire leur contraction (Tojkander et al., 2015) (**Figure 21**).

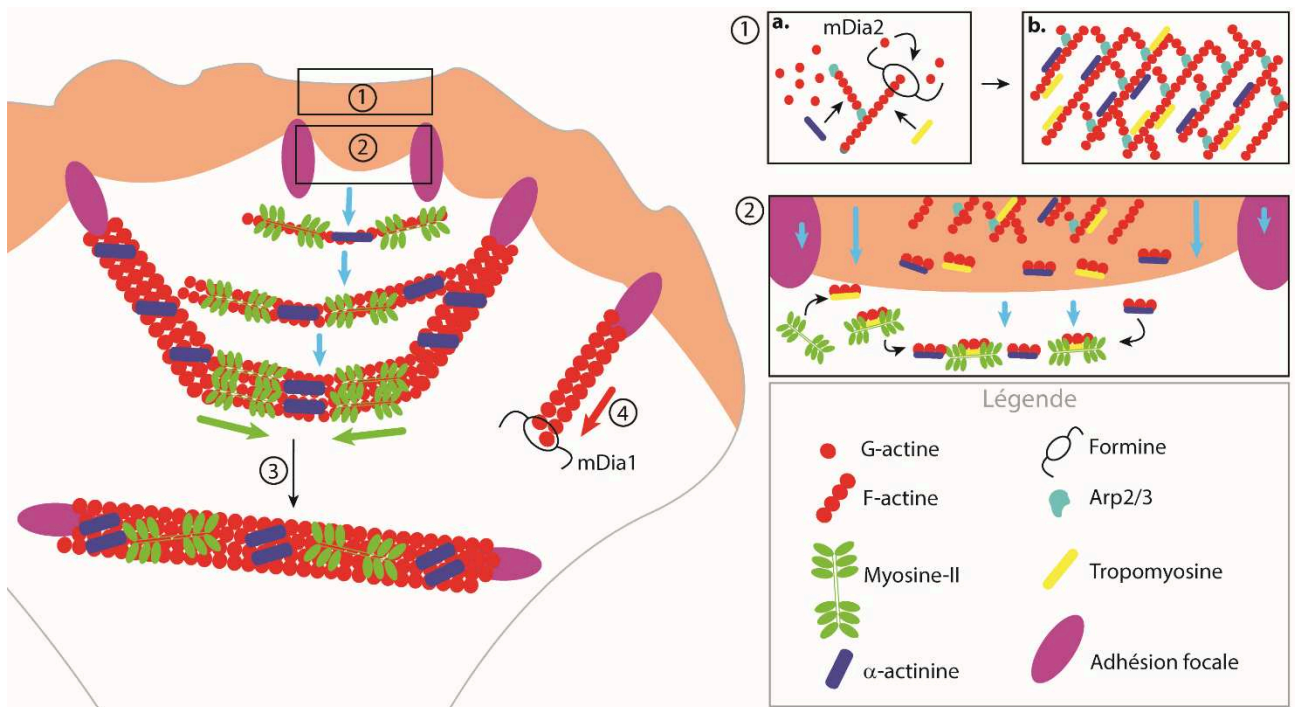


Figure 21 : Modèle de la formation des différents types de fibres de stress mDia2 et Arp2/3 polymérisent l'actine en réseau branché dans le lamellipode (1). Les filaments générés par mDia2 se couvrent de tropomyosine. À la jonction entre le lamellipode et la lamelle, les adhérences focales ralentissent le flux rétrograde (flèches bleues). La différence de vitesse créée serait responsable de la formation de minifilaments suite à la cassure du réseau d'actine branchée. Les filaments couverts de tropomyosine recrutent la myosine-II dans la lamelle et l'ensemble des filaments se joint bout à bout pour former un arc transverse (2). Lorsque plusieurs arcs s'accumulent entre deux fibres dorsales, la contraction produite par la myosine-II (flèches vertes) est suffisamment forte pour joindre les deux fibres dorsales en une fibre ventrale (3). Les fibres dorsales se forment par élancement grâce à la formine mDia1 (4). La zone orange délimite le lamellipode.

c. Organisation des fibres de stress pendant l'étalement

L'étude des fibres de stress au cours de l'étalement cellulaire a rapidement mis en évidence que ces câbles présentent une dynamique importante, qui varie au cours du processus d'étalement et dépend de l'activité de la myosine-II (Senju and Miyata, 2009; Tee et al., 2015). Suite à l'analyse systématique des fibres de stress dans des fibroblastes confinés sur des motifs circulaires de fibronectine, Tee et al. décrivent la dynamique de ces câbles par étapes. D'abord, un faisceau d'actine circulaire se forme le long de la périphérie cellulaire, puis de nombreux câbles radiaux se forment à partir des adhérences en périphérie. Ces câbles, qui correspondent à des fibres de stress dorsales, facilitent le mouvement d'arcs transverses vers le centre de la cellule. Les fibres dorsales ayant une tendance à effectuer un mouvement de rotation, possiblement dû à leur croissance par les formines couplée à l'ancrage du filament d'actine par l' α -actinine-1, celles-ci entraînent les arcs transverses à la mise en place d'une organisation chirale. La dernière étape consiste en l'alignement de l'ensemble des fibres de stress dans la cellule (Tee et al., 2015). Cette dynamique extrêmement

reproductible dans des cellules fibroblastiques n'est en revanche pas directement reproduite dans des cellules épithéliales. Les lignées épithéliales Caco-2, MDCK, MCF-7 ou HaCaT ne forment jamais ce type d'organisation des fibres de stress lorsqu'elles sont confinées sur ces motifs circulaires (Jalal et al., 2019). Seule l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse par traitement à l'EGF, ou la modification de la dynamique de l'actine par traitement avec la latrunculine-A, conduit à la réorganisation chirale des fibres de stress dans les kératinocytes (Jalal et al., 2019). Ces travaux montrent donc que la régulation de la dynamique de l'actine, ou l'effet du confinement, produit un comportement cellulaire spécifique dans les cellules épithéliales.

d. Participation à la migration cellulaire

La majorité des fibres de stress étant reliées aux adhérences focales, leur participation à la migration cellulaire a été très étudiée, dans les types cellulaires où elles sont présentes, mais le rôle exact de chaque population n'est toujours pas clairement établi à ce jour. En combinant des mesures de TFM et de la vidéomicroscopie, Oakes et al. ont ainsi montré que la présence des fibres dorsales dans la lignée U2OS était nécessaire à la stabilisation et maturation des adhérences focales mais dispensables pour la transmission de forces au substrat (Oakes et al., 2012). L'observation d'U2OS en migration par microscopie résolutive SIM a cependant conduit Burnette et al. à proposer un modèle selon lequel le flux rétrograde des arcs transverses, couplé au lien entre les fibres de stress dorsales et les adhérences focales, force l'aplatissement de la lamelle pendant la migration (Burnette et al., 2014). Il a aussi été montré que la tension générée par les fibres de stress est importante pour le remodelage de la MEC lors de la migration dans des matrices 3D (Rhee and Grinnell, 2006; Gateva et al., 2014; Owen et al., 2017).

e. Les fibres de stress comme mécanotransducteurs

Si la composition en myosine et protéines de réticulation des fibres de stress semble prédire des propriétés mécaniques différentes, ainsi qu'il a été suggéré à partir de données de TFM (Soiné et al., 2015), le travail de l'équipe Kumar l'a formellement démontré suite à l'ablation au laser de fibres de stress uniques. Leurs résultats permettent d'affirmer que ce sont les fibres ventrales qui supportent le plus de stress alors que les dorsales en subissent le moins (Lee et al., 2018). La réponse des fibres de stress à la tension est visible par leur changement de composition, par exemple le recrutement de zyxine sur les fibres en réponse à une pression exercée par AFM (Colombelli et al., 2009), mais aussi par leur réorientation qui varie suivant l'axe de tension subie par la cellule et la fréquence de l'information mécanique. Les cellules endothéliales, qui sont soumises au flux sanguin

en permanence, alignent leurs fibres de stress dans le sens du flux. Au contraire, des cellules soumises à un stress cyclique ont tendance à réorienter leurs fibres de stress dans l'axe perpendiculaire à l'axe du stress (Hayakawa et al., 2001; Niediek et al., 2012).

Les fibres de stress participent donc à la transmission de l'information mécanique de l'environnement en signal biochimique, principalement en agissant sur les protéines de signalisation présentes aux adhérences focales, mais aussi en modifiant leur propre composition et donc les propriétés mécaniques du cytosquelette (Oakes et al., 2017). L'ensemble de travaux concernant la participation des fibres de stress dans les mécanismes de réponse à l'information mécanique suggèrent que celles-ci jouent un rôle important dans les cellules épithéliales polarisées, qui en contiennent un très grand nombre (Burridge and Wittchen, 2013; Kassianidou and Kumar, 2015).

6. Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) : une molécule d'adhérence pas comme les autres ?

6.1. Structure et expression

a. Structure

EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) est une protéine transmembranaire, exprimée spécifiquement par les cellules épithéliales dans les épithéliums non-stratifiés en conditions physiologiques. Elle est composée de 314 acides aminés, répartis en un long domaine extracellulaire « EpEX » (1-265), un domaine transmembranaire (266-288) et une petite queue cytoplasmique « EpIC » (289-314, voir **Figure 22**). Les 23 premiers acides aminés constituent le peptide signal, qui est clivé lors de son envoi à la membrane plasmique. La séquence d'EpCAM montre une bonne conservation parmi les vertébrés supérieurs, avec 81% de conservation entre l'Homme et la souris (Schnell et al., 2013). De plus, EpCAM contient plusieurs sites de modification post-traductionnelle par *N*-glycosylation, qui participent à la stabilité de la protéine à la membrane plasmique (Munz et al., 2008).

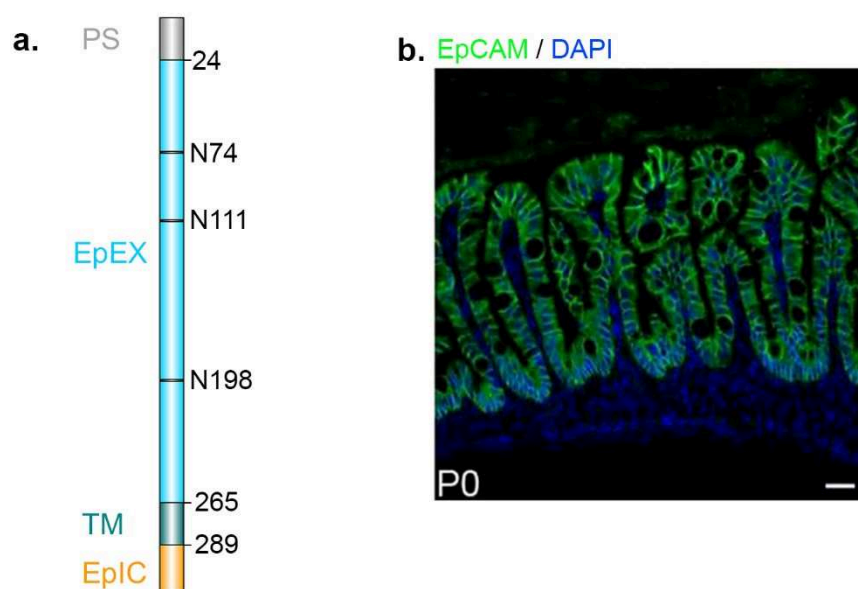


Figure 22 : Structure et localisation d'EpCAM a. EpCAM est composée d'un domaine extracellulaire (EpEX, acides aminés 24-265), un domaine transmembranaire (TM, 265-288) et un court domaine intracellulaire (EpIC, 289-314). Les sites de *N*-glycosylation sont représentés par une barre noire. PS, peptide signal. Schéma réalisé à l'aide du programme IBS (Liu et al., 2015). b. Distribution d'EpCAM dans l'intestin grêle d'une souris sauvage à P0, extrait de (Lei et al., 2012).

b. Expression en conditions physiologiques

L'expression d'EpCAM apparaît très tôt au cours du développement embryonnaire, visible dans la masse cellulaire interne et le trophoblaste de blastocystes de rat, et se maintient tout au

long du développement des épithéliums des différents organes. Chez l'adulte, EpCAM est exprimée uniquement à la membrane basolatérale des épithéliums non-stratifiés. Le côlon ainsi que l'intestin grêle présentent les plus hauts niveaux d'expression, mais EpCAM est aussi présent dans les épithéliums de l'appareil respiratoire (trachée et poumon), des appareils génitaux, et du rein.

Il a été proposé que le niveau d'expression d'EpCAM dans l'épithélium du système digestif soit corrélé avec le niveau de différenciation des cellules épithéliales, EpCAM étant encore plus exprimée au niveau des cryptes que le long de la villosité (Balzar et al., 1999). Il existe un gène homologue à *EPCAM*, nommé *TACSTD2*, avec qui *EPCAM* partage 49% d'identité de séquence. La protéine résultante TROP-2 (Trophoblast cell surface antigen 2) est exprimée dans les tissus épithéliaux mais suivant un patron d'expression différent, non corrélé à celui d'EpCAM. Par ailleurs, les deux protéines participent à des fonctions différentes et ne peuvent se substituer (Goldenberg et al., 2018).

c. Expression d'EpCAM en conditions pathologiques

Aussi connue sous le nom de Trop1 ou TACSTD1 (Tumor-associated calcium signal transducer 1), EpCAM a d'abord été identifiée comme un marqueur de surface de cellules cancéreuses lors d'un criblage à l'aide d'anticorps monoclonaux chez des souris immunisées par l'injection de cellules d'adénocarcinome colorectal (Herlyn et al., 1979). EpCAM est en effet souvent surexprimée dans les cellules cancéreuses d'origine épithéliale, et son haut niveau d'expression est associé à un mauvais pronostic de survie chez les patients atteints de cancer du sein, des ovaires ou de la vésicule biliaire. L'expression d'EpCAM est d'ailleurs toujours utilisée pour le diagnostic de tumeurs (Patriarca et al., 2012).

En plus de son rôle dans la progression tumorale, des mutations dans le gène *EPCAM* sont associées au développement du Syndrome de Lynch, syndrome prédisposant au développement du cancer colorectal HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, ou cancer colorectal héréditaire sans polypose) qui représente 3 % des cancers colorectaux. En effet, la perte des derniers exons d'*EPCAM* est responsable de la transcription continue du gène et de l'inactivation du promoteur du gène voisin *MSH2* (*MutS protein Homolog 2*, impliqué dans la réparation de mésappariements d'ADN), situé en aval sur le même chromosome (Ligtenberg et al., 2009; Lynch et al., 2015).

Enfin, la perte d'expression d'EpCAM est directement responsable du développement de la Dysplasie Epithéliale Intestinale (DEI, ou en anglais « Congenital Tufting Enteropathy, CTE »). La CTE est une maladie rare, avec une incidence estimée de 1/100 000 en Europe, et responsable d'insuffisance intestinale sévère (Goulet et al., 2007). Elle se caractérise par l'apparition d'une

diarrhée chronique dès les premières semaines de vie, rapidement létale des suites de la déshydratation et de l'incapacité d'absorption de nourriture. Aucun traitement n'est disponible actuellement, hormis une transplantation intestinale. Les patients sont donc placés sous nutrition parentérale quotidienne, une procédure lourde et sujette à complications au niveau hépatique, mais qui permet de prolonger l'espérance de vie de quelques années (soit 10 à 20 ans pour les sujets sous nutrition parentérale). Cette maladie génétique est due pour 73% des patients à la transmission autosomale récessive de mutations non-sens dans le gène *EPCAM* qui conduisent donc à l'extinction de la protéine (Sivagnanam et al., 2008; Salomon et al., 2011, 2014). Cette entéropathie est caractérisée au niveau histologique par l'accumulation d'entérocytes en touffes de cellules (ou « tufts » en anglais) le long de la villosité, donnant un aspect pseudo-stratifié hétérogène à l'épithélium dysplasique (**Figure 23**). L'effet de la perte d'EpCAM au niveau cellulaire et moléculaire dans le cas de la DEI correspond à une partie de mon projet de thèse et sera détaillé dans le chapitre 3.

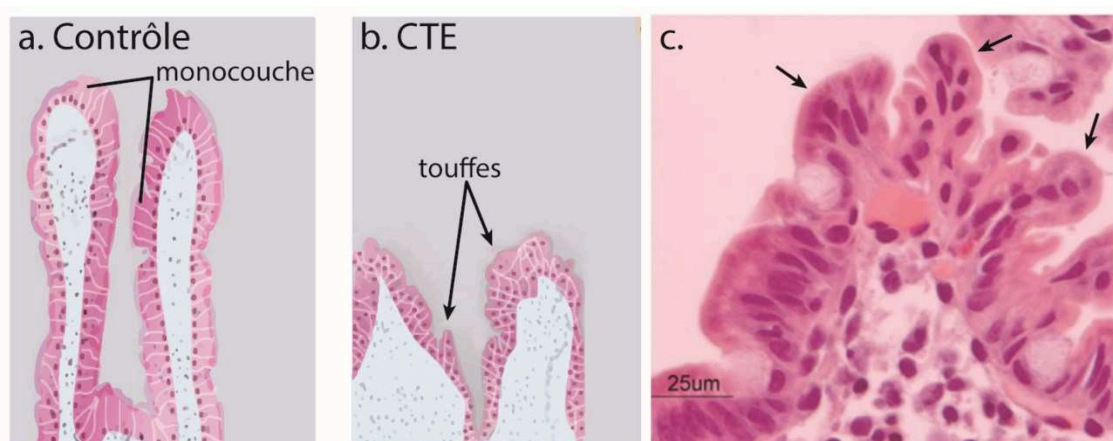


Figure 23 : Organisation de l'épithélium intestinal de patients atteints de CTE. Schémas de l'organisation d'une villosité intestinale normale (a) ou d'un patient atteint de CTE (b). c. Coloration hématoxyline-éosine d'une villosité de patient CTE où les touffes sont visibles (flèches). Adapté de (Sivagnanam et al., 2008).

6.2. EpCAM et les jonctions intercellulaires

a. Adhérence cellulaire médiée par EpCAM

Les premiers travaux concernant le rôle d'EpCAM au niveau cellulaire ont conduit à sa caractérisation comme molécule d'adhérence capable de former des jonctions cellulaires avec les cellules voisines, par liaison homotypique des domaines extracellulaires. En effet, la surexpression d'EpCAM dans des lignées de fibroblastes conduit à leur agrégation, et au tri entre les populations EpCAM-positives et EpCAM-négatives. Contrairement aux complexes formés par les cadhérines, la force d'adhérence des molécules EpCAM est indépendante de la présence de calcium (Litvinov et al.,

1994). Comparativement aux jonctions E-cadhérine, les adhérences formées par EpCAM sont cependant relativement faibles (Litvinov et al., 1997).

Bien que la fonction d'EpCAM comme molécule d'adhérence soit largement décrite dans la littérature, plusieurs études ont mis en évidence la participation d'EpCAM dans d'autres processus cellulaires (cf. partie 6.3). Enfin, l'obtention récente de la structure cristallographique d'EpEX ainsi que son analyse par diffusion des rayons X aux petits angles (ou Small Angle X-rays Scattering, SAXS) indique que le domaine extracellulaire d'EpCAM forme des *cis*-dimères mais aucun *trans*-dimère n'a été observé, ce qui limite la crédibilité de la fonction d'EpCAM comme une CAM classique (Pavšič et al., 2014; Gaber et al., 2018). De plus, la force d'adhérence entre deux domaines EpEX, mesurée par AFM, est extrêmement faible, à la limite d'un effet significatif (Tsaktanis et al., 2015). Ces récents résultats semblent donc fortement compromettre le rôle d'EpCAM comme étant une molécule d'adhérence intercellulaire *per se*.

b. EpCAM et les jonctions adhérentes

Il est rapidement apparu qu'EpCAM ne faisait pas partie des familles de CAM classiques, et qu'elle n'appartenait pas au même complexe que celui formé par la E-cadhérine. D'ailleurs, EpCAM et E-cadhérine ne co-immunoprécipitent pas dans une monocouche épithéliale polarisée (Wu et al., 2013). De plus, l'expression d'EpCAM dans des fibroblastes murins exprimant la E-cadhérine conduit à la disparition des jonctions intercellulaires, en limitant l'association d'E-cadhérine et des α - et β -caténines au cytosquelette d'actine (Balzar et al., 1998). Cet effet de l'expression d'EpCAM sur les jonctions cadhérine-dépendantes a aussi été observé dans une lignée de cellules humaines de la glande mammaire. L'expression d'EpCAM dans les cellules HBL-100 diminue la quantité d' α - et β -caténines aux jonctions, de façon PI3K-dépendante. Une co-immunoprécipitation réalisée entre EpCAM et PI3K révèle qu'EpCAM s'associerait à la sous-unité régulatrice de PI3K (Winter et al., 2007).

In vivo, chez les poissons-zèbre injectés avec un morpholino dirigé contre EpCAM, les cellules épithéliales de la couche enveloppante présentent un ralentissement des mouvements d'épibolie et une plus grande susceptibilité à l'infection, ce qui suggère également des défauts au niveau des jonctions adhérentes. De fait, la E-cadhérine ainsi que l' α - et la β -caténine sont moins recrutées aux membranes en absence d'EpCAM (Slanchev et al., 2009). De même, chez le xénope, l'extinction d'EpCAM conduit à la désintégration des embryons suite à d'importantes lésions de l'épiderme. De fait, la C-cadhérine est fortement déstabilisée des jonctions en absence d'EpCAM. Ces résultats ont aussi été validés dans la lignée Caco-2, où la déstabilisation de la E-cadhérine aux contacts cellule-cellule est observée en absence d'EpCAM (Maghzal et al., 2013).

c. EpCAM et les jonctions serrées

En 2005, Ladwein et al. ont mis en évidence par co-immunoprécipitation une interaction entre EpCAM et la Claudine-7, un composant des jonctions serrées, dans des lignées cellulaires tumorales de rat et d'adénocarcinomes humains (Ladwein et al., 2005). La même équipe a par la suite identifié que le site de liaison entre EpCAM et la Claudine-7 se trouve dans le domaine transmembranaire d'EpCAM, et que cette interaction favorise le recrutement du complexe EpCAM/Claudine-7 dans les microdomaines enrichis en tétraspanines à la membrane plasmique, induisant une signalisation anti-apoptotique et le développement de tumeurs *in vivo* (Nübel et al., 2009). Par ailleurs, leur analyse de l'adhérence intercellulaire dans des HEK transfectés avec EpCAM et la Claudine-7 indique que la formation de ce complexe empêche l'oligomérisation d'EpCAM, mais est sans conséquence sur l'adhérence des cellules entre elles. Ce résultat est aussi en accord avec l'hypothèse selon laquelle EpCAM ne serait pas, ou pas uniquement, une molécule d'adhérence cellulaire.

La création d'un modèle murin EpCAM-KO a permis de mettre en évidence un lien entre EpCAM et les Claudines *in vivo*. L'analyse des jonctions serrées dans l'épithélium de souris EpCAM-KO par microscopie électronique a révélé que celles-ci étaient désorganisées par l'absence d'EpCAM, conduisant à une augmentation de la perméabilité paracellulaire de l'épithélium. L'hybridation *in situ* de différentes Claudines suggère que cette perméabilité accrue serait due à la perte d'expression des Claudines-2, -3, -7 et -15 dans les souris mutantes EpCAM-KO (Lei et al., 2012). *In vitro*, Wu et al. ont également mis en évidence une interaction entre EpCAM et la Claudine-7, et leurs résultats indiquent qu'EpCAM protège les Claudines-7 et -1 de la dégradation et conduit à leur accumulation aux jonctions serrées. En revanche, la mesure de résistance électrique de la monocouche épithéliale réalisée dans le cadre de cette étude est contradictoire aux données obtenues *in vivo*. En effet, leur monocouches T84 et Caco-2 présentent une résistance transépithéliale plus forte après réduction de l'expression d'EpCAM (Wu et al., 2013).

6.3. Autres fonctions attribuées à EpCAM

a. Signalisation pro-proliférative

Plusieurs études ont plus récemment mis en évidence d'autres fonctions pour les différents domaines d'EpCAM. La métalloprotéase ADAM17 est responsable du clivage de EpEX, qui est relargué dans le milieu extracellulaire, puis la γ -sécrétase PS-2 clive le domaine intracellulaire. EpIC s'associe ensuite à β -caténine et FHL2, et ce complexe transloque dans le noyau pour initier la

transcription de gènes-cibles tels que *CycD1*, *cMYC*, *OCT-4*, *NANOG*, *SOX2*, et *KLF4* qui favorisent la prolifération cellulaire (Maetzel et al., 2009).

Le domaine extracellulaire d'EpCAM a quant à lui été impliqué dans la signalisation du récepteur à l'EGF (Pan et al., 2018). EpEX est capable de se lier à EGFR et induit l'activation des kinases Erk en aval, ce qui promeut la prolifération. En revanche, contrairement à l'EGF, l'activation d'EGFR par EpEX diminue l'expression de facteurs de transcription responsables de l'EMT.

b. EpCAM et la pluripotence

L'expression d'EpCAM dans les cellules souches embryonnaires humaines ou de souris est associée à l'état non-différencié (Lu et al., 2010). De plus, parmi les cibles de la signalisation Wnt induite par EpCAM se trouvent de nombreux facteurs de transcription régulant la pluripotence (Nanog, Oct4, Sox2, ...) et il a récemment été montré qu'EpCAM augmente l'efficacité de reprogrammation de MEFs en cellules-souches pluripotentes induites, voire peut se substituer à certains facteurs, tels que Sox2 et Nanog (Kuan et al., 2017). L'expression d'EpCAM est d'ailleurs utilisée pour l'identification de cellules-souches cancéreuses des cancers du poumon (Herreros-Pomares et al., 2018).

c. EpCAM et la migration cellulaire

Considérant la surexpression d'EpCAM dans un grand nombre de cancers, l'effet de sa surexpression ou de son extinction a été particulièrement analysé dans le contexte de la migration cellulaire. Les résultats sont cependant contradictoires. *In vivo*, l'extinction d'EpCAM diminue la migration de cellules dendritiques chez la souris (Gaiser et al., 2012) et limite les mouvements d'épibolie lors du développement embryonnaire du poisson-zèbre (Slanchev et al., 2009). Au contraire, la perte d'EpCAM augmente la vitesse de migration de cellules MDCK et OVCAR4 (Barth et al., 2018; Fan et al., 2015) mais n'a pas d'effet sur la migration de monocouches de cellules Caco-2 (Wu et al., 2013). De même, la surexpression d'EpCAM ne fait pas consensus. Elle conduit à une plus grande migration de cellules MCF-7 (Gao et al., 2015) mais diminue celle de la lignée d'adénocarcinome du poumon A549 (Zhang et al., 2015). L'ensemble de ces résultats suggère qu'EpCAM participe à la migration cellulaire mais son rôle exact est sûrement fortement dépendant du contexte cellulaire.

6.4. EpCAM est une protéine majeure de l'intégrité épithéliale

L'étude de plusieurs modèles animaux confirme son importance dans le maintien de l'intégrité épithéliale. Chez le xénope, la perte d'expression d'EpCAM induit l'arrêt du développement suite aux défauts de formation de l'épiderme (Maghzal et al., 2013). Les mutants de perte de fonction d'EpCAM chez le poisson-zèbre présentent une épibolie ralentie et, bien qu'ils se développent, leur épiderme est compromis (perte de cellules épithéliales, plus grande susceptibilité aux infections). Au niveau cellulaire, l'analyse des jonctions a révélé la perte d'E-cadhérine des jonctions et l'extension du complexe de jonction apical vers le pôle basal des cellules. De plus, les cellules des embryons EpCAM-KO disposent d'une capacité de protrusion réduite, avec la formation de protrusions larges mais plus courtes que celles des embryons sauvages. La ré-introduction d'E-cadhérine dans les embryons mutants ne parvenant pas à restaurer le phénotype normal, il est apparu que le mécanisme impliqué était plus complexe qu'un simple défaut d'adhérence cellulaire (Slanchev et al., 2009). Un modèle murin EpCAM-KO, établi par Guerra et al., présente également des défauts d'organisation de l'épithélium intestinal, conduisant à la mort précoce des souris nouveau-nés des suites d'une diarrhée hémorragique et de l'insuffisance intestinale, de façon similaire aux patients atteints de CTE (Guerra et al., 2012). Comme chez le poisson-zèbre, la perte de fonction d'EpCAM conduit à l'accumulation cytoplasmique d'E-cadhérine et la disparition des jonctions adhérentes.

6.5. EpCAM module la contractilité cellulaire

Le concept contre-intuitif qu'une molécule décrite comme participant à de l'adhérence intercellulaire favorise la migration, et que son extinction conduise à des défauts de l'épibolie pendant le développement du poisson-zèbre (Slanchev et al., 2009) ont conduit Maghzal et al. à analyser plus en détail le rôle d'EpCAM dans ce processus. Ils ont validé l'effet de la perte d'expression d'EpCAM sur l'épibolie du modèle xénope, dont le développement est arrêté par de nombreuses lésions de l'épiderme lors de l'utilisation de morpholinos anti-EpCAM (EpCAM-MO) (Maghzal et al., 2013). En utilisant des explants d'ectoderme pour étudier la fonction d'EpCAM au niveau cellulaire, ils ont ainsi mis en évidence que la perte d'intégrité de l'épiderme chez le xénope est due à une plus forte contractilité cellulaire induite par la signalisation dépendant de nPKC et conduisant à l'internalisation de C-cadhérine. L'augmentation de la contractilité (par le niveau de MRLC phosphorylée) ainsi que la suractivation de la voie Erk ont aussi été validées dans la lignée Caco-2. L'impact d'EpCAM sur la contractilité cellulaire semble donc clair. Cependant, la voie de signalisation Erk n'est sûrement pas l'unique mécanisme impliqué puisque l'utilisation d'un

dominant négatif de RhoA (dnRhoA), ou un traitement Y-27632, sont également capables de restaurer un phénotype normal dans les explants EpCAM-MO. Etant donné les nombreux rétrocontrôles présents dans la régulation de la contractilité cellulaire, le mécanisme moléculaire reliant EpCAM à la contractilité mérite donc d'être plus finement analysé.

Chapitre 2 – Projet de thèse

En synthétisant l'ensemble des travaux concernant la fonction d'EpCAM, il apparaît que cette protéine participe à de nombreux processus cellulaires dans les épithéliums (adhérence intercellulaire, migration, prolifération, ...). La majorité de ces résultats ayant été obtenus dans des systèmes différents, il est prévisible d'observer des variations entre les études de différentes équipes. Cependant la quantité de fonctions proposées tend à faire penser que soit EpCAM serait régulée de manière spécifique en fonction de l'épithélium dans lequel elle est exprimée, soit que sa fonction impacte un système qui regroupe l'ensemble des différents rôles proposés, auquel cas l'impact d'EpCAM sur le cytosquelette d'actine, tel que décrit par Maghzal et al., semble avoir le plus de sens. Mon projet de thèse consistait donc à comprendre les mécanismes d'action d'EpCAM dans des cellules épithéliales différenciées.

Chez l'Homme, la perte de fonction d'EpCAM est associée au développement de la maladie rare CTE dont les patients atteints développent une déficience intestinale aiguë associée à des diarrhées sévères. Au niveau histologique, l'absence d'EpCAM provoque une désorganisation tissulaire sévère de l'épithélium intestinal, avec la présence de lésions en touffes caractéristiques, le long de la villosité intestinale (Patey et al., 1997; Delacour et al., 2016). Toutefois au début des travaux sur la CTE, l'origine de ces défauts physiologiques et de la formation des lésions n'était pas connue. Plusieurs hypothèses pouvaient être envisagées :

- L'organisation apico-basale des cellules serait défectueuse
- L'adhérence des cellules à la lame basale serait compromise
- La migration des cellules le long de la villosité serait défectueuse
- Les cellules se multiplieraient de façon anarchique tout au long de la villosité au lieu de se diviser dans les cryptes
- Les cellules s'extruderaient anormalement le long de la villosité

Afin d'analyser les fonctions d'EpCAM au plus proche d'un contexte physiologique, le laboratoire a mis en place une collaboration avec le département de gastro-entérologie pédiatrique, dirigée par le Pr Olivier Goulet, de l'Hôpital Necker-Enfants Malades. Cela nous a permis d'analyser chez l'Homme l'effet de la perte d'EpCAM sur l'intégrité tissulaire à partir de biopsies de patients atteints de la CTE. De plus, pour avoir accès à plus de matériel et pouvoir tester des hypothèses au niveau cellulaire et moléculaire, deux lignées de cellules où l'expression d'EpCAM a été éteinte par stratégie shARN ont été établies, à partir de la lignée Caco-2. Cette lignée a été particulièrement choisie car il s'agit de cellules humaines d'adénocarcinome colique dont le phénotype cancéreux est très faible et qui, par ailleurs, présente une importante capacité de polarisation apico-basale et de formation d'une bordure en brosse représentative d'entérocytes sains.

Au cours de mon M2 et la première partie de ma thèse j'ai donc cherché à caractériser les conséquences de la perte d'EpCAM pour valider l'une des hypothèses de travail, et décrire en détail le mécanisme moléculaire dont EpCAM est responsable dans les cellules épithéliales.

Sur les biopsies de patients, la lame basale ne présentait pas de défauts structurels évidents ; en revanche il est vite apparu que l'architecture de la bordure en brosse était gravement affectée. Par conséquent, nous avons orienté nos premières analyses sur l'étude de la polarité apico-basale des cellules épithéliales différenciées. Ceci nous a permis de mettre en évidence que la perte d'EpCAM induit un défaut de distribution et d'activité de la contractilité cellulaire, responsable de la perte de polarité apico-basale d'entérocytes en monocouche. Ce travail est présenté dans le chapitre 3 (p. 67) et a été publié en 2017, dans un article où je suis co-premier auteur. De plus, ce travail a fait l'objet d'une revue publiée dans Médecine/Sciences en 2017, pour laquelle je suis premier auteur, disponible en annexe.

Les résultats de notre première étude laissaient supposer une action d'EpCAM sur le réseau d'actomyosine de façon plus générale, et interroge sur les autres processus dépendants de ce système. EpCAM régule-t-elle la contractilité cellulaire dans le contexte de l'adhérence au substrat et de la migration des cellules épithéliales ? Dans la seconde partie de ma thèse, je me suis donc concentrée sur cette question. J'ai d'abord montré la présence de défauts d'adhérence au substrat et de migration des cellules épithéliales en absence d'EpCAM. De façon surprenante, ces défauts sont observables aussi bien en monocouche qu'en cellule unique. L'impact d'EpCAM sur un système où aucun contact cellulaire n'est présent était, à ce moment-là, inattendu et permettrait de valider de façon claire et définitive qu'EpCAM n'est pas, ou pas uniquement, une molécule d'adhérence intercellulaire. J'ai donc poursuivi l'étude de l'impact d'EpCAM sur le cytosquelette d'actine et la contractilité cellulaire en cellule unique. Ce travail m'a permis de mettre en évidence qu'EpCAM est requise pour la régulation de l'actomyosine, par la modulation du turnover de RhoA au cortex des cellules épithéliales. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre 4, ils sont actuellement en cours de rédaction pour soumission d'un article dans lequel je serai premier auteur.

**Chapitre 3 – EpCAM conditionne l'organisation du domaine
apical de l'entérocyte en modulant la contractilité cellulaire :
conséquences sur l'architecture et la physiologie de
l'épithélium intestinal**

1. Présentation des résultats

Bien que la CTE ait été décrite pour la première fois au milieu des années 90 (Reifen et al., 1994; Goulet et al., 1995), la première description de mutations à l'origine de la maladie n'a été apportée qu'en 2008 (Sivagnanam et al., 2008). La corrélation entre données cliniques et analyse génétique n'a été établie qu'en 2014 (Salomon et al., 2014). Les maladies rares responsables d'atrophie microvillositaire sont raisonnablement décrites du point de vue clinique et histologique, mais très peu d'entre elles ont été étudiées dans le champ de recherche de la biologie cellulaire. Le mécanisme le plus détaillé concerne le développement de la maladie des inclusions microvillositaires (MVID), une maladie rare apparentée à la CTE (Delacour et al., 2016). Des mutations dans le gène *MYO5B*, responsables de la perte d'expression de la myosine non-conventionnelle 5b, conduisent à l'adressage incorrect des protéines apicales au niveau de la bordure en brosse (Roland et al., 2011). Au début de ma thèse, aucune donnée alors disponible ne permettait d'expliquer les défauts induits par la perte d'EpCAM sur l'organisation épithéliale et la fonctionnalité des entérocytes chez les patients atteints de CTE. Nous avons donc débuté cette étude par une analyse fine des biopsies de patients mutés pour *EPCAM*.

Grâce aux connaissances et à l'expertise apportées par le Dr Julie Salomon, spécialisée en gastro-entérologie pédiatrique, qui réalisait sa thèse pendant mon M2, et aux compétences de notre laboratoire en biologie cellulaire et techniques de microscopie, nous avons pu décrire les mécanismes cellulaires impliqués et les relier aux observations histologiques de la CTE. L'utilisation de techniques d'analyses et de microscopie pointues (microscopie confocale, microscopie résolutive SIM ou microscopie électronique à balayage) ainsi que des techniques de microfabrication développées dans le laboratoire, nous a permis de mettre en évidence un défaut d'organisation des entérocytes en absence d'EpCAM, d'EpCAM à la fois dans des biopsies duodénales de patients atteints de CTE et mutés pour EpCAM, et en utilisant des clones de cellules épithéliales intestinales humaines (Caco2) dans lesquels l'expression d'EpCAM est éteinte par shRNA.

Notre travail rapporte : **(i)** l'affaiblissement des jonctions adhérentes dépendantes de la E-cadhérine (**fig. 2b, d, e**), ainsi qu'il a été montré dans plusieurs modèles animaux EpCAM-KO (Slanchev et al., 2009; Maghzal et al., 2013), mais surtout **(ii)** la présence de défauts jamais détectés jusqu'à présent suite à l'absence d'EpCAM, à savoir une distorsion de la ceinture de jonctions serrées et la déformation des contacts tricellulaires (**fig. 3f-k**). Enfin, **(iii)** nous démontrons que ces défauts sont couplés à une perturbation atypique de la polarité apico-basale, associée à une atrophie microvillositaire sévère (**fig. 1f-i**).

Comme décrit précédemment (Patey et al., 1997; Goulet et al., 2007), la perte d'EpCAM conduit à l'accumulation de cellules en touffes le long des villosités chez les patients atteints de CTE (**fig. 1a, b**). L'utilisation de cellules Caco2 EpCAM-KO nous a permis de valider les défauts de distribution des protéines des jonctions et de la polarité apicale visibles sur les biopsies de patients (**fig. 1-3**), mais les monocouches de cellules en culture 2D classique ne reproduisaient pas les lésions tissulaires présentes sur les biopsies. Nous avons donc mis en place un système de culture en 3D, sur des substrats synthétiques reproduisant la géométrie des villosités intestinales. Sur ces villosités synthétiques, nos cultures EpCAM-KO formaient des touffes similaires aux lésions visibles sur les biopsies de patients (**fig. 8**). Nos résultats démontrent que l'ensemble de ces défauts, à la fois au niveau cellulaire et au niveau tissulaire, proviennent d'une dérégulation de la contractilité cellulaire produite par l'actomyosine. Une étude précédente avait déjà relié EpCAM à la contractilité cellulaire, en montrant que les mouvements d'épibolie lors du développement du poisson-zèbre étaient contrôlés par l'inhibition des PKCs dont la voie de signalisation en aval favorisait la phosphorylation de la myosine-II (Maghzal et al., 2013). Nos résultats soulignent non seulement l'importance du niveau d'activité de la myosine-II mais surtout l'impact de la distribution de cette activité. En effet, les cellules EpCAM-KO présentent une contractilité globale réduite comparativement aux cellules contrôles (**fig. 5g, h**), mais c'est l'accumulation de l'actomyosine aux points de contacts tricellulaires, et donc la suractivité contractile localisée (**fig. 5i-q**), qui est responsable de la redistribution du domaine apical en 2D (**fig. 6**), et de la formation des touffes en 3D (**fig. 9**). Ce travail met aussi en exergue l'effet de la géométrie du tissu sur la répartition des forces générées par l'actomyosine, et les conséquences qui en découlent suite aux dérégulations du cytosquelette dans un contexte pathologique (**fig. 7 et 8**). L'ensemble de ces résultats, et le mécanisme qui s'en dégage, est synthétisé sous forme de schéma en **fig. 10**.

Ce travail a donné lieu à une publication, que je vous présente ici.

2. Contractile forces at tricellular contacts modulate epithelial organization and monolayer integrity

ARTICLE

Received 10 Oct 2016 | Accepted 17 Nov 2016 | Published 13 Jan 2017

DOI: 10.1038/ncomms13998

OPEN

Contractile forces at tricellular contacts modulate epithelial organization and monolayer integrity

Julie Salomon^{1,2,*}, Cécile Gaston^{1,*}, Jérémy Magescas^{1,*}, Boris Duvauchelle³, Danielle Canioni⁴, Lucie Sengmanivong⁵, Adeline Mayeux¹, Grégoire Michaux⁶, Florence Campeotto^{2,7}, Julie Lemale⁸, Jérôme Viala⁹, Françoise Poirier³, Nicolas Minc¹⁰, Jacques Schmitz², Nicole Brousse⁴, Benoit Ladoux^{1,11}, Olivier Goulet² & Delphine Delacour¹

Monolayered epithelia are composed of tight cell assemblies that ensure polarized exchanges. EpCAM, an unconventional epithelial-specific cell adhesion molecule, is assumed to modulate epithelial morphogenesis in animal models, but little is known regarding its cellular functions. Inspired by the characterization of cellular defects in a rare EpCAM-related human intestinal disease, we find that the absence of EpCAM in enterocytes results in an aberrant apical domain. In the course of this pathological state, apical translocation towards tricellular contacts (TCs) occurs with striking tight junction belt displacement. These unusual cell organization and intestinal tissue defects are driven by the loss of actomyosin network homeostasis and contractile activity clustering at TCs, yet is reversed by myosin-II inhibitor treatment. This study reveals that adequate distribution of cortical tension is crucial for individual cell organization, but also for epithelial monolayer maintenance. Our data suggest that EpCAM modulation protects against epithelial dysplasia and stabilizes human tissue architecture.

¹Cell Adhesion and Mechanics, Institut Jacques Monod, CNRS UMR7592, Paris Diderot University, 75205 Paris, France. ²Department of Paediatric Gastroenterology, Hôpital Necker-Enfants Malades, Sorbonne Paris Cité, 75015 Paris, France. ³Morphogenesis, Homeostasis and Pathologies, Institut Jacques Monod, CNRS UMR7592, Paris Diderot University, 75013 Paris, France. ⁴Department of Paediatric Anatomic-Pathology, Hôpital Necker-Enfants Malades, Sorbonne Paris Cité, 75015 Paris, France. ⁵Membrane Dynamics and Mechanics of Intracellular Signaling Laboratory, Institut Curie-Centre de Recherche, PSL Research University, 75005 Paris, France. ⁶Institut de Génétique et Développement de Rennes, CNRS UMR6290, 35000 Rennes, France. ⁷Laboratoire de Microbiologie EA 4065, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, 75005 Paris, France. ⁸Department of Pediatric Nutrition and Gastroenterology, Armand-Trousseau Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Pierre et Marie Curie University, 75012 Paris, France. ⁹Department of Pediatric Gastroenterology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Robert Debré Hospital, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR843, 75019 Paris, France. ¹⁰Cellular Spatial Organization, Institut Jacques Monod, CNRS UMR7592, Paris Diderot University, 75205 Paris, France. ¹¹Mechanobiology Institute, National University of Singapore, Singapore 117411, Singapore. * These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.D. (email: delphine.delacour@ijm.fr).

Constitutional dysmorphology of enterocytes leads to rare human congenital enteropathies. The MicroVillous Inclusion Disease (MVID) and the less studied Congenital Tufting Enteropathy (CTE) have both the common characteristic of being responsible for chronic diarrhoea, persistent during digestive rest and exacerbated by food uptake. MVID and CTE diseases are distinct from inflammatory bowel diseases, such as Crohn disease or autoimmune enteropathy that results from immune dysregulation^{1–3}.

The CTE (MIM #613217), alternatively named intestinal epithelial dysplasia, leads to intestinal insufficiency soon after birth. No curative treatment is available, and the pathology is rapidly lethal unless palliative care, namely daily parenteral nutrition (that is, intravenous feeding, bypassing eating and digestion processes)^{1,2}. CTE has an incidence estimated to 1/50,000–100,000 in Western Europe⁴. CTE intestinal epithelium displays unique morphological abnormalities, materialized by formation of aberrant focal stacks of pseudo-multilayered enterocytes on the villus, named ‘tufts’⁵ (Fig. 1a,b). At late stages, tufts can affect up to 70% of the villi^{1,5}. CTE disease has been associated with pathogenic loss of function mutations of the *EPCAM* gene in 73% of the patients^{3,6,7}.

EpCAM (Epithelial-Cell Adhesion Molecule) is a transmembrane glycoprotein that is expressed in various epithelia. Often used as an epithelial cancer marker in clinical studies, it has been primarily described as an unconventional Ca^{2+} -independent homophilic CAM protein^{8,9}, but clear molecular mechanisms for how EpCAM may regulate epithelium architecture are still lacking. Diverse models of EpCAM signalling functions have been proposed. The best characterized function of EpCAM concerns cell proliferation. Gires and colleagues¹⁰ showed that proteolytic cleaved intracellular fragment of EpCAM and its nuclear translocation is capable of directly modulating transcription factors. Moreover, EpCAM deprivation or overexpression has been proposed to influence bulk actin organization in epithelial thymic cells¹¹. However, precise mechanisms mediating this effect remains to be found. EpCAM has also been reported to exhibit α -actinin-binding sites⁹, but these observations have not been pursued. In addition, whether EpCAM belongs to a well-described adhesion complex or constitutes an independent adhesion complex is unknown. A functional «connection» between EpCAM and E-cadherin has been proposed, with no direct physical interaction^{12,13}. Several studies suggested a potential interplay between EpCAM and E-cadherin-based cell contact sites. Overexpression of EpCAM interferes with E-cadherin-based cell adhesion, and EpCAM has been considered as an antagonist of intercellular adhesion¹². Knockdown of EpCAM in Zebrafish and Xenopus epidermis caused perturbations of E-cadherin stabilization at adherens junctions (AJs)^{14,15}. Recently, EpCAM has been reported to be dispensable for direct cell–cell adhesion or cell–substrate adhesion *per se*¹⁶. Thus EpCAM functions are probably very different from what was assumed, and, importantly, no mechanism for how EpCAM deficiency may lead to enterocyte dysfunction has been proposed to date.

Here we characterize cellular defects related to EpCAM loss in CTE intestinal biopsies and in EpCAM-depleted Caco2 cells. We find that the absence of EpCAM causes unusual epithelial individual cell organization defects, together with perturbation of the monolayered intestinal epithelium. We show that these abnormalities stem from an inappropriate actomyosin activity at tricellular contacts (TCs), thus providing a new function for EpCAM in contractile force patterning in epithelium.

Results

EpCAM is required for intestinal brush border integrity.

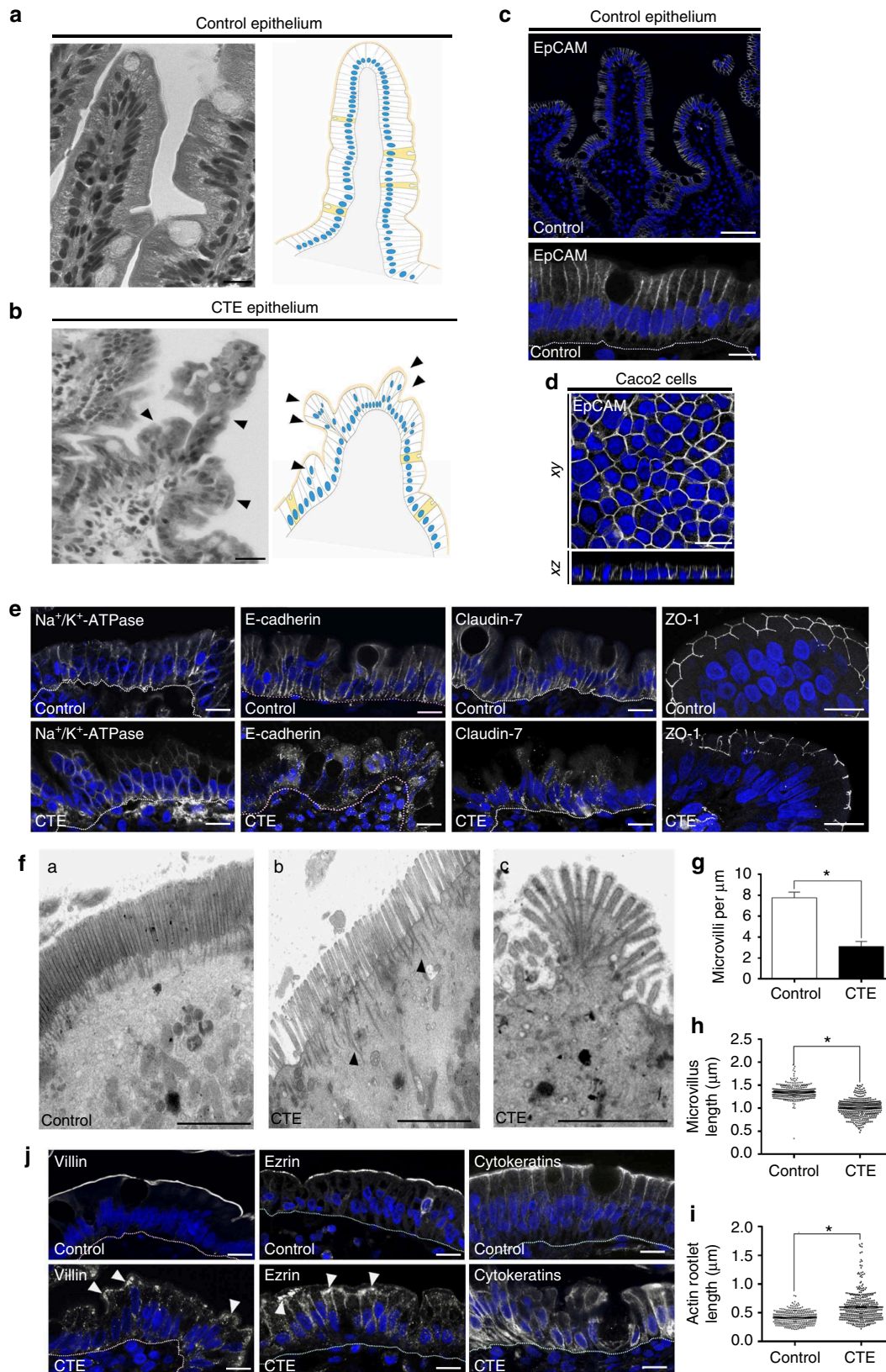
To understand EpCAM role(s), we first analysed *EPCAM* mutated CTE enterocytes. Since EpCAM is distributed at lateral membranes in human enterocytes (Fig. 1c,d), we first focused on the distribution of cell–cell adhesion complexes. While no difference was observed for the Na^+/K^+ -ATPase ionic pump (Fig. 1e), E-cadherin were barely detected at lateral membranes, but instead appeared at numerous cytoplasmic-positive compartments in *EPCAM*-mutated patients (Fig. 1e). Weakened cell–cell contacts and numerous cellular interdigitations at lateral membranes were also noticed (Supplementary Fig. 1A), indicating a loss of stability of E-cadherin-based cell adhesion complexes at CTE lateral membranes, as previously reported in the Zebrafish skin¹⁴, in *Xenopus*¹⁵ and in EpCAM mutant mice¹⁷. In addition, lateral membrane distribution of claudin-7, a component of the paracellular barrier permeability¹⁸, was impaired in CTE enterocytes (Fig. 1e), as seen in EpCAM mutant mice¹⁹. This suggests defects in barrier permeability in CTE epithelium, as previously described in EpCAM-silenced cells or EpCAM mutant mice^{19,20}. Moreover, distribution of the tight junction associated protein ZO-1 revealed that tight junction belts were present, but displayed a distorted shape in CTE cells (Fig. 1e). At apical membranes, CTE brush border exhibited microvillus rarefaction (Fig. 1f,g), variable microvillous atrophy (Fig. 1f,h), as well as length increase and contraction of actin rootlets (Figs 1f(b,c) and 1i and Fig. 1f(c), respectively), resulting in a fan-like shaped brush border. Brush border structural components, such as villin and ezrin, partially disappeared from the brush border and accumulated in the terminal web area (Fig. 1j, white arrowheads). Terminal web cytoskeletal elements, such as cytokeratins, were severely displaced from the apical cortex (Fig. 1j). In addition, abnormal presence of numerous intracellular organelles was noted in the terminal web area (Supplementary Fig. 1Ba,b, white arrowheads), as well as apical plasma membrane herniations (Supplementary Fig. 1Bc, black stars). Altogether, these data show that the brush border is destructured on EpCAM loss of function in CTE intestines. As a result, the brush border-associated lactase phlorizin hydrolase became accumulated intracellularly in CTE biopsies compared with control samples (Supplementary Fig. 1C). These results show that EpCAM loss of function impairs the integrity of the entire brush border organelle and consequently the functional enterocyte terminal differentiation in human intestine. Although tight junction distribution was in favour of a conservation of the apico-basal barrier *per se* in human CTE biopsies, brush border components were massively relocated at lateral membranes in CTE biopsies (Fig. 1j), suggesting that epithelial organization was affected in an unusual manner. These data suggest that EpCAM plays a major role in maintaining epithelial integrity.

EpCAM silencing causes apical domain expansion at TCs.

To further study EpCAM cellular function(s), we generated stable human Caco2 clones silenced for EpCAM (Fig. 2a; Supplementary Fig. 2A–B). We first analysed cell–cell adhesion complexes. E-cadherin ladder-like patterns were noticed at bicellular lateral membranes (Fig. 2b), and apical AJ belt appeared punctuated in EpCAM-depleted cells (Fig. 2d,e, white arrowheads). EpCAM loss led to the presence of cell adhesion fractures at lateral membranes. To test specificity of these abnormalities, we performed rescue experiments by transfecting an EpCAM-GFP short hairpin RNA (shRNA)-resistant construct in EpCAM-depleted cells. Green fluorescent protein (GFP) construct has been used in parallel as a control (Supplementary

Fig. 3A,B). EpCAM re-expression in EpCAM-silenced cells caused the disappearance of cell adhesion fractures (Supplementary Fig. 3A,B). Moreover, E-cadherin staining revealed that honeycomb-like cell shape was lost in absence of EpCAM in epithelial cells (Fig. 2f,g), and strongly suggested

that an epithelial disequilibrium occurs within EpCAM mutated monolayers^{21,22}. In addition to E-cadherin-based defects, the expression level of claudin-7 strongly decreased (Supplementary Fig. 2A,D), and its subcellular distribution was significantly modified on EpCAM loss (Fig. 2h). These results show that



cell–cell adhesion is compromised in EpCAM-mutated cells. Nevertheless, basal polarity was not perturbed since Scribble, a component of the basolateral protein complex Scribble/Lethal Giant larvae/Disc large²³, remained laterally located in the absence of EpCAM (Fig. 2c). In conclusion, in spite of the presence of discrete adhesion fractures and cell shape changes, bona fide basolateral determination was not grossly affected.

Moreover, we tested tight junction integrity in absence of EpCAM. Tight junction belts were present at apical-sides, but appeared deformed at bicellular contacts on EpCAM silencing (Fig. 2i,j), as observed in CTE biopsies (Fig. 1e). An increase of occludin expression occurred in EpCAM-deprived cells (Supplementary Fig. 2A,C), and an intriguing enrichment of tight junction components took place at TCs (Fig. 2i,j). The tight junction belt was distorted toward basal-side at TCs, creating a regular tube (Fig. 2k). EpCAM rescue caused the disappearance of tight junction belt distortion at TCs, and restored cortical tight junction belt positioning (Supplementary Fig. 3C,D). These results show that tight junction belt positioning was severely compromised on EpCAM loss.

In parallel, we investigated apical polarity on EpCAM loss. Apical polarity players Crb3, aPKC and Par3 (ref. 23; Fig. 3a–c), and microvillous core components, such as villin and actin (Fig. 3d,e), were barely detectable at the apical domain of EpCAM-silenced cells, but instead massively relocated laterally at TCs. However, neither Par3 nor microvillous component ezrin expression was significantly perturbed on EpCAM loss (Supplementary Fig. 2A,E–F). Accordingly, with apical marker mislocalization, microvilli were formed along TC vertices (Fig. 3f). At higher resolution, tight junction and apical protein populations were not intermixed at TCs, where tight junction components rather embraced apical protein pools (Fig. 3g–k). Hence an apico-basal border protein complex did still exist in EpCAM-deprived enterocytes, but was aberrantly distorted towards atypical TC vertices with the consecutive appearance of extended apical domains (EADs). On EpCAM-GFP transfection in EpCAM-depleted cells, Par3 and villin were not anymore located at TCs and relocated at the apical membrane, showing that EADs faded away and cortical apical domain was recovered after EpCAM rescue (Supplementary Fig. 4). Altogether, these results suggest that EpCAM loss of function impairs tight junction complex and apical domain positioning, and that EpCAM is required for proper epithelial cell organization.

Loss of tricellulin does not recapitulate EpCAM silencing.

TCs have been recently described as narrow tubes at the contact of three neighbouring cells, and we wondered whether a perturbation of TCs might be responsible of EAD formation. We first tested the distribution of tricellulin, a major component of these

junctions^{24,25}. In EpCAM-silenced cells, tricellulin puncta were aberrantly displaced towards the bottom of tubes embraced by tight junction components at TCs (Fig. 4a–d), suggesting an impairment of TC positioning. This result prompted us to test a putative functional interaction between EpCAM and tricellulin. We first tested the expression level of tricellulin, and we did not observe a significant change in tricellulin amounts on EpCAM loss (Fig. 4e,f). We also analysed their interaction by immunoprecipitation followed by western blot (WB). We found that tricellulin does not co-immunoprecipitate with EpCAM, and vice versa (Fig. 4g), demonstrating that EpCAM and tricellulin may not physically interact. We next analysed cellular defects induced by tricellulin silencing (Supplementary Fig. 5A,B). While rosette formation occurred as previously reported²⁶, EpCAM and E-cadherin localization were not grossly affected (Fig. 4h,i). The same observation was made for the tight junction component occludin and the apical polarity player Crb3, although a decrease of apical signal and a slight increase of cytosolic staining could be observed in tricellulin-silenced cells (Fig. 4j,k). Moreover, villin immunostaining was less regular at the apical domain and actin became less present in microvilli, but instead enriched at lateral borders (Fig. 4l,m). Tricellulin silencing also led to massive redirection of actin cytoskeleton along lateral membranes (Fig. 4m). Importantly, no EAD was formed in absence of tricellulin (Fig. 4j,m). No significant change in the expression of the hallmark proteins we analysed was noticed after tricellulin deprivation (Supplementary Fig. 5). These results demonstrate that tricellulin silencing in Caco2 cells does not significantly affect the global organization of individual cells, but causes a perturbation of the brush border structure and a relocation of the actin network along lateral membranes. We conclude that tricellulin depletion does not mimic EpCAM loss in Caco2 cells.

Local hypercontractility occurs at TCs on EpCAM loss.

How might EpCAM act at the molecular level? The large panel of observed defects (that is, brush border contraction, tight junction belt irregularity, TC displacement, cell shape defects) converged to a possible participation of EpCAM in the cortical contractility generated at cell junctions^{27–29}. On the inner surface of lateral membranes, actin filaments are associated with E-cadherin-based cell adhesion complexes and generate most of the intracellular mechanical forces generated through their interaction with the motor proteins myosin-IIa and IIb (ref. 30). We tested if perturbation of the actomyosin activity could account for cellular defects observed in EpCAM-deprived cells. Strikingly, in EpCAM-silenced cells, we found that the homogeneous lateral distribution of myosins-IIa and -IIb was lost and that those motor isoforms were massively redirected to atypical TC vertices (Fig. 5a–d), where they covered the EADs (Fig. 5e,f). Proper

Figure 1 | Cell organization defects occur in the intestinal epithelium of CTE patients. (a,b) Histological analysis of hematoxylin–eosin stained paraffin sections of duodenal biopsies from control (a) and CTE patients (b). Scale bars, 10 μ m. For each condition, a corresponding scheme of the epithelial organization is presented. CTE intestinal epithelium displays tufts (black arrowheads). **(c,d)** Confocal microscopy analysis of EpCAM distribution in duodenal control biopsy (c) or in Caco2 cells (d). Intestinal epithelium baseline is demarcated by dotted white line (c). Scale bars, upper panel 50 μ m (c), lower panel 10 μ m (c) and 10 μ m (d). **(e)** Confocal microscopy analyses of Na⁺/K⁺-ATPase, E-cadherin, claudin-7 and ZO-1 distribution in control or CTE biopsies. $N_{\text{Control}} = 6$ biopsies, $N_{\text{CTE}} = 6$ biopsies. Scale bars, 10 μ m. **(f)** Transmission electron microscopy (TEM) ultrastructural analysis of enterocyte apical membranes in control (a) and CTE (b,c) biopsies, showing actin rootlets (black arrowheads). Scale bars, 5 μ m. $N_{\text{Control}} = 3$ biopsies, $N_{\text{CTE}} = 3$ biopsies. **(g)** Statistical analysis of microvillus density in control and CTE enterocytes. t -test, $*P < 0.0004$. **(h)** Statistical analysis of microvillus length in control and CTE enterocytes. Control(MV length) = $1.35 \pm 0.007 \mu$ m, CTE(MV length) = $1.001 \pm 0.009 \mu$ m. t -test, $*P$ -value < 0.0001 . $N_{\text{Control}} = 3$ biopsies, $n_{\text{Control}} = 352$ microvilli, $N_{\text{CTE}} = 3$ biopsies, $n_{\text{CTE}} = 400$ microvilli. **(i)** Statistical analysis of the actin rootlet length in control and CTE enterocytes. Control(length) = $0.416 \pm 0.006 \mu$ m, CTE(length) = $0.596 \pm 0.01 \mu$ m. $N_{\text{Control}} = 3$ biopsies, $n_{\text{Control}} = 309$ actin rootlets, $N_{\text{CTE}} = 3$ biopsies, $n_{\text{CTE}} = 394$ actin rootlets. t -test, $*P < 0.0001$. Values are mean \pm s.e.m. **(j)** Confocal microscopy analyses of villin, ezrin and cytokeratins distribution in control or CTE biopsy sections. $N_{\text{Control}} = 12$ biopsies, $N_{\text{CTE}} = 6$ biopsies. Scale bars, 10 μ m. Nuclei were detected by Hoechst 33342 staining (blue).

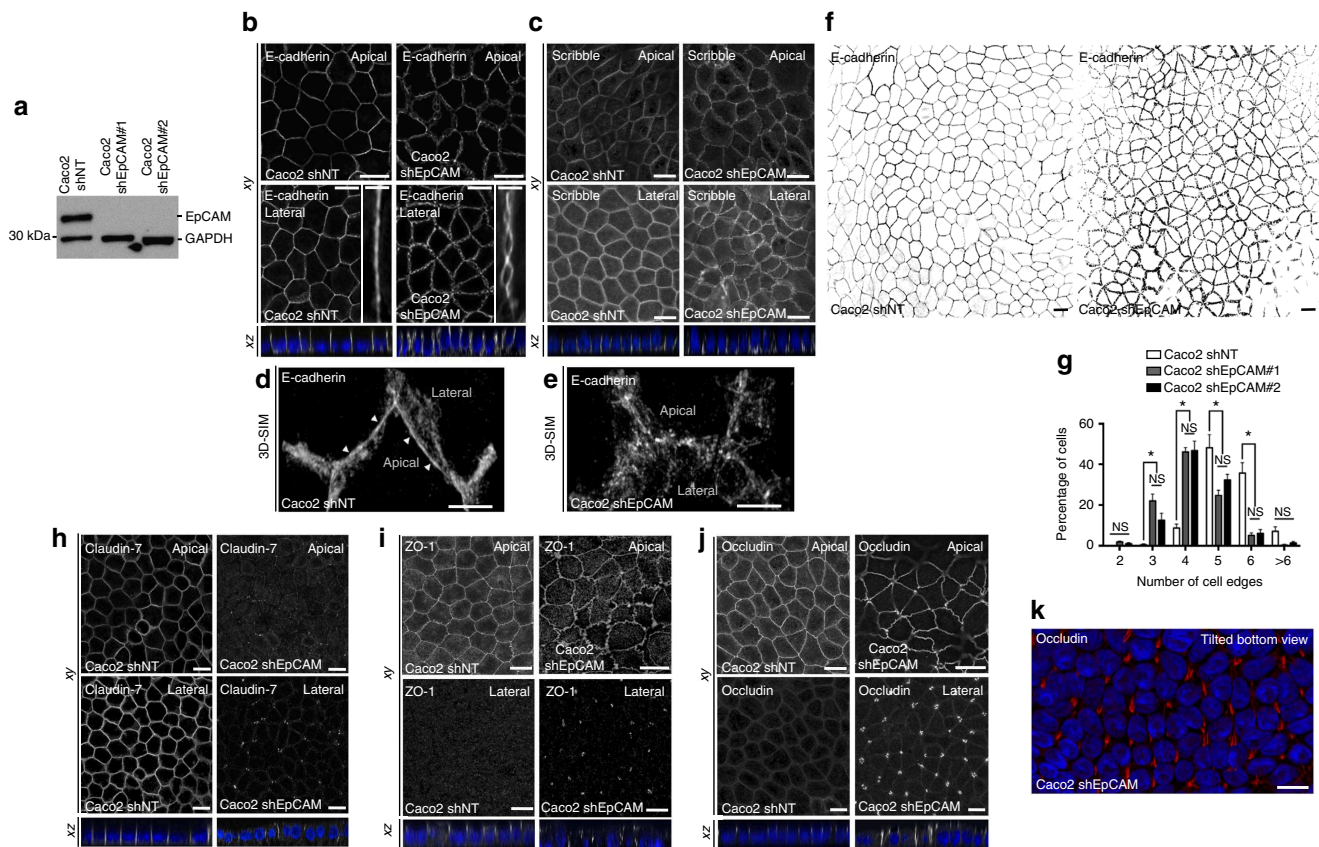


Figure 2 | EpCAM silencing leads to unusual tight junction positioning defects at tricellular junctions. (a) Western blot analysis of the EpCAM expression level in control (*Caco2 shNT*) or EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM #1* and *Caco2 shEpCAM #2*) clones. GAPDH was used as loading control. (b,c) Confocal microscopy analysis of E-cadherin (b) and Scribble (c) on the apical or lateral sides in control and EpCAM-depleted cells. Scale bars, 5 μ m. Nuclei were detected with Hoechst 33342 staining (blue). (d,e) 3D-SIM microscopy analysis of E-cadherin localization in control (d) and EpCAM-depleted (e) cells. Scale bars, 2 μ m. (f) Cell shape analysis after E-cadherin immunostaining in control or EpCAM-depleted cells. Scale bars, 5 μ m. (g), Statistical analysis of polygonal shape in control or EpCAM-depleted cells. Three independent experiments were carried out. N (*Caco2shNT*) = 517 cells, N (*Caco2shEpCAM#1*) = 550 cells, N (*Caco2shEpCAM#2*) = 427 cells. *Caco2 shNT* cells with two cell edges = 0%, three cell edges = $0.455 \pm 0.787\%$, four cell edges = $8.673 \pm 3.406\%$, five cell edges = $48.154 \pm 11.123\%$, six cell edges = $35.652 \pm 8.888\%$, more than six cell edges = $7.067 \pm 3.851\%$. *Caco2 shEpCAM#1* cells with two cell edges = $1.822 \pm 0.733\%$, three cell edges = $22.031 \pm 5.906\%$, four cell edges = $46.061 \pm 3.851\%$, five cell edges = $24.728 \pm 4.344\%$, six cell edges = $5.027 \pm 2.210\%$, more than six cell edges = $0.330 \pm 0.572\%$. *Caco2 shEpCAM#2* cells with two cell edges = $0.966 \pm 0.848\%$, three cell edges = $12.542 \pm 5.942\%$, four cell edges = $46.739 \pm 8.082\%$, five cell edges = $32.319 \pm 4.777\%$, six cell edges = $6.098 \pm 3.412\%$, more than six cell edges = $1.336 \pm 1.261\%$. Unpaired *t*-tests, * $P < 0.0001$. Values are mean \pm s.e.m. (h-j) Confocal microscopy analysis of claudin-7, ZO-1 and occludin on the apical or lateral sides in control and EpCAM-depleted cells. (k) Confocal analysis of occludin (red) location at TCs in EpCAM-depleted cells, 3D rendering of z-stacks. Tilted bottom view is presented. Scale bars, 5 μ m. Nuclei were detected with Hoechst 33342 staining (blue).

cortical and lateral localization of myosin-IIa and -IIb was restored on EpCAM rescue (Supplementary Fig. 6A–D). The ability of the relocated actomyosin to generate cell contractility in mutant cells was further probed by analysing the phosphorylation state of the myosin regulatory light chain (P-MLC2)³¹. Using both biochemical and immunofluorescence approaches, we observed that the amount of P-MLC2 was markedly reduced in absence of EpCAM (Fig. 5g–j). The same tendency was observed using an antibody directed against double-phosphorylated MLC2 (Supplementary Fig. 7). However, a local concentration of the remaining pool of P-MLC2 was observed at TCs in mutant *Caco2* cells (Fig. 5i,k). Re-expression of an EpCAM-GFP shRNA-resistant construct could restore amounts of P-MLC2 comparable to those measured in control cells (Supplementary Fig. 8A,B), and suppressed P-MLC2 accumulation at TCs (Supplementary Fig. 8C,D). Similar mislocalization and accumulation of myosin-II isoforms and P-MLC2 at TCs were observed in CTE biopsies

(Fig. 5l–q). Thus, the absence of EpCAM may lead to a local hypercontractility at TCs in epithelial cells, suggesting that the proper patterning of the actomyosin network at cell–cell contacts depends on EpCAM.

Actomyosin perturbation drives apical domain mispositioning.

To determine whether perturbation of the cell contractility pattern could be responsible for cellular defects described above, we reduced myosin-II activity in EpCAM-silenced clones using blebbistatin³². Strikingly, blebbistatin-treated EpCAM-depleted cells recovered P-MLC2 location at bicellular junctions (Fig. 6a). We next tested the presence of EADs after blebbistatin treatment at the ultrastructural level using scanning electron microscopy (SEM; Fig. 6b,d,e). Brush borders regularly appeared at the apical surface of the monolayer in dimethylsulphoxide (DMSO)-treated control cells (Fig. 6b). The apical surface of DMSO-treated EpCAM-depleted cells displayed irregular or even non-existent

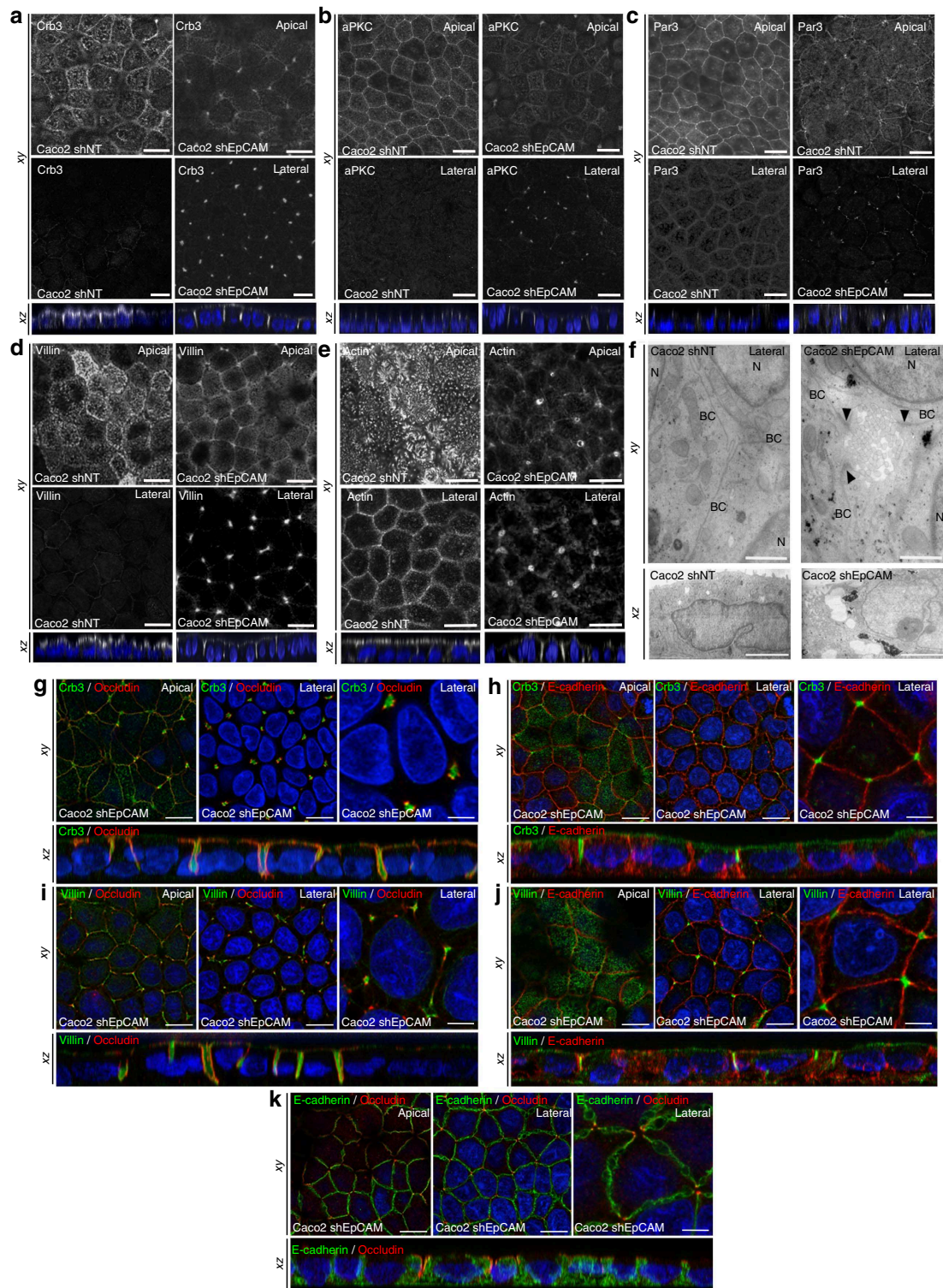


Figure 3 | Apical domain is unusually displaced at tricellular junctions through EpCAM silencing. (a–e) Confocal microscopy analysis of Crb3 (a), aPKC (b), Par3 (c), villin (d) and actin (e) on the apical or lateral sides in control (*Caco2 shNT*, left panels) and EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM*, right panels) cells. xy and xz views are presented showing the relocated apical markers at tricellular junctions. Scale bars, 5 μm . (f) TEM ultrastructural analysis of tricellular contacts in control (*Caco2 shNT*, left) and EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM*, right) cells, showing microvilli at tricellular contacts. Arrowheads point to TJs. Longitudinal (xy) and transversal views (xz) are presented. BC, bicellular contact, N, nucleus. Scale bars xy, 1 μm and xz, 2 μm . (g–k) Confocal microscopy analysis of double immunostainings for Crb3 (green) and occluding (red) (g), Crb3 (green) and E-cadherin (red) (h), villin (green) and occluding (red) (i), villin (green) and E-cadherin (red) (j), and E-cadherin (green) and occluding (red) (k) on the apical or lateral sides in EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM*) cells. xy and xz views are presented. Scale bars, 5 μm ; high magnifications, 2 μm . Nuclei were detected with Hoechst 33342 staining (blue).

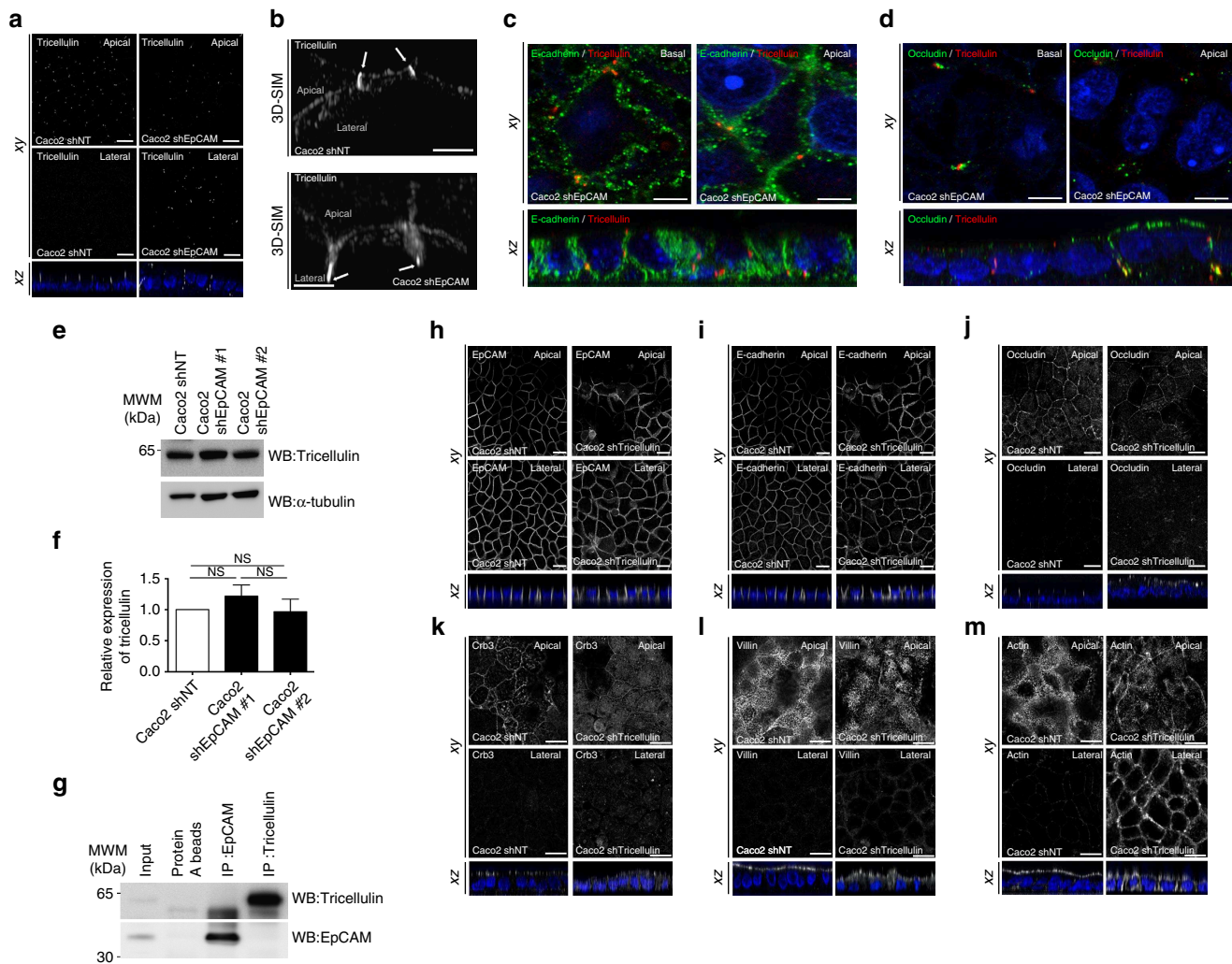


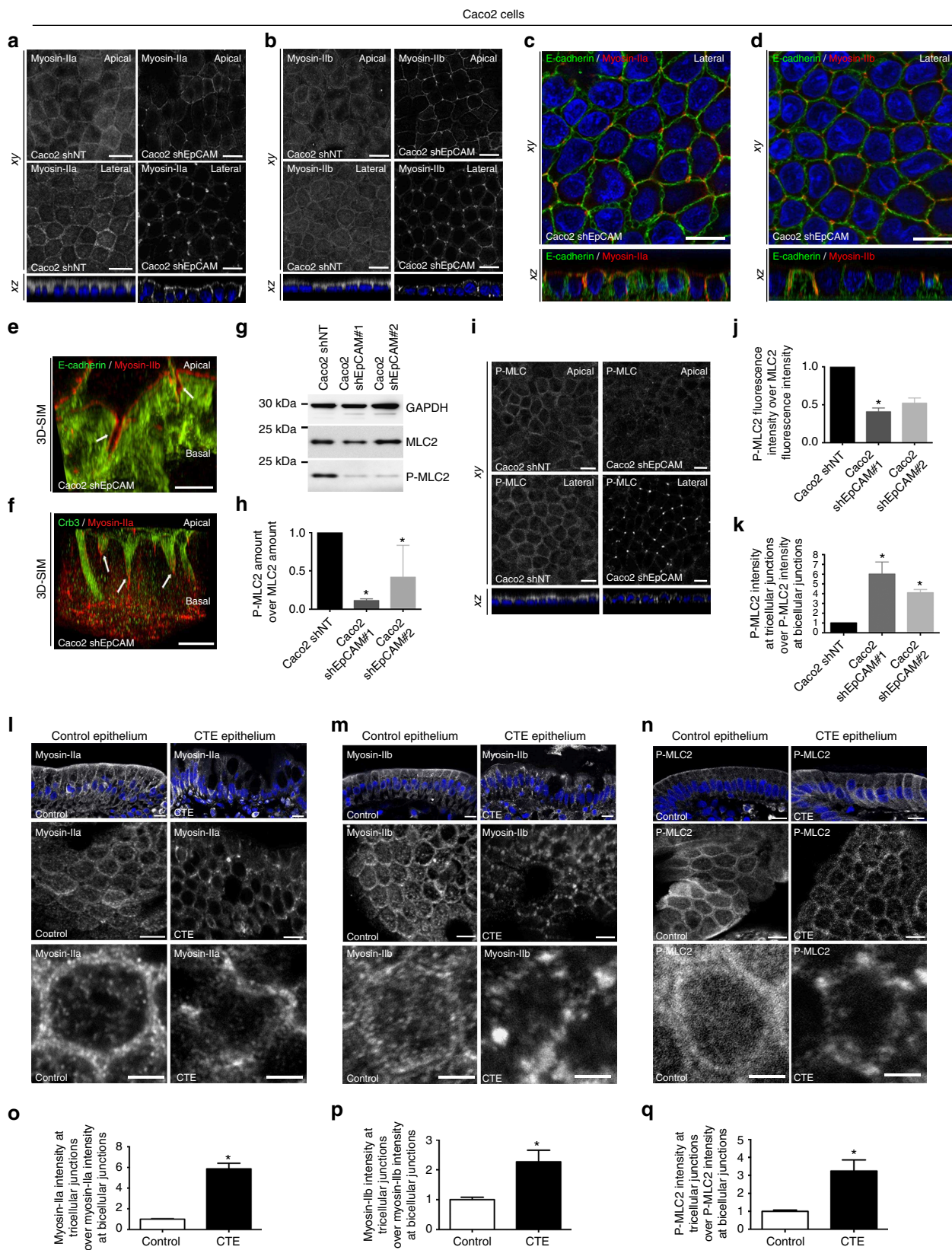
Figure 4 | Tricellulin silencing does not lead to apical domain displacement at tricellular junctions. (a) Confocal microscopy analysis of tricellulin distribution on the apical (*Apical*, upper panels) or lateral (*Lateral*, lower panels) side in control (*Caco2 shNT*, left panels) and EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM*, right panels) cells. *xy* and *xz* views are presented. Scale bars, 5 μ m. (b) 3D-SIM microscopy analysis of tricellulin localization in control (*Caco2 shNT*) and EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM*) cells. While tricellulin was focused at the most apical part of the tricellular junctions in control cells, it was instead concentrated at the bottom of aberrant tricellular junctional tubes in the absence of EpCAM (white arrows). Scale bars, 2 μ m. (c,d) Confocal microscopy analysis of double immunostainings for E-cadherin (green) and tricellulin (red) (c), occludin (green) and tricellulin (red) (d), on the basal or apical sides in EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM*) cells. *xy* and *xz* views are presented. Scale bars, 2 μ m. (e) Western blot analysis of the level of tricellulin expression in control (*Caco2 shNT*) or EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM* #1 and *Caco2 shEpCAM* #2) clones. α -tubulin was used as loading control. (f) Statistical analysis of tricellulin amounts relative to α -tubulin amounts in control (*Caco2 shNT*) or EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM* #1 and *Caco2 shEpCAM* #2) clones. The analysis was performed based on three independent experiments. Percentage of tricellulin expression in control cells = 100%, in *Caco2 shEpCAM*#1 cells = $121.8 \pm 0.18\%$, and in *Caco2 shEpCAM*#2 = $96.8 \pm 0.20\%$. Three independent experiments were used, and statistical significance was determined one-way analysis of variance and Tukey's multiple comparison tests. (g) Western blot detection of tricellulin (upper panel) or EpCAM (lower panel) after immunoprecipitation of EpCAM or tricellulin from control *Caco2* cell extracts. (h–m) Confocal microscopy analysis of EpCAM, E-cadherin, occluding, Crb3, villin and actin distribution on the apical (*Apical*, upper panels) or lateral (*Lateral*, lower panels) side in control (*Caco2 shNT*, left panels) and tricellulin-depleted (*Caco2 shTricellulin*, right panels) cells. *xy* and *xz* views are presented. Scale bars, 5 μ m. Nuclei were detected with Hoechst 33342 staining (blue).

brush border. Instead, we observed microvilli in vortex assemblies at TCs, likely EAD structures (Fig. 6b, yellow arrowheads). The particular arrangement of microvilli in EADs at TCs was further confirmed by actin staining of DMSO-treated mutant cells and three dimensional (3D) rendering of confocal *z*-stacks (Fig. 6c–d). Blebbistatin treatment caused the disappearance of EADs in EpCAM-silenced cells, and microvilli could be distinguished at the apical surface again (Fig. 6b,c,e). Furthermore, time course analysis showed that microvilli were progressively observed at cell corners under 5 and 50 μ M

blebbistatin treatment for 2 h (Fig. 6f,g, yellow arrowheads) and an impressive cortical restoration of the brush border was obtained on a 2 h treatment with 50 μ M blebbistatin (Fig. 6f). In addition, time-lapse imaging of lateral membranes on blebbistatin treatment showed that bicellular junctions arose from EADs at TCs (Fig. 6h, yellow arrowheads). Moreover, *xz* views highlighted the progressive reduction of the EADs from the basal-side to the apical-side (Fig. 6h, yellow arrowheads). These data suggest that a myosin-II-dependent inward pulling force may be produced at TCs in EpCAM-depleted cells, from

the apical-side to the basal-side, plausibly in a similar manner of what has been proposed for extruding apoptotic cells and epithelial tissue bending³³. In addition, enrichment of actomyosin and apical markers was not observed anymore at TCs after blebbistatin treatment of EpCAM-silenced cells

(Supplementary Fig. 9A–C). Brush border was partially restored at the cortical surface (Fig. 6f; Supplementary Fig. 9B). Occludin recovered a correct junctional distribution at the apical surface, in spite of a dotted pattern, possibly as a consequence of myosin inhibition (Supplementary Fig. 9D). Tricellulin was



not detected anymore at tricellular lateral membranes (Supplementary Fig. 9E). Cell adhesion fractures were not observed, and honeycomb-like cell shape was progressively restored in blebbistatin-treated EpCAM-depleted cells (Supplementary Fig. 9F,G). These data show that the translocation of the apical compartment and EAD formation result from excessive contractile activity at TCs and consecutive shrinking of bicellular junctions on EpCAM loss.

Actomyosin disorganization causes loss of monolayered state.

At the tissue level, modifications of the contractile properties at TCs in the absence of EpCAM may be at the origin of the development of tufts in CTE patients. Since tuft-like structures were not visualized in conventional two-dimensional (2D) cultures, we hypothesized that this may be attributed to the topological properties of the cell environments. Along this line, we first tested 3D Matrigel cultures. Under such conditions, classical cyst organization was disrupted in EpCAM-silenced cells, with increased amounts of multi-layered, unshaped and/or multiluminal cysts (Fig. 7a). Moreover, weakening of E-cadherin-based cell adhesion was highlighted by adhesion fractures (Fig. 7b(b,c)), as well as enrichment of lateral E-cadherin at basal sides (Fig. 7b(d), white arrowheads). Supranumerous lumens contained the microvillous components actin and ezrin, as well as the apical polarity player Crb3 (Fig. 7c–e). Interestingly, we observed E-cadherin enrichments at the most basal part of the lateral membranes (Fig. 7b(d)), as well as ectopic appearance of apical hallmarks along basal membranes (Fig. 7c–e, white arrowheads). Global apico-basal polarity was thus compromised in mutant cells, with the appearance of inverted polarity cysts (Fig. 7a). Moreover, double immunostainings for villin and ZO-1, or E-cadherin and ezrin revealed that apical domain engulfments took place from central lumens in absence of EpCAM (Fig. 7f,g). Even though these data demonstrate that collective epithelial organization in 3D is impaired on EpCAM loss of function, tuft-like structures were not detected in 3D Matrigel cysts. We hypothesized that these cultures might not be appropriate to fully reproduce intestinal epithelial behaviour. We therefore used photolithography approaches to generate 3D elastomeric substrates that mimic villous physical constraints³⁴ (Fig. 8a–c). When grown on synthetic villi, control cells formed regular monolayers (Fig. 8d,e). In contrast, EpCAM-depleted cells displayed frequent tuft-like structures (Fig. 8d,e). Moreover, the absence of EpCAM caused a drastic perturbation of hallmark proteins controlling epithelial organization, including Par3, villin,

actin, E-cadherin and occludin, with the frequent appearance of apical domains engulfments (Fig. 8f, yellow arrows). These results demonstrate that EpCAM-depleted cells cultured on 3D synthetic villi can phenocopy CTE cellular and tissue defects. Remarkably, treatment with the cell contractility inhibitor blebbistatin caused the concomitant disappearance of tuft-like structures and recovery of a polarized monolayer undistinguishable from controls (Fig. 9a). This result demonstrates that local hyperactivation of the contractile apparatus was at the origin of the tuft formation.

Finally, we asked why the defects of the contractile apparatus were materialized by tuft formation in 3D synthetic villus cultures, but not in 2D cultures nor in 3D Matrigel cultures. One explanation could be the differences of epithelial topology in these cell culture systems. Indeed, apical-sides are located outside in 3D synthetic villi, but inside in 3D Matrigel cultures. To test this point, we performed hanging drop cultures to generate spheroids where apical-sides are outside³⁵. Whereas regular spheroids were formed in 97% of control cells, 97% of the spheroids were irregularly shaped and displayed tuft-like cell assemblies on the apical-side in the absence of EpCAM (Supplementary Fig. 10). These data show that an epithelial topology with the apical-side outside may favour tuft formation in EpCAM-mutated cells. Another explanation came from the analysis of the contractile network in the different culture systems. In 3D synthetic villi, myosin-IIa, -IIb and P-MLC2 are mainly located at the apical-side (Fig. 9b–d), as they are in 2D cultures and in human intestines (Fig. 5a,b,i,l–n, respectively). In contrast, in 3D Matrigel cultures, the contractile network is located at the basal-side facing the Matrigel, with only a small fraction detected at the apical-side (Fig. 9b–d), as previously described³⁶. This suggests distinct functions of the contractile network in 3D morphogenesis according to the epithelial topology. While required for the overall cyst shaping in basal-side outside topologies³⁶, it may be dedicated to the apical domain maintenance in apical-side outside topologies. On EpCAM loss, the contractile apparatus was severely disturbed in 3D synthetic villi, but kept its main distribution at the basal-side in 3D Matrigel cultures (Fig. 9b–d). Although the small proportion of myosin-IIa, -IIb and P-MLC2, normally located at the apical-side, was mislocalized in absence of EpCAM. Thus, EpCAM loss impacts the cortical contractile network when located at the apical-side, but not at the basal-side. Altogether, these results demonstrate that epithelial tufts associated with EpCAM loss-of-function originate from defects in the spatial organization of the contractile properties in the

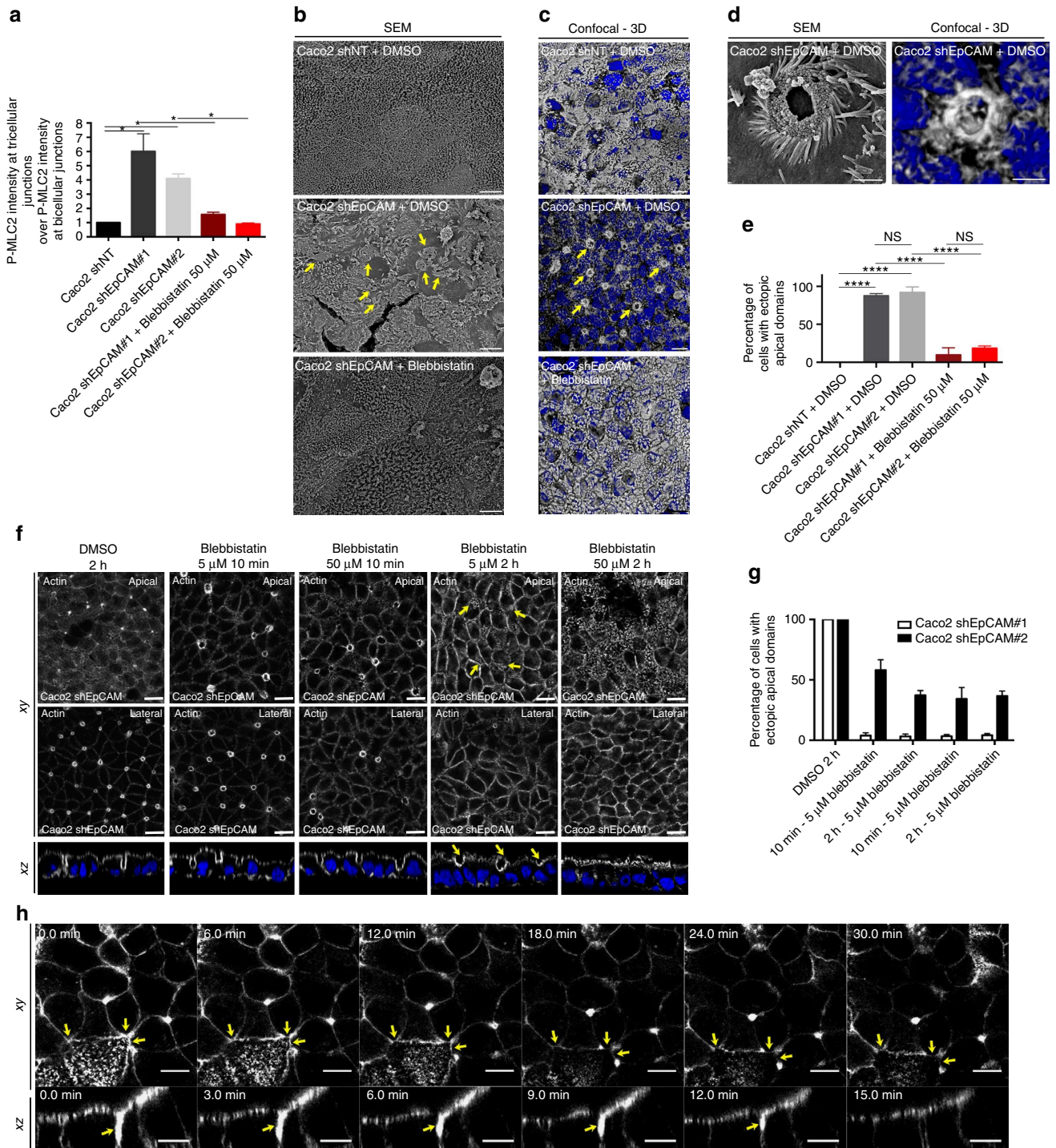
Figure 5 | Exacerbation of contractile forces at TCs on EpCAM loss. (a,b) Distribution of myosin-IIa and -IIb in control and EpCAM-depleted cells. Scale bars, 5 μ m. (c,d) Distribution of E-cadherin and myosin-IIa, or E-cadherin and myosin-IIb in EpCAM-depleted cells. Scale bars, 5 μ m. (e,f) 3D-SIM analysis of E-cadherin and myosin-IIb, or Crb3 and myosin-IIa in EpCAM-depleted cells. Scale bars, 5 μ m. (g) Western blot analysis of MLC2 and P-MLC2 amounts in control and EpCAM-depleted cells. GAPDH was used as loading control. (h) Quantification of P-MLC2 amount relative to MLC2 in control and EpCAM-depleted cells. One-way ANOVA with Dunnett's test, * $P < 0.01$. Caco2shNT = 1, Caco2shEpCAM#1 = 0.11 ± 0.2 , Caco2shEpCAM#2 = 0.42 ± 0.2 . (i) Distribution of P-MLC2 in control or EpCAM-silenced cells. Scale bars, 5 μ m. (j) Quantification of total P-MLC2 immunofluorescence intensity relative to MLC2 immunofluorescence intensity in control or EpCAM-depleted cells. One-way analysis of variance test with Dunnett's test, * $P = 0.007$, ** $P = 0.002$. $n_{(\text{Caco2shNT})} = 30$ cells, $n_{(\text{Caco2shEpCAM\#1})} = 30$, $n_{(\text{Caco2shEpCAM\#2})} = 30$. Caco2shNT = 1, Caco2shEpCAM#1 = 0.4 ± 0.05 , Caco2shEpCAM#2 = 0.52 ± 0.07 . (k) Quantification of P-MLC2 immunofluorescence intensity at TCs relative to immunofluorescence intensity at bicellular junctions (BJs) in control or EpCAM-depleted cells. One-way analysis of variance with unpaired t -test, * $P = 0.0001$. $n_{(\text{Caco2shNT})} = 30$ cells, $n_{(\text{Caco2shEpCAM\#1})} = 28$, $n_{(\text{Caco2shEpCAM\#2})} = 30$. Caco2shNT = 1, Caco2shEpCAM#1 = 6.01 ± 1.24 , Caco2shEpCAM#2 = 4.1 ± 0.33 . (l–n) Distribution of myosin-IIa, -IIb and P-MLC2 in control or CTE biopsies. Scale bars, 5 μ m. $N_{(\text{Control})} = 3$ biopsies, $N_{(\text{CTE})} = 3$. (o–q) Quantification of myosin-IIa, -IIb or P-MLC2 immunofluorescence intensity at TCs relative to immunofluorescence intensity at BJs in control or CTE biopsies. $N_{(\text{Control})} = 3$ biopsies, $N_{(\text{CTE})} = 3$. Unpaired t -test, (o) * $P < 0.0001$, (p) * $P = 0.0062$, (q) * $P = 0.0016$. $n_{(\text{Control myosin-IIa})} = 37$ cells, $n_{(\text{CTE myosin-IIa})} = 29$, $n_{(\text{Control myosin-IIb})} = 14$, $n_{(\text{CTE myosin-IIb})} = 14$, $n_{(\text{Control P-MLC2})} = 15$, $n_{(\text{CTE P-MLC2})} = 21$. Myosin-IIa_(Control) = 1 ± 0.04 , myosin-IIa_(CTE) = 5.86 ± 0.54 , myosin-IIb_(Control) = 1 ± 0.08 , myosin-IIb_(CTE) = 2.27 ± 0.39 , P-MLC2_(Control) = 1 ± 0.07 , P-MLC2_(CTE) = 3.25 ± 0.62 . For quantification, three independent replicates have been performed. Values are mean \pm s.e.m. Nuclei were stained with Hoechst 33342.

monolayer, and result in perturbation of cellular arrangements that emerge only in the particular 3D intestinal tissue environment.

Discussion

Mechanical modulation of an epithelial layer has been reported to ensure cell adhesion, cell migration and more recently epithelial homeostasis^{37–40}. A direct correlation between cell contractility and front-to-back polarity in migrating cells has been shown⁴¹, highlighting a close relationship between polarity determinants and actomyosin activity. In *Drosophila*,

deprivation of PTEN, a polarity master regulator in epithelia, caused defects in polygonal cell shape and heterogeneous distribution of the actomyosin apparatus, similarly to EpCAM silencing. However, no connection was made with the state of apico-basal epithelial organization at that time⁴². To our knowledge, few reports made a link between spatial regulation of epithelial contractile properties and apico-basal organization. Takeichi and colleagues⁴³ showed that Par3 inhibits ROCK by recruiting aPKC and Par6 to the zonula adherens. In addition, aPKC inhibits the junctional actin assembly through the action of Lulu2 (refs 44,45).



Importantly, our study highlights an intriguing correlation between the homeostasis of the actomyosin apparatus, the cohesion of the understudied TCs and apico-basal organization. Actomyosin clustering and excess of cortical forces at TCs generates local deformation of tight junctions and displacement of tricellular proteins, which are easily reversed on myosin activity inhibition, thus showing an unexpected plasticity of these particular junctions. To date, very few studies analysed the importance of TCs in epithelial organization^{26,46,47}. Notably, Furuse and colleagues demonstrated instability of tight junction belt and actomyosin network under tricellulin silencing²⁶. Because of the specific formation of EADs at TCs (Fig. 3) and tricellulin displacement after EpCAM removal (Fig. 4a–d), it would have been tempting to functionally connect EpCAM and tricellulin. However, EpCAM and tricellulin do not appear to physically interact (Fig. 4g), and neither apical-to-basal distortion of the tight junction belt nor EAD formation was observed in tricellulin-silenced cells in our hands (Fig. 4h–m). Tricellulin displacement at TCs could passively follow the tight junction distortion, since tricellulin interacts with the Cdc42 GEF Tuba, a ZO-1-binding protein⁴⁸.

Expansion of apical membrane and ectopic appearance of the brush border at TCs in EpCAM-mutated cells explain chronic intestinal absorption incapacity and pathological diarrhoea in CTE patients. The marked perturbation of the brush border absorptive structure on EpCAM silencing clearly explains the constitutional inability of CTE patients to absorb any luminal nutrients. Concomitantly, defective cell–cell interactions occur in EpCAM-mutated enterocytes. A decrease of transepithelial resistance has been demonstrated in EpCAM-silenced human intestinal T84 cells and EpCAM mutant mice^{19,20}. Our analyses show weakened E-cadherin-based cell–cell adhesion, with the appearance of cell adhesion fractures (Fig. 1e; Supplementary Fig. 1A; Fig. 2b,d,e). In addition, claudin-7 mislocalization to TCs and expression level decrease occurs in EpCAM-depleted cells (Figs 1e and 2h, Supplementary Fig. 2) and EpCAM mutant mice, as previously reported¹⁹. Claudin-7 association with tight junctions remains controversial¹⁸, but claudin-7 loss causes incorrect paracellular barrier permeability^{49,50}. Moreover, the apical-to-basal distortion of tight junctions at tricellular corners and TC mislocalization strongly suggest that tight junction belt integrity may be compromised. Accordingly, freeze-fracture electron microscopy analyses revealed less-organized tight junction strands in the intestinal epithelium of EpCAM mutant mice¹⁹. Epithelial permeability induced by this large panel of cell adhesion abnormalities could well explain

the occurrence of continuous liquid leaks that correspond clinically to chronic diarrhea persisting at bowel rest in CTE patients⁴. Nevertheless, such barrier defects would also be expected to favour an increased mucosal inflammation in response to permeability to pathogens. Conversely, though very low inflammation has been described in a few early human intestinal biopsies, epithelial inflammation is far from being part of the histological characteristics observed in CTE patients. Filling of intercellular spaces with biological material such as ectopic microvilli might constitute a physical obstacle to progression of pathogens, preventing such inflammatory evolution. Altogether, epithelial and cellular defects reported in our study contribute to explain clinical symptoms observed in CTE patients.

Alteration of epithelial contractile patterning is correlated to the development of tissue lesions characteristic of a rare human congenital epithelial disorder. Tuft-like structures only appear on EpCAM-depleted synthetic villi, testifying of an enhanced mechanical stress provided by the particular topography of the monolayer substrate. We assume that different parameters may account for tuft formation: aberrant TCs, actomyosin tension distribution, epithelial organization and substrate topography (Fig. 9e). Tufts could be the result of the abnormal presence of apical domains at TCs and defective cell arrangements. Cortical forces repartition at multicellular contacts may be critical for epithelial monolayer behaviour on tissue topography, and tufts could be caused by exacerbated distortions of TCs on 3D substrates on EpCAM silencing. Moreover, in control cells cultured in 2D or 3D synthetic villus cultures, cortical tensile forces are homogeneously distributed tangentially to the tissue plane and allow for the maintenance of the monolayer cohesion⁵¹. EpCAM loss leads to a net modification of the actomyosin distribution and consequent contractile forces organization. Inward-pulling forces may now be locally generated at TCs, perpendicular to the 2D substrate plane. An epithelial instability is revealed in 3D synthetic villi. The geometry of 3D synthetic villi causes changes in the distribution of inward-pulling forces, which are now radially oriented with the substrate. Their convergence may provoke monolayer bending in 3D synthetic villi³³, and may result in cell displacement apically from the monolayer, in a similar manner to what occurs during cell extrusion^{52,53}. Tight junctions and actomyosin apparatus relocation takes place along lateral membranes during cell extrusion⁵², whereas EpCAM silencing causes their displacement solely along TCs (Fig. 2h–j; Fig. 3e). We hypothesize that EpCAM-depleted cells could undergo some form of incomplete cell extrusion and be blocked in

Figure 6 | Apical domain positioning is restored on cell contractility decrease. (a) Quantification of P-MLC2 immunofluorescence intensity at TCs relative to immunofluorescence intensity at BJs in control, EpCAM-depleted or 2h-blebbistatin-treated EpCAM-depleted cells. One-way analysis of variance with unpaired *t*-test, **P* < 0.05. $n_{(\text{Caco2shNT})} = 30$ cells, $n_{(\text{Caco2shEpCAM\#1})} = 28$, $n_{(\text{Caco2shEpCAM\#2})} = 30$, $n_{(\text{Caco2shEpCAM\#1} + \text{Blebbistatin } 50 \mu\text{M})} = 31$, $n_{(\text{Caco2shEpCAM\#2} + \text{Blebbistatin } 50 \mu\text{M})} = 30$. $\text{Caco2shNT} = 1$, $\text{Caco2shEpCAM\#1} = 6.01 \pm 1.24$, $\text{Caco2shEpCAM\#2} = 4.1 \pm 0.33$, $\text{Caco2shEpCAM\#1} + \text{Blebbistatin } 50 \mu\text{M} = 1.57 \pm 0.17$, $\text{Caco2shEpCAM\#2} + \text{Blebbistatin } 50 \mu\text{M} = 0.91 \pm 0.06$. (b) SEM analyses of apical surfaces of DMSO-treated control, EpCAM-depleted or EpCAM-depleted cells treated with blebbistatin for 2 h. Scale bars, 4 μm . (c) Confocal analysis and 3D rendering of z-stacks of actin location at TCs in DMSO-treated control, EpCAM-depleted or EpCAM-depleted cells treated with blebbistatin for 2 h. Scale bars, 4 μm . (d) High magnifications of EADs from SEM or confocal and 3D rendering analyses. Scale bars, 1 μm . (e) Quantification of EADs on DMSO or blebbistatin treatment in Caco2shNT or shEpCAM cells. One-way ANOVA with Tukey's test, *****P* < 0.0001. $n_{(\text{Caco2shNT} + \text{DMSO})} = 107$ cells, $n_{(\text{Caco2shEpCAM\#1} + \text{DMSO})} = 105$, $n_{(\text{Caco2shEpCAM\#2} + \text{DMSO})} = 91$, $n_{(\text{Caco2shEpCAM\#1} + \text{Blebbistatin})} = 96$, $n_{(\text{Caco2shEpCAM\#2} + \text{Blebbistatin})} = 81$. EAD-positive Caco2shNT cells = 0%, EAD-positive Caco2shEpCAM\#1 + DMSO cells = 87.41 \pm 1.64%, EAD-positive Caco2shEpCAM\#1 + DMSO cells = 91.98 \pm 4.21%, EAD-positive Caco2shEpCAM\#1 + blebbistatin cells = 9.55 \pm 5.46%, EAD-positive Caco2shEpCAM\#1 + DMSO = 18.43 \pm 1.83%. (f) Confocal analysis of actin distribution and brush border formation in Caco2shEpCAM cells. Cells were treated for 2 h with DMSO, or for 10 min or 2 h with 5 or 50 μM of blebbistatin. Scale bars, 5 μm . (g) Quantification of EADs on DMSO or blebbistatin treatment in Caco2 shEpCAM cells. $N(2 \text{ h, DMSO}) = 5,467$ cells, $N(10 \text{ min, } 5 \mu\text{M}) = 3,598$, $N(10 \text{ min, } 50 \mu\text{M}) = 4,032$, $N(2 \text{ h, } 5 \mu\text{M}) = 289$, $N(2 \text{ h, } 50 \mu\text{M}) = 4,416$. *t*-test, *P* < 0.0001. (h) Analysis of lateral membrane behaviour in EpCAM-depleted Caco2 cells during 50 μM blebbistatin treatment and time-lapse acquisitions. Lateral membranes have been stained with SirActin labelling. Scale bars, 10 μm . For quantification, three independent replicates have been performed. Values are mean \pm s.e.m. Nuclei were stained with Hoechst 33342.

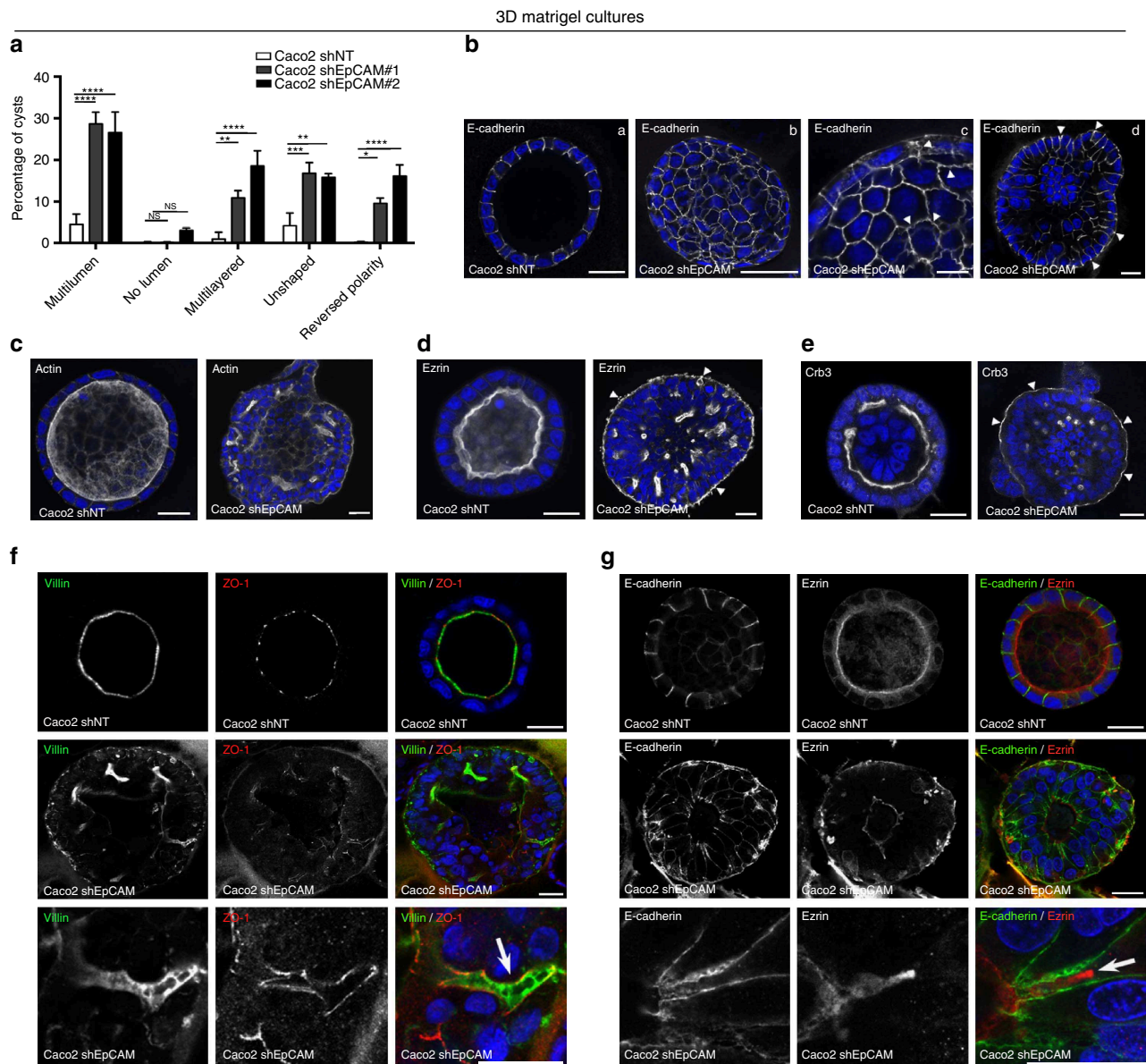


Figure 7 | Epithelial organization in 3D Matrigel cultures is perturbed on EpCAM loss. (a) Statistical analysis of cyst morphology in Caco2 shNT (white), Caco2 shEpCAM#1 (grey) and Caco2 shEpCAM#2 (black) cells. Three independent experiments were performed. $N_{(\text{Caco2shNT})} = 779$ cysts, $N_{(\text{Caco2shEpCAM\#1})} = 1,049$ cysts, $N_{(\text{Caco2shEpCAM\#2})} = 1,686$ cysts. Unpaired *t*-tests, **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.1$. Percentage of Caco2shNT cells with multilumen cysts = $4.5 \pm 2.5\%$, no lumen cysts = $0.13 \pm 0.2\%$, multilayered cysts = $0.9 \pm 1.7\%$, unshaped cysts = $4.1 \pm 3.0\%$ and reversed polarity cysts = $0.2 \pm 0.2\%$. Percentage of Caco2shEpCAM#1 cells with multilumen cysts = $28.6 \pm 4.9\%$, no lumen cysts = $0.2 \pm 0.3\%$, multilayered cysts = $10.9 \pm 3.0\%$, unshaped cysts = $16.7 \pm 4.5\%$ and reversed polarity cysts = $9.6 \pm 2.2\%$. Percentage of Caco2shEpCAM#2 cells with multilumen cysts = $26.6 \pm 8.5\%$, no lumen = $3.0 \pm 1.1\%$, multilayered cysts = $18.5 \pm 6.3\%$, unshaped cysts = $15.8 \pm 1.5\%$ and reversed polarity cysts = $16.1 \pm 4.7\%$. Values are mean \pm s.d. (b–e) Confocal analysis of E-cadherin (b), actin (c), ezrin (d) and Crb3 (e) in 21 days 3D Matrigel cultures of control (*Caco2 shNT*) and EpCAM-silenced (*Caco2 shEpCAM*) cells. (b(c)) Arrowheads point toward weakened E-cadherin-based cell adhesions. (b(d)) Arrowheads point toward basal redirection of lateral E-cadherin. (d–e) Arrowheads point toward apical marker mislocalization on the outer side of the cysts, reflecting the loss of apico-basal polarity in shEpCAM cells. Nuclei were detected with Hoechst 33342 staining (blue). Scale bars, 10 μm . (f,g) Confocal analysis of double immunostainings for villin (green) and ZO-1 (red) (f), or E-cadherin (green) and ezrin (red) (g) in 21 days 3D Matrigel cultures of control (*Caco2 shNT*) and EpCAM-silenced (*Caco2 shEpCAM*) cells. Higher magnifications on EADs are presented in the lower panels. Nuclei were detected with Hoechst 33342 staining (blue). Scale bars, 20 μm .

a ‘pre-extruded state’, thus producing the formation of tuft structures.

In addition, differences observed between 2D cultures and synthetic villi may be attributed to local changes of the curvature in the latter. Tuft formation takes place along the villus, and the particular shape of the villus *per se* may also account for these morphological defects. Indeed, curvature is not

homogeneous when progressing from the bottom to the top of the 3D substrates since the radius varies from 75 (μm) (villus bottom) to 35 μm (villus top). Cell contractility has been reported to depend on substrate-induced curvature during epithelial closure for gaps of similar dimensions⁵⁴. Along this line, villus topography may induce changes in the cortical contractility along the orthoradial direction from the bottom

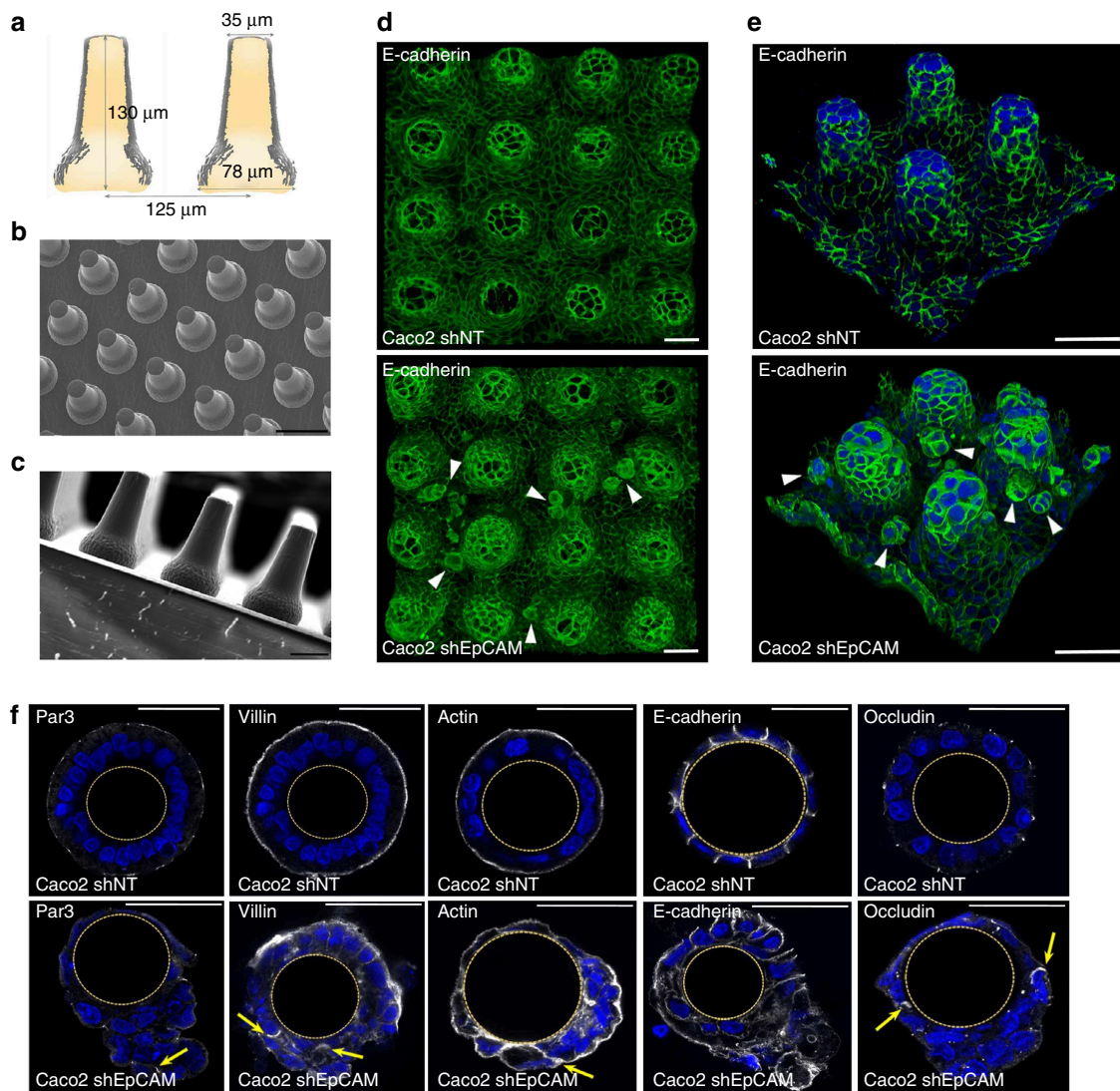


Figure 8 | Generation of PDMS culture inserts that mimic villus topography, and highlighting of tuft-like structures in cultures EpCAM-silenced on synthetic villi. (a) Schematic representation of the synthetic polydimethylsiloxane (PDMS) villus inserts. (b,c) Scanning electron microscopy analyses of villus PDMS culture inserts: top (b) and side (c) views are presented. Scale bars, 50 μm (b) and 100 μm (c). (d,e) Confocal microscopy analysis of E-cadherin distribution in control (*Caco2 shNT*, upper panels) and EpCAM-silenced (*Caco2 shEpCAM*, lower panels) cells that were grown on 3D villus-like micropatterned PDMS inserts for 21 days. After z-stack acquisitions, 3D rendering was generated. White arrowheads point on tuft-like structures. Scale bars, 50 μm . (f) Confocal microscopy analysis of Par3, villin, actin, E-cadherin and occludin distribution in control (*Caco2 shNT*) and EpCAM-silenced (*Caco2 shEpCAM*) cells that were grown on villous PDMS inserts for 21 days. Transversal xy views are presented. Par3, villin, actin and occludin display abnormal lateral membrane localization in the absence of EpCAM (yellow arrows). Scale bars, 50 μm .

to the top, whereas cortical contractility remains isotropic on 2D substrates. We thus speculate that these changes of cell contractility may also promote tuft formation in absence of EpCAM, and further studies including various villus dimensions may help to clarify this point.

Tissue-scale changes also took place when EpCAM-silenced cells were grown in 3D Matrigel system, although of a different nature. Supranumerous lumens were formed and likely as a result of the mislocalization of tight junctions and of minor pool of apical actomyosin in the intrinsic physical confinement of cysts (Fig. 7). However, since the actomyosin majority at basal-side was not obviously perturbed on EpCAM loss, it still allowed cysts to keep a correct shape, and no tuft-structure was noticed. How is the contractile apparatus recruited either to the apical- or to the basal-side? Myosin distribution and epithelial topology seem to be intermingled, which suggest a physical modulation

of myosin patterning and/or activation dictated by lumen positioning and substrate curvature at the tissue scale.

EpCAM increasingly appears as a key factor in tissue organization^{14,15}. Its molecular mode of action at cell adhesion sites might be indirect and could in part go through actomyosin network at lateral membranes. Interestingly, EpCAM has been proposed to regulate bulk organization of the actin cytoskeleton in epithelial thymic cells¹¹. Recently, myosin-II activity has been reported to be indirectly controlled by EpCAM in *Xenopus* epidermis and in non-polarized *Caco2* cells, where the absence of EpCAM would lead to exacerbated cell contractility¹⁵. Our data revealed that, in fully differentiated human enterocytes, stable deprivation of EpCAM triggers global contractile activity reduction at cellular level, but leads to reshaping of actomyosin apparatus and local tricellular activation of myosin-II at subcellular level. In addition, the heterogeneity

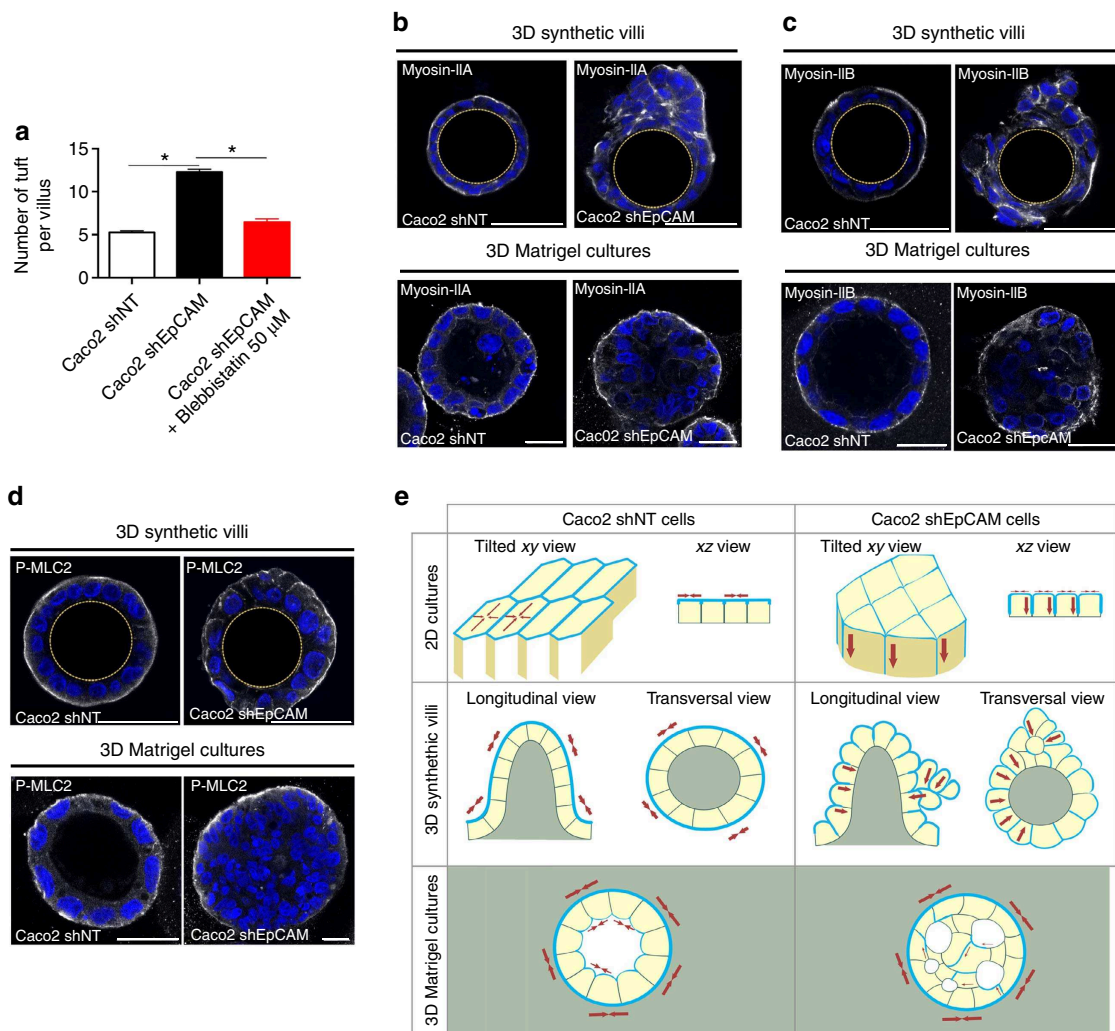


Figure 9 | Cell contractility, and epithelial and substrate topography participate in tuft formation in the absence of EpCAM. (a) Statistical analysis of the number of tuft-like structures detected along the 3D microfabricated villus structures in control (*Caco2 shNT*), EpCAM-depleted cells (*Caco2 shEpCAM*) and 2h-blebbistatin-treated EpCAM-depleted cells (*Caco2 shEpCAM#1 + Blebbistatin 50 μ M*). Three independent replicates have been performed. One-way analysis of variance with unpaired *t*-test, $*P < 0.0001$. $n_{(Caco2\ shNT)} = 196$ villi, $n_{(Caco2\ shEpCAM)} = 210$ villi, $n_{(Caco2\ shEpCAM + Blebbistatin)} = 210$ villi. *Caco2 shNT* (mean number of tufts per villus) = 5, *Caco2 shEpCAM* (mean number of tufts per villus) = 12, *Caco2 shEpCAM + Blebbistatin 50 μ M* (mean number of tufts per villus) = 6. (b–d) Confocal microscopy analysis of myosin-IIa (b), myosin-IIb (c) and P-MLC2 (d) distribution in control (*Caco2 shNT*) and EpCAM-silenced (*Caco2 shEpCAM*) cells that were grown on villous PDMS inserts or in 3D Matrigel cultures for 21 days. Transversal xy views are presented. Scale bars, 50 μ m. (e) Schemes recapitulating the cellular and epithelial phenotypes observed in control (*Caco2 shNT*) or EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM*) conditions when cells are grown in 2D, 3D synthetic villi or 3D Matrigel cultures. Contractile apparatus (blue) and predicted tensile forces (red arrows) are presented.

in the distribution of tensile forces according to the culture system on EpCAM loss suggests that its modulation of the actomyosin homeostasis may be spatially restricted to the apical cortex (Fig. 9). Actomyosin network association with AJs is considered crucial for their formation and vice versa, and tension generation at lateral membranes has been reported to be required for junction disassembly^{27,28}. Moreover, actomyosin distribution and activity are directly modulated by tight junction proteins, and silencing of ZO-1 in MDCK cells increases actomyosin association with AJs and the level of contractility generated^{55,56}. Taking published data into account, three scenarios could be considered for EpCAM function in actomyosin homeostasis at lateral membranes. Absence of EpCAM could impact E-cadherin complexes and may consequently destabilize the actomyosin network. Conversely, loss of EpCAM may impair homeostasis of the actomyosin apparatus and impacts

AJ integrity. Alternatively, tight junction belt disturbance may also account for actomyosin perturbation. Using high-resolution microscopy, Peifer and colleagues⁵⁶ demonstrated that actin cables anchor at TCs. Contrary to tight junction loss in MDCK cells⁵⁶, increased tight junction protein levels together with tight junction remodelling may have provoked actomyosin destabilization at AJs and its subsequent accumulation and activation at TCs. However, knowledge of the spatial activation of myosin-II and related kinases is fragmented, and distribution of the kinases responsible for myosin-II activation, taking into account the geometry of a columnar epithelial cell, remains to be clearly established.

Our data support a requirement for EpCAM in the regulation of tension homeostasis within epithelial monolayer. EpCAM loss leads to a general decrease of MLC phosphorylation within fully differentiated epithelial cells, but triggers an unusual

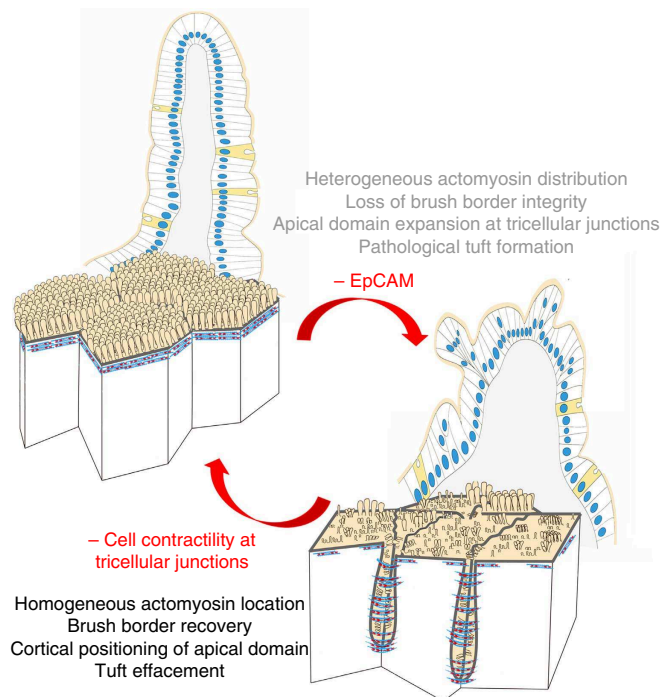


Figure 10 | Schemes showing the effects of EpCAM deprivation and the reverse effects obtained by inhibition of the local hypercontractility using myosin-II inhibitors. Cellular distribution of actin (blue) and myosin-II (red) network is shown.

local activation of cortical myosin-II at TCs. Thus, the proper balance of cortical tension within epithelial tissues provides the link between tissue integrity and intercellular adhesion. Since cellular defects and tissue-scale changes are reversible under cell contractility inhibition, this study may open therapeutic perspectives for CTE patients (Fig. 10).

Methods

Human biopsies and preparation of tissue samples. Tissue samples of *EPCAM* mutated CTE children were provided by Necker-Enfants Malades, Robert Debré and Trousseau hospitals (Paris, France) and were collected either from the Necker Paediatric Anatomopathology Department for retrospective analyses, or from the Gastroenterological functional exploration Departments for prospective studies. Genetic characterization of the CTE patients included here had been conducted in a previous study (Salomon *et al.*⁷). The patient cohort analysed here comprised $N = 6$ CTE patients mutated for *EPCAM* and aged 4 months to 17 years, as well as $N = 12$ controls (non CTE patients: $N = 2$ patients with Crohn's disease, $N = 1$ patient with hyperinsulinemia, $N = 1$ patient with duodenal atresia, $N = 2$ patients with auto-immune enteropathies, $N = 2$ patients with gastro-oesophageal reflux, and $N = 4$ patients with coeliac disease) aged 9 months to 14 years, who underwent duodenal endoscopy for routine explorations. The CTE patients displayed typical CTE epithelial abnormalities in intestinal biopsies and parenteral nutrition dependency, and presented *EPCAM* loss-of-function mutations. Duodenal biopsies were collected during endoscopic procedures for diagnosis and/or monitoring of CTE and control infants. All parents signed informed consent forms approved by our local ethics committee for DNA and biopsy exploitation (Unité de Recherche Clinique (URC) of Necker Hospital, URC).

Tissue sample preparation. $N_{\text{Control}} = 12$ biopsies and $N_{\text{CTE}} = 6$ biopsies were prepared for immunohistochemical analyses. Biopsies were fixed for 2 h in either 4% formaldehyde or by successive 1 h incubations in cold 70, 90 or 100% methanol solutions and then stored at -20°C in methanol. The samples were then paraffin embedded. A measure of 5 μm sections were de-waxed in a xylene bath, rehydrated in isopropanol and in solutions with decreasing ethanol concentrations, and were processed for either immunohistochemistry or immunostaining. For immunohistological analyses, classical hematoxylin/eosin staining procedure was used. For immunostaining, de-waxed tissue sections were blocked in 1.5% donkey serum (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) for 1 h. Primary antibody incubations were performed at 4°C overnight and secondary antibody incubations at room temperature for 2 h, both in 1.5% donkey serum

solution. Hoechst 33342 staining (Life Technologies, Paisley, UK) was used to detect nuclei. Tissue sections were mounted in home-made Mowiol 488 solution.

Cell cultures. Caco2_{BBE} cells were kindly provided by Dr S. Robine (Curie Institute, Paris). Cells were routinely grown in DMEM 4.5 g l^{-1} glucose, 20% fetal bovine serum, 10% penicillin-streptomycin (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). The culture medium was renewed every day. Fully polarized cells were obtained after 21 days. For 3D cultures in Matrigel, trypsinized Caco2 cells were resuspended in pure Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) at a final concentration of 2.10^6 cells ml^{-1} . A measure of 30 μl of Matrigel cell suspensions were laid onto precooled 12 mm coverslips. Caco2 cysts were grown for at least 2 weeks and medium was daily renewed.

EpCAM reduction was carried out by lentiviral delivery of shRNA constructs directed against human *EPCAM* (*shEpCAM#1*: TRCN0000073734 5'-CCGGG CCGTAAACTGCTTTGTGAATCTCGAGATTACAAAAGCAGTTTACG GCTTTTTG-3', and *shEpCAM#2*: TRCN0000073737 5'-CCGGCGCGTTAT CAACTGGATCCAACCTCGAGTTGGATCCAGTTGATAACGCGTTTTTG-3') designed and cloned into the lentiviral pLKO.1 puromycin resistant vector Mission shRNA lentiviral Transduction particle (Sigma Aldrich).

Tricellulin reduction was carried out by lentiviral delivery of shRNA constructs directed against human *MARVELD2* (*shTricellulin#1*: TRCN0000072634 5'-CCGGGTGCAATGATCTTCTGTTCGAGAAACAGGAAGA TCATTGCAGCTTTTTG-3', and *shTricellulin#2*: TRCN0000072636 5'-CCGGCGCAGCCATAGTCTATGTGAACCTCGAGTTCACATAGACTATGG CTGCGTTTTTG-3').

Control Caco2 clones (*shNT*) were generated using pLKO.1-puro non-target shRNA control transduction particles SHC016V (5'-CCGGCGCGATAGCGCT AATAATTTCTCGAGAAATTATAGCGCTATCGCGCTTTTT-3'). Clone generation was performed in DMEM supplemented with 20% FBS, 10% penicillin/streptomycin and 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ puromycin (InvivoGen, San Diego, CA, USA) and selected clones were routinely maintained in 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ puromycin. Efficiency and specificity of EpCAM reduction was assessed by WBs.

shRNA-resistant EpCAM sequence (*shEpCAM#1* resistant: 5'-ATGG CGCCCCGCAGGTCCTCGCGTTCTGGGCTTCTGCTTGCCGCGCGCAGCGG CACTTTTGCAGCTCAGGAAGAATGTGTCTGTGAAAACACTACAAGCTG GCTGTGAATTGTTTCGTCACAATAATCGTCAATGCCAGTGTACTT CAGTTGGTGACAAAATACTGTCAATTTGCTCAAAGCTGGTGCCCA AATGTTTGGTGATGAAGGCAGAAATGAATGGTCAAAAACCTGGG AGAAGAGCAAAAACCTGAAGGGGCCCTCCAGAACAAATGATGGG CTTATGATCTGACTGCGATGAGAGCGGGCTTTAAGGCCAAG CAGTGCACCGCACCTCCATGTCTGGTGTGTGAACACTGCTGG GGTCAGAAGAACAGACAAGGACACTGAAATAACCTGCTCTGA GCGAGTGAAGACCTACTGGATCATCTGAACATAAAAACAAAAGCA AGAGAAAACCTTATGATAGTAAAAGTTGTCGGACTGCACCTCAGAAG GAGATCACACCGGTTATCAACTGGATCCAAAATTTATCACGAGTATT TTGTATGAGAATAATGTTATCACTATTGATCTGGTTCAAAATCTTCT CAAAAACCTCAGAAATGATGTGGACATAGCTGATGTGGCTTATTATTTT GAAAAAGATGTTAAAAGTGAATCCTTGTTCATTTCAAGAAAAATGG ACCTGACAGTAAATGGGAACAACCTGGATCTGGATCTGGTCAAACCT TAATTTATTATGTTGATGAAAAAGCACCTGAATTTCTCAATGCAGGGTCT AAAAGCTGGTGTATTGCTGTTATTGCTGTTGTTGTTGTTGATGAGATGTT GCTGGAATTGTTGCTGTTATTCCAGAAAGAGAGAAATGGCA AAGTATGAGAAGGCTGAGATAAAGGAGATGGGTGAGATGCATAGGG AACTCAATGCATAA-3') was provided by Invitrogen and cloned into a pEGFP-N1 backbone using the following primers (Eurofins genomics): Forward: 5'-aattctcagctcgagctaccATGGCGCCCCCGCAGGTC-3', Reverse: 5'-caccatgtgtgcccagcgggtgacccggcTGCATTGAGTTCCTATGCATCTCA-3'. *shEpCAM#1*-resistant Caco-2 clones were generated by transfection with Lipofectamine 2000 (Sigma Aldrich) and selection in DMEM supplemented with 20% FBS, 10% penicillin/streptomycin, 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ puromycin and 0.5 mg ml^{-1} geneticin (Life Technologies).

Hanging drop cultures were used to generate 3D spheroids⁵⁷. A measure of 10 μl drops of single cell suspension (concentration 2×10^6 cells ml^{-1}) were deposited on the inverted lid of a 60 mm culture dish. The lid was placed back, and 5 ml of phosphate-buffered saline (PBS) was placed in the bottom of the dish to create a wet chamber. After 48 h, spheroids were imaged using Keyence VHX 2000E microscope.

Western blots. WBs were performed as follows. Cells were lysed for 30 min with lysis buffer, that is, 50 mM Tris per HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 2 mM EGTA, 1 mM sodium orthovanadate with complete protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). Insoluble debris were removed by centrifugation at 13,000g for 15 min and supernatants were used as cell lysates. Protein amounts were determined by Bradford assay. For each condition, 50 μg of proteins were loaded per well in Novex Tris-Glycine pre-cast gels (Thermo Fischer) and transferred on nitrocellulose membranes using iBlot Dry blotting system (Thermo Fischer). Proteins were detected with either horseradish peroxidase-linked goat anti-mouse IgG antibody (dilution 1:10,000; Sigma-Aldrich) or horseradish peroxidase-linked donkey anti-rabbit IgG antibody (dilution 1:10,000, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), and SuperSigna West Femto

Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fischer Scientific) and visualized on ImageQuant LAS4000 (GE-Healthcare). Signal quantification was performed using Fiji software. Uncropped scan of WBs can be found in Supplementary Figs 11–14.

Antibodies and reagents. Mouse monoclonal antibody directed against villin (clone ID2C3, immunofluorescence (IF) dilution 1:100), rabbit polyclonal antibody directed against ezrin (IF dilution 1:200, WB dilution 1:500) and mouse monoclonal antibody directed against lactase phlorizin hydrolase (IF dilution 1:100) were kindly provided by Dr S. Robine (Curie Institute, Paris). Mouse monoclonal antibody directed against Crb3 (IF dilution 1:100) was kindly provided by Dr A. Le Bivic (IBDM, Luminy, France). Mouse monoclonal (#AM00558PU-N, IF dilution 1:100) and rabbit polyclonal (#ab71916, IF dilution 1:100, WB dilution 1:1,000) antibodies directed against EpCAM were from Acris (Herford, Germany) and Abcam (Cambridge, MA, USA), respectively. Mouse monoclonal antibodies directed against E-cadherin (#610181, IF dilution 1:100) and aPKC (#610207 clone 41, IF dilution 1:100) were from BD Biosciences (Rockville, MD, USA). Mouse monoclonal antibody directed against pancytokeratin (#SRE0061, clone PCK-26, IF dilution 1:100) was from Sigma Aldrich. Rabbit polyclonal antibodies directed against Na^+/K^+ -ATPase (#ab76020, IF dilution 1:100) and occludin (#TA306787, IF dilution 1:100, WB dilution 1:1,000) were from Abcam (Cambridge, UK) and Acris (Herford), respectively. Rat monoclonal antibody directed against occludin (clone MOC37, IF dilution 1:50) was a gift from Sylvie Robine. Rabbit polyclonal antibodies directed against tricellulin (#48-8400, IF dilution 1:100, WB dilution 1:1,000), ZO-1 (#40-2300, IF dilution 1:200), Par3 (#PA5-33529, IF dilution 1:100, WB dilution 1:500) and claudin-7 (#34-9100, IF dilution 1:200, WB dilution 1:1,000) were from Life Technologies. Rabbit polyclonal antibody directed against Scribble (#sc-28737, IF dilution 1:100) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit polyclonal antibodies directed against myosin-IIA (#909801, clone Poly19098, IF dilution 1:200) and myosin-IIb (#909901, clone Poly19099, IF dilution 1:200) were from Biogen (formerly Covance, Princeton, NJ, USA). Rabbit polyclonal antibody directed against MLC2 (#3672, WB dilution 1:1,000) was from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Rabbit polyclonal antibody directed against P-MLC2 (S19/S20, #600-401-416, IF dilution 1:100, WB dilution 1:500) was from Rockland (Limerick, PA, USA). Rabbit polyclonal antibody directed against phosphomyosin light chain (P-MLC2; T18/S19, #3674, WB dilution 1:500) was from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Monoclonal antibody directed against GAPDH (#60004-1-Ig, clone 1E6D9, WB dilution 1:500) was from Proteintech (Chicago, IL, USA). Monoclonal antibody directed against GFP (#11814460001, clones 7.1 and 13.1, WB dilution 1:1,000) was from Roche (Basel, Switzerland). Anti-mouse Alexa-488 and anti-rabbit Alexa-568 secondary antibodies (dilution 1:250) were from Life Technologies. Phalloidin-FITC and phalloidin-598 were from Sigma-Aldrich and Life Technologies, respectively.

Immunofluorescence and electron microscopy analyses. For immunofluorescence, cells grown on solid supports or on Matrigel matrix were fixed either in 4% formaldehyde for 15 min or 1 h, respectively, or in -20°C precooled methanol for 5 or 30 min, respectively. Cell permeabilisation was performed by incubating the cells in 0.02% saponine (Sigma-Aldrich) in PBS, and saturation in PBS containing 0.025% saponine, 1% BSA. Primary antibody incubations were performed in PBS containing 0.025% saponine and 1% BSA at 4°C for 12 h for 2D cultures or 24 h for Matrigel suspensions. Secondary antibodies (Life Technologies) were incubated 1 h for 2D cultures or 12 h for Matrigel suspension. Nuclei were detected by Hoechst 33342 staining (Life Technologies). Cells were mounted in Mowiol 488 solution (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany).

Confocal images were acquired on a Leica TCS SP5, Leica TCS SP8 and Zeiss LSM780 microscopes with $\times 40$ or $\times 63$ water planapochromat lenses (Leica Microsystems, Wetzlar) and processed with ImageJ. For 3D microfabricated device imaging, SP8 acquisitions were processed for 3D rendering provided by the Leica software package.

Quantifications of P-MLC2 and MLC2 fluorescence were performed on a LEICA TCS SP8 using hybrid detector. Image stacks were acquired using counting mode setup with identical acquisition settings (laser power, objectives and magnifications) for each acquired image and condition. Fluorescence quantifications were done using Fiji software. To determine total fluorescence per cell, single cell was manually delimited on phalloidin treated cells for cell edge determination. For each experiment set, the mean P-MLC2 fluorescence per cell was reported on the mean MLC2 fluorescence per cell. To determine fluorescence intensity at TCs versus bicellular contacts, cell edges were visualized on phalloidin treated cells. Tricellular and bicellular contacts were manually delimited. For each cell, the total pixel intensity of TCs was reported on the total pixel intensity of bicellular contacts.

3D-SIM images were acquired on the Nikon N-SIM system using a $\times 100$ APO TIRF objective in the NIKON Imaging Center at the Curie Institute (Paris, France). The images reconstruction based on the Gustafsson methods⁵⁸ were performed on the NIS-Elements Ar software.

$N_{(\text{Control})} = 3$ biopsies, $N_{(\text{CTE})} = 3$ biopsies were used for transmission electron microscopy analyses. Biopsies were immersion-fixed in 2.5% glutaraldehyde

(Electron Microscopy Sciences (EMS), Hatfield, PA, USA) in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4; Sigma-Aldrich) for 2 h at 4°C and then in 1% osmic acid (EMS) in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h. Standard procedures for dehydration and embedding in Epon-Araldite (EMS) were used. Same procedure was used for Caco2 monolayer samples. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate (Sigma-Aldrich) solutions before examination using a Tecnai T12 microscope (FEI, Eindhoven, Netherlands).

For SEM analyses, cells were fixed overnight at 4°C in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer. They were dehydrated in a graded series of ethanol solutions, then dried by the CO_2 critical-point method using Emcpd300 (Leica microsystems). Samples were mounted on an aluminium stub with a silver lacquer and sputter coated with a 5–10 nm platinum layer using Emace600 (Leica microsystems). Acquisitions were performed using a GeminiSEM 500 (Zeiss).

Blebbistatin treatment. Cells were incubated in 5 or 50 μM blebbistatin (Sigma-Aldrich) in DMSO for 10 min or 2 h, then washed out with PBS and fixed for immunostaining. Cells were incubated for 2 h in DMSO as controls.

For live cell imaging, actin cytoskeleton was stained using SiR-Actin (Spirochrome, Stein am Rhein, Switzerland). Cells were incubated 30 min with 1 μM SiR-Actin and maintained in 100 nM SiR-Actin in cell culture medium along the image acquisitions. Before acquisitions, blebbistatin was added in culture medium at 50 μM final concentration. Time-lapse acquisitions were performed on a Leica TCS SP8, using a $\times 40$ numerical aperture 1.3 oil objective. Images were acquired every 3 min and analysed using Fiji software.

Biomimetic cell culture inserts and tuft quantifications. Silicon wafers were patterned with arrays of cylindrical pits that mimic intestinal villus topography using soft photolithography and deep etching process⁵⁹. Wafers were silanized with tridecafluoro-trichlorosilane to facilitate elastomer layer release after curing. Liquid silicone prepolymer, that is, polydimethylsiloxane (PDMS; Sylgard 182 + 184, Dow-Corning, Auburn, MI, USA), was poured over the wafer, cured at 65°C overnight and peeled off. After release from the mold, the PDMS patterned replica was cut into subunits for cell culture, iodized and sterilized in an air plasma (Harrick, Ithaca, NY, USA) for 5 min. The cells were then cultured on the PDMS patterns in Petri dishes.

For tuft quantification, shNT and shEpCAM Caco2 cells were cultured on PDMS microdevices until full polarization, then immunostained for E-cadherin and stained with Hoechst33342 for nucleus detection. Three independent experiments were used and five separate fields of 42 micropillars were analysed for each cell type. The number of tufts on each pillar was collected and compared using Dunn's multiple comparison tests (Kruskal–Wallis statistics, GraphPad Prism software, GraphPad Software, Inc.).

Data availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author on request.

References

- Goulet, O. *et al.* Intractable diarrhea of infancy with epithelial and basement membrane abnormalities. *J. Pediatr.* **127**, 212–219 (1995).
- Canani, R. B., Castaldo, G., Bacchetta, R., Martin, M. G. & Goulet, O. Congenital diarrhoeal disorders: advances in this evolving web of inherited enteropathies. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 293–302 (2015).
- Delacour, D., Salomon, J., Robine, S. & Louvard, D. Plasticity of the brush border - the yin and yang of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 161–174 (2016).
- Goulet, O., Salomon, J., Ruemmele, F., de Serres, N. P. & Brousse, N. Intestinal epithelial dysplasia (tufting enteropathy). *Orphanet J. Rare Dis.* **2**, 20 (2007).
- Patey, N. *et al.* Distribution of cell adhesion molecules in infants with intestinal epithelial dysplasia (tufting enteropathy). *Gastroenterology* **113**, 833–843 (1997).
- Sivagnanam, M. *et al.* Identification of EpCAM as the gene for congenital tufting enteropathy. *Gastroenterology* **135**, 429–437 (2008).
- Salomon, J. *et al.* Genetic characterization of congenital tufting enteropathy: epcam associated phenotype and involvement of SPINT2 in the syndromic form. *Hum. Genet.* **133**, 299–310 (2014).
- Balzar, M., Winter, M. J., de Boer, C. J. & Litvinov, S. V. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J. Mol. Med.* **77**, 699–712 (1999).
- Schnell, U., Cirulli, V. & Giepmans, B. N. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 1989–2001 (2013).
- Maetzel, D. *et al.* Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat. Cell Biol.* **11**, 162–171 (2009).
- Guillemot, J. C. *et al.* Ep-CAM transfection in thymic epithelial cell lines triggers the formation of dynamic actin-rich protrusions involved in the organization of epithelial cell layers. *Histochem. Cell Biol.* **116**, 371–378 (2001).

12. Winter, M. J. *et al.* Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp. Cell Res.* **285**, 50–58 (2003).
13. Winter, M. J., Cirulli, V., Briaire-de Bruijn, I. H. & Litvinov, S. V. Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase. *Mol. Cell Biochem.* **302**, 19–26 (2007).
14. Slanchev, K. *et al.* The epithelial cell adhesion molecule EpCAM is required for epithelial morphogenesis and integrity during zebrafish epiboly and skin development. *PLoS Genet.* **5**, e1000563 (2009).
15. Maghzal, N., Kayali, H. A., Rohani, N., Kajava, A. V. & Fagotto, F. EpCAM controls actomyosin contractility and cell adhesion by direct inhibition of PKC. *Dev. Cell* **27**, 263–277 (2013).
16. Tsaktanis, T. *et al.* Cleavage and cell adhesion properties of human epithelial cell adhesion molecule (HEPCAM). *J. Biol. Chem.* **290**, 24574–24591 (2015).
17. Guerra, E. *et al.* mTrop1/Epcam knockout mice develop congenital tufting enteropathy through dysregulation of intestinal E-cadherin/beta-catenin. *PLoS ONE* **7**, e49302 (2012).
18. Gunzel, D. & Yu, A. S. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev.* **93**, 525–569 (2013).
19. Lei, Z. *et al.* EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. *Dev. Biol.* **371**, 136–145 (2012).
20. Kozan, P. A. *et al.* Mutation of EpCAM leads to intestinal barrier and ion transport dysfunction. *J. Mol. Med.* **93**, 535–545 (2015).
21. Rauzi, M., Verant, P., Lecuit, T. & Lenne, P. F. Nature and anisotropy of cortical forces orienting *Drosophila* tissue morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1401–1410 (2008).
22. Trichas, G. *et al.* Multi-cellular rosettes in the mouse visceral endoderm facilitate the ordered migration of anterior visceral endoderm cells. *PLoS Biol.* **10**, e1001256 (2012).
23. Rodriguez-Boulant, E. & Macara, I. G. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat. Rev.* **15**, 225–242 (2014).
24. Mariano, C., Sasaki, H., Brites, D. & Brito, M. A. A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 787–796 (2011).
25. Furuse, M., Izumi, Y., Oda, Y., Higashi, T. & Iwamoto, N. Molecular organization of tricellular tight junctions. *Tissue Barriers* **2**, e28960 (2014).
26. Oda, Y., Otani, T., Ikenouchi, J. & Furuse, M. Tricellulin regulates junctional tension of epithelial cells at tricellular contacts through Cdc42. *J. Cell. Sci.* **127**, 4201–4212 (2014).
27. Budnar, S. & Yap, A. S. A mechanobiological perspective on cadherins and the actin-myosin cytoskeleton. *F1000Prime Rep.* **5**, 35 (2013).
28. Twiss, F. & de Rooij, J. Cadherin mechanotransduction in tissue remodeling. *Cell Mol. Life Sci.* **70**, 4101–4116 (2013).
29. Keller, 3rd T. C. & Mooseker, M. S. Ca⁺⁺-calmodulin-dependent phosphorylation of myosin, and its role in brush border contraction in vitro. *J. Cell. Biol.* **95**, 943–959 (1982).
30. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. & Horwitz, A. R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev.* **10**, 778–790 (2009).
31. Murrell, M., Oakes, P. W., Lenz, M. & Gardel, M. L. Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility. *Nat. Rev.* **16**, 486–498 (2015).
32. Straight, A. F. *et al.* Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science* **299**, 1743–1747 (2003).
33. Monier, B. *et al.* Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. *Nature* **518**, 245–248 (2015).
34. le Digabel, J., Ghibaudo, M., Trichet, L., Richert, A. & Ladoux, B. Microfabricated substrates as a tool to study cell mechanotransduction. *Med. Biol. Eng. Comput.* **48**, 965–976 (2010).
35. Pampaloni, F., Reynaud, E. G. & Stelzer, E. H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev.* **8**, 839–845 (2007).
36. Ivanov, A. I. *et al.* Myosin II regulates the shape of three-dimensional intestinal epithelial cysts. *J. Cell Sci.* **121**, 1803–1814 (2008).
37. DuFort, C. C., Paszek, M. J. & Weaver, V. M. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat. Rev.* **12**, 308–319 (2011).
38. Iskratsch, T., Wolfenson, H. & Sheetz, M. P. Appreciating force and shape—the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nat. Rev.* **15**, 825–833 (2014).
39. Zhao, B. *et al.* The non-muscle-myosin-II heavy chain Myh9 mediates colitis-induced epithelium injury by restricting Lgr5⁺ stem cells. *Nat. Commun.* **6**, 7166 (2015).
40. Fernandez-Sanchez, M. E. *et al.* Mechanical induction of the tumorigenic beta-catenin pathway by tumour growth pressure. *Nature* **523**, 92–95 (2015).
41. Juanes-Garcia, A. *et al.* A regulatory motif in nonmuscle myosin II-B regulates its role in migratory front-back polarity. *J. Cell Biol.* **209**, 23–32 (2015).
42. Bardet, P. L. *et al.* PTEN controls junction lengthening and stability during cell rearrangement in epithelial tissue. *Dev. Cell* **25**, 534–546 (2013).
43. Ishiuchi, T. & Takeichi, M. Willin and Par3 cooperatively regulate epithelial apical constriction through aPKC-mediated ROCK phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **13**, 860–866 (2011).
44. Nakajima, H. & Tanoue, T. Lulu2 regulates the circumferential actomyosin tensile system in epithelial cells through p114RhoGEF. *J. Cell Biol.* **195**, 245–261 (2011).
45. Nakajima, H. & Tanoue, T. The circumferential actomyosin belt in epithelial cells is regulated by the Lulu2-p114RhoGEF system. *Small GTPases* **3**, 91–96 (2012).
46. Bosveld, F. *et al.* Epithelial tricellular junctions act as interphase cell shape sensors to orient mitosis. *Nature* **530**, 495–498 (2016).
47. Ikenouchi, J. *et al.* Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **171**, 939–945 (2005).
48. Otani, T., Ichii, T., Aono, S. & Takeichi, M. Cdc42 GEF Tuba regulates the junctional configuration of simple epithelial cells. *J. Cell Biol.* **175**, 135–146 (2006).
49. Alexandre, M. D., Jeansonne, B. G., Renegar, R. H., Tatum, R. & Chen, Y. H. The first extracellular domain of claudin-7 affects paracellular Cl⁻ permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 87–91 (2007).
50. Alexandre, M. D., Lu, Q. & Chen, Y. H. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. *J. Cell Sci.* **118**, 2683–2693 (2005).
51. Mao, Y. & Baum, B. Tug of war—the influence of opposing physical forces on epithelial cell morphology. *Dev. Biol.* **401**, 92–102 (2015).
52. Slatton, G. M. & Rosenblatt, J. Tumour cell invasion: an emerging role for basal epithelial cell extrusion. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 495–501 (2014).
53. Wu, S. K. & Yap, A. S. Patterns in space: coordinating adhesion and actomyosin contractility at E-cadherin junctions. *Cell Commun. Adhes.* **20**, 201–212 (2013).
54. Vedula, S. R. *et al.* Mechanics of epithelial closure over non-adherent environments. *Nat. Commun.* **6**, 6111 (2015).
55. Fanning, A. S., Van Itallie, C. M. & Anderson, J. M. Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia. *Mol. Biol. Cell* **23**, 577–590 (2012).
56. Choi, W. *et al.* Remodeling the zonula adherens in response to tension and the role of afadin in this response. *J. Cell Biol.* **213**, 243–260 (2016).
57. Foty, R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J. Vis. Exp.* **52**, 2720 (2011).
58. Gustafsson, M. G. *et al.* Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys. J.* **94**, 4957–4970 (2008).
59. du Roure, O. *et al.* Force mapping in epithelial cell migration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 2390–2395 (2005).

Acknowledgements

We thank Patrick Tounian from the Armand Trousseau Hospital paediatric gastroenterology department (Paris, France), Marc Bellaïche and Jean-Pierre Hugot from the Robert Debré Hospital paediatric gastroenterology department (Paris, France) for contributing to the CTE biopsy collection. We thank the CTE patients and their family, for allowing us to study biopsies. We thank Sylvie Robine, René-Marc Mège, Maud Dumoux and Anne-Lise Haenni for critical reading of the manuscript. We thank Gianluca Greci and Mohammed Ashraf (Microfabrication facility, Mechanobiology Institute (MBI), National University of Singapore (NUS), Singapore) for the design and generation of silicon wafers. We thank Léo Veyrier, Thomas Eche, Vincent Leguillier and Victoria Djordjevic for technical help. We thank Sandra Colas and Vanessa Lory for their expertise (Unité de Recherche Clinique (URC), Necker Hospital, Paris, France). We thank Virginie Bazin from the Electron Microscopy facility of the Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS, Paris) for the SEM sample preparation and technical assistance during acquisitions. We thank François Waharte from the Nikon centre imaging facility (Curie Institute, Paris). We thank Rémi Le Borgne (ImagoSeine) for cell monolayer sample preparation for transmission electron microscopy. Confocal microscopy analyses were performed in the ImagoSeine microscopy facility (Institut Jacques Monod, IJM). High-resolution 3D-SIM and SP8 confocal analyses were acquired in the Nikon centre imaging facility (Curie Institute, Paris). This work was supported by grants from the GEFLUC Paris-Ile de France ‘Les entreprises contre le cancer’, from the ‘Fondation pour la Recherche Médicale’, from the ‘Association pour la Recherche contre le Cancer’, from ‘La Ligue, Comité de Paris’, ‘Initiatives d’excellence’ (Idex ANR-11-IDEX-0005-02)—Labex «Who Am I?» (ANR-11-LABX-0071) and from the ‘Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, AP-HP’ (Projets Hospitaliers de Recherche Clinique (PHRC) grants).

Author contributions

J.S., C.G., J.M., B.D., A.M., L.S., G.M., B.L. and D.D. performed the experiments. D.C., F.C., J.L., J.V., N.B. and O.G. provided patient biopsies. F.P., J.S., N.B. and O.G. participated in interpretation of the experiments and discussion. J.S., C.G., J.M., N.M., B.L. and D.D. designed the experiments. J.S., C.G., J.M. and D.D. performed analyses. J.S. and D.D. coordinated the overall research and experiments, and wrote the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

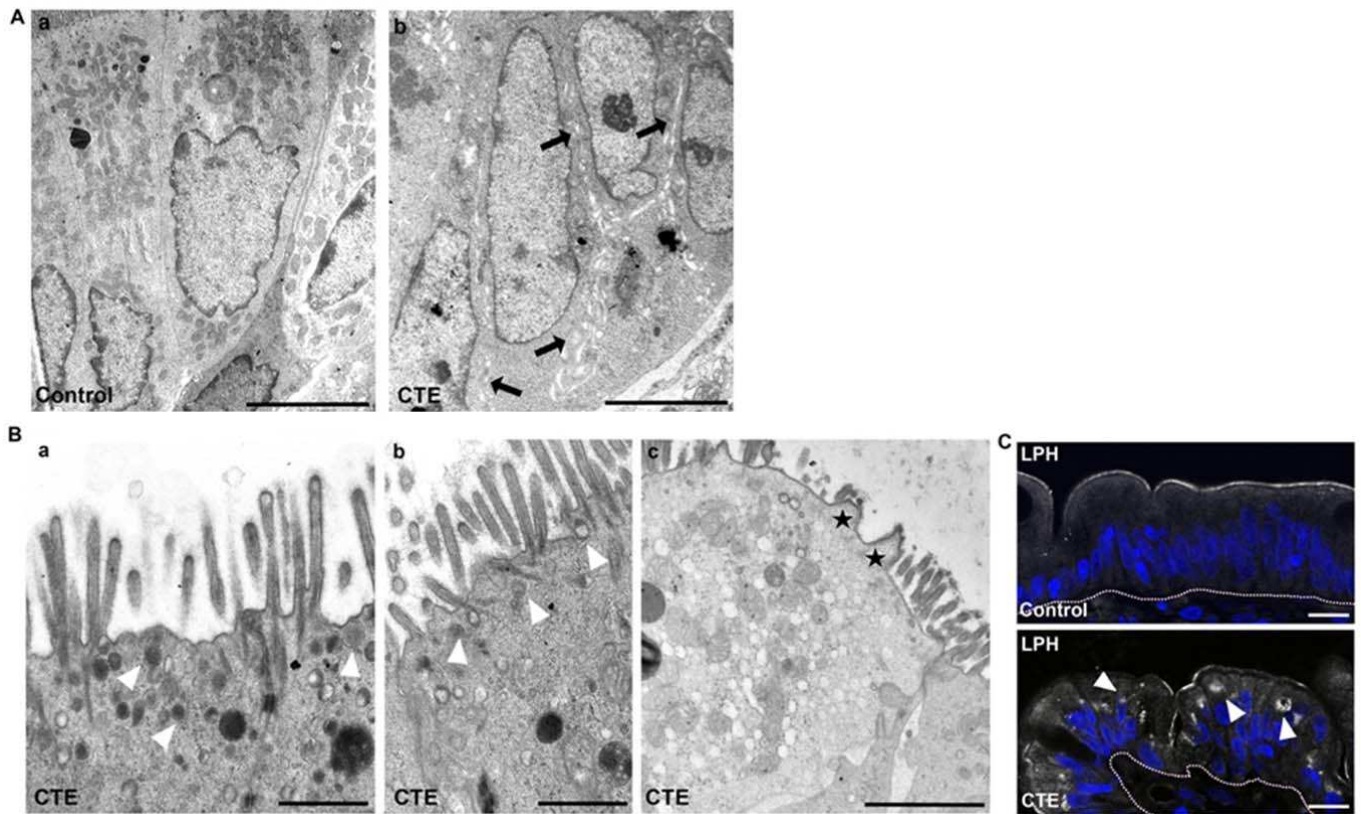
How to cite this article: Solomon, J. *et al.* Contractile forces at tricellular contacts modulate epithelial organization and monolayer integrity. *Nat. Commun.* **8**, 13998 doi: 10.1038/ncomms13998 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

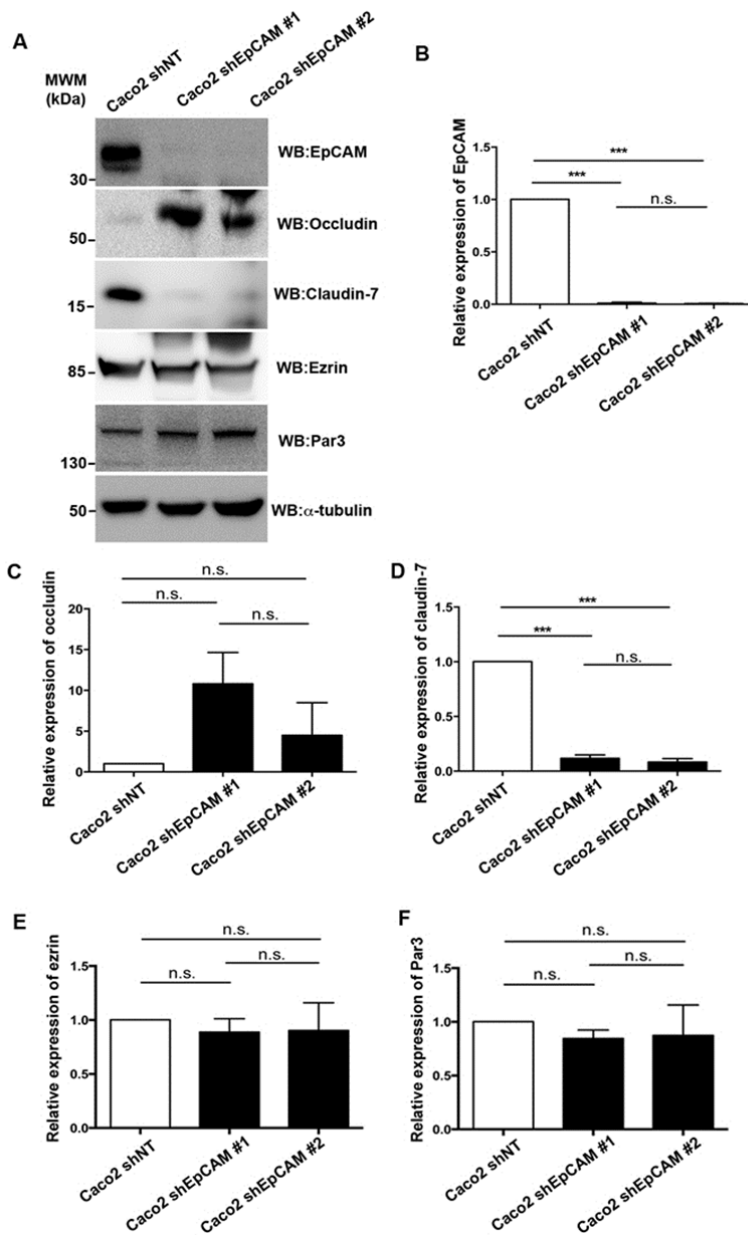


This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

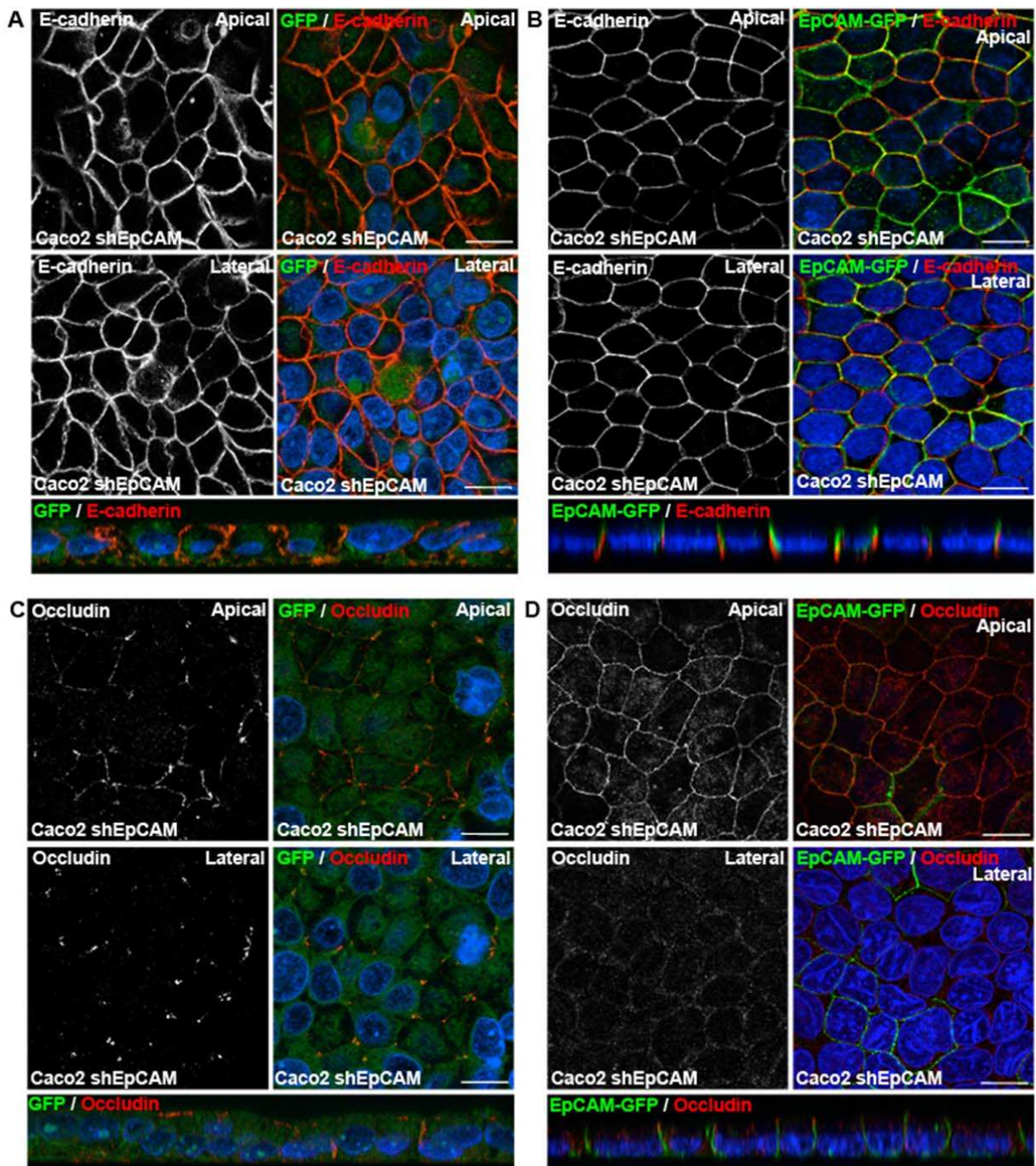
© The Author(s) 2017



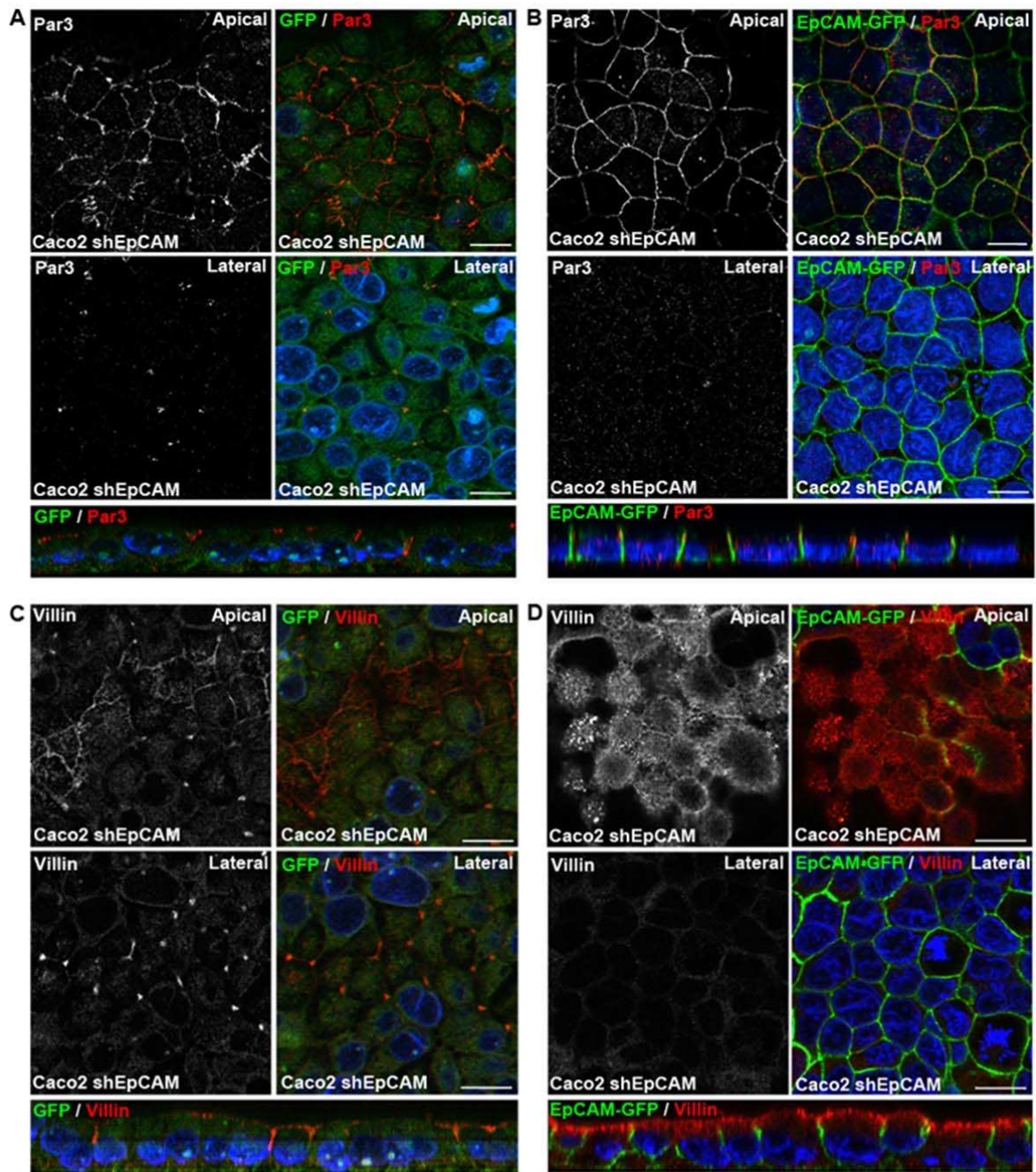
Supplementary Figure 1: Cell-cell adhesion and terminal web defects occur in CTE patients. (A), TEM ultrastructural analysis of lateral membranes in control (*a*) and CTE (*b*) biopsies. Arrows point at interdigitations on lateral membranes. $N_{(\text{Control})} = 3$ biopsies, $N_{(\text{CTE})} = 3$ biopsies. Scale bars, 5 μm . (B), TEM ultrastructural analysis of enterocyte apical cortex in CTE biopsies. **Ba-b**, White arrowheads point at abnormal accumulation of electron dense vacuoles in the terminal web in CTE samples. **Bc**, Black stars show plasma membrane herniations. $N_{(\text{Control})} = 3$ biopsies, $N_{(\text{CTE})} = 3$ biopsies. Scale bars **Ba-b**, 1 μm ; scale bar **Bc**, 2 μm . (C), Confocal microscopy analyses of LPH distribution after immunostaining on control (*upper panel*) or CTE (*lower panel*) biopsy paraffin sections. In CTE epithelia, LPH was accumulated in perinuclear compartments (*white arrowheads*). $N_{(\text{Control})} = 12$ biopsies, $N_{(\text{CTE})} = 6$ biopsies. Scale bars, 10 μm .



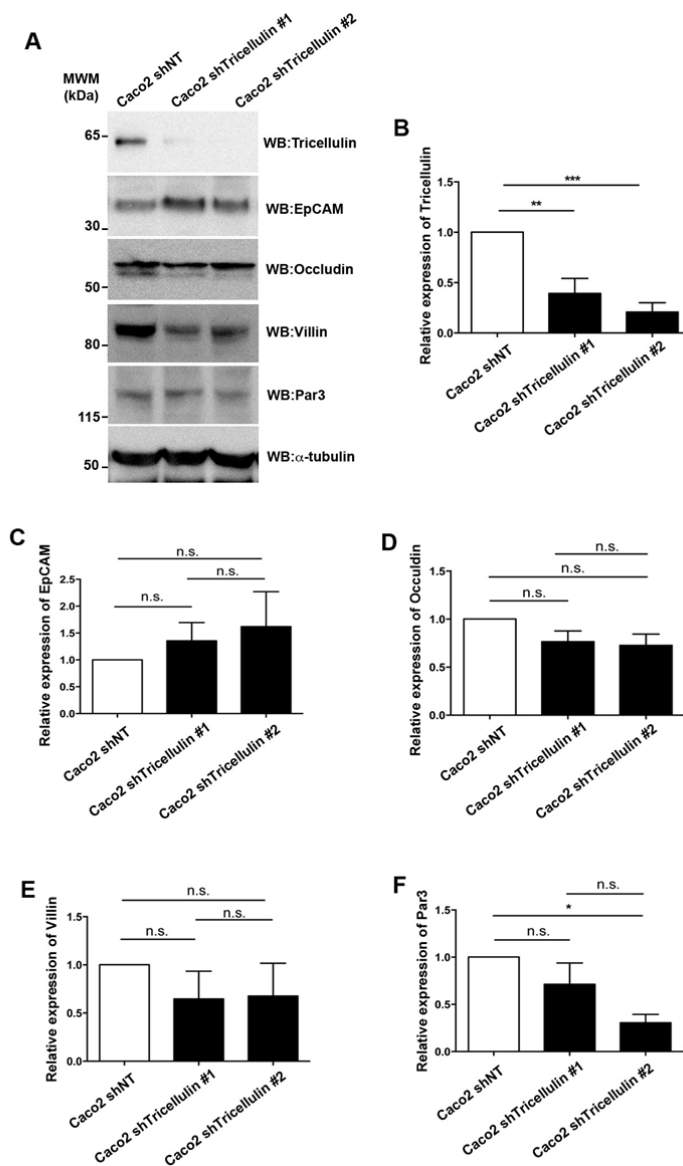
Supplementary Figure 2: Expression levels in EpCAM-depleted cells. (A) Western blot analysis of the level of the expression of EpCAM, occludin, claudin-7, ezrin and Par3 in control (*Caco2 shNT*) or EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM#1* and *Caco2 shEpCAM#2*) clones. α -tubulin was used as loading control. (B-F) Statistical analysis of EpCAM, occludin, claudin-7, ezrin or Par3 amounts relative to loading control amounts in control (*Caco2 shNT*) or EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM #1* and *Caco2 shEpCAM #2*) clones. The analysis was performed based on three independent experiments. Statistical significance was determined using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison tests. ***, *P*-value < 0.0001. Percentage of EpCAM expression in control cells = 100 %, in *Caco2 shEpCAM#1* cells = 1.08 ± 0.0009 %, and in *Caco2 shEpCAM#2* = 0.72 ± 0.003 %. Percentage of occludin expression in control cells = 100 %, in *Caco2 sh EpCAM #1* cells = 1081 ± 383 %, and in *Caco2 sh EpCAM #2* = 449.1 ± 399 %. Percentage of claudin-7 expression in control cells = 100 %, in *Caco2 sh EpCAM #1* cells = 11.71 ± 0.03 %, and in *Caco2 sh EpCAM #2* = 8.34 ± 0.03 %. Percentage of ezrin expression in control cells = 100 %, in *Caco2 sh EpCAM #1* cells = 88.75 ± 0.12 %, and in *Caco2 sh EpCAM #2* = 90.31 ± 0.26 %. Percentage of Par3 expression in control cells = 100 %, in *Caco2 sh EpCAM #1* cells = 84.62 ± 0.08 %, and in *Caco2 sh EpCAM #2* = 87.43 ± 0.28 %. Values are mean \pm s.e.m.



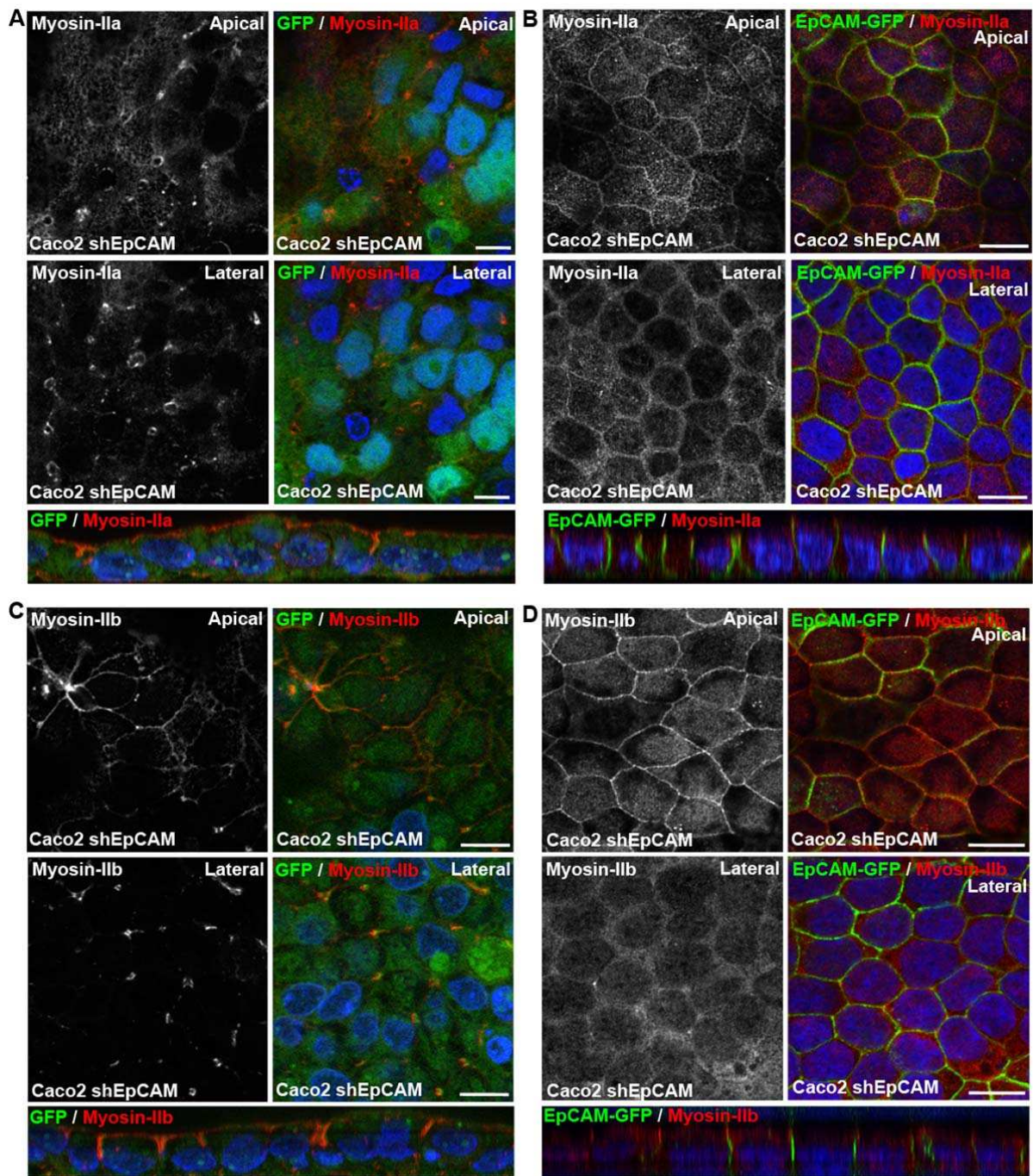
Supplementary Figure 3: Recovering of cell-cell adhesion integrity and tight junction belt positioning after EpCAM rescue in EpCAM-mutant cells. Confocal microscopy analysis of immunostainings for E-cadherin (*red*) (A-B) and occludin (*red*) (C-D), on the apical (*Apical*) and lateral (*Lateral*) sides in EpCAM-depleted cells transfected with plasmids coding for GFP (A and C) or shRNA resistant EpCAM-GFP (B and D) constructs. *xy* and *xz* views are presented. Scale bars, 5 μm. Nuclei were detected with Hoechst 33342 staining (*blue*).



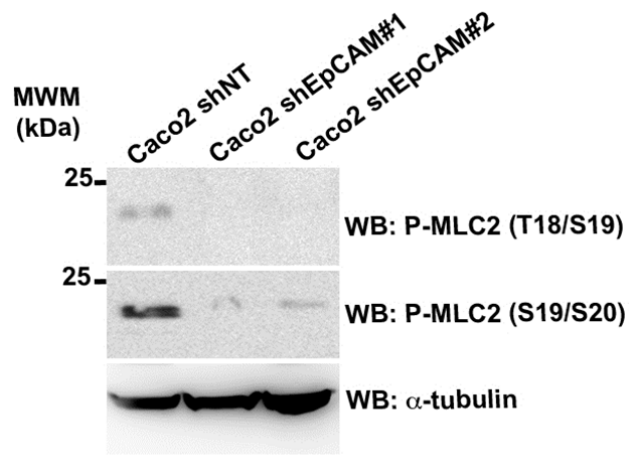
Supplementary Figure 4: Recovering of correct apical domain positioning after EpCAM rescue in EpCAM-mutant cells. Confocal microscopy analysis of immunostainings for Par3 (*red*) (A-B) and villin (*red*) (C-D), on the apical (*Apical*) and lateral (*Lateral*) sides in EpCAM-depleted cells transfected with plasmids coding for GFP (A and C) or shRNA resistant EpCAM-GFP (B and D) constructs. *xy* and *xz* views are presented. Scale bars, 5 μ m. Nuclei were detected with Hoechst 33342 staining (*blue*).



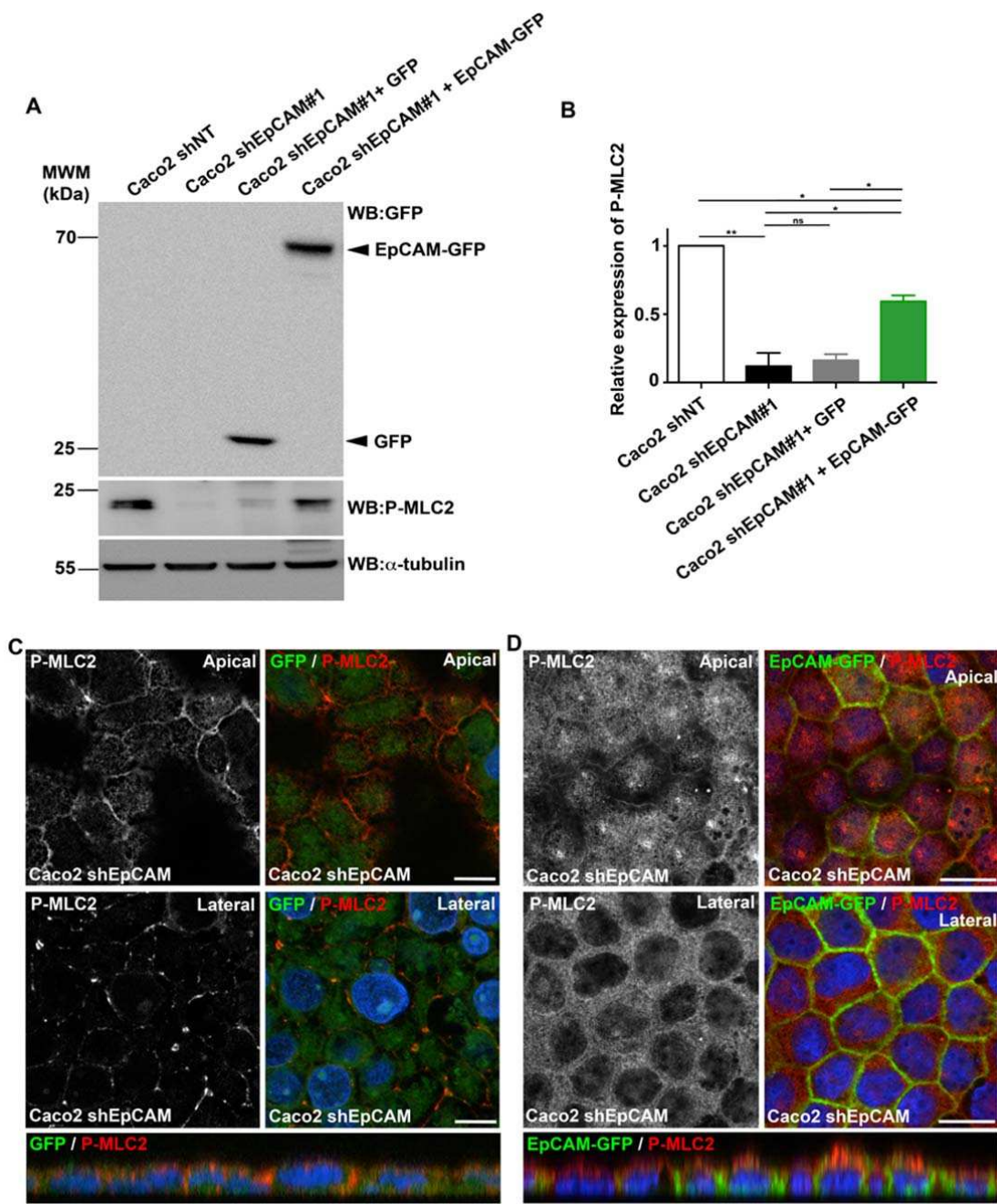
Supplementary Figure 5: Expression levels in tricellulin-depleted cells. (A) Western blot analysis of the level of the expression of tricellulin, EpCAM, occludin, villin and Par3 in control (*Caco2 shNT*) or tricellulin-depleted (*Caco2 shTricellulin #1* and *Caco2 shTricellulin #2*) clones. α -tubulin was used as loading control. (B-F) Statistical analysis of tricellulin, EpCAM, occludin, villin or Par3 amounts relative to α -tubulin amounts in control (*Caco2 shNT*) or tricellulin-depleted (*Caco2 shTricellulin #1* and *Caco2 shTricellulin #2*) clones. The analysis was performed based on three independent experiments. Statistical significance was determined using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison tests. *, P -value < 0.1, **, P -value < 0.01, ***, P -value < 0.001. Percentage of tricellulin expression in Caco2shNT cells = 100 %, in Caco2 shTricellulin#1 cells = 39.28 \pm 0.15 %, and in Caco2 shTricellulin#2 = 20.79 \pm 0.09 %. Percentage of EpCAM expression in Caco2shNT cells = 100 %, in Caco2 shTricellulin#1 cells = 135 \pm 0.34 %, and in Caco2 shTricellulin#2 = 162 \pm 0.65 %. Percentage of occludin expression in Caco2shNT cells = 100 %, in Caco2 shTricellulin#1 cells = 76.56 \pm 0.11 %, and in Caco2 shTricellulin#2 = 72.65 \pm 0.12 %. Percentage of villin expression in Caco2shNT cells = 100 %, in Caco2 shTricellulin#1 cells = 64.69 \pm 0.29 %, and in Caco2 shTricellulin#2 = 67.64 \pm 0.34 %. Percentage of Par3 expression in Caco2shNT cells = 100 %, in Caco2 shTricellulin#1 cells = 71.26 \pm 0.23 %, and in Caco2 shTricellulin#2 = 30.51 \pm 0.09 %. Values are mean \pm s.e.m.



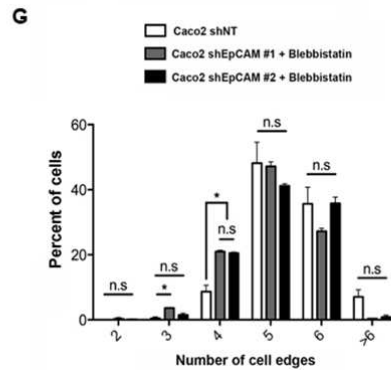
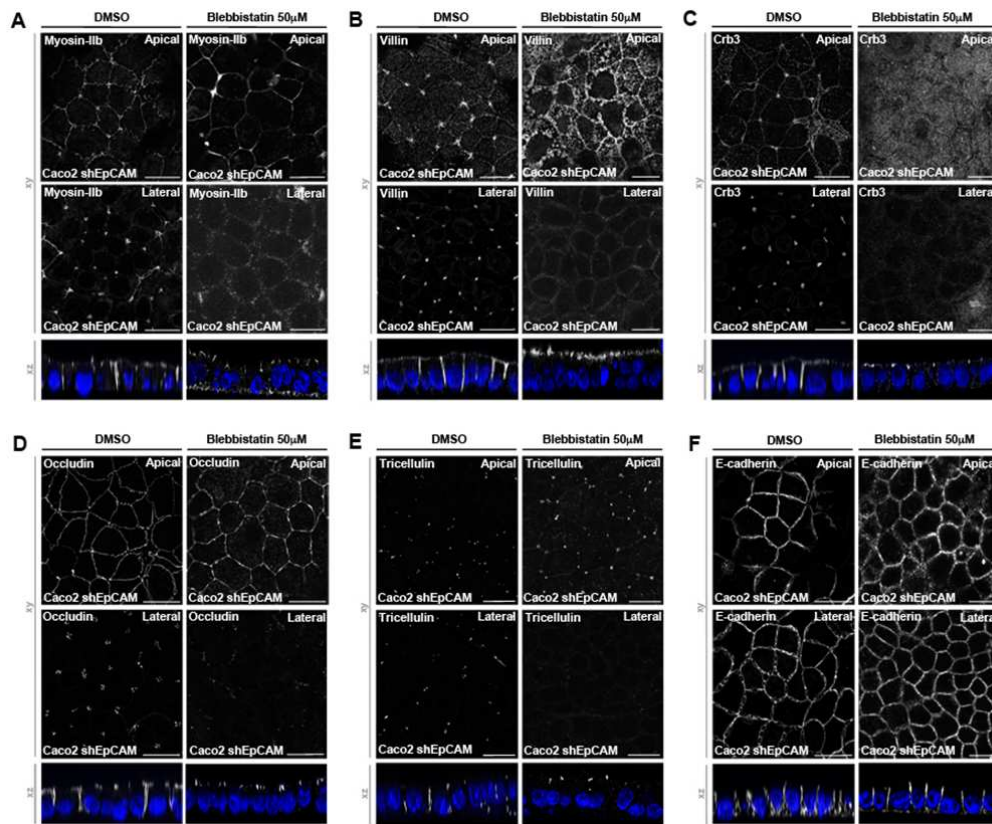
Supplementary Figure 6: Recovering of correct actomyosin positioning after EpCAM rescue in EpCAM-mutant cells. Confocal microscopy analysis of immunostainings for myosin-IIa (*red*) (A-B) and myosin-IIb (*red*) (C-D), on the apical (*Apical*) and lateral (*Lateral*) sides in EpCAM-depleted cells transfected with plasmids coding for GFP (A and C) or shRNA resistant EpCAM-GFP (B and D) constructs. *xy* and *xz* views are presented. Scale bars, 5 μm. Nuclei were detected with Hoechst 33342 staining (*blue*).



Supplementary Figure 7: P-MLC2 amounts are decreased in EpCAM-mutant cells Western blot analysis of P-MLC2 amounts in control (*Caco2 shNT*) or EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM#1* and *Caco2 shEpCAM#2*) cells, using antibodies directed against either P-MLC2 (T18/S19) or P-MLC2 (S19/S20). α -tubulin was used as loading control.

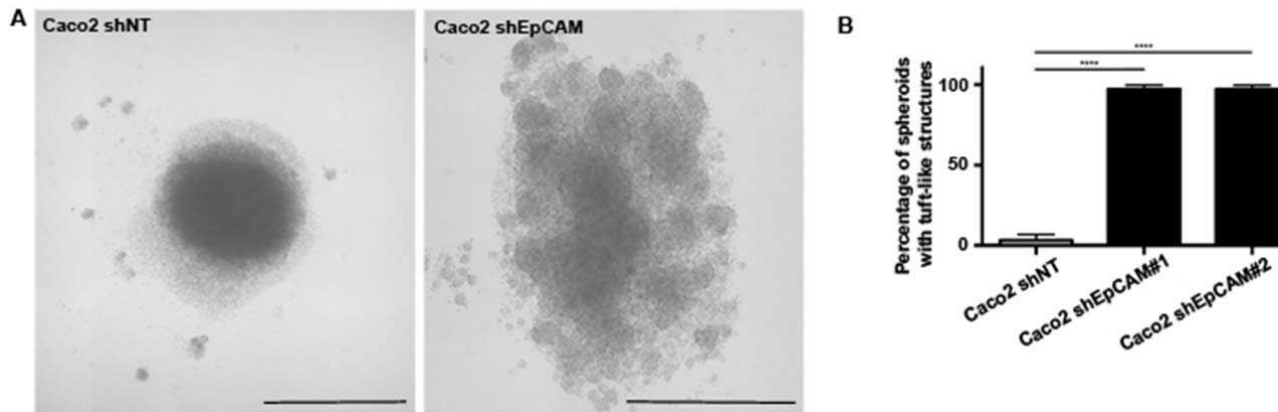


Supplementary Figure 8: Restoration of proper P-MLC2 amounts and distribution after EpCAM rescue in EpCAM-mutant cells. (A) Western blot analysis of P-MLC2 amounts in control (*Caco2 shNT*) or EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM#1*) cells, transfected either with GFP (*Caco2 shEpCAM#1+GFP*) or EpCAM-GFP (*Caco2 shEpCAM#1+EpCAM-GFP*) constructs. (B) Statistical significance was determined using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison tests. The analysis was performed based on three independent experiments. *, *P*-value < 0.1, **, *P*-value < 0.01. Percentage of P-MLC2 expression in *Caco2shNT* cells = 100 %, in *Caco2 shEpCAM#1* cells = 11.89 ± 9.74 %, in *Caco2 shEpCAM#1+GFP* = 16.21 ± 4.45 % and in *Caco2 shEpCAM#1+EpCAM-GFP* = 59.5 ± 4.34 %. Values are mean ± s.e.m. (C-D) Confocal microscopy analysis of immunostainings for P-MLC2 (red) on the apical (*Apical*) and lateral (*Lateral*) sides in EpCAM-depleted cells transfected with plasmids coding for GFP (C) or shRNA resistant EpCAM-GFP (D) constructs. *xy* and *xz* views are presented. Scale bars, 5 μm. Nuclei were detected with Hoechst 33342 staining (blue).



Supplementary Figure 9: Recovery of correct epithelial organization upon blebbistatin treatment. (A-F) Confocal microscopy analysis of myosin-IIb (A), villin (B), Crb3 (C), occludin (D), tricellulin (E) and E-cadherin (F) localization in Caco2 shEpCAM cells without or with 50 μ M blebbistatin treatment for 2 h. Scale bars, 5 μ m. (G) Statistical analysis of polygonal shape in control (*Caco2 shNT*, white) and 2h 50 μ M blebbistatin-treated EpCAM-deprived cells (*Caco2 shEpCAM#1 + blebbistatin*, gray, and *Caco2 shEpCAM#2 + blebbistatin*, black). Three independent experiments were performed. N (*Caco2shNT*) = 517 cells, N (*Caco2shEpCAM#1+blebbistatin*) = 732 and N (*Caco2shEpCAM#2+blebbistatin*) = 688. Percentage of Caco2 shNT cells with 2 cell edges = 0 %, with 3 cell edges = 0,455 \pm 0,455 %, with 4 cell edges = 8,673 \pm 1,967 %, with 5 cell edges = 48,154 \pm 6,422 %, with 6 cell edges = 35,652 \pm 5,131 %, with more than 6 cell edges = 7,067 \pm 2,224 %. Percentage of Caco2 shEpCAM#1 cells with 2 cell edges = 0,391 \pm 0,391 %, with 3 cell edges = 3,697 \pm 0,129 %, with 4 cell edges = 21,010 \pm 0,419 %, with 5 cell edges = 47,228 \pm 1,419 %, with 6 cell edges = 27,263 \pm 0,913 %, with more than 6 cell edges = 0,411 \pm 0,014 %. Percentage of Caco2 shEpCAM#2 cells with 2 cell edges = 0,149 \pm 0,149 %, with 3 cell edges = 1,480 \pm 0,547 %, with 4 cell edges = 20,509 \pm 0,313 %, with 5 cell edges = 41,156 \pm 0,648 %, with 6 cell edges = 35,811 \pm 1,889 %, with more than 6 cell edges = 0,896 \pm 0,518 %. Unpaired *t* tests, * *P*-value <0,01. Values are mean \pm s.e.m.

Hanging drop cultures



Supplementary Figure 10: Spheroid organization defects in hanging drop cultures of EpCAM-depleted cells. (A) Analyses of control (*Caco2 shNT*) or EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM*) cells in hanging drop cultures for 48 hours. Scale bars, 1mm. (B) Statistical significance was determined using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. ****, P -value < 0.0001. Percentage of spheroids with tuft-like structures in Caco2shNT cells = 3.2 ± 2.1 %, in Caco2 shEpCAM#1 cells = 97.2 ± 1.5 %, and in Caco2 shEpCAM#2 = 97.1 ± 1.4 %. Values are mean \pm s.e.m.

Figure 2A

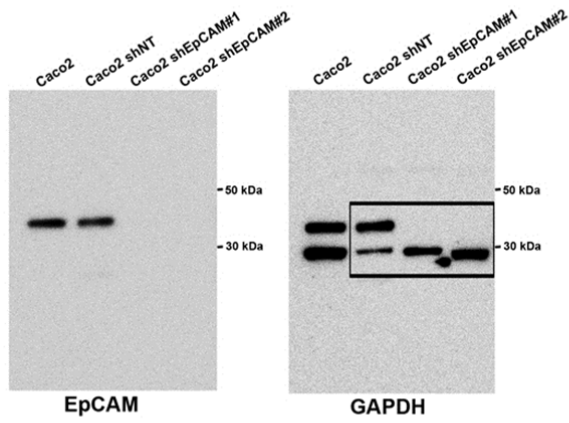


Figure 4E

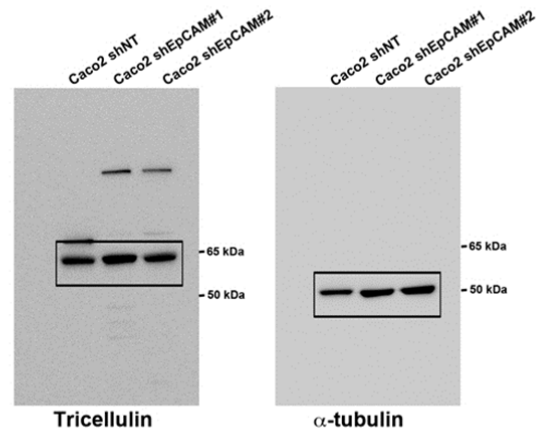


Figure 4G

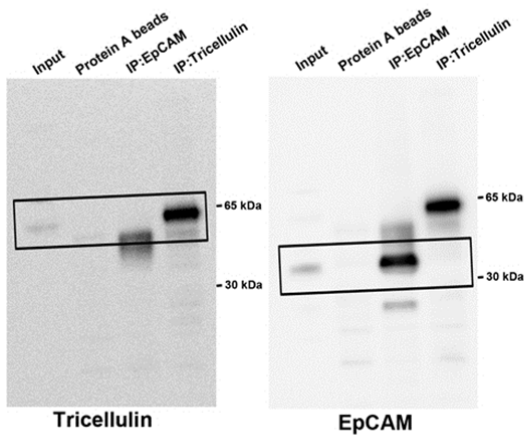
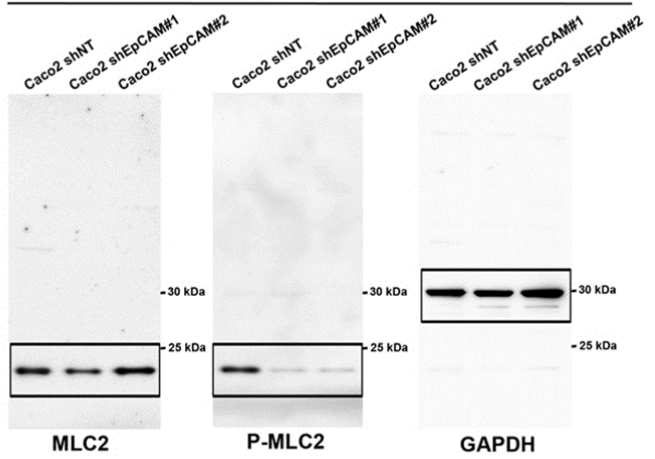
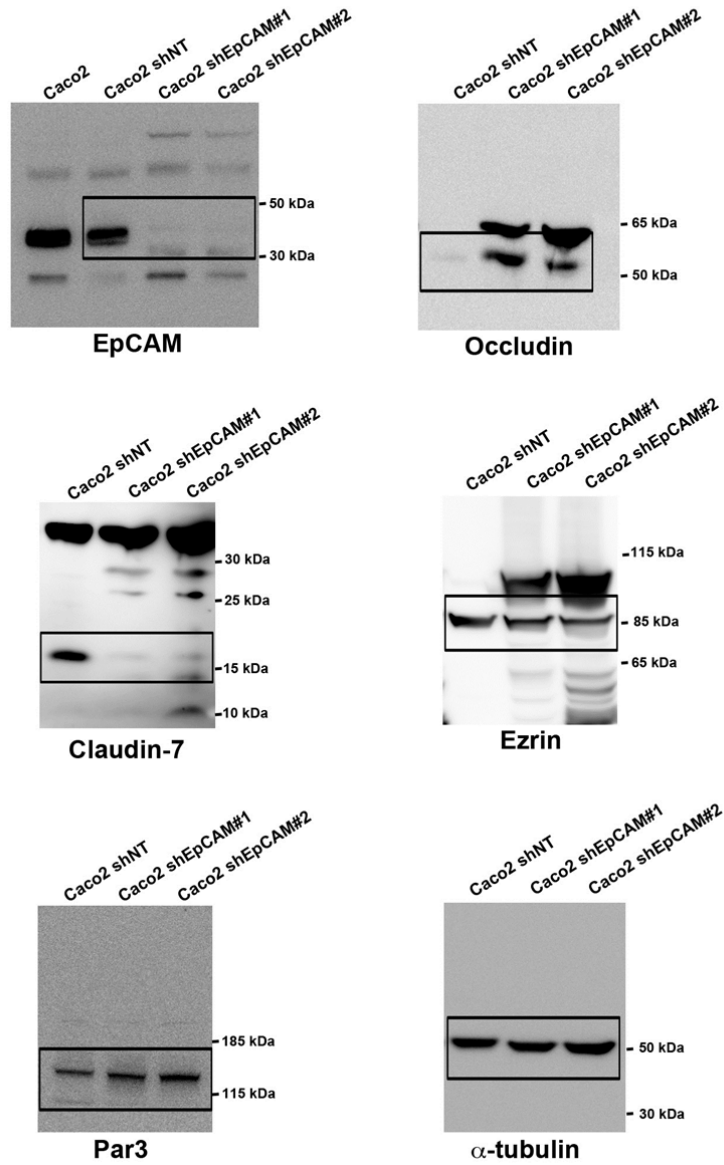


Figure 5G



Supplementary Figure 11: Uncropped original gels shown in the main manuscript. Western blots correspond to those shown in Figures 2A, 4E, 4G and 5G.

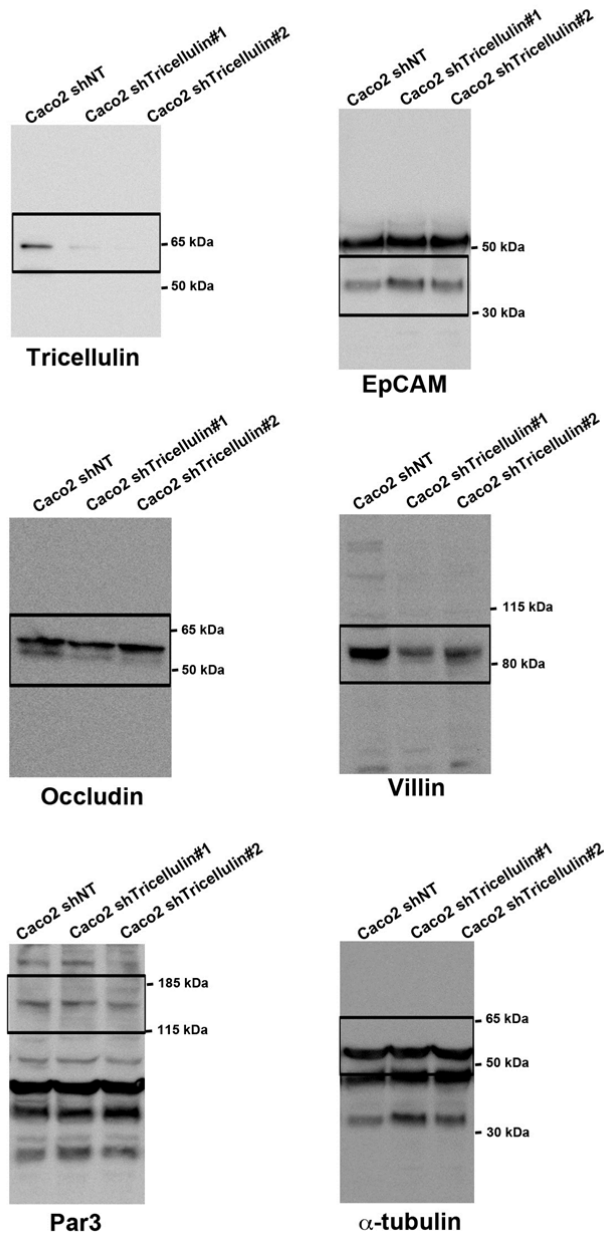
Supplementary Figure 2A



Supplementary Figure 12: Uncropped original gels shown in the in the Supplementary Information.

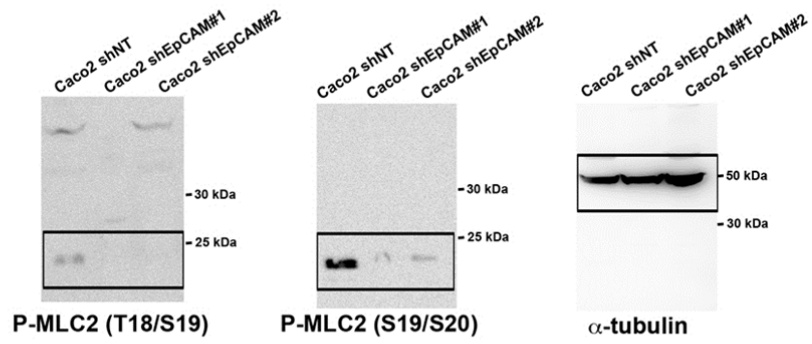
Western blots correspond to those shown in Supplementary Figure 2A.

Supplementary Figure 5A

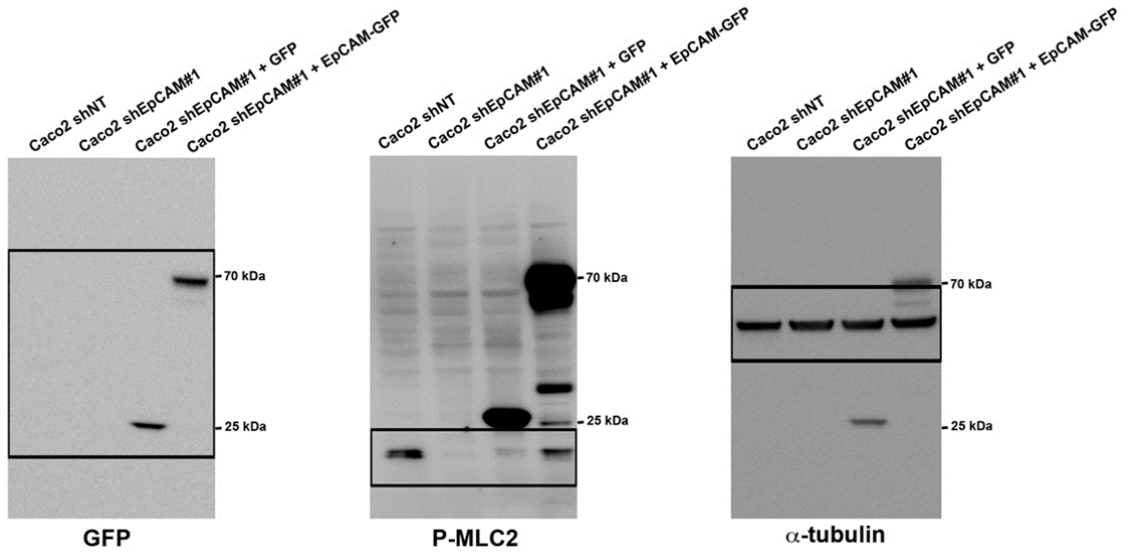


Supplementary Figure 13: Uncropped original gels shown in the Supplementary Information. Western blots correspond to those shown in Supplementary Figure 5A.

Supplementary Figure 7



Supplementary Figure 8



Supplementary Figure 14: Uncropped original gels shown in the Supplementary Information. Western blots correspond to those shown in Supplementary Figures 7 and 8.

3. Discussion

Cette première étude participe à la meilleure compréhension des fonctions d'EpCAM dans une monocouche épithéliale polarisée. Tout d'abord, nous avons validé la participation d'EpCAM au maintien des jonctions adhérentes dépendantes de la E-cadhérine, ainsi qu'il avait été observé par d'autres équipes sur des modèles animaux (Slanchev et al., 2009; Maghzal et al., 2013). De plus, nous mettons en évidence qu'EpCAM est requise pour une organisation correcte de la ceinture de jonctions serrées ; en son absence celles-ci sont distordues. Une interaction entre EpCAM et la Claudine-7 avait été décrite auparavant, au niveau des jonctions serrées (Ladwein et al., 2005; Lei et al., 2012). Selon nos données, dans l'épithélium intestinal la Claudine-7 n'est pas spécifiquement enrichie aux jonctions serrées (**fig. 2h**) mais répartie de manière homogène le long des membranes latérales, son expression est cependant effectivement réduite dans les cellules EpCAM-KO (**fig. supp. 2A, D**). Nous n'avons pas pu mettre en évidence une interaction directe entre EpCAM et Claudine-7 au cours de nos expériences. Il est donc possible que cette interaction dépende du type cellulaire analysé, ou puisque nous observons un effet sur son niveau d'expression, qu'elle soit indirecte dans notre système.

De manière intéressante, nos résultats apportent également une nouvelle vision de la protéine EpCAM en établissant un lien entre EpCAM et les points de contacts tricellulaires. Les jonctions tricellulaires sont spécifiquement touchées par la perte d'EpCAM, qui provoque la redistribution de la tricelluline au niveau basal des puits formés par l'activité ectopique de la myosine-II, et entraîne l'ensemble du domaine apical de l'entérocyte en ces points particuliers. Nous n'avons pas détecté d'interaction entre la tricelluline et EpCAM (**fig. 4g**), et bien que l'extinction de la tricelluline ne reproduise pas les défauts observés en absence d'EpCAM (**fig. 4**), il est surprenant de constater la concentration de l'actomyosine et des éléments régulateurs de la polarité apicale à cette localisation précise. Les jonctions tricellulaires apparaissent cependant comme des points particuliers de régulation de l'actomyosine. En effet, l'extinction de la tricelluline réduit la formation de fibres d'actine dans une monocouche de cellules MTD-1A (Oda et al., 2014). Ce travail indique par ailleurs un enrichissement de la RhoGEF Tuba, un régulateur de Cdc42 aux jonctions tricellulaires (Oda et al., 2014), supportant aussi l'hypothèse d'une régulation particulière du cytosquelette d'actine à ce niveau. L'effet d'EpCAM sur la structure des jonctions tricellulaires est donc très probablement indirect, et dépend de la régulation d'EpCAM sur l'actomyosine. EpCAM pourrait jouer un rôle de régulateur de la distribution et/ou l'activité contractile de la myosine-II aux jonctions cellulaires. En effet, en son absence l'activité de la myosine-II est redistribuée des jonctions bicellulaires vers les jonctions tricellulaires (**Figure 24**).

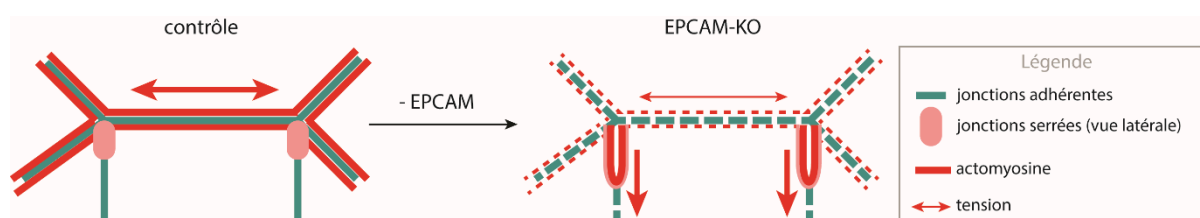


Figure 24 : Schéma de l'effet d'EpCAM sur la distribution de l'activité contractile aux jonctions. Représentation récapitulative des hypothèses de l'action d'EpCAM sur la tension et la structure des jonctions cellulaires. EpCAM maintient l'activité de l'actomyosine homogène aux jonctions bi- et tri-cellulaires. En son absence, le déséquilibre entre les forces exercées aux deux types de jonctions affaiblit leurs structures.

L'activité contractile aux contacts bicellulaires participe au recrutement des cadhérines et au renforcement des jonctions adhérentes maintenues par E-cadhérine (Yamada and Nelson, 2007; Liu et al., 2010; Yonemura et al., 2010). Cette idée permettrait donc d'expliquer l'affaiblissement des jonctions adhérentes maintenues par la E-cadhérine aux contacts bicellulaires suite à l'extinction d'EpCAM. De même, les composants des jonctions serrées sont dépendants du niveau de tension aux contacts bicellulaires (Spadaro et al., 2017) ; la redistribution de l'activité contractile aux points de contacts tricellulaires expliquerait la distorsion et donc la défaillance des jonctions serrées. Beaucoup d'études ont décrit l'importance d'un niveau de tension aux jonctions, notamment pour le maintien de l'intégrité épithéliale (Acharya et al., 2018; Pinheiro and Bellaïche, 2018), cependant peu d'entre elles ont considéré les mécanismes de régulation en amont. Nos résultats mettent en lumière un point important et pour l'instant peu exploré : comment est régulée l'activité de la myosine-II aux jonctions ? Existe-il une différence au niveau spatial de cette régulation ? Ou au niveau temporel ? Les kinases et phosphatases régulatrices de la myosine-II sont-elles différemment réparties suivant les jonctions ? Et si tel est le cas, comment cette information spatiale est-elle conservée ou ré-établie au cours de la dynamique des épithéliums qui remodelent régulièrement leurs jonctions face à des stress ou en homéostasie (division, intercalation, ...) ?

La restauration du phénotype contrôle suite au traitement à la blebbistatine des monocouches EpCAM-KO (**fig. 6f-h**) indique que, bien que le niveau global de contractilité soit faible, une hyperactivation localisée est responsable de la perturbation de l'ensemble de la monocouche. Ce résultat met en lumière l'importance de la composante spatiale de la régulation qui pour l'instant n'est pas suffisamment considérée par rapport au niveau d'activation global de la contractilité. Il est probable que l'organisation des cellules épithéliales et leur réponse au stress soient fortement dépendante d'un équilibre de la tension qui s'exerce aux jonctions.

L'actomyosine tient également une place centrale dans le processus de migration cellulaire, à la fois aux jonctions cellulaires pour la coordination des cellules pendant la migration collective, mais aussi au niveau des jonctions avec le substrat. Il serait donc également intéressant d'analyser le cytosquelette d'actine des cellules EpCAM-KO pendant la migration afin de caractériser la présence

possible de défauts de distribution de l'actomyosine et donc des forces de traction nécessaires au déplacement.

La caractérisation détaillée de l'épithélium dysplasique des patients CTE que nous avons effectuée permet de relier la structure désorganisée de l'épithélium des patients avec les disfonctionnements liés à la pathologie. Ce résultat démontre pour la première fois qu'un défaut d'activité contractile au niveau cellulaire est responsable du développement d'une maladie rare chez l'Homme. La perturbation de la polarité apico-basale des entérocytes, avec l'accumulation du domaine apical et de la bordure en brosse aux jonctions tricellulaires, explique l'insuffisance intestinale des patients puisque les enzymes digestives sont majoritairement présentées à la bordure en brosse. En outre, nos résultats démontrent définitivement l'importance du réseau d'actomyosine pour la mise en place et la stabilisation de la bordure en brosse ; cette idée avait été émise par Mark Mooseker dans les années 1980 (Keller et al., 1985), et reprise par l'équipe du Pr Wedlich-Soldner. Ils ont montré dans des cellules MDCK que le réseau d'actomyosine serait requis pour le déplacement latéral des microvillosités au pôle apical (Klingner et al., 2014). Nos résultats permettent d'affirmer qu'en effet, une activité contractile est requise au pôle apical pour le maintien de l'architecture de la bordure en brosse.

De plus, la distorsion des jonctions serrées, ainsi que la déstabilisation des contacts tricellulaires, laisse présager de faiblesses aux jonctions tricellulaires. Il existe une littérature abondante sur la fonction de barrière de la diffusion paracellulaire des jonctions serrées, à la fois aux contacts bicellulaires et tricellulaires (Masuda et al., 2011; Furuse et al., 2014; Zihni et al., 2016). La déformation de ces jonctions explique possiblement les symptômes de diarrhée persistante des patients atteints de CTE. Enfin, la déstabilisation de la E-cadhérine dans le cytoplasme des cellules EpCAM-KO (**fig. 1e et fig. 2b, d, e**) qui fragilise les jonctions adhérentes est une piste intéressante pour la formation des lésions tissulaires en forme de touffes. Les jonctions E-cadhérine sont des sites importants de mécanotransduction (Ladoux et al., 2015), leur affaiblissement rend donc probablement la monocouche épithéliale plus sensible aux stress mécaniques ; d'ailleurs, le défaut de stabilisation de la E-cadhérine est plus sévère lorsque les cellules EpCAM-KO sont cultivées sur substrats 3D qu'en 2D, avec apparition d'E-cadhérine dans des compartiments intracytoplasmiques (**fig. 8f**). La diminution de l'activité contractile globale de la monocouche qui serait responsable de la déstabilisation de la E-cadhérine pourrait expliquer, en plus de la répartition aberrante des forces de tension au sein de la monocouche, l'apparition des touffes dans l'épithélium EpCAM-KO face à la géométrie des villosités synthétiques, phénomène qui ne se produit pas dans le système de culture en 2D.

Jusqu'à présent, la majorité des études concernant la mécanotransduction s'est concentrée sur la réponse des cellules à la rigidité du substrat, souvent dans le contexte de la migration et en cellule unique (Trichet et al., 2012; Kurniawan et al., 2016; Gupta et al., 2016). En comparaison, très peu d'études ont entrepris de caractériser l'effet d'une géométrie en 3D sur le comportement cellulaire, en particulier dans les monocouches épithéliales (Xi et al., 2017). Grâce aux techniques de microfabrication disponibles au laboratoire, nous avons pu mettre en place des cultures 3D et analyser le comportement épithélial sur ces substrats. L'analyse des épithéliums sur une géométrie en 3D était alors novatrice dans notre champ de recherche. Nous avons observé que les cellules EpCAM-KO ne parviennent pas à s'organiser en monocouche épithéliale. Ce résultat montre que l'action d'EpCAM sur l'activité contractile des jonctions est requise pour que l'épithélium s'adapte aux contraintes physiques de son environnement, ici la géométrie du substrat.

Pour résumer, cette étude m'a permis de mettre en évidence d'EpCAM est requise pour stabiliser différents types de jonctions cellulaires et pour maintenir la polarité apico-basale des cellules épithéliales, et ce via la régulation spatiale de la distribution de l'actomyosine. Cette action d'EpCAM est cruciale pour maintenir l'intégrité tissulaire épithéliale.

Chapitre 4 – Impact d’EpCAM sur la distribution et l’activité de RhoA

1. Présentation des résultats

La découverte d'EpCAM dans les années 70 par plusieurs équipes différentes, par criblage d'antigènes présents à la surface de cellules cancéreuses, a conduit à lui donner un grand nombre de noms (e.g. CD326, 17-1A, TROP-1, etc...). Depuis 2007, en référence à sa présence aux contacts cellulaires et sa capacité à induire l'adhérence cellulaire (Litvinov et al., 1994), il a été convenu d'uniformiser la nomenclature de cette protéine sous le nom EpCAM (Baeuerle and Gires, 2007). Le modèle proposé de l'adhérence cellule-cellule par EpCAM consiste en la formation de *cis*-dimères par deux molécules d'EpCAM à la membrane d'une cellule, puis de l'interaction de deux dimères en un tétramère qui relierait les cellules voisines (Trebak et al., 2001; Pavšič et al., 2014). Au début de ma thèse, l'ensemble des travaux concernant cette protéine étaient donc focalisés sur sa participation directe, ou indirecte par signalisation, aux jonctions intercellulaires.

Notre première étude démontre clairement que la perte d'EpCAM modifie la distribution et l'activité de l'actomyosine, avec un impact important sur le maintien de la polarité apico-basale des cellules épithéliales. Si l'on considère en parallèle, la ré-expression d'EpCAM dans de nombreux cancers et les données indiquant sa participation à la migration cellulaire, ces résultats interrogent sur la possibilité d'un effet plus large d'EpCAM sur le cytosquelette d'actine et les autres processus qui en dépendent, tels que l'adhérence cellule-substrat, la migration ou la division cellulaire.

Dans le contexte d'une monocouche épithéliale polarisée, le domaine baso-latéral des entérocytes ne semblait pas perturbé de façon évidente. Cependant, pour obtenir des domaines apicaux différenciés, avec la présence d'une bordure en brosse bien établie, les cellules Caco-2 étaient ensemencées à forte densité et maintenues en culture pendant 21 jours. Les cellules prennent alors une forme colonnaire et forment une monocouche compacte, ce qui laisse peu de possibilité de mouvement. Il est donc possible que des défauts au niveau basal, qui perturberaient la migration cellulaire, ne soient pas visibles dans ce système de culture. Les études réalisées *in vivo* tendent à favoriser cette hypothèse. En effet, celles-ci décrivent un ralentissement, voire un arrêt total, des mouvements morphogénétiques dans les embryons de Xénope où l'expression d'EpCAM est éteinte (Maghzal et al., 2010, 2013). L'analyse en microscopie électronique à transmission des cellules épithéliales lors de l'épibolie du poisson-zèbre révèle que les cellules des embryons EpCAM-MO forment des protrusions plus petites mais plus larges que celles des embryons sauvages, résultant en une migration ralentie (Slanchev et al., 2009). Afin de clarifier la relation entre la protéine EpCAM et l'actomyosine, nous avons entrepris d'analyser l'effet de son extinction sur le potentiel d'adhérence et de migration cellulaire.

Mes premières expériences de migration collective ont montré que le déplacement de la monocouche épithéliale était ralenti en absence d'EpCAM. Ce résultat se rajoute aux données

contradictoires concernant l'effet d'EpCAM sur la migration cellulaire, tantôt positif *in vitro* en monocouche de cellules MDCK (Barth et al., 2018), tantôt négatif *in vivo* (Slanchev et al., 2009). De façon surprenante j'ai noté que, même en cellule unique, les cellules EpCAM-KO présentent des défauts de migration cellulaire (**fig. supp. 1a-c**). Ce résultat étonnant m'a poussé à continuer l'analyse des effets de l'extinction d'EpCAM sur le cytosquelette en cellule unique. J'ai donc utilisé les techniques de biologie cellulaire et l'expertise en mécanobiologie du laboratoire pour caractériser le phénotype des cellules EpCAM-KO dans le contexte de l'adhérence au substrat et la migration.

Ce défaut de migration est aussi visible en cellule unique et s'explique probablement par le phénotype le plus marquant, à savoir l'absence de polarité avant-arrière (**fig. 1e-h**). L'analyse par western blot et immunofluorescence de la présence d'EpCAM en cellule unique montrant qu'EpCAM est présente et autant exprimée dans cette condition qu'en monocouche polarisée (**fig. 1a-d**), j'ai donc entrepris de caractériser le phénotype EpCAM-KO en cellule unique. Mes résultats montrent que la perte d'EpCAM est responsable de la désorganisation du cytosquelette d'actine, définie par le blocage de la maturation des fibres de stress (**fig. 2**), suite à une sur-activation ectopique de la GTPase RhoA. En absence d'EpCAM, RhoA activé est maintenu à la membrane d'une population d'endosomes de recyclage (**fig. 8**). Le suivi par vidéomicroscopie de RhoA activé démontre que la dynamique de cette GTPase est nécessaire à la mise en place de la polarité avant-arrière des cellules Caco2, puisqu'elle est bloquée en absence d'EpCAM (**fig. 6**). L'analyse des différentes voies de trafic a permis de montrer l'existence d'un transport commun d'EpCAM et RhoA activé via la voie de recyclage rapide dépendante de Rab35 et EHD1 (**fig. 7**).

Prises ensemble, les données que j'ai obtenues montrent pour la première fois :

- (i) La dynamique de la GTPase RhoA pendant l'adhérence et la polarisation avant-arrière de cellules épithéliales
- (ii) La participation d'EpCAM à cette dynamique et son importance pour l'organisation et l'activité de l'actomyosine pendant l'adhérence et la migration cellulaire
- (iii) Un rôle pour EpCAM en cellule unique

Ces résultats sont regroupés dans un article prêt pour soumission et provisoirement intitulé « Spatio-temporal modulation of cortical RhoA zone conditions actomyosin activity in epithelial cells » que je vous présente ci-dessous.

2. Spatio-temporal modulation of cortical RhoA zone conditions actomyosin activity in epithelial cells

Spatio-temporal modulation of cortical RhoA zone conditions actomyosin activity in epithelial cells

Gaston Cécile ¹, De Beco Simon ¹, Doss Bryant ², Pan Meng ², Benlamara Sarah ¹, Gauquelin Estelle ¹, D'Alessandro Joseph¹, Lim Chwee Teck ², Ladoux Benoit ¹ and Delacour Delphine ^{1*}

¹ Cell adhesion and mechanics, Institut Jacques Monod, CNRS UMR7592, Paris Diderot University, 75205 Paris Cedex 13, France

² Mechanobiology Institute, T-lab, Singapore 117411, Singapore

* Corresponding author:

Delphine Delacour

« Cell adhesion and mechanics » group, Institut Jacques Monod, CNRS-UMR7592, Paris Diderot University, 15 Rue Hélène Brion, 75013 Paris, France

Phone: +33 1 57 21 80 69

delphine.delacour@ijm.fr

Keywords: cell polarity, cell contractility, RhoA, EpCAM, trafficking

Summary

Actomyosin organization and force-generating property are the basis of spreading and cell migration behavior. While these processes are often studied in fibroblastic cells, very little is known about the regulators of actomyosin distribution and activity in epithelial cells. EpCAM, an epithelial specific protein described as a cell adhesion molecule, was shown to regulate cell contractility but the molecular mechanism involved is still incompletely understood. In this study we report that EpCAM is responsible for the correct organization and contractility of actin fibers in epithelial cells, through the modulation of RhoA dynamics. EpCAM depletion induces the accumulation of an intracellular active RhoA pool at endosomal membranes, and increases actomyosin activity, leading to tensile regulation failure. Our results reveal that EpCAM participates to RhoA dynamics, by directing the endosomal pathways followed by the GTPase for its recycling. The inability to remodel this intracellular RhoA cortical zone in absence of EpCAM prevents epithelial cells to reorganize their actomyosin cytoskeleton and hinder spreading, front-rear polarity establishment and cell migration. Our data demonstrate that EpCAM achieve this regulation in single cell, and therefore we propose that EpCAM function as a cell adhesion molecule is revised to that of a cortical cell contractility regulator.

Introduction

Biological processes as diverse as cell division, extrusion, maintenance of cell shape or morphogenetic movements rely on the proper regulation of the actomyosin cytoskeleton distribution and activity (Rosenblatt et al., 2001; Green et al., 2012; Munjal and Lecuit, 2014; Munjal et al., 2015; Heer and Martin, 2017). These cellular processes are driven by the development of internal forces (Yamada and Nelson, 2007; Abe and Takeichi, 2008; Papusheva and Heisenberg, 2010). Being subjected to the most acute remodeling events, epithelial tissues are especially sensitive to any cues affecting their tensional homeostasis.

Tension generation relies on the presence and the activity of the non-muscle myosin-II motor. Phosphorylation of its regulatory light chain MRLC on serine 19 (S19) and threonine (T18) favors myosin-II ATPase activity and assembly with actin filaments (Craig et al., 1983; Watanabe et al., 2007; Vicente-Manzanares and Horwitz, 2010). In addition, myosin-II dephosphorylation is required for the motor displacement along actin fibers (Watanabe et al., 2007). Several signaling pathways modulate myosin-II phosphorylation, targeting different target kinases, among which Myosin Light Chain Kinase (MLCK) is the most specific (Holzapfel et al., 1983; Vicente-Manzanares et al., 2009). Rho-associated coiled coil-containing kinases (ROCK) promotes contractility by MRLC phosphorylation but also by inactivating the Myosin Light Chain Phosphatase (MLCP) (Amano et al., 2000; Vicente-Manzanares et al., 2009). The small GTPase RhoA mediates ROCK stimulation (Julian and Olson, 2014), therefore its distribution and activity levels must be tightly controlled to ensure the correct contractile response within the cell (Agarwal and Zaidel-Bar, 2019). RhoGTPases are described as molecular switches, as they transition between an activated (GTP-loaded) and inactivated (GDP-loaded) state. This cycling between inactive and active form, promoted by the sequential action of its guanine nucleotide exchange factors (GEFs) that promote GTP-loading, and GTPase-activating proteins (GAPs) that favor GTP hydrolysis (Rossman et al., 2005; Bos et al., 2007; Hodge and Ridley, 2016), is important for the maintenance of active RhoA zones. RhoA cycling would occur near the plasma membrane, where the majority of its GEFs and GAPs are located. Moreover, RhoA activation facilitates its translocation to the plasma membrane (Michaelson et al., 2001). It is now clear that RhoA inactivation is as important as its activation, since it enables a pulsatile behavior of myosin-II activity needed for efficient contractility (Mason et al., 2016; Teo and Yap, 2016). Current research efforts particularly focus on understanding the upstream controlling mechanisms of this canonical contractility regulator.

EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) is a transmembrane protein, exclusively expressed in epithelial cells in physiological conditions. Although it was primarily described as a Ca²⁺-

independent cell-cell adhesion molecule (Litvinov et al., 1994; Balzar et al., 1998), its conflicting functional interaction with E-cadherin and recent structural analyses tend to challenge this statement (Litvinov et al., 1997; Winter et al., 2003, 2007; Pavšič et al., 2014; Gaber et al., 2018). Recent studies reveal that EpCAM behaves as an intriguing player in the regulation of actomyosin contractility (Maghzal et al., 2013). In agreement with this hypothesis, we demonstrated that loss of EpCAM triggers inappropriate distribution and magnitude of contractility, with a major impact on the apico-basal polarity maintenance and epithelial monolayer integrity, leading to the development of tissue lesions characteristics of a rare human disease (Salomon et al., 2017).

Here we analyzed the role of EpCAM in contractility homeostasis of unpolarized, isolated cells and its impact on their migratory properties. We report the existence of an intracellular active RhoA zone at the cell cortex. There, EpCAM potentiates active RhoA recycling back to plasma membrane through endosomal compartments, and thus ensures proper contractility for stress fiber maturation in epithelial cells. We propose that EpCAM function as a cell adhesion molecule is revised to a more general role of cortical cell contractility regulator.

Results

EpCAM is required for cell polarity independently of cell-cell contacts

We first determined the expression of EpCAM in epithelial Caco2 cells cultured on collagen-coated substrates at different culture times, *i.e.* either as 21-days monolayers or 2-days post-plating at very low density to obtain a vast majority of single cells. Unexpectedly, western blot analysis showed that EpCAM is already expressed in single cells at a level comparable to monolayers (Figure 1a-b). The relation between EpCAM and cell-cell contacts is widely reported (Schnell et al., 2013; Mueller et al., 2014; Herreros-Pomares et al., 2018), therefore we questioned its distribution in isolated cells. Labelling of endogenous EpCAM, or detection of an exogenous EpCAM-GFP construct, revealed that it localizes in dynamic vesicular and tubular structures which are enriched at the apical cortex of individual epithelial cells (Figure 1c-e; Supplementary video 1). This distribution suggested an active function in single cells and prompted us to test the requirement of EpCAM in isolated cells by morphological and dynamical analyses. For that purpose, we used stable control and EpCAM-silenced Caco2 clones that we previously established (Salomon et al., 2017). The impact of EpCAM silencing on individual cell behavior was first assessed by time-lapse imaging of cell spreading and migration. 2 hours after spreading, control cells already exhibited front-rear polarity and an active lamellipodial activity concomitant with motile behavior (Supplementary video 2; Figure 1e ; Supplementary Figure 1a, c). In sharp contrast, EpCAM-depleted spread cells showed an isotropic

organization, a circular or “fried-egg” shape, characteristic of unpolarized single cells (Figure 1f). In addition, EpCAM-KO cells displacement on the substrate was less extensive, showing a loss of directionality and reduced protrusion activity (Supplementary video 3; Supplementary Figure 1b-c, d-f). 2 days after spreading, follow-up quantifications, by the measure of cell shape and nucleus position, demonstrated that the spreading and polarization of EpCAM-depleted cells was indeed blocked and not only delayed (Figure 1g, h).

Stress fiber maturation relies on EpCAM expression in epithelial cells

Adhesion and motile activity are sustained by actin cytoskeletal reorganization, and accordingly we assessed actin dynamics in LifeAct-GFP transfected control and EpCAM-KO cells during spreading and polarity acquisition. Imaging of the actin network revealed that in control cells, actin cables dynamically reorganize while the cell spreads and acquires its polarized shape. First, circular arcs form, at the boundary between lamellipodium and lamella, coupled with the appearance of radial fibers, which then give rise to tangential fibers, as previously described in fibroblasts (Shemesh et al., 2009; Burnette et al., 2011, 2014) (Figure 2a, Supplementary video 4). EpCAM-KO cells formed the circular arcs and radial fibers but, contrary to control cells, kept this cable organization in a seemingly frozen state during the 3 hours course of the experiment (Figure 2b, Supplementary video 5). To further probe the extent of the actin cytoskeleton immobilization upon EpCAM depletion, we analyzed the actin network architecture 24h after spreading. We coupled this analysis to the distribution of focal adhesion marker paxillin, in order to properly characterize the fiber content in each condition. According to literature, actin fiber subtypes can be distinguished according to their protein composition and dynamics, and their symmetric or asymmetric association with focal adhesions (FAs) (Tojkander et al., 2012). Ventral stress fibers, connected at both ends to FAs and decorated with myosin-II, constitute the force generating fibers (BurrIDGE and Wittchen, 2013). Circular arcs exert contractile forces that are collectively transmitted to radial fibers, which in turn passively transmit tension from the center of the cell to the FA anchoring them (Burnette et al., 2014). As such, radial fibers bear greater stress but exert low forces on the substrate (Soigné et al., 2015; Lee et al., 2018). While control cells display a majority of tangential ventral stress fibers (Figure 2c-d), EpCAM-silenced cells exhibit very few ventral fibers, instead containing longer radial fibers compared to control cells and a dense central network of circular arcs (Figure 2c, d-g). These results show that stress fiber maturation is blocked in EpCAM-depleted cells. Coincidentally, as the major fibers in EpCAM-KO cells are radial, the connected FAs are radially oriented and mainly located in a 5 μ m belt at the cell periphery (Figure 2c, e). The analysis of several other FA components demonstrated the striking modification of FA distribution upon EpCAM loss (Supplementary Figure

2). β 1-integrin and the tension-sensitive proteins talin and vinculin were still located at FAs of EpCAM-depleted cells, organized in the same radially-oriented pattern than paxillin. Zyxin, used a proxy for the maturity of focal adhesions, was also detected in EpCAM-depleted cells (Supplementary Figure 2). Thus, we concluded that EpCAM is not involved in focal adhesion formation or maturation *per se* but rather participates in their centripetal sliding. To test the specificity of these abnormalities, we performed rescue experiments by transfecting an EpCAM-GFP shRNA-resistant construct in EpCAM-depleted cells, and we observed that correct FA distribution was recovered after EpCAM rescue (Supplementary Figure 3a). Of note, similar mis-arrangement of FAs and actin cables was observed in EpCAM-KO cell islands, showing that the impact of EpCAM on cell-substrate adhesion and actin organization also takes place when cell-cell contacts are formed (Supplementary Figure 3b).

EpCAM is expressed in several simple epithelia, and we wondered whether its impact on stress fiber organization could be generalized to other cell types. Therefore, we probed the stress fiber organization of other EpCAM-expressing or non-expressing cell types. We used the renal epithelial MDCK cells, which display an EpCAM expression level comparable to control Caco2 cells, and osteosarcoma U2OS cells and endometrial epithelial HeLa cells, showing similar lack of EpCAM expression than EpCAM-depleted Caco2 clones (Figure 3a, b). Whereas MDCK cells exhibit ventral fibers, their formation is impaired upon EpCAM-siRNA silencing (Figure 3c; Supplementary Figure 4). Conversely, while U2OS and HeLa cells display a vast majority of radial and circular arcs, as previously reported (Burrige and Wittchen, 2013), the introduction of an EpCAM-GFP construct induced a remodeling towards ventral stress fibers, demonstrating that ectopic EpCAM expression is sufficient to drive the formation of contractile stress fibers in EpCAM non-expressing cells (Figure 3d-e). Altogether, these results emphasize that: i) EpCAM is able to play a role in single cells, independently of cell-cell contacts, and ii) the absence of EpCAM provokes changes in the actin network and associated FAs, leading to cell morphology defect early during spreading, and the maintenance of an unpolarized state that impinges on the cell migratory behavior. We conclude that EpCAM participates to a cell-autonomous general regulatory mechanism for cell polarity, and is instrumental for stress fiber maturation in epithelial cells.

Loss of EpCAM results in impaired epithelial cell mechanics

Given the stress fiber subtypes differences in tension-bearing and force generation properties (Lee et al., 2018), we reasoned that the distinct actin organization could account for a modification of the cell mechanical properties, that would explain the lesser migratory behavior of EpCAM-KO cells compared to controls. Atomic force microscopy experiments showed that similar rigidity was

detected in the central region containing the nucleus, *i.e.* in cell heights range comprised between 2 and 5 μm , in control and mutant cells. However, as expected, different rigidities were measured in the cell protrusion, considered as the area where the cell height is below 2 μm (two-fold increase in Young's modulus for EpCAM-KO cells in the cell area under 2 μm in height), demonstrating that EpCAM depletion resulted in a stiffer lamella. This difference is most likely due to the higher density of stiff fibers in the EpCAM-KO cells that are nicely resolved by the AFM nanoindentation. (Figure 4a-d). Moreover, traction force microscopy (TFM) experiments (Treat et al., 2009) allowed measurement of the impact of the actin remodeling in EpCAM-KO cells on their ability to generate traction forces on the substrate. The data revealed that EpCAM-depleted cells exerted lower traction forces on the substrate than the control cells from spreading time, up to 24h of observation (mean of 388.1 ± 75.0 Pa and 577.4 ± 49.9 Pa, respectively) (Figure 4e, f). Additionally, timelapse analysis of TFM data showed that control cells generate traction in a dynamic manner, probing the substrate, while EpCAM-KO lower forces are maintained throughout the experiment (Supplementary Figure 2a). The data demonstrate that EpCAM deprivation modifies the mechanical properties of epithelial cells, most likely due to the fact that the arrangement of underlying actin cytoskeleton is altered in mutant cells.

Aberrant contractile activity is at the origin of stress fiber maturation failure

Several mechanisms were put forward to explain SFs maturation. A first study by Hotulainen and colleagues demonstrated that radial fibers grow by formin-mediated actin polymerization at FAs, and that ventral stress fibers arise from the fusion of radial fibers and associated-transverse arcs following the arcs contraction during the retrograde flow of the SF network (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Tojkander et al., 2015). Another study reported the existence of stress fibers assembly *de novo* from the concatenation of short actin filaments (Machesky and Hall, 1997; Vallenius, 2013). Stress fiber formation and dynamics have been actively scrutinized in fibroblasts and mesenchymal cells, but very few studies took place in epithelial cells.

Symmetry breaking and acquisition of front-rear polarity, as well as stress fiber maturation requires α 4-actinin and contractility (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Prager-Khoutorsky et al., 2011; Roca-Cusachs et al., 2013). The striking requirement of EpCAM in these cellular processes prompted us to investigate the participation of α 4-actinin and myosin-IIA in the development of the EpCAM-KO phenotype. We therefore tested α 4-actinin and myosin-IIA distribution to evaluate these processes in epithelial cells. Stress fibers in control cells are cross-linked by a periodic distribution of α 4-actinin that alternates with myosin-IIA, generating the classical sarcomeric appearance of ventral stress fibers (Figure 5a). By contrast, in EpCAM-KO cells, α 4-actinin accumulates on radial fibers devoid of

myosin-IIA, which is enriched along circular arcs (Figure 5a), in agreement with the canonical radial fibers and circular arcs previously described (Cai et al., 2010; Burridge and Wittchen, 2013). α 4-actinin was previously reported in literature as an EpCAM binding partner (Balzar et al., 1998), therefore we first hypothesized that EpCAM depletion would prevent correct α 4-actinin dynamics and its reorganization needed for stress fibers maturation. However, in our hands, no interaction between EpCAM and α 4-actinin was detected using co-immunoprecipitation (Supplementary Figure 5a). In addition, α 4-actinin silencing by siRNA was not able to restore the presence of ventral stress fibers in the EpCAM-KO cells (Supplementary Figure 5b-c).

We thus focused on cell contractility mechanisms to determine whether they are involved in the development of the EpCAM-KO phenotype. As shown in Figure 5a, myosin-IIA remains associated with circular arcs in mutant cells. Several studies described that the intensity and distribution of cell contractility were modulated by EpCAM in epithelial monolayers (Maghzal et al., 2013; Salomon et al., 2017). To assess the contractile ability of myosin-IIA, we performed an immunostaining against the phosphorylated form of the myosin regulatory light chain (P-MLC2). In absence of EpCAM, the P-MLC2 signal intensified and was concentrated along circular arcs in comparison to control cells (Figure 5b-d). This result was confirmed by Western blot, where P-MLC2 levels increased relative to the total amount of MLC2 in comparison with control cells (Figure 5e-f). These data demonstrate that actomyosin activity is increased but restricted to circumferential actin arcs in EpCAM-silenced cells, creating a uniform hypercontractile ring at the cell cortex.

The degree of P-MLC2 along circular arcs and ventral stress fibers is preferentially regulated by ROCK and MLCK (Tanner et al., 2010; Kassianidou et al., 2017a, 2017b). To test whether the local hypercontractility at circular arcs was at the origin of stress fibers and FA abnormalities, we submitted single EpCAM-KO cells to treatment with blebbistatin or Y-27632 to reduce myosin-II ATPase activity and ROCK activity, respectively (Figure 5g). Incubation with 10 μ M blebbistatin led to total disappearance of radial fibers and circular arcs, as previously described (Supplementary Figure 6); (Burnette et al., 2014; Tee et al., 2015). However, treatment with 2 μ M blebbistatin provoked a decreased number of circular arcs, the swirling of actin cables with the development of a few ventral stress fibers, as well as more numerous and more centrally distributed FAs (Figure 5g). Similarly, treatment with 10 μ M Y-2763 totally abolished the formation of radial fibers and circular arcs (Supplementary Figure 6), but a lower dose (0,5 μ M) led to the disappearance of radial stress fibers, the formation of linear ventral stress fibers, the reduction of FA size and their distribution within the cell body (Figure 5g). Partial and full recovery of the stress fibers maturation using blebbistatin and Y-27 treatment respectively, pointed toward RhoA signaling. To assess the upstream RhoA involvement, we used a RhoA activator (CN03). Over-activation of RhoA worsens the phenotype

(Figure 5g), suggesting RhoA participation to the EpCAM-dependent mechanism. Formins are well-known effectors of RhoA, and along this line, we tested their activity in EpCAM-depleted cells using the SMIFH2 inhibitor. SMIFH2 low-dose treatment reduced the size of the radial fibers, as well as the cell protrusion depth (Supplementary Figure 6). These results are reminiscent of the work of Bershadsky and colleagues, and demonstrate that mild adjustments of circular arcs contractility levels trigger actin reorganization from radial to chiral and linear SFs in epithelial cells seeded on non-patterned substrates / unconstrained conditions (Tee et al., 2015). Moreover, Arp2/3 or MLCK inhibition, through CK666 or ML-7 treatment, respectively, had no effect on EpCAM-silenced cells (Supplementary Figure 6). We concluded that actomyosin hyperactivity is at the core of the defects on stress fibers maturation induced by the silencing of EpCAM. Since the inhibition of both ROCK and formin activities counteracts the EpCAM-KO phenotype, we hypothesized that EpCAM may act upstream of the actomyosin apparatus activity, likely at the level of RhoA signaling.

Active RhoA dynamics during epithelial cell spreading and polarity acquisition is impaired in EpCAM-KO cells

Though typical transitions in cytoskeletal remodeling during cell spreading and polarity acquisition are described, a global spatial and temporal analysis of the contractility signaling is still missing. We thus monitored the spatiotemporal dynamics of GTP-loaded form of RhoA during cell polarization and stress fiber maturation using the location biosensor derived from the C-terminus of anillin, AHPH (Tse et al., 2012; Priya et al., 2015). mCherry-tagged AHPH partially co-distributes with total Rho-GFP (Supplementary Figure 7a) and overlaps significantly with the location biosensor based on the RhoA-GTP binding domain of ROCK1 (ROCK1-GBD-GFP) or with the location biosensor based on the GTP-RhoA binding domain of mDia (mDia-GBD-GFP) (Supplementary Figure 7b-c, respectively) (Budnar et al., 2019). These data testify of the specificity of AHPH-tagged for RhoA-GTP signal and confirm that it can be faithfully used to probe RhoA-GTP dynamics. In control Caco2 cells, AHPH-GFP localizes in discrete vesicles in the cell protrusion and close to plasma membrane, as previously reported in neuronal and epithelial cells (Bisi et al., 2013; Braun et al., 2015; Vassilev et al., 2017). Interestingly enough, the RhoA location biosensor displays a drastic change of its distribution from cell seeding to final cell spreading (Figure 6a). Within the first 15 minutes post-seeding, whereas no clear actin cable can be distinguished yet, RhoA-GTP-positive vesicles are perinuclearly located in still round-shaped cells. While spreading intensifies with the clear expansion of protrusions in circular shaped cells, RhoA-GTP concentrates in a central ring and co-distributes with an intense actin worms meshwork. The time of 30-minutes post-seeding is characterized by the appearance of concentric actin arcs at the level of the RhoA-GTP central ring, suggesting that RhoA-GTP central ring and

subsequent signaling might be required for the formation of TAs during cell spreading. Starting from 1 hour after initiation of spreading, RhoA-GTP distribution is remodeled, causing the disappearance of the central ring, concomitantly with the acquisition of a polarized cell shape. At 2-hour post-seeding, control cells display a final spreading state and exhibit scattered and homogeneous RhoA-GTP vesicular distribution throughout the cytoplasm. Accumulation of RhoA-GTP is observed from cell to cell. These kinetics show an evolution of active RhoA distribution during epithelial cell spreading. Moreover, the generation of a RhoA-GTP central ring precedes the formation of concentric actin arcs. Maturation of actin cables and efficient cell spreading are concomitant with rearrangement of the central ring and the acquisition of a homogeneous patterning of RhoA-GTP in the spread cell. Similar rearrangement of total Rho-GFP was observed during cell spreading (not shown).

RhoA-GTP distribution was then assessed in EpCAM-deprived cells. Whereas in control cells AHPH-mCherry probe displays scattered vesicles throughout the cytoplasm when cell spreading is accomplished, EpCAM-KO cells displayed an accumulation of active RhoA signal in vesicular and larger tubular compartments within the lamella (Figure 6b-c). Similar data were obtained for total Rho-GFP (Supplementary Figure 8). These AHPH-positive compartments concentrate right above the circular arcs (Figure 6d). The accumulation of AHPH probe suggests that the absence of EpCAM may impinge on RhoA-GTP dynamics. To test this hypothesis, we imaged GTP-RhoA using AHPH-mCherry reporter in control and EpCAM-KO cells (Supplementary videos 6-7). We found that AHPH-GFP-positive vesicles exhibited a complex and fast intracellular trafficking in control cells (Supplementary video 6). Measure of the vesicle movement revealed movement majorly directed to and from the cell protrusion (Figure 6e). In the absence of EpCAM, however, RhoA-GTP-positive vesicles movement was blocked and led to subsequent enrichment at the level of TAs (Figure 6e; Supplementary video 7). These data led us to conclude that EpCAM may participate to the dynamics of RhoA-GTP within cell protrusions. Altogether, the dynamics and dissolution of the active RhoA ring in control cells compared to its maintenance in EpCAM-KO cells allowed us to conclude that the reorganization of the active RhoA cortical ring allows the remodeling of actin fibers, which is blocked in absence of EpCAM. These results demonstrate that EpCAM is required for remodeling the RhoA-GTP zone and the subsequent reorganization of actin fibers during cell spreading.

EpCAM ensures turnover of active RhoA at the cortex of the cell protrusion

How does EpCAM ensure proper cell spreading? In the light of afore described data, we hypothesized that EpCAM may participate in the remodeling of the active RhoA zone during spreading. Thus, we analyzed EpCAM distribution together with the RhoA-GTP location biosensor

(Figure 7a-f). We found that a subpopulation of endogenous EpCAM- or EpCAM-GFP-positive intracellular compartments co-distributes with AHPH-GFP or AHPH-mCherry, respectively. This colocalization takes place in unpolarized cells and continues when cells acquire front-rear polarization (Figure 7a and 7d, respectively). We used fluorescently tagged Rab GTPases as a proxy for organelle identity to characterize the intracellular compartments where EpCAM and active RhoA colocalized. We identified the recycling endocytic pathway as the preferential location for RhoA-GTP and EpCAM. In fact, RhoA-GTP and EpCAM co-distribute at 90% in Rab35-positive and at 60% in C-terminal Eps15 homology domain-1 (EHD1)-positive compartments (Figure 7g-h and 7i-j, respectively). Contrary to the work on neural crest cells published by M. Takeichi (Vassilev et al., 2017), the recycling marker Rab11 showed only 15% colocalization with AHPH-positive compartments (Supplementary Figure 9). Noteworthy, EpCAM and RhoA were only barely detected in Rab5-, EEA1-, Rab7-, Rab8- and Rab4-positive organelles (not shown). These results support the fact that RhoA-GTP and EpCAM colocalization specifically takes place in a fast recycling pathway and lead us to suggest that EpCAM may play a direct role in the cycling of RhoA-GTP through its recycling at the cell cortex.

In line with this idea, we first evaluated the effect of EpCAM silencing on the recycling of RhoA-GTP. We found that RhoA-GTP remained sequestered and accumulated in EHD1- and Rab35-containing compartments in EpCAM-KO cells (Figure 8a-d), showing that the cortical accumulation of the AHPH probe we observed in the absence of EpCAM reflect a block of RhoA-GTP in recycling compartments. To provide further evidence that the endosomal recycling is required for turnover of RhoA-GTP and stress fiber maturation, we used dominant negative mutant forms of either EHD1 (mutation of glycine 65 to arginine in the P-loop domain of EHD1 which renders EHD1 cytosolic, i.e. EHD1G65R-GFP) (Naslavsky and Caplan, 2011) or Rab35 (Rab35S22N-GFP) (Figure 8e). Overexpression of the mutant forms in control cells led to the accumulation of the AHPH location biosensor in a circular manner within the cell protrusion, nicely mimicking the effect of EpCAM silencing on RhoA-GTP distribution. Interestingly, concomitant perturbation of the epithelial cell shape was observed after EHD1G65R-GFP or Rab35S22N-GFP expression (Figure 8e). However, although transfected cells exhibit modified arrangement of actin cables and focal adhesions, the phenotype resulting from the expression of recycling mutants differed from the one of EpCAM-KO cells (Figure 8f), suggesting that EpCAM does not block the recycling pathway *per se* but rather the progression of Rho-GTP there. In conclusion, our results demonstrate that active RhoA is recycled along with EpCAM via the fast endosomal recycling mediated by Rab35, and this RhoA-GTP recycling is required to ensure epithelial cell spreading. Moreover, EpCAM potentiates RhoA-GTP progression through the recycling endosomes for proper turnover.

Discussion

Biochemical studies, coupled with the use of C3 toxin and mutant constructs, showed that RhoA participates to stress fibers formation and myosin-II-dependent contractility (Nobes and Hall, 1995; Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). Thereafter came the canonical view of RhoGTPases describing Rac1 and Cdc42 at the cell leading edge to support protrusive activity whereas RhoA promoted contraction at the cell rear (Raftopoulou and Hall, 2004). Although these studies were essential to our understanding of RhoGTPases functions, their tools only allowed for a fixed image of their activity at a given time, and their dynamics were missing. The development and use of FRET probes by Machacek et al., showed that RhoA was actually highly activated in a 2 μm wide band at the leading edge of migrating cells and participated to protrusive activity while Rac1 and Cdc42 stabilized the protrusion for directed motion (Machacek et al., 2009). Our experiments revealed that a cortical ring of active RhoA forms and grows as cell spreads, and finally disperse while the cells polarize, to form a gradient along the front-rear axis (Figure 6a). In sharp contrast, as EpCAM-KO cells maintain this cortical ring of active RhoA and are unable to break symmetry to polarize normally, we argue that a tight spatio-temporal regulation of this pool of RhoA is necessary for the correct initiation of polarity in migrating epithelial cells. This result is in agreement with several studies, that showed the importance of proper balance of contractile forces for spreading and polarization in fibroblasts cells (Prager-Khoutorsky et al., 2011; Trichet et al., 2012). To our knowledge, this is the first report RhoA dynamics during epithelial cell spreading and polarity acquisition.

Active RhoA is actually evenly distributed in the control cells once they polarized in a front-rear axis. RhoA cycling between its active and inactive state depends on its GEFs and GAPs activity. Recent works and reviews pointing towards the same surprising distributions of active GTPases proposed that the patterns of RhoA activity relied on the subcellular distribution of GEFs and GAPs in function-oriented domains, rather than the GTPase's location in itself (Fritz and Pertz, 2016). More than 80 RhoGEFs and GAPs are reported in the human genome (Lawson and Ridley, 2018), suggesting that the RhoGTPases cycling is more specifically regulated than a simple ON-OFF switch. The control of these GEFs and GAPs in combination would grant an extreme precision for the tuning of RhoA. For instance, in *Drosophila*, RhoGEF2 and Cumberland-GAP coordinate to promote pulsatile ROCK and myosin-II activity that are necessary for apical constriction during ventral furrow formation (Mason et al., 2016). If each subcellular location is indeed determined by a subset of GEFs and GAPs dependent on the function exerted in the area, the maintenance of the active RhoA pool in absence of EpCAM could be explained by its anomalous dynamics. In the control cells where recycling

progress as expected, RhoA never accumulates in the cortical area where a GEF, or the absence of a GAP, would maintain the GTPase abnormally activated. The careful screening of GEFs and GAPs responsible for these defects still remain an important subject of study.

Many studies highlighted that RhoA activity led to stress fibers formation in fibroblastic cell lines, but few analyzed it in epithelial cells. We show that the ectopic RhoA activity present at the cortex of EpCAM-depleted cells negatively impacts stress fibers' maturation. Our work contrasts with the data presented by Jalal et al., however the many differences in our approaches could account for the discrepancies in the results. First, they could reflect the differences in cell lines or ECM protein coating we used, that probably rely on or triggers different signaling pathways, respectively. Second, their experiments were made using circular patterns. Though it allows easier reading and reproducibility of actin fibers dynamics, the spreading of Caco-2 cells is limited and they never formed all the described fibers subtypes that we observed in unconstrained conditions (Jalal et al., 2019). One possibility is that confinement prevented the Caco-2 cells to properly organize their cytoskeleton, and that is likely a general property of epithelial cells as confined MDCK cells did not form radial fibers either. Another inherent effect to the use of circular pattern is the inability of cell to undergo symmetry-breaking. If the control of polarity and stress fiber maturation are temporally related in epithelial cells, it is possible that their setup conditions prevented the appearance of ventral stress fibers in these cell types.

While transmembrane receptor trafficking (such as integrins or cadherins) has been under intense scrutiny in the context of cell migration and cancer metastasis (Mellman and Yarden, 2013; Paul et al., 2015; Kajiho et al., 2018), the link between traffic and RhoGTPases is only now coming to the fore. It was recently shown that Rab11 and its partner FIP3 promote the recycling of Rac1, that is necessary for Rac1 activity upon the actin cytoskeleton for the spreading and activation of T-cells (Bouchet et al., 2016). Cdc42 transport to the cell front is mediated by Rab6-positive vesicles, and Rab6 is able to regulate Cdc42 activity to promote U2OS cell spreading (Vestre et al., 2019). Vassilev et al. recently showed that, in neural crest cells, RhoA trafficking seems to be mediated by Rab11-positive recycling pathway (Vassilev et al., 2017). We demonstrated that active RhoA and EpCAM colocalize at the membrane of endosomal recycling compartments, however our results show that, even though a small proportion of active RhoA was indeed carried by Rab11-positive vesicles (Figure 7), the major recycling pathway for RhoA in our cells is mediated by Rab35/EHD1-positive endosomes. Nevertheless, even if the pathways differ in both studies, our result further emphasizes the importance of trafficking in the regulation of RhoA activity.

We previously established that EpCAM depletion led to decreased contractility at bicellular, but not tricellular, junctions of epithelial tissue (Salomon et al., 2017). Several reports pointed out the

importance of RhoA activity for the maintenance of myosin-II activity and junctional integrity (Arnold et al., 2017; Priya et al., 2017). We now provide evidence that EpCAM participates to RhoA recycling and the spatial control of its activity in single cell, with striking effect on myosin-II recruitment and activity. Analysis of EpCAM and RhoA recycling to and from the cellular junctions should prove especially informative concerning the control of junctional contractility and the maintenance of epithelial integrity.

In summary, our results demonstrate that active RhoA accumulates in an intracellular pool on the membranes of Rab35-positive endosomes, in EpCAM-depleted cells. This ectopic RhoA activity is responsible for incorrect cell contractility distribution and activity in epithelial cells, leading to symmetry-breaking, migration and stress fibers defects in absence of EpCAM. In light of these results, we propose that EpCAM function as a cell adhesion molecule is revised to a more general role as a cell contractility regulator.

Materials & Methods

Cell culture

Caco2_{BBE} cells were kindly provided by Dr. S. Robine (Curie Institute, Paris). Cells were routinely grown in DMEM 4.5 g/l glucose, 20% fetal bovine serum, 10% penicillin-streptomycin (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). The culture medium was renewed every day.

EpCAM reduction was carried out by lentiviral delivery of shRNA constructs directed against human *EPCAM*

shEpCAM#1: TRCN0000073734 5'-
CCGGGCCGTAAACTGCTTTGTGAATCTCGAGATTCACAAAGCAGTTTACGGCTTTTTG-3', and

shEpCAM#2: TRCN0000073737 5'-
CCGGCGCATTATCAACTGGATCCAACCTCGAGTTGGATCCAGTTGATAACGCGTTTTTG-3' designed and

cloned into the lentiviral pLKO.1 puromycin resistant vector Mission shRNA lentiviral Transduction particle (Sigma Aldrich).

shRNA-resistant EpCAM sequence (shEpCAM#1 resistant : 5'-

ATGGCGCCCCGCAGGTCCTCGCGTTCGGGCTTCTGCTTGCCGCGGCGACGGCGACTTTTGCCGCAGCTCAGG
AAGAATGTGTCTGTGAAAACACTACAAGCTGGCTGTGAATTGTTTCGTCACAATAATCGTCAATGCCAGTGTAC
TTCAGTTGGTGCACAAAATACTGTCATTTGCTCAAAGCTGGCTGCCAAATGTTTGGTGATGAAGGCAGAAATG
AATGGCTCAAACTTGGGAGAAGAGCAAAACCTGAAGGGGCCCTCCAGAACAATGATGGGCTTTATGATCCT
GACTGCGATGAGAGCGGGCTCTTAAGGCCAAGCAGTGCAACGGCACCTCCATGTGCTGGTGTGTGAACACT
GCTGGGGTCAGAAGAACAGACAAGGACACTGAAATAACCTGCTCTGAGCGAGTGAGAACCTACTGGATCATC
ATTGAACTAAAACACAAAGCAAGAGAAAAACCTTATGATAGTAAAAGTTTGCGGACTGCACTTCAGAAGGAG
ATCACAACGCGTTATCAACTGGATCCAAAATTTATCACGAGTATTTTGTATGAGAATAATGTTATCACTATTGA
TCTGGTTCAAATTTCTTCTCAAAAAACTCAGAATGATGTGGACATAGCTGATGTGGCTTATTATTTGAAAAAG
ATGTTAAAGGTGAATCCTTGTTCATTCTAAGAAAATGGACCTGACAGTAAATGGGGAACAACCTGGATCTGGA
TCCTGGTCAAACCTTAATTTATTATGTTGATGAAAAAGCACCTGAATTCTCAATGCAGGGTCTAAAAGCTGGTG
TTATTGCTGTTATTGTGGTTGTGGTGATAGCAGTTGTTGCTGGAATTGTTGTGCTGGTTATTTCCAGAAAGAAG
AGAATGGCAAAGTATGAGAAGGCTGAGATAAAGGAGATGGGTGAGATGCATAGGGAACTCAATGCATAA –

3') was provided by Invitrogen and cloned into a pEGFP-N1 backbone using the following primers (Eurofins genomics): Forward: 5'- aattctgcagtcgacggtaccATGGCGCCCCGCAGGTC -3',

Reverse: 5'- caccatggtggcgaccaggtggatccgggTGCATTGAGTTCCTATGCATCTCA -3'. *shEpCAM#1*-resistant Caco-2 clones were generated by transfection with lipofectamine 2000 (Sigma Aldrich) and selection in DMEM supplemented with 20% FBS, 10% penicillin/streptomycin, 2 µg/ml puromycin and 0.5 mg/ml geneticin (Life Technologies).

Caco-2 paxillin-GFP and Lifeact-GFP were obtained by transfection lipofectamine 2000 (Sigma Aldrich) and selection in DMEM supplemented with 20% FBS, 10% penicillin/streptomycin, 2 µg/ml puromycin and 1 mg/ml geneticin (Life Technologies). For all experiments cells were plated on collagen-coated substrates, obtained by adsorption of collagen I (Sigma) that was incubated at room temperature for 1h at 50 µg/mL in 0.02N acetic acid, and washed with PBS before cell seeding.

Transfection

Plasmid and siRNA transient transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. ACTN4 silencing was carried out using two siRNA targeting human ACTN4 mRNA, from Sigma Aldrich.

siRNA ACTN4 #1: 5'- CUUCUCUGGUGCCAGAGAA[dT][dT]-3'

siRNA ACTN4 #2: 5'- GACAUGUUCAUCGUCCAUA[dT][dT] – 3'

EpCAM reduction in MDCK cells was carried out using two siRNA targeting dog EpCAM mRNA, purchased from Invitrogen:

siRNA EpCAM #1: 5'- UUCAUAACCAAACAUUUGGUUGCCA -3'

siRNA EpCAM #2: 5' – UGAUUGAGAGCUGCCUUUCUAUUUA -3'

EpCAM-GFP was purchased from Origene (NM_002354, CAT# RG201989). Rab11 dominant negative mutant was purchased from Addgene (# 12678). AHPH-GFP and AHPH-mCherry constructs were a kind gift from Dr. A.Yap (Brisbane University, Australia). GFP-Rho wt was a gift from Dr Anne Blangy (CRBM, Montpellier, France). Rab5a-mCherry and Rab11-GFP constructs were a gift from Dr. L. Johannes (Curie Institute, France), Rab4, Rab8 were gift from Dr. G. Montagnac (Gustave Roussy Institute, France). Paxillin-GFP was provided by Dr. M. Coppey (Jacques Monod Institute, France). EHD1-GFP and EHD1-G65R-GFP were a gift from Dr S. Caplan. Rab35-RFP and Rab35-S22N-RFP were provided by Dr A. Echard (Pasteur Institute, Paris, France).

Antibodies and reagents

Rabbit polyclonal antibody directed against EpCAM (#ab71916, IF dilution, 1:100) was from Abcam. Mouse monoclonal antibodies directed against paxillin (# 5H11, IF dilution, 1:100) and talin (#TA205, IF dilution, 1:100) were from Merck Millipore. Rat monoclonal antibody against activated β1-integrin was from BD Biosciences (#, IF dilution: 1/100). Rabbit polyclonal antibody against vinculin (# V4139, IF dilution, 1:100) was from Sigma-Aldrich. Rabbit polyclonal antibody directed against MLC2 (#3672, WB dilution 1:1,000) was from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Rabbit polyclonal antibody directed against P-MLC2 (S19/S20, #600-401-416, IF dilution 1:100, WB dilution 1:500) was from Rockland (Limerick, PA, USA). Rabbit monoclonal antibody directed against ACTN4 was from Life

Technologies (#42-1400, IF dilution, 1:100). Monoclonal antibody directed against GAPDH (#60004-1-Ig, clone 1E6D9, WB dilution, 1:500) was from Proteintech (Chicago, IL, USA).

Biochemical analysis

Cell lysates were made 1 or 21 days after plating, for single cells or polarized monolayer respectively. Cells were lysed for 30 min using the following lysis buffer: 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA, 1mM EDTA, with complete protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor PhosSTOP (Roche, Basel, Switzerland). Insoluble debris were removed by centrifugation at 13,000 g for 15 min. Total protein content was measured by Bradford assay.

Immunostaining

Cells were grown on collagen-coated glass coverslips, fixed using 4% paraformaldehyde for 15 min, then permeabilized using 0.02% saponin solution in PBS for 20 min. 0.02% saponin/1% BSA solution was used for a 30min blocking step, before proceeding to incubation with the primary antibody at 4°C overnight. The next day, secondary antibody was added after 3 washing steps, and left to incubate for 2h at RT. Except for SIM analysis where Vectashield medium was used, all stainings were mounted in Mowiol.

Immunoprecipitation

Cells were lysed as described above. Lysates were precleared with protein A–Sepharose beads for 1 h, incubated with antibodies overnight at 4°C, and incubated with newly prepared protein A–Sepharose beads the next day, for 2 h. The beads were washed three times with the lysis buffer. Precipitates were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting.

Live imaging

Live cell spreading and migratory assays were performed with the Biostation (Nikon) using the 20x objective. Time-lapse images were taken every 10 min for 2 to 4 hours. Cell were treated with mitomycin C (10 µg/mL) for 1h to prevent division, before seeding on collagen-coated glass bottom fluorodishes (World Precision Instruments, #FD35-100). Cell tracks measurements and graphs were obtained using MATLAB.

Cell edge protrusive activity was analyzed using kymographs from 10 min time-lapse movies with 5s frame rate, obtained on a wide field microscope (DMI6000, Leica) using x100/1.4NA Plan apochromatic oil objective. Briefly, four lines per cell normal to a free cell edge were used to

generate kymographs from which protrusion and retraction rates, time of protrusion and retraction, amplitude and period were measured with ImageJ.

Actin dynamics experiments were performed using an inverted DMI8 Leica microscope equipped with a CSU-W1 spinning disk head (Yokogawa - Andor), using a x100 1.4 NA oil objective. Images were acquired every 5min for 2-4h. Active RhoA dynamics were followed on the same microscope, for 2min with a 5s frame rate.

Structured Illumination Microscopy

3D-Structured Illumination Microscopy (SIM) was performed on a Zeiss Elyra Microscope coupled to an optovar 1.6, 63X objective and a camera EM CCD Andor SIM. During z-stack acquisition, 5 rotations were applied. Deconvoluted structured illumination images were generated by Zen software, and images were merged in ImageJ.

Atomic force microscopy

Cells were cultured in DMEM, 20% FBS, 1

Traction Force Microscopy

Soft polydimethylsiloxane (PDMS) substrates of 15kPa rigidity containing red 200nm fluorescent beads (Life technologies) were prepared by mixing CY52-276 kit components (Dow Corning Toray) at 1:1 ratio and letting it spread and cure on glass bottom fluorodishes overnight. Collagen I (Sigma) was adsorbed on the surface on the substrate as described above. Cells were plated on the substrate and imaged for 22-24h, at a 6 min interval in the Biostation (Nikon) using the x20 objective. Images were aligned to compensate for experimental drift before analysis of the beads displacement was performed, using Particle Imaging Velocimetry (PIV) script in MATLAB. From the displacement data, Fourier transform traction cytometry (FTTC) plugin in ImageJ (available at <https://sites.google.com/site/qingzongtseng/tfm>) was used to estimate the traction forces exerted on the substrate. The total traction force exerted by cells was calculated by summing the magnitudes of the traction vectors under and near the cell of interest and multiplying by the area covered by those vectors.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad (PRISM). Unless otherwise stated, experiments were replicated 3 times independently and comparison between samples were done without Gaussian distribution assumption of the data, meaning comparisons were carried out using Mann-Whitney test for two conditions comparison, or Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison tests for three and more conditions. P-values met the following criteria * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Triple colocalization was analyzed using a Matlab-based custom program. Briefly, fluorescence was first segmented in each channel using local thresholding (Phansalkar method; Phansalkar et al., 2011), and a local 2-D median filter with user-defined 135 neighborhood size was applied to remove noise. Colocalization was then measured using the Manders split coefficients M1 and M2 (Manders et al., 1992) as such:

$M1 = \frac{\sum_i S1_{i,coloc}}{\sum_i S1_i}$ and $M2 = \frac{\sum_j S2_{j,coloc}}{\sum_j S2_j}$, where $S1_{i,coloc} = S1_i$ if $S1_i > 0$ AND $S2_i > 0$, and $S2_{j,coloc} = S2_j$ if $S2_j > 0$ AND $S1_j > 0$. The Matlab Code or the standalone user interface can be shared upon request.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

References

- Abe, K., and Takeichi, M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 13–19.
- Acharya, B.R., Nestor-Bergmann, A., Liang, X., Gupta, S., Duszyk, K., Gauquelin, E., Gomez, G.A., Budnar, S., Marcq, P., Jensen, O.E., et al. (2018). A Mechanosensitive RhoA Pathway that Protects Epithelia against Acute Tensile Stress. *Developmental Cell* *47*, 439-452.e6.
- Agarwal, P., and Zaidel-Bar, R. (2019). Principles of Actomyosin Regulation In Vivo. *Trends Cell Biol.* *29*, 150–163.
- Amano, M., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. (2000). Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp. Cell Res.* *261*, 44–51.
- Arnold, T.R., Stephenson, R.E., and Miller, A.L. (2017). Rho GTPases and Actomyosin: partners in regulating epithelial cell-cell junction structure and function. *Exp Cell Res* *358*, 20–30.
- Baeuerle, P.A., and Gires, O. (2007). EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* *96*, 417–423.
- Balzar, M., Bakker, H.A.M., Briaire-de-Bruijn, I.H., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., and Litvinov, S.V. (1998). Cytoplasmic Tail Regulates the Intercellular Adhesion Function of the Epithelial Cell Adhesion Molecule. *Mol Cell Biol* *18*, 4833–4843.
- Balzar, M., Winter, M.J., Boer, C.J. de, and Litvinov, S.V. (1999). The biology of the 17–1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* *77*, 699–712.
- Barac, A., Basile, J., Vázquez-Prado, J., Gao, Y., Zheng, Y., and Gutkind, J.S. (2004). Direct interaction of p21-activated kinase 4 with PDZ-RhoGEF, a G protein-linked Rho guanine exchange factor. *J. Biol. Chem.* *279*, 6182–6189.
- Bardet, P.-L., Guirao, B., Paoletti, C., Serman, F., Léopold, V., Bosveld, F., Goya, Y., Mirouse, V., Graner, F., and Bellaïche, Y. (2013). PTEN Controls Junction Lengthening and Stability during Cell Rearrangement in Epithelial Tissue. *Developmental Cell* *25*, 534–546.
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 19–33.
- Barnhart, E., Lee, K.-C., Allen, G.M., Theriot, J.A., and Mogilner, A. (2015). Balance between cell–substrate adhesion and myosin contraction determines the frequency of motility initiation in fish keratocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 5045–5050.
- Barriga, E.H., Franze, K., Charras, G., and Mayor, R. (2018). Tissue stiffening coordinates morphogenesis by triggering collective cell migration in vivo. *Nature* *554*, 523–527.
- Barth, A.I.M., Kim, H., and Riedel-Kruse, I.H. (2018). Regulation of epithelial migration by epithelial cell adhesion molecule requires its Claudin-7 interaction domain. *PLoS One* *13*.
- Baum, B., and Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol* *192*, 907–917.

- Beach, J.R., Shao, L., Remmert, K., Li, D., Betzig, E., and Hammer, J.A. (2014). Nonmuscle myosin II isoforms coassemble in living cells. *Curr. Biol.* *24*, 1160–1166.
- Begnaud, S., Chen, T., Delacour, D., Mège, R.-M., and Ladoux, B. (2016). Mechanics of epithelial tissues during gap closure. *Curr. Opin. Cell Biol.* *42*, 52–62.
- Behrndt, M., Salbreux, G., Campinho, P., Hauschild, R., Oswald, F., Roensch, J., Grill, S.W., and Heisenberg, C.-P. (2012). Forces Driving Epithelial Spreading in Zebrafish Gastrulation. *Science* *338*, 257–260.
- Benais-Pont, G., Punn, A., Flores-Maldonado, C., Eckert, J., Raposo, G., Fleming, T.P., Cereijido, M., Balda, M.S., and Matter, K. (2003). Identification of a tight junction–associated guanine nucleotide exchange factor that activates Rho and regulates paracellular permeability. *The Journal of Cell Biology* *160*, 729–740.
- Benham-Pyle, B.W., Pruitt, B.L., and Nelson, W.J. (2015). Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and β -catenin activation to drive cell cycle entry. *Science* *348*, 1024–1027.
- Beningo, K.A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J.V., and Wang, Y. (2001). Nascent Focal Adhesions Are Responsible for the Generation of Strong Propulsive Forces in Migrating Fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* *153*, 881–888.
- Bertet, C., Sulak, L., and Lecuit, T. (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature* *429*, 667.
- Bertocchi, C., Wang, Y., Ravasio, A., Hara, Y., Wu, Y., Sailov, T., Baird, M.A., Davidson, M.W., Zaidel-Bar, R., Toyama, Y., et al. (2017). Nanoscale architecture of cadherin-based cell adhesions. *Nat Cell Biol* *19*, 28–37.
- Bilder, D., and Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* *403*, 676.
- Bisi, S., Disanza, A., Malinverno, C., Frittoli, E., Palamidessi, A., and Scita, G. (2013). Membrane and actin dynamics interplay at lamellipodia leading edge. *Curr. Opin. Cell Biol.* *25*, 565–573.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiological Reviews* *94*, 235–263.
- Block, J., Breitsprecher, D., Kühn, S., Winterhoff, M., Kage, F., Geffers, R., Duwe, P., Rohn, J.L., Baum, B., Brakebusch, C., et al. (2012). FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Curr. Biol.* *22*, 1005–1012.
- Borghi, N., Sorokina, M., Shcherbakova, O.G., Weis, W.I., Pruitt, B.L., Nelson, W.J., and Dunn, A.R. (2012). E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell–cell contacts upon externally applied stretch. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 12568–12573.
- Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* *129*, 865–877.
- Bouchet, J., Del Río-Iñiguez, I., Lasserre, R., Agüera-Gonzalez, S., Cucho, C., Danckaert, A., McCaffrey, M.W., Di Bartolo, V., and Alcover, A. (2016). Rac1-Rab11-FIP3 regulatory hub coordinates vesicle traffic with actin remodeling and T-cell activation. *EMBO J.* *35*, 1160–1174.

Braun, A.C., Hendrick, J., Eisler, S.A., Schmid, S., Hausser, A., and Olayioye, M.A. (2015). The Rho-specific GAP protein DLC3 coordinates endocytic membrane trafficking. *J. Cell. Sci.* *128*, 1386–1399.

Brouns, M.R., Matheson, S.F., Hu, K.Q., Delalle, I., Caviness, V.S., Silver, J., Bronson, R.T., and Settlemann, J. (2000). The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* *127*, 4891–4903.

Brüser, L., and Bogdan, S. (2017). Adherens Junctions on the Move—Membrane Trafficking of E-Cadherin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *9*, a029140.

Buckley, I.K., and Porter, K.R. (1967). Cytoplasmic fibrils in living cultured cells. A light and electron microscope study. *Protoplasma* *64*, 349–380.

Buckley, C.D., Tan, J., Anderson, K.L., Hanein, D., Volkmann, N., Weis, W.I., Nelson, W.J., and Dunn, A.R. (2014). The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science* *346*, 1254211.

Budnar, S., Husain, K.B., Gomez, G.A., Naghibosadat, M., Varma, A., Verma, S., Hamilton, N.A., Morris, R.G., and Yap, A.S. (2019). Anillin Promotes Cell Contractility by Cyclic Resetting of RhoA Residence Kinetics. *Dev. Cell*.

Burnette, D.T., Manley, S., Sengupta, P., Sougrat, R., Davidson, M.W., Kachar, B., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nat. Cell Biol.* *13*, 371–381.

Burnette, D.T., Shao, L., Ott, C., Pasapera, A.M., Fischer, R.S., Baird, M.A., Loughian, C.D., Delanoë-Ayari, H., Paszek, M.J., Davidson, M.W., et al. (2014). A contractile and counterbalancing adhesion system controls the 3D shape of crawling cells. *J Cell Biol* *205*, 83–96.

Burridge, K., and Wittchen, E.S. (2013). The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J Cell Biol* *200*, 9–19.

Cai, Y., Rossier, O., Gauthier, N.C., Biais, N., Fardin, M.-A., Zhang, X., Miller, L.W., Ladoux, B., Cornish, V.W., and Sheetz, M.P. (2010). Cytoskeletal coherence requires myosin-IIA contractility. *J. Cell. Sci.* *123*, 413–423.

Callow, M.G., Zozulya, S., Gishizky, M.L., Jallal, B., and Smeal, T. (2005). PAK4 mediates morphological changes through the regulation of GEF-H1. *Journal of Cell Science* *118*, 1861–1872.

Cao, X., Kaneko, T., Li, J.S., Liu, A.-D., Voss, C., and Li, S.S.C. (2015). A phosphorylation switch controls the spatiotemporal activation of Rho GTPases in directional cell migration. *Nat Commun* *6*, 7721.

Chanet, S., Miller, C.J., Vaishnav, E.D., Ermentrout, B., Davidson, L.A., and Martin, A.C. (2017). Actomyosin meshwork mechanosensing enables tissue shape to orient cell force. *Nat Commun* *8*, 15014.

Chen, T., Saw, T.B., Mège, R.-M., and Ladoux, B. (2018). Mechanical forces in cell monolayers. *J Cell Sci* *131*, jcs218156.

Chevallier, J., Koop, C., Srivastava, A., Petrie, R.J., Lamarche-Vane, N., and Presley, J.F. (2009). Rab35 regulates neurite outgrowth and cell shape. *FEBS Letters* *583*, 1096–1101.

- Chew, T.L., Masaracchia, R.A., Goeckeler, Z.M., and Wysolmerski, R.B. (1998). Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK). *J. Muscle Res. Cell. Motil.* *19*, 839–854.
- Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., and Horwitz, A.R. (2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1039–1050.
- Choi, W., Acharya, B.R., Peyret, G., Fardin, M.-A., Mège, R.-M., Ladoux, B., Yap, A.S., Fanning, A.S., and Peifer, M. (2016). Remodeling the zonula adherens in response to tension and the role of afadin in this response. *J Cell Biol* *213*, 243–260.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* *133*, 1403–1415.
- Chu, J., Pham, N.T., Olate, N., Kislitsyna, K., Day, M.-C., LeTourneau, P.A., Kots, A., Stewart, R.H., Laine, G.A., Cox, C.S., et al. (2013). Biphasic Regulation of Myosin Light Chain Phosphorylation by p21-activated Kinase Modulates Intestinal Smooth Muscle Contractility. *J Biol Chem* *288*, 1200–1213.
- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M.F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* *3*, 339–345.
- Colombelli, J., Besser, A., Kress, H., Reynaud, E.G., Girard, P., Caussinus, E., Haselmann, U., Small, J.V., Schwarz, U.S., and Stelzer, E.H.K. (2009). Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *Journal of Cell Science* *122*, 1665–1679.
- Craig, R., Smith, R., and Kendrick-Jones, J. (1983). Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules. *Nature* *302*, 436–439.
- Crawley, S.W., Mooseker, M.S., and Tyska, M.J. (2014). Shaping the intestinal brush border. *J Cell Biol* *207*, 441–451.
- Dambournet, D., Machicoane, M., Chesneau, L., Sachse, M., Rocancourt, M., El Marjou, A., Formstecher, E., Salomon, R., Goud, B., and Echard, A. (2011). Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nature Cell Biology* *13*, 981–988.
- Dan, C., Kelly, A., Bernard, O., and Minden, A. (2001). Cytoskeletal Changes Regulated by the PAK4 Serine/Threonine Kinase Are Mediated by LIM Kinase 1 and Cofilin. *J. Biol. Chem.* *276*, 32115–32121.
- Danik, S.B., Liu, F., Zhang, J., Suk, H.J., Morley, G.E., Fishman, G.I., and Gutstein, D.E. (2004). Modulation of Cardiac Gap Junction Expression and Arrhythmic Susceptibility. *Circ Res* *95*, 1035–1041.
- Das, T., Safferling, K., Rausch, S., Grabe, N., Boehm, H., and Spatz, J.P. (2015). A molecular mechanotransduction pathway regulates collective migration of epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* *17*, 276–287.
- Davis, M.A., Ireton, R.C., and Reynolds, A.B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* *163*, 525–534.

Delacour, D., Salomon, J., Robine, S., and Louvard, D. (2016). Plasticity of the brush border - the yin and yang of intestinal homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *13*, 161–174.

Desai, R., Sarpal, R., Ishiyama, N., Pellikka, M., Ikura, M., and Tepass, U. (2013). Monomeric α -catenin links cadherin to the actin cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* *15*, 261–273.

Döbereiner, H.-G., Dubin-Thaler, B., Giannone, G., Xenias, H.S., and Sheetz, M.P. (2004). Dynamic phase transitions in cell spreading. *Phys. Rev. Lett.* *93*, 108105.

Dubin-Thaler, B.J., Giannone, G., Döbereiner, H.-G., and Sheetz, M.P. (2004). Nanometer Analysis of Cell Spreading on Matrix-Coated Surfaces Reveals Two Distinct Cell States and STEPs. *Biophys J* *86*, 1794–1806.

le Duc, Q., Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D., and de Rooij, J. (2010). Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *J Cell Biol* *189*, 1107–1115.

Dulyaninova, N.G., Malashkevich, V.N., Almo, S.C., and Bresnick, A.R. (2005). Regulation of myosin-IIA assembly and Mts1 binding by heavy chain phosphorylation. *Biochemistry* *44*, 6867–6876.

Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* *474*, 179–183.

Elbert, M., Cohen, D., and Müsch, A. (2006). PAR1b Promotes Cell–Cell Adhesion and Inhibits Dishevelled-mediated Transformation of Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Mol Biol Cell* *17*, 3345–3355.

Elosegui-Artola, A., Oria, R., Chen, Y., Kosmalska, A., Pérez-González, C., Castro, N., Zhu, C., Trepac, X., and Roca-Cusachs, P. (2016). Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. *Nature Cell Biology* *18*, 540–548.

Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* *126*, 677–689.

Evans, W.H., and Martin, P.E.M. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Molecular Membrane Biology* *19*, 121–136.

Fan, Q., Cheng, J.-C., Qiu, X., Chang, H.-M., and Leung, P.C.K. (2015). EpCAM is up-regulated by EGF via ERK1/2 signaling and suppresses human epithelial ovarian cancer cell migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *457*, 256–261.

Feng, Y., Ngu, H., Alford, S.K., Ward, M., Yin, F., and Longmore, G.D. (2013). α -actinin1 and 4 tyrosine phosphorylation is critical for stress fiber establishment, maintenance and focal adhesion maturation. *Exp. Cell Res.* *319*, 1124–1135.

Feng, Y., LoGrasso, P.V., Defert, O., and Li, R. (2016). Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential. *J. Med. Chem.* *59*, 2269–2300.

Franke, J.D., Montague, R.A., and Kiehart, D.P. (2005). Nonmuscle myosin II generates forces that transmit tension and drive contraction in multiple tissues during dorsal closure. *Curr. Biol.* *15*, 2208–2221.

Frémont, S., Hammich, H., Bai, J., Wioland, H., Klinkert, K., Rocancourt, M., Kikuti, C., Stroebel, D., Romet-Lemonne, G., Pylypenko, O., et al. (2017). Oxidation of F-actin controls the terminal steps of cytokinesis. *Nat Commun* 8, 14528.

Fritz, R.D., and Pertz, O. (2016). The dynamics of spatio-temporal Rho GTPase signaling: formation of signaling patterns. *F1000Res* 5.

Fujiwara, S., Ohashi, K., Mashiko, T., Kondo, H., and Mizuno, K. (2016). Interplay between Solo and keratin filaments is crucial for mechanical force-induced stress fiber reinforcement. *Mol Biol Cell* 27, 954–966.

Fujiwara, S., Matsui, T.S., Ohashi, K., Mizuno, K., and Deguchi, S. (2019). Keratin-binding ability of the N-terminal Solo domain of Solo is critical for its function in cellular mechanotransduction. *Genes Cells* 24, 390–402.

Fukata, M., Kuroda, S., Fujii, K., Nakamura, T., Shoji, I., Matsuura, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. (1997). Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J. Biol. Chem.* 272, 29579–29583.

Furuse, M., Izumi, Y., Oda, Y., Higashi, T., and Iwamoto, N. (2014). Molecular organization of tricellular tight junctions. *Tissue Barriers* 2, e28960.

Gaber, A., Kim, S.J., Kaake, R.M., Benčina, M., Krogan, N., Šali, A., Pavšič, M., and Lenarčič, B. (2018). EpCAM homo-oligomerization is not the basis for its role in cell-cell adhesion. *Sci Rep* 8.

Gaiser, M.R., Lämmermann, T., Feng, X., Igyarto, B.Z., Kaplan, D.H., Tessarollo, L., Germain, R.N., and Udey, M.C. (2012). Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E889-897.

Galic, M., Tsai, F.-C., Collins, S.R., Matis, M., Bandara, S., and Meyer, T. (2014). Dynamic recruitment of the curvature-sensitive protein ArhGAP44 to nanoscale membrane deformations limits exploratory filopodia initiation in neurons. *ELife* 3.

Gao, J., Yan, Q., Wang, J., Liu, S., and Yang, X. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 is mediated by AP1-dependent EpCAM expression in MCF-7 cells. *J. Cell. Physiol.* 230, 775–782.

Garcia, P.D., and Garcia, R. (2018). Determination of the Elastic Moduli of a Single Cell Cultured on a Rigid Support by Force Microscopy. *Biophys. J.* 114, 2923–2932.

Gateva, G., Tojkander, S., Koho, S., Carpen, O., and Lappalainen, P. (2014). Palladin promotes assembly of non-contractile dorsal stress fibers through VASP recruitment. *J Cell Sci* 127, 1887–1898.

Gauthier, N.C., Fardin, M.A., Roca-Cusachs, P., and Sheetz, M.P. (2011). Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14467–14472.

Geiger, B., Spatz, J.P., and Bershadsky, A.D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 21–33.

Giannone, G., Dubin-Thaler, B.J., Döbereiner, H.-G., Kieffer, N., Bresnick, A.R., and Sheetz, M.P. (2004). Periodic Lamellipodial Contractions Correlate with Rearward Actin Waves. *Cell* 116, 431–443.

Goldenberg, D.M., Stein, R., and Sharkey, R.M. (2018). The emergence of trophoblast cell-surface antigen 2 (TROP-2) as a novel cancer target. *Oncotarget* 9, 28989–29006.

Goulet, O., Kedinger, M., Brousse, N., Cuenod, B., Colomb, V., Patey, N., de Potter, S., Mougenot, J.F., Canioni, D., and Cerf-Bensussan, N. (1995). Intractable diarrhea of infancy with epithelial and basement membrane abnormalities. *J. Pediatr.* 127, 212–219.

Goulet, O., Salomon, J., Ruemmele, F., de Serres, N.P.-M., and Brousse, N. (2007). Intestinal epithelial dysplasia (tufting enteropathy). *Orphanet J Rare Dis* 2, 20.

Green, R.A., Paluch, E., and Oegema, K. (2012). Cytokinesis in Animal Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28, 29–58.

Gudipaty, S.A., and Rosenblatt, J. (2017). Epithelial cell extrusion: Pathways and pathologies. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 67, 132–140.

Guerra, E., Lattanzio, R., La Sorda, R., Dini, F., Tiboni, G.M., Piantelli, M., and Alberti, S. (2012). mTrop1/Epcam knockout mice develop congenital tufting enteropathy through dysregulation of intestinal E-cadherin/ β -catenin. *PLoS ONE* 7, e49302.

Gupta, M., Doss, B., Lim, C.T., Voituriez, R., and Ladoux, B. (2016). Single cell rigidity sensing: A complex relationship between focal adhesion dynamics and large-scale actin cytoskeleton remodeling. *Cell Adh Migr* 10, 554–567.

Hatte, G., Prigent, C., and Tassan, J.-P. (2018). Tight junctions negatively regulate mechanical forces applied to adherens junctions in vertebrate epithelial tissue. *J. Cell. Sci.* 131.

Hayakawa, K., Sato, N., and Obinata, T. (2001). Dynamic reorientation of cultured cells and stress fibers under mechanical stress from periodic stretching. *Exp. Cell Res.* 268, 104–114.

Heer, N.C., and Martin, A.C. (2017). Tension, contraction and tissue morphogenesis. *Development* 144, 4249–4260.

Heer, N.C., Miller, P.W., Chanet, S., Stoop, N., Dunkel, J., and Martin, A.C. (2017). Actomyosin-based tissue folding requires a multicellular myosin gradient. *Development* 144, 1876–1886.

Héraud, C., Pinault, M., Lagrée, V., and Moreau, V. (2019). p190RhoGAPs, the ARHGAP35- and ARHGAP5-Encoded Proteins, in Health and Disease. *Cells* 8.

Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D., and Koprowski, H. (1979). Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *PNAS* 76, 1438–1442.

Herreros-Pomares, A., Aguilar-Gallardo, C., Calabuig-Fariñas, S., Sirera, R., Jantus-Lewintre, E., and Camps, C. (2018). EpCAM duality becomes this molecule in a new Dr. Jekyll and Mr. Hyde tale. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 126, 52–63.

Herrmann, H., and Aebi, U. (2016). Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.

Higashi, T., and Miller, A.L. (2017). Tricellular junctions: how to build junctions at the TRICkiest points of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 28, 2023–2034.

- Hirata, N., Takahashi, M., and Yazawa, M. (2009). Diphosphorylation of regulatory light chain of myosin IIA is responsible for proper cell spreading. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 381, 682–687.
- Hodge, R.G., and Ridley, A.J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17, 496–510.
- Hoffman, L.M., Jensen, C.C., Chaturvedi, A., Yoshigi, M., and Beckerle, M.C. (2012). Stretch-induced actin remodeling requires targeting of zyxin to stress fibers and recruitment of actin regulators. *Mol. Biol. Cell* 23, 1846–1859.
- Hohmann, T., and Dehghani, F. (2019). The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells* 8.
- Holzapfel, G., Wehland, J., and Weber, K. (1983). Calcium control of actin-myosin based contraction in triton models of mouse 3T3 fibroblasts is mediated by the myosin light chain kinase (MLCK)-calmodulin complex. *Exp. Cell Res.* 148, 117–126.
- Hong, S., Troyanovsky, R.B., and Troyanovsky, S.M. (2013). Binding to F-actin guides cadherin cluster assembly, stability, and movement. *J Cell Biol* 201, 131–143.
- Hotulainen, P., and Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of Cell Biology* 173, 383–394.
- Humphries, J.D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M.J., and Ballestrem, C. (2007). Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* 179, 1043–1057.
- Iden, S., and Collard, J.G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 846–859.
- Ikebe, M., Hartshorne, D.J., and Elzinga, M. (1986). Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.* 261, 36–39.
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171, 939–945.
- Iskratsch, T., Yu, C.-H., Mathur, A., Liu, S., Stévenin, V., Dwyer, J., Hone, J., Ehler, E., and Sheetz, M. (2013). FHOD1 is needed for directed forces and adhesion maturation during cell spreading and migration. *Dev. Cell* 27, 545–559.
- Ito, S., Okuda, S., Abe, M., Fujimoto, M., Onuki, T., Nishimura, T., and Takeichi, M. (2017). Induced cortical tension restores functional junctions in adhesion-defective carcinoma cells. *Nat Commun* 8, 1834.
- Itoh, K., Ossipova, O., and Sokol, S.Y. (2014). GEF-H1 functions in apical constriction and cell intercalations and is essential for vertebrate neural tube closure. *J. Cell. Sci.* 127, 2542–2553.
- Izumi, G., Sakisaka, T., Baba, T., Tanaka, S., Morimoto, K., and Takai, Y. (2004). Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. *J. Cell Biol.* 166, 237–248.

Jalal, S., Shi, S., Acharya, V., Huang, R.Y.-J., Viasnoff, V., Bershadsky, A.D., and Tee, Y.H. (2019). Actin cytoskeleton self-organization in single epithelial cells and fibroblasts under isotropic confinement. *J. Cell. Sci.* *132*.

Julian, L., and Olson, M.F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK). *Small GTPases* *5*.

Kage, F., Winterhoff, M., Dimchev, V., Mueller, J., Thalheim, T., Freise, A., Brühmann, S., Kollasser, J., Block, J., Dimchev, G., et al. (2017). FMNL formins boost lamellipodial force generation. *Nat Commun* *8*, 14832.

Kajiho, H., Kajiho, Y., and Scita, G. (2018). Harnessing membrane trafficking to promote cancer spreading and invasion: The case of RAB2A. *Small GTPases* *9*, 304–309.

Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A.M., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Hess, H.F., and Waterman, C.M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* *468*, 580–584.

Kassianidou, E., and Kumar, S. (2015). A biomechanical perspective on stress fiber structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* *1853*, 3065–3074.

Kassianidou, E., Hughes, J.H., and Kumar, S. (2017a). Activation of ROCK and MLCK tunes regional stress fiber formation and mechanics via preferential myosin light chain phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* *28*, 3832–3843.

Kassianidou, E., Brand, C.A., Schwarz, U.S., and Kumar, S. (2017b). Geometry and network connectivity govern the mechanics of stress fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, 2622–2627.

Keller, T.C., Conzelman, K.A., Chasan, R., and Mooseker, M.S. (1985). Role of myosin in terminal web contraction in isolated intestinal epithelial brush borders. *J. Cell Biol.* *100*, 1647–1655.

Klingner, C., Cherian, A.V., Fels, J., Diesinger, P.M., Aufschnaiter, R., Maghelli, N., Keil, T., Beck, G., Tolić-Nørrelykke, I.M., Bathe, M., et al. (2014). Isotropic actomyosin dynamics promote organization of the apical cell cortex in epithelial cells. *J. Cell Biol.* *207*, 107–121.

Klinkert, K., and Echard, A. (2016). Rab35 GTPase: A Central Regulator of Phosphoinositides and F-actin in Endocytic Recycling and Beyond. *Traffic* *17*, 1063–1077.

Kobayashi, H., and Fukuda, M. (2013). Rab35 establishes the EHD1-association site by coordinating two distinct effectors during neurite outgrowth. *J. Cell. Sci.* *126*, 2424–2435.

Kobielak, A., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nature Cell Biology* *6*, 21.

Kocgozlu, L., Saw, T.B., Le, A.P., Yow, I., Shagirov, M., Wong, E., Mège, R.-M., Lim, C.T., Toyama, Y., and Ladoux, B. (2016). Epithelial cell packing induces distinct modes of cell extrusions. *Curr Biol* *26*, 2942–2950.

Koestler, S.A., Steffen, A., Nemethova, M., Winterhoff, M., Luo, N., Holleboom, J.M., Krupp, J., Jacob, S., Vinzenz, M., Schur, F., et al. (2013). Arp2/3 complex is essential for actin network treadmilling as well as for targeting of capping protein and cofilin. *Mol. Biol. Cell* *24*, 2861–2875.

- Kohno, T., Kikuchi, S., Ninomiya, T., and Kojima, T. (2017). The bicellular tensile force sorts the localization of LSRs in bicellular and tricellular junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1397*, 185–194.
- Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B., and Echard, A. (2006). Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr. Biol.* *16*, 1719–1725.
- Kovac, B., Teo, J.L., Mäkelä, T.P., and Vallenius, T. (2013). Assembly of non-contractile dorsal stress fibers requires α -actinin-1 and Rac1 in migrating and spreading cells. *J. Cell. Sci.* *126*, 263–273.
- Kovacs, E.M., Goodwin, M., Ali, R.G., Paterson, A.D., and Yap, A.S. (2002). 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.
- Kovács, M., Wang, F., Hu, A., Zhang, Y., and Sellers, J.R. (2003). Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. *J. Biol. Chem.* *278*, 38132–38140.
- Kowalczyk, A.P., and Green, K.J. (2013). Structure, Function and Regulation of Desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci* *116*, 95–118.
- Kuan, I.-I., Liang, K.-H., Wang, Y.-P., Kuo, T.-W., Meir, Y.-J.J., Wu, S.C.-Y., Yang, S.-C., Lu, J., and Wu, H.-C. (2017). EpEX/EpCAM and Oct4 or Klf4 alone are sufficient to generate induced pluripotent stem cells through STAT3 and HIF2 α . *Sci Rep* *7*, 41852.
- Kulakowski, G., Bousquet, H., Manneville, J.-B., Bassereau, P., Goud, B., and Oesterlin, L.K. (2018). Lipid packing defects and membrane charge control RAB GTPase recruitment. *Traffic* *19*, 536–545.
- Kumar, R., Sanawar, R., Li, X., and Li, F. (2017). Structure, Biochemistry, and Biology of PAK Kinases. *Gene* *605*, 20–31.
- Kuragano, M., Murakami, Y., and Takahashi, M. (2018). Nonmuscle myosin IIA and IIB differentially contribute to intrinsic and directed migration of human embryonic lung fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *498*, 25–31.
- Kurniawan, N.A., Chaudhuri, P.K., and Lim, C.T. (2016). Mechanobiology of cell migration in the context of dynamic two-way cell–matrix interactions. *Journal of Biomechanics* *49*, 1355–1368.
- Ladoux, B., Anon, E., Lambert, M., Rabodzey, A., Hersen, P., Buguin, A., Silberzan, P., and Mège, R.-M. (2010). Strength Dependence of Cadherin-Mediated Adhesions. *Biophys J* *98*, 534–542.
- Ladoux, B., Nelson, W.J., Yan, J., and Mège, R.M. (2015). The mechanotransduction machinery at work at adherens junctions. *Integr Biol (Camb)* *7*, 1109–1119.
- Ladwein, M., Pape, U.-F., Schmidt, D.-S., Schnölzer, M., Fiedler, S., Langbein, L., Franke, W.W., Moldenhauer, G., and Zöller, M. (2005). The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp. Cell Res.* *309*, 345–357.
- Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell* *84*, 359–369.
- Lawson, C.D., and Ridley, A.J. (2018). Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol* *217*, 447–457.

Lecuit, T., and Yap, A.S. (2015). E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics. *Nat. Cell Biol.* *17*, 533–539.

Lecuit, T., Lenne, P.-F., and Munro, E. (2011). Force Generation, Transmission, and Integration during Cell and Tissue Morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *27*, 157–184.

Lee, J.H., Zheng, Y., von Bornstadt, D., Wei, Y., Balcioglu, A., Daneshmand, A., Yalcin, N., Yu, E., Herisson, F., Atalay, Y.B., et al. (2014). Selective ROCK2 Inhibition In Focal Cerebral Ischemia. *Ann Clin Transl Neurol* *1*, 2–14.

Lee, S., Kassianidou, E., and Kumar, S. (2018). Actomyosin stress fiber subtypes have unique viscoelastic properties and roles in tension generation. *Mol Biol Cell* *29*, 1992–2004.

Leerberg, J.M., Gomez, G.A., Verma, S., Moussa, E.J., Wu, S.K., Priya, R., Hoffman, B.D., Grashoff, C., Schwartz, M.A., and Yap, A.S. (2014). Tension-Sensitive Actin Assembly Supports Contractility at the Epithelial Zonula Adherens. *Curr Biol* *24*, 1689–1699.

Lei, Z., Maeda, T., Tamura, A., Nakamura, T., Yamazaki, Y., Shiratori, H., Yashiro, K., Tsukita, S., and Hamada, H. (2012). EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. *Developmental Biology* *371*, 136–145.

Leung, T., Manser, E., Tan, L., and Lim, L. (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J. Biol. Chem.* *270*, 29051–29054.

Leung, T., Chen, X.Q., Manser, E., and Lim, L. (1996). The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* *16*, 5313–5327.

Ligtenberg, M.J.L., Kuiper, R.P., Chan, T.L., Goossens, M., Hebeda, K.M., Voorendt, M., Lee, T.Y.H., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Hendriks-Cornelissen, S.J.B., et al. (2009). Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat. Genet.* *41*, 112–117.

Lisowska, J., Rödel, C.J., Manet, S., Miroshnikova, Y.A., Boyault, C., Planus, E., Mets, R.D., Lee, H.-H., Destaing, O., Mertani, H., et al. (2018). The CCM1–CCM2 complex controls complementary functions of ROCK1 and ROCK2 that are required for endothelial integrity. *J Cell Sci* *131*, jcs216093.

Litvinov, S.V., Bakker, H.A.M., Velders, M.P., Fleuren, G.J., and Warnaar, S.O. (1994). Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* *125*, 437–446.

Litvinov, S.V., Balzar, M., Winter, M.J., Bakker, H.A., Briaire-de Bruijn, I.H., Prins, F., Fleuren, G.J., and Warnaar, S.O. (1997). Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J. Cell Biol.* *139*, 1337–1348.

Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., Lahrmann, U., Zhao, Q., Zheng, Y., Zhao, Y., et al. (2015). IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics* *31*, 3359–3361.

Liu, Z., Tan, J.L., Cohen, D.M., Yang, M.T., Sniadecki, N.J., Ruiz, S.A., Nelson, C.M., and Chen, C.S. (2010). Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 9944–9949.

- Loschke, F., Seltsmann, K., Bouameur, J.-E., and Magin, T.M. (2015). Regulation of keratin network organization. *Curr. Opin. Cell Biol.* *32*, 56–64.
- Lu, T.-Y., Lu, R.-M., Liao, M.-Y., Yu, J., Chung, C.-H., Kao, C.-F., and Wu, H.-C. (2010). Epithelial Cell Adhesion Molecule Regulation Is Associated with the Maintenance of the Undifferentiated Phenotype of Human Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 8719–8732.
- Lynch, H.T., Snyder, C.L., Shaw, T.G., Heinen, C.D., and Hitchins, M.P. (2015). Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 181–194.
- Ma, X., Jana, S.S., Anne Conti, M., Kawamoto, S., Claycomb, W.C., and Adelstein, R.S. (2010). Ablation of Nonmuscle Myosin II-B and II-C Reveals a Role for Nonmuscle Myosin II in Cardiac Myocyte Karyokinesis. *Mol Biol Cell* *21*, 3952–3962.
- Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G.L., Hahn, K.M., and Danuser, G. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* *461*, 99–103.
- Machesky, L.M., and Hall, A. (1997). Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J. Cell Biol.* *138*, 913–926.
- Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P.A., Munz, M., et al. (2009). Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nature Cell Biology* *11*, 162–171.
- Maghzal, N., Vogt, E., Reintsch, W., Fraser, J.S., and Fagotto, F. (2010). The tumor-associated EpCAM regulates morphogenetic movements through intracellular signaling. *J. Cell Biol.* *191*, 645–659.
- Maghzal, N., Kayali, H.A., Rohani, N., Kajava, A.V., and Fagotto, F. (2013). EpCAM Controls Actomyosin Contractility and Cell Adhesion by Direct Inhibition of PKC. *Developmental Cell* *27*, 263–277.
- Mason, F.M., Xie, S., Vasquez, C.G., Tworoger, M., and Martin, A.C. (2016). RhoA GTPase inhibition organizes contraction during epithelial morphogenesis. *J. Cell Biol.* *214*, 603–617.
- Masuda, S., Oda, Y., Sasaki, H., Ikenouchi, J., Higashi, T., Akashi, M., Nishi, E., and Furuse, M. (2011). LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J Cell Sci* *124*, 548–555.
- Mateus, A.M., Gorfinkiel, N., Schamberg, S., and Martinez Arias, A. (2011). Endocytic and Recycling Endosomes Modulate Cell Shape Changes and Tissue Behaviour during Morphogenesis in *Drosophila*. *PLoS One* *6*.
- McBeath, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K., and Chen, C.S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* *6*, 483–495.
- Mège, R.M., and Ishiyama, N. (2017). Integration of Cadherin Adhesion and Cytoskeleton at Adherens Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *9*, a028738.
- Meiri, D., Marshall, C.B., Greeve, M.A., Kim, B., Balan, M., Suarez, F., Bakal, C., Wu, C., Larose, J., Fine, N., et al. (2012). Mechanistic insight into the microtubule and actin cytoskeleton coupling through dynein-dependent RhoGEF inhibition. *Mol. Cell* *45*, 642–655.

- Mellman, I., and Yarden, Y. (2013). Endocytosis and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a016949.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M., and Philips, M.R. (2001). Differential Localization of Rho Gtpases in Live Cells. *J Cell Biol* 152, 111–126.
- Michel, D., Arsanto, J.-P., Massey-Harroche, D., Béclin, C., Wijnholds, J., and Le Bivic, A. (2005). PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J. Cell. Sci.* 118, 4049–4057.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761–772.
- Monier, B., Gettings, M., Gay, G., Mangeat, T., Schott, S., Guarner, A., and Suzanne, M. (2015). Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. *Nature* 518, 245–248.
- Mueller, J.L., McGeough, M.D., Peña, C.A., and Sivagnanam, M. (2014). Functional consequences of EpCam mutation in mice and men. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306, G278–G288.
- Munjal, A., and Lecuit, T. (2014). Actomyosin networks and tissue morphogenesis. *Development* 141, 1789–1793.
- Munjal, A., Philippe, J.-M., Munro, E., and Lecuit, T. (2015). A self-organized biomechanical network drives shape changes during tissue morphogenesis. *Nature* 524, 351–355.
- Munz, M., Fellingner, K., Hofmann, T., Schmitt, B., and Gires, O. (2008). Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM. *Front. Biosci.* 13, 5195–5201.
- Murrell, M.P., and Gardel, M.L. (2012). F-actin buckling coordinates contractility and severing in a biomimetic actomyosin cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 20820–20825.
- Nanes, B.A., Chiasson-MacKenzie, C., Lowery, A.M., Ishiyama, N., Faundez, V., Ikura, M., Vincent, P.A., and Kowalczyk, A.P. (2012). p120-catenin binding masks an endocytic signal conserved in classical cadherins. *J Cell Biol* 199, 365–380.
- Naslavsky, N., and Caplan, S. (2011). EHD proteins: Key conductors of endocytic transport. *Trends Cell Biol* 21, 122–131.
- Nguyen, T.T.T., Park, W.S., Park, B.O., Kim, C.Y., Oh, Y., Kim, J.M., Choi, H., Kyung, T., Kim, C.-H., Lee, G., et al. (2016). PLEKHG3 enhances polarized cell migration by activating actin filaments at the cell front. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 10091–10096.
- Nicholas, N.S., Pipili, A., Lesjak, M.S., and Wells, C.M. (2019). Differential role for PAK1 and PAK4 during the invadopodia lifecycle. *Small GTPases* 10, 289–295.
- Niediek, V., Born, S., Hampe, N., Kirchgeßner, N., Merkel, R., and Hoffmann, B. (2012). Cyclic stretch induces reorientation of cells in a Src family kinase- and p130Cas-dependent manner. *European Journal of Cell Biology* 91, 118–128.
- Nimnual, A.S., Taylor, L.J., and Bar-Sagi, D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* 5, 236–241.

Nishimura, T., and Kaibuchi, K. (2007). Numb Controls Integrin Endocytosis for Directional Cell Migration with aPKC and PAR-3. *Developmental Cell* 13, 15–28.

Nishimura, T., and Takeichi, M. (2008). Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling. *Development* 135, 1493–1502.

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.

Nübel, T., Preobraschenski, J., Tuncay, H., Weiss, T., Kuhn, S., Ladwein, M., Langbein, L., and Zöller, M. (2009). Claudin-7 Regulates EpCAM-Mediated Functions in Tumor Progression. *Mol Cancer Res* 7, 285–299.

Oakes, P.W., Beckham, Y., Stricker, J., and Gardel, M.L. (2012). Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template. *J Cell Biol* 196, 363–374.

Oakes, P.W., Wagner, E., Brand, C.A., Probst, D., Linke, M., Schwarz, U.S., Glotzer, M., and Gardel, M.L. (2017). Optogenetic control of RhoA reveals zyxin-mediated elasticity of stress fibres. *Nat Commun* 8.

Oda, Y., Otani, T., Ikenouchi, J., and Furuse, M. (2014). Tricellulin regulates junctional tension of epithelial cells at tricellular contacts through Cdc42. *J Cell Sci* 127, 4201–4212.

Oh, K.-S., Oh, B.K., Park, C.H., Seo, H.W., Kang, N.S., Lee, J.H., Lee, J.S., and Ho Lee, B. (2013). Cardiovascular effects of a novel selective Rho kinase inhibitor, 2-(1H-indazole-5-yl)amino-4-methoxy-6-piperazino triazine (DW1865). *Eur. J. Pharmacol.* 702, 218–226.

Owen, L.M., Adhikari, A.S., Patel, M., Grimmer, P., Leijnse, N., Kim, M.C., Notbohm, J., Franck, C., and Dunn, A.R. (2017). A cytoskeletal clutch mediates cellular force transmission in a soft, three-dimensional extracellular matrix. *Mol Biol Cell* 28, 1959–1974.

Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, A.S., and Gundersen, G.G. (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Biol.* 3, 723–729.

Pan, M., Schinke, H., Luxenburger, E., Kranz, G., Shakhtour, J., Libl, D., Huang, Y., Gaber, A., Pavšič, M., Lenarčič, B., et al. (2018). EpCAM ectodomain EpEX is a ligand of EGFR that counteracts EGF-mediated epithelial-mesenchymal transition through modulation of phospho-ERK1/2 in head and neck cancers. *PLoS Biol.* 16, e2006624.

Papusheva, E., and Heisenberg, C.-P. (2010). Spatial organization of adhesion: force-dependent regulation and function in tissue morphogenesis. *The EMBO Journal* 29, 2753–2768.

Pasapera, A.M., Plotnikov, S.V., Fischer, R.S., Case, L.B., Egelhoff, T.T., and Waterman, C.M. (2015). Rac1-dependent phosphorylation and focal adhesion recruitment of myosin IIA regulates migration and mechanosensing. *Curr Biol* 25, 175–186.

Patey, N., Scoazec, J., Cuenod-Jabri, B., Canioni, D., Kedinger, M., Goulet, O., and Brousse, N. (1997). Distribution of cell adhesion molecules in infants with intestinal epithelial dysplasia (tufting enteropathy). *Gastroenterology* 113, 833–843.

Patriarca, C., Macchi, R.M., Marschner, A.K., and Mellstedt, H. (2012). Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: A short review. *Cancer Treatment Reviews* 38, 68–75.

Paul, N.R., Jacquemet, G., and Caswell, P.T. (2015). Endocytic Trafficking of Integrins in Cell Migration. *Current Biology* 25, R1092–R1105.

Pavšič, M., Gunčar, G., Djinović-Carugo, K., and Lenarčič, B. (2014). Crystal structure and its bearing towards an understanding of key biological functions of EpCAM. *Nature Communications* 5, 4764.

Pegtel, D.M., Ellenbroek, S.I.J., Mertens, A.E.E., van der Kammen, R.A., de Rooij, J., and Collard, J.G. (2007). The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity. *Curr. Biol.* 17, 1623–1634.

Peng, Y., Chen, Z., Chen, Y., Li, S., Jiang, Y., Yang, H., Wu, C., You, F., Zheng, C., Zhu, J., et al. (2019). ROCK isoforms differentially modulate cancer cell motility by mechanosensing the substrate stiffness. *Acta Biomaterialia* 88, 86–101.

Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L., and Hahn, K.M. (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440, 1069.

Peterson, L.J., Rajfur, Z., Maddox, A.S., Freel, C.D., Chen, Y., Edlund, M., Otey, C., and Burridge, K. (2004). Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo. *Mol. Biol. Cell* 15, 3497–3508.

Piekny, A.J., and Glotzer, M. (2008). Anillin Is a Scaffold Protein That Links RhoA, Actin, and Myosin during Cytokinesis. *Current Biology* 18, 30–36.

Pinheiro, D., and Bellaïche, Y. (2018). Mechanical Force-Driven Adherens Junction Remodeling and Epithelial Dynamics. *Dev. Cell* 47, 3–19.

Pollard, T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol* 103, 2747–2754.

Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S.L., Waterman-Storer, C.M., and Danuser, G. (2004). Two Distinct Actin Networks Drive the Protrusion of Migrating Cells. *Science* 305, 1782–1786.

Prager-Khoutorsky, M., Lichtenstein, A., Krishnan, R., Rajendran, K., Mayo, A., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2011). Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nature Cell Biology* 13, 1457–1465.

Priya, R., Gomez, G.A., Budnar, S., Verma, S., Cox, H.L., Hamilton, N.A., and Yap, A.S. (2015). Feedback regulation through myosin II confers robustness on RhoA signalling at E-cadherin junctions. *Nature Cell Biology* 17, 1282–1293.

Priya, R., Liang, X., Teo, J.L., Duszyc, K., Yap, A.S., and Gomez, G.A. (2017). ROCK1 but not ROCK2 contributes to RhoA signaling and NMIIA-mediated contractility at the epithelial zonula adherens. *Mol Biol Cell* 28, 12–20.

Qin, Y., Capaldo, C., Gumbiner, B.M., and Macara, I.G. (2005). The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *J Cell Biol* 171, 1061–1071.

- Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* *265*, 23–32.
- Raleigh, D.R., Marchiando, A.M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M., and Turner, J.R. (2010). Tight Junction-associated MARVEL Proteins MarvelD3, Tricellulin, and Occludin Have Distinct but Overlapping Functions. *Mol Biol Cell* *21*, 1200–1213.
- Rape, A.D., Guo, W.-H., and Wang, Y.-L. (2011). The regulation of traction force in relation to cell shape and focal adhesions. *Biomaterials* *32*, 2043–2051.
- Ravasio, A., Cheddadi, I., Chen, T., Pereira, T., Ong, H.T., Bertocchi, C., Brugues, A., Jacinto, A., Kabla, A.J., Toyama, Y., et al. (2015). Gap geometry dictates epithelial closure efficiency. *Nat Commun* *6*.
- Reifen, R.M., Cutz, E., Griffiths, A.M., Ngan, B.Y., and Sherman, P.M. (1994). Tufting enteropathy: a newly recognized clinicopathological entity associated with refractory diarrhea in infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *18*, 379–385.
- Rhee, S., and Grinnell, F. (2006). P21-activated kinase 1: convergence point in PDGF- and LPA-stimulated collagen matrix contraction by human fibroblasts. *J Cell Biol* *172*, 423–432.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* *302*, 1704–1709.
- Roca-Cusachs, P., del Rio, A., Puklin-Faucher, E., Gauthier, N.C., Biais, N., and Sheetz, M.P. (2013). Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by α -actinin triggers adhesion maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, E1361–E1370.
- Rodriguez-Boulan, E., and Macara, I.G. (2014). Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol* *15*, 225–242.
- Rodriguez-Diaz, A., Toyama, Y., Abravanel, D.L., Wiemann, J.M., Wells, A.R., Tulu, U.S., Edwards, G.S., and Kiehart, D.P. (2008). Actomyosin purse strings: renewable resources that make morphogenesis robust and resilient. *HFSP J* *2*, 220–237.
- Roeth, J.F., Sawyer, J.K., Wilner, D.A., and Peifer, M. (2009). Rab11 Helps Maintain Apical Crumbs and Adherens Junctions in the Drosophila Embryonic Ectoderm. *PLoS One* *4*.
- Roland, J.T., Bryant, D.M., Datta, A., Itzen, A., Mostov, K.E., and Goldenring, J.R. (2011). Rab GTPase-Myo5B complexes control membrane recycling and epithelial polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 2789–2794.
- Rolo, A., Skoglund, P., and Keller, R. (2009). Morphogenetic movements driving neural tube closure in *Xenopus* require myosin IIB. *Dev Biol* *327*, 327.
- Rosenblatt, J., Raff, M.C., and Cramer, L.P. (2001). An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr. Biol.* *11*, 1847–1857.
- Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 167–180.
- Salomon, J., Espinosa-Parrilla, Y., Goulet, O., Al-Qabandi, W., Guigue, P., Canioni, D., Bruneau, J., Alzahrani, F., Almuhsen, S., Cerf-Bensussan, N., et al. (2011). A founder effect at the EPCAM locus in Congenital Tufting Enteropathy in the Arabic Gulf. *Eur J Med Genet* *54*, 319–322.

Salomon, J., Goulet, O., Canioni, D., Brousse, N., Lemale, J., Tounian, P., Coulomb, A., Marinier, E., Hugot, J.-P., Ruemmele, F., et al. (2014). Genetic characterization of congenital tufting enteropathy: epcam associated phenotype and involvement of SPINT2 in the syndromic form. *Hum. Genet.* *133*, 299–310.

Salomon, J., Gaston, C., Magescas, J., Duvauchelle, B., Canioni, D., Sengmanivong, L., Mayeux, A., Michaux, G., Campeotto, F., Lemale, J., et al. (2017). Contractile forces at tricellular contacts modulate epithelial organization and monolayer integrity. *Nat Commun* *8*.

Sandí, M.-J., Marshall, C.B., Balan, M., Coyaud, É., Zhou, M., Monson, D.M., Ishiyama, N., Chandrakumar, A.A., La Rose, J., Couzens, A.L., et al. (2017). MARK3-mediated phosphorylation of ARHGEF2 couples microtubules to the actin cytoskeleton to establish cell polarity. *Sci Signal* *10*.

Sato, K., Watanabe, T., Wang, S., Kakeno, M., Matsuzawa, K., Matsui, T., Yokoi, K., Murase, K., Sugiyama, I., Ozawa, M., et al. (2011). Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC. *Mol. Biol. Cell* *22*, 3103–3119.

Schiller, H.B., Friedel, C.C., Boulegue, C., and Fässler, R. (2011). Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. *EMBO Rep* *12*, 259–266.

Schnell, U., Cirulli, V., and Giepmans, B.N.G. (2013). EpCAM: Structure and function in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* *1828*, 1989–2001.

Scholey, J.M., Taylor, K.A., and Kendrick-Jones, J. (1980). Regulation of non-muscle myosin assembly by calmodulin-dependent light chain kinase. *Nature* *287*, 233.

Seddiki, R., Narayana, G.H.N.S., Strale, P.-O., Balcioglu, H.E., Peyret, G., Yao, M., Le, A.P., Teck Lim, C., Yan, J., Ladoux, B., et al. (2018). Force-dependent binding of vinculin to α -catenin regulates cell–cell contact stability and collective cell behavior. *Mol Biol Cell* *29*, 380–388.

Senju, Y., and Miyata, H. (2009). The role of actomyosin contractility in the formation and dynamics of actin bundles during fibroblast spreading. *J. Biochem.* *145*, 137–150.

Shemesh, T., Verkhovsky, A.B., Svitkina, T.M., Bershadsky, A.D., and Kozlov, M.M. (2009). Role of Focal Adhesions and Mechanical Stresses in the Formation and Progression of the Lamellum Interface. *Biophys J* *97*, 1254–1264.

Shewan, A.M., Maddugoda, M., Kraemer, A., Stehbens, S.J., Verma, S., Kovacs, E.M., and Yap, A.S. (2005). Myosin 2 Is a Key Rho Kinase Target Necessary for the Local Concentration of E-Cadherin at Cell–Cell Contacts. *MBoC* *16*, 4531–4542.

Shim, J., Lee, S.-M., Lee, M.S., Yoon, J., Kweon, H.-S., and Kim, Y.-J. (2010). Rab35 Mediates Transport of Cdc42 and Rac1 to the Plasma Membrane during Phagocytosis. *Mol Cell Biol* *30*, 1421–1433.

Sivagnanam, M., Mueller, J.L., Lee, H., Chen, Z., Nelson, S.F., Turner, D., Zlotkin, S.H., Pencharz, P.B., Ngan, B.-Y., Libiger, O., et al. (2008). Identification of EpCAM as the gene for congenital tufting enteropathy. *Gastroenterology* *135*, 429–437.

Slanchev, K., Carney, T.J., Stemmler, M.P., Koschorz, B., Amsterdam, A., Schwarz, H., and Hammerschmidt, M. (2009). The Epithelial Cell Adhesion Molecule EpCAM Is Required for Epithelial Morphogenesis and Integrity during Zebrafish Epiboly and Skin Development. *PLoS Genet* *5*.

- Slattum, G., McGee, K.M., and Rosenblatt, J. (2009). P115 RhoGEF and microtubules decide the direction apoptotic cells extrude from an epithelium. *J Cell Biol* 186, 693–702.
- Smith, M.A., Blankman, E., Gardel, M.L., Luettjohann, L., Waterman, C.M., and Beckerle, M.C. (2010). A Zyxin-Mediated Mechanism for Actin Stress Fiber Maintenance and Repair. *Dev Cell* 19, 365–376.
- Soiné, J.R.D., Brand, C.A., Stricker, J., Oakes, P.W., Gardel, M.L., and Schwarz, U.S. (2015). Model-based Traction Force Microscopy Reveals Differential Tension in Cellular Actin Bundles. *PLoS Comput Biol* 11.
- Song, S., Eckerle, S., Onichtchouk, D., Marrs, J.A., Nitschke, R., and Driever, W. (2013). Pou5f1-dependent EGF expression controls E-cadherin endocytosis, cell adhesion, and zebrafish epiboly movements. *Dev. Cell* 24, 486–501.
- Spadaro, D., Le, S., Laroche, T., Mean, I., Jond, L., Yan, J., and Citi, S. (2017). Tension-Dependent Stretching Activates ZO-1 to Control the Junctional Localization of Its Interactors. *Current Biology* 27, 3783-3795.e8.
- Staehein, L.A., Mukherjee, T.M., and Williams, A.W. (1969). Freeze-etch appearance of the tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice. *Protoplasma* 67, 165–184.
- Stahley, S.N., and Kowalczyk, A.P. (2015). Desmosomes in acquired disease. *Cell Tissue Res* 360, 439–456.
- Staunton, J.R., Doss, B.L., Lindsay, S., and Ros, R. (2016). Correlating confocal microscopy and atomic force indentation reveals metastatic cancer cells stiffen during invasion into collagen I matrices. *Sci Rep* 6, 19686.
- Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J., and Stradal, T.E.B. (2004). Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* 23, 749–759.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 513–525.
- Sun, Z., Guo, S.S., and Fässler, R. (2016). Integrin-mediated mechanotransduction. *J Cell Biol* 215, 445–456.
- Swart-Mataraza, J.M., Li, Z., and Sacks, D.B. (2002). IQGAP1 is a component of Cdc42 signaling to the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 277, 24753–24763.
- Tachibana, K., Nakanishi, H., Mandai, K., Ozaki, K., Ikeda, W., Yamamoto, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S., and Takai, Y. (2000). Two Cell Adhesion Molecules, Nectin and Cadherin, Interact through Their Cytoplasmic Domain–Associated Proteins. *J Cell Biol* 150, 1161–1176.
- Takai, Y., and Nakanishi, H. (2003). Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *Journal of Cell Science* 116, 17–27.
- Takeichi, M. (2014). Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 397–410.
- Tanner, K., Boudreau, A., Bissell, M.J., and Kumar, S. (2010). Dissecting regional variations in stress fiber mechanics in living cells with laser nanosurgery. *Biophys. J.* 99, 2775–2783.

Tee, Y.H., Shemesh, T., Thiagarajan, V., Hariadi, R.F., Anderson, K.L., Page, C., Volkmann, N., Hanein, D., Sivaramakrishnan, S., Kozlov, M.M., et al. (2015). Cellular chirality arising from the self-organization of the actin cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* *17*, 445–457.

Teo, J.L., and Yap, A.S. (2016). Cycling Rho for tissue contraction. *J. Cell Biol.* *214*, 495–498.

Thomas, W.A., Boscher, C., Chu, Y.-S., Cuvelier, D., Martinez-Rico, C., Seddiki, R., Heysch, J., Ladoux, B., Thiery, J.P., Mege, R.-M., et al. (2013). α -Catenin and Vinculin Cooperate to Promote High E-cadherin-based Adhesion Strength. *J Biol Chem* *288*, 4957–4969.

Tojkander, S., Gateva, G., Schevzov, G., Hotulainen, P., Naumanen, P., Martin, C., Gunning, P.W., and Lappalainen, P. (2011). A Molecular Pathway for Myosin II Recruitment to Stress Fibers. *Current Biology* *21*, 539–550.

Tojkander, S., Gateva, G., and Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci* *125*, 1855–1864.

Tojkander, S., Gateva, G., Husain, A., Krishnan, R., and Lappalainen, P. (2015). Generation of contractile actomyosin bundles depends on mechanosensitive actin filament assembly and disassembly. *ELife* *4*.

Trebak, M., Begg, G.E., Chong, J.M., Kanazireva, E.V., Herlyn, D., and Speicher, D.W. (2001). Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* *276*, 2299–2309.

Trepat, X., Wasserman, M.R., Angelini, T.E., Millet, E., Weitz, D.A., Butler, J.P., and Fredberg, J.J. (2009). Physical forces during collective cell migration. *Nature Physics* *5*, 426–430.

Trichet, L., Digabel, J.L., Hawkins, R.J., Vedula, S.R.K., Gupta, M., Ribault, C., Hersen, P., Voituriez, R., and Ladoux, B. (2012). Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness. *PNAS* *109*, 6933–6938.

Truebestein, L., Elsner, D.J., Fuchs, E., and Leonard, T.A. (2015). A molecular ruler regulates cytoskeletal remodelling by the Rho kinases. *Nat Commun* *6*, 10029.

Tsaktanis, T., Kremling, H., Pavšič, M., von Stackelberg, R., Mack, B., Fukumori, A., Steiner, H., Vielmuth, F., Spindler, V., Huang, Z., et al. (2015). Cleavage and Cell Adhesion Properties of Human Epithelial Cell Adhesion Molecule (HEPCAM). *J Biol Chem* *290*, 24574–24591.

Tse, Y.C., Werner, M., Longhini, K.M., Labbe, J.-C., Goldstein, B., and Glotzer, M. (2012). RhoA activation during polarization and cytokinesis of the early *Caenorhabditis elegans* embryo is differentially dependent on NOP-1 and CYK-4. *Mol Biol Cell* *23*, 4020–4031.

Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., et al. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* *389*, 990–994.

Ulrich, F., Krieg, M., Schötz, E.-M., Link, V., Castanon, I., Schnabel, V., Taubenberger, A., Mueller, D., Puech, P.-H., and Heisenberg, C.-P. (2005). Wnt11 functions in gastrulation by controlling cell cohesion through Rab5c and E-cadherin. *Dev. Cell* *9*, 555–564.

Vallénus, T. (2013). Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. *Open Biol* *3*, 130001.

- 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.
- Vassilev, V., Platek, A., Hiver, S., Enomoto, H., and Takeichi, M. (2017). Catenins Steer Cell Migration via Stabilization of Front-Rear Polarity. *Developmental Cell* *43*, 463-479.e5.
- Verma, S., Shewan, A.M., Scott, J.A., Helwani, F.M., den Elzen, N.R., Miki, H., Takenawa, T., and Yap, A.S. (2004). Arp2/3 activity is necessary for efficient formation of E-cadherin adhesive contacts. *J. Biol. Chem.* *279*, 34062–34070.
- Vestre, K., Kjos, I., Guadagno, N.A., Borg Distefano, M., Kohler, F., Fenaroli, F., Bakke, O., and Progida, C. (2019). Rab6 regulates cell migration and invasion by recruiting Cdc42 and modulating its activity. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Vicente-Manzanares, M., and Horwitz, A.R. (2010). Myosin Light Chain Mono- and Di-Phosphorylation Differentially Regulate Adhesion and Polarity in Migrating Cells. *Biochem Biophys Res Commun* *402*, 537–542.
- Vicente-Manzanares, M., and Horwitz, A.R. (2011). Adhesion dynamics at a glance. *J Cell Sci* *124*, 3923–3927.
- Vicente-Manzanares, M., Koach, M.A., Whitmore, L., Lamers, M.L., and Horwitz, A.F. (2008). Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *J Cell Biol* *183*, 543–554.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *10*, 778–790.
- Vicente-Manzanares, M., Newell-Litwa, K., Bachir, A.I., Whitmore, L.A., and Horwitz, A.R. (2011). Myosin IIA/IIB restrict adhesive and protrusive signaling to generate front–back polarity in migrating cells. *J Cell Biol* *193*, 381–396.
- Wang, F., Kovacs, M., Hu, A., Limouze, J., Harvey, E.V., and Sellers, J.R. (2003). Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *J. Biol. Chem.* *278*, 27439–27448.
- Wang, Q., Chen, X.-W., and Margolis, B. (2007). PALS1 Regulates E-Cadherin Trafficking in Mammalian Epithelial Cells. *Mol Biol Cell* *18*, 874–885.
- Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E.D., and Takeichi, M. (1998). alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J. Cell Biol.* *142*, 847–857.
- Watanabe, T., Hosoya, H., and Yonemura, S. (2007). Regulation of Myosin II Dynamics by Phosphorylation and Dephosphorylation of Its Light Chain in Epithelial Cells. *Mol Biol Cell* *18*, 605–616.
- Watanabe, T., Wang, S., and Kaibuchi, K. (2015). IQGAPs as Key Regulators of Actin-cytoskeleton Dynamics. *Cell Struct. Funct.* *40*, 69–77.
- Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* *6*, 154–161.

Wells, C.M., Whale, A.D., Parsons, M., Masters, J.R.W., and Jones, G.E. (2010). PAK4: a pluripotent kinase that regulates prostate cancer cell adhesion. *J. Cell. Sci.* **123**, 1663–1673.

Winder, S.J., and Ayscough, K.R. (2005). Actin-binding proteins. *Journal of Cell Science* **118**, 651–654.

Winter, M.J., Nagelkerken, B., Mertens, A.E.E., Rees-Bakker, H.A.M., Briaire-de Bruijn, I.H., and Litvinov, S.V. (2003). Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Experimental Cell Research* **285**, 50–58.

Winter, M.J., Cirulli, V., Briaire-de Bruijn, I.H., and Litvinov, S.V. (2007). Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase. *Mol. Cell. Biochem.* **302**, 19–26.

Wojnacki, J., Quassollo, G., Marzolo, M.-P., and Cáceres, A. (2014). Rho GTPases at the crossroad of signaling networks in mammals: impact of Rho-GTPases on microtubule organization and dynamics. *Small GTPases* **5**, e28430.

Wolfenson, H., Iskratsch, T., and Sheetz, M.P. (2014). Early Events in Cell Spreading as a Model for Quantitative Analysis of Biomechanical Events. *Biophys J* **107**, 2508–2514.

Wood, W., Jacinto, A., Grose, R., Woolner, S., Gale, J., Wilson, C., and Martin, P. (2002). Wound healing recapitulates morphogenesis in *Drosophila* embryos. *Nat. Cell Biol.* **4**, 907–912.

Wu, C., and Horowitz, A. (2011). Membrane traffic as a coordinator of cell migration and junction remodeling. *Commun Integr Biol* **4**, 703–705.

Wu, C.-J., Mannan, P., Lu, M., and Udey, M.C. (2013). Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) Regulates Claudin Dynamics and Tight Junctions ♦. *J Biol Chem* **288**, 12253–12268.

Xi, W., Sonam, S., Beng Saw, T., Ladoux, B., and Teck Lim, C. (2017). Emergent patterns of collective cell migration under tubular confinement. *Nat Commun* **8**, 1517.

Yam, P.T., Wilson, C.A., Ji, L., Hebert, B., Barnhart, E.L., Dye, N.A., Wiseman, P.W., Danuser, G., and Theriot, J.A. (2007). Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *J. Cell Biol.* **178**, 1207–1221.

Yamada, S., and Nelson, W.J. (2007). Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* **178**, 517–527.

Yao, M., Qiu, W., Liu, R., Efremov, A.K., Cong, P., Seddiki, R., Payre, M., Lim, C.T., Ladoux, B., Mège, R.-M., et al. (2014). Force-dependent conformational switch of α -catenin controls vinculin binding. *Nature Communications* **5**, 4525.

Yap, A.S., Duszyc, K., and Viasnoff, V. (2018). Mechanosensing and Mechanotransduction at Cell–Cell Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, a028761.

Yoneda, A., Multhaupt, H.A.B., and Couchman, J.R. (2005). The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. *J Cell Biol* **170**, 443–453.

Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A., and Shibata, M. (2010). α -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nature Cell Biology* **12**, 533–542.

Yu, C., Law, J.B.K., Suryana, M., Low, H.Y., and Sheetz, M.P. (2011). Early integrin binding to Arg-Gly-Asp peptide activates actin polymerization and contractile movement that stimulates outward translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 20585–20590.

Yüce, Ö., Piekny, A., and Glotzer, M. (2005). An ECT2–centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J Cell Biol* *170*, 571–582.

Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z., and Geiger, B. (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *Journal of Cell Science* *116*, 4605–4613.

Zenke, F.T., Krendel, M., DerMardirossian, C., King, C.C., Bohl, B.P., and Bokoch, G.M. (2004). p21-activated Kinase 1 Phosphorylates and Regulates 14-3-3 Binding to GEF-H1, a Microtubule-localized Rho Exchange Factor. *J. Biol. Chem.* *279*, 18392–18400.

Zhang, B., Zhang, H., and Shen, G. (2015). Metastasis-associated protein 2 (MTA2) promotes the metastasis of non-small-cell lung cancer through the inhibition of the cell adhesion molecule Ep-CAM and E-cadherin. *Jpn. J. Clin. Oncol.* *45*, 755–766.

Zhang, H., Ghai, P., Wu, H., Wang, C., Field, J., and Zhou, G.-L. (2013). Mammalian Adenylyl Cyclase-associated Protein 1 (CAP1) Regulates Cofilin Function, the Actin Cytoskeleton, and Cell Adhesion. *J Biol Chem* *288*, 20966–20977.

Zhang, J., Fonovic, M., Suyama, K., Bogoyo, M., and Scott, M.P. (2009). Rab35 controls actin bundling by recruiting fascin as an effector protein. *Science* *325*, 1250–1254.

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., et al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* *21*, 2747–2761.

Zihni, C., Munro, P.M.G., Elbediwy, A., Keep, N.H., Terry, S.J., Harris, J., Balda, M.S., and Matter, K. (2014). Dbl3 drives Cdc42 signaling at the apical margin to regulate junction position and apical differentiation. *J Cell Biol* *204*, 111–127.

Zihni, C., Mills, C., Matter, K., and Balda, M.S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 564–580.

Acknowledgments

We thank Arthur Radoux, Tess Berthier, Dylan Gourmelin and Amandine Rousseau for technical help. Confocal microscopy and high-resolution 3D-SIM analyses were performed in the ImagoSeine microscopy facility (Institut Jacques Monod, IJM). This work was supported by grants from The Association Prolific (prix « Graine de Chercheur » 2017) (to C.G.), "Initiatives d'excellence" (Idex ANR-11-IDEX-0005-02) - Labex « Who Am I? » (ANR-11-LABX-0071) (to D.D), the Groupama Foundation – Research Prize for Rare Diseases 2017 (to D.D), the Human Frontier Science Program (RGP0038/2018) (to C.T.L. and D.D).

Abbreviations

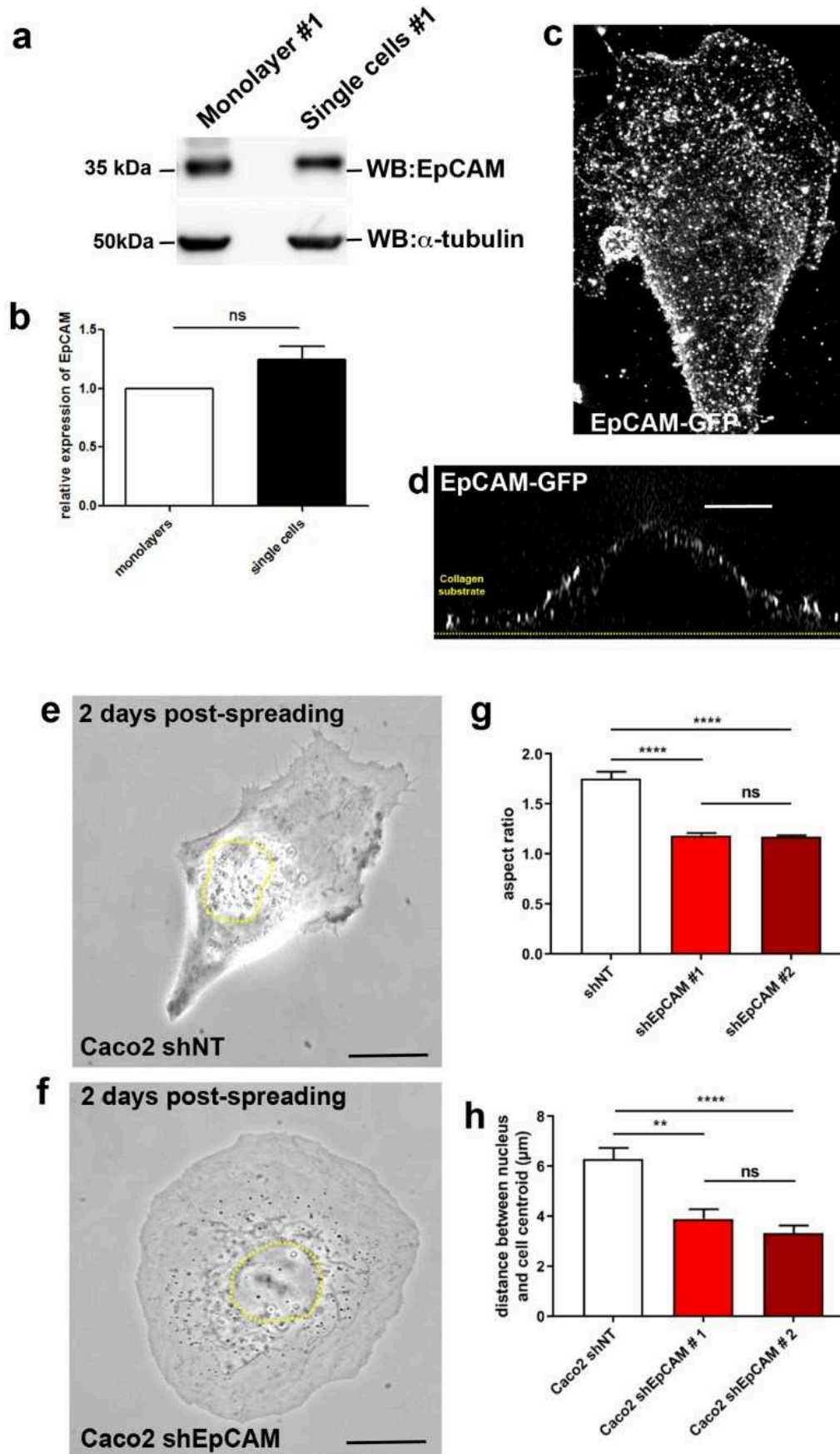
CTE, Congenital Tufting Enteropathy; EpCAM, epithelial-cell adhesion molecule; FA, focal adhesion; IF, immunofluorescence; MLC2, myosin light chain 2; P-MLC2, phosphorylated myosin light chain 2; SIM, structured illumination microscopy; TA, transverse arcs; WB, Western blot.

Supplementary Information (Supplementary Figures S1 to S9, and Supplementary Videos 1 to 7) is available in the online version of the paper.

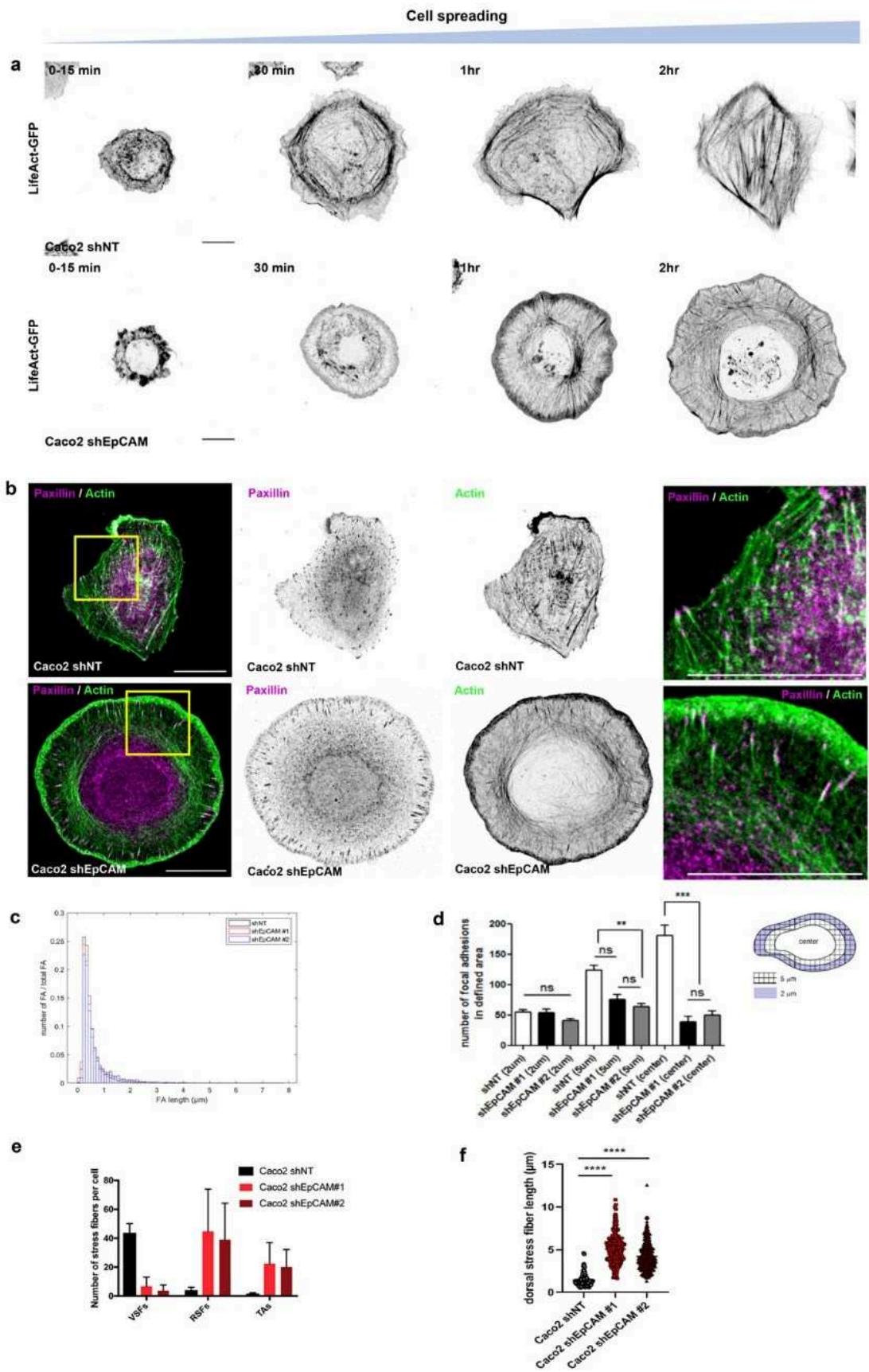
Author contributions: C.G., B.D., P.M., E.G., S.B. and D.D. performed the experiments. C.G., A.M. and D.D. designed the experiments. C.G., S.D.B., B.D., P.M., J.D.A., E.G. and D.D. performed analyses. C.G. and D.D. coordinated the overall research and experiments, and wrote the manuscript.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

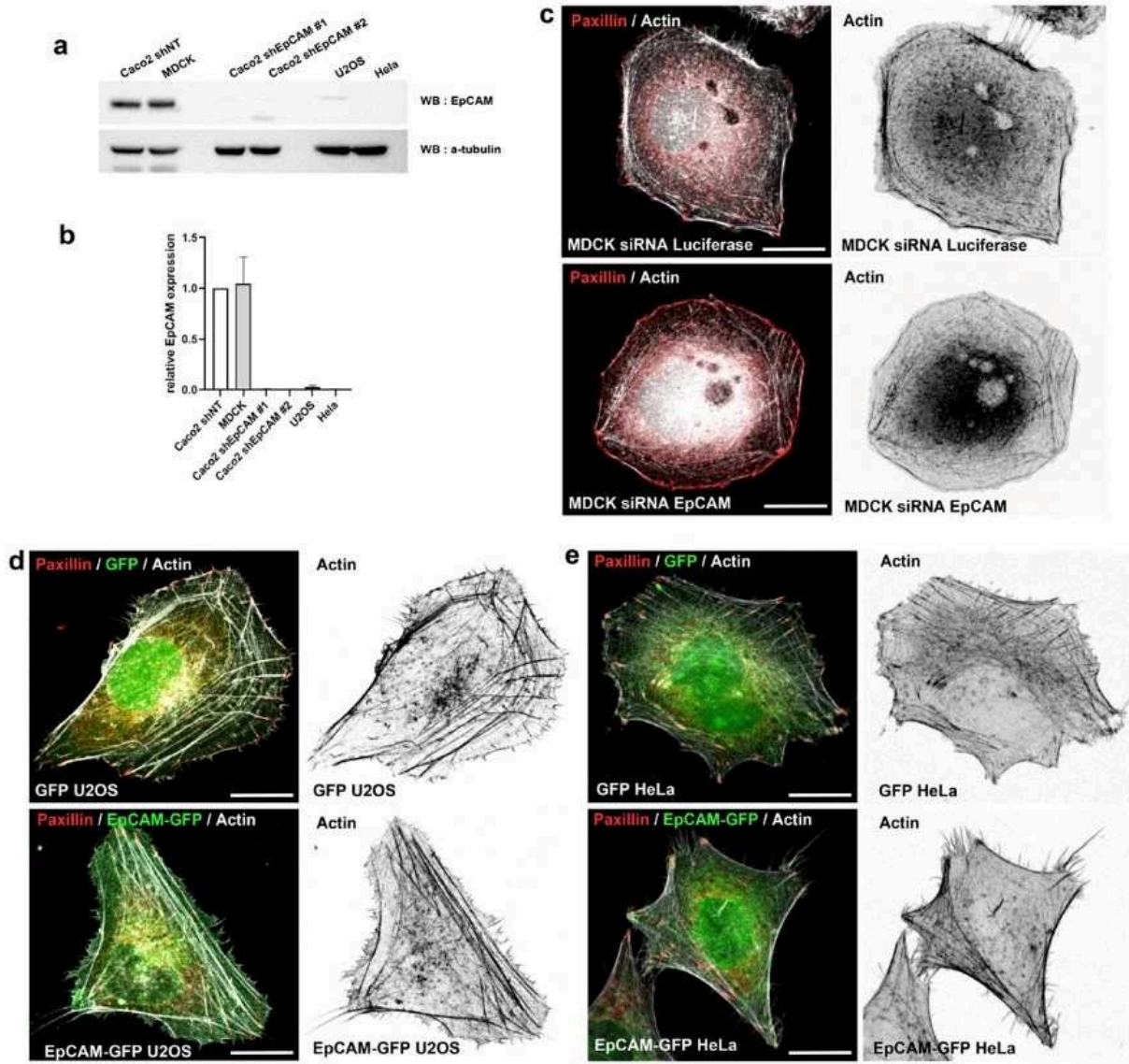
Materials and correspondence: Correspondence and material requests should be addressed to D. Delacour.



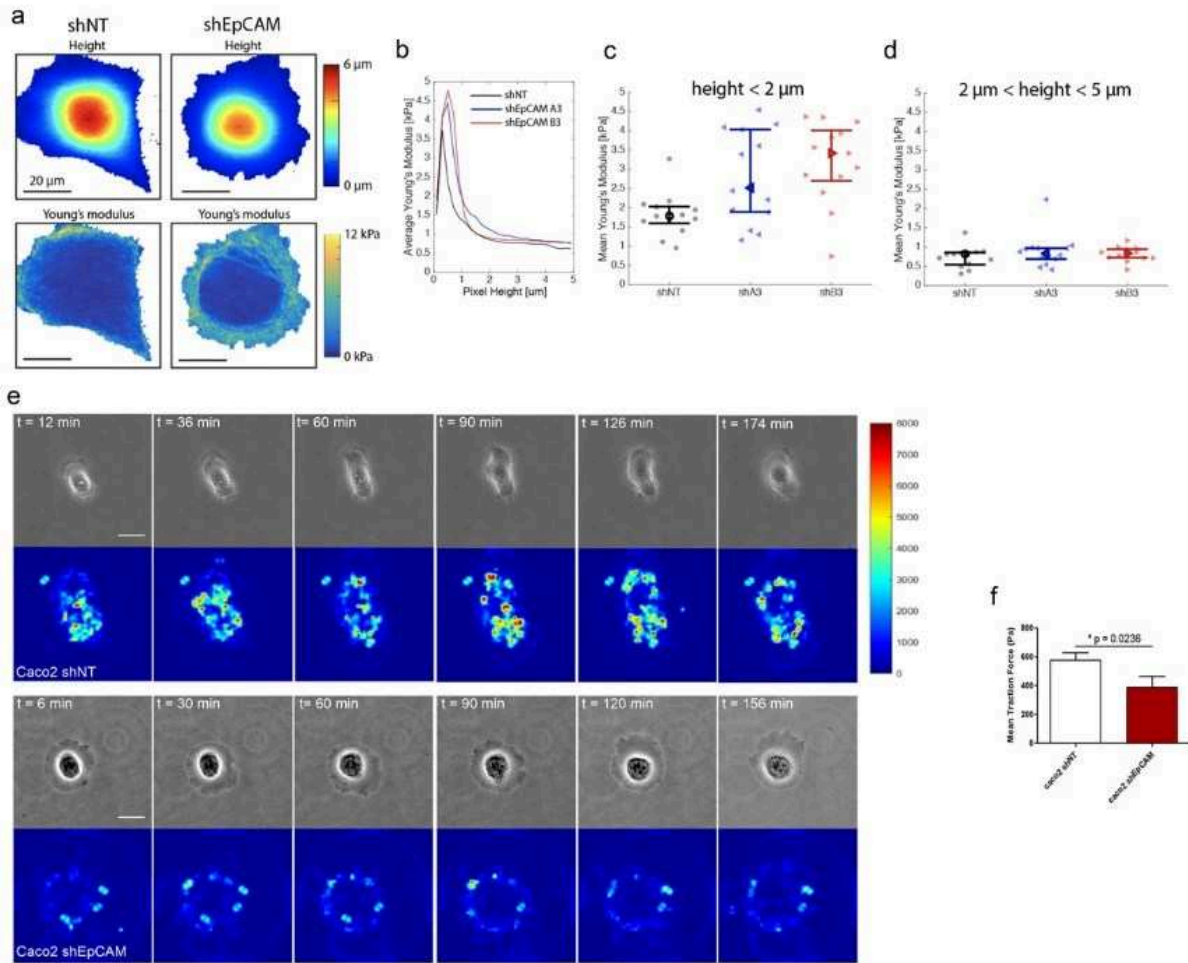
Gaston et al., Figure 1



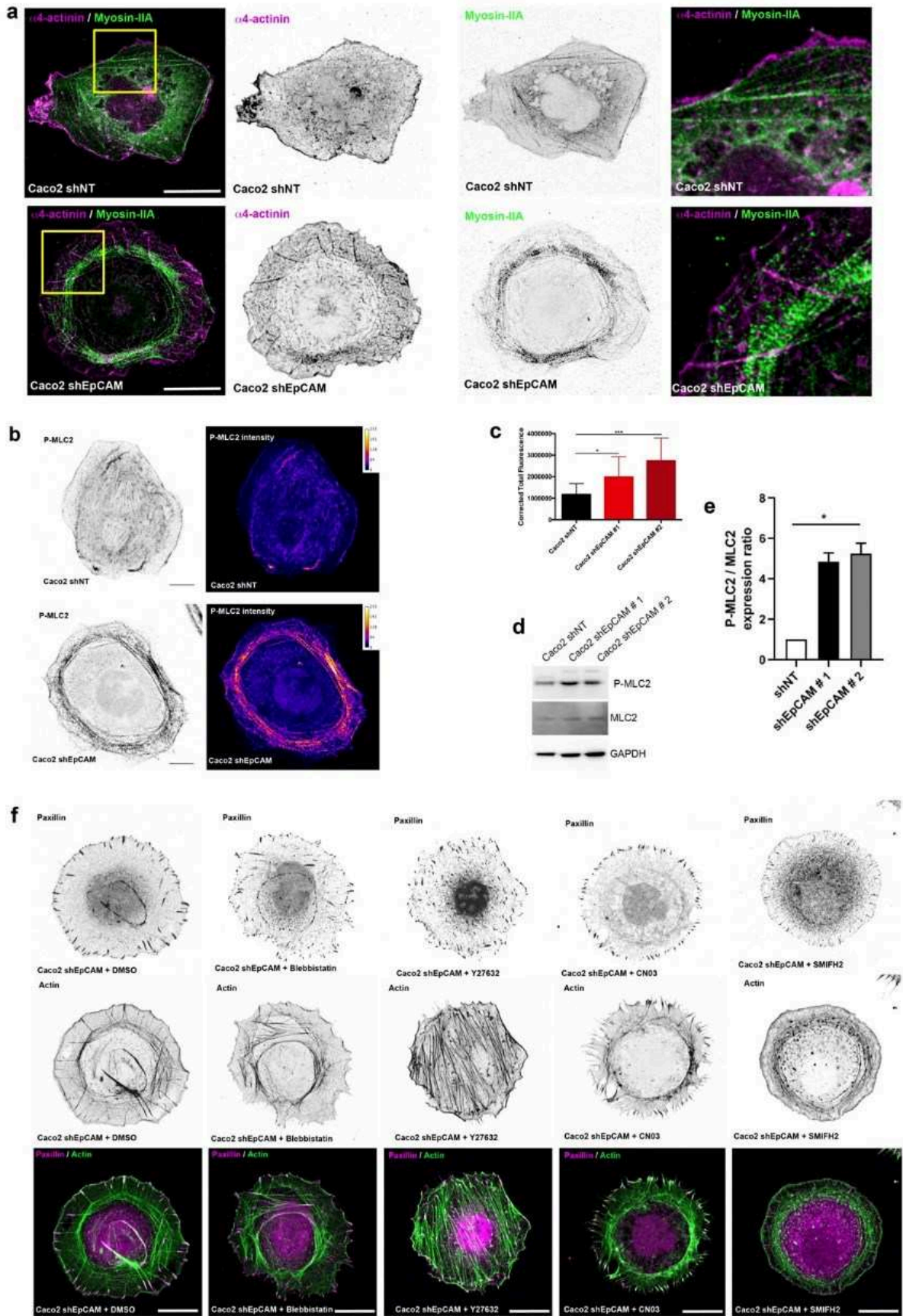
Gaston et al., Figure 2



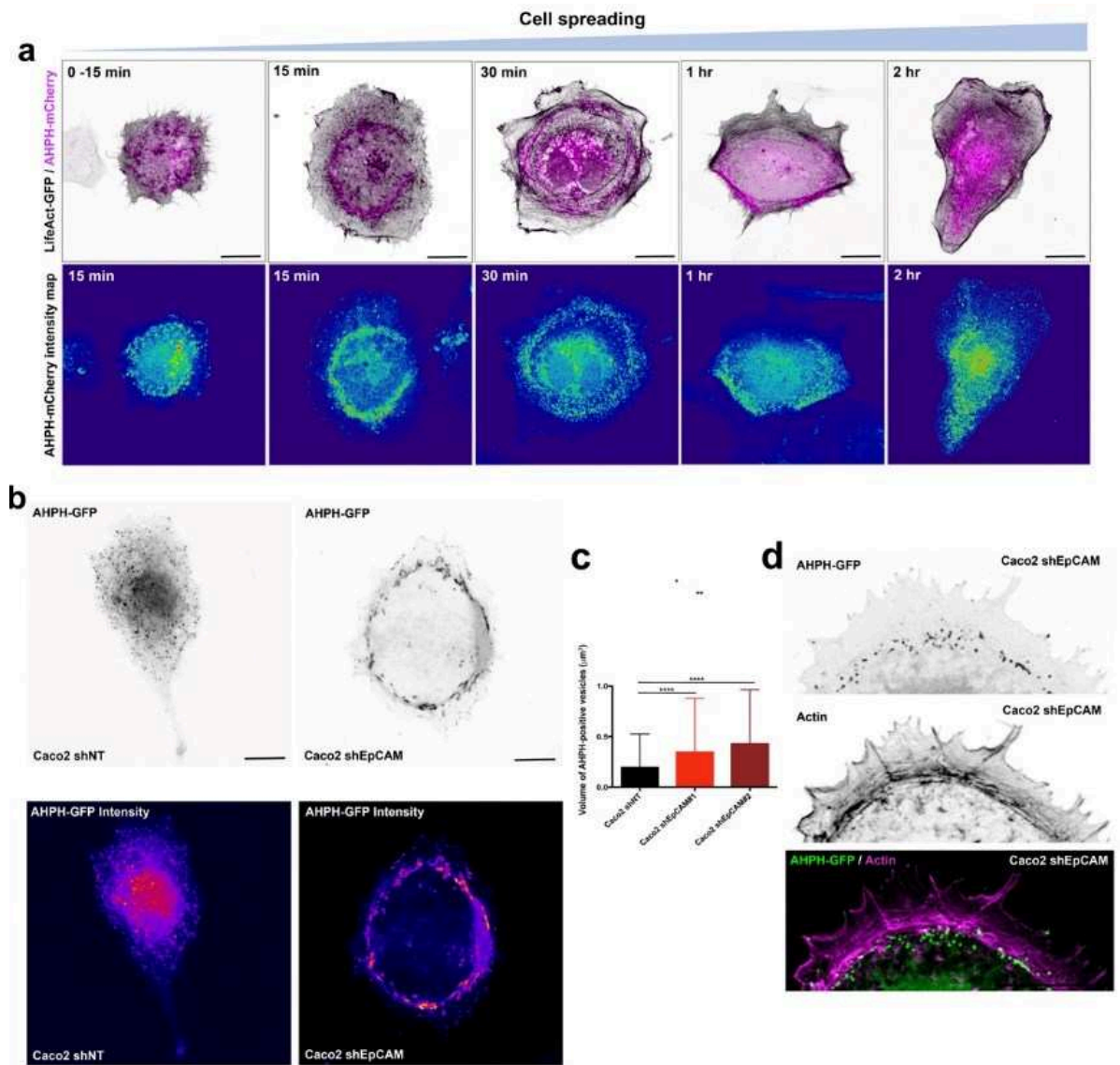
Gaston et al., Figure 3



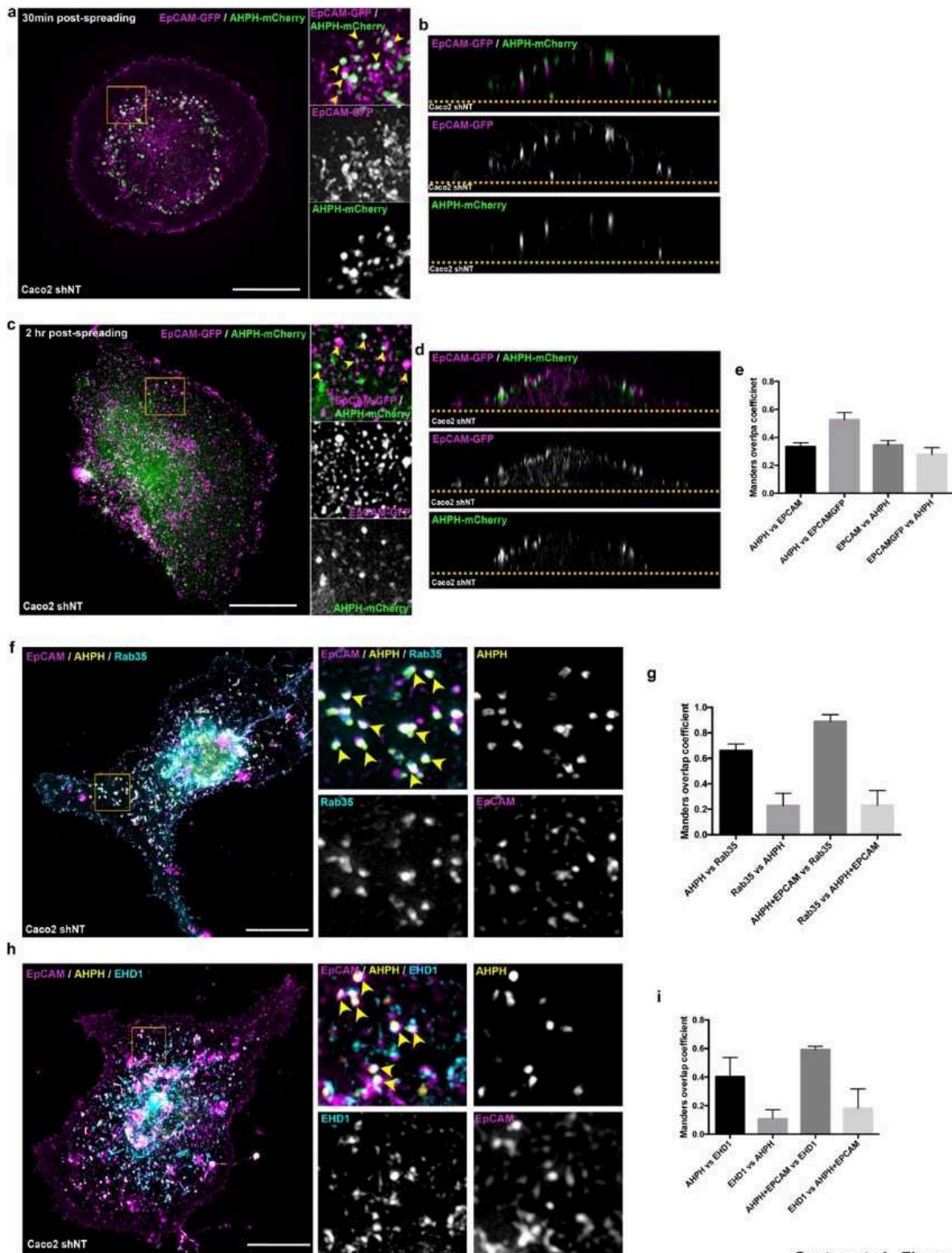
Gaston et al., Figure 4



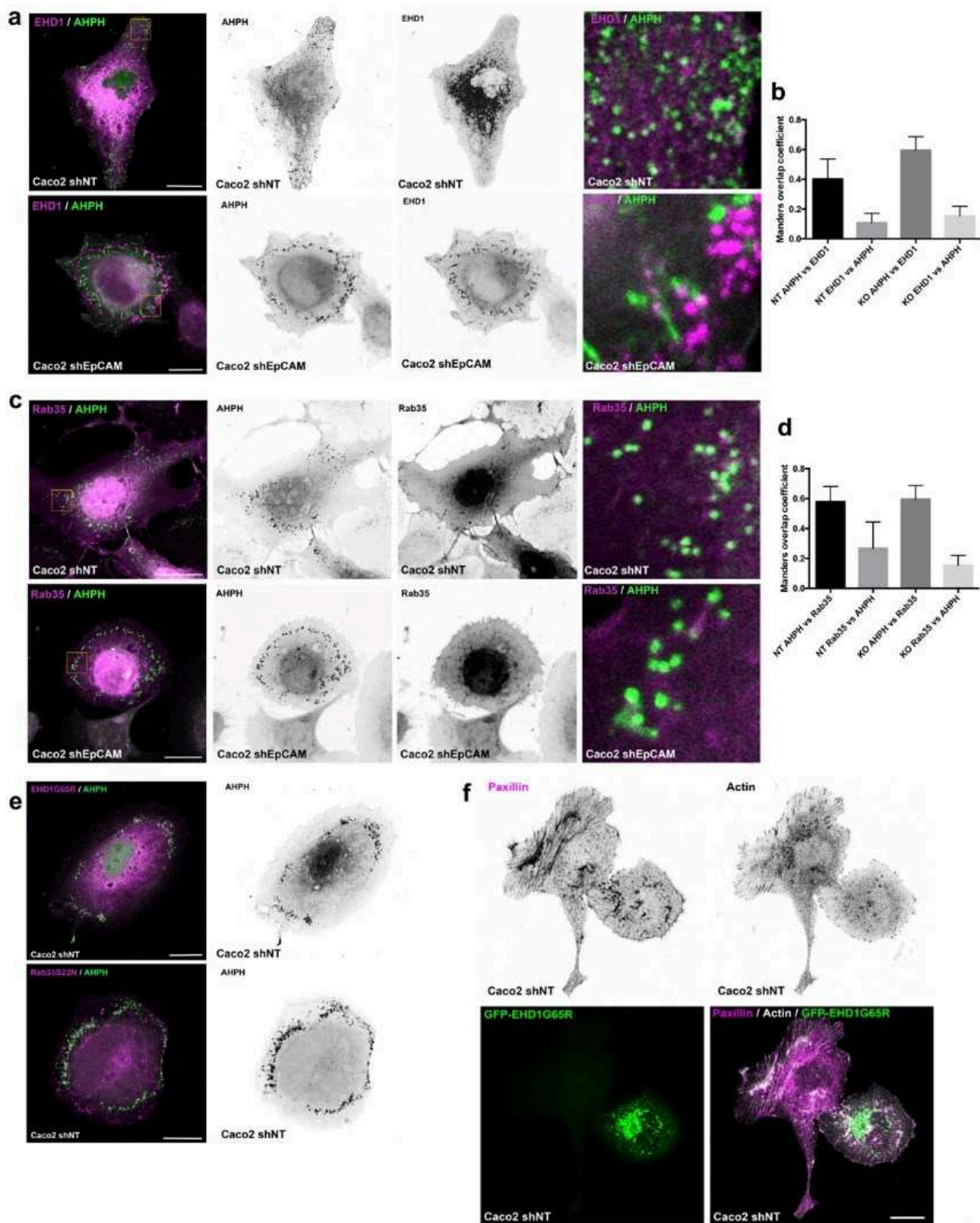
Gaston et al., Figure 5



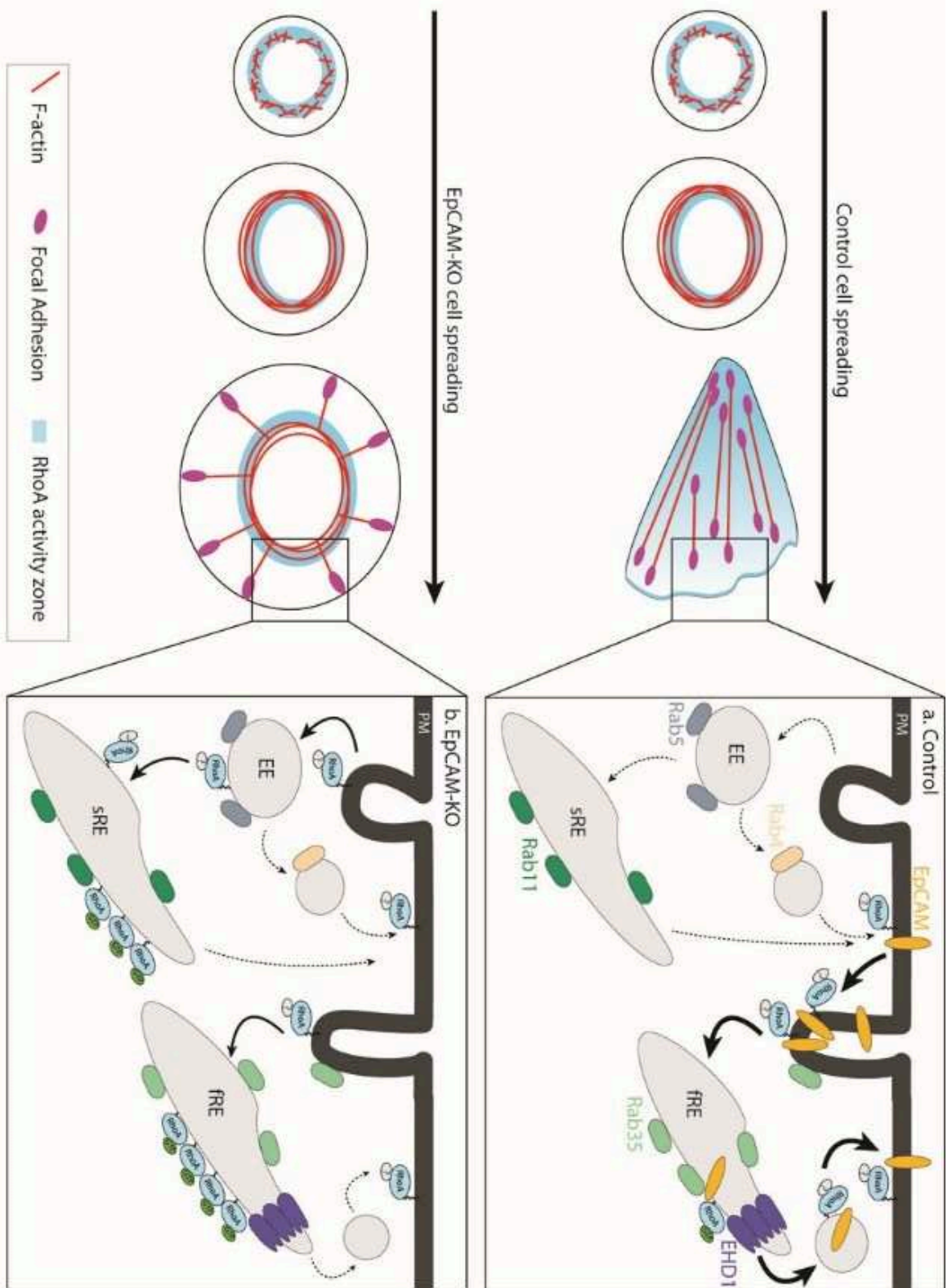
Gaston et al., Figure 6



Gaston et al., Figure 7



Gaston et al., Figure 8



Gaston et al., Figure 9

Figure legends

Figure 1: EpCAM is required for single cell front-rear polarization and migration. (a-b) Western blot analysis **(a)** and statistical analysis **(b)** of the EpCAM expression in Caco2 21-days monolayers or single cells spread on collagen-coated petri dishes and coverslips, respectively. α -tubulin was used as a loading control. Three independent experiments were carried out. **(c-d)** 3D-SIM microscopy analysis of EpCAM distribution in Caco2 single cells. xy **(c)** and xz **(d)** views are presented. Scale bar, 5 μ m. **(e-f)** Phase contrast representative images of control **(e)** or EpCAM-depleted **(f)** 2-days post-spreading Caco2 single cells. Scale bar, 5 μ m. **(g-h)** Statistical analysis of the aspect ratio **(g)** and the distance between the nucleus and the centroid **(h)** in control (*Caco2 shNT*) or EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM #1 and #2*) cells. Three independent experiments were carried out. N > 30 cells for each condition. Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test, P<0.0001. Values are mean \pm s.e.m.

Figure 2: EpCAM participates in the maturation of ventral stress fibers in Caco2 cells. (a) Time-lapse images of actin cable rearrangement during cell spreading and polarity acquisition in control and EpCAM-KO cells. Scale bar, 5 μ m. **(b)** Confocal analysis of actin (*green*) and paxillin (*magenta*) distributions in control (*Caco2 shNT*) and EpCAM-silenced (*Caco2 shEpCAM*) cells. Accumulated z-stack are presented. Scale bar, 5 μ m. **(c)** Analysis of the distribution of focal adhesions according to their size in control (*Caco2 shNT*) and EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM#1 and #2*) cells. **(d)** Statistical analysis of FA density in the delimited 2 μ m, 5 μ m or center area. N (*Caco2 shNT*) = 31 cells, N (*Caco2 shEpCAM#1*) = 30 cells, N (*Caco2 shEpCAM #2*) = 30 cells. Kruskal-Wallis test and Dunn multiple comparison test, **P <0.01, ***P<0.001. Values are mean \pm s.e.m. Three independent experiments were carried out. **(e)** Statistical analysis of the number of ventral stress fibers (VSFs), radial fibers (RSFs) and transverse arcs (TAs) in control and EpCAM-depleted cells. Values are mean \pm s.e.m. Three independent experiments were carried out. **(f)** Statistical analysis of the length of radial fibers in control and EpCAM-silenced cells. N (*Caco2 shNT*) = 36 cells, N (*Caco2 shEpCAM#1*) = 35 cells, N (*Caco2 shEpCAM #2*) = 43 cells, n>160 dorsal fibers for each condition. ****P<0.0001. Values are mean \pm s.e.m. Three independent experiments were carried out.

Figure 3: EpCAM expression triggers the formation of stress fibers. (a) Western blot analysis of EpCAM expression in control Caco2 (*Caco2 shNT*), MDCK, EpCAM-silenced (*Caco2 shEpCAM#1 and #2*), U2OS and HeLa cells. α -tubulin was used as a loading control. **(b)** Quantification of EpCAM expression in control Caco2 (*Caco2 shNT*), MDCK, EpCAM-silenced (*Caco2 shEpCAM#1 and #2*), U2OS and HeLa cells. Values are mean \pm s.e.m. Three independent experiments were carried out. **(c-e)**

Confocal analysis of actin and paxillin in control and EpCAM siRNA-treated MDCK cells **(c)**, in GFP- and EpCAM-GFP-transfected U2OS cells **(d)**, and in GFP- and EpCAM-GFP-transfected HeLa cells **(e)**. Accumulated z-stack are presented. Scale bar, 5 μ m.

Figure 4: Loss of EpCAM provokes cell mechanical changes. **(a)** Representative maps showing the cell topography (*top*) and local Young's modulus (*bottom*) for a representative control cell (*left*) and shEpCAM cell (*right*). **(b)** Average pixel stiffness versus local pixel height for the different conditions. All force-indentation curves ($n > 150000$ for each condition, merged from 2 experiments) are binned according to the pixel height in 200 nm increments and the average Young's modulus is taken in each bin and plotted. **(c)** Average Young's modulus in the region of height $< 2 \mu\text{m}$ for each cell (Control $n=13$, shEpCAM #1 $n=14$, and shEpCAM #2 $n=13$, merged from 2 experiments). Plots show the median

Figure 6: Active RhoA distribution is impaired in the absence of EpCAM. **(a)** Confocal analysis of the distribution of AHPH-mCherry (*magenta*) and actin in control cells during cell polarization and maturation of stress fibers from 0 to 2 hours. AHPH-mCherry intensity maps are presented in the bottom panel. Scale bar, 5 μ m. **(b)** AHPH-GFP intensity maps were generated in control and EpCAM-depleted cells with LUT table Physics from ImageJ and are presented in the bottom panel. Max intensity z-projection of substacks are presented. **(c)** Statistical analysis of the volume of AHPH-GFP-positive structures in control (*Caco2 shNT*) and EpCAM-silenced (*Caco2 shEpCAM #1 and #2*) cells. N (*Caco2 shNT*) = 10 cells, N (*Caco2 shEpCAM#1*) = 5 cells, N (*Caco2 shEpCAM #2*) = 10 cells. One-way ANOVA with unpaired t-test, **** *P*-value < 0.0001. **(d)** Confocal analysis the distribution of AHPH-GFP (*green*) and actin (*magenta*) within the cell protrusion in EpCAM-silenced *Caco2* cells. Scale bar, 5 μ m.

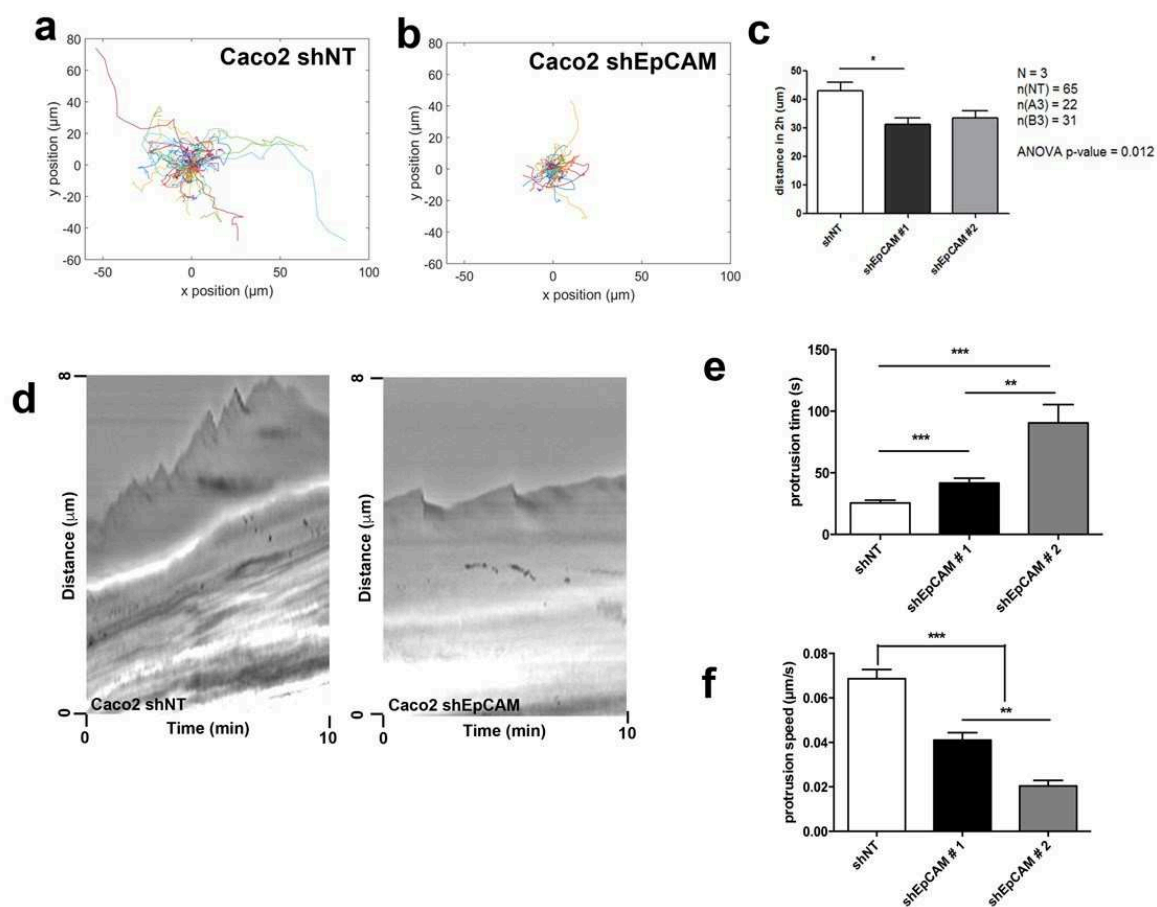
Figure 7: EpCAM and active RhoA co-evolve in recycling endosomes. **(a-d)** 3D-SIM microscopy analysis of EpCAM-GFP (*magenta*) and AHPH-mCherry (*green*) in unpolarized single cells during cell spreading **(a-b)** and polarity acquisition **(c-d)** in the *xy* plane **(a,c)** or the *xz* plane **(b,d)**. Collagen substrate is delimited by an orange dotted line. Arrows point on colocalizations. Scale bar, 5 μ m. **(e)** Quantification of the Manders overlap coefficient between AHPH-mCherry versus endogenous EpCAM, AHPH-mCherry versus EpCAM-GFP, endogenous EpCAM versus AHPH-mCherry, and EpCAM-GFP versus AHPH-mCherry in polarized single *Caco2* cells. **(f)** 3D-SIM microscopy analysis of EpCAM (*magenta*), AHPH-GFP (*yellow*) and Rab35-RFP (*blue*) in polarized single cells. Arrows point on colocalizations. Scale bar, 5 μ m. **(g)** Quantification of the the Manders overlap coefficient between AHPH-GFP versus Rab35-RFP, Rab35-RFP versus AHPH-GFP, AHPH-GFP+endogenousEpCAM versus Rab35-RFP, and Rab35-RFP versus AHPH-GFP +endogenousEpCAM in polarized single *Caco2* cells. **(h)** 3D-SIM microscopy analysis of EpCAM (*magenta*), AHPH-mCherry (*yellow*) and EHD1-GFP (*blue*) in polarized single cells. Arrows point on colocalizations. Scale bar, 5 μ m. **(i)** Quantification of the the Manders overlap coefficient between AHPH-mCherry versus EHD1-GFP, EHD1-GFP versus AHPH-mCherry, AHPH-mCherry+endogenousEpCAM versus EHD1-GFP, and EHD1-GFP versus AHPH-mCherry +endogenousEpCAM in polarized single *Caco2* cells.

Figure 8: Active RhoA is blocked in recycling endosomes in the absence of EpCAM. **(a)** Confocal analysis of the distribution of EHD1-GFP (*magenta*) and AHPH-mCherry (*green*) in control and EpCAM-silenced cells. **(b)** Quantification of the Manders overlap coefficient between AHPH-mCherry versus EHD1-GFP or EHD1-GFP versus AHPH-mCherry in control or EpCAM-depleted cells. Values are mean \pm s.e.m. **(c)** Confocal analysis of the distribution of Rab35-RFP (*magenta*) and AHPH-GFP

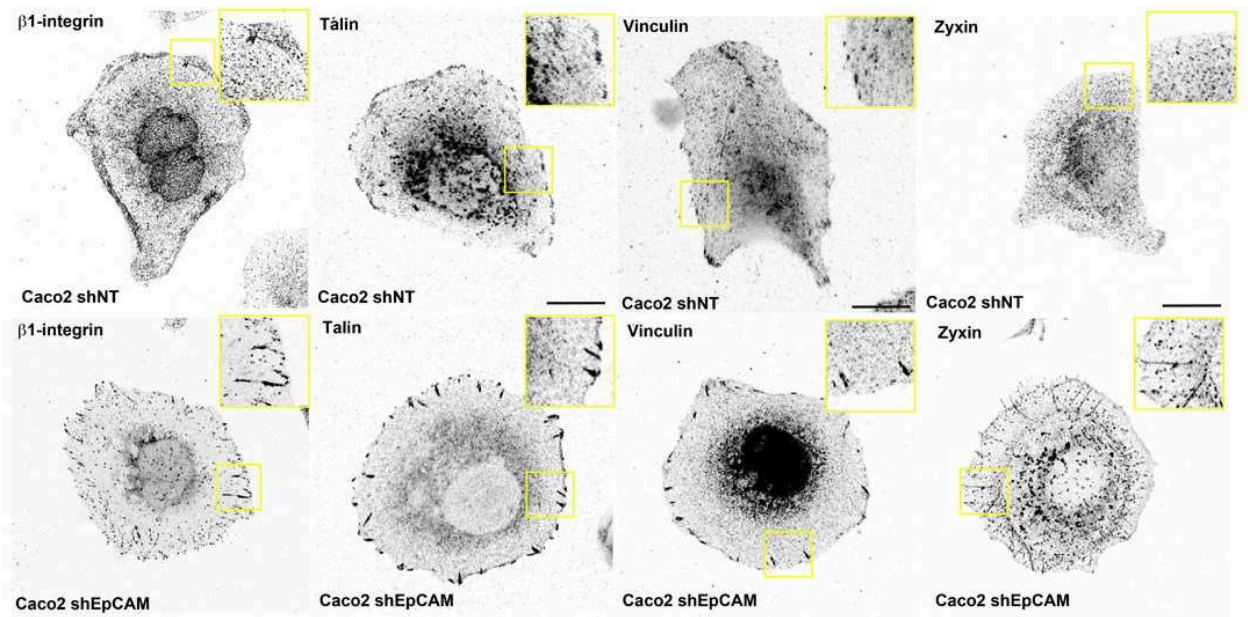
(*green*) in control and EpCAM-silenced cells. **(d)** Quantification of the Manders overlap coefficient between AHPH-GFP versus Rab35-RFP or Rab35-RFP versus AHPH-GFP in control or EpCAM-depleted cells. Values are mean \pm s.e.m. **(e)** Confocal analysis of EHD1G65R-GFP (*magenta*) and AHPH-mCherry (*green*) (*upper panel*), or Rab35S22N-RFP (*magenta*) and AHPH-GFP (*green*) (*lower panel*) in control Caco2 cells. **(f)** Confocal analysis of actin and paxillin distribution after EHD1G65R-GFP transfection in Caco2 cells. Scale bar, 5 μ m.

Figure 9: Scheme showing the active RhoA dynamics in control and EpCAM-KO cells during spreading. Active RhoA zone remodeling is prevented in absence of EpCAM leading to polarization and migration defects. **(a-b)** Inserts depicting the RhoA recycling pathway in control **(a)** or EpCAM-KO cells **(b)**. **(a)** EpCAM promotes the RhoA-GTP fast recycling via Rab35/EHD1-positive endosomes. **(b)** In the absence of EpCAM, RhoA is not recycled specifically through Rab35 pathway and RhoA-GTP accumulates in the recycling endosomes. EE, early endosome; fRE, fast recycling endosome; sRE, slow recycling endosome. The width of the arrows indicates the use of the pathway.

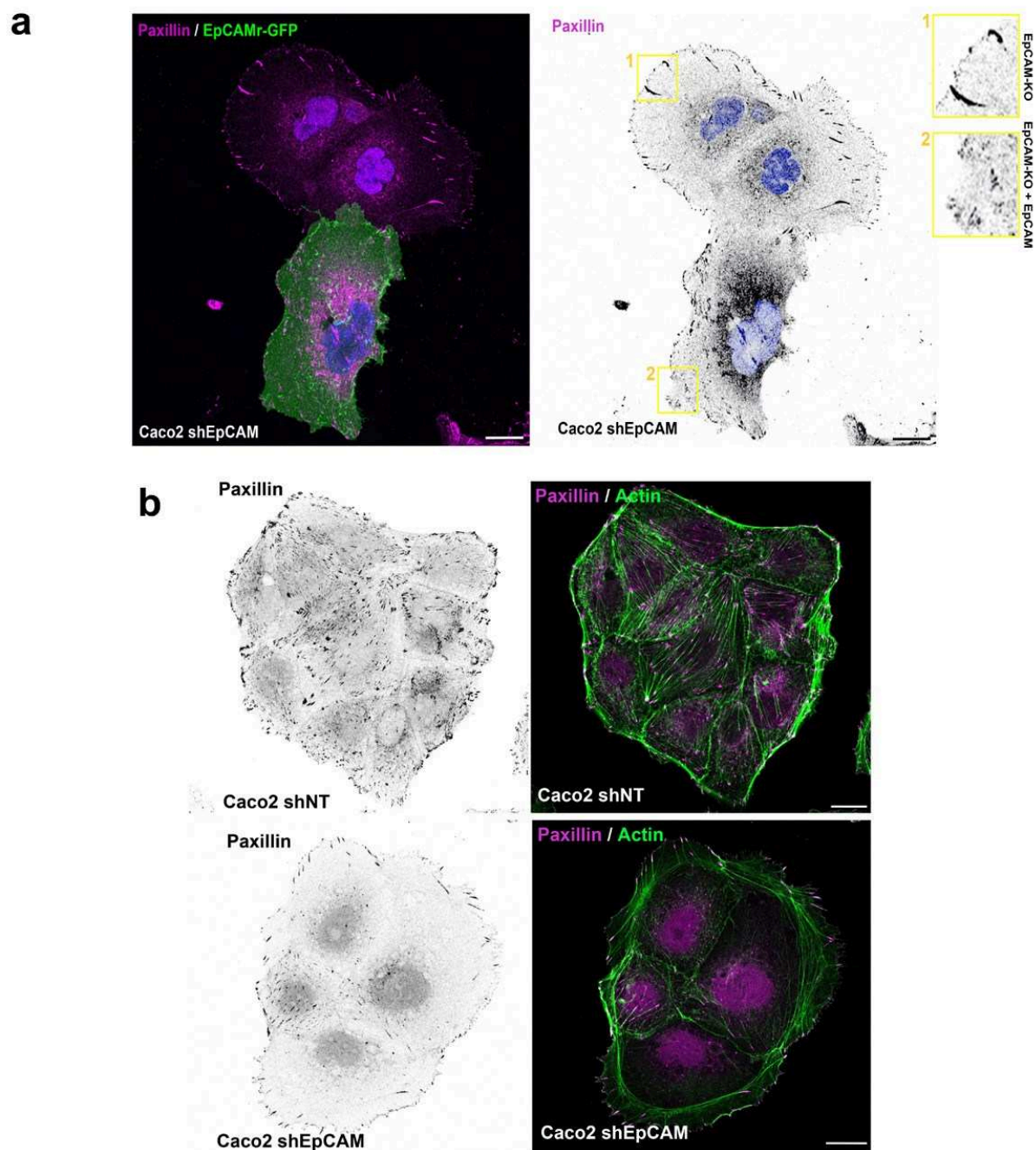
Supplementary Figures



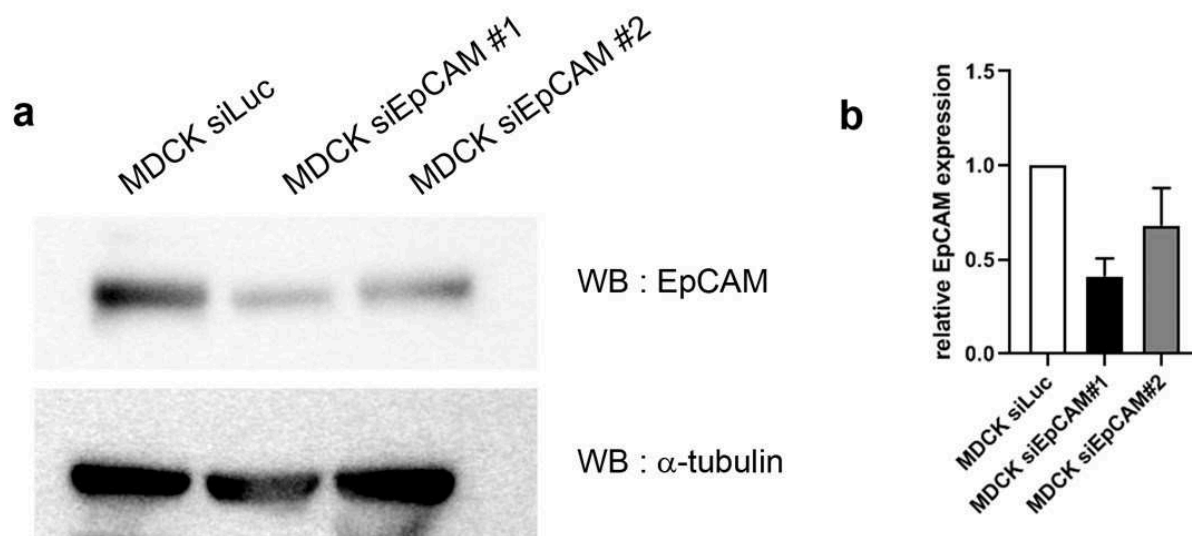
Supplementary Figure 1: (a-b) Color map of cell tracks in control (*Caco2 shNT*) (a) and EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM*) (b) cells. **(c)** Statistical analysis of the distance traveled by control and EpCAM-silenced cells within 2 hours. N (*Caco2 shNT*) = 65 cells, N (*Caco2 shEpCAM#1*) = 22 cells, N (*Caco2 shEpCAM #2*) = 31 cells. ANOVA test, P -value=0,012. Values are mean \pm s.e.m. Three independent experiments were carried out. **(d)** Representative kymograph of lamellipodial activity in control and EpCAM-silenced cells. **(e-f)** Statistical analyses of the protrusion time (e) and the protrusion speed (f). Protrusion amplitude (*Caco2shNT*) = $1,39 \pm 0,081 \mu\text{m}$ (n=94 events analysed), protrusion amplitude (*Caco2shEpCAM#1*) = $1,70 \pm 0,118 \mu\text{m}$ (n=52), protrusion amplitude (*Caco2shEpCAM#2*) = $1,45 \pm 0,261 \mu\text{m}$ (n=25). Protrusion speed (*Caco2shNT*) = $0,069 \pm 0,0042 \mu\text{m/s}$ (n=84), protrusion speed (*Caco2shEpCAM#1*) = $0,041 \pm 0,0033 \mu\text{m/s}$ (n=50), protrusion speed (*Caco2shEpCAM#2*) = $0,020 \pm 0,0025 \mu\text{m/s}$ (n=23). Values are mean \pm SEM. Dunn's multiple comparison test. ** P -value <0.01, *** P -value <0.001. Three independent experiments were carried out.



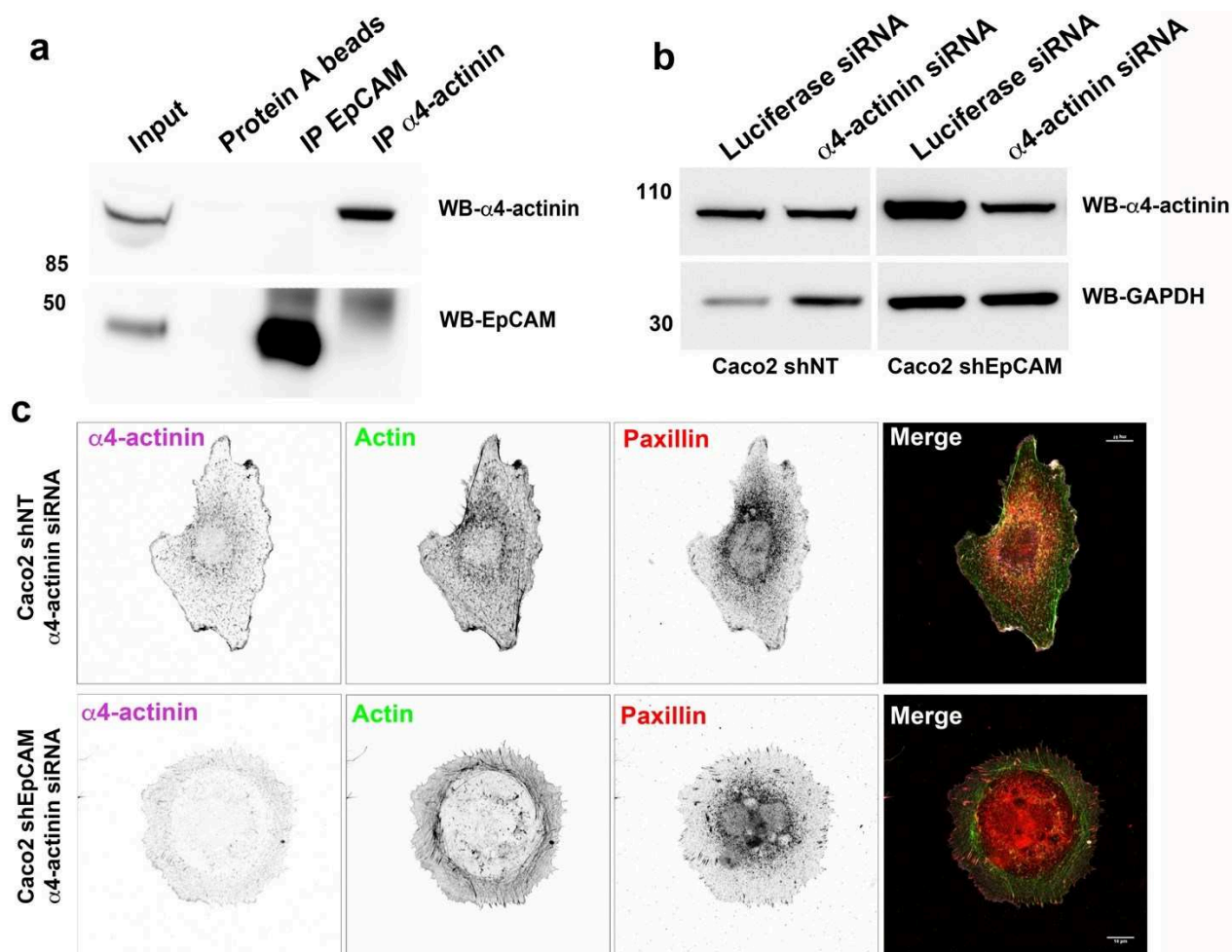
Supplementary Figure 2: Confocal analysis of the distribution of β 1-integrin, talin, vinculin and zyxin in control and EpCAM-silenced cells. Accumulated z-stacks are presented. Scale bar, 5 μ m.



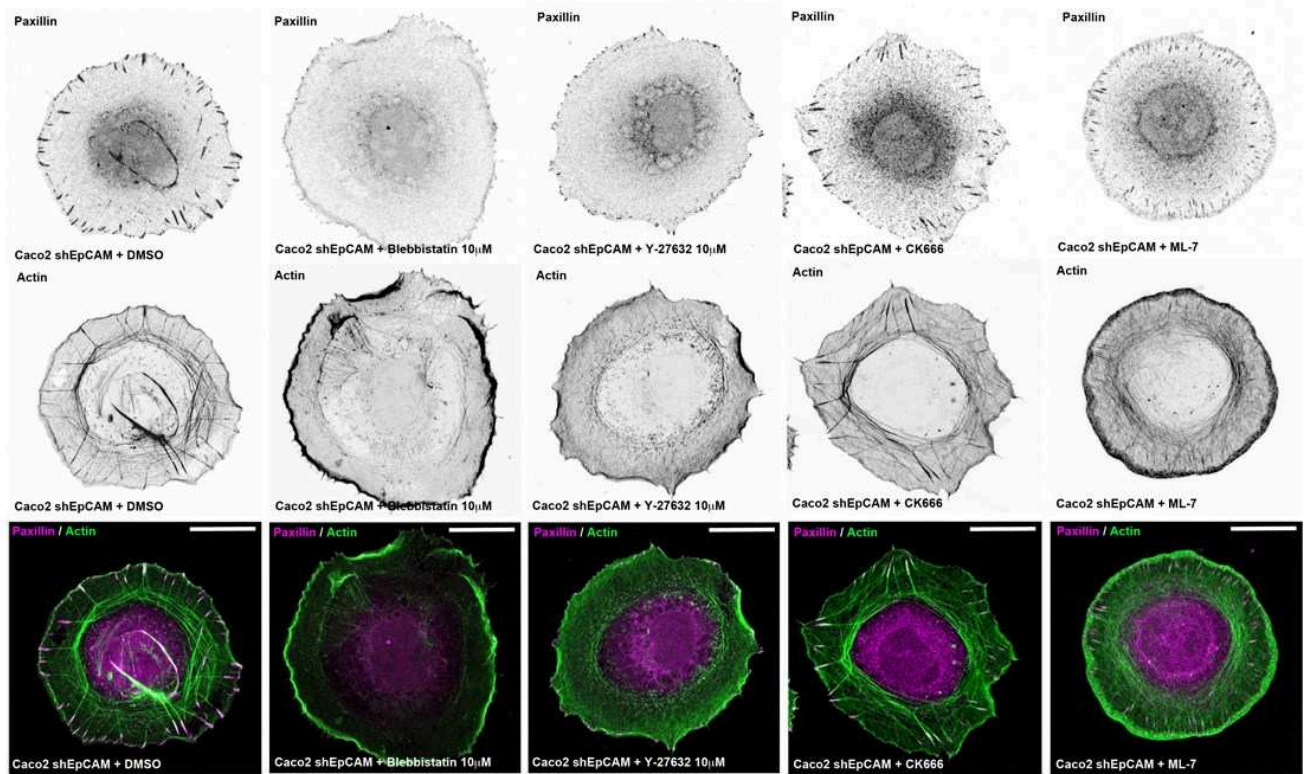
Supplementary Figure 3: (a) Confocal analysis of EpCAMr-GFP and paxillin in control and EpCAMr-GFP cells. Accumulated z-stacks are presented. Scale bar, 5 μ m. **(b)** Confocal analysis of actin and paxillin distribution in control and EpCAM-depleted cell islands. Accumulated z-stacks are presented. Scale bar, 5 μ m.



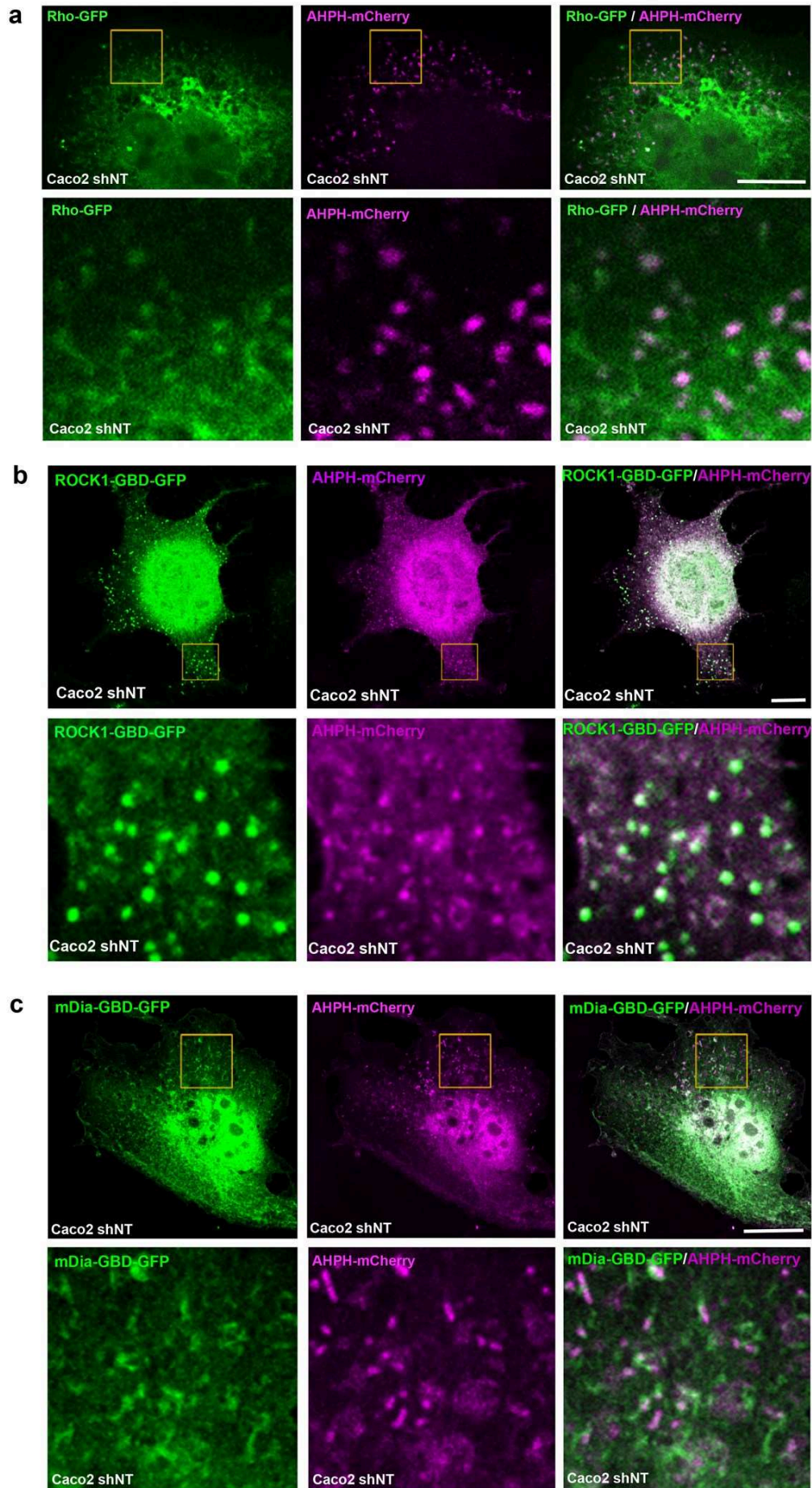
Supplementary Figure 4: (a) Western blot analysis of EpCAM expression in control or EpCAM siRNA-treated MDCK cells. α -tubulin was used as a loading control. **(b)** Statistical analysis of EpCAM expression in control and siRNA-treated MDCK cells. Three independent experiments were carried out.



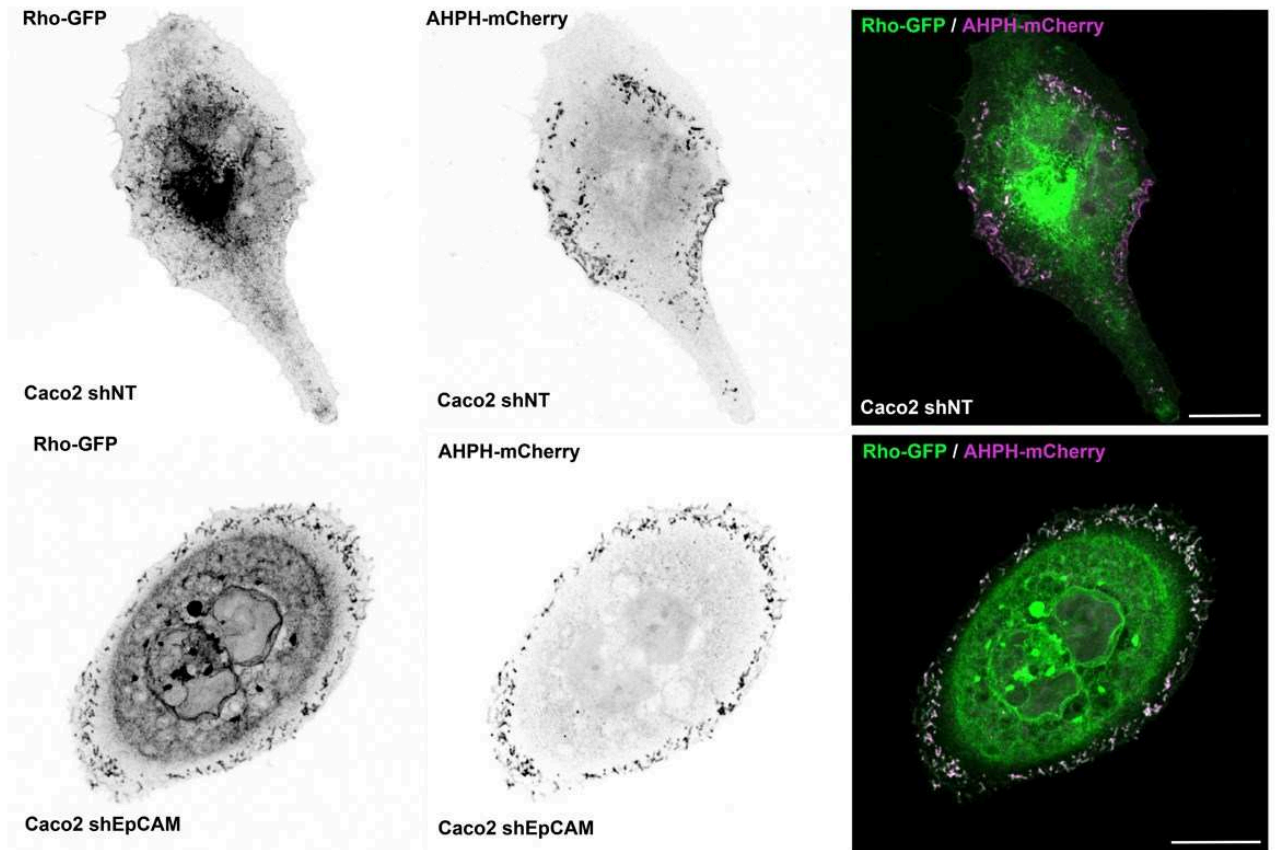
Supplementary Figure 5: (a) Western blot detection of α 4-actinin (*upper panel*) and EpCAM (*lower panel*) after immunoprecipitation of α 4-actinin or EpCAM from control Caco2 cell extracts. **(b)** Western blot analysis of α 4-actinin expression in control (*Luciferase siRNA*) or α 4-actinin-depleted (*α 4-actinin siRNA*) Caco2 shNT and Caco2 shEpCAM cells. GAPDH was used as loading control. **(c)** Confocal analysis of α 4-actinin, actin and paxillin distribution in α 4-actinin-depleted Caco2shNT cells (*upper panel*) or in α 4-actinin-depleted Caco2 shEpCAM cells (*lower panel*). Scale bar, 10 μ m.



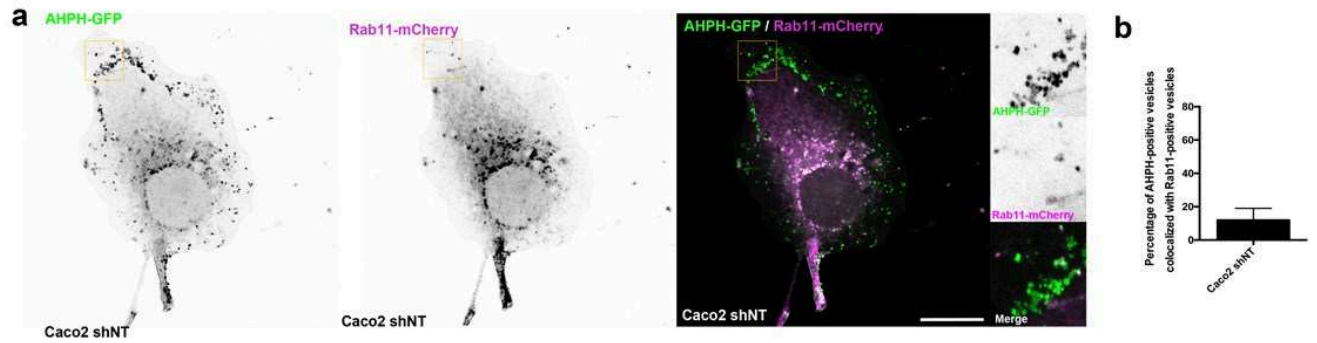
Supplementary Figure 6: Confocal analysis of paxillin (*magenta*) and actin (*green*) in EpCAM-depleted cells upon DMSO, blebbistatin 10 μM, Y-27632 10 μM, CK666 50 μM or ML-7 10 μM treatment for 1 hour. Scale bars, 5μm.



Supplementary Figure 7: (a-c) Confocal analysis of total RhoA (Rho-GFP) **(a)**, RhoA-GTP binding domain of ROCK1 (ROCK1-GBD-GFP) **(b)** or RhoA-GTP binding domain of mDia (mDia-GBD-GFP), together with GTP-RhoA (AHPH-mCherry). Scale bar, 5 μm .



Supplementary Figure 8: Confocal analysis of RhoA (Rho-GFP) and RhoA-GTP (AHPH-mCherry) distribution in control (*Caco2 shNT*) and EpCAM-depleted (*Caco2 shEpCAM*) cells. Scale bars, 5 μ m.



Supplementary Figure 9: (a) Confocal analysis of RhoA-GTP (AHPH-GFP) and Rab11-mCherry in Caco2 cells. Scale bar, 5 μ m. **(b)** Quantification of the Manders overlap coefficient between AHPH-GFP versus Rab11-mCherry in Caco2 cells.

3. Discussion

Comme je l'ai précédemment indiqué, les premiers travaux concernant EpCAM, et son nom même la désignant comme une molécule d'adhérence cellule-cellule *per se*, ont orienté les recherches concernant cette protéine depuis les années 90. Le travail de l'équipe de François Fagotto a permis de proposer un rôle indirect pour EpCAM dans la régulation de la contractilité via la voie de signalisation des PKCs atypiques (aPKCs). Cette voie visant la MLCK conduit à la déstabilisation des jonctions de E-cadhérine (Maghzal et al., 2013). Deux articles parus pendant ma thèse s'appuient sur des données structurales pour remettre en cause la participation d'EpCAM à un complexe d'adhérence (Tsaktanis et al., 2015; Gaber et al., 2018). Nos données étant obtenues en cellule unique, elles démontrent clairement qu'EpCAM possède une fonction indépendante de sa présence aux contacts cellulaires. Ces résultats nous permettent d'assigner à EpCAM une position de régulateur en amont de la GTPase RhoA, et décrivent les conséquences de son extinction au niveau fonctionnel dans les cellules épithéliales.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse démontrent que l'hypothèse reliant EpCAM et les aPKCs décrite dans leur article (Maghzal et al., 2010, 2013), n'est pas l'unique voie reliant EpCAM à la contractilité cellulaire. D'ailleurs, la contribution de la signalisation dépendante de RhoA a été présentée dans leur article, en figure supplémentaire, mais non retenue dans leur modèle final (Maghzal et al., 2013). Pourtant, ces données supplémentaires montrent clairement que l'utilisation d'un mutant dominant-négatif de RhoA (RhoA-DN) ou de Y-27632 restaure l'intégrité des explants d'ectoderme de manière similaire à l'inhibiteur de PKC δ employé à forte dose (5 μ M). Si la dose d'inhibiteur de PKC δ est intermédiaire (2 μ M), RhoA-DN est même plus efficace, indiquant un rôle prépondérant de RhoA pour le maintien de l'intégrité des épithéliums.

Dans notre étude, grâce à l'utilisation de la sonde développée par le laboratoire de M. Glotzer (Piekny and Glotzer, 2008), et reprise par le laboratoire d'Alpha Yap (Priya et al., 2015), nous avons analysé la distribution de RhoA activé en dynamique pendant l'adhérence au substrat et l'acquisition de la polarité avant-arrière des cellules épithéliales. Lorsque la cellule n'est pas encore étalée, RhoA-GTP est réparti de manière homogène, puis lorsqu'elle adhère au substrat et commence à s'étaler, un anneau de RhoA actif se forme au cortex. Au fur et à mesure de l'étalement, RhoA-GTP se disperse dans la cellule jusqu'à former un gradient croissant d'activité de l'avant de la cellule vers l'arrière (**fig. 6a**). En l'absence d'EpCAM, l'anneau de RhoA actif est maintenu, la dynamique de RhoA est très fortement réduite (**fig. 6b**), et la majorité des cellules EpCAM-KO ne parviennent pas à briser la symétrie pour établir un axe avant-arrière (**fig. 6b et fig. 1e-h**). Ce résultat montre directement l'importance de la dynamique de RhoA pour l'étalement des

cellules et l'organisation du cytosquelette d'actine, ce qui n'a jamais été décrit ni dans les cellules épithéliales, ni dans quelque modèle cellulaire que ce soit.

Contrairement à l'étude publiée par M. Takeichi (Vassilev et al., 2017), nous montrons que le trafic intracellulaire de RhoA passe majoritairement par la voie de recyclage dépendante de Rab35, et implique EHD1, une protéine responsable de la fission des vésicules à partir des endosomes de recyclage (**fig. 7, 8**) (Kouranti et al., 2006; Naslavsky and Caplan, 2011; Kobayashi and Fukuda, 2013). Le remodelage du cytosquelette varie suivant l'environnement cellulaire et implique un degré de plasticité au niveau temporel et spatial dans sa régulation. La composante spatiale est particulièrement visible dans les cellules neuronales où la répartition des RhoGEFs et RhoGAPs se distingue entre le corps cellulaire et l'axone (Galic et al., 2014; Fritz and Pertz, 2016). De même, le maintien de la polarité avant-arrière lors de la migration dépend d'une régulation différente entre les deux régions cellulaires. Il n'est donc pas surprenant que l'interaction entre les RhoGTPases et les mécanismes de trafic intracellulaire recueille de plus en plus d'attention (Wu and Horowitz, 2011; Bisi et al., 2013).

Rab35 contrôle une voie de recyclage rapide, importante dans de nombreux processus cellulaires, notamment pour la division (Kouranti et al., 2006; Klinkert and Echard, 2016). L'extrémité C-terminale de Rab35 est riche en acides aminés basiques dont la charge globale positive lui confère la propriété intéressante de former des interactions électrostatiques avec les lipides chargés négativement du feuillet interne de la membrane plasmique (Kulakowski et al., 2018). MICAL1, une oxydoréductase recrutée par Rab35 permet à l'abscission de progresser en induisant la dépolymérisation des filaments d'actine présent dans le midbody (Frémont et al., 2017). Parmi les effecteurs de Rab35 à la membrane des endosomes de recyclage, MICAL-L1 recrute EHD1, est une protéine capable de réaliser la fission des tubules de recyclage (Naslavsky and Caplan, 2011; Kobayashi and Fukuda, 2013). De plus en plus d'articles mettent en évidence la participation de Rab35 à l'organisation du cytosquelette d'actine, soit en s'associant directement avec des protéines de réticulation de l'actine telle que la fascine (Zhang et al., 2009), soit en modulant l'activité de régulateurs du cytosquelette. Plusieurs études ont révélé une colocalisation entre Rab35 et les GTPases Cdc42 et Rac1 (Chevallier et al., 2009; Shim et al., 2010; Klinkert and Echard, 2016). L'activation de Cdc42 par son interaction avec Rab35 est nécessaire pour la formation de filopodes et promeut l'extension de neurites dans des cellules de neuroblastome. Les auteurs ont aussi noté une colocalisation avec la GTPase RhoA mais sans effet apparent sur la formation de neurites (Chevallier et al., 2009).

EpCAM, RhoA activé et Rab35 colocalisent dans les cellules Caco2 (**fig. 7**). L'absence d'EpCAM ne semble pas modifier le recrutement de RhoA activé aux endosomes Rab35-positifs. De plus, la colocalisation d'EHD1 avec les vésicules AHPH-positives est augmentée en absence d'EpCAM (**fig. 8b**). Le mutant EHD1-G65R, qui a perdu sa capacité de liaison à l'ATP, phénocopie le blocage du recyclage de RhoA visible dans les cellules EpCAM-KO. Cela suggérerait qu'EpCAM favorise l'activité d'EHD1 en temps normal (**fig. 8e**). La présence de tubules EHD1-positifs qui semblent légèrement plus longs en absence d'EpCAM tend à favoriser cette hypothèse. Comment EpCAM influencerait l'activité d'EHD1 ? Il est possible que l'absence d'EpCAM empêche le recrutement de facteurs qui faciliterait l'activité d'EHD1, ou au contraire favorise le recrutement de partenaires ayant un effet négatif sur son activité. De plus, l'accumulation de RhoA activé à ce niveau pourrait exercer un rétrocontrôle sur la fission à partir des endosomes de recyclage.

Une autre question intéressante concerne le mécanisme d'activation de RhoA à la membrane des endosomes. La vision canonique des GTPases décrit leur activation à la membrane plasmique à l'aide de GEFs et leur inactivation puis maintien dans le cytoplasme sous l'action des GAPs et des GDIs. Des études précédentes laissaient sous-entendre la possibilité de l'activation de RhoA dans un pool intracellulaire, et non à la membrane plasmique (Braun et al., 2015; Vassilev et al., 2017). Ces travaux soulèvent un point intéressant et pour l'instant inexploré. Comment le cycle des GTPases est-il couplé à leur trafic ? Maintiennent-elles leur activité quelle que soit la membrane à laquelle elles sont incorporées et dans ce cas, par quel moyen ? Nos résultats montrent que RhoA est activé dans les endosomes de recyclage. Il est possible que des GEFs soient recrutées à la surface des endosomes par d'autres protéines du cargo, ou redistribuées aux endosomes suite à la déstabilisation des réseaux de cytosquelette. L'accumulation de RhoA activé dans les cellules EpCAM-KO amène aussi un deuxième point : RhoA est-il activé par la présence d'une GEF dans cette nouvelle localisation ou est-il bloqué dans les endosomes à cause de son activation ? Une hypothèse possible serait que RhoA doit être désactivé pour pouvoir poursuivre son recyclage. Cette question pourrait être résolue par l'analyse fine en vidéomicroscopie de RhoA et de son état d'activation en fonction de son trafic à l'aide des marqueurs du recyclage. Ces futures expériences, à la fois en cellule unique mais aussi sur des monocouches polarisées, seront extrêmement informatives sur ce point pour l'instant inexploré.

La dynamique des fibres de stress observée dans les cellules Caco2 et MDCK correspond à ce qui a été décrit pour les fibroblastes, à savoir la formation des arcs transverses à la frontière entre le lamellipode et la lamelle, puis celles des fibres ventrales à partir des fibres dorsales (Hotulainen and

Lappalainen, 2006; Tee et al., 2015). Nos résultats contrastent avec l'analyse de Jalal et al., qui n'observent pas de transition des fibres dorsales aux fibres ventrales dans les cellules épithéliales (Jalal et al., 2019) ; cependant, cette différence peut s'expliquer par la présence du confinement circulaire dans leurs expériences. En effet le confinement contraint le type de fibres de stress qu'une cellule peut établir, ainsi que leur connexion avec d'autres éléments du cytosquelette et leur dynamique (Kassianidou et al., 2017b; Lee et al., 2018). D'autre part, la forme en cercle maintient la cellule dans un état symétrique qui n'est probablement pas propice à l'établissement de la polarité avant-arrière, et peut-être à la maturation des fibres ventrales en cellules épithéliales.

La perturbation de RhoA conduit au blocage de la maturation des fibres de stress. Le fait que RhoA impacte ces structures n'est pas surprenant puisque qu'il s'agit des premiers résultats concernant les fonctions régulées par cette GTPase (Nobes and Hall, 1995; Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). En plus de la contractilité cellulaire, les α -actinine-1 et -4 sont décrites comme étant requises pour la maturation des fibres de stress (Peterson et al., 2004; Hotulainen and Lappalainen, 2006; Feng et al., 2013). Ayant écarté la possibilité que l' α -actinine-1 (non présente sur les câbles d'actine dans les cellules Caco2, résultat non publié) et l' α -actinine-4 participent à ce processus (**fig. 5a et fig. supp. 5**), nous nous sommes concentrés sur le niveau de contractilité présent au niveau des arcs transverses. En absence d'EpCAM, la quantité de myosine II phosphorylée est bien plus élevée qu'en condition contrôle (**fig. 5b-e**), et la majorité se situe sur les arcs transverses (**fig. 5b**). En considérant que l'activité contractile doit être comprise dans une gamme de valeurs raisonnables pour être efficace, une tension trop faible ou trop forte pourrait expliquer le défaut de maturation des fibres de stress. Les résultats obtenus après traitement des cellules EpCAM-KO par des drogues qui modulent l'activité contractile confirment cette idée. En effet, l'application de blebbistatine ou de Y-27 à des doses faibles (2 μ M et 0,5 μ M, respectivement, **fig. 5f**) permettent de rétablir la formation de fibres de stress, alors que des doses plus importantes et plus classiquement utilisées (10 μ M) n'ont aucun effet (résultat non publié).

Les résultats concernant la myosine-II suggèrent que la tension exercée sur les câbles d'actine est excessive en absence d'EpCAM. Cependant, il apparait là un paradoxe au regard des données obtenues par TFM, qui indiquent que les cellules EpCAM-KO exercent des forces très faibles sur le substrat (**fig. 4e, f**). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène :

- Les adhérences focales ne sont pas correctement reliées cytosquelette
- La contraction des arcs n'est pas bien transmise au substrat au niveau de la connexion entre les arcs transverses et les fibres dorsales
- Bien que la myosine-II soit phosphorylée, son action est réduite
- Le type de fibres de stress en soi est moins efficace pour transmettre des forces au substrat

Le marquage de différents composants des adhérences focales ne nous a pas permis d'identifier une protéine manquante, parmi celles connues pour la transmission de l'information mécanique (**fig. supp. 2**). En revanche, la distribution de la zyxine est particulièrement intéressante. En absence d'EpCAM, celle-ci est recrutée très fortement sur les fibres dorsales (**fig. supp 2**). Il a été montré que la zyxine participe à un mécanisme de réparation des fibres de stress quand celles-ci se cassent ou se déforment. La zyxine est recrutée aux sites de cassure des fibres de stress et recrute l' α -actinine et le complexe VASP pour stabiliser et réparer la fibre afin de restaurer son activité de mécanotransducteur (Smith et al., 2010; Hoffman et al., 2012). Les fibres dorsales des cellules EpCAM-KO sont très enrichies en zyxine et en ACTN4, ce qui laisse penser qu'elles seraient fragilisées et/ou en processus de réparation.

Pour évaluer la connexion entre les fibres dorsales et les arcs transverses, j'ai analysé la présence de la palladine (PLLD). Cette protéine est capable de se lier aux filaments d'actine, et son extinction cause la réduction des fibres dorsales, ainsi que des défauts de connexion entre celles-ci et les arcs transverses dans des cellules U2OS (Gateva et al., 2014). L'immunomarquage de la palladine montre que cette protéine est présente dans les cellules EpCAM-KO (**Figure 25**). Même si le signal est assez diffus, elle est enrichie au niveau des fibres d'actine (flèches) et son intensité ne semble pas différente de celle visible dans les cellules contrôles.

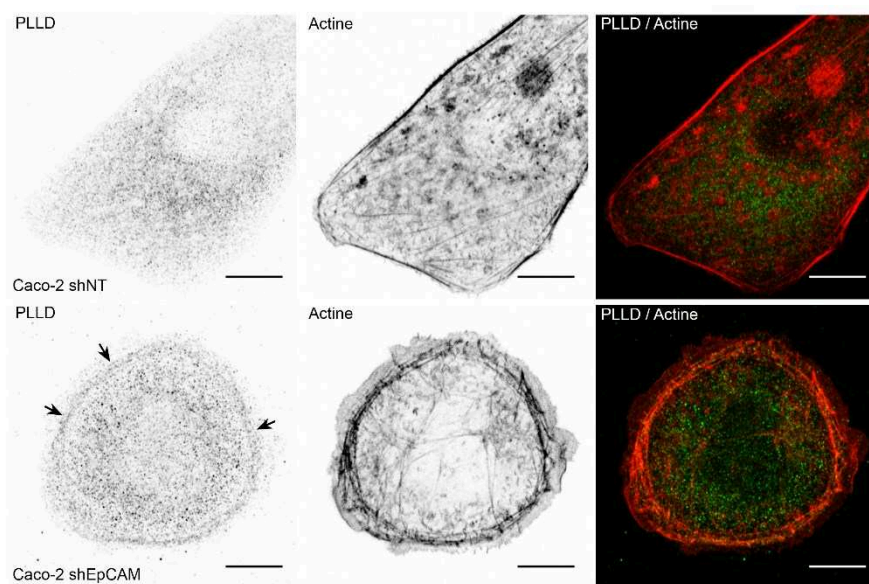


Figure 25 : Distribution de la palladine (PLLD) dans les cellules contrôles et EpCAM-KO. PLLD est enrichie au niveau des arcs transverses (flèches). Barre d'échelle, 10 μ m.

Concernant l'activité de la myosine-II en regard de sa phosphorylation, la quantité de chaîne légère régulatrice totale n'étant pas différente entre les cellules contrôles et les cellules EpCAM, il semblerait que la quantité de myosine soit identique entre les deux conditions. De façon intéressante, l'équipe d'A. Martin a démontré que, dans le contexte de la constriction apicale chez la

drosophile, une activation constitutive de RhoA augmente en effet l'activité de la myosine-II mais ne produit pas de contractilité efficace pour autant (Mason et al., 2016). Les auteurs proposent que la pulsativité de l'activité de la myosine-II, entraînée par le cycle de RhoA entre les états activé et inactivé, est essentielle pour le développement de la contractilité. Ainsi, l'inactivation de RhoA est nécessaire, au même titre que son activation. Dans la mesure où RhoA reste bloqué sous forme activée dans les cellules EpCAM-KO, le caractère pulsatile de la myosine-II pourrait être perdu, la rendant incapable de générer une contractilité raisonnable. En outre, l'analyse de la distribution des isoformes myosine-IIA et myosine-IIB montre un co-recrutement important de la myosine-IIA et -IIB de façon aberrante aux arcs transverses en absence d'EpCAM (**Figure 26**). L'activité ATPase de la myosine-IIB est plus faible que celle de la myosine-IIA, il est donc possible que l'action des myosines soit effectivement moins efficace pour produire une tension en absence d'EpCAM.

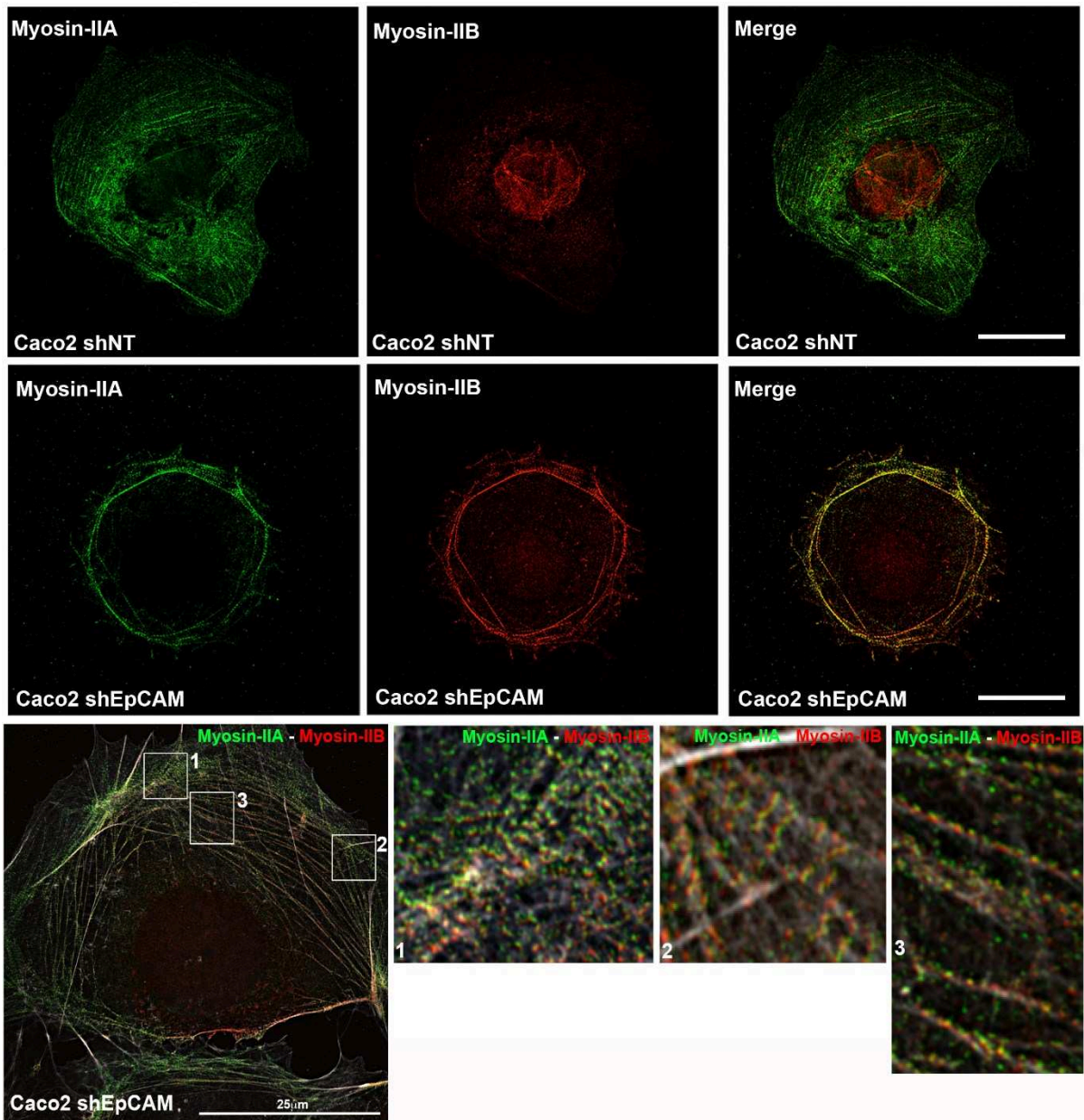


Figure 26 : Distribution des myosines-IIA et -IIB dans les cellules contrôles et EpCAM-KO. En microscopie confocale (panneau du haut, barre d'échelle, 10 μm) et en microscopie super-résolutive SIM (panneau du bas, barre d'échelle, 25 μm).

De plus, une activité moins productive des myosines permettrait aussi d'expliquer le phénotype de migration de la proportion de cellules EpCAM-KO capables de briser la symétrie après l'étalement, qui ressemble plus au mode de migration des kératocytes (cellules en forme de « C », avec une lamelle très étendue) qu'à celui des cellules contrôles (**Figure 27**).

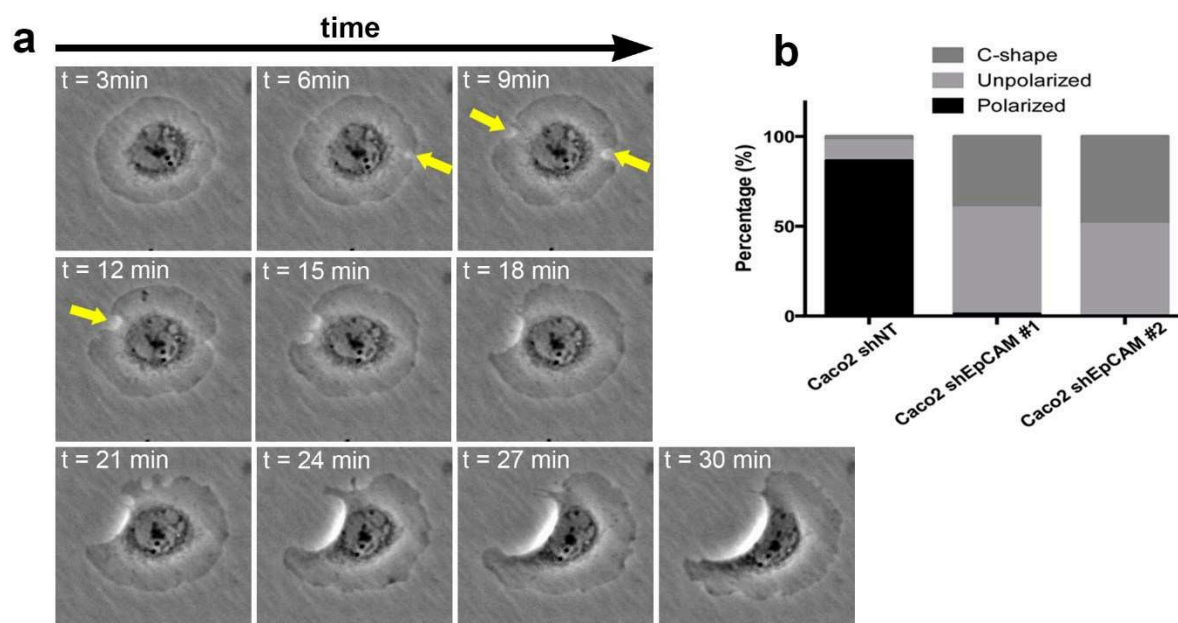


Figure 27 : Etallement des cellules EpCAM-KO et brisure de symétrie. **(a)** Brisure de symétrie d'une cellule Caco-2 EpCAM-KO. **(b)** Quantification des deux phénotypes (non-polarisé ou forme en « C ») des cellules EpCAM-KO.

Parmi les mécanismes décrits comme responsables de la brisure de symétrie dans les kératocytes se trouvent : la répartition asymétrique des adhérences focales et/ou des forces de tension, ou encore des variations de vitesse du flot d'actine. Ces fluctuations sont capables de générer la mise en place d'une polarité avant-arrière, laquelle est ensuite maintenue par la réorganisation du cytosquelette (Yam et al., 2007; Prager-Khoutorsky et al., 2011; Trichet et al., 2012; Barnhart et al., 2015). Les adhérences focales des cellules EpCAM-KO sont réparties tout autour de la cellule de manière radiale (**fig. 2b**), donc ne sont probablement pas la source d'asymétrie responsable de la formation des cellules « en C ». En revanche, la diminution de l'activité contractile à l'aide de Y-27632, ou de blebbistatine, perturbe l'étalement de fibroblastes et conduit à l'apparition du phénotype en « C » (Cai et al., 2010). L'analyse de l'initiation de la migration des kératocytes supporte également l'idée selon laquelle la brisure de symétrie nécessaire à l'initiation d'un mouvement dépend de l'équilibre entre la force d'adhérence de la cellule au substrat et celle de la tension créée par la myosine-II. Les kératocytes peuvent migrer, même en présence d'une activité de la myosine-II réduite, si l'adhérence au substrat est également faible (Barnhart et al., 2015). Les expériences de TFM, ainsi que l'analyse de l'adhérence au substrat des cellules EpCAM-KO, montrent que celles-ci sont en effet faiblement adhérentes (**Figure 28**). Enfin, la dynamique de l'actine étant perturbée en absence d'EpCAM, la réorganisation nécessaire au maintien de cette polarité avant-arrière ne serait pas possible, et expliquerait l'arrêt rapide du mouvement.

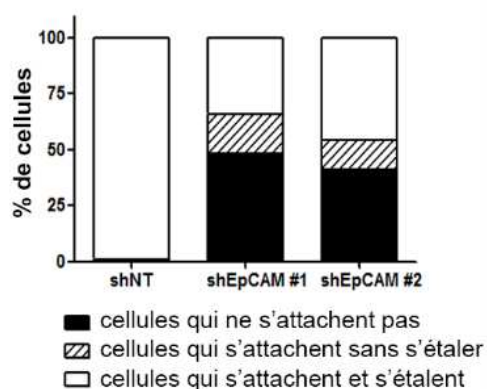


Figure 28 : Quantification de l'adhérence et l'étalement des cellules sur collagène. N > 100 cellules par condition.

Pour résumer, cette deuxième étude m'a permis de mettre en évidence qu'EpCAM possède une fonction de régulation de l'activité de l'actomyosine, laquelle est indépendante des contacts cellule-cellule. Son activité de régulateur, qui s'exerce sur le contrôle de la dynamique de la GTPase RhoA, est requise pour la dynamique correcte du cytosquelette d'actine et donc pour l'adhérence au substrat, l'établissement de la polarité avant-arrière et la migration cellulaire. Ces résultats sont schématisés dans le modèle présenté dans l'article (**fig. 9**) et la **Figure 29**.

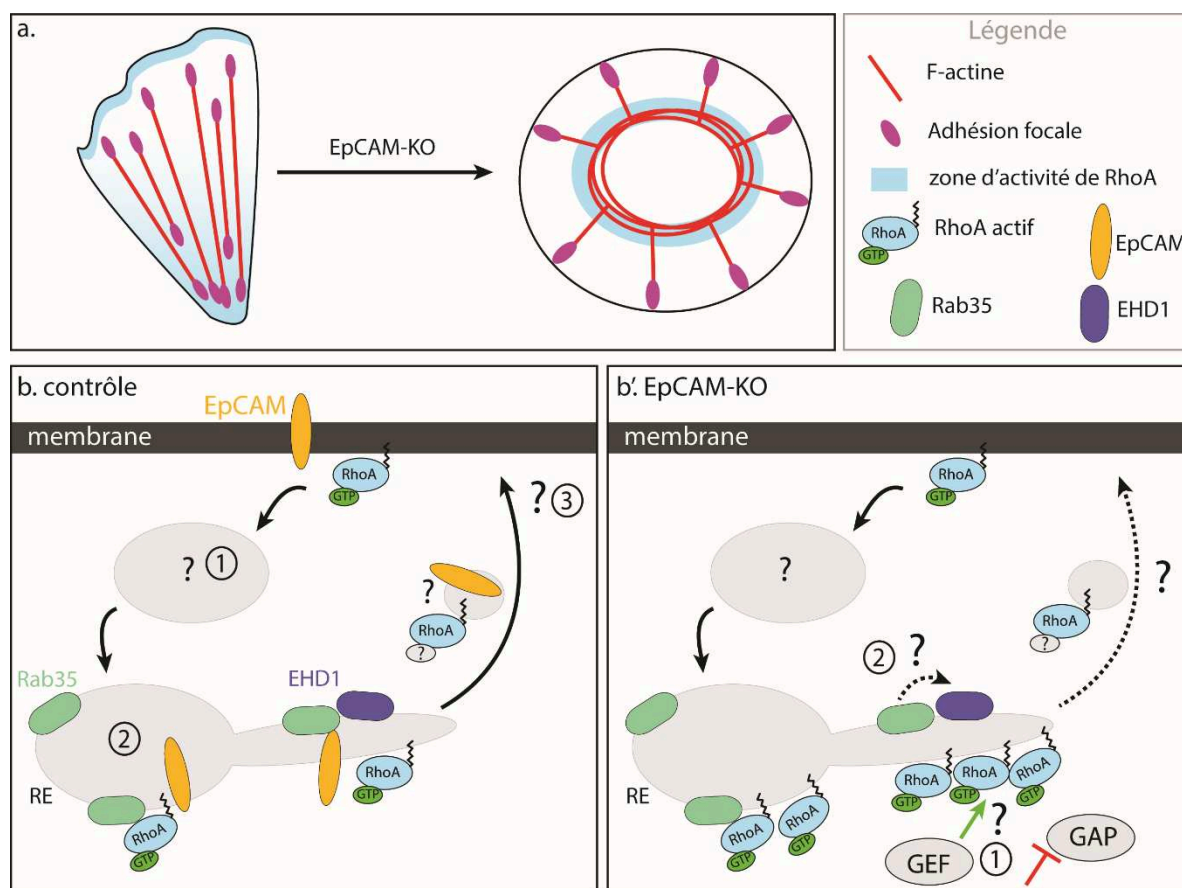


Figure 29 : Schéma récapitulatif. **a.** EpCAM favorise la dynamique de RhoA nécessaire à la maturation des fibres de stress ventrales. En son absence RhoA est bloqué et activé dans une zone circulaire à la membrane des endosomes de recyclage. **b.** En condition contrôle, RhoA est internalisé et recyclé par la voie Rab35. Le mécanisme de son internalisation (et la participation potentielle d'EpCAM à ce niveau) est inconnu (1). RhoA activé et EpCAM colocalisent dans les endosomes de recyclage Rab35-positifs (2). L'état d'activation de RhoA au cours du recyclage vers la membrane plasmique, ainsi que le transport ou co-transport d'EpCAM, sont inconnus (3). **b'.** En absence d'EpCAM, RhoA activé est accumulé dans les endosomes de recyclage. Son état d'activation est possiblement régulé à ce niveau par la présence d'une RhoGEF ou l'absence d'une RhoGAP suite à l'extinction d'EpCAM (1). En absence d'EpCAM, l'activité d'EHD1 est potentiellement perturbée (2). RE, « recycling endosome ».

Chapitre 5 – Conclusion

1. Résumé des travaux

Au cours de ma thèse, j'ai d'abord mis en évidence l'existence d'un mécanisme de régulation de la contractilité dépendant d'EpCAM dans les monocouches épithéliales, et l'importance de cette relation pour le maintien de la polarité apico-basale des entérocytes. EpCAM contrôle le niveau d'activité et la distribution de la myosine-II au niveau des jonctions cellulaires. En son absence, l'activité de la myosine-II est globalement réduite, conduisant à la déstabilisation des complexes E-cadhérine et des jonctions serrées. L'activité contractile restante est relocalisée aux jonctions tricellulaires, créant un déséquilibre entre les forces de tension exercées sur les jonctions bicellulaires et tricellulaires, qui est responsable du positionnement ectopique du domaine apical de l'entérocyte au niveau des jonctions tricellulaires. Cette caractérisation réalisée au niveau cellulaire sur les cellules Caco2 EpCAM-KO en 2D a été considérée en parallèle de l'étude des biopsies de patients atteints de CTE. Cela nous a permis de réaliser l'importance des contraintes liées à la géométrie du tissu intestinal et de dresser un portrait du mécanisme à l'œuvre responsable des lésions tissulaires caractéristiques présentes chez les patients atteints de CTE.

Dans un deuxième projet, afin de déterminer l'étendue de la régulation exercée par EpCAM sur le cytosquelette d'actine, nous avons analysé l'effet de l'extinction d'EpCAM sur les processus d'adhérence au substrat et de migration cellulaire. Nos résultats rapportent que la régulation de l'activité de la myosine-II exercée par EpCAM dépend de la participation de celle-ci au recyclage de la GTPase RhoA. Dans les cellules EpCAM-KO, RhoA activé est maintenu à la membrane d'endosomes de recyclage Rab35-positifs, et la dynamique des câbles d'actine est bloquée en un système limitant la capacité des cellules à acquérir une polarité avant-arrière et à migrer (**Figure 30**). Ce travail démontre également qu'EpCAM exerce cette fonction en cellule unique, ce qui valide, et démontre au niveau fonctionnel, les récentes observations structurales d'EpCAM qui suggéraient qu'elle ne se comportait pas comme une CAM classique.

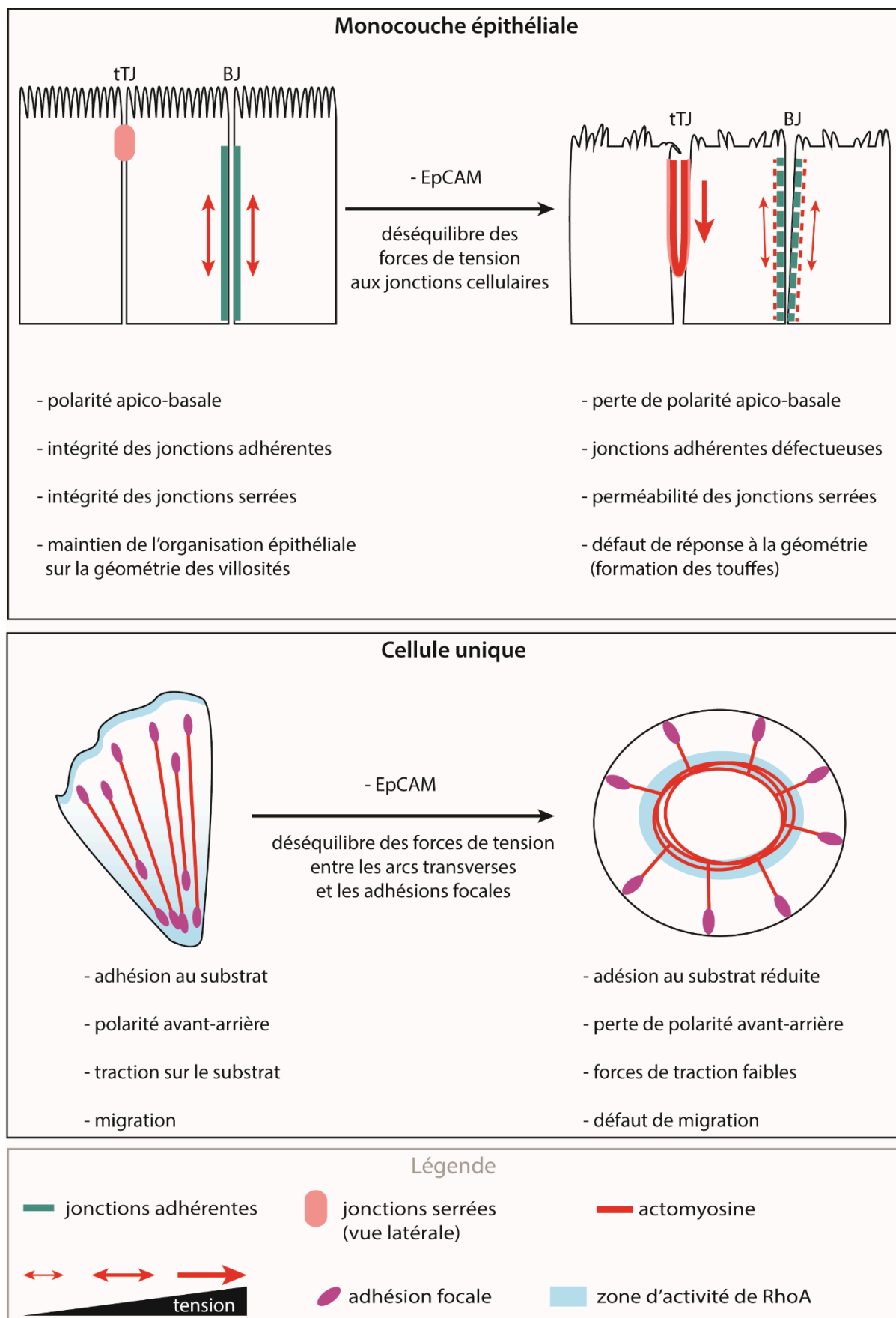


Figure 30 : Schéma récapitulatif de l'ensemble des résultats. BJ, jonction bicellulaire ; tTJ, jonction tricellulaire.

2. Perspectives et travaux en cours

2.1. Localisation de RhoA activé aux membranes des endosomes

En cellule unique, le blocage de la dynamique de RhoA suite à l'extinction d'EpCAM se traduit par un défaut de l'organisation et de l'activité du cytosquelette d'actomyosine. Il est intéressant de noter que même si la GTPase est activée, le fait qu'elle soit mal localisée conduit à un mauvais comportement cellulaire. Les premiers travaux concernant les GTPases Rac1 et RhoA ont établi un modèle de la migration cellulaire selon lequel les GTPases Rac1 et RhoA activent des voies de signalisation antagonistes, l'une favorisant la formation de protrusions à l'avant de la cellule alors que l'autre serait responsable de la contraction de l'arrière (Ridley et al., 2003). Le développement de sondes FRET a ensuite nuancé cette vision binaire, en montrant que les RhoGTPases sont en réalité extrêmement dynamiques, et de manière surprenante, que RhoA est fortement activé dans une bande restreinte de 2 μm à l'avant des cellules en migration (Pertz et al., 2006). Par la suite, il est apparu que l'activation de RhoA à l'avant de la cellule est synchronisée avec la progression de la protrusion alors que Rac1 et Cdc42 sont exprimées à l'arrière de la zone de RhoA avec un délai et servent à maintenir la protrusion pour garantir la directionnalité du mouvement (Machacek et al., 2009). Le fait que, suivant sa localisation, la même GTPase favorise des comportements cellulaires différents a conduit plusieurs revues récentes à suggérer que les domaines d'activation de RhoA dépendent plus de domaines délimités par la distribution de différentes RhoGEFs, RhoGAPs et effecteurs, que de la localisation de la GTPase en elle-même (Fritz and Pertz, 2016). Il existe environ 80 GEFs et GAPs chez l'Homme, ce qui sous-entend que la régulation des GTPases est effectivement plus finement contrôlée que la vision simple de l'interrupteur moléculaire. L'analyse de la distribution et de l'activité de RhoA au cours de la division supporte cette idée. RhoA est en effet recruté dans la zone limitée au plan équatorial d'une cellule en division et participe à l'ingression du sillon de division. La restriction de RhoA au plan équatorial est dépendante de la coordination entre la RhoGEF Ect2 et la RhoGAP CYK-4, et l'extinction de ces régulateurs conduit à la diffusion de RhoA activé sur une plus grande surface, ce qui perturbe la division (Yüce et al., 2005). Si chaque région subcellulaire contient un ensemble variable de RhoGEFs et GAPs en fonction de l'activité qui doit s'y exercer, le maintien de l'anneau de RhoA actif pourrait s'expliquer par la dynamique réduite de RhoA en absence d'EpCAM. Dans les cellules contrôles, où le trafic de RhoA est correct, la GTPase ne s'accumule pas aux endosomes de recyclage. Ainsi, on peut supposer que le cycle d'activation/inactivation de RhoA est intimement lié à son trafic intracellulaire ; la présence d'une RhoGEF, ou l'absence d'une RhoGAP, au niveau des endosomes de recyclage pourrait être responsable du blocage de RhoA activé dans les cellules EpCAM-KO (**Figure 29**).

Compte tenu du nombre important de GEFs et GAPs, nous avons décidé dans un premier temps d'explorer la distribution de trois GEFs (p114-RhoGEF, p115-RhoGEF et GEF-H1) et une GAP (p190-RhoGAP) décrites comme participant aux processus mécanotransducteurs dans les épithéliums (Acharya et al., 2018; Héraud et al., 2019). Les distributions de p114-RhoGEF et p190-RhoGAP ne présentent pas de différence entre les cellules contrôles et les cellules EpCAM-KO (données non montrées). En revanche, p115-RhoGEF et GEF-H1 s'accumulent dans la zone périnucléaire proche des arcs transverses en absence d'EpCAM (**Figure 31**). La perte d'EpCAM modifie donc la distribution de RhoGEFs, bien qu'il soit pour l'instant difficile de savoir s'il s'agit de GEFs en amont ou d'un rétrocontrôle de l'activation de RhoA. L'analyse de leur niveau d'activité serait nécessaire pour le confirmer, mais il est possible que ces GEFs soient responsables de l'état bloqué en RhoA activé, en absence d'EpCAM.

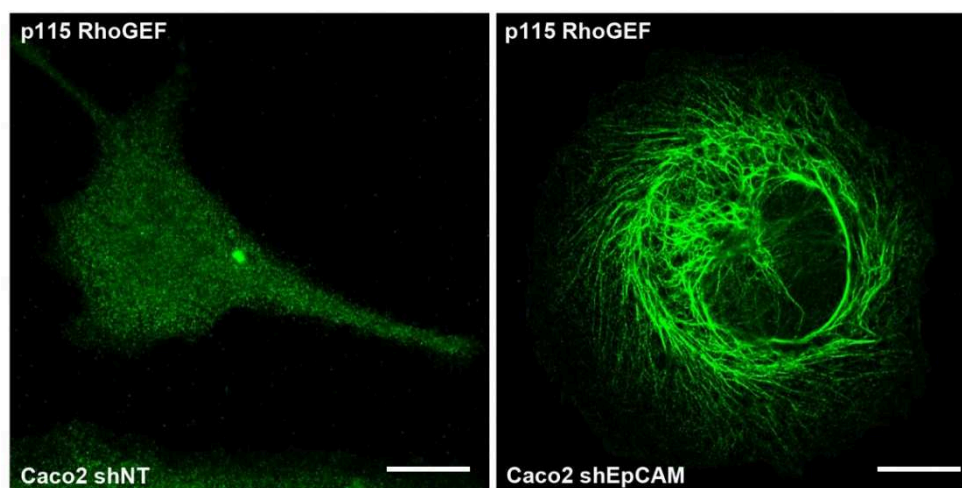


Figure 31 : Distribution de p115-RhoGEF en microscopie confocale dans les cellules Caco2 contrôle ou EpCAM-KO. Barre d'échelle, 10 μ m.

2.2. Cycle de RhoA et trafic intracellulaire

Comme indiqué précédemment, les données obtenues concernant le recyclage de RhoA activé soulèvent de nombreuses questions. Nos résultats montrent qu'EpCAM et RhoA transitent en majorité par la voie Rab35, cependant une portion de ces molécules utilisent la voie Rab11 comme décrit dans l'article de M. Takeichi (Vassilev et al., 2017). Néanmoins, dans nos mains, seul 15% d'AHPH se localisent dans les endosomes de recyclage Rab11-positifs (**fig. supp. 9**), alors qu'il colocalise à 60% et 40 % avec les endosomes de recyclage Rab35-positifs et EHD1-positifs, respectivement. Comment RhoA et EpCAM sont-ils dirigés suivant l'une ou l'autre des voies et quelles conséquences cela produit en terme d'interaction avec différents partenaires ? En absence d'EpCAM, la majorité des molécules de RhoA activé transitent via la voie Rab11 (60%, données

préliminaires), ce qui indique qu'EpCAM est probablement responsable du recyclage de RhoA par la voie Rab35. L'impact d'un passage via les voies Rab35 ou Rab11 sur le cycle d'activation/inactivation de RhoA, la périodicité de ce cycle, et les répercussions sur l'arrangement du réseau d'actomyosine et la contractilité cellulaire restent des points en suspens.

Enfin, considérant le nombre croissant d'études montrant l'activité de RhoA hors de la membrane plasmique, il serait intéressant de suivre la dynamique de RhoA total et RhoA activé avec une haute résolution spatiale et temporelle, pour s'assurer de la corrélation entre son activation et sa présence à la membrane, et corriger la vision classique du cycle de RhoA si nécessaire.

2.3. Processus d'activation de RhoA aux jonctions

Un mécanisme d'activation aberrant de RhoA pourrait également être à l'œuvre dans les monocouches polarisées au niveau des jonctions bicellulaire et/ou tricellulaires. Il serait donc également intéressant d'analyser la dynamique de RhoA activé, et le cycle de RhoA en général, dans les cellules en monocouches polarisées, et d'évaluer, dans le cas où elle serait défectueuse, l'importance de cette dynamique avec la formation et le maintien des jonctions cellule-cellule. En première intention, j'ai analysé la distribution de RhoA activé aux jonctions cellulaires d'une monocouche (**Figure 32**). Les structures RhoA-positives sont notablement plus larges en absence d'EpCAM, ce qui suggérerait un défaut dans la vésiculation ou fission des endosomes en absence d'EpCAM, de façon similaire aux défauts visibles en cellule unique.

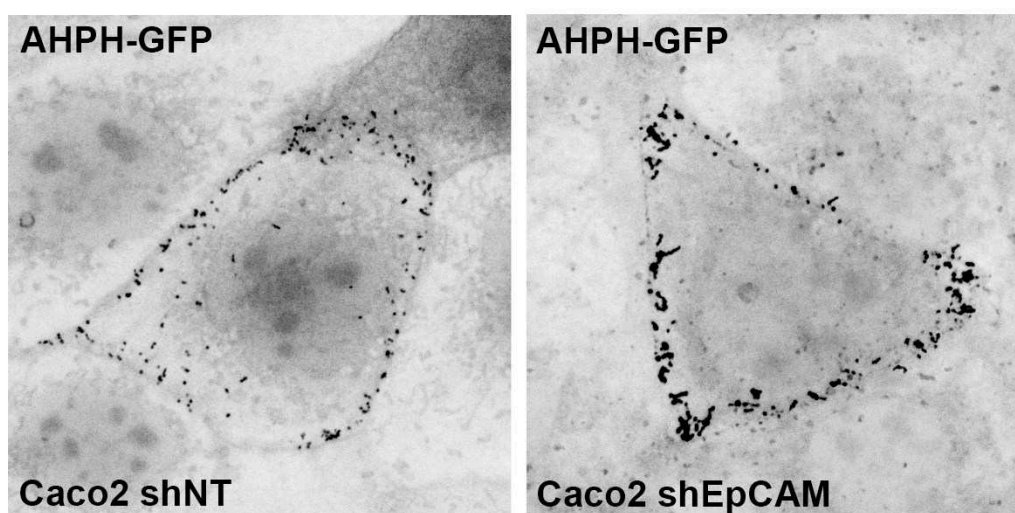


Figure 32 : Distribution de RhoA activé à la jonction de cellules Caco2 contrôles ou EpCAM-KO.

D'ailleurs, un mécanisme similaire de recyclage de RhoA activé à proximité des jonctions bicellulaires est attendu, à la vue des premiers résultats que j'ai pu obtenir (**Figure 33**).

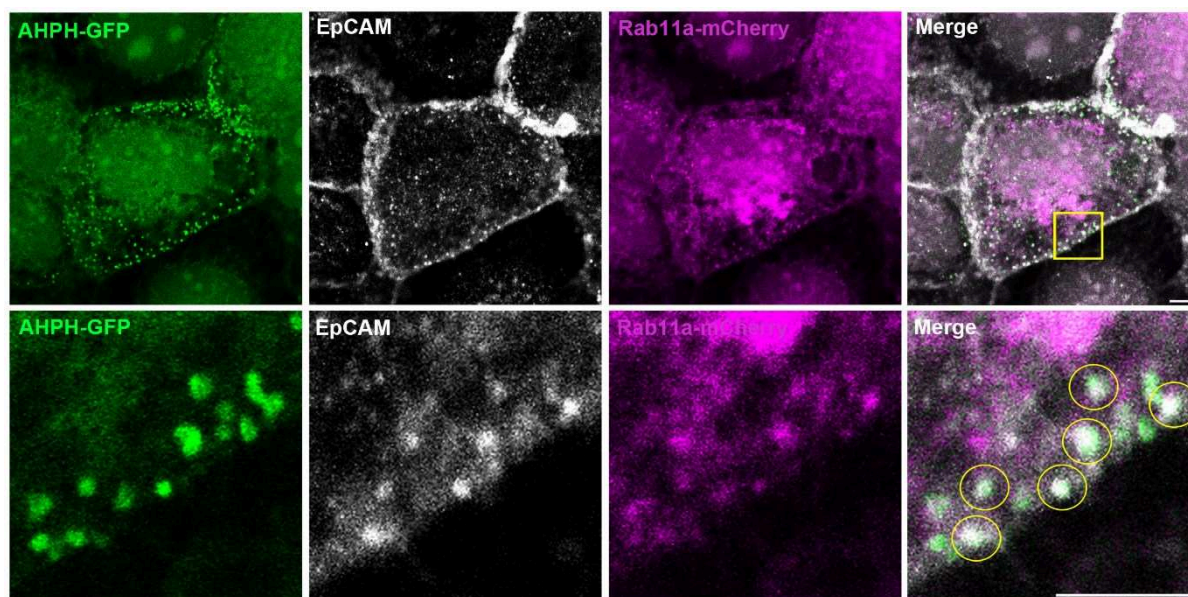


Figure 33 : Distribution de RhoA activé, EpCAM et Rab11 aux jonctions bicellulaires de cellules Caco2 contrôles, en microscopie confocale. Barre d'échelle, 10 μ m.

2.4. Effet de l'extinction d'EpCAM sur les autres cytosquelettes

Les résultats obtenus suite à l'utilisation des inhibiteurs de ROCKs et des formines nous ont permis d'établir un lien entre RhoA et EpCAM, en observant son impact sur l'actomyosine. Cependant, il est clair que l'effet de l'hyperactivité de RhoA sur le cytosquelette d'actine n'explique pas l'entièreté du phénotype EpCAM-KO puisque aucun traitement ne restaure la polarisation avant-arrière visible dans les cellules contrôles. Il est clairement établi que les trois systèmes de cytosquelettes, à savoir l'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires, interagissent et s'entre-régulent (Hohmann and Dehghani, 2019). La littérature concernant l'effet de RhoA sur les microtubules est abondante et expliciterait les défauts de forme et de trafic intracellulaire visibles dans les cellules EpCAM-KO (Palazzo et al., 2001; Meiri et al., 2012; Wojnacki et al., 2014; Sandí et al., 2017). D'autre part, GEF-H1 ou p115-RhoGEF se trouvent parfois associées aux microtubules pour limiter l'activité de RhoA (Meiri et al., 2012; Slattum et al., 2009). Ces éléments permettent de poser plusieurs hypothèses : EpCAM contrôlerait-elle la distribution et l'activité de RhoA par un effet sur les microtubules ? ou en modulant l'adressage de GEFs ou GAPs via les microtubules ?

Le marquage des microtubules avec l' α -tubuline montre effectivement que ceux-ci sont réorganisés, et possiblement déstabilisés (**Figure 34**). Cela pourrait suggérer qu'EpCAM serait plutôt un stabilisateur de l'organisation des microtubules, et que son extinction en perturbant le réseau de microtubules conduirait à la relocalisation de RhoA. L'utilisation des mutants de Rab35 et EHD1 dans les cellules contrôles phénocopie l'extinction d'EpCAM alors que celles-ci conservent a priori un réseau de microtubules intact. Il est donc probable que l'action d'EpCAM sur RhoA ait lieu en amont

de l'effet sur les microtubules, mais une étude plus approfondie serait nécessaire pour évaluer son impact sur la polarisation cellulaire et les défauts observés de l'organisation du cytosquelette d'actine.

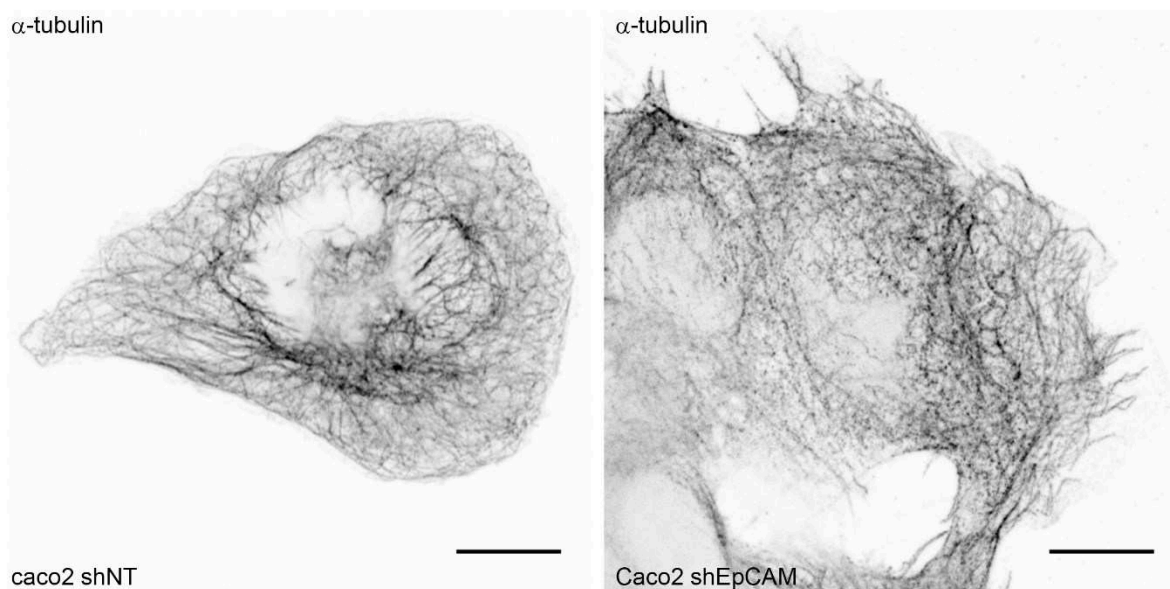


Figure 34 : Distribution de l'α-tubuline en cellule Caco2 contrôle ou EpCAM-KO. Barre d'échelle, 10 μm.

La distribution particulière de p115-RhoGEF et de GEF-H1 (**Figure 31**), qui ne semblait pas correspondre aux microtubules, nous a poussé à analyser l'organisation des filaments intermédiaires. Les filaments intermédiaires sont principalement connus comme éléments de structure des cellules et de résistance aux perturbations mécaniques via leur ancrage aux desmosomes et héli-desmosomes (Herrmann and Aebi, 2016; Kowalczyk and Green, 2013). Dans les épithéliums, les filaments intermédiaires sont représentés majoritairement par les tonofibrilles de kératines qui se forment par association de dimères entre kératines de type I et de type II. Les épithéliums simples tels que l'intestin expriment principalement les couples kératine-8/kératine-18 (K8/K18) et kératine-7/kératine-19 (K7/K19) (Loschke et al., 2015). Bien qu'un rapport indique une élongation des desmosomes dans les souris EpCAM-KO (Mueller et al., 2014), nous n'avons pas observé d'effet notable de l'extinction d'EpCAM sur les desmosomes dans nos cellules (données non montrées). La distribution de la keratine-19 (K19) dans les cellules EpCAM-KO correspond effectivement à celle des deux RhoGEFs (**Figure 35**). L'association de p115-RhoGEF et GEF-H1 aux microtubules conduit à leur inactivation, leur présence sur les filaments intermédiaires indique au moins qu'ils ne sont pas nécessairement inactifs dans les cellules EpCAM-KO, et de fait ils sont relocalisés très proches des câbles d'actine où la myosine est phosphorylée, ce qui tend à indiquer qu'ils seraient actifs. Il existe très peu de données concernant les RhoGEFs et les filaments

intermédiaires. Une équipe a récemment montré que la RhoGEF Solo (aussi nommée ARHGEF-40) est capable de se lier aux filaments de K8/K18 et que l’extinction de la RhoGEF est responsable de la désorganisation du réseau de kératines et des fibres de stress (Fujiwara et al., 2016, 2019). Il serait donc extrêmement intéressant d’analyser la distribution et l’activité de Solo dans nos cellules EpCAM-KO. Approfondir le lien entre EpCAM, RhoA et les filaments intermédiaires est d’autant plus important que leur déstabilisation participe sûrement à la fragilisation des cellules EpCAM-KO face au stress mécanique.

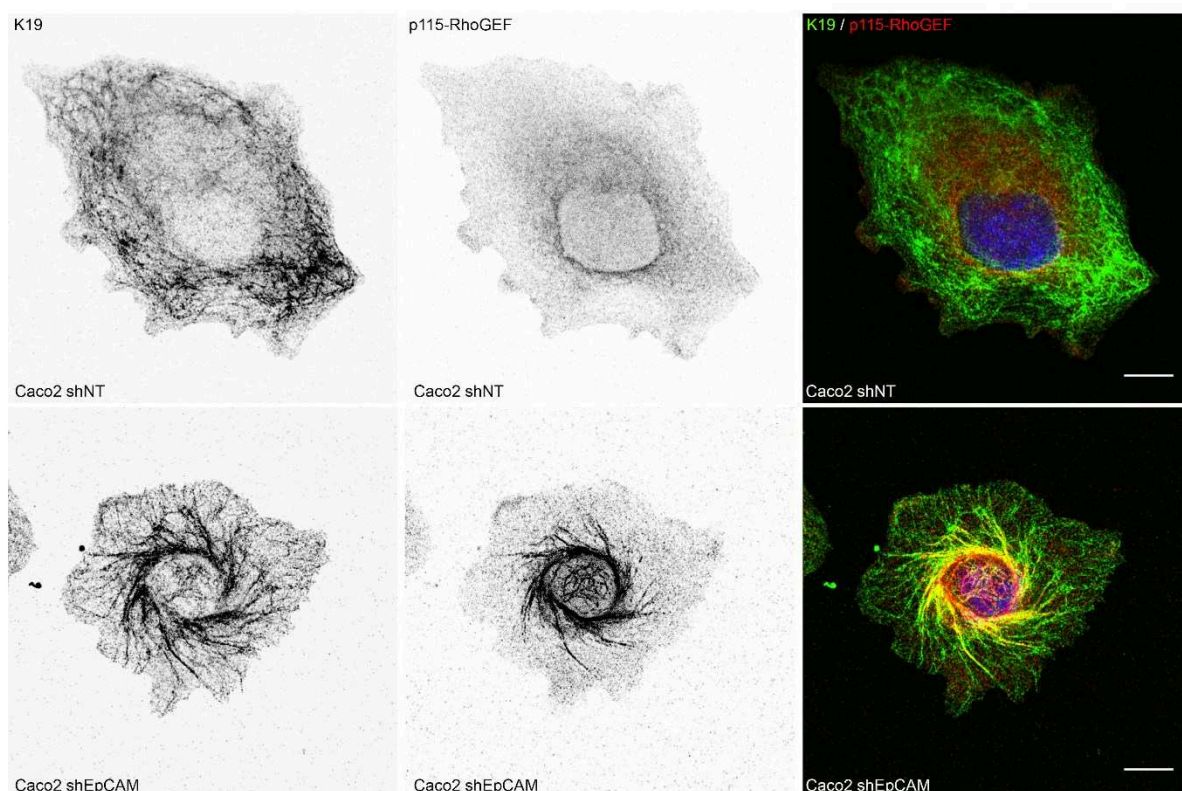


Figure 35 : Distribution de p115-RhoGEF et de la kératine-19 (K19) en cellule Caco2 contrôlée ou EpCAM-KO. P115-RhoGEF est relocalisé aux filaments intermédiaires en absence d’EpCAM. Barre d’échelle, 10 μ m.

2.5. Transport d’EpCAM et impact pour l’intégrité des épithéliums

EpCAM est présente à la surface cellulaire et participe au recyclage de RhoA, mais qu’en est-il de sa propre dynamique ? En effet, il n’existe pour l’instant aucune donnée concernant le trafic intracellulaire d’EpCAM, ni en monocouche ni en cellule unique. Cela nous fournirait des informations intéressantes par exemple sur la durée ou l’impact de son co-transport avec RhoA sur l’état d’activation de la GTPase.

D’autre part, l’utilisation du modèle simplifié de la cellule unique nous a permis de démontrer que l’action d’EpCAM sur le cytosquelette est indépendante des contacts cellulaires, mais le fait

qu'EpCAM participe au recyclage de RhoA doit être replacé dans le contexte de l'épithélium. La géométrie de l'épithélium intestinal crée un stress au niveau des jonctions cellulaires, auquel les cellules contrôles répondent en réorganisant leurs jonctions pour maintenir l'intégrité du tissu. Le fait que les cellules EpCAM-KO n'y parviennent pas suggère que l'action d'EpCAM sur la dynamique de RhoA pourrait être requise pour le remodelage des jonctions face à la géométrie du tissu intestinal. EpCAM pourrait, par exemple, constituer un signal de la tension présente dans la membrane plasmique et favoriser la dynamique de RhoA pour le renforcement des jonctions en cas de variation de tension dans l'épithélium.

Références

- Abe, K., and Takeichi, M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 13–19.
- Acharya, B.R., Nestor-Bergmann, A., Liang, X., Gupta, S., Duszyk, K., Gauquelin, E., Gomez, G.A., Budnar, S., Marcq, P., Jensen, O.E., et al. (2018). A Mechanosensitive RhoA Pathway that Protects Epithelia against Acute Tensile Stress. *Developmental Cell* *47*, 439-452.e6.
- Agarwal, P., and Zaidel-Bar, R. (2019). Principles of Actomyosin Regulation In Vivo. *Trends Cell Biol.* *29*, 150–163.
- Amano, M., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. (2000). Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp. Cell Res.* *261*, 44–51.
- Arnold, T.R., Stephenson, R.E., and Miller, A.L. (2017). Rho GTPases and Actomyosin: partners in regulating epithelial cell-cell junction structure and function. *Exp Cell Res* *358*, 20–30.
- Baeuerle, P.A., and Gires, O. (2007). EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* *96*, 417–423.
- Balzar, M., Bakker, H.A.M., Briaire-de-Bruijn, I.H., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., and Litvinov, S.V. (1998). Cytoplasmic Tail Regulates the Intercellular Adhesion Function of the Epithelial Cell Adhesion Molecule. *Mol Cell Biol* *18*, 4833–4843.
- Balzar, M., Winter, M.J., Boer, C.J. de, and Litvinov, S.V. (1999). The biology of the 17–1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* *77*, 699–712.
- Barac, A., Basile, J., Vázquez-Prado, J., Gao, Y., Zheng, Y., and Gutkind, J.S. (2004). Direct interaction of p21-activated kinase 4 with PDZ-RhoGEF, a G protein-linked Rho guanine exchange factor. *J. Biol. Chem.* *279*, 6182–6189.
- Bardet, P.-L., Guirao, B., Paoletti, C., Serman, F., Léopold, V., Bosveld, F., Goya, Y., Mirouse, V., Graner, F., and Bellaïche, Y. (2013). PTEN Controls Junction Lengthening and Stability during Cell Rearrangement in Epithelial Tissue. *Developmental Cell* *25*, 534–546.
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 19–33.
- Barnhart, E., Lee, K.-C., Allen, G.M., Theriot, J.A., and Mogilner, A. (2015). Balance between cell–substrate adhesion and myosin contraction determines the frequency of motility initiation in fish keratocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 5045–5050.
- Barriga, E.H., Franze, K., Charras, G., and Mayor, R. (2018). Tissue stiffening coordinates morphogenesis by triggering collective cell migration in vivo. *Nature* *554*, 523–527.
- Barth, A.I.M., Kim, H., and Riedel-Kruse, I.H. (2018). Regulation of epithelial migration by epithelial cell adhesion molecule requires its Claudin-7 interaction domain. *PLoS One* *13*.
- Baum, B., and Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol* *192*, 907–917.

Beach, J.R., Shao, L., Remmert, K., Li, D., Betzig, E., and Hammer, J.A. (2014). Nonmuscle myosin II isoforms coassemble in living cells. *Curr. Biol.* *24*, 1160–1166.

Begnaud, S., Chen, T., Delacour, D., Mège, R.-M., and Ladoux, B. (2016). Mechanics of epithelial tissues during gap closure. *Curr. Opin. Cell Biol.* *42*, 52–62.

Behrndt, M., Salbreux, G., Campinho, P., Hauschild, R., Oswald, F., Roensch, J., Grill, S.W., and Heisenberg, C.-P. (2012). Forces Driving Epithelial Spreading in Zebrafish Gastrulation. *Science* *338*, 257–260.

Benais-Pont, G., Punn, A., Flores-Maldonado, C., Eckert, J., Raposo, G., Fleming, T.P., Cereijido, M., Balda, M.S., and Matter, K. (2003). Identification of a tight junction–associated guanine nucleotide exchange factor that activates Rho and regulates paracellular permeability. *The Journal of Cell Biology* *160*, 729–740.

Benham-Pyle, B.W., Pruitt, B.L., and Nelson, W.J. (2015). Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and β -catenin activation to drive cell cycle entry. *Science* *348*, 1024–1027.

Beningo, K.A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J.V., and Wang, Y. (2001). Nascent Focal Adhesions Are Responsible for the Generation of Strong Propulsive Forces in Migrating Fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* *153*, 881–888.

Bertet, C., Sulak, L., and Lecuit, T. (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature* *429*, 667.

Bertocchi, C., Wang, Y., Ravasio, A., Hara, Y., Wu, Y., Sailov, T., Baird, M.A., Davidson, M.W., Zaidel-Bar, R., Toyama, Y., et al. (2017). Nanoscale architecture of cadherin-based cell adhesions. *Nat Cell Biol* *19*, 28–37.

Bilder, D., and Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* *403*, 676.

Bisi, S., Disanza, A., Malinverno, C., Frittoli, E., Palamidessi, A., and Scita, G. (2013). Membrane and actin dynamics interplay at lamellipodia leading edge. *Curr. Opin. Cell Biol.* *25*, 565–573.

Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiological Reviews* *94*, 235–263.

Block, J., Breitsprecher, D., Kühn, S., Winterhoff, M., Kage, F., Geffers, R., Duwe, P., Rohn, J.L., Baum, B., Brakebusch, C., et al. (2012). FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Curr. Biol.* *22*, 1005–1012.

Borghi, N., Sorokina, M., Shcherbakova, O.G., Weis, W.I., Pruitt, B.L., Nelson, W.J., and Dunn, A.R. (2012). E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell–cell contacts upon externally applied stretch. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 12568–12573.

Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* *129*, 865–877.

Bouchet, J., Del Río-Iñiguez, I., Lasserre, R., Agüera-Gonzalez, S., Cucho, C., Danckaert, A., McCaffrey, M.W., Di Bartolo, V., and Alcover, A. (2016). Rac1-Rab11-FIP3 regulatory hub coordinates vesicle traffic with actin remodeling and T-cell activation. *EMBO J.* *35*, 1160–1174.

- Braun, A.C., Hendrick, J., Eisler, S.A., Schmid, S., Hausser, A., and Olayioye, M.A. (2015). The Rho-specific GAP protein DLC3 coordinates endocytic membrane trafficking. *J. Cell. Sci.* *128*, 1386–1399.
- Brouns, M.R., Matheson, S.F., Hu, K.Q., Delalle, I., Caviness, V.S., Silver, J., Bronson, R.T., and Settleman, J. (2000). The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* *127*, 4891–4903.
- Brüser, L., and Bogdan, S. (2017). Adherens Junctions on the Move—Membrane Trafficking of E-Cadherin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *9*, a029140.
- Buckley, I.K., and Porter, K.R. (1967). Cytoplasmic fibrils in living cultured cells. A light and electron microscope study. *Protoplasma* *64*, 349–380.
- Buckley, C.D., Tan, J., Anderson, K.L., Hanein, D., Volkman, N., Weis, W.I., Nelson, W.J., and Dunn, A.R. (2014). The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science* *346*, 1254211.
- Budnar, S., Husain, K.B., Gomez, G.A., Naghibosadat, M., Varma, A., Verma, S., Hamilton, N.A., Morris, R.G., and Yap, A.S. (2019). Anillin Promotes Cell Contractility by Cyclic Resetting of RhoA Residence Kinetics. *Dev. Cell*.
- Burnette, D.T., Manley, S., Sengupta, P., Sougrat, R., Davidson, M.W., Kachar, B., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nat. Cell Biol.* *13*, 371–381.
- Burnette, D.T., Shao, L., Ott, C., Pasapera, A.M., Fischer, R.S., Baird, M.A., Loughian, C.D., Delanoë-Ayari, H., Paszek, M.J., Davidson, M.W., et al. (2014). A contractile and counterbalancing adhesion system controls the 3D shape of crawling cells. *J Cell Biol* *205*, 83–96.
- Burridge, K., and Wittchen, E.S. (2013). The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J Cell Biol* *200*, 9–19.
- Cai, Y., Rossier, O., Gauthier, N.C., Biais, N., Fardin, M.-A., Zhang, X., Miller, L.W., Ladoux, B., Cornish, V.W., and Sheetz, M.P. (2010). Cytoskeletal coherence requires myosin-IIA contractility. *J. Cell. Sci.* *123*, 413–423.
- Callow, M.G., Zozulya, S., Gishizky, M.L., Jallal, B., and Smeal, T. (2005). PAK4 mediates morphological changes through the regulation of GEF-H1. *Journal of Cell Science* *118*, 1861–1872.
- Cao, X., Kaneko, T., Li, J.S., Liu, A.-D., Voss, C., and Li, S.S.C. (2015). A phosphorylation switch controls the spatiotemporal activation of Rho GTPases in directional cell migration. *Nat Commun* *6*, 7721.
- Chanet, S., Miller, C.J., Vaishnav, E.D., Ermentrout, B., Davidson, L.A., and Martin, A.C. (2017). Actomyosin meshwork mechanosensing enables tissue shape to orient cell force. *Nat Commun* *8*, 15014.
- Chen, T., Saw, T.B., Mège, R.-M., and Ladoux, B. (2018). Mechanical forces in cell monolayers. *J Cell Sci* *131*, jcs218156.
- Chevallier, J., Koop, C., Srivastava, A., Petrie, R.J., Lamarche-Vane, N., and Presley, J.F. (2009). Rab35 regulates neurite outgrowth and cell shape. *FEBS Letters* *583*, 1096–1101.

Chew, T.L., Masaracchia, R.A., Goeckeler, Z.M., and Wysolmerski, R.B. (1998). Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK). *J. Muscle Res. Cell. Motil.* *19*, 839–854.

Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., and Horwitz, A.R. (2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1039–1050.

Choi, W., Acharya, B.R., Peyret, G., Fardin, M.-A., Mège, R.-M., Ladoux, B., Yap, A.S., Fanning, A.S., and Peifer, M. (2016). Remodeling the zonula adherens in response to tension and the role of afadin in this response. *J Cell Biol* *213*, 243–260.

Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* *133*, 1403–1415.

Chu, J., Pham, N.T., Olate, N., Kislitsyna, K., Day, M.-C., LeTourneau, P.A., Kots, A., Stewart, R.H., Laine, G.A., Cox, C.S., et al. (2013). Biphasic Regulation of Myosin Light Chain Phosphorylation by p21-activated Kinase Modulates Intestinal Smooth Muscle Contractility. *J Biol Chem* *288*, 1200–1213.

Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M.F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* *3*, 339–345.

Colombelli, J., Besser, A., Kress, H., Reynaud, E.G., Girard, P., Caussinus, E., Haselmann, U., Small, J.V., Schwarz, U.S., and Stelzer, E.H.K. (2009). Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *Journal of Cell Science* *122*, 1665–1679.

Craig, R., Smith, R., and Kendrick-Jones, J. (1983). Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules. *Nature* *302*, 436–439.

Crawley, S.W., Mooseker, M.S., and Tyska, M.J. (2014). Shaping the intestinal brush border. *J Cell Biol* *207*, 441–451.

Dambournet, D., Machicoane, M., Chesneau, L., Sachse, M., Rocancourt, M., El Marjou, A., Formstecher, E., Salomon, R., Goud, B., and Echard, A. (2011). Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nature Cell Biology* *13*, 981–988.

Dan, C., Kelly, A., Bernard, O., and Minden, A. (2001). Cytoskeletal Changes Regulated by the PAK4 Serine/Threonine Kinase Are Mediated by LIM Kinase 1 and Cofilin. *J. Biol. Chem.* *276*, 32115–32121.

Danik, S.B., Liu, F., Zhang, J., Suk, H.J., Morley, G.E., Fishman, G.I., and Gutstein, D.E. (2004). Modulation of Cardiac Gap Junction Expression and Arrhythmic Susceptibility. *Circ Res* *95*, 1035–1041.

Das, T., Safferling, K., Rausch, S., Grabe, N., Boehm, H., and Spatz, J.P. (2015). A molecular mechanotransduction pathway regulates collective migration of epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* *17*, 276–287.

Davis, M.A., Ireton, R.C., and Reynolds, A.B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* *163*, 525–534.

- Delacour, D., Salomon, J., Robine, S., and Louvard, D. (2016). Plasticity of the brush border - the yin and yang of intestinal homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *13*, 161–174.
- Desai, R., Sarpal, R., Ishiyama, N., Pellikka, M., Ikura, M., and Tepass, U. (2013). Monomeric α -catenin links cadherin to the actin cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* *15*, 261–273.
- Döbereiner, H.-G., Dubin-Thaler, B., Giannone, G., Xenias, H.S., and Sheetz, M.P. (2004). Dynamic phase transitions in cell spreading. *Phys. Rev. Lett.* *93*, 108105.
- Dubin-Thaler, B.J., Giannone, G., Döbereiner, H.-G., and Sheetz, M.P. (2004). Nanometer Analysis of Cell Spreading on Matrix-Coated Surfaces Reveals Two Distinct Cell States and STEPs. *Biophys J* *86*, 1794–1806.
- le Duc, Q., Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D., and de Rooij, J. (2010). Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *J Cell Biol* *189*, 1107–1115.
- Dulyaninova, N.G., Malashkevich, V.N., Almo, S.C., and Bresnick, A.R. (2005). Regulation of myosin-IIA assembly and Mts1 binding by heavy chain phosphorylation. *Biochemistry* *44*, 6867–6876.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* *474*, 179–183.
- Elbert, M., Cohen, D., and Müsch, A. (2006). PAR1b Promotes Cell–Cell Adhesion and Inhibits Dishevelled-mediated Transformation of Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Mol Biol Cell* *17*, 3345–3355.
- Elosegui-Artola, A., Oria, R., Chen, Y., Kosmalska, A., Pérez-González, C., Castro, N., Zhu, C., Trepats, X., and Roca-Cusachs, P. (2016). Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. *Nature Cell Biology* *18*, 540–548.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* *126*, 677–689.
- Evans, W.H., and Martin, P.E.M. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Molecular Membrane Biology* *19*, 121–136.
- Fan, Q., Cheng, J.-C., Qiu, X., Chang, H.-M., and Leung, P.C.K. (2015). EpCAM is up-regulated by EGF via ERK1/2 signaling and suppresses human epithelial ovarian cancer cell migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *457*, 256–261.
- Feng, Y., Ngu, H., Alford, S.K., Ward, M., Yin, F., and Longmore, G.D. (2013). α -actinin1 and 4 tyrosine phosphorylation is critical for stress fiber establishment, maintenance and focal adhesion maturation. *Exp. Cell Res.* *319*, 1124–1135.
- Feng, Y., LoGrasso, P.V., Defert, O., and Li, R. (2016). Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential. *J. Med. Chem.* *59*, 2269–2300.
- Franke, J.D., Montague, R.A., and Kiehart, D.P. (2005). Nonmuscle myosin II generates forces that transmit tension and drive contraction in multiple tissues during dorsal closure. *Curr. Biol.* *15*, 2208–2221.

Frémont, S., Hammich, H., Bai, J., Wioland, H., Klinkert, K., Rocancourt, M., Kikuti, C., Stroebel, D., Romet-Lemonne, G., Pylypenko, O., et al. (2017). Oxidation of F-actin controls the terminal steps of cytokinesis. *Nat Commun* 8, 14528.

Fritz, R.D., and Pertz, O. (2016). The dynamics of spatio-temporal Rho GTPase signaling: formation of signaling patterns. *F1000Res* 5.

Fujiwara, S., Ohashi, K., Mashiko, T., Kondo, H., and Mizuno, K. (2016). Interplay between Solo and keratin filaments is crucial for mechanical force-induced stress fiber reinforcement. *Mol Biol Cell* 27, 954–966.

Fujiwara, S., Matsui, T.S., Ohashi, K., Mizuno, K., and Deguchi, S. (2019). Keratin-binding ability of the N-terminal Solo domain of Solo is critical for its function in cellular mechanotransduction. *Genes Cells* 24, 390–402.

Fukata, M., Kuroda, S., Fujii, K., Nakamura, T., Shoji, I., Matsuura, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. (1997). Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J. Biol. Chem.* 272, 29579–29583.

Furuse, M., Izumi, Y., Oda, Y., Higashi, T., and Iwamoto, N. (2014). Molecular organization of tricellular tight junctions. *Tissue Barriers* 2, e28960.

Gaber, A., Kim, S.J., Kaake, R.M., Benčina, M., Krogan, N., Šali, A., Pavšič, M., and Lenarčič, B. (2018). EpCAM homo-oligomerization is not the basis for its role in cell-cell adhesion. *Sci Rep* 8.

Gaiser, M.R., Lämmermann, T., Feng, X., Igyarto, B.Z., Kaplan, D.H., Tessarollo, L., Germain, R.N., and Udey, M.C. (2012). Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E889-897.

Galic, M., Tsai, F.-C., Collins, S.R., Matis, M., Bandara, S., and Meyer, T. (2014). Dynamic recruitment of the curvature-sensitive protein ArhGAP44 to nanoscale membrane deformations limits exploratory filopodia initiation in neurons. *ELife* 3.

Gao, J., Yan, Q., Wang, J., Liu, S., and Yang, X. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 is mediated by AP1-dependent EpCAM expression in MCF-7 cells. *J. Cell. Physiol.* 230, 775–782.

Garcia, P.D., and Garcia, R. (2018). Determination of the Elastic Moduli of a Single Cell Cultured on a Rigid Support by Force Microscopy. *Biophys. J.* 114, 2923–2932.

Gateva, G., Tojkander, S., Koho, S., Carpen, O., and Lappalainen, P. (2014). Palladin promotes assembly of non-contractile dorsal stress fibers through VASP recruitment. *J Cell Sci* 127, 1887–1898.

Gauthier, N.C., Fardin, M.A., Roca-Cusachs, P., and Sheetz, M.P. (2011). Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14467–14472.

Geiger, B., Spatz, J.P., and Bershadsky, A.D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 21–33.

Giannone, G., Dubin-Thaler, B.J., Döbereiner, H.-G., Kieffer, N., Bresnick, A.R., and Sheetz, M.P. (2004). Periodic Lamellipodial Contractions Correlate with Rearward Actin Waves. *Cell* 116, 431–443.

- Goldenberg, D.M., Stein, R., and Sharkey, R.M. (2018). The emergence of trophoblast cell-surface antigen 2 (TROP-2) as a novel cancer target. *Oncotarget* 9, 28989–29006.
- Goulet, O., Kedinger, M., Brousse, N., Cuenod, B., Colomb, V., Patey, N., de Potter, S., Mougenot, J.F., Canioni, D., and Cerf-Bensussan, N. (1995). Intractable diarrhea of infancy with epithelial and basement membrane abnormalities. *J. Pediatr.* 127, 212–219.
- Goulet, O., Salomon, J., Ruemmele, F., de Serres, N.P.-M., and Brousse, N. (2007). Intestinal epithelial dysplasia (tufting enteropathy). *Orphanet J Rare Dis* 2, 20.
- Green, R.A., Paluch, E., and Oegema, K. (2012). Cytokinesis in Animal Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28, 29–58.
- Gudipaty, S.A., and Rosenblatt, J. (2017). Epithelial cell extrusion: Pathways and pathologies. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 67, 132–140.
- Guerra, E., Lattanzio, R., La Sorda, R., Dini, F., Tiboni, G.M., Piantelli, M., and Alberti, S. (2012). mTrop1/Epcam knockout mice develop congenital tufting enteropathy through dysregulation of intestinal E-cadherin/ β -catenin. *PLoS ONE* 7, e49302.
- Gupta, M., Doss, B., Lim, C.T., Voituriez, R., and Ladoux, B. (2016). Single cell rigidity sensing: A complex relationship between focal adhesion dynamics and large-scale actin cytoskeleton remodeling. *Cell Adh Migr* 10, 554–567.
- Hatte, G., Prigent, C., and Tassan, J.-P. (2018). Tight junctions negatively regulate mechanical forces applied to adherens junctions in vertebrate epithelial tissue. *J. Cell. Sci.* 131.
- Hayakawa, K., Sato, N., and Obinata, T. (2001). Dynamic reorientation of cultured cells and stress fibers under mechanical stress from periodic stretching. *Exp. Cell Res.* 268, 104–114.
- Heer, N.C., and Martin, A.C. (2017). Tension, contraction and tissue morphogenesis. *Development* 144, 4249–4260.
- Heer, N.C., Miller, P.W., Chanet, S., Stoop, N., Dunkel, J., and Martin, A.C. (2017). Actomyosin-based tissue folding requires a multicellular myosin gradient. *Development* 144, 1876–1886.
- Héraud, C., Pinault, M., Lagrée, V., and Moreau, V. (2019). p190RhoGAPs, the ARHGAP35- and ARHGAP5-Encoded Proteins, in Health and Disease. *Cells* 8.
- Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D., and Koprowski, H. (1979). Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *PNAS* 76, 1438–1442.
- Herreros-Pomares, A., Aguilar-Gallardo, C., Calabuig-Fariñas, S., Sirera, R., Jantus-Lewintre, E., and Camps, C. (2018). EpCAM duality becomes this molecule in a new Dr. Jekyll and Mr. Hyde tale. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 126, 52–63.
- Herrmann, H., and Aebi, U. (2016). Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.
- Higashi, T., and Miller, A.L. (2017). Tricellular junctions: how to build junctions at the TRICkiest points of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 28, 2023–2034.

Hirata, N., Takahashi, M., and Yazawa, M. (2009). Diphosphorylation of regulatory light chain of myosin IIA is responsible for proper cell spreading. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *381*, 682–687.

Hodge, R.G., and Ridley, A.J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *17*, 496–510.

Hoffman, L.M., Jensen, C.C., Chaturvedi, A., Yoshigi, M., and Beckerle, M.C. (2012). Stretch-induced actin remodeling requires targeting of zyxin to stress fibers and recruitment of actin regulators. *Mol. Biol. Cell* *23*, 1846–1859.

Hohmann, T., and Dehghani, F. (2019). The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells* *8*.

Holzapfel, G., Wehland, J., and Weber, K. (1983). Calcium control of actin-myosin based contraction in triton models of mouse 3T3 fibroblasts is mediated by the myosin light chain kinase (MLCK)-calmodulin complex. *Exp. Cell Res.* *148*, 117–126.

Hong, S., Troyanovsky, R.B., and Troyanovsky, S.M. (2013). Binding to F-actin guides cadherin cluster assembly, stability, and movement. *J Cell Biol* *201*, 131–143.

Hotulainen, P., and Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of Cell Biology* *173*, 383–394.

Humphries, J.D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M.J., and Ballestrem, C. (2007). Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* *179*, 1043–1057.

Iden, S., and Collard, J.G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *9*, 846–859.

Ikebe, M., Hartshorne, D.J., and Elzinga, M. (1986). Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.* *261*, 36–39.

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* *171*, 939–945.

Iskratsch, T., Yu, C.-H., Mathur, A., Liu, S., Stévenin, V., Dwyer, J., Hone, J., Ehler, E., and Sheetz, M. (2013). FHOD1 is needed for directed forces and adhesion maturation during cell spreading and migration. *Dev. Cell* *27*, 545–559.

Ito, S., Okuda, S., Abe, M., Fujimoto, M., Onuki, T., Nishimura, T., and Takeichi, M. (2017). Induced cortical tension restores functional junctions in adhesion-defective carcinoma cells. *Nat Commun* *8*, 1834.

Itoh, K., Ossipova, O., and Sokol, S.Y. (2014). GEF-H1 functions in apical constriction and cell intercalations and is essential for vertebrate neural tube closure. *J. Cell. Sci.* *127*, 2542–2553.

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

- Jalal, S., Shi, S., Acharya, V., Huang, R.Y.-J., Viasnoff, V., Bershadsky, A.D., and Tee, Y.H. (2019). Actin cytoskeleton self-organization in single epithelial cells and fibroblasts under isotropic confinement. *J. Cell. Sci.* *132*.
- Julian, L., and Olson, M.F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK). *Small GTPases* *5*.
- Kage, F., Winterhoff, M., Dimchev, V., Mueller, J., Thalheim, T., Freise, A., Brühmann, S., Kollasser, J., Block, J., Dimchev, G., et al. (2017). FMNL formins boost lamellipodial force generation. *Nat Commun* *8*, 14832.
- Kajiho, H., Kajiho, Y., and Scita, G. (2018). Harnessing membrane trafficking to promote cancer spreading and invasion: The case of RAB2A. *Small GTPases* *9*, 304–309.
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A.M., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Hess, H.F., and Waterman, C.M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* *468*, 580–584.
- Kassianidou, E., and Kumar, S. (2015). A biomechanical perspective on stress fiber structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* *1853*, 3065–3074.
- Kassianidou, E., Hughes, J.H., and Kumar, S. (2017a). Activation of ROCK and MLCK tunes regional stress fiber formation and mechanics via preferential myosin light chain phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* *28*, 3832–3843.
- Kassianidou, E., Brand, C.A., Schwarz, U.S., and Kumar, S. (2017b). Geometry and network connectivity govern the mechanics of stress fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, 2622–2627.
- Keller, T.C., Conzelman, K.A., Chasan, R., and Mooseker, M.S. (1985). Role of myosin in terminal web contraction in isolated intestinal epithelial brush borders. *J. Cell Biol.* *100*, 1647–1655.
- Klingner, C., Cherian, A.V., Fels, J., Diesinger, P.M., Aufschnaiter, R., Maghelli, N., Keil, T., Beck, G., Tolić-Nørrelykke, I.M., Bathe, M., et al. (2014). Isotropic actomyosin dynamics promote organization of the apical cell cortex in epithelial cells. *J. Cell Biol.* *207*, 107–121.
- Klinkert, K., and Echard, A. (2016). Rab35 GTPase: A Central Regulator of Phosphoinositides and F-actin in Endocytic Recycling and Beyond. *Traffic* *17*, 1063–1077.
- Kobayashi, H., and Fukuda, M. (2013). Rab35 establishes the EHD1-association site by coordinating two distinct effectors during neurite outgrowth. *J. Cell. Sci.* *126*, 2424–2435.
- Kobielak, A., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nature Cell Biology* *6*, 21.
- Kocgozlu, L., Saw, T.B., Le, A.P., Yow, I., Shagirov, M., Wong, E., Mège, R.-M., Lim, C.T., Toyama, Y., and Ladoux, B. (2016). Epithelial cell packing induces distinct modes of cell extrusions. *Curr Biol* *26*, 2942–2950.
- Koestler, S.A., Steffen, A., Nemethova, M., Winterhoff, M., Luo, N., Holleboom, J.M., Krupp, J., Jacob, S., Vinzenz, M., Schur, F., et al. (2013). Arp2/3 complex is essential for actin network treadmilling as well as for targeting of capping protein and cofilin. *Mol. Biol. Cell* *24*, 2861–2875.

- Kohno, T., Kikuchi, S., Ninomiya, T., and Kojima, T. (2017). The bicellular tensile force sorts the localization of LSRs in bicellular and tricellular junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1397, 185–194.
- Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B., and Echard, A. (2006). Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr. Biol.* 16, 1719–1725.
- Kovac, B., Teo, J.L., Mäkelä, T.P., and Vallenius, T. (2013). Assembly of non-contractile dorsal stress fibers requires α -actinin-1 and Rac1 in migrating and spreading cells. *J. Cell. Sci.* 126, 263–273.
- Kovacs, E.M., Goodwin, M., Ali, R.G., Paterson, A.D., and Yap, A.S. (2002). 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.
- Kovács, M., Wang, F., Hu, A., Zhang, Y., and Sellers, J.R. (2003). Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. *J. Biol. Chem.* 278, 38132–38140.
- Kowalczyk, A.P., and Green, K.J. (2013). Structure, Function and Regulation of Desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci* 116, 95–118.
- Kuan, I.-I., Liang, K.-H., Wang, Y.-P., Kuo, T.-W., Meir, Y.-J.J., Wu, S.C.-Y., Yang, S.-C., Lu, J., and Wu, H.-C. (2017). EpEX/EpCAM and Oct4 or Klf4 alone are sufficient to generate induced pluripotent stem cells through STAT3 and HIF2 α . *Sci Rep* 7, 41852.
- Kulakowski, G., Bousquet, H., Manneville, J.-B., Bassereau, P., Goud, B., and Oesterlin, L.K. (2018). Lipid packing defects and membrane charge control RAB GTPase recruitment. *Traffic* 19, 536–545.
- Kumar, R., Sanawar, R., Li, X., and Li, F. (2017). Structure, Biochemistry, and Biology of PAK Kinases. *Gene* 605, 20–31.
- Kuragano, M., Murakami, Y., and Takahashi, M. (2018). Nonmuscle myosin IIA and IIB differentially contribute to intrinsic and directed migration of human embryonic lung fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 498, 25–31.
- Kurniawan, N.A., Chaudhuri, P.K., and Lim, C.T. (2016). Mechanobiology of cell migration in the context of dynamic two-way cell–matrix interactions. *Journal of Biomechanics* 49, 1355–1368.
- Ladoux, B., Anon, E., Lambert, M., Rabodzey, A., Hersen, P., Buguin, A., Silberzan, P., and Mège, R.-M. (2010). Strength Dependence of Cadherin-Mediated Adhesions. *Biophys J* 98, 534–542.
- Ladoux, B., Nelson, W.J., Yan, J., and Mège, R.M. (2015). The mechanotransduction machinery at work at adherens junctions. *Integr Biol (Camb)* 7, 1109–1119.
- Ladwein, M., Pape, U.-F., Schmidt, D.-S., Schnölzer, M., Fiedler, S., Langbein, L., Franke, W.W., Moldenhauer, G., and Zöller, M. (2005). The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp. Cell Res.* 309, 345–357.
- Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell* 84, 359–369.
- Lawson, C.D., and Ridley, A.J. (2018). Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol* 217, 447–457.

- Lecuit, T., and Yap, A.S. (2015). E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics. *Nat. Cell Biol.* *17*, 533–539.
- Lecuit, T., Lenne, P.-F., and Munro, E. (2011). Force Generation, Transmission, and Integration during Cell and Tissue Morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *27*, 157–184.
- Lee, J.H., Zheng, Y., von Bornstadt, D., Wei, Y., Balcioglu, A., Daneshmand, A., Yalcin, N., Yu, E., Herisson, F., Atalay, Y.B., et al. (2014). Selective ROCK2 Inhibition In Focal Cerebral Ischemia. *Ann Clin Transl Neurol* *1*, 2–14.
- Lee, S., Kassianidou, E., and Kumar, S. (2018). Actomyosin stress fiber subtypes have unique viscoelastic properties and roles in tension generation. *Mol Biol Cell* *29*, 1992–2004.
- Leerberg, J.M., Gomez, G.A., Verma, S., Moussa, E.J., Wu, S.K., Priya, R., Hoffman, B.D., Grashoff, C., Schwartz, M.A., and Yap, A.S. (2014). Tension-Sensitive Actin Assembly Supports Contractility at the Epithelial Zonula Adherens. *Curr Biol* *24*, 1689–1699.
- Lei, Z., Maeda, T., Tamura, A., Nakamura, T., Yamazaki, Y., Shiratori, H., Yashiro, K., Tsukita, S., and Hamada, H. (2012). EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. *Developmental Biology* *371*, 136–145.
- Leung, T., Manser, E., Tan, L., and Lim, L. (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J. Biol. Chem.* *270*, 29051–29054.
- Leung, T., Chen, X.Q., Manser, E., and Lim, L. (1996). The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* *16*, 5313–5327.
- Ligtenberg, M.J.L., Kuiper, R.P., Chan, T.L., Goossens, M., Hebeda, K.M., Voorendt, M., Lee, T.Y.H., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Hendriks-Cornelissen, S.J.B., et al. (2009). Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat. Genet.* *41*, 112–117.
- Lisowska, J., Rödel, C.J., Manet, S., Miroshnikova, Y.A., Boyault, C., Planus, E., Mets, R.D., Lee, H.-H., Destaing, O., Mertani, H., et al. (2018). The CCM1–CCM2 complex controls complementary functions of ROCK1 and ROCK2 that are required for endothelial integrity. *J Cell Sci* *131*, jcs216093.
- Litvinov, S.V., Bakker, H.A.M., Velders, M.P., Fleuren, G.J., and Warnaar, S.O. (1994). Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* *125*, 437–446.
- Litvinov, S.V., Balzar, M., Winter, M.J., Bakker, H.A., Briaire-de Bruijn, I.H., Prins, F., Fleuren, G.J., and Warnaar, S.O. (1997). Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J. Cell Biol.* *139*, 1337–1348.
- Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., Lahrmann, U., Zhao, Q., Zheng, Y., Zhao, Y., et al. (2015). IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics* *31*, 3359–3361.
- Liu, Z., Tan, J.L., Cohen, D.M., Yang, M.T., Sniadecki, N.J., Ruiz, S.A., Nelson, C.M., and Chen, C.S. (2010). Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 9944–9949.

Loschke, F., Seltsmann, K., Bouameur, J.-E., and Magin, T.M. (2015). Regulation of keratin network organization. *Curr. Opin. Cell Biol.* *32*, 56–64.

Lu, T.-Y., Lu, R.-M., Liao, M.-Y., Yu, J., Chung, C.-H., Kao, C.-F., and Wu, H.-C. (2010). Epithelial Cell Adhesion Molecule Regulation Is Associated with the Maintenance of the Undifferentiated Phenotype of Human Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 8719–8732.

Lynch, H.T., Snyder, C.L., Shaw, T.G., Heinen, C.D., and Hitchins, M.P. (2015). Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 181–194.

Ma, X., Jana, S.S., Anne Conti, M., Kawamoto, S., Claycomb, W.C., and Adelstein, R.S. (2010). Ablation of Nonmuscle Myosin II-B and II-C Reveals a Role for Nonmuscle Myosin II in Cardiac Myocyte Karyokinesis. *Mol Biol Cell* *21*, 3952–3962.

Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G.L., Hahn, K.M., and Danuser, G. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* *461*, 99–103.

Machesky, L.M., and Hall, A. (1997). Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J. Cell Biol.* *138*, 913–926.

Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P.A., Munz, M., et al. (2009). Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nature Cell Biology* *11*, 162–171.

Maghzal, N., Vogt, E., Reintsch, W., Fraser, J.S., and Fagotto, F. (2010). The tumor-associated EpCAM regulates morphogenetic movements through intracellular signaling. *J. Cell Biol.* *191*, 645–659.

Maghzal, N., Kayali, H.A., Rohani, N., Kajava, A.V., and Fagotto, F. (2013). EpCAM Controls Actomyosin Contractility and Cell Adhesion by Direct Inhibition of PKC. *Developmental Cell* *27*, 263–277.

Mason, F.M., Xie, S., Vasquez, C.G., Tworoger, M., and Martin, A.C. (2016). RhoA GTPase inhibition organizes contraction during epithelial morphogenesis. *J. Cell Biol.* *214*, 603–617.

Masuda, S., Oda, Y., Sasaki, H., Ikenouchi, J., Higashi, T., Akashi, M., Nishi, E., and Furuse, M. (2011). LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J Cell Sci* *124*, 548–555.

Mateus, A.M., Gorfinkiel, N., Schamberg, S., and Martinez Arias, A. (2011). Endocytic and Recycling Endosomes Modulate Cell Shape Changes and Tissue Behaviour during Morphogenesis in *Drosophila*. *PLoS One* *6*.

McBeath, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K., and Chen, C.S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* *6*, 483–495.

Mège, R.M., and Ishiyama, N. (2017). Integration of Cadherin Adhesion and Cytoskeleton at Adherens Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *9*, a028738.

Meiri, D., Marshall, C.B., Greeve, M.A., Kim, B., Balan, M., Suarez, F., Bakal, C., Wu, C., Larose, J., Fine, N., et al. (2012). Mechanistic insight into the microtubule and actin cytoskeleton coupling through dynein-dependent RhoGEF inhibition. *Mol. Cell* *45*, 642–655.

- Mellman, I., and Yarden, Y. (2013). Endocytosis and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a016949.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M., and Philips, M.R. (2001). Differential Localization of Rho Gtpases in Live Cells. *J Cell Biol* 152, 111–126.
- Michel, D., Arsanto, J.-P., Massey-Harroche, D., Béclin, C., Wijnholds, J., and Le Bivic, A. (2005). PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J. Cell. Sci.* 118, 4049–4057.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761–772.
- Monier, B., Gettings, M., Gay, G., Mangeat, T., Schott, S., Guarner, A., and Suzanne, M. (2015). Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. *Nature* 518, 245–248.
- Mueller, J.L., McGeough, M.D., Peña, C.A., and Sivagnanam, M. (2014). Functional consequences of EpCam mutation in mice and men. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306, G278–G288.
- Munjal, A., and Lecuit, T. (2014). Actomyosin networks and tissue morphogenesis. *Development* 141, 1789–1793.
- Munjal, A., Philippe, J.-M., Munro, E., and Lecuit, T. (2015). A self-organized biomechanical network drives shape changes during tissue morphogenesis. *Nature* 524, 351–355.
- Munz, M., Fellingner, K., Hofmann, T., Schmitt, B., and Gires, O. (2008). Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM. *Front. Biosci.* 13, 5195–5201.
- Murrell, M.P., and Gardel, M.L. (2012). F-actin buckling coordinates contractility and severing in a biomimetic actomyosin cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 20820–20825.
- Nanes, B.A., Chiasson-MacKenzie, C., Lowery, A.M., Ishiyama, N., Faundez, V., Ikura, M., Vincent, P.A., and Kowalczyk, A.P. (2012). p120-catenin binding masks an endocytic signal conserved in classical cadherins. *J Cell Biol* 199, 365–380.
- Naslavsky, N., and Caplan, S. (2011). EHD proteins: Key conductors of endocytic transport. *Trends Cell Biol* 21, 122–131.
- Nguyen, T.T.T., Park, W.S., Park, B.O., Kim, C.Y., Oh, Y., Kim, J.M., Choi, H., Kyung, T., Kim, C.-H., Lee, G., et al. (2016). PLEKHG3 enhances polarized cell migration by activating actin filaments at the cell front. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 10091–10096.
- Nicholas, N.S., Pipili, A., Lesjak, M.S., and Wells, C.M. (2019). Differential role for PAK1 and PAK4 during the invadopodia lifecycle. *Small GTPases* 10, 289–295.
- Niediek, V., Born, S., Hampe, N., Kirchgeßner, N., Merkel, R., and Hoffmann, B. (2012). Cyclic stretch induces reorientation of cells in a Src family kinase- and p130Cas-dependent manner. *European Journal of Cell Biology* 91, 118–128.
- Nimnual, A.S., Taylor, L.J., and Bar-Sagi, D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* 5, 236–241.

Nishimura, T., and Kaibuchi, K. (2007). Numb Controls Integrin Endocytosis for Directional Cell Migration with aPKC and PAR-3. *Developmental Cell* 13, 15–28.

Nishimura, T., and Takeichi, M. (2008). Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling. *Development* 135, 1493–1502.

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.

Nübel, T., Preobraschenski, J., Tuncay, H., Weiss, T., Kuhn, S., Ladwein, M., Langbein, L., and Zöller, M. (2009). Claudin-7 Regulates EpCAM-Mediated Functions in Tumor Progression. *Mol Cancer Res* 7, 285–299.

Oakes, P.W., Beckham, Y., Stricker, J., and Gardel, M.L. (2012). Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template. *J Cell Biol* 196, 363–374.

Oakes, P.W., Wagner, E., Brand, C.A., Probst, D., Linke, M., Schwarz, U.S., Glotzer, M., and Gardel, M.L. (2017). Optogenetic control of RhoA reveals zyxin-mediated elasticity of stress fibres. *Nat Commun* 8.

Oda, Y., Otani, T., Ikenouchi, J., and Furuse, M. (2014). Tricellulin regulates junctional tension of epithelial cells at tricellular contacts through Cdc42. *J Cell Sci* 127, 4201–4212.

Oh, K.-S., Oh, B.K., Park, C.H., Seo, H.W., Kang, N.S., Lee, J.H., Lee, J.S., and Ho Lee, B. (2013). Cardiovascular effects of a novel selective Rho kinase inhibitor, 2-(1H-indazole-5-yl)amino-4-methoxy-6-piperazino triazine (DW1865). *Eur. J. Pharmacol.* 702, 218–226.

Owen, L.M., Adhikari, A.S., Patel, M., Grimmer, P., Leijnse, N., Kim, M.C., Notbohm, J., Franck, C., and Dunn, A.R. (2017). A cytoskeletal clutch mediates cellular force transmission in a soft, three-dimensional extracellular matrix. *Mol Biol Cell* 28, 1959–1974.

Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, A.S., and Gundersen, G.G. (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Biol.* 3, 723–729.

Pan, M., Schinke, H., Luxenburger, E., Kranz, G., Shakhtour, J., Libl, D., Huang, Y., Gaber, A., Pavšič, M., Lenarčič, B., et al. (2018). EpCAM ectodomain EpEX is a ligand of EGFR that counteracts EGF-mediated epithelial-mesenchymal transition through modulation of phospho-ERK1/2 in head and neck cancers. *PLoS Biol.* 16, e2006624.

Papusheva, E., and Heisenberg, C.-P. (2010). Spatial organization of adhesion: force-dependent regulation and function in tissue morphogenesis. *The EMBO Journal* 29, 2753–2768.

Pasapera, A.M., Plotnikov, S.V., Fischer, R.S., Case, L.B., Egelhoff, T.T., and Waterman, C.M. (2015). Rac1-dependent phosphorylation and focal adhesion recruitment of myosin IIA regulates migration and mechanosensing. *Curr Biol* 25, 175–186.

Patey, N., Scoazec, J., Cuenod-Jabri, B., Canioni, D., Kedinger, M., Goulet, O., and Brousse, N. (1997). Distribution of cell adhesion molecules in infants with intestinal epithelial dysplasia (tufting enteropathy). *Gastroenterology* 113, 833–843.

- Patriarca, C., Macchi, R.M., Marschner, A.K., and Mellstedt, H. (2012). Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: A short review. *Cancer Treatment Reviews* 38, 68–75.
- Paul, N.R., Jacquemet, G., and Caswell, P.T. (2015). Endocytic Trafficking of Integrins in Cell Migration. *Current Biology* 25, R1092–R1105.
- Pavšič, M., Gunčar, G., Djinović-Carugo, K., and Lenarčič, B. (2014). Crystal structure and its bearing towards an understanding of key biological functions of EpCAM. *Nature Communications* 5, 4764.
- Pegtel, D.M., Ellenbroek, S.I.J., Mertens, A.E.E., van der Kammen, R.A., de Rooij, J., and Collard, J.G. (2007). The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity. *Curr. Biol.* 17, 1623–1634.
- Peng, Y., Chen, Z., Chen, Y., Li, S., Jiang, Y., Yang, H., Wu, C., You, F., Zheng, C., Zhu, J., et al. (2019). ROCK isoforms differentially modulate cancer cell motility by mechanosensing the substrate stiffness. *Acta Biomaterialia* 88, 86–101.
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L., and Hahn, K.M. (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440, 1069.
- Peterson, L.J., Rajfur, Z., Maddox, A.S., Freel, C.D., Chen, Y., Edlund, M., Otey, C., and Burridge, K. (2004). Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo. *Mol. Biol. Cell* 15, 3497–3508.
- Piekny, A.J., and Glotzer, M. (2008). Anillin Is a Scaffold Protein That Links RhoA, Actin, and Myosin during Cytokinesis. *Current Biology* 18, 30–36.
- Pinheiro, D., and Bellaïche, Y. (2018). Mechanical Force-Driven Adherens Junction Remodeling and Epithelial Dynamics. *Dev. Cell* 47, 3–19.
- Pollard, T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol* 103, 2747–2754.
- Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S.L., Waterman-Storer, C.M., and Danuser, G. (2004). Two Distinct Actin Networks Drive the Protrusion of Migrating Cells. *Science* 305, 1782–1786.
- Prager-Khoutorsky, M., Lichtenstein, A., Krishnan, R., Rajendran, K., Mayo, A., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2011). Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nature Cell Biology* 13, 1457–1465.
- Priya, R., Gomez, G.A., Budnar, S., Verma, S., Cox, H.L., Hamilton, N.A., and Yap, A.S. (2015). Feedback regulation through myosin II confers robustness on RhoA signalling at E-cadherin junctions. *Nature Cell Biology* 17, 1282–1293.
- Priya, R., Liang, X., Teo, J.L., Duszyc, K., Yap, A.S., and Gomez, G.A. (2017). ROCK1 but not ROCK2 contributes to RhoA signaling and NMIIA-mediated contractility at the epithelial zonula adherens. *Mol Biol Cell* 28, 12–20.
- Qin, Y., Capaldo, C., Gumbiner, B.M., and Macara, I.G. (2005). The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *J Cell Biol* 171, 1061–1071.

Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* 265, 23–32.

Raleigh, D.R., Marchiando, A.M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M., and Turner, J.R. (2010). Tight Junction-associated MARVEL Proteins MarvelD3, Tricellulin, and Occludin Have Distinct but Overlapping Functions. *Mol Biol Cell* 21, 1200–1213.

Rape, A.D., Guo, W.-H., and Wang, Y.-L. (2011). The regulation of traction force in relation to cell shape and focal adhesions. *Biomaterials* 32, 2043–2051.

Ravasio, A., Cheddadi, I., Chen, T., Pereira, T., Ong, H.T., Bertocchi, C., Brugues, A., Jacinto, A., Kabla, A.J., Toyama, Y., et al. (2015). Gap geometry dictates epithelial closure efficiency. *Nat Commun* 6.

Reifen, R.M., Cutz, E., Griffiths, A.M., Ngan, B.Y., and Sherman, P.M. (1994). Tufting enteropathy: a newly recognized clinicopathological entity associated with refractory diarrhea in infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 18, 379–385.

Rhee, S., and Grinnell, F. (2006). P21-activated kinase 1: convergence point in PDGF- and LPA-stimulated collagen matrix contraction by human fibroblasts. *J Cell Biol* 172, 423–432.

Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* 302, 1704–1709.

Roca-Cusachs, P., del Rio, A., Puklin-Faucher, E., Gauthier, N.C., Biais, N., and Sheetz, M.P. (2013). Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by α -actinin triggers adhesion maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1361–E1370.

Rodriguez-Boulan, E., and Macara, I.G. (2014). Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 225–242.

Rodriguez-Diaz, A., Toyama, Y., Abravanel, D.L., Wiemann, J.M., Wells, A.R., Tulu, U.S., Edwards, G.S., and Kiehart, D.P. (2008). Actomyosin purse strings: renewable resources that make morphogenesis robust and resilient. *HFSP J* 2, 220–237.

Roeth, J.F., Sawyer, J.K., Wilner, D.A., and Peifer, M. (2009). Rab11 Helps Maintain Apical Crumbs and Adherens Junctions in the Drosophila Embryonic Ectoderm. *PLoS One* 4.

Roland, J.T., Bryant, D.M., Datta, A., Itzen, A., Mostov, K.E., and Goldenring, J.R. (2011). Rab GTPase-Myo5B complexes control membrane recycling and epithelial polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 2789–2794.

Rolo, A., Skoglund, P., and Keller, R. (2009). Morphogenetic movements driving neural tube closure in *Xenopus* require myosin IIB. *Dev Biol* 327, 327.

Rosenblatt, J., Raff, M.C., and Cramer, L.P. (2001). An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr. Biol.* 11, 1847–1857.

Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 167–180.

Salomon, J., Espinosa-Parrilla, Y., Goulet, O., Al-Qabandi, W., Guigue, P., Canioni, D., Bruneau, J., Alzahrani, F., Almuhsen, S., Cerf-Bensussan, N., et al. (2011). A founder effect at the EPCAM locus in Congenital Tufting Enteropathy in the Arabic Gulf. *Eur J Med Genet* 54, 319–322.

- Salomon, J., Goulet, O., Canioni, D., Brousse, N., Lemale, J., Tounian, P., Coulomb, A., Marinier, E., Hugot, J.-P., Ruemmele, F., et al. (2014). Genetic characterization of congenital tufting enteropathy: epcam associated phenotype and involvement of SPINT2 in the syndromic form. *Hum. Genet.* *133*, 299–310.
- Salomon, J., Gaston, C., Magescas, J., Duvauchelle, B., Canioni, D., Sengmanivong, L., Mayeux, A., Michaux, G., Campeotto, F., Lemale, J., et al. (2017). Contractile forces at tricellular contacts modulate epithelial organization and monolayer integrity. *Nat Commun* *8*.
- Sandí, M.-J., Marshall, C.B., Balan, M., Coyaud, É., Zhou, M., Monson, D.M., Ishiyama, N., Chandrakumar, A.A., La Rose, J., Couzens, A.L., et al. (2017). MARK3-mediated phosphorylation of ARHGEF2 couples microtubules to the actin cytoskeleton to establish cell polarity. *Sci Signal* *10*.
- Sato, K., Watanabe, T., Wang, S., Kakeno, M., Matsuzawa, K., Matsui, T., Yokoi, K., Murase, K., Sugiyama, I., Ozawa, M., et al. (2011). Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC. *Mol. Biol. Cell* *22*, 3103–3119.
- Schiller, H.B., Friedel, C.C., Boulegue, C., and Fässler, R. (2011). Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. *EMBO Rep* *12*, 259–266.
- Schnell, U., Cirulli, V., and Giepmans, B.N.G. (2013). EpCAM: Structure and function in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* *1828*, 1989–2001.
- Scholey, J.M., Taylor, K.A., and Kendrick-Jones, J. (1980). Regulation of non-muscle myosin assembly by calmodulin-dependent light chain kinase. *Nature* *287*, 233.
- Seddiki, R., Narayana, G.H.N.S., Strale, P.-O., Balcioglu, H.E., Peyret, G., Yao, M., Le, A.P., Teck Lim, C., Yan, J., Ladoux, B., et al. (2018). Force-dependent binding of vinculin to α -catenin regulates cell–cell contact stability and collective cell behavior. *Mol Biol Cell* *29*, 380–388.
- Senju, Y., and Miyata, H. (2009). The role of actomyosin contractility in the formation and dynamics of actin bundles during fibroblast spreading. *J. Biochem.* *145*, 137–150.
- Shemesh, T., Verkhovsky, A.B., Svitkina, T.M., Bershadsky, A.D., and Kozlov, M.M. (2009). Role of Focal Adhesions and Mechanical Stresses in the Formation and Progression of the Lamellum Interface. *Biophys J* *97*, 1254–1264.
- Shewan, A.M., Maddugoda, M., Kraemer, A., Stehbens, S.J., Verma, S., Kovacs, E.M., and Yap, A.S. (2005). Myosin 2 Is a Key Rho Kinase Target Necessary for the Local Concentration of E-Cadherin at Cell–Cell Contacts. *MBoC* *16*, 4531–4542.
- Shim, J., Lee, S.-M., Lee, M.S., Yoon, J., Kweon, H.-S., and Kim, Y.-J. (2010). Rab35 Mediates Transport of Cdc42 and Rac1 to the Plasma Membrane during Phagocytosis. *Mol Cell Biol* *30*, 1421–1433.
- Sivagnanam, M., Mueller, J.L., Lee, H., Chen, Z., Nelson, S.F., Turner, D., Zlotkin, S.H., Pencharz, P.B., Ngan, B.-Y., Libiger, O., et al. (2008). Identification of EpCAM as the gene for congenital tufting enteropathy. *Gastroenterology* *135*, 429–437.
- Slanchev, K., Carney, T.J., Stemmler, M.P., Koschorz, B., Amsterdam, A., Schwarz, H., and Hammerschmidt, M. (2009). The Epithelial Cell Adhesion Molecule EpCAM Is Required for Epithelial Morphogenesis and Integrity during Zebrafish Epiboly and Skin Development. *PLoS Genet* *5*.

Slattum, G., McGee, K.M., and Rosenblatt, J. (2009). P115 RhoGEF and microtubules decide the direction apoptotic cells extrude from an epithelium. *J Cell Biol* 186, 693–702.

Smith, M.A., Blankman, E., Gardel, M.L., Luettjohann, L., Waterman, C.M., and Beckerle, M.C. (2010). A Zyxin-Mediated Mechanism for Actin Stress Fiber Maintenance and Repair. *Dev Cell* 19, 365–376.

Soiné, J.R.D., Brand, C.A., Stricker, J., Oakes, P.W., Gardel, M.L., and Schwarz, U.S. (2015). Model-based Traction Force Microscopy Reveals Differential Tension in Cellular Actin Bundles. *PLoS Comput Biol* 11.

Song, S., Eckerle, S., Onichtchouk, D., Marrs, J.A., Nitschke, R., and Driever, W. (2013). Pou5f1-dependent EGF expression controls E-cadherin endocytosis, cell adhesion, and zebrafish epiboly movements. *Dev. Cell* 24, 486–501.

Spadaro, D., Le, S., Laroche, T., Mean, I., Jond, L., Yan, J., and Citi, S. (2017). Tension-Dependent Stretching Activates ZO-1 to Control the Junctional Localization of Its Interactors. *Current Biology* 27, 3783-3795.e8.

Staehelin, L.A., Mukherjee, T.M., and Williams, A.W. (1969). Freeze-etch appearance of the tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice. *Protoplasma* 67, 165–184.

Stahley, S.N., and Kowalczyk, A.P. (2015). Desmosomes in acquired disease. *Cell Tissue Res* 360, 439–456.

Staunton, J.R., Doss, B.L., Lindsay, S., and Ros, R. (2016). Correlating confocal microscopy and atomic force indentation reveals metastatic cancer cells stiffen during invasion into collagen I matrices. *Sci Rep* 6, 19686.

Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J., and Stradal, T.E.B. (2004). Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* 23, 749–759.

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 513–525.

Sun, Z., Guo, S.S., and Fässler, R. (2016). Integrin-mediated mechanotransduction. *J Cell Biol* 215, 445–456.

Swart-Mataraza, J.M., Li, Z., and Sacks, D.B. (2002). IQGAP1 is a component of Cdc42 signaling to the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 277, 24753–24763.

Tachibana, K., Nakanishi, H., Mandai, K., Ozaki, K., Ikeda, W., Yamamoto, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S., and Takai, Y. (2000). Two Cell Adhesion Molecules, Nectin and Cadherin, Interact through Their Cytoplasmic Domain–Associated Proteins. *J Cell Biol* 150, 1161–1176.

Takai, Y., and Nakanishi, H. (2003). Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *Journal of Cell Science* 116, 17–27.

Takeichi, M. (2014). Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 397–410.

Tanner, K., Boudreau, A., Bissell, M.J., and Kumar, S. (2010). Dissecting regional variations in stress fiber mechanics in living cells with laser nanosurgery. *Biophys. J.* 99, 2775–2783.

- Tee, Y.H., Shemesh, T., Thiagarajan, V., Hariadi, R.F., Anderson, K.L., Page, C., Volkmann, N., Hanein, D., Sivaramakrishnan, S., Kozlov, M.M., et al. (2015). Cellular chirality arising from the self-organization of the actin cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* *17*, 445–457.
- Teo, J.L., and Yap, A.S. (2016). Cycling Rho for tissue contraction. *J. Cell Biol.* *214*, 495–498.
- Thomas, W.A., Boscher, C., Chu, Y.-S., Cuvelier, D., Martinez-Rico, C., Seddiki, R., Heysch, J., Ladoux, B., Thiery, J.P., Mege, R.-M., et al. (2013). α -Catenin and Vinculin Cooperate to Promote High E-cadherin-based Adhesion Strength. *J Biol Chem* *288*, 4957–4969.
- Tojkander, S., Gateva, G., Schevzov, G., Hotulainen, P., Naumanen, P., Martin, C., Gunning, P.W., and Lappalainen, P. (2011). A Molecular Pathway for Myosin II Recruitment to Stress Fibers. *Current Biology* *21*, 539–550.
- Tojkander, S., Gateva, G., and Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci* *125*, 1855–1864.
- Tojkander, S., Gateva, G., Husain, A., Krishnan, R., and Lappalainen, P. (2015). Generation of contractile actomyosin bundles depends on mechanosensitive actin filament assembly and disassembly. *ELife* *4*.
- Trebak, M., Begg, G.E., Chong, J.M., Kanazireva, E.V., Herlyn, D., and Speicher, D.W. (2001). Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* *276*, 2299–2309.
- Trepat, X., Wasserman, M.R., Angelini, T.E., Millet, E., Weitz, D.A., Butler, J.P., and Fredberg, J.J. (2009). Physical forces during collective cell migration. *Nature Physics* *5*, 426–430.
- Trichet, L., Digabel, J.L., Hawkins, R.J., Vedula, S.R.K., Gupta, M., Ribault, C., Hersen, P., Voituriez, R., and Ladoux, B. (2012). Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness. *PNAS* *109*, 6933–6938.
- Truebestein, L., Elsner, D.J., Fuchs, E., and Leonard, T.A. (2015). A molecular ruler regulates cytoskeletal remodelling by the Rho kinases. *Nat Commun* *6*, 10029.
- Tsaktanis, T., Kremling, H., Pavšič, M., von Stackelberg, R., Mack, B., Fukumori, A., Steiner, H., Vielmuth, F., Spindler, V., Huang, Z., et al. (2015). Cleavage and Cell Adhesion Properties of Human Epithelial Cell Adhesion Molecule (HEPCAM). *J Biol Chem* *290*, 24574–24591.
- Tse, Y.C., Werner, M., Longhini, K.M., Labbe, J.-C., Goldstein, B., and Glotzer, M. (2012). RhoA activation during polarization and cytokinesis of the early *Caenorhabditis elegans* embryo is differentially dependent on NOP-1 and CYK-4. *Mol Biol Cell* *23*, 4020–4031.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., et al. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* *389*, 990–994.
- Ulrich, F., Krieg, M., Schötz, E.-M., Link, V., Castanon, I., Schnabel, V., Taubenberger, A., Mueller, D., Puech, P.-H., and Heisenberg, C.-P. (2005). Wnt11 functions in gastrulation by controlling cell cohesion through Rab5c and E-cadherin. *Dev. Cell* *9*, 555–564.
- Vallénus, T. (2013). Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. *Open Biol* *3*, 130001.

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.

Vassilev, V., Platek, A., Hiver, S., Enomoto, H., and Takeichi, M. (2017). Catenins Steer Cell Migration via Stabilization of Front-Rear Polarity. *Developmental Cell* *43*, 463-479.e5.

Verma, S., Shewan, A.M., Scott, J.A., Helwani, F.M., den Elzen, N.R., Miki, H., Takenawa, T., and Yap, A.S. (2004). Arp2/3 activity is necessary for efficient formation of E-cadherin adhesive contacts. *J. Biol. Chem.* *279*, 34062–34070.

Vestre, K., Kjos, I., Guadagno, N.A., Borg Distefano, M., Kohler, F., Fenaroli, F., Bakke, O., and Progidia, C. (2019). Rab6 regulates cell migration and invasion by recruiting Cdc42 and modulating its activity. *Cell. Mol. Life Sci.*

Vicente-Manzanares, M., and Horwitz, A.R. (2010). Myosin Light Chain Mono- and Di-Phosphorylation Differentially Regulate Adhesion and Polarity in Migrating Cells. *Biochem Biophys Res Commun* *402*, 537–542.

Vicente-Manzanares, M., and Horwitz, A.R. (2011). Adhesion dynamics at a glance. *J Cell Sci* *124*, 3923–3927.

Vicente-Manzanares, M., Koach, M.A., Whitmore, L., Lamers, M.L., and Horwitz, A.F. (2008). Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *J Cell Biol* *183*, 543–554.

Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *10*, 778–790.

Vicente-Manzanares, M., Newell-Litwa, K., Bachir, A.I., Whitmore, L.A., and Horwitz, A.R. (2011). Myosin IIA/IIB restrict adhesive and protrusive signaling to generate front–back polarity in migrating cells. *J Cell Biol* *193*, 381–396.

Wang, F., Kovacs, M., Hu, A., Limouze, J., Harvey, E.V., and Sellers, J.R. (2003). Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *J. Biol. Chem.* *278*, 27439–27448.

Wang, Q., Chen, X.-W., and Margolis, B. (2007). PALS1 Regulates E-Cadherin Trafficking in Mammalian Epithelial Cells. *Mol Biol Cell* *18*, 874–885.

Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E.D., and Takeichi, M. (1998). alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J. Cell Biol.* *142*, 847–857.

Watanabe, T., Hosoya, H., and Yonemura, S. (2007). Regulation of Myosin II Dynamics by Phosphorylation and Dephosphorylation of Its Light Chain in Epithelial Cells. *Mol Biol Cell* *18*, 605–616.

Watanabe, T., Wang, S., and Kaibuchi, K. (2015). IQGAPs as Key Regulators of Actin-cytoskeleton Dynamics. *Cell Struct. Funct.* *40*, 69–77.

Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* *6*, 154–161.

- Wells, C.M., Whale, A.D., Parsons, M., Masters, J.R.W., and Jones, G.E. (2010). PAK4: a pluripotent kinase that regulates prostate cancer cell adhesion. *J. Cell. Sci.* *123*, 1663–1673.
- Winder, S.J., and Ayscough, K.R. (2005). Actin-binding proteins. *Journal of Cell Science* *118*, 651–654.
- Winter, M.J., Nagelkerken, B., Mertens, A.E.E., Rees-Bakker, H.A.M., Briaire-de Bruijn, I.H., and Litvinov, S.V. (2003). Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Experimental Cell Research* *285*, 50–58.
- Winter, M.J., Cirulli, V., Briaire-de Bruijn, I.H., and Litvinov, S.V. (2007). Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase. *Mol. Cell. Biochem.* *302*, 19–26.
- Wojnacki, J., Quassollo, G., Marzolo, M.-P., and Cáceres, A. (2014). Rho GTPases at the crossroad of signaling networks in mammals: impact of Rho-GTPases on microtubule organization and dynamics. *Small GTPases* *5*, e28430.
- Wolfenson, H., Iskratsch, T., and Sheetz, M.P. (2014). Early Events in Cell Spreading as a Model for Quantitative Analysis of Biomechanical Events. *Biophys J* *107*, 2508–2514.
- Wood, W., Jacinto, A., Grose, R., Woolner, S., Gale, J., Wilson, C., and Martin, P. (2002). Wound healing recapitulates morphogenesis in *Drosophila* embryos. *Nat. Cell Biol.* *4*, 907–912.
- Wu, C., and Horowitz, A. (2011). Membrane traffic as a coordinator of cell migration and junction remodeling. *Commun Integr Biol* *4*, 703–705.
- Wu, C.-J., Mannan, P., Lu, M., and Udey, M.C. (2013). Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) Regulates Claudin Dynamics and Tight Junctions ♦. *J Biol Chem* *288*, 12253–12268.
- Xi, W., Sonam, S., Beng Saw, T., Ladoux, B., and Teck Lim, C. (2017). Emergent patterns of collective cell migration under tubular confinement. *Nat Commun* *8*, 1517.
- Yam, P.T., Wilson, C.A., Ji, L., Hebert, B., Barnhart, E.L., Dye, N.A., Wiseman, P.W., Danuser, G., and Theriot, J.A. (2007). Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *J. Cell Biol.* *178*, 1207–1221.
- Yamada, S., and Nelson, W.J. (2007). Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* *178*, 517–527.
- Yao, M., Qiu, W., Liu, R., Efremov, A.K., Cong, P., Seddiki, R., Payre, M., Lim, C.T., Ladoux, B., Mège, R.-M., et al. (2014). Force-dependent conformational switch of α -catenin controls vinculin binding. *Nature Communications* *5*, 4525.
- Yap, A.S., Duszyc, K., and Viasnoff, V. (2018). Mechanosensing and Mechanotransduction at Cell–Cell Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *10*, a028761.
- Yoneda, A., Multhaupt, H.A.B., and Couchman, J.R. (2005). The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. *J Cell Biol* *170*, 443–453.
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A., and Shibata, M. (2010). α -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nature Cell Biology* *12*, 533–542.

Yu, C., Law, J.B.K., Suryana, M., Low, H.Y., and Sheetz, M.P. (2011). Early integrin binding to Arg-Gly-Asp peptide activates actin polymerization and contractile movement that stimulates outward translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 20585–20590.

Yüce, Ö., Piekny, A., and Glotzer, M. (2005). An ECT2–centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J Cell Biol* *170*, 571–582.

Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z., and Geiger, B. (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *Journal of Cell Science* *116*, 4605–4613.

Zenke, F.T., Krendel, M., DerMardirossian, C., King, C.C., Bohl, B.P., and Bokoch, G.M. (2004). p21-activated Kinase 1 Phosphorylates and Regulates 14-3-3 Binding to GEF-H1, a Microtubule-localized Rho Exchange Factor. *J. Biol. Chem.* *279*, 18392–18400.

Zhang, B., Zhang, H., and Shen, G. (2015). Metastasis-associated protein 2 (MTA2) promotes the metastasis of non-small-cell lung cancer through the inhibition of the cell adhesion molecule Ep-CAM and E-cadherin. *Jpn. J. Clin. Oncol.* *45*, 755–766.

Zhang, H., Ghai, P., Wu, H., Wang, C., Field, J., and Zhou, G.-L. (2013). Mammalian Adenylyl Cyclase-associated Protein 1 (CAP1) Regulates Cofilin Function, the Actin Cytoskeleton, and Cell Adhesion. *J Biol Chem* *288*, 20966–20977.

Zhang, J., Fonovic, M., Suyama, K., Bogyo, M., and Scott, M.P. (2009). Rab35 controls actin bundling by recruiting fascin as an effector protein. *Science* *325*, 1250–1254.

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., et al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* *21*, 2747–2761.

Zihni, C., Munro, P.M.G., Elbediwy, A., Keep, N.H., Terry, S.J., Harris, J., Balda, M.S., and Matter, K. (2014). Dbl3 drives Cdc42 signaling at the apical margin to regulate junction position and apical differentiation. *J Cell Biol* *204*, 111–127.

Zihni, C., Mills, C., Matter, K., and Balda, M.S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 564–580.

Annexes

Annexe I

The CXCL12/CXCR4 signaling pathway in the control of human papillomavirus infection: new susceptibility factors in viral pathogenesis

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol* 2015 ; 25 : 2-23.
2. Foulongne V, Sauvage V, Hebert C, et al. Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. *PLoS One* 2012 ; 7 : e38499.
3. Bzhalava D, Muhr LS, Lagheden C, et al. Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin. *Sci Rep* 2014 ; 4 : 5807.
4. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 10516-21.
5. Leiding JW, Holland SM. Warts, et al. Human papillomavirus in primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2012 ; 130 : 1030-48.
6. Beussant Cohen S, Fenneteau O, Plouvier E, et al. Description and outcome of a cohort of 8 patients with WHIM syndrome from the French severe chronic neutropenia registry. *Orphanet J Rare Dis* 2012 ; 7 : 71.
7. Bachelerie F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, et al. International union of basic and clinical pharmacology [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2014 ; 66 : 1-79.
8. McDermott DH, Gao JL, Liu Q, et al. Chromothriptic cure of WHIM syndrome. *Cell* 2015 ; 160 : 686-99.
9. Meuris F, Gaudin F, Aknin ML, et al. Symptomatic improvement in human papillomavirus-induced epithelial neoplasia by specific targeting of the CXCR4 chemokine receptor. *J Invest Dermatol* 2016 ; 136 : 473-80.
10. Chow KY, Brotin E, Ben Khalifa Y, et al. A pivotal role for CXCL12 signaling in HPV-mediated transformation of keratinocytes: clues to understanding HPV-pathogenesis in WHIM syndrome. *Cell Host Microbe* 2010 ; 8 : 523-33.
11. Brotin E, Carthagna L, Chow KYC et al. La chimiokine CXCL12 et le papillomavirus humain. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 341-3.
12. Meuris F, Carthagna L, Jaracz-Ros A, et al. The CXCL12/CXCR4 signaling pathway: a new susceptibility factor in human papillomavirus pathogenesis. *PLoS Pathog* 2016 ; 12 : e1006039.

NOUVELLE

La dysplasie épithéliale intestinale, ou quand l'intestin est sous « deux de tension » cellulaire

Cécile Gaston¹, Julie Salomon^{1,2}, Olivier Goulet², Delphine Delacour¹

L'épithélium intestinal, une monocouche épithéliale polarisée dynamique

Une monocouche épithéliale est sujette au remodelage lors du développement ou d'événements de réparation tissulaire ; un renouvellement cellulaire, des réarrangements ainsi que des phénomènes d'extrusion adviennent constamment pour maintenir l'homéostasie de cette monocouche. Un épithélium doit donc stabiliser son organisation et s'adapter de façon globale, pour maintenir son état polarisé et cohésif. L'épithélium intestinal constitue un très bon modèle pour étudier différentes questions d'organisation tissulaire et cellulaire. La monocouche de cellules épithéliales qui tapisse l'intestin grêle présente une architecture simple et régulière, où les cellules prolifératives

et les cellules différenciées sont distribuées dans des compartiments tissulaires différents : respectivement, les « cryptes » et les « villosités ». Tandis que les entérocytes évoluent le long de la villosité, les cellules suivent un processus d'organisation spécifique, appelé différenciation terminale, avec la formation d'une structure fonctionnelle au cortex apical, la bordure en brosse des microvillosités ; celle-ci expose les enzymes intestinales, augmente la surface membranaire au pôle apical et potentialise ainsi l'absorption de nutriments à l'interface entre la lumière de l'intestin et l'épithélium [1, 2].

EpCAM, un acteur clé dans le maintien de la monocouche épithéliale intestinale

Les entéropathies congénitales présentent des perturbations de l'organi-

¹ Adhérence cellulaire et mécanique, Institut Jacques Monod, CNRS UMR7592, Université Paris Diderot, 15, rue Hélène Brion, 75013 Paris, France.

² Département de gastroentérologie pédiatrique et nutrition, Hôpital Necker-Enfants Malades, Sorbonne Paris Cité, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris, France. delphine.delacour@ijm.fr

sation de l'épithélium intestinal le long de l'axe crypto-villositaire et sont, pour la plupart, responsables d'insuffisance intestinale. Deux d'entre elles sont particulièrement sévères : l'atrophie microvillositaire (AMV) et la dysplasie épithéliale intestinale (DEI en français, CTE pour *congenital tufting enteropathy*, en anglais) [3].

La DEI a été décrite pour la première fois en 1994 [4] et plus en détail en 1995 [5]. Cette entéropathie est moins fréquente que l'AMV, avec une incidence estimée à 1/200 000 en Europe. La DEI est histologiquement définie par un épithélium dysplasique caractéristique, prenant de façon hétérogène un aspect pseudostratifié où les entérocytes s'accumulent sous forme de houppettes ou « tufts » [6], qui touchent jusqu'à 70 % des villosités à un stade avancé [6].

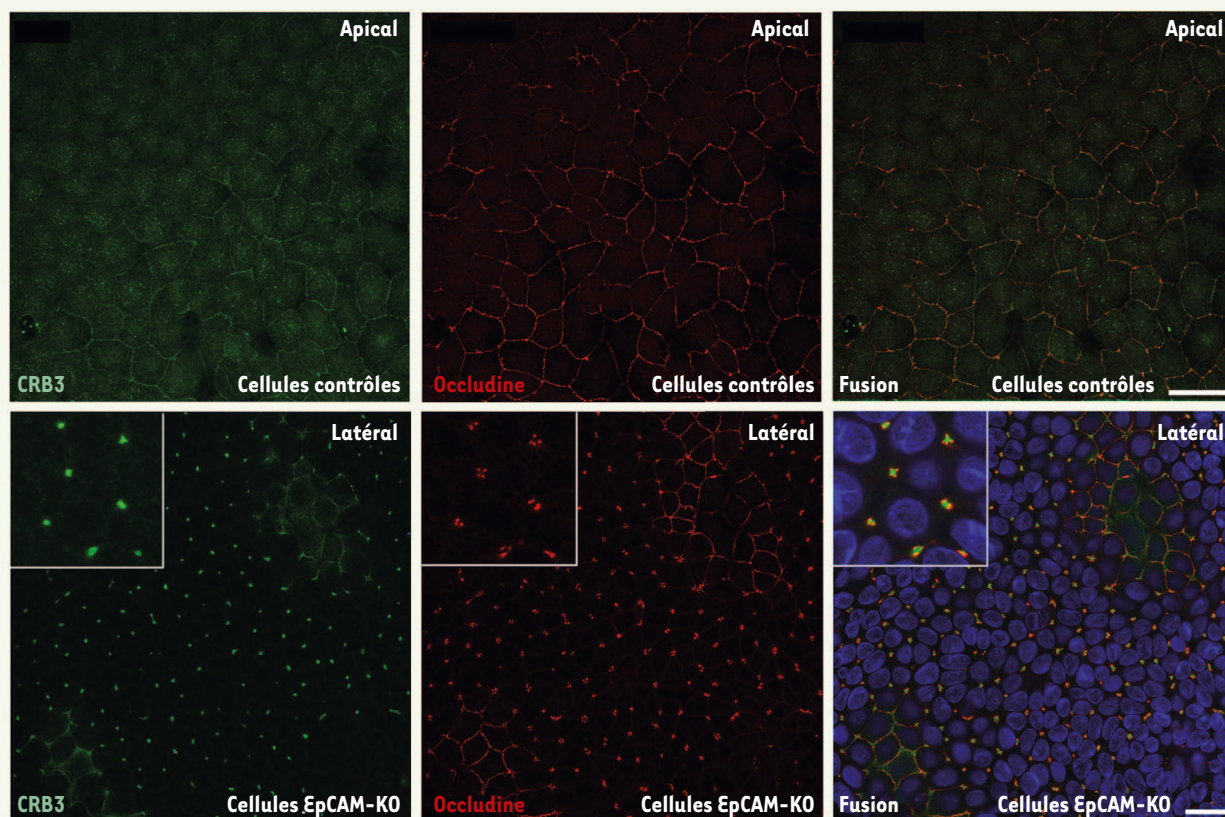


Figure 1. Distribution de *Crb3* (*Crumbs protein homolog 3*, protéine de polarité apicale, en vert) et de l'*occludine* (protéine des jonctions serrées, en rouge) dans les cellules contrôles ou n'exprimant plus *EpCAM* (*EpCAM-KO*). Sont présentés les plans focaux dans lesquels les deux protéines sont majoritairement distribuées, côté apical dans les cellules contrôles ou côté latéral dans les cellules *EpCAM-KO*. Les noyaux ont été colorés par du Hoechst 33342 et apparaissent en bleu (microscopie confocale, barre d'échelle : 10 μ m). *EpCAM* : *epithelial cell adhesion molecule* ; *KO* : *knock-out*.

La preuve directe de la participation d'*EpCAM* (*epithelial cell adhesion molecule*) dans le maintien de la monocouche épithéliale intestinale a été fournie par une récente étude clinique où des mutations faux-sens ou non-sens du gène *EPCAM*, conduisant respectivement à la perte d'expression ou à des formes tronquées de la protéine, ont été corrélées au développement de la DEI chez 73 % des patients [7]. *EpCAM* est une protéine spécifiquement exprimée dans les épithéliums monostratifiés [8]. Des défauts de son expression perturbent l'homéostasie des tissus épithéliaux ; elle est par ailleurs surexprimée dans de nombreux carcinomes, et représente un

marqueur pour la détection et le suivi des tumeurs épithéliales [9, 10].

EpCAM a été initialement décrite comme une molécule d'adhésion cellulaire [8], mais, malgré un rôle évident dans le maintien de l'intégrité épithéliale, ses mécanismes d'action précis dans les cellules épithéliales ont été peu décrits.

EpCAM préserve l'organisation apico-basale des entérocytes

Un travail récent, réalisé dans notre laboratoire, a apporté de nouvelles informations sur le rôle d'*EpCAM* dans l'épithélium intestinal [11] (→). Les analyses de biopsies duodénales de patients atteints

de DEI, exprimant une protéine *EpCAM* mutée, ont révélé une désorganisation des entérocytes : la perte d'une protéine *EpCAM* normale engendre en effet un affaiblissement de l'adhérence cellule-cellule, un défaut de polarisation et une perte de la bordure en brosse ; les éléments structuraux de la bordure en brosse tels que la villine et l'ezrine sont spécifiquement délocalisés le long des membranes latérales.

Afin d'affiner l'étude des fonctions d'*EpCAM* dans l'entérocyte humain, nous avons généré, par une approche d'interférence par l'ARN, des clones de cellules de la lignée intestinale humaine Caco-2 dans lesquels l'expression d'*EpCAM* est stablement réprimée (cellules *EpCAM-*

(→) Voir la Nouvelle d'O. Gires, m/s n° 5, mai 2009, page 449

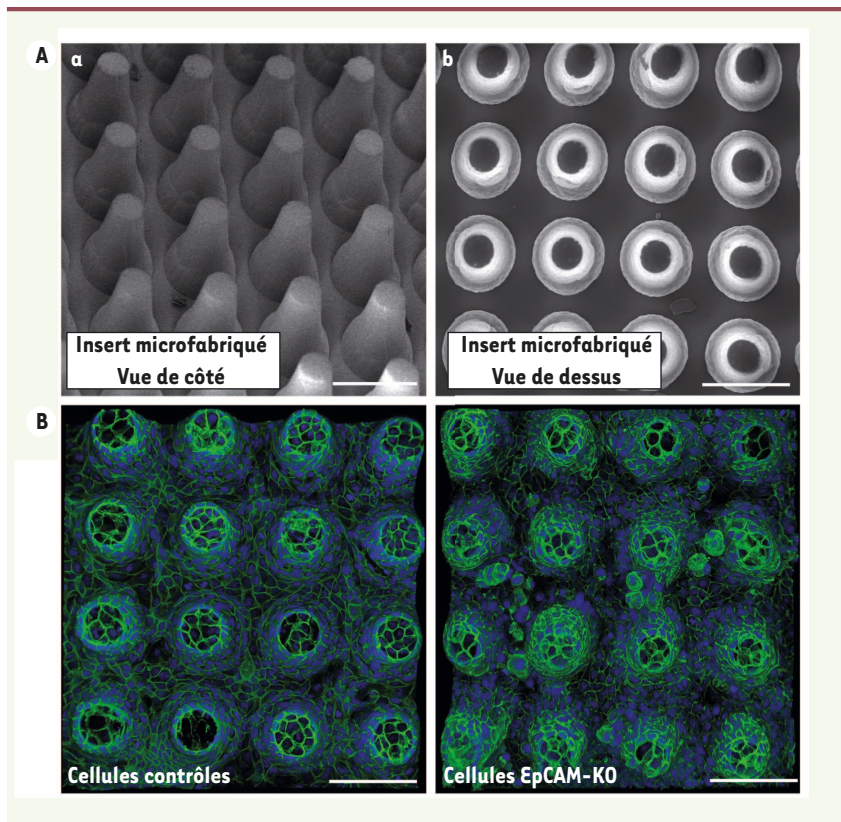


Figure 2. Substrats en 3-dimensions (3D) dans des inserts en polydiméthylsiloxane (PDMS) imitant les villosités. **A.** Analyse en microscopie électronique à balayage. Sont présentées des vues de côté (a) ou de dessus (b). Barre d'échelle, 100 μ m. **B.** Analyse en microscopie confocale de l'intégrité de la couche épithéliale intestinale constituée par les cellules contrôles ou n'exprimant plus EpCAM (EpCAM-KO) lorsqu'elles sont cultivées sur un substrat de PDMS en 3D, à géométrie semblable aux villosités. Les cellules ont été immuno-marquées pour détecter la E-cadhérine (en vert) et les noyaux ont été révélés par du Hoechst 33342 (en bleu) (barre d'échelle : 100 μ m).

Knock-Out ou « EpCAM-KO »). Outre les défauts cellulaires déjà observés sur les biopsies de patients atteints de DEI, une modification de la morphologie des jonctions serrées est visible dans les cellules EpCAM-KO : ces cellules présentent des jonctions serrées déformées aux contacts tricellulaires. Au lieu de maintenir la cohésion du pôle apical, elles s'étirent vers le pôle basal, formant un « puits de jonction » dans lequel des composants du domaine apical s'accumulent et engendrent ainsi la formation de domaines apicaux ectopiques (Figure 1). Cette étude démontre que l'intégrité de la bordure en brosse, la localisation des hydrolases intestinales associées, et donc la différenciation terminale des entéro-

cytes, sont bouleversées en l'absence d'EpCAM, ce qui permet d'expliquer, au moins en partie, l'incapacité d'absorption des nutriments rencontrée par les patients atteints de DEI. De plus, la déformation des jonctions serrées et la fragilisation des jonctions cellule-cellule contribuent très probablement aux diarrhées chroniques persistantes au repos digestif que connaissent les patients [11].

L'absence d'EpCAM modifie l'intensité et la répartition des forces de tension dans l'épithélium intestinal

Nous avons émis l'hypothèse que la protéine EpCAM participerait au maintien des forces contractiles générées par le réseau d'actomyosine et exercées aux

jonctions cellule-cellule. Décrit initialement dans le muscle strié, le réseau d'actomyosine est formé par l'association de fibres d'actine avec la protéine motrice myosine-II. La myosine-II activée peut se déplacer entre les fibres d'actine, faire glisser ces fibres les unes par rapport aux autres, et ainsi générer un phénomène de contraction du cytosquelette. Dans les cellules épithéliales, l'actomyosine est nécessaire pour stabiliser leur forme cylindrique [12].

Dans des cellules contrôles, le réseau d'actomyosine est majoritairement localisé de façon homogène à la face interne des membranes cellulaires au cortex apical. En l'absence d'EpCAM, il se redistribue le long des contacts tricellulaires. De plus, l'activation de la myosine-II diminue au sein des entérocytes contenant des molécules EpCAM mutées ; l'activité résiduelle se concentre alors néanmoins de façon aberrante au niveau des contacts tricellulaires. Cet accroissement local de la contractilité cellulaire génère des forces de tension ectopiques aux contacts tricellulaires, orientées vers l'intérieur de la monocouche.

Le traitement des cellules n'exprimant pas EpCAM par la blebbistatine, une molécule capable d'inhiber l'activité de la myosine-II, permet de contrecarrer les forces contractiles anormalement distribuées, et de relocaliser la bordure en brosse et ses composants à la face luminale, démontrant l'origine biomécanique des défauts causés par la perte d'EpCAM [11].

La géométrie du tissu intestinal influence la répartition des forces de tension

Bien que l'étude des cellules EpCAM-KO nous ait permis de caractériser le mécanisme responsable des défauts cellulaires, la présence de lésions tissulaires, caractéristiques de l'entéropathie DEI, n'a pu être observée sur les cellules cultivées en monocouche.

Les études *in vivo* sur des modèles animaux sont très restreintes dans le cas de cette pathologie : les modèles murins



disponibles, dans lesquels le gène *EPCAM* a été invalidé, conduisent très rapidement à la mort des animaux et ne permettent pas, par conséquent, d'analyses approfondies. En 2009, le travail d'Hans Clevers a cependant révolutionné le champ de recherche en gastroentérologie avec la génération de cultures primaires sous la forme d'organoides intestinaux *in vitro* [13]. Toutefois, cette technique présente un désavantage intrinsèque majeur pour l'étude de la dysplasie épithéliale intestinale : les organoïdes intestinaux ne forment pas de villosités et le comportement des entérocytes le long de la villosité ne peut être étudié.

Les techniques de microfabrication permettent de générer des surfaces structurées de petite échelle qui peuvent être utilisées comme des substrats modèles, de géométrie et de composition contrôlées. De telles approches sont appliquées pour générer des environnements de culture en 3-dimensions (3D) et pour réaliser des études en conditions physiologiques. Nous avons mis en place un tel système de culture 3D, qui fait appel à des techniques alliant la microfabrication et la matière molle. Des moules maîtres de silice sont produits par photolithographie, dans lesquels des inserts en polydiméthylsiloxane (PDMS) sont ensuite polymérisés, constituant ainsi les substrats 3D sur lesquels les entérocytes sont directement cultivés (Figure 2A) [11].

Les cellules Caco2, cultivées sur ces substrats villositaires en 3D, acquièrent une géométrie semblable aux villosités des entérocytes. Elles se polarisent et se différencient en formant une bordure en brosse similaire à celle qui est formée dans l'intestin natif. Les cellules *EpCAM-KO*, lorsqu'elles sont cultivées dans ces conditions, forment des points focaux d'empilements multicellulaires qui miment les lésions épithéliales

caractéristiques de la muqueuse altérée observées dans la DEI (Figure 2B). Ces lésions sont éliminées lorsque les cellules *EpCAM-KO* sont traitées avec la blebbistatine. Les lésions tissulaires présentes chez les patients souffrant de dysplasie épithéliale intestinale ont donc pour origine le défaut de répartition des forces de tension, comme observé sur les cultures en monocouche. Ces défauts cellulaires sont exacerbés par la géométrie du tissu intestinal.

Conclusion et perspectives

Les retombées de ce travail sont multiples, tant dans le domaine de la biologie fondamentale que dans le domaine médical. L'ensemble de ces résultats plaide en faveur d'une participation de la protéine *EpCAM* à l'adaptation des cellules aux propriétés géométriques du substrat et à la régulation de l'intégrité de la couche épithéliale intestinale. Ces données suggèrent que les signaux topographiques émanant du microenvironnement tissulaire pourraient être traduits et influencer l'organisation épithéliale.

Ces résultats font, en outre, progresser la compréhension des signes cliniques caractéristiques de la dysplasie épithéliale intestinale. Ils sont ainsi très encourageants pour le développement de traitements fondés sur la modulation de l'activité contractile de l'entérocyte pour ces patients exprimant une protéine *EpCAM* mutée. ♦

The congenital tufting enteropathy, or when the intestine is under low cellular tension

REMERCIEMENTS

Nous remercions Tess Berthier (Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot) pour la préparation d'inserts de culture 3D en PDMS, et Virginie Bazin pour la préparation d'échantillons en microscopie électronique à balayage (Service de microscopie électronique, institut de biologie - Paris

Seine, IBPS). Ce travail est soutenu par « Initiatives d'excellence » (Idex ANR-11-IDEX-0005-02) - Labex « Who Am I ? » (ANR-11-LABX-0071), et par la Fondation Groupama (Prix de recherche sur les Maladies Rares 2017).

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Crawley SW, Shifrin DA Jr, Grega-Larson NE, et al. Intestinal brush border assembly driven by protocadherin-based intermicrovillar adhesion. *Cell* 2014 ; 157 : 433-46.
2. Delacour D, Salomon J, Robine S, Louvard D. Plasticity of the brush border: the yin and yang of intestinal homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016 ; 13 : 161-74.
3. Goulet O, Salomon J, Ruemmele F, et al. Intestinal epithelial dysplasia (tufting enteropathy). *Orphanet J Rare Dis* 2007 ; 2 : 20.
4. Reifen RM, Cutz E, Griffiths AM, et al. Tufting enteropathy: a newly recognized clinicopathological entity associated with refractory diarrhea in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994 ; 18 : 379-85.
5. Goulet O, Keding M, Brousse N, et al. Intractable diarrhea of infancy with epithelial and basement membrane abnormalities. *J Pediatr* 1995 ; 127 : 212-9.
6. Patey N, Scoazec JY, Cuenod-Jabri B, et al. Distribution of cell adhesion molecules in infants with intestinal epithelial dysplasia (tufting enteropathy). *Gastroenterology* 1997 ; 113 : 833-43.
7. Salomon J, Goulet O, Canioni D, et al. Genetic characterization of congenital tufting enteropathy: *epcam* associated phenotype and involvement of SPINT2 in the syndromic form. *Hum Genet* 2014 ; 133 : 299-310.
8. Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (*Ep-CAM*). *J Mol Med* 1999 ; 77 : 699-712.
9. Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Mellstedt H. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat Rev* 2012 ; 38 : 68-75.
10. Salomon J, Gaston C, Magescas J, et al. Contractile forces at tricellular contacts modulate epithelial organization and monolayer integrity. *Nat Commun* 2017 ; 8 : 13998.
11. Gires O. *EpCAM*, une protéine versatile impliquée dans l'oncogenèse. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 449-50.
12. Lecuit T, Yap AS. E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics. *Nat Cell Biol* 2015 ; 17 : 533-9.
13. Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* 2013 ; 340 : 1190-4.



Tarifs d'abonnement m/s - 2017

**Abonnez-vous
à médecine/sciences**

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès
des sciences biologiques et médicales

**Bulletin d'abonnement
page 806 dans ce numéro de m/s**

