

Aspects moléculaires de l'adhérence cellulaire cadhérine-dépendante : les premiers moments de l'interaction

par Émilie Perret, Olivier Courjean, Sylvain Vigier & Hélène Feracci

CNRS UMRI44, Institut Curie, Morphogenèse cellulaire et progression tumorale, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05. E-mail : Helene.Feracci@curie.fr

Reçu le 21 septembre 2004

RÉSUMÉ

Les cadhérines représentent une des principales familles de molécules d'adhérence cellulaire et jouent un rôle crucial dans la mise en place des tissus au stade embryonnaire et dans leur cohésion à l'âge adulte. Ces glycoprotéines réalisent des interactions de type homophile dépendantes du calcium. Ces dernières années, différentes approches expérimentales ont été utilisées pour résoudre les bases moléculaires de ces interactions. Les données de la littérature sont relativement confuses en ce qui concerne le mode d'inter-

action de ces molécules. Différents modèles ont été proposés, et le mécanisme d'adhérence est encore soumis à controverses. De récentes approches biophysiques conjuguées aux techniques classiques de biologie nous permettront de progresser vers une meilleure compréhension du mécanisme par lequel les cadhérines régulent l'adhérence cellulaire. La prise en compte des propriétés cinétiques de ces interactions au niveau unimoléculaire apporte ainsi un éclairage nouveau sur ces régulations moléculaires.

SUMMARY Molecular aspects of cadherin-mediated cell adhesion: the first moments of the interaction

Cadherins play a major role in the development and maintenance of all solid tissues. These transmembrane glycoproteins are responsible for calcium-dependent homophilic cell interactions. Recently, many different experimental approaches have been used to untangle the molecular basis of cadherin-mediated adherence. Various models have been suggested, particularly from high-resolution structures. Whilst the adherence mechanism is still under contro-

versy, it is widely accepted that the specificity of the adherent interaction is localized to the N-terminal domain. New biophysical techniques together with biological approaches will allow a better understanding of how cadherins regulate cell-cell adherence. Integrating kinetics properties of cadherin interaction at the single molecule level has led to a greater understanding of cadherin molecular regulations.

INTRODUCTION

L'adhérence cellulaire gouverne la morphogenèse et l'intégrité des tissus biologiques, ainsi que la communication entre les cellules et leur environnement. Ces mécanismes font intervenir des complexes multimoléculaires, composés en particulier de trois types d'éléments fonctionnels : les molécules d'adhérence, les protéines de la matrice extracellulaire et les protéines d'ancrage intracellulaire. Les molécules d'adhérence, présentes au niveau de la membrane plasmique, sont les premiers acteurs des interactions intercellulaires. Leur association est régie par un ensemble d'interactions en perpétuelle dynamique. Cette dynamique d'interaction sera primordiale dans la régulation du développement des contacts entre cellules.

Les cadhérines représentent une des principales familles d'adhérence intercellulaire dépendante du calcium.

Les cadhérines classiques ont été les premières à être découvertes. Ces glycoprotéines transmembranaires réalisent des interactions de type homophile, dépendantes du calcium. Le domaine intracytoplasmique de ces molécules se lie aux filaments d'actine et participe à différentes voies de signalisation.

LA SUPERFAMILLE DES CADHÉRINES

Takeichi en 1977 identifie les cadhérines par leur très grande sensibilité à l'action de la trypsine, mais cette protéolyse est inhibée en présence de calcium. («Ca» pour calcium et «Adherin» pour adhérence en grec) (Takeichi, 1977).

Tous les membres de la superfamille des cadhérines ont un domaine extracellulaire constitué par la répétition



de plusieurs « motifs cadhérines » d'environ 110 acides aminés (EC), comprenant en particulier les séquences fortement conservées de fixation des ions Ca^{2+} . Les cadhérines sont décrites comme des molécules d'adhérence, même si certains membres n'ont pas de fonction adhésive clairement démontrée. Sur la base de leur séquence, on peut distinguer différentes sous familles : les cadhérines classiques, les cadhérines desmosomales, les protocadhérines et les « cadherin-like protéins » (Nollet *et al.*, 2000). Les cadhérines classiques sont subdivisées en deux groupes, type I et type II. Les cadhérines de type I sont la E- (épithéliale), la N- (neuronale), la P- (placentaire), la R- (rétinienne), et la C-cadhérine de Xénope. Les cadhérines de type II sont les cadhérines 5 à 12 et 18 à 20 à ce jour. Les cadhérines classiques et desmosomales ont un domaine extracellulaire composé de cinq motifs cadhérines nommés EC1 à EC5 depuis l'extrémité N-terminale.

D'un point de vue fonctionnel, les cadhérines jouent un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire. L'expression spatio-temporelle spécifique à chaque cadhérine conduit à la formation de territoires cellulaires et tissulaires bien définis (Takeichi, 1988). Les réarrangements cellulaires sont concomitants à un réarrangement du profil d'expression des cadhérines, souvent corrélié avec la différenciation cellulaire. La production de souris transgéniques présentant une invalidation de gènes de cadhérines a confirmé le rôle primordial de ces molécules (Larue *et al.*, 1994; Radice *et al.*, 1997). Leur rôle morphogénétique a également été mis en évidence *in vitro* (Nagafuchi *et al.*, 1987). Une étude très élégante a démontré que les cadhérines jouent un rôle plus direct dans la différenciation de certains tissus et qu'elles peuvent influencer l'activité de certains gènes (Larue *et al.*, 1996). À l'âge adulte, les cadhérines interviennent dans le maintien des structures tissulaires, et l'altération de leur expression a pu être associée à l'apparition de caractères invasifs. À ce titre la E-cadhérine a été classée comme gène suppresseur de tumeurs (Birchmeier *et al.*, 1996; Christofori & Semb, 1999).

STRUCTURE MOLÉCULAIRE DES CADHÉRINES CLASSIQUES

Interaction homophile/hétérophile entre cadhérines

Originellement, l'interaction entre cadhérines est définie comme homophile car ces molécules représentent à la fois la serrure à la surface d'une cellule et la clé à la surface de la cellule voisine (Hirano *et al.*, 1987; Nose *et al.*, 1988). Le caractère homophile a été suggéré par l'observation des réarrangements cellulaires au cours du développement, souvent associés à un changement d'expression des cadhérines (Takeichi, 1988). Par ailleurs, les cellules endothéliales, qui expriment deux cadhérines différentes, la VE- et la N-cadhérine, illustrent de manière pertinente le caractère homophile de l'interaction des cadhérines (Navarro *et al.*, 1998).

Toutefois, des exemples de plus en plus nombreux d'interactions hétérophiles sont apparus dans la litté-

ture. Ainsi la N- et la R-cadhérine peuvent former des interactions hétérophiles révélées par agrégation cellulaire et immunoprécipitation (Shan *et al.*, 2000). Des cellules exprimant la A-CAM (N-cadhérine de poulet) forment, en co-culture, des jonctions hétérotypiques avec des cellules exprimant la L-CAM (E-cadhérine de poulet) (Volk *et al.*, 1987). Des résultats contradictoires ont été obtenus pour la E- et la P-cadhérine (Duguay *et al.*, 2003; Nose *et al.*, 1988). Ceci montre que de nombreux points restent obscurs dans la compréhension du mécanisme d'interaction des cadhérines.

Études structurales/modèles d'interaction

À ce jour, seules les cadhérines classiques ont fait l'objet d'études structurales approfondies. Les premières études réalisées sur les domaines E/EC1 et N/EC1, respectivement par RMN (Overduin *et al.*, 1995) et RX (Shapiro *et al.*, 1995), ont révélé une organisation tridimensionnelle de type « immunoglobulin-like », avec 7 brins β antiparallèles organisés en deux feuillettes. Cette structure, de dimensions $45\text{\AA} \times 25\text{\AA} \times 25\text{\AA}$, est commune à tous les modules cadhérine.

La présence d'appariements parallèles et antiparallèles dans les premiers cristaux de cadhérines a suggéré le premier modèle d'interaction, appelé modèle en « fermeture éclair » qui propose que des monomères de cadhérines à la surface d'une cellule s'organisent en dimères cis, puis que deux dimères à la surface de deux cellules voisines s'associent en trans au niveau du domaine EC1. La résolution de la structure des domaines E/EC1-2 et N/EC1-2 (Nagar *et al.*, 1996; Pertz *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 1998) a partiellement modifié ce modèle. Les domaines EC1 et EC2 forment entre eux un angle de 130° et la zone de contact en cis se situe autour de la zone charnière entre les deux domaines. Des interactions impliquant les domaines N-ter des cadhérines ont été observées en utilisant la protéine chimérique E-cadhérine-COMP (COMP : domaine de pentamérisation) (Tomschy *et al.*, 1996). Cette construction peut néanmoins imposer des contraintes géométriques réduisant la flexibilité des domaines EC. Plusieurs approches fonctionnelles ont étayé l'idée que EC1 serait fortement impliqué dans l'interaction adhésive. La délétion de ce domaine conduit à la perte de l'activité adhésive de la N-cadhérine (Shan *et al.*, 1999). Des mutations ponctuelles, en particulier sur le tryptophane 2 (Trp2), modifient les propriétés adhésives de plusieurs cadhérines (Perret *et al.*, 2002; Tamura *et al.*, 1998). Enfin, EC1 est également considéré comme le siège de la spécificité d'adhérence (Nose *et al.*, 1990).

L'interface antiparallèle, qui n'avait jamais été observée dans les études sur EC1-2, a été visualisée récemment sur l'ensemble de l'ectodomaine de la C-cadhérine (C/EC1-5) (Boggon *et al.*, 2002). Cette interface implique un échange réciproque de brins β correspondant à l'extrémité N-terminale de EC1, précédemment attribué à l'interface entre dimères cis (Shapiro *et al.*, 1995). Cette étude remet en question la nécessité d'une association préalable en dimères cis pour que l'interaction

adhésive se produise. L'organisation moléculaire dans ces cristaux fait apparaître un empilement de monomères en cis, présentant une courbure prononcée et une torsion des différents modules l'un par rapport à l'autre. Une étude tomographique des desmosomes confirme qu'une pré-organisation en dimères cis n'est pas indispensable à l'interaction antiparallèle des cadhérines desmosomales (He *et al.*, 2003).

Un certain nombre de données expérimentales (anticorps bloquants, tests d'agrégation) suggère que les domaines EC2 à EC5 soient aussi impliqués dans l'interaction (Chappuis-Flament *et al.*, 2001; Vestweber & Kemler, 1985). Une implication de ces modules a été mise en évidence sur la C-cadhérine par utilisation de la machine de forces d'Israelachvili (SFA : Surface Force Apparatus) (Sivasankar *et al.*, 1999). La SFA permet de mesurer simultanément la distance entre deux surfaces et, lors de la séparation, l'énergie dissipée après contact. Trois décrochages successifs sont observés lors de la séparation de C/EC1-5 reflétant des interactions multiples (Zhu *et al.*, 2003). Une organisation en hexamère a aussi été décrite pour la VE-cadhérine (Legrand *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces études, à la fois structurales, morphologiques, biophysiques et ultrastructurales, conduit à proposer différents modèles d'interaction des cadhérines. Bien que parfois très différents ces modèles ne sont pas pour autant exclusifs. Il est toutefois certain que le modèle de « fermeture éclair », qui a servi de base à de très nombreuses études, se révèle insuffisamment précis et doit être affiné.

Les études de cristallographie RX ont permis de localiser de façon précise les ions Ca^{2+} sur la protéine. Trois ions Ca^{2+} se fixent entre deux domaines EC adjacents (Boggon *et al.*, 2002; Nagar *et al.*, 1996). Les observations obtenues par microscopie électronique suggèrent que le calcium régule les interactions entre cadhérines (Pertz *et al.*, 1999). EC1-5, qui apparaît comme un bâtonnet étiré d'environ 22 nm de long, adopte une organisation beaucoup plus compacte en absence de calcium. Ces observations sont renforcées par le fait que des mutations dans les sites de fixation du calcium peuvent modifier la localisation subcellulaire des cadhérines, mais aussi le comportement cellulaire (Handschuh *et al.*, 2001).

DE L'ADHÉRENCE CELLULAIRE À LA MOLÉCULE UNIQUE

Généralités

Dans le contexte biologique, pour qu'il y ait adhérence intercellulaire, la première exigence est que deux cellules soient suffisamment proches l'une de l'autre pour qu'une interaction éventuelle se produise. Le premier contact physique correspond à l'interaction entre domaines extracellulaires des protéines d'adhérence. Cette approche peut être influencée par différents événements, comme : *i*) les aléas de la fluctuation membranaire, *ii*) la force de protrusion exercée par les lamelli-

podes, *iii*) le milieu extérieur. Lorsque les molécules sont suffisamment proches, une première liaison peut se former. Cette étape critique est conditionnée par la nature de ces molécules et les paramètres intrinsèques de l'interaction créée. Cette interaction, si elle est suffisamment efficace, permettra de maintenir les cellules en contact (Bell, 1978; Pierres *et al.*, 1998a). Sa durée de vie va déterminer son aptitude à induire le renforcement de l'attachement et la formation d'autres liaisons. La zone de contact sera consolidée par la participation de protéines cytoplasmiques qui vont créer des connexions avec le cytosquelette et initier diverses voies de signalisation cellulaire.

Mesures de l'adhérence à l'échelle cellulaire

Les tests d'agrégation cellulaire furent parmi les premiers essais utilisés pour étudier l'adhérence cellulaire. Ils ont permis d'évaluer le caractère adhésif de différentes molécules de surface et particulièrement des cadhérines (Roth, 1968). Ces tests reflètent non seulement la capacité des cellules à interagir mais aussi à rester associées en présence d'une contrainte mécanique. En effet, le niveau d'agitation est un paramètre critique à considérer, et les résultats vont dépendre en partie de la force de rotation appliquée. La complexité de cette approche a été récemment étudiée en détail, avec une attention particulière portée sur la densité protéique dans la formation de contacts (Duguay *et al.*, 2003). Une autre technique, mise au point par McClay, est basée sur l'utilisation de la force centrifuge pour évaluer l'association des cellules à un substrat (Angres *et al.*, 1996; McClay *et al.*, 1981). Ces mesures montrent que le nombre de molécules impliquées dans l'interaction peut grandement contribuer à la ségrégation des cellules et à leur résistance aux contraintes mécaniques. Ce paramètre très critique doit être contrôlé avec rigueur pour interpréter correctement les observations faites à l'échelle cellulaire. Ces approches ont permis de poser les premières bases des processus de reconnaissance cellulaire mais n'informent pas sur les propriétés moléculaires des protéines adhésives.

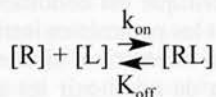
Paramètres dynamiques d'une interaction adhésive

De nouvelles approches sont apparues récemment, provenant comme ceci est souvent le cas, de progrès techniques, en particulier de l'ouverture de techniques de physique à leur application en biologie. Ces récents développements permettent d'accéder aux propriétés intrinsèques d'interactions entre biomolécules. Nous allons décrire les notions auxquelles font référence ces paramètres dynamiques en insistant sur leur sens précis.

Lien entre constantes d'équilibre et constantes cinétiques

Une interaction ligand(L)-récepteur(R) est souvent définie par la constante d'affinité K_A . Un K_A élevé implique qu'une interaction est énergiquement favorable,

et une façon simple de représenter une interaction est la suivante :



La constante d'équilibre K_A , paramètre thermodynamique de processus à l'équilibre, est définie par : $K_A = [RL] / [R] \times [L] = k_{\text{on}} / k_{\text{off}}$. Toutefois, les processus biologiques comme la formation des contacts cellulaires approchent très rarement l'équilibre et les constantes cinétiques deviennent alors les paramètres pertinents (van der Merwe & Barclay, 1994). En effet, deux couples RL différents peuvent présenter une même valeur de K_A et pourtant posséder des constantes d'association et de dissociation très différentes. La vitesse d'association est définie par : $k_{\text{on}} \times [R] \times [L]$ et k_{on} reflète l'efficacité de formation de l'interaction. La vitesse de dissociation est définie par : $k_{\text{off}} \times [RL]$ et k_{off} informe sur la stabilité de l'interaction. $1/k_{\text{off}}$ correspond à la durée de vie de l'interaction. Ainsi, décrire une interaction par la seule constante d'affinité ne donne qu'un reflet partiel du comportement de ces protéines sans informer sur le mécanisme moléculaire.

Si l'on prend l'exemple des interactions cellule-cellule, différentes questions essentielles doivent être soulevées. Les molécules sont-elles capables d'interagir assez rapidement pour qu'*in vivo* un contact cellulaire puisse se développer? Combien de temps doit persister l'interaction pour déclencher un signal? Les cadhérines soulèvent des questions plus spécifiques. Existe-t-il entre diverses cadhérines des différences significatives dans les cinétiques d'interaction? Comment ces protéines sont-elles impliquées dans des mécanismes aussi divers que reconnaissance, migration cellulaire ou formation de structures stables comme les jonctions adhérentes? Il est important de pouvoir répondre à ces questions pour tenter de résoudre la complexité des interactions cellulaires.

Contraintes liées à la nature membranaire des cadhérines

Dans le contexte biologique et outre ces aspects cinétiques, les interactions entre cadhérines sont très fortement influencées par leur nature membranaire. En effet, les contraintes imposées aux interactions se produisant en 2D (protéines fixées sur deux surfaces) ou en 3D (protéines en solution) ne sont pas nécessairement identiques. Pour comprendre cette différence, il suffit de considérer le mécanisme d'interaction qui peut conceptuellement être séparé en deux étapes (Bell, 1978). Que l'interaction ait lieu en solution ou entre deux surfaces, elle peut s'écrire comme indiqué sur les schéma I.

La première étape, favorisée par la diffusion, correspond à la rencontre entre les deux partenaires. La deuxième étape, qui correspond à l'étape de réaction proprement dite, peut ensuite se produire. Dans cette équation, « AB » correspond au complexe de rencontre, d_+ et d_- les constantes d'association et de dissociation de

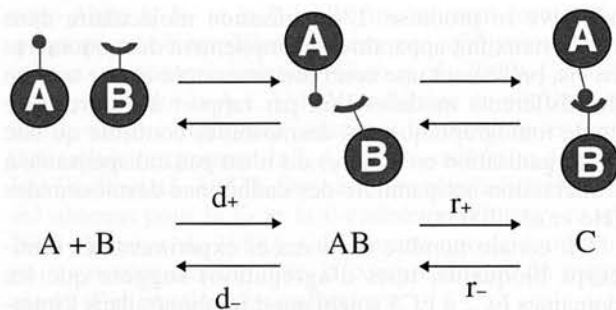


SCHÉMA I.

ce complexe; « C » à la liaison formée entre les deux réactifs, et, r_+ et r_- les constantes d'association et de dissociation de la liaison. Différents éléments interviennent à chaque étape. Tout d'abord lors de la première étape, la diffusion de molécules est différente en 3D et 2D. En effet, en 3D les molécules sont amenées à une distance favorable pour l'interaction grâce à la diffusion possible dans toutes les directions. La distance entre molécules est déterminée par la concentration de chaque soluté et leur coefficient de diffusion ne dépend que de la taille de la molécule et de la viscosité du milieu. En 2D, la diffusion est limitée et la distance entre ces deux surfaces est alors un paramètre critique. Pour une protéine intégrée dans une membrane cellulaire, la diffusion va essentiellement dépendre de la viscosité de la membrane donc de sa composition, de la taille de la protéine, et d'une possible association à des protéines cytoplasmiques. Les contraintes sont encore plus restrictives pour des molécules greffées sur des surfaces solides, puisque aucune diffusion latérale n'est possible. Ensuite, lors de la seconde étape interviennent l'orientation et la flexibilité des molécules et en 2D, le mode de greffage peut également affecter cette étape.

Aspects méthodologiques

De nombreuses approches peuvent être utilisées pour mesurer les paramètres d'interaction entre molécules. Pour les interactions entre protéines solubles, on peut citer la dialyse à l'équilibre, l'ultracentrifugation, ou des techniques faisant appel à la radioactivité ou la fluorescence. Pour les interactions d'un récepteur immobilisé avec un ligand soluble, les mesures en pseudo-solution peuvent être réalisées par résonance plasmonique de surface (SPR) (Karlsson *et al.*, 1991). Enfin, pour étudier des interactions entre protéines transmembranaires, comme les cadhérines, il sera judicieux de mesurer ces constantes en 2D. La chambre de flux permet de reproduire cette configuration et constitue un moyen très efficace et quantitatif pour étudier les propriétés cinétiques de liaisons impliquant des molécules liées à des surfaces. Le principe consiste à étudier le mouvement de cellules ou de billes couvertes de récepteurs le long d'une surface couverte d'un ligand en présence d'un faible écoulement laminaire, de telle façon qu'un arrêt généré par une seule liaison soit détectable. L'analyse des trajectoires permet

de déterminer la durée de vie d'une liaison unique et la fréquence de formation de telles liaisons traduit l'efficacité d'interaction. L'utilisation d'un flux hydrodynamique permet d'entraîner la bille ou la cellule lors de son détachement, et évite que la liaison se forme à nouveau. De plus, ce flux hydrodynamique très faible (de l'ordre de quelques pN) affecte peu le k_{off} de l'interaction. La chambre de flux est une des rares techniques qui permettent d'approcher le k_{on} (Pierres *et al.*, 1998c). La configuration en 2D ou 3D peut également affecter la constante de dissociation de l'interaction. En 3D, la dissociation correspond à la probabilité de rupture spontanée de l'interaction (k_{off}); en 2D, la liaison peut être soumise à des forces parasites affectant le k_{off} (Pierres *et al.*, 1998b).

Intérêt des mesures à l'échelle de la molécule unique

L'analyse de toutes ces observations nécessite de connaître précisément le nombre de molécules impliquées dans l'interaction, ce qui est à l'heure actuelle impossible. Prenons, pour être plus concret, l'exemple de la chambre de flux. Si le nombre de molécules impliquées dans les arrêts varie, les mesures ne sont pas interprétables, puisque directement dépendantes du nombre de liaisons impliquées. Pour rajouter à la complexité, il ne faut pas oublier que dans ce contexte, chaque liaison a sa propre histoire, puisqu'elle se forme et se dissocie de façon indépendante. Une façon de contourner le problème est de réaliser les mesures à l'échelle de la molécule unique. Les résultats, liés à des conditions expérimentales contrôlées, refléteront uniquement les paramètres d'un couple L-R. Malgré la difficulté de leur mise en œuvre, ces méthodologies sont des approches de choix pour accéder aux détails du comportement dynamique des interactions protéine-protéine.

Comment considérer que nous sommes à l'échelle unimoléculaire ? Il n'existe pas de critères absolus, mais plusieurs arguments, qui varient selon les approches, servent à valider le fait que les conditions sont atteintes. Par exemple, la chambre de flux permet de mesurer le k_{off} d'une interaction. Il est évident que la valeur mesurée doit être indépendante de la densité protéique. Cette densité doit être appropriée : 1) trop élevée, elle entraîne la formation de liaisons multiples, 2) trop faible, elle fournit des fréquences d'interactions incompatibles avec l'établissement de bonnes statistiques. Il peut aussi sembler évident que cette interaction doit suivre une cinétique de premier ordre pour refléter les propriétés d'une interaction unique. Ce cas simple n'est pas une condition absolue, puisqu'une interaction entre biomolécules correspond à un ensemble de micro-interactions dont la révélation dépend de la sensibilité de la technique.

Les études à l'échelle cellulaire reflètent un comportement moyen de l'ensemble des protagonistes. L'approche réductionniste de la molécule unique permet un découplage des phénomènes cellulaires et par conséquent une identification plus aisée du rôle de chaque partenaire.

PARAMETRES CINÉTIQUES DE L'INTERACTION E-CADHÉRINE

La E-cadhérine joue un rôle pivot dans la formation et le maintien des épithéliums et est considérée comme prototype des cadhérines classiques de type I. Elle a été choisie pour étudier la dynamique de l'interaction entre cadhérines à l'échelle unimoléculaire pour mieux appréhender leur mode d'association dans le contexte biologique.

L'étude a été initiée sur les domaines E/EC1-2, considérés comme la portion minimale nécessaire à l'interaction, et leur dynamique d'interaction testée en chambre à flux laminaire. Les fragments sont fixés sur des surfaces modèles : billes et surface/fond de la chambre (Pierres *et al.*, 1998a). Cette configuration présente un double avantage. D'une part, la fixation sur des surfaces permet de contourner la difficulté d'homoassociation éventuelle des fragments en solution. D'autre part, ces protéines sont présentées dans une topologie similaire à celles du contexte biologique. Les surfaces sont ensuite amenées en contact à l'aide d'un faible écoulement laminaire. Ce système minimaliste mime le contact entre deux cellules, tout en éliminant les paramètres difficilement contrôlables (formation de plaques adhésives, organisation du cytosquelette, mouvements membranaires, etc.).

Une des principales difficultés, du fait de la très grande sensibilité de la méthode, consiste à mettre au point les conditions expérimentales satisfaisant aux exigences de mesures à l'échelle de la molécule unique. Ces conditions étant remplies, nous avons évalué la durée de vie de l'interaction entre fragments E/EC1-2 à différents taux de cisaillement. Par extrapolation à force nulle, cette durée de vie a été estimée à 2s. Par comparaison avec d'autres couples L-R, cette interaction entre fragments de E-cadhérine peut être qualifiée de très brève. Cette dynamique d'interaction, très inattendue pour une molécule impliquée dans des structures jonctionnelles considérées comme stables, nous a amenés à proposer un mécanisme dynamique pour expliquer la plasticité des interactions cellulaires mais aussi la spécificité des interactions entre cadhérines (Perret *et al.*, 2002).

Nous avons ensuite concentré notre intérêt sur un acide aminé situé à l'extrémité N-terminale du domaine EC1, le Trp2. Cet acide aminé, conservé pour toutes les cadhérines classiques de type I et II ainsi que les cadhérines desmosomales, semble être particulièrement important dans l'activité adhésive de ces molécules. En effet, la mutation du Trp2 en Ala abolit l'activité adhésive au niveau cellulaire (Tamura *et al.*, 1998) ainsi que sur les protéines isolées (Perret *et al.*, 2002 ; Pertz *et al.*, 1999). Enfin, *in vivo*, la mutation de ce Trp en glycine sur la N-cadhérine conduit, chez le poisson zèbre, à une létalité au stade embryonnaire (Malicki *et al.*, 2003). Au niveau structural, la chaîne latérale du Trp2 vient se loger dans une poche hydrophobe formée en particulier par l'alanine 80 du motif HAV au niveau du domaine EC1. Cependant la façon dont la chaîne latérale interagit avec la poche hydrophobe est controversée. La première étude

cristallographique propose que l'ancrage se fasse de façon réciproque dans la cavité hydrophobe de la molécule adjacente au sein du dimère parallèle (Shapiro *et al.*, 1995). Dans les cristaux obtenus par Pertz *et al.*, l'ancrage du Trp2 dans la poche hydrophobe se fait de façon intramoléculaire (Pertz *et al.*, 1999). Ces deux études proposent que cet ancrage engendre la formation d'une interface adhésive nécessaire à l'association anti-parallèle. Plus récemment, Boggon *et al.* ont observé une participation active du Trp2 dans l'interaction adhésive (Boggon *et al.*, 2002).

En résumé, la façon dont le Trp2 est impliqué dans l'interaction adhésive est encore imprécise et, pour clarifier ce point, nous avons recouvert les surfaces de la chambre de flux (billes et lame de mica) du même fragment protéique (fragment sauvage E/EC1-2 ou muté E/W2A) ou l'une des surfaces par le fragment sauvage et l'autre par le fragment muté. Ces configurations conduisent à trois situations distinctes : *i*) le Trp2 et la poche hydrophobe sont présents sur les deux surfaces, *ii*) seule la poche hydrophobe est présente sur les deux surfaces, et aucun Trp2 n'est présent, *iii*) le Trp2 et la poche hydrophobe sont présents sur une surface et la surface opposée ne possède que la poche hydrophobe. Nous avons affiné la sensibilité de la méthode, ce qui nous a permis d'étudier la participation du Trp2 dans l'interaction (en préparation).

DISCUSSION

Le mode d'interaction des cadhérines au niveau moléculaire est à l'heure actuelle relativement imprécis. De nombreux points restent controversés : la nécessité ou non d'un dimère parallèle pré-établi pour que l'interaction adhésive s'établisse, l'implication d'autres domaines en plus de EC1 dans l'interaction, la localisation de l'interface (ou des interfaces) adhésive(s), la régulation de la spécificité de l'interaction, etc.

Les premiers résultats obtenus par chambre de flux ont apporté des informations nouvelles concernant les interactions entre E-cadhérines. Du fait de la stabilité apparente des jonctions adhérentes, nous avons en effet tendance à considérer que la E-cadhérine établissait des interactions très stables : «At the one extreme are the cadherins, which mediate stable interactions between cells in solid organs and epithelia and thus contribute to the structural integrity of the body. At the other extreme are the selectins, which mediate the most transient cell-cell interactions known – the rolling of leucocytes on endothelial surfaces at speeds of up to 150 $\mu\text{m s}^{-1}$ » (van der Merwe & Barclay, 1994). Nous avons montré que, de façon inattendue, la durée d'interaction entre fragments E/EC1-2 est très comparable à celle mesurée entre la P-sélectine et son ligand (Alon *et al.*, 1995). Nous avons aussi, par la même méthode, précisé le rôle du Trp2 dans l'interaction.

Nos observations suggèrent qu'un dimère pré-établi n'est pas indispensable pour qu'une interaction adhésive

entre cadhérines s'établisse. En effet il est très peu probable qu'un dimère parallèle puisse se former, compte tenu de la densité et du mode de greffage des fragments. Des études à la fois structurales et morphologique ne mettent pas en évidence de dimères parallèles (Boggon *et al.*, 2002; He *et al.*, 2003). Cela n'exclut pas qu'*in vivo* une dimérisation/oligomérisation, qui pourrait impliquer divers partenaires cytoplasmiques, ne soit pas nécessaire pour initier la signalisation cellulaire.

La dynamique de ces interactions pourrait permettre d'expliquer la spécificité et la plasticité des contacts cellulaires, mais aussi l'organisation de structures globalement stables. Il est important de noter que, outre la durée et la résistance à la rupture, le temps pour que la liaison se forme est une caractéristique importante pour une interaction adhésive. Dans un contexte cellulaire, le nombre de molécules impliquées, l'aptitude au regroupement et la consolidation par le cytosquelette sont autant de paramètres qui devront être évalués pour comprendre les mécanismes de l'adhérence. À plus long terme, la substitution de billes par des cellules exprimant des cadhérines à leur surface nous permettra d'établir le lien entre les propriétés moléculaires des cadhérines et leur comportement à l'échelle cellulaire. Enfin, l'étude d'autres cadhérines ainsi que les interactions hétérophiles constitueront des étapes essentielles pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui induisent la spécificité et la diversité des rôles biologiques joués par les cadhérines.

BIBLIOGRAPHIE

- Alon R., Hammer D. A. & Springer T. A., Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature*, 1995, 374, 539-542.
- Angres B., Barth A. & Nelson W. J., Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: kinetic analysis of E-cadherin-mediated adhesion using a quantitative adhesion assay. *J. Cell. Biol.*, 1996, 134, 549-557.
- Bell G. I., Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 1978, 200, 618-627.
- Birchmeier C., Birchmeier W. & Brand-Saberi B., Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat. (Basel)*, 1996, 156, 217-226.
- Boggon T. J., Murray J., Chappuis-Flament S., Wong E., Gumbiner B. M. & Shapiro L., C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science*, 2002, 296, 1308-1313.
- Chappuis-Flament S., Wong E., Hicks L. D., Kay C. M. & Gumbiner B. M., Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J. Cell. Biol.*, 2001, 154, 231-243.
- Christofori G. & Semb H., The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.*, 1999, 24, 73-76.
- Duguay D., Foty R. A. & Steinberg M. S., Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Dev. Biol.*, 2003, 253, 309-323.
- Handschuh G., Luber B., Hutzler P., Hofler H. & Becker K. F., Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences. *J. Mol. Biol.*, 2001, 314, 445-454.

- He W., Cowin P. & Stokes D. L., Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science*, 2003, 302, 109-113.
- Hirano S., Nose A., Hatta K., Kawakami A. & Takeichi M., Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J. Cell. Biol.*, 1987, 105, 2501-2510.
- Karlsson R., Michaelsson A. & Mattsson L., Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J. Immunol. Methods*, 1991, 145, 229-240.
- Larue L., Antos C., Butz S., Huber O., Delmas V., Dominis M. & Kemler R., A role for cadherins in tissue formation. *Development*, 1996, 122, 3185-3194.
- Larue L., Ohsugi M., Hirchenhain J. & Kemler R., E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 8263-8267.
- Legrand P., Bibert S., Jaquinod M., Ebel C., Hewat E., Vincent F., Vanbelle C., Concord E., Vernet T. & Gulino D., Self-assembly of the vascular endothelial cadherin ectodomain in a Ca²⁺-dependent hexameric structure. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 3581-3588.
- Malicki J., Jo H. & Pujic Z., Zebrafish N-cadherin, encoded by the glass onion locus, plays an essential role in retinal patterning. *Dev. Biol.*, 2003, 259, 95-108.
- McClay D. R., Wessel G. M. & Marchase R. B., Intercellular recognition: quantitation of initial binding events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 4975-4979.
- Nagafuchi A., Shirayoshi Y., Okasaki K., Yasuda K. & Takeichi M., Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature*, 1987, 329, 341-343.
- Nagar B., Overduin M., Ikura M. & Rini J. M., Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*, 1996, 380, 360-364.
- Navarro P., Ruco L. & Dejana E., Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J. Cell. Biol.*, 1998, 140, 1475-1484.
- Nollet F., Kools P. & van Roy F., Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.*, 2000, 299, 551-572.
- Nose A., Nagafuchi A. & Takeichi M., Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell*, 1988, 54, 993-1001.
- Nose A., Tsuji K. & Takeichi M., Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell*, 1990, 61, 147-155.
- Overduin M., Harvey T. S., Bagby S., Tong K. I., Yau P., Takeichi M. & Ikura M., Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science*, 1995, 267, 386-389.
- Perret E., Benoliel A. M., Nassoy P., Pierres A., Delmas V., Thiery J. P., Bongrand P. & Feracci H., Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *Embo J.*, 2002, 21, 2537-2546.
- Pertz O., Bozic D., Koch A. W., Fauser C., Brancaccio A. & Engel J., A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J.*, 1999, 18, 1738-1747.
- Pierres A., Benoliel A. M. & Bongrand P., Interactions between biological surfaces. *Curr. Opin. Coll. & Interface Science*, 1998a, 3, 525-533.
- Pierres A., Benoliel A. M. & Bongrand P., Studying receptor-mediated cell adhesion at the single molecule level. *Cell. Adhes. Commun.*, 1998b, 5, 375-395.
- Pierres A., Feracci H., Delmas V., Benoliel A. M., Thiery J. P. & Bongrand P., Experimental study of the interaction range and association rate of surface-attached cadherin 11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998c, 95, 9256-9261.
- Radice G. L., Rayburn H., Matsunami H., Knudsen K. A., Takeichi M. & Hynes R. O., Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Developmental Biology*, 1997, 181, 64-78.
- Roth S., Studies on intercellular adhesive selectivity. *Dev. Biol.*, 1968, 18, 602-631.
- Shan W. S., Koch A., Murray J., Colman D. R. & Shapiro L., The adhesive binding site of cadherins revisited. *Biophys. Chem.*, 1999, 82, 157-163.
- Shan W. S., Tanaka H., Phillips G. R., Arndt K., Yoshida M., Colman D. R. & Shapiro L., Functional cis-heterodimers of N- and R-cadherins. *J. Cell. Biol.*, 2000, 148, 579-590.
- Shapiro L., Fannon A. M., Kwong P. D., Thompson A., Lehmann M. S., Grubel G., Legrand J. F., Als-Nielsen J., Colman D. R. & Hendrickson W. A., Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*, 1995, 374, 327-337.
- Sivasankar S., Briehier W., Lavrik N., Gumbiner B. & Leckband D., Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 11820-11824.
- Takeichi M., Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell. Biol.*, 1977, 75, 464-474.
- Takeichi M., The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 1988, 102, 639-655.
- Tamura K., Shan W. S., Hendrickson W. A., Colman D. R. & Shapiro L., Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron*, 1998, 20, 1153-1163.
- Tomschy A., Fauser C., Landwehr R. & Engel J., Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains. *Embo J.*, 1996, 15, 3507-3514.
- van der Merwe P. A. & Barclay A. N., Transient intercellular adhesion: the importance of weak protein-protein interactions. *Trends Biochem. Sci.*, 1994, 19, 354-358.
- Vestweber D. & Kemler R., Identification of a putative cell adhesion domain of uvomorulin. *Embo J.*, 1985, 4, 3393-3398.
- Volk T., Cohen O. & Geiger B., Formation of heterotypic adherens-type junctions between L-CAM-containing liver cells and A-CAM-containing lens cells. *Cell*, 1987, 50, 987-994.
- Zhu B., Chappuis-Flament S., Wong E., Jensen I. E., Gumbiner B. M. & Leckband D., Functional analysis of the structural basis of homophilic cadherin adhesion. *Biophys. J.*, 2003, 84, 4033-4042.

L'ORGANISATION DU COMPLEXE
CADHERINE-CATENINES