



**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU**  
**Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques**  
**Département de Biochimie-Microbiologie**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

En vue de l'obtention du Diplôme de Master II en Biologie  
Option : **Biochimie Appliquée**

Présenté par : **Mlle Lila Madjene**

**Thème**

**Influence de la N-cadhérine sur la migration des  
cellules HEK et sur l'expression de ses  
partenaires intracellulaires.**

Devant le jury composé de :

<b>Mme Iratni Aiche Ghenima</b>	Maitre Assistante Classe A	<b>UMMTO</b>	<b>Présidente</b>
<b>Mr Houali Karim</b>	Professeur	<b>UMMTO</b>	<b>Promoteur</b>
<b>Mr Moualek Idir</b>	Maitre Assistant Classe A	<b>UMMTO</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mme Hamidouche Zahia</b>	Maitre de Conference Classe A	<b>UMMTO</b>	<b>Examinatrice</b>

Année universitaire : 2015-2016

## **REMERCIEMENTS**

Mes remerciements vont en premier lieu à mon promoteur, Monsieur Houali Karim, professeur à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour m'avoir permis de réaliser mon stage, pour ses corrections, son soutien et ses conseils.

Merci aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer ce travail et m'honorent de leur présence.

Je remercie Monsieur Guiseppe Baldacci, directeur de l'institut Jacques Monod pour m'avoir permis de réaliser ce stage au sein de l'Institut.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à René Marc Mège, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour m'avoir soutenu tout au long de ce stage en me dispensant son savoir et sa gentillesse.

Un grand merci à Thao Nguyen pour m'avoir dirigé durant ces travaux et qui m'a énormément apporté grâce à ses connaissances et ses conseils.

Merci à toute l'équipe « Adhésion cellulaire et mécanique », pour les moments agréables que j'ai passé.

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail en particulier mon père et ma sœur Anya pour leurs corrections et conseils judicieux.

## **DEDICACES**

Je dédie ce mémoire à :

Mes chers parents ; papa, maman nulle dédicace ne pourrait exprimer mes sincères sentiments, ma reconnaissance et ma gratitude.

Mon grand frère Fares et ma petite sœur Mayssa pour leur soutien et leur dévouement.

Ma grande sœur Anya sans qui rien de cela n'aurait été possible et mon beau-frère Idhir, pour leur soutien et leurs encouragements.

Ma grand-mère que Dieu lui prête longue vie.

Ma famille, mes amis ainsi que tous ceux qui me sont chers.

## RESUME

Les récepteurs d'adhésion de la famille des cadhérines participent aux interactions cellule-cellule, ils permettent de faire le lien entre les cellules adjacentes et leurs cytosquelettes. Pour cela, les cadhérines recrutent par voie intracellulaire les caténines  $\alpha$ ,  $\beta$  et p120, ainsi que la vinculine.

Ce mémoire vise à mieux comprendre l'influence de la N-cadhérine sur deux mécanismes en particuliers : la migration des cellules et le recrutement des partenaires intracellulaires des cadhérines.

Nous avons donc étudié l'impact de la N-cadhérine sur la dynamique et le recrutement de ses partenaires intracellulaires au niveau de cellules complètement dépourvues de cadhérines ; les cellules HEK (Human Embryonic Kidney). Nous avons ainsi pu prouver que la N-cadhérine influence la migration des cellules HEK. En effet les cellules HEK transfectées avec le gène codant pour la N-cadhérine migrent plus vite que les cellules HEK sous leur forme native.

Nous avons également montré que l'engagement de la N-cadhérine permet un recrutement plus important des partenaires intracellulaires des cadhérines, en particulier des caténines  $\beta$  et p120 ainsi que la vinculine. De plus, la présence du récepteur de FGF (Fibroblast Growth Factor Receptor) induit un recrutement encore plus élevé de ces protéines cytoplasmiques, mettant ainsi en évidence la synergie entre la N-cadhérine et le FGFR.

La N-cadhérine, stimule donc l'expression de ses partenaires cytoplasmiques, ce qui permet de booster la dynamique du flux d'actine et ainsi accentuer la motilité des corps cellulaires.

Ceci ne peut évidemment pas être appliqué à toutes les cellules de l'organisme, car l'engagement des cadhérines, en particulier la N-cadhérine, diffère d'un type cellulaire à un autre. La N-cadhérine peut favoriser la migration ou la ralentir, tout dépend du contexte cellulaire.

**Mots clés :** cadhérines / caténines / vinculine / FGFR / adhésion cellulaire / migration cellulaire / partenaires intracellulaires.

## ABSTRACT

The adhesion receptors of the cadherin family are involved in cell-cell interactions, to make the connection between the adjacent cell and the cytoskeleton. For this, they recruit intracellularly catenins  $\alpha$ ,  $\beta$ , p120, and vinculin.

This dissertation aims to better understand the influence of N-cadherin on two specific contexts: cell migration and recruitment of intracellular partners of cadherins.

We therefore studied the effect of N-cadherin on the dynamics and the recruitment of intracellular partners in cells completely devoid of cadherins; HEK (Human Embryonic Kidney). It was thus possible to prove that N-cadherins influence the migration of HEK cells. Indeed HEK cells transfected with N-cadherin gene migrate faster than those cells in their native form.

We also shown that the involvement of N-cadherin allows greater recruitment of intracellular partners of cadherins, especially  $\beta$  catenin, p120 catenin and vinculin. Moreover, the presence of the FGF receptor (Fibroblast Growth Factor Receptor), induces an even greater recruitment of cytoplasmic proteins, which highlights the synergy between N-cadherin and FGFR.

N-cadherin allows to stimulate the expression of cytoplasmic partners, which can amplify the dynamics of the actin flow and thus increase the motility of cell bodies.

This obviously can not be applied to all cells of the organism, because the engagement of cadherins, particularly N-cadherin, differs from one cell type to another. N-cadherin may promote or slow the migration, depending on the cellular context.

**Keywords** : cadherin / catenin / vinculin / FGFR / cell adhesion / cell migration / intracellular partners.

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	III
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	IV
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	V
<b>GLOSSAIRE</b> .....	VI
<b>INTRODUCTION</b> .....	01
<b>I- Adhésion cellulaire</b> .....	01
Les jonctions d'ancrage.....	02
<b>II- Les cadhérines</b> .....	03
1- Structure et fonction des cadhérines.....	03
2- Partenaires intracellulaires des cadhérines.....	04
2.1- Interactions avec les caténines.....	04
2.1.1- Les caténines p120.....	04
2.1.2- Les caténines $\beta$ .....	05
2.1.3- Les caténines $\alpha$ .....	05
2.2- La vinculine.....	05
3- Ancrage des cadhérines au cytosquelette d'actine suite à la formation des premiers contacts intercellulaires.....	07
3.1- Le cytosquelette d'actine.....	07
3.2- Remodelage du cytosquelette dans l'établissement des contacts.....	07
<b>III- Cadhérines et migration cellulaire</b> .....	10
1- La migration cellulaire.....	10
2- Rôle des cadhérines dans la migration cellulaire.....	11
<b>IV- Cadhérines et cancer</b> .....	13
1- Cancer.....	13
2- Rôle des cadhérines E et N dans le développement métastatique.....	13
3- La TEM : transition épithelio-mésenchymateuse.....	14
4- Coopération des cadhérines avec le facteur de croissance FGFR.....	16

<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL</b> .....	18
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	19
1- Décongélation et mise en culture des cellules.....	19
2- Fabrication des moules en forme de canaux de 200µm de largeur.....	19
3- Ensemencement des cellules dans les moules préfabriqués.....	20
4- Biostation.....	21
5- Immunocytochimie.....	21
6- Extraction totale des protéines.....	24
7- Western blot.....	24
8- Immunomarquage des protéines sur membrane de nitrocellulose.....	25
9- Quantification des bandes de protéines obtenues au Western Blot.....	26
<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS</b> .....	27
1- Suivi comparatif de la migration des différents types de cellules HEK.....	27
2- Immunocytochimie : marquage des partenaires intracellulaires des cadhérines....	30
3- Quantification des protéines après Western Blot.....	34
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	38
<b>ANNEXES</b> .....	40
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	43

## LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	Anticorps
BSA	Bovin Serum Albumin
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EC	Extra Cellulaire
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
Fn	Fibronectine
GFP	Green Fluorescente Protein
HEK	Human Embryonic Kidney
Ncad	Neural Cadherin
ON	Over Night
PBS	Phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PFA	Paraformaldéhyde
PS	Pénicilline + Streptomycine
RPM	Rotation par minute
RT	Room Temperature (température ambiante)
SVF	Sérum de Veau fœtal
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
Wt	Wild type (forme sauvage)

## LISTE DES FIGURES

	<b>Page</b>
<b>Figure 01</b> Représentation de l'interaction de type homotypique permise par les cadhérines au niveau des jonctions d'ancrage	02
<b>Figure 02</b> Représentation structurale d'un homodimère de cadhérines	03
<b>Figure 03</b> Organisation moléculaire autour d'une cadhérine classique au niveau d'une jonction adhérente	06
<b>Figure 04</b> Organisation de l'actine suite à la formation des premiers contacts cadhérine-cadhérine	08
<b>Figure 05</b> Représentation schématique de la formation du lamellipode suite aux interactions entre molécules de N-cadhérines de cellules voisines	09
<b>Figure 06</b> Visualisation en microscopie par fluorescence de l'actine (marquage GFP) à l'origine des lamellipodes d'une cellule de type fibroblaste	10
<b>Figure 07</b> Migration collective de cellules épithéliales	11
<b>Figure 08</b> La transition épithélio-mésenchymateuse	15
<b>Figure 09</b> Représentation schématique du complexe N-cadhérine/FGFR au niveau d'une jonction adhérente	16
<b>Figure 10</b> Représentation schématique de la forme des moules fabriqués	20
<b>Figure 11</b> Suivi comparatif de la migration des cellules HEK WT et des cellules HEK Ncad, en $\mu\text{m}$ par heure	27
<b>Figure 12</b> Quantification relative de la N-cadhérine au niveau des différents types cellulaires (HEK WT, HEK Ncad, HEK NR)	35
<b>Figure 13</b> Quantification relative de la vinculine et de la $\beta$ -caténine au niveau des trois types cellulaires (HEK WT, HEK Ncad, HEK NR)	36
<b>Figure 14</b> Quantification relative de la p120-caténine au niveau des trois types cellulaires (HEK WT, HEK Ncad, HEK NR)	36

## LISTE DES TABLEAUX

	<b>Page</b>
<b>Tableau I</b> Immunofluorescence 1 : protéines marquées et fluorochromes correspondants	23
<b>Tableau II</b> Immunofluorescence 1 : protéines marquées et fluorochromes correspondants	24
<b>Tableau III</b> Tableau comparatif de la migration des cellules HEK WT et HEK Ncad	28

## GLOSSAIRE

**Armadillo** : Une répétition Armadillo est le nom d'une séquence d'acides aminés caractéristique répétitive d'environ 40 résidus de longueur que l'on trouve dans de nombreuses protéines.

**Cytosquelette** : réseau complexe de filaments protéiques s'étendant dans tout le cytoplasme. Il permet aux cellules de s'adapter à une grande variété de changements morphologiques.

**Fibroblastes** : surnommées « cellules de soutien » car elles sont présentes dans les nombreux tissus conjonctifs de l'organisme.

**Fibronectine** : glycoprotéine extracellulaire, présente des sites d'interaction avec des composantes de la matrice extracellulaire (ici permet l'adhésion des cellules au moule).

**Homophilie (homotypie)** : interaction entre deux protéines de même type.

**Lamellipodes** : large extension membranaire composée de filaments d'actine en réseaux.

**Métastase** : Dissémination de cellules cancéreuses par voie lymphatique ou sanguine qui vont coloniser d'autres tissus.

**Morphogénèse** : Développement des tissus et organes d'un organisme.

**Mowiol** : produit utilisé en immunomarquage ; il permet le montage et la fixation des lamelles sur les grandes lames ; il préserve la forme des cellules ainsi que la fluorescence pour l'observation en microscopie à fluorescence.

**PDMS : Polydiméthylsiloxane** : résine liquide et visqueuse qui prend la consistance d'une gomme une fois chauffée à 80°C.

**Plasma cleaner** : machine permettant d'éliminer les impuretés de différents substrats grâce à l'association d'ions et de gaz, permet la sonication.

**Pluronic** : (ici) solution permettant d'éviter l'adhérence des cellules sur le bloc de PDMS.

**Triton** : détergent de synthèse, permet de perméabiliser les membranes cytoplasmiques et nucléaires pour que les anticorps puissent avoir accès au cytoplasme et noyau de la cellule lors de l'immunocytochimie.

Les termes définis dans ce glossaire sont marqués par un astérisque (\*) dans le mémoire.

# INTRODUCTION

La morphogenèse permet la formation d'un organisme pluricellulaire formé de milliards de cellules associées et agencées entre elles pour former des tissus et organes. Au cours de ce développement, les cellules doivent migrer et adapter leur formes et leur cohésion aux contraintes mécaniques et aux signaux locaux qui leurs sont imposés. Les contacts physiques des cellules permis par leur environnement mécanique sont donc très importants.

Les cellules sont capables de percevoir cet environnement en détectant des forces qui sont envoyées sous forme de stimuli mécaniques et ainsi répondre en adaptant leur morphologie à ces contraintes. Pour y répondre, les cellules sont rattachées entre elles par diverses structures membranaires spécialisées qui permettent l'adhésion des cellules entre elles et à la matrice extracellulaire et assurent ainsi une cohésion de l'ensemble du tissu.

## I- L'adhésion cellulaire

L'adhésion est un processus fondamental pour la vie cellulaire car elle régule de nombreux processus comme la croissance cellulaire, la division, la différenciation, la motilité des cellules, la prolifération et la mort cellulaire.

Cette adhésion, réalisée par de nombreuses structures de jonctions, a une importance capitale au sein des tissus. Ces structures forment une barrière perméable avec l'environnement. L'épithélium et l'endothélium sont deux exemples qui illustrent parfaitement cette idée. Ces deux barrières naturelles permettent respectivement de compartimenter les tissus entre eux ou de séparer le sang des tissus sous-jacents (**Gentit Dit Maurin, 2013**).

L'adhésion cellulaire est représentée par de nombreux types de jonctions cellulaires, il en existe trois grands types : les jonctions serrées, les jonctions communicantes et les jonctions d'ancrage. Ces jonctions permettent d'établir un lien entre le cytosquelette et l'environnement. Dans les tissus, l'environnement cellulaire peut être constitué d'autres cellules ou de la matrice extracellulaire ; on distingue ainsi des interactions de type cellule/cellule appelées jonctions adhérentes et des interactions de type cellule/matrice extracellulaire appelées les adhésions focales.

Les molécules responsables de l'adhérence des cellules à leur environnement sont les CAMs : Cell Adhesion Molecules, qui sont des glycoprotéines transmembranaires représentées principalement pour les types d'interactions cités par :

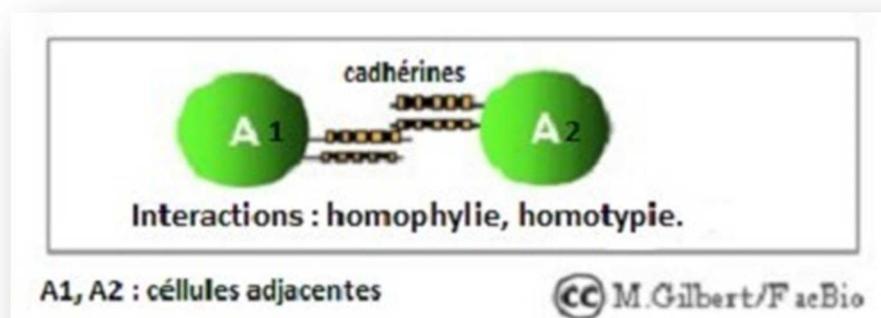
- les cadhérines dans le cas des adhésions cellule/cellule ;
- les intégrines dans le cas des adhésions cellule/matrice extracellulaire.

Pour adapter leurs formes en réponse aux changements mécaniques environnementaux, les cellules agissent en étroite coopération avec le milieu intracellulaire représenté par le cytosquelette, composé de filaments d'actine, filaments intermédiaires et microtubules.

*Nous traiterons ici des jonctions adhérentes appelées également jonctions d'ancrage, particulièrement de type cellule-cellule.*

### Les jonctions d'ancrage

Les jonctions adhérentes ou jonctions d'ancrage permettant une liaison intercellulaire dont le rôle principal est de maintenir la cohésion cellulaire, elles sont réalisées par les cadhérines, principales protéines transmembranaires de l'adhérence intercellulaire, elles lient les cellules juxtaposées entre elles. Les jonctions d'ancrage ont une fonction calcium-dépendante et permettent des liaisons homophiliques\*, c'est-à-dire entre récepteurs de même type (**Figure 1**), dans notre cas il s'agit de liaisons cadhérines-cadhérines.



**Figure 1** : Représentation de l'interaction de type homotypique permise par les cadhérines au niveau des jonctions d'ancrage.

Dans ce type de jonctions, les cellules sont accrochées entre elles par les cadhérines dont le domaine extracellulaire établit un contact avec le domaine extracellulaire de la cadhérine adjacente voisine.

## II- Les cadhérines

### 1- Structure et fonction des cadhérines

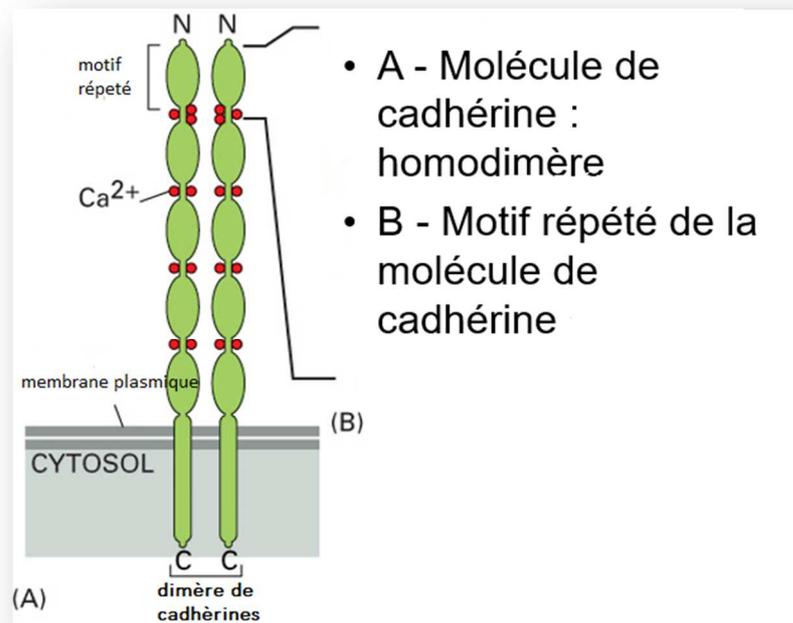
Les cadhérines sont les actrices majeures de la mise en place et du maintien des tissus, elles ont été nommées ainsi pour «calcium adhering».

Elles sont très diversifiées et forment une superfamille de glycoprotéines localisées à la surface des cellules, nous traiterons ici de la famille des **cadhérines classiques**.

Les principales cadhérines classiques sont représentées par les E, P, N et VE cadhérines, en fonction de leur emplacement dans les différents tissus :

- E-cadhérine : localisées dans les cellules épithéliales ;
- P-cadhérine : placenta, épiderme, épithélium mammaire ;
- N-cadhérine : neurones, cœur, squelette, cristallin, fibroblaste ;
- VE-cadhérines : endothélium vasculaire.

Les cadhérines classiques sont formées par un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (**Figure 2**).



**Figure 2** : Représentation structurale d'un homodimère de cadhérines.

La partie extracellulaire possède une extrémité N-terminale, formée d'ectodomains EC pour Extra Cellulaire conservés de 110 acides aminés chacun, répétés 5 fois chez les cadhérines classiques. L'interface de deux ectodomains EC constitue un site de liaison à trois ions calcium (**Figure 2**). L'association de ces trois ions calcium entre chaque domaine EC apporte la rigidité et la stabilité de la cadhérine et permet l'homodimérisation et l'interaction homophile (**Plesent, 2012**).

Les cadhérines possèdent également un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui est ancré à la membrane avec une extrémité C terminale, qui leur permet d'interagir avec les différents partenaires cytoplasmiques, principalement les caténines de type  $\alpha$ ,  $\beta$  et p120, et ce pour permettre l'ancrage au cytosquelette d'actine.

Notons que pour la formation d'une interaction adhésive, la formation d'un dimère parallèle est nécessaire car celui-ci permet d'apporter la rigidité de la partie extracellulaire (**Camard et al., 2012**).

## **2- Partenaires intracellulaires des cadhérines**

### **2.1- Interactions avec les caténines**

L'extrémité C-terminale intracellulaire des cadhérines réalise de nombreuses associations, elle est nécessaire à la formation de contacts résistants.

La région cytoplasmique des cadhérines permet l'interaction avec les caténines regroupant principalement les caténines  $\beta$ , p120 et la famille de l' $\alpha$ -caténine. Ces dernières permettent la liaison au cytosquelette d'actine, cette liaison est requise pour l'établissement des contacts cellulaires (**Bard et al., 2008**). Ensemble, ces protéines contrôlent la formation, la maintenance et le fonctionnement des jonctions adhérentes.

#### **2.1.1- La caténine p120**

Protéine d'environ 120 kDa, elle possède 10 domaines de type Armadillo\* de 42 acides aminés chacun. Elle interagit spécifiquement avec le domaine juxta membranaire des cadhérines (**Figure 3**) et participe à la régulation de la dynamique jonctionnelle de l'actine. La p120-caténine est donc impliquée dans la stabilisation des cadhérines engagées, favorisant ainsi le renforcement des contacts.

### 2.1.2- La caténine $\beta$

Protéine d'environ 90 kDa, possède une partie C-terminale, une partie N-terminale et un domaine centrale fait de 12 répétitions d'un motif protéique de type Armadillo permettant la liaison à la région C-terminale des cadhérines. Elle assure également la liaison avec l' $\alpha$ -caténine (**Figure 3**). La  $\beta$ -caténine interagit avec tous ses partenaires impliqués dans l'adhésion cellulaire (**Reiffers et Viens, 2011**). La liaison de la  $\beta$ -caténine aux éléments du complexe adhésif est régulée par l'interaction avec d'autres protéines.

### 2.1.3- La caténine $\alpha$

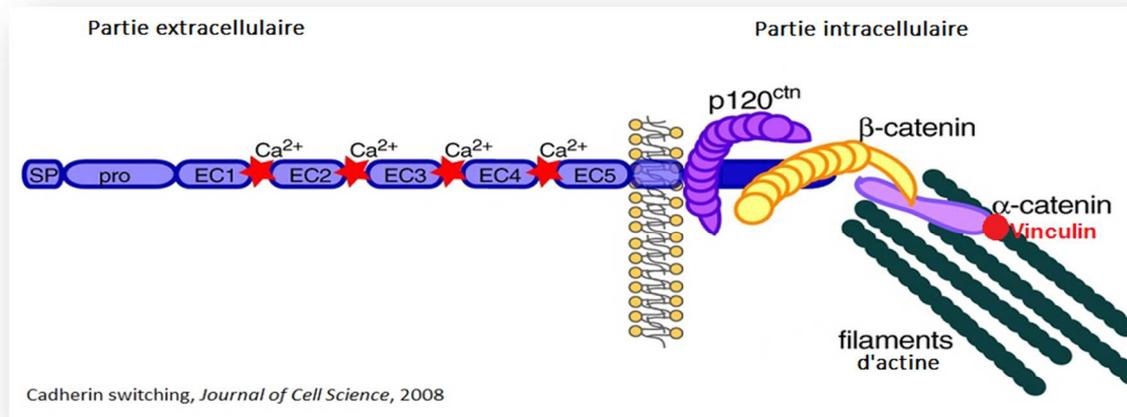
L' $\alpha$ -caténine est une protéine d'environ 102 kDa, présente sous 3 isoformes : E (pour épithélial), N (pour neuronale) et T (trouvée dans les testicules et le cœur). Elle possède trois domaines, un domaine N-terminal de liaison à la  $\beta$ -caténine, un domaine C-terminal de liaison à l'actine (**Figure 3**) et un domaine central de liaison à la vinculine. Elle contient également un domaine de modulation (domaine M), domaine qui permettrait le repliement de la protéine sur elle-même, régulant sa liaison à la vinculine avec laquelle elle présente une forte homologie. L' $\alpha$ -caténine possède donc la capacité de lier l'actine directement et indirectement en interagissant avec d'autres protéines de liaison à l'actine, elle est un important régulateur de l'ancrage des cadhérines à l'actine.

## 2.2- La vinculine

La vinculine est une protéine de 117 kDa qui partage avec l' $\alpha$ -caténine des similarités structurales, en effet ces deux protéines peuvent d'une part lier directement l'actine et d'autre part des protéines s'associant à l'actine. Cependant, l' $\alpha$ -caténine n'est localisée qu'au niveau des adhésions cadhérines dépendantes alors que la vinculine est retrouvée au niveau des adhésions focales et des adhésions cadhérines-dépendantes. C'est également une molécule de liaison à l'actine.

La vinculine possède un domaine amino-terminal qui interagit avec les protéines  $\alpha$ -caténine et  $\alpha$ -actinine, et un domaine carboxyterminal pouvant s'associer avec l'actine. L'interaction des domaines amino et carboxy-terminaux entraîne une auto-inhibition de la protéine. En effet cette interaction en tête à queue empêche la liaison de certains de ses partenaires tels que l' $\alpha$ -actinine (protéine fibrillaire permettant aux filaments d'actine de lier les stries Z des fibres

musculaires). Des études récentes ont suggéré que l' $\alpha$ -caténine pouvait intervenir dans l'activation de la vinculine aux contacts cadhérine dépendants (Mège *et al.*, 2006 et Plesent, 2012).



**Figure 3** : Organisation moléculaire autour d'une cadhérine classique au niveau d'une jonction adhérente (Wheelock M J. *et al.*, 2008).

Le domaine extracellulaire de la cadhérine comprend cinq répétitions homologues (EC1-EC5) qui sont pontés par des ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Figure 3). Le domaine cytoplasmique se lie d'abord à p120-caténine à proximité de la membrane plasmique puis à la  $\beta$ -caténine à proximité de l'extrémité C-terminale. La  $\beta$ -caténine elle-même interagit avec l' $\alpha$ -caténine pour lier les filaments d'actine soit via la vinculine ou l' $\alpha$ -actinine (Figure 3) (Wheelock M J *et al.*, 2008).

La régulation de l'activité adhésive des cadhérines est donc renforcée par l'interaction des caténines, directe ou indirecte via l' $\alpha$ -actinine ou la vinculine, avec les filaments d'actine. Elle peut également être modulée par l'action de voies de signalisation impliquant la caténine p120. Enfin, l'activité adhésive est régulée par la phosphorylation des caténines, qui peut influencer le clustering des cadhérines.

Les structures de la E-cadhérine et la N-cadhérine sont similaires, comme le sont leurs interactions avec les caténines (Wheelock M J *et al.*, 2008), cependant nous parlerons ici de N-cadhérines, celles utilisées pour la réalisation de nos expériences.

### **3- Ancrage des cadhérines au cytosquelette d'actine suite à la formation des premiers contacts intercellulaires.**

La formation du contact intercellulaire nécessite que les cadhérines établissent un lien avec les filaments d'actine, et ce, via les partenaires intracellulaires évoqués ci-dessus. Ces liaisons permettront la formation du complexe cadhérine/caténine/actine.

#### **3.1- Cytosquelette d'actine**

L'actine, est une protéine globulaire de 42 kDa exprimée par tous les eucaryotes, elle est l'une des protéines majoritaires du cytosol. Les monomères d'actine G pour globulaire s'assemblent en filaments sous la forme de deux hélices enroulées qui sont dénommés actine F pour filamenteuse. Ce processus n'est pas spontané et nécessite le recrutement d'ATP et de nombreuses protéines, formant des complexes de nucléation d'actine.

L'actine est responsable de la morphologie et de la plasticité des cellules se trouvant ainsi impliquée dans de nombreux mouvements intracellulaires, elle intervient notamment dans la contraction musculaire, dans le déplacement cellulaire, les changements de forme... etc (Bohineust, 2013).

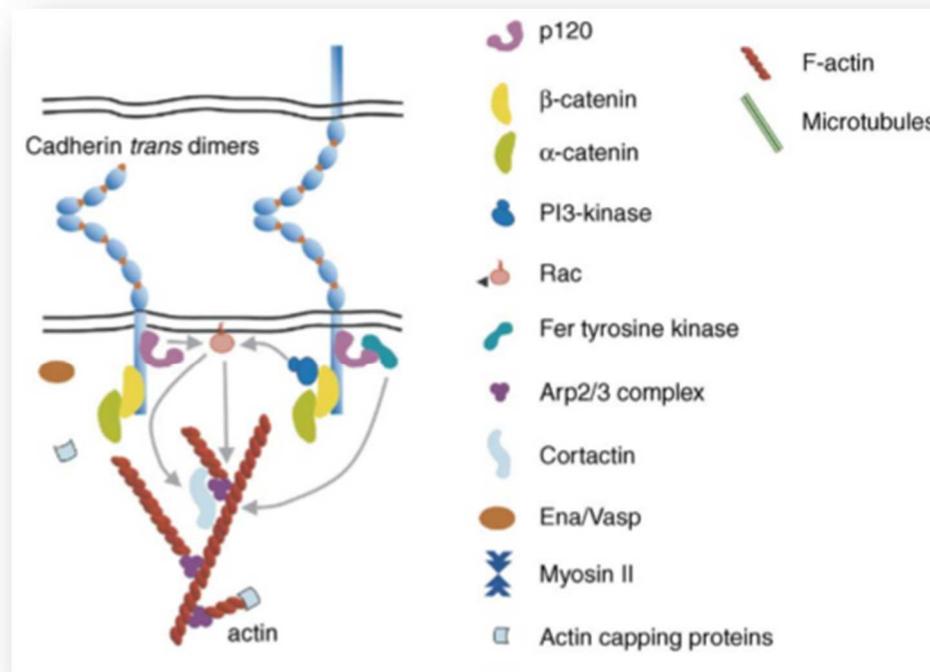
#### **3.2- Remodelage du cytosquelette dans l'établissement des contacts**

Au moment où les cadhérines à la surface d'une cellule rencontrent des molécules de N-cadhérine de cellules voisines, elles forment les premières interactions homophiliques. Cette liaison s'accompagne d'un bouleversement de l'organisation de la membrane et un remodelage différentiel du réseau d'actine (Mège *et al.*, 2006).

L'association des monomères aux extrémités moins dites « pointues » et extrémités plus dites « barbée » permet un allongement des filaments d'actine qui vont par la suite s'organiser en réseau. De nombreuses protéines interviennent pour lier les monomères, sectionner les filaments, lier ou stabiliser les filaments.

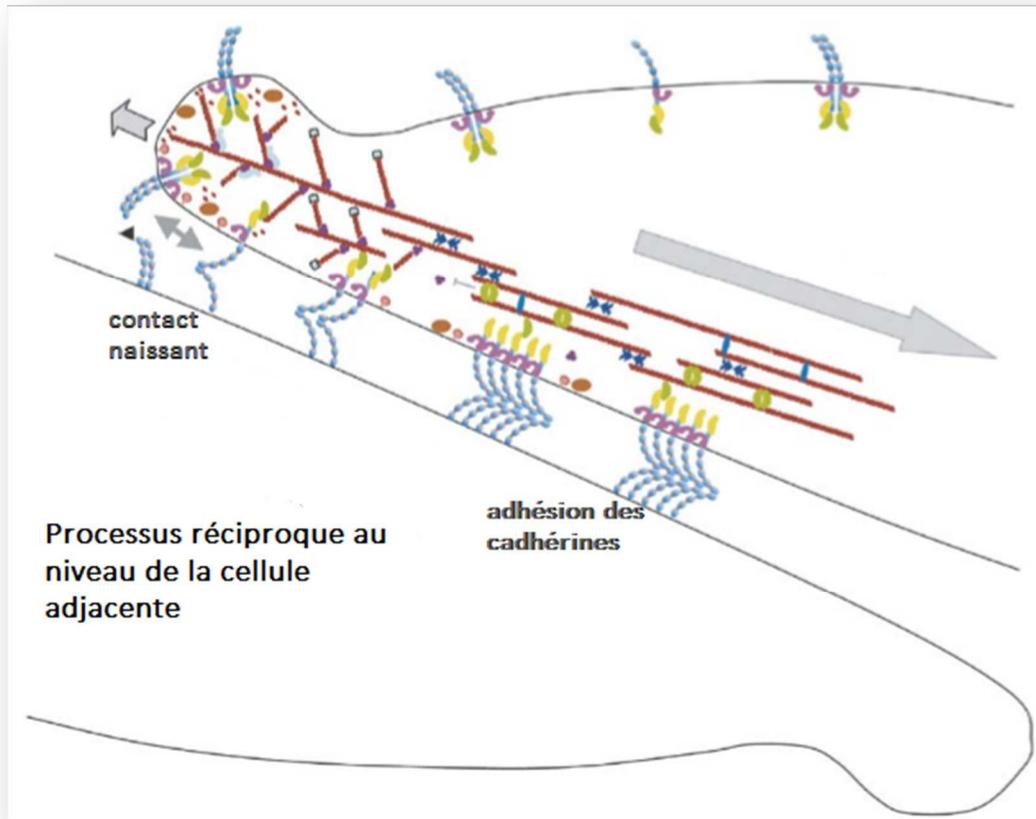
L'association des molécules de N-cadhérine associée à p120 induit l'activation de Rac et de la PI3K permettant la nucléation de l'actine par Arp 2/3 (Actin related protein 2/3) (Figure

4). Ce complexe nucléaire va s'associer à l'extrémité pointue d'un monomère d'actine puis à un filament déjà formé permettant le maillage de filaments d'actine. Un nouveau polymère d'actine est ainsi constitué, et va s'allonger grâce à des facteurs favorisant la polymérisation, tels que la profiline (Mège *et al.*, 2006 et Gentil Dit Maurin, 2010).



**Figure 4 :** Organisation de l'actine suite à la formation des premiers contacts cadhérine-cadhérine (Mège *et al.*, 2006).

La dynamique de formation des filaments d'actine ainsi régulée par des événements permanents et alternés de polymérisation et de dépolymérisation des monomères d'actine permet aux cellules de se déformer en formant des protrusions membranaires de type lamellipode\* (Figure 5).



**Figure 5 :** Représentation schématique de la formation du lamellipode suite aux interactions entre molécules de N-cadhérines de cellules voisines (**Mège *et al.*, 2006**).

Ces protrusions membranaires permettent d'agrandir la surface de contact entre deux cellules voisines ce qui favorise l'interaction des molécules de N-cadhérines de proche en proche. Ceci induit l'élargissement des membranes dans une direction et donc l'extension des contacts intercellulaires.

La N-cadhérine peut donc être considérée comme une molécule d'adhérence capable de réguler la formation de la jonction adhérente en favorisant la transduction des messages extracellulaires vers l'intérieur de la cellule et de générer ainsi des messages signalétiques (**Gentil Dit Maurin, 2010**).

### III- Cadhérines et migration cellulaire

#### 1- Migration cellulaire

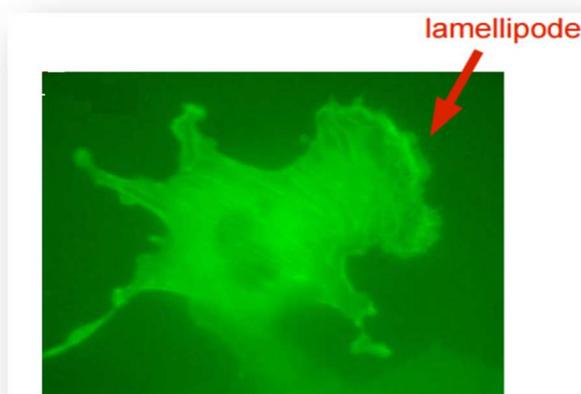
La migration cellulaire est la capacité de certaines cellules à se mouvoir, donc à effectuer des mouvements spontanés ou réactionnels (**Gautreau, 2013**). C'est un processus fondamental dans le développement embryonnaire. C'est notamment grâce aux déplacements coordonnés de cellules au cours de la gastrulation que se dessinent les grands axes d'organisation de l'organisme (**Stéphanou, 2006**).

Chez l'adulte, les migrations cellulaires sont moins répandues, mais néanmoins nécessaires aux cellules immunitaires qui se déplacent dans l'organisme à la recherche d'agents pathogènes ou pour la cicatrisation de blessures, par exemple.

L'actine, sous sa forme filamentueuse est un acteur majeur de cette dynamique, elle permet à la cellule de projeter sa membrane en formant les lamellipodes (**Figure 6**).

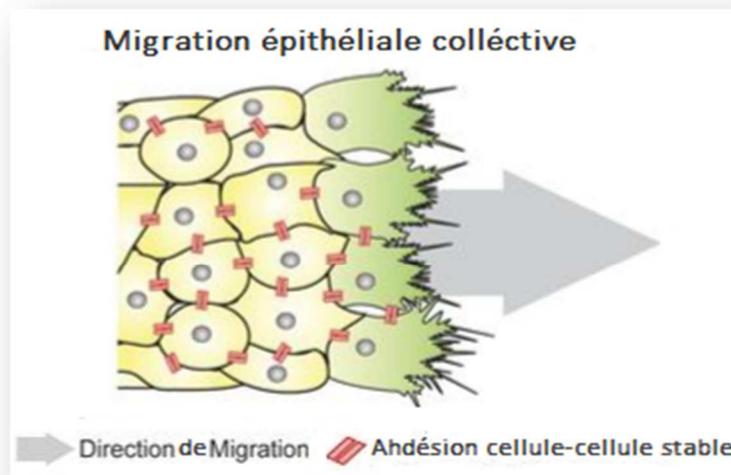
Cette dynamique est régulée par des événements permanents et alternés de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine. En effet, dans les lamellipodes, l'actine se polymérise en direction du mouvement et se dépolymérise en arrière (**Bard et al, 2008**).

La contraction des filaments d'actine est également à l'origine du déplacement des cellules et ce grâce à l'association de l'actine à la myosine, formant un complexe contractile : l'actomyosine (**Bard et al, 2008**) (**Lüllmann-Rauch, 2008**).



**Figure 6:** Visualisation en microscopie par fluorescence de l'actine (marquage GFP) à l'origine des lamellipodes d'une cellule de type fibroblaste (**Collin, 2004**).

Mise à part les cellules immunitaires, la plupart des types cellulaires migrent en groupe c'est-à-dire que les cellules se déplacent ensemble, on parle de migration collective (**Figure 7**). Elle permet aux cellules mobiles de guider voir d'emmener avec elles les cellules immobiles et elle facilite l'intégration de différents signaux pendant la migration par toutes les cellules du groupe afin de répondre collégialement à l'ensemble des stimuli externes (**Pégliion et Manneville, 2012**).



**Figure 7 :** Migration collective de cellules épithéliales. Les cellules épithéliales se déplacent en groupes cohésifs, maintenant des adhésions intercellulaires, les cellules leaders forment des protrusions orientés dans la direction de migration (**Scarpa E. et al., 2016**).

## 2- Rôle des cadhérines dans la migration cellulaire

L'ancrage des jonctions adhérentes au cytosquelette permet de maintenir l'adhérence entre cellules adjacentes qui se retrouvent « collées » les unes aux autres, mais également d'assurer un couplage mécanique entre les forces d'adhérence générées aux zones de contact intercellulaire et le reste de la cellule. Ce couplage permet aux cellules d'utiliser les cadhérines comme supports adhésifs pour promouvoir la migration cellulaire (**Peglion, 2012**). Le mécanisme à l'œuvre lors du couplage mécanique a été investigué *in vitro* grâce à l'utilisation de substrats artificiels de cadhérines. Ces études ont permis de mettre en évidence le rôle positif de la liaison à la N-cadhérine dans la migration du cône de croissance (**Bard, 2009 et Giannone et al., 2009**). Cette interaction génère des forces protrusives et contractiles nécessaires à l'avancée de la cellule.

En effet lorsque les cellules migrent sur un substrat de cadhérines, le couplage mécanique entre les jonctions adhérentes et le réseau contractile d'actomyosine sous-jacent fait intervenir les protéines intracellulaires (citées précédemment) liant l'actine aux cadhérines (Peglion, 2012).

Lors de la migration collective, les cadhérines maintiennent la cohésion intercellulaire grâce à leur lien avec le cytosquelette d'actine. En effet, les complexes cadhérines/caténines sont associés à la fois à des fibres d'actine qui se trouvent le long de la membrane plasmique en contact avec la cellule voisine, mais aussi avec des filaments d'actine perpendiculaires à la membrane plasmique, qui vont permettre les protrusions (Peglion *et al.*, 2012).

Cette liaison N-cadhérine-actine dynamique est nécessaire pour le mouvement intercellulaire au sein des amas de cellules pendant la migration cellulaire collective (Bradbury, 2012).

Les cadhérines promeuvent également un comportement coordonné des cellules en inhibant la formation des protrusions aux contacts intercellulaires et en favorisant leur formation aux bords libres des cellules (Theveneau *et al.*, 2010).

Plus encore qu'une jonction stable, la dynamique des cadhérines au sein de la cellule, pourrait donc jouer un rôle essentiel à la migration cellulaire par les voies de signalisation qu'elles activent lors de la formation des jonctions adhérentes. Elle permettrait une meilleure synchronisation entre les différents signaux pro et anti-migratoires. En effet, en tant que signal lui-même, l'interaction dépendante des cadhérines se doit d'être dynamique pour agir de manière transitoire à un moment donné et s'arrêter l'instant d'après (Peglion, 2012).

Il a été également montré que l'architecture solide des contacts intercellulaires formés par les cadhérines est également fondamentale pour que la cellule, qui migre, puisse se servir de la cellule, sous-jacente ou voisine, comme de support (Peglion, 2012).

Pour résumer, les jonctions adhérentes peuvent avoir des effets distincts, sur la migration cellulaire. En fonction du type cellulaire et du microenvironnement, les JAs (jonctions adhérentes) effectuées par les cadhérines favorisent la migration individuelle, la migration collective coordonnée ou participent à l'inhibition de la motilité après contact.

Compte tenu des nombreuses fonctions des jonctions adhérentes dans de nombreux processus physiologiques et particulièrement la migration cellulaire, on conçoit aisément

qu'une altération de leur intégrité ait des conséquences dramatiques pour l'organisme. Outre les défauts de développement embryonnaire générés, la perte des protéines formant les jonctions adhérentes participe à la progression invasive cancéreuse (**Peglion, 2012**).

#### **IV- Cadhérines et cancer**

##### **1- Cancer**

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire (tumeur) anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme. Au cours de l'évolution de la maladie, certaines cellules peuvent migrer de leur lieu de production et former des métastases dont la formation est un processus comprenant plusieurs étapes :

- Perte de la capacité d'adhésion intercellulaire ;
- Détachement de la matrice extracellulaire ;
- Sécrétion d'enzymes qui dégradent la matrice ;
- Envahissement des tissus voisins et des vaisseaux ;
- Développement de tumeurs malignes.

La capacité des cellules cancéreuses à se disséminer et à former des métastases à distance de la masse tumorale initiale est la cause principale de la mortalité associée au cancer (**Gupta et Massagué, 2006**), la compréhension du mécanisme à l'origine du détachement des cellules cancéreuses de la masse tumorale est donc fondamentale.

Les cadhérines, jouant un rôle clé dans les mouvements cellulaires du développement embryonnaire, sont des candidats majeurs pouvant relier l'adhérence intercellulaire et l'invasion tumorale.

##### **2- Rôle des cadhérines E et N dans le développement métastatique**

Les cadhérines jouent un rôle important dans les processus de développement ainsi que les processus pathologiques.

En effet, elles permettent le maintien des cellules les unes aux autres, elles sont également impliquées dans le phénomène d'inhibition de contact, c'est à dire que lorsque les cellules sont à confluence, les E-cadhérines inhibent leur croissance, leur permettant ainsi d'arrêter de proliférer.

Les cellules cancéreuses sont dépourvues de leurs cadhérines E, la fonction d'adhésion est perturbée ou compromise, il n'y a donc pas d'inhibition de contact.

Leur perte cause donc un désordre tissulaire, une migration cellulaire aberrante et provoque une dissémination des cellules cancéreuses et une dérégulation des voies de signalisation associées à la progression tumorale et donc formation de métastases dans différents cancers car il n'y a plus de maintien et de cohésion entre les cellules.

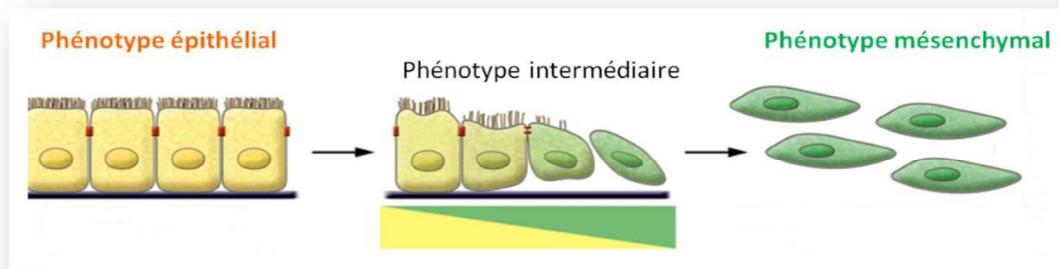
95% des cancers touchent les cellules épithéliales. Cette prépondérance a permis de récolter plus de données sur les altérations de la E-cadhérine lors de la propagation des cellules tumorales (**Peglion, 2012**).

La perte de l'expression ou de la fonction E-cadhérine dans les carcinomes épithéliaux a longtemps été considérée comme la principale raison de la perturbation des contacts cellulaires des cellules épithéliales serrés et la libération de cellules tumorales invasives à partir de la tumeur primaire. En effet, la E-cadhérine sert de suppresseur de l'invasion et de la croissance des cancers épithéliaux, et son élimination fonctionnelle représente une étape clé dans l'acquisition du phénotype invasif pour de nombreuses tumeurs.

Des preuves récentes indiquent cependant, que, en plus de la perte de E-cadhérine considéré comme "invasion suppresseur", une autre molécule d'adhésion, la N-cadhérine, devient régulée à la hausse dans les lignées cellulaires de tumeurs invasives. Il a été démontré que la N-cadhérine est présente dans les lignées cellulaires de cancer du sein invasif, et que son expression exogène dans des cellules tumorales induit une morphologie dispersée et la mobilité accrue due à la TEM : transition épithélio-mésenchymateuse, induisant l'invasion des tissus avoisinants et les métastases (**Hazan RB et al., 2004**).

### **3- La TEM : transition épithélio-mésenchymateuse**

Pendant le développement embryonnaire, la transition épithélio-mésenchymateuse se produit de manière contrôlée dans de nombreux tissus. Elle provoque la migration des cellules qu'elle transforme et participe à la morphogénèse des organes. Au cours de ce processus, les cellules épithéliales changent de morphologie et de comportement pour devenir motiles et invasives. Les cellules perdent leur polarité apico-basale, se détachent de l'épithélium, prennent une morphologie mésenchymateuse qui favorise l'infiltration des cellules dans les tissus (**Figure 8**).



**Figure 8 :** La transition épithélio-mésenchymateuse. Perte du phénotype épithélial (orange) et acquisition progressive d'un phénotype mésenchymateux (vert). Chaque phénotype est caractérisé par l'expression de marqueurs spécifiques. **(Kalluri et Weinberg, 2009).**

De nombreuses études ont montré ces dernières années qu'une TEM peut se produire anormalement dans certains adénomes ou hyperplasies épithéliales et conduire à la dissémination des cellules tumorales **(Thiery et Sleeman, 2006)**. En effet, dans la majorité des tumeurs épithéliales de hauts-grades, on retrouve la signature d'une TEM, associant la perte de la E-cadhérine à l'augmentation du niveau de la N-cadhérine **(Margaret J et al., 2008)**.

L'altération de la E-cadhérine dans ces tumeurs ne serait que la conséquence d'un programme du développement embryonnaire anormalement activé lors de la progression tumorale par différents signaux.

En plus de favoriser le détachement et la migration individuelle des cellules tumorales, l'échange de cadhérines pourrait faciliter l'invasion collective observée dans de nombreuses tumeurs. La perte de la E-cadhérine faciliterait le détachement de la masse tumorale et l'expression de la N-cadhérine suffirait à maintenir le groupe cohésif et à diriger la migration vers les vaisseaux sanguins par exemple **(Peglion, 2012)**.

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

Les conséquences fonctionnelles d'une TEM sur des cellules tumorales sont dramatiques au niveau de l'organisme. Celle-ci convertit des cellules à fort potentiel prolifératif mais encore immobiles et adhérentes en cellules invasives capables d'envahir le tissu interstitiel avoisinant et de passer dans la circulation sanguine **(Peglion, 2012)**.

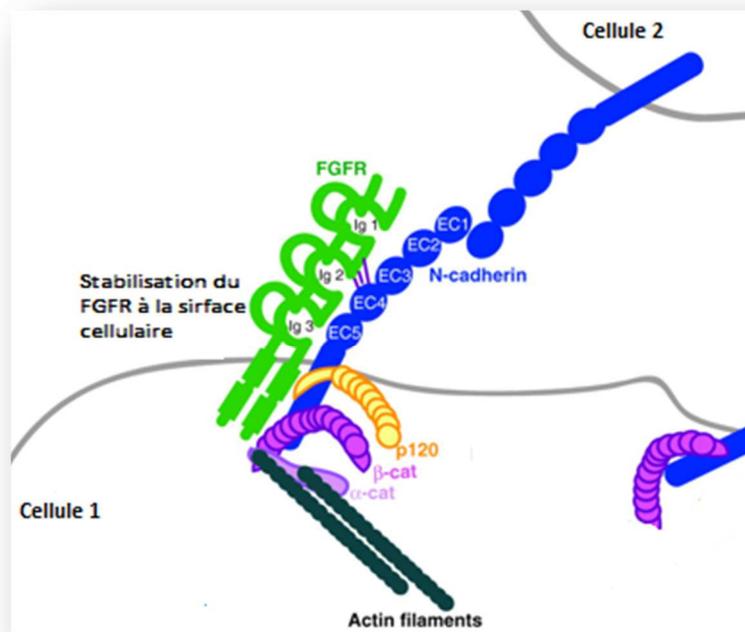
L'invasion cellulaire pourrait également être due à des voies de signalisations permises par un complexe formé à la surface cellulaire par la coopération entre la N-cadhérine et le récepteur de FGF (Fibroblast Growth Factor Receptor).

#### 4- Coopération des N-cadhérines avec le facteur de croissance FGFR

Les FGFRs (Fibroblast Growth Factor Receptors) sont les récepteurs des facteurs de croissance des fibroblastes. Ces protéines dont la taille varie entre 110 et 150 kDa, elles sont localisées à la surface cellulaire. Comme les cadhérines les FGFRs sont constitués d'une région N-terminale extracellulaire et une région C-terminale intracellulaire séparées par un domaine transmembranaire (**Figure 9**).

Les FGFRs sont capables de recevoir des signaux de l'extérieur via leur partie extracellulaire pour les transmettre à l'intérieur de la cellule et induire de nombreux messages cellulaires. Ces récepteurs ont généralement une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire. La transmission des messages à la cellule passe alors par l'autophosphorylation du récepteur sur les résidus tyrosine (**Guasch, 2002**).

La N-cadhérine interagit avec le récepteur de FGF et stabilise le récepteur sur la surface cellulaire (**Figure 9**).



**Figure 9** : Représentation schématique du complexe N-cadhérine/FGFR au niveau d'une jonction adhérente (Reiffers, 2011).

Après la liaison, le complexe FGFR/N-cadhérine induit déclenche de nombreuses voies de signalisation intracellulaires orchestrant les événements cellulaires clés, qui favorisent l'invasivité de la cellule.

Le complexe protéique ainsi formé permet notamment la production de la MMP-9 : Métalloprotéinase matricielle 9, enzyme qui a notamment la capacité de dégrader les composants de la matrice extracellulaire. Son augmentation confère ainsi aux cellules exprimant la N-cadhérine une plus grande aptitude à pénétrer les barrières de protéines de la matrice ce qui rend les cellules beaucoup plus invasives (**Nguyen et Mège, 2016**).

Ce complexe interviendrait également dans l'angiogenèse, c'est-à-dire la synthèse de nouveaux vaisseaux, qui constitue un mécanisme essentiel dans la réparation des tissus mais également dans le développement des tumeurs.

Les deux types de récepteurs (N-cadhérine et FGFR) sont impliqués dans la régulation de la migration cellulaire pendant le développement normal et la dérégulation lors de la progression du cancer. A l'heure actuelle, la synergie entre la N-cadhérine et FGFR et les effets combinés de leur dérégulation sont encore mal compris (**Nguyen et Mège, 2016**).

Cependant, dans certains cancers, comme les ostéosarcomes, la N-cadhérine peut se comporter comme un suppresseur de tumeur. Elle se révèle, par exemple, efficace pour inhiber la croissance tumorale et la formation de métastase du cancer du pancréas chez la souris (**Shintani *et al.*, 2008**).

La N-cadhérine peut donc avoir plusieurs fonctions: favoriser l'adhésion ou l'induction de la migration, tout dépend du contexte cellulaire.

## **OBJECTIFS DU TRAVAIL :**

Au cours de mon stage, notre objectif a été d'étudier dans un premier temps l'influence de la N-cadhérine sur la migration des cellules HEK (Human Embryonic Kidney). Ces cellules proviennent de rein embryonnaire humain, elles ont été choisies car elles sont dépourvues de toutes cadhérines.

Dans un second temps, nous avons analysé l'influence de la N-cadhérine et du complexe N-cadhérine/FGFR sur l'expression des partenaires intracellulaires et des cadhérines, principalement la  $\beta$ -caténine, la p120-caténine et la vinculine.

Pour cela, nous avons cultivé trois modèles de cellules HEK :

- 1 : Les cellules HEK dans leur forme native (HEK WT),
- 2 : Les cellules HEK préalablement transfectées avec la N-cadhérine seule (HEK Ncad)
- 3 : Les cellules HEK préalablement transfectées avec le complexe N-cadhérine/FGFR (HEK Ncad FGFR ou HEK NR)

Nous avons d'abord étudié la migration simultanée des cellules HEK WT et des cellules HEK Ncad. Nous avons comparé la vitesse de migration de ces deux types de cellules. Nous avons par la suite réalisé un marquage par immunofluorescence des protéines cytoplasmiques partenaire des cadhérines, nous avons comparé leur expression visuellement sur les trois modèles de cellules : HEK WT, HEK Ncad et HEK Ncad FGFR.

Pour confirmer les résultats de l'immunofluorescence, nous avons fait une séparation des protéines totales suivie d'un immunoblot et d'une quantification semi-quantitative des protéines spécifiques marquées, et ce, pour les différents modèles de cellules que nous avons cultivé.

## MATERIELS ET METHODES

Le stage pratique a été réalisé à l'institut de recherche Jaques Monod à Paris, dans l'équipe « Adhésion cellulaire et mécanique ».

Pour les manipulations que nous avons effectuées, nous avons utilisé les trois types de cellules que nous avons citées c'est-à-dire HEK WT, HEK Ncad et HEK Ncad FGFR.

Ces dernières étaient conservées à -180°C, il a donc fallu les décongeler avant de lancer leur culture.

### **1 - Décongélation et mise en culture des cellules (même procédure pour les trois types cellulaires)**

Préparation du milieu de culture (Cf annexe 1)

Decomplémentation du SVF (Sérum de Vœu Fœtal) (Cf annexe 2)

Nous prenons les cellules congelées à -180°C dans des tubes de 1,5ml, nous les mettons dans un bain marie à 37°C, une fois décongelées nous plaçons les cellules dans un tube de 15 ml et on complète avec du milieu de culture chauffé à 37°C qsp 5ml.

Homogénéiser en faisant des allers retours avec une pipette et placer le tout dans une flasque de 50ml que l'on met dans l'incubateur avec les conditions optimales de culture cellulaires : 37°C, atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> et environ 80 à 85% d'humidité.

Entretien des cellules (Cf annexe 3)

Conditions de stérilité et manipulations des cellules (Cf annexe 4)

Protocole de repiquage (Cf annexe 5)

### **2- Fabrication des moules en forme de canaux de 200µm de largeur (Cf annexe 6)**

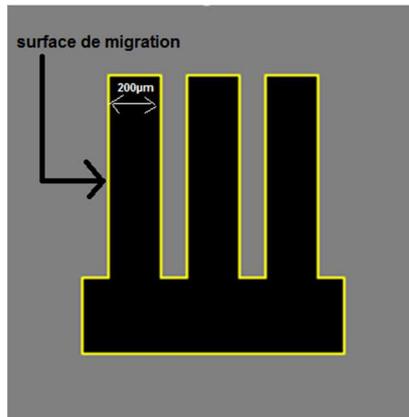
Fabrication de moules en forme de canaux de 200µm de largeur que nous posons sur des lamelles en verre recouvertes d'une résine (PDMS), les moules laissent leur empreinte sur la lamelle aboutissant à la formation de motifs en forme de canaux sur la surface des lamelles sur lesquels les cellules vont migrer (**Figure 10**).

Pour obtenir les moules sur lesquels nous pouvons faire migrer les cellules il y a trois principales étapes à suivre (celles-ci sont décrites en détails dans l'annexe 6) :

Préparation des patterns (moules de 200  $\mu\text{m}$ )

Préparation des lamelles recouvertes de PDMS,

Préparation des stamps PDMS (empreinte du moule).



**Figure 10 : Représentation schématique de la forme des moules fabriqués.** Ces moules sont constitués d'une surface commune où l'on dépose les cellules et de bandes de 200 $\mu\text{m}$  de large où vont migrer ces cellules.

### 3- Ensemencement des cellules dans les moules préfabriqués

Prendre les cultures de cellules arrivées à confluence dans les flasques de 50ml (cellules HEK WT, HEK Ncad),

- Aspirer délicatement tout le milieu,
- Ajouter 1ml de Cell Dissociation Solution (non enzymatique),
- Incuber quelques minutes (environ 5 minutes),
- Vérifier sous microscope inverse que les cellules sont bien décollées de la surface de la flasque.
- Décoller les cellules les unes des autres en faisant des allers retours à l'aide d'une pipette,
- Placer le tout dans un tube de 15ml,
- Rincer la flasque avec 2ml de milieu de culture, rajouter au tube de 15 ml,
- Centrifuger les tubes pendant 3 minutes à 1000rpm.
- Aspirer le surnageant (jeter),
- Ajouter au culot 70  $\mu\text{l}$  de milieu neuf,
- Pipeter plusieurs fois afin de resuspendre le culot cellulaire,
- Placer le tout sur la partie du moule non couverte par le bloc PDMS des lamelles.
- Incuber 25 minutes (temps nécessaire pour que les cellules adhèrent à la surface de la

lamelle),

- Rincer 2 fois en ajoutant 1ml de milieu neuf et aspirer.
- Remettre 1ml de milieu de culture neuf et placer dans l'incubateur entre 15 et 17 heures (ON : over night).
- Retirer les blocs PDMS pour permettre aux cellules de migrer puis remettre dans l'incubateur pendant au moins 6 heures.

#### **4- Biostation**

La biostation est un système compact d'incubation de cellules qui permet d'imager pendant un temps prolongé leur prolifération et leur migration. Il reproduit les mêmes fonctions qu'un incubateur ordinaire (température, taux d'humidité et de CO<sub>2</sub>) pouvant ainsi reproduire les conditions nécessaires au développement cellulaire, tout en étant combiné à un système d'imagerie en phase et en fluorescence.

Les cellules sont ici imagées pendant qu'elles migrent sur les moules fabriqués.

Réglages :

Microscope grossissement 10X

1 photo toutes les 6 minutes pendant 24 heures.

#### **5- Immunocytochimie**

Le principe de l'immunomarquage est de mettre en évidence une protéine d'intérêt. La méthode consiste à reconnaître un antigène spécifique de la protéine grâce à un anticorps primaire, qui va s'y fixer. On élimine l'excès d'anticorps par lavage, puis on utilise un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire. Cet anticorps secondaire est couplé à un fluorochrome qui, lorsqu'il est excité par un laser, va émettre un signal lumineux à une longueur d'onde précise. On peut alors l'observer à l'aide d'un microscope à fluorescence.

**Protocole d'Immunocytochimie :**

**JOUR 1 :**

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles en verre rondes dans des boîtes à 6 puits

- Aspiration du milieu.
- Rinçage des cellules avec du PBS 1X.

- Fixation des cellules avec du PFA 2% (laisser agir 20 minutes).
- Rinçage au PBS 1X.
- Perméabilisation des cellules avec du PBS 1X + BSA (0,5%) + Tritton\* (0,15%) pendant 30 minutes à température ambiante.
- Rinçage au PBS 1X (2 fois)
- Saturation des sites non spécifiques : par la sérum-albumine bovine (PBS-BSA 0,5%) pendant 30 minutes à température ambiante.
- Ajout des anticorps primaires (dilués au 1/100<sup>ème</sup> dans la BSA 0,5%) dans un volume total de 100 µl/lamelle.
- Recouvrir de papier humidifié pour éviter le dessèchement des cellules
- Incubation en chambre humide et noire à 4°C toute la nuit.

## **JOUR 2 :**

- Rinçage de d'anticorps primaire avec du PBS 1X.
- Ajout des anticorps secondaires correspondants (dilués selon les anticorps au 1/200<sup>ème</sup> ou 1/400<sup>ème</sup> dans un volume total de 50 µl/lamelle).
- Incubation de l'Ac secondaire pendant 2 heures température ambiante (à l'abri de la lumière).
- Lavage au PBS 1X (3 fois).
- Marquage des noyaux : par incubation avec du DAPI (dilution au 1/4000<sup>ème</sup> dans du PBS) à l'abri de la lumière pendant 5 minutes  
Sinon en cas de marquage de l'actine, incubation simultanée avec de la phalloïdine (molécule permettant de marquer les filaments d'actine) pendant 5 minutes.
- Lavage au PBS 1X pendant 5 minutes (à l'abri de la lumière).
- Montage sur lame dans une goutte de Mowiol\*.
- Conservation des lames à 4°C à l'abri de la lumière.

Nous avons fait deux immunocytochimies, une première où nous avons utilisé les cellules HEK WT et HEK Ncad pour marquer la vinculine + la  $\beta$ -caténine et la p120 + l'actine. Une seconde où nous avons marqué la myosine + l'actine et la vinculine chez les trois types de cellules (HEK WT, HEK Ncad et HEK Ncad FGFR).

**Remarque :** Les anticorps primaires utilisés proviennent du lapin, de la souris ou de la chèvre. Les anticorps secondaires sont produits chez l'âne ou la chèvre et marqués avec des fluorochromes en GFP ou Cy5, la N-cadhérine est marquée en Cy3 et les noyaux en DAPI.

## **Révélation**

Microscope à fluorescence de type Aoptome (ZEISS)

Grossissement 40X

Microscope relié à un ordinateur avec lequel nous pouvons prendre des photos.

## **Fluorochromes utilisés**

GFP (Green Fluorescent Protein) : émet une fluorescence verte à 488nm

Cy3 (Cyanine 3) : fluorescence rouge à 560nm

Cy5 (Cyanine 5) : fluorescence rouge lointaine à 650nm

DAPI : émet une fluorescence bleue brillante vers 450-490 nm

## **Balayage des différentes longueurs d'ondes** (Mise en évidence des protéines)

Sur l'ordinateur, nous observons d'abord les noyaux cellulaires à 460nm en DAPI (bleu) et nous choisissons un endroit où prendre une photo.

Nous changeons de longueur d'onde, à 488 nm pour faire apparaître les protéines marquées en GFP (vert) et nous prenons une photo au même endroit qu'avec le DAPI.

Même opération avec le Cy3 (rouge) à 560nm et le Cy5 (rouge lointain) à 650nm.

Pour faire apparaître toutes les protéines en même temps, chacune avec la couleur correspondant, à l'aide du logiciel Aoptome relié au microscope, on rassemble les photos prises avec les différentes longueurs d'ondes que l'on superpose. Toutes les protéines apparaissent ainsi sur une seule et même photo.

## **Tableaux représentatifs des protéines marquées et fluorochromes correspondants**

**Tableau I : Immunofluorescence 1**

	<b>Marquage</b>	<b>Protéines marquées</b>	<b>Fluorochromes correspondants</b>
<b>Cellules HEK WT et HEK Ncad</b>	1	$\beta$ -caténine	GFP
		Vinculine	Cy5
		N-cadhérine	Cy3
	2	p120 caténine	GFP
		Actine	Cy5
		N cadhérine	Cy3

**Tableau II : Immunofluorescence 2**

<b>Cellules</b>	<b>Marquage</b>	<b>Protéines marquées</b>	<b>Fluorochromes correspondants</b>
<b>HEK WT, HEK Ncad, et HEK NR</b>	1	Myosine	GFP
		Actine	Cy5
		N-cadhérine	Cy3

### **6- Extraction totale des protéines**

Même procédure pour les trois types de cellules cultivées

- Prendre les flasques de 50ml de culture cellulaire
- Rincer délicatement avec du PBS 1X
- Ajouter 1ml de Cell Dissociation Solution, laisser agir dans l'incubateur pendant 5 minutes
- Décrocher les cellules en faisant des allers retours avec une pipette
- Placer le tout dans un tube de 15 ml
- Centrifuger 3 minutes à 1000 rpm (obtention d'un culot cellulaire)
- Aspirer et jeter le surnageant
- Ajouter au culot 300µL de tampon de lyse (RIPA-N + anti protéases + anti phosphatases)
- Laisser sur glace 1 heure en secouant les tubes toutes les 10 minutes
- Faire 6 allers retours avec une seringue 26G
- Transférer dans des eppendorfs (1,5ml)
- Centrifuger pendant 10 minutes, 10000g à 4°C (obtention d'un culot de débris cellulaire et d'un surnageant contenant les extraits protéiques)
- Récupérer les surnageants dans des eppendorfs et conserver à -20°C.

### **7- Western blot (en PAGE SDS)**

- Décongeler les extraits protéiques (sur glace)
- Préparer 100µl de protéines + 100µl de SDS pour chaque extrait

Marqueurs de poids moléculaire : **Pré Stain Ladder**.

- Déposer 8 µl de marqueur dans le premier puit, et 20µl de chaque échantillon dans les autres puits.

- Effectuer une migration sur gel de polyacrylamide précoulé de type NuPAGE® 4% et 12% Bis-Tris Invitrogen (4% gel de concentration et 12% gel de séparation) dans du tampon de migration Mops 1X Invitrogen, à 120 Volt.

Après la migration, un transfert sur membrane de nitrocellulose a été effectué, grâce à un kit de transfert rapide **iBlot Gel Transfer Stack Nitrocellulose, Mini**.

Durée du transfert : 7minutes 30.

- Saturer les membranes dans une solution de PBS Tween + lait (PBS 1X, Tween 0,1%, Lait 5%).

## **8- Immunomarquage des protéines sur membrane de nitrocellulose (immunoblot)**

### **JOUR 1**

- Ajout des anticorps primaires (dilués au 1/1000<sup>ème</sup> dans un volume total de 1ml de PBS Tween + Lait)
- Garder toute la nuit à l'abri de la lumière à 4°C (chambre froide)

### **JOUR 2**

- Rincer l'anticorps primaire en faisant balancer les membranes dans du PBS Tween (0,1%) pendant 15 minutes.
- Ajout des Ac secondaires dirigés contre les Ac primaires (dilués au 10000 dans un volume total de 5ml de PBS Tween Lait)
- Recouvrir d'aluminium (pour tenir à l'abri de la lumière car les Ac sont photosensibles) et mettre à balancer (pour bien répartir l'Ac secondaire) pendant 2 heures à température ambiante.
- Rincer 15 minutes au PBS Tween et plonger les membranes dans de l'eau Mili Q avant de révéler et quantifier.

**Remarque** : Les protéines marquées sont : N-cadhérine, la vinculine, la  $\beta$ -caténine et la p120-caténine. Les anticorps primaires utilisés proviennent du lapin ou de la souris, les anticorps secondaires sont marqués avec des fluorochromes émettant des fluorescences lorsqu'ils sont excités à 700 ou 800nm.

## **Révélation**

Systeme Odycey

Fluorescence 700 ou 800nm

Intensité du fluorochrome : 6,5 à 700nm et 7,5 à 800nm

## **9- Quantification des bandes de protéines obtenues au Western Blot**

Le logiciel que nous avons utilisé est ImageJ (Fiji), il nous a permis la quantification des bandes obtenues à partir des profils électrophorétiques, nous avons ainsi pu en extraire des informations quantitatives.

L'expression des protéines (représentées par les bandes correspondantes) a pu être mesurée en quantifiant l'intensité des bandes pour chaque type de cellule. L'intensité des bande étant proportionnelle à l'expression de chaque protéine.

En sélectionnant les différentes bandes, Image J trace des pics en fonction de l'intensité de chaque bande puis on choisit de quantifier ces pics en mesurant l'aire de ces pics, le logiciel donne ainsi des valeurs représentant la surface de chaque pic en pixels, ces valeurs n'ont pas d'unité particulière.

Nous avons ainsi pu tracer les histogrammes représentant l'intensité des bandes pour chaque type de cellule (proportionnelle à la quantité de protéines présente donc à leur expression au niveau des jonctions).

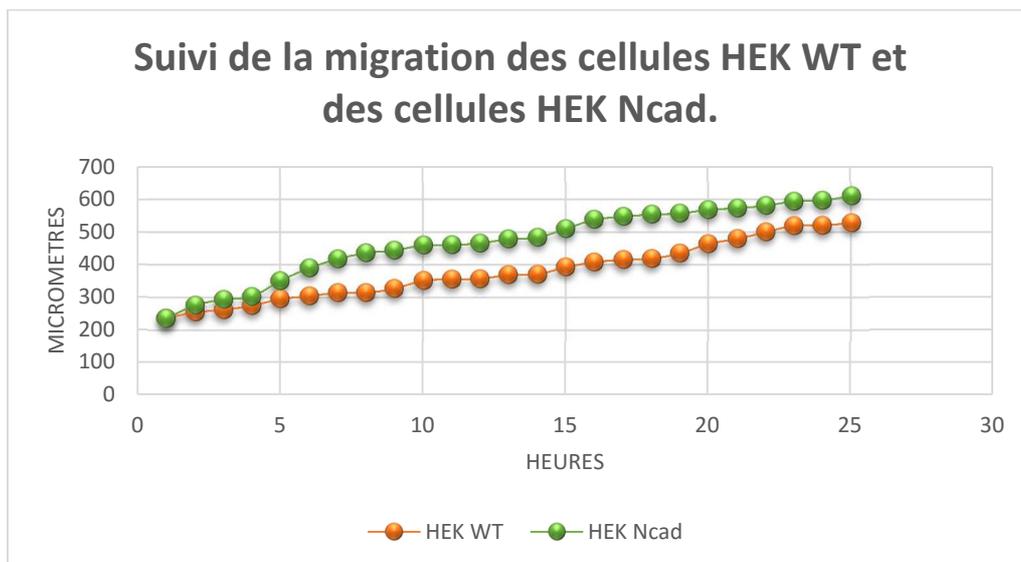
## RESULTATS ET DISCUSSIONS

### 1- Suivi comparatif de la migration des différents types de cellules HEK (Etude de l'influence de la N-cadhérine lors de la migration cellulaire)

L'avancement des deux types de cellules à travers les moules de 200 $\mu$ m de large que nous avons fabriqué est représenté par les deux courbes du graphe de la figure 11, les cellules HEK WT sont représentées en rouge et les cellules HEK Ncad en orange.

À première vue, nous pouvons dire que les deux courbes ont la même allure, c'est-à-dire relativement linéaire avec une évolution continue.

Nous observons cependant un écart dans l'évolution de la migration des deux modèles de cellules, cet écart est représenté par un angle plus élevé à partir de la quatrième heure de migration pour la pente qui représente les cellules de type HEK Ncad ce qui dénote d'une vitesse de migration plus élevée pour ce cellules.



**Figure 11** : Suivi comparatif de la migration des cellules HEK WT et des cellules HEK Ncad, en  $\mu$ m par heure.

Le graphe ci-dessus représente la distance que parcourent les cellules en  $\mu$ m par heures. Sur une moyenne de 9 échantillons par type de cellules. Sachant que nous avons pris une photo toutes les six minutes (10 prises par heure). Nous avons choisi pour la représentation graphique de prendre une distance sur dix donc la distance que parcourent les cellules toutes les heures pendant 24 heures. La distance de départ c'est-à-dire environ 235 $\mu$ m correspond à la distance à laquelle les cellules ont commencé leur migration (car nous leur avons laissé quelques heures pour adhérer et s'adapter à la surface de la lamelle).

Suite à cette migration, nous pouvons observer au niveau du tableau III (sur la moyenne des 9 échantillons), que les cellules WT ont migré d'environ 293µm en 24 heures et les Ncad d'environ 375µm. Les cellules transfectées avec la N-cadhérines (HEK Ncad) ont donc migré de plus de 80µm par rapport aux cellules HEK WT.

**Tableau III : Tableau comparatif de la migration des cellules HEK WT et HEK Ncad**

	Cellules HEK WT	Cellules HEK Ncad
Début de migration	235 µm	235 µm
Fin de migration	528 µm	610 µm
Distance moyenne parcourue	293 µm	375 µm
Temps écoulé	24 heures	24 heures
Vitesse moyenne de migration	12,2 µm/heure	15,62 µm/heure
Ecart de vitesse	3,43 µm/heure	

Tableau récapitulatif de la distance que parcourent les cellules HEK WT et HEK Ncad en 24 heures ainsi que la vitesse avec laquelle ces cellules avancent, ce qui nous a permis de calculer l'écart de vitesse entre ces deux types cellulaire.

Ces résultats suggèrent donc que la N-cadhérine stimulerait la migration de ces cellules. Elle influencerait la migration des cellules HEK en leur permettant de migrer plus vite puisque d'après ces résultats, la N-cadhérine stimule la vitesse moyenne de progression des cellules HEK.

Si la dynamique des jonctions adhérentes au sein de cellules épithéliales statiques a largement été étudiée, peu de données existent sur ce phénomène dans des cellules en migration. Certaines études ont cependant porté sur le rôle des cadhérines lors de la migration de différents types cellulaires, particulièrement la N-cadhérine car celle-ci accentuerait l'invasivité des cellules et donc la formation de métastases lors de certains cancers (**Bard L., 2009**).

Par exemple, au niveau de la migration du cône de croissance, des études ont permis de mettre en évidence le rôle positif de la liaison à la N-cadhérine (**Bard et al., 2008 ; Giannone et al., 2009**). Bard et ses collaborateurs expliquent ici que c'est l'interaction de la N-cadhérine au complexe contractile d'actomyosine qui permet l'avancée de la cellule.

La vitesse d'avancée du cône de croissance serait ainsi corrélée avec l'efficacité du couplage

mécanique entre la N-cadhérine et le flux rétrograde d'actine, et dépend de l' $\alpha$ -caténine et des autres protéines intracellulaires permettant la liaison de la cadhérine à l'actine (**Bard L., 2009**). Les interactions de la N-cadhérines avec ses partenaires cytosoliques génèrent des signaux pro ou anti-migratoires bien distincts, spécifique de chaque type cellulaire (**Peglion F., 2012**). Dans le cas des cellules que nous avons utilisé pour la réalisation de ce projet, c'est-à-dire les cellules HEK, les cellules migrent plus rapidement en présence de N-cadhérine, il s'agit donc évidemment de signaux pro-migratoires.

Une étude similaire concerne la migration des cellules germinales du poisson zèbre après une étude *in vivo* (**Kardash et al., 2010**). Ces recherches montrent que la migration de ces cellules serait impossible sans la liaison de la N-cadhérine à l'actine via la  $\beta$ -caténine. Les effets des interactions mutuelles entre les cellules qui expriment les cadhérines aboutissent donc à une régulation commune du cytosquelette, qui dirigera la migration cellulaire dans un environnement complexe et permettrait une avancée plus rapide des cellules lors de la migration collective.

Ces données nous permettent donc de confirmer nos résultats en montrant le rôle positif de la N-cadhérine lors de la migration des cellules, elles nous permettent également de conforter les idées impliquant la N-cadhérine dans l'invasivité des cellules lors de certains cancers.

La N-cadhérine peut cependant avoir la fonction inverse, c'est-à-dire inhiber la croissance tumorale dans certains cancers (**Shintani et al., 2008**), nous ne pouvons donc pas lui attribuer sans contexte le rôle de promoteur invasif, tout dépend du contexte cellulaire elle peut promouvoir ou ralentir la croissance cellulaire.

## 2- Immunocytochimie : marquage des partenaires intracellulaires des cadhérines

Les résultats des immunofluorescences réalisées sont représentés sur les photos 1, 2 et 3. Nous avons marqué les protéines intracellulaires partenaires des cadhérines dans un premier temps au niveau des cellules HEK WT et HEK Ncad (photos 1 et 2), ceci nous a permis de voir l'influence de la N-cadhérine sur l'expression de ces protéines. Dans un second temps nous avons marqué ces protéines au niveau des cellules HEK WT, HEK Ncad et HEK Ncad-FGFR pour voir en plus l'influence du complexe N-cadhérine/FGFR sur l'expression des protéines cytosoliques (photo 3).

Au niveau des cellules HEK WT et HEK Ncad nous avons d'abord marqué la vinculine et la  $\beta$ -caténine (voir photo 1), puis la p120-caténine et l'actine (voir photo 2).

Pour ce qui est des cellules HEK WT, HEK Ncad et HEK Ncad-FGFR, nous avons marqué la myosine et l'actine (voir photo 3).

Rappelons la couleur des fluorochromes utilisés, les molécules sont données au niveau des tableaux I et II dans la partie matériels et méthodes:

GFP : de couleur verte (vire au jaune) ;

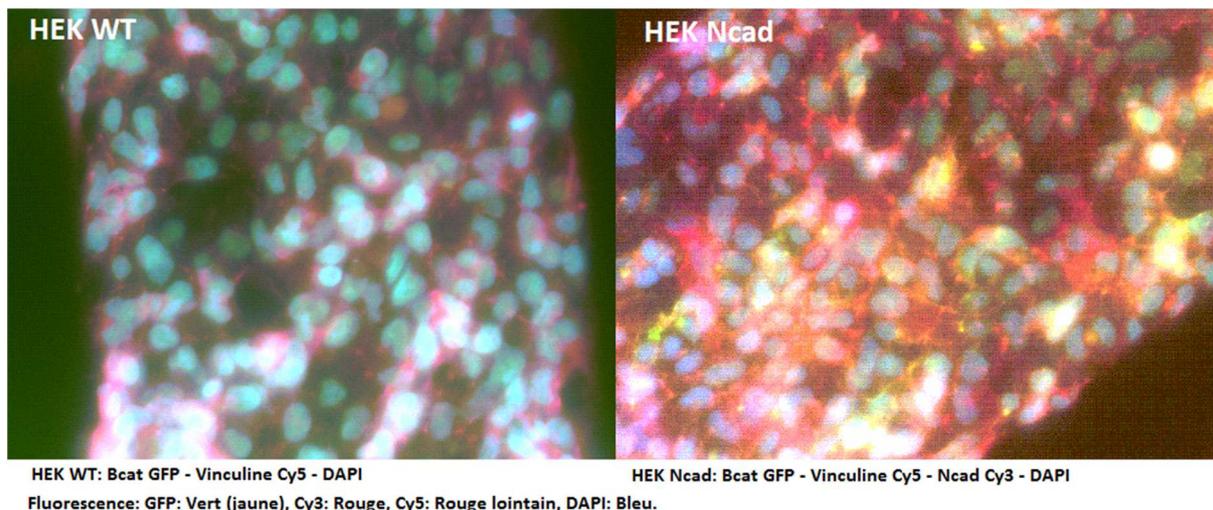
Cy3 : de couleur rouge ;

Cy5 : de couleur rouge lointaine ;

DAPI : de couleur bleue.

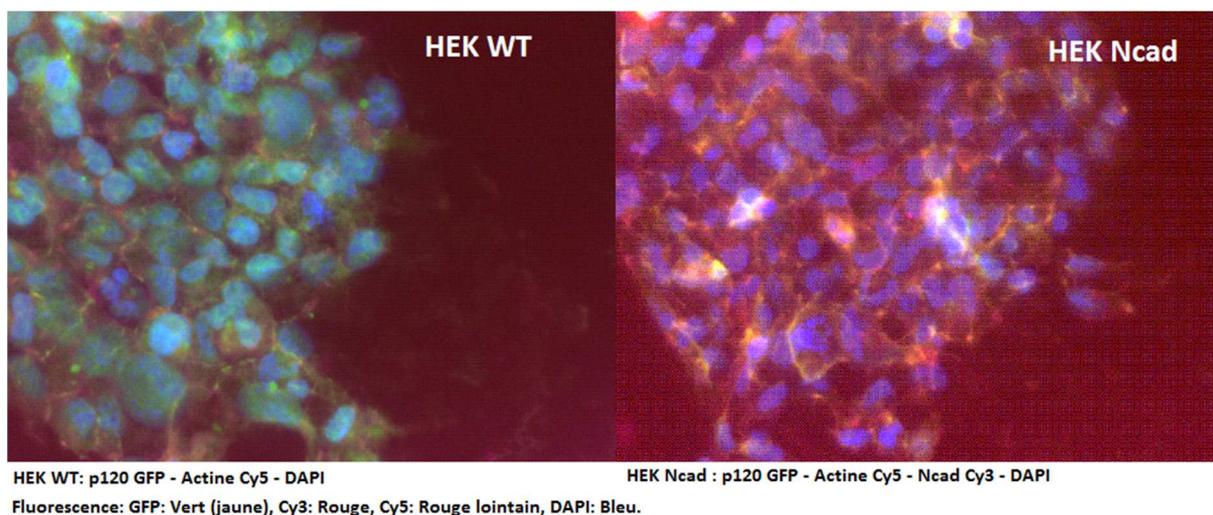
Les photos que nous avons obtenues nous ont permis de faire une analyse comparative sur la façon dont les partenaires intracellulaires des cadhérines s'expriment, et ce, en observant l'intensité de la fluorescence émise par les protéines en présence de N-cadhérine et en présence du complexe N-cadhérine/FGFR, il s'agit donc là d'une interprétation visuelle des résultats.

En observant la photo 1, nous remarquons qu'au niveau ces cellules HEK WT, la  $\beta$ -caténine, censée être visible en GFP, n'est pratiquement pas visible, la vinculine quant à elle est distinguée en rouge lointain (Cy5). Au niveau des cellules HEK Ncad, nous voyons correctement les protéines telles que la vinculine en Cy5 et la N-cadhérine entourant les cellules en rouge (Cy3). On distingue également clairement la  $\beta$ -caténine où le fluorochrome GFP tend plus vers le jaune. La couleur jaune du GFP censé apparaître en vert est due à la superposition des différentes couleurs. La superposition des rouges (Cy3 et Cy5) sur le GFP lui donne une teinte qui tend vers le jaune.



**Photo1** : Immunomarquage de la vinculine Cy5 et la  $\beta$ -caténine GFP au niveau des cellules HEK WT et HEK Ncad.

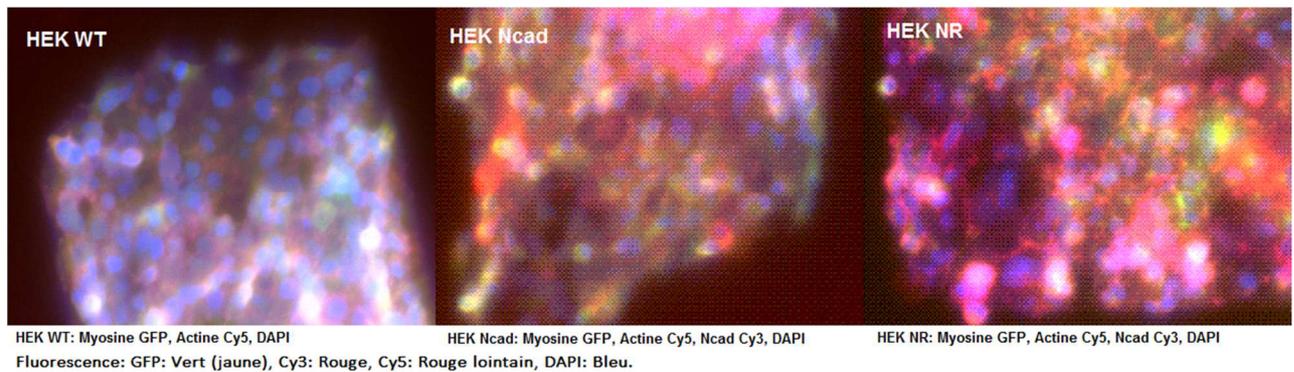
Sur la photo 2, où nous avons marqué la p120-caténine et l'actine, la p120-caténine en GFP (vert-jaune) est visible sur les cellules HEK WT et sur les cellules HEK Ncad en jaune de façon plus intense. La teinte jaune du GFP est également due à la superposition des différentes couleurs dues aux différents fluorochromes. L'actine en Cy5 (rouge lointain) quant à elle n'est pas visible au niveau des cellules HEK WT et légèrement perçue au niveau des HEK Ncad où nous percevons un léger voile rougeâtre au niveau des cellules.



**Photo 2** : Photos de l'immunomarquage de la p120-caténine GFP et l'actine Cy5 au niveau des cellules HEK WT et HEK Ncad.

La photo 3 montre le marquage de la myosine en GFP que nous ne voyons pas au niveau des cellules HEK WT. Au niveau des cellules transfectées avec la N-cadhérine, malgré la mauvaise qualité de la photo, nous percevons des reflets de verts qui tirent vert le jaune, il s'agit de la myosine. Quant aux cellules transfectées avec la N-cadhérine et le FGFR, nous distinguons assez bien la myosine en vert-jaune, particulièrement sur le côté haut de la photo. Même constatation pour le GFP qui tire également ici vers le jaune, couleur due à la superposition des différents fluorochromes.

Sur cette photo, l'actine a été marquée en Cy5 qui doit apparaître en rouge lointain, et tout comme la myosine, elle n'est pas visible au niveau des HEK WT, elle est à peine appréciée au niveau des cellules HEK Ncad mais nous arrivons quand même à la distinguer au niveau des cellules HEK-Ncad FGFR en plus de la N-cadhérine en rouge (entourant les cellules).



**Photo 3** : Photos de l'immunomarquage de la myosine GFP et de l'actine Cy5 au niveau des cellules HEK WT, HEK Ncad et HEK NR.

**Remarque** : Les prises de vue obtenues manquent de clarté, et ce, compte tenue de la qualité des fluorochromes utilisés. Après de nombreux essais, c'est le meilleur résultat auquel nous avons abouti.

Les observations énumérées précédemment nous ont permis de constater une augmentation de l'intensité des protéines en présence de N-cadhérine, les couleurs représentant les protéines sont en effet mieux visibles au niveau des photos représentant les cellules transfectées avec la N-cadhérine.

Ces résultats nous laissent penser que la N-cadhérine influencerait positivement l'expression de ses partenaires intracellulaires (vinculine,  $\beta$ -caténine, p120-caténine, actine...), c'est-à-dire que sa présence stimulerait l'expression de ces dernières. En effet, la N-cadhérine lie certaines de ces protéines directement telles que la p120-caténine et la  $\beta$ -caténine et d'autres

indirectement telle que l'acine, elle permet donc leur recrutement permanent au niveau des jonctions (**Plesent, 2012**), ce qui explique donc la hausse de l'expression de ce protéines en sa présence.

La photo 3 nous a permis de remarquer qu'au niveau des cellules HEK Ncad-FGFR, il y a une hausse de l'intensité des protéines, et ce, comparé aux deux autres types cellulaires. Les fluorochromes sont dans ce cas d'une intensité plus prononcée que les cas précédents, ce qui montre une hausse plus importante de l'expression des partenaires cytoplasmiques des cadhérines en présence de N-cadhérine et du récepteur de FGF. Ce qui pourrait mettre en évidence la coopération positive du complexe N-cadhérine/FGFR.

En effet, en se fixant à la N-cadhérine, le récepteur de FGF acquière une stabilité lui permettant de devenir actif et ainsi induire une augmentation de l'expression des N-cadhérines (**Nguyen et Mège, 2016**) qui à leur tour en se liant à leurs partenaires cytoplasmiques, vont les recruter davantage et donc induire une plus grande expression de ces derniers. Ceci pourrait expliquer les résultats que nous avons obtenus.

Une analyse visuelle n'étant pas toujours fiable, les résultats qui suivent, portent sur l'analyse des Western Blots et la quantification des différentes protéines marquées pour les trois modèles de cellules utilisées. Ces résultats serviront de test de confirmation à l'immunomarquage que nous avons réalisé.

### 3- Quantification des protéines après Western Blot

Les profils électrophorétiques obtenus suite à l'immunomarquage fait à partir des Western Blot sont représentés au niveau des figures 12a, 13a et 14a. Nous avons choisi de marquer la N-cadhérine (figure 12a) et trois partenaires intracellulaires de cette dernière ; la vinculine (figure 13a), la  $\beta$ -caténine (figure 13a) et la p120-caténine (figure 14a). Les histogrammes correspondants représentent l'expression des différentes protéines d'adhésion cellulaire (N-cadhérine et partenaires intracellulaires) pour les trois types de cellules : HEK WT, HEK Ncad, HEK Ncad FGFR.

Des informations quantitatives ont été extraites à partir de ces profils électrophorétiques et ce, grâce au logiciel Image J. Ce logiciel nous a permis de mesurer l'intensité des bandes pour chaque type de cellule.

Nous avons ainsi pu tracer les histogrammes représentant l'intensité des bandes pour chaque type cellulaire (l'intensité étant proportionnelle à la quantité de protéines présente au niveau des jonctions donc à leur expression à ce même niveau).

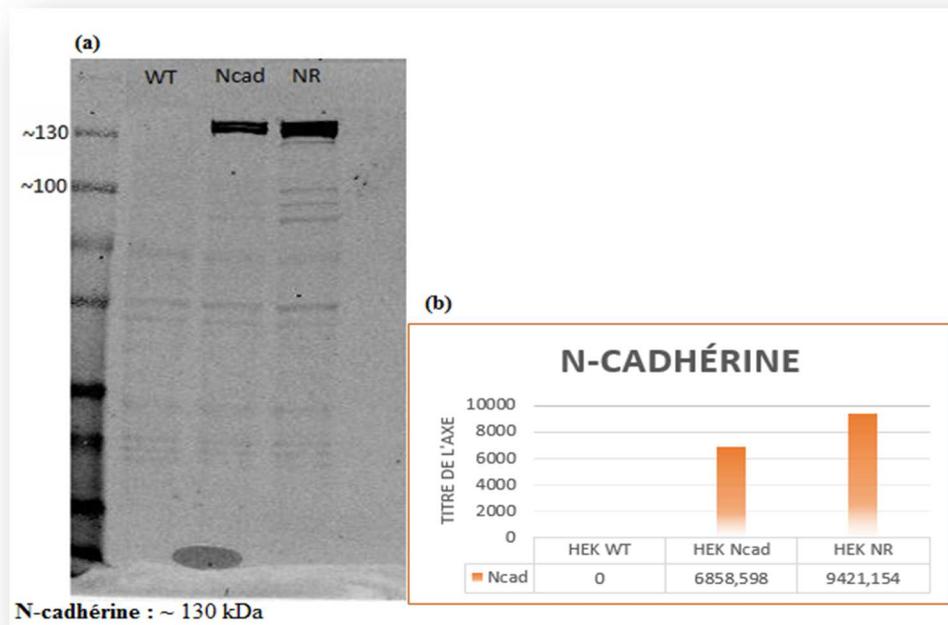
Nous rappelons que ces valeurs n'ont pas d'unité, il s'agit là d'une quantification relative.

Les résultats donnés par ces histogrammes (voir figures 12b, 13b et c, 14b) nous ont donc permis de faire une étude comparative de l'expression de chaque protéine individuellement et ce pour les cellules HEK WT, HEK Ncad et HEK Ncad FGFR.

En observant ces histogrammes, chacun représentant la façon dont une protéine s'exprime pour les trois types de cellules, on remarque qu'ils ont tous la même allure.

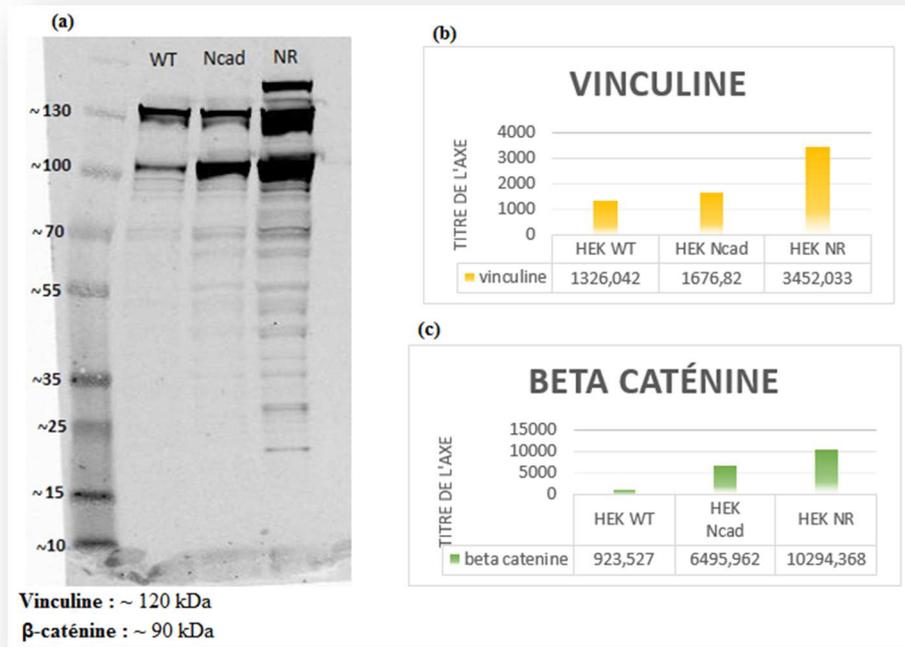
On note que l'expression des protéines de jonctions est faible au niveau des cellules HEK WT, elle est plus élevée en présence de N-cadhérine et encore plus élevée en présence de N-cadhérine et du récepteur de FGF.

Comme observé au niveau de la figure 12b, la N-cadhérine est absente chez les cellules HEK WT, ce pourquoi ces cellules ont été choisies, son expression est plus importante au niveau des cellules HEK transfectées avec celle-ci, elle est encore plus exprimée au niveau des cellules HEK possédant en plus de la N-cadhérine le récepteur de FGF.

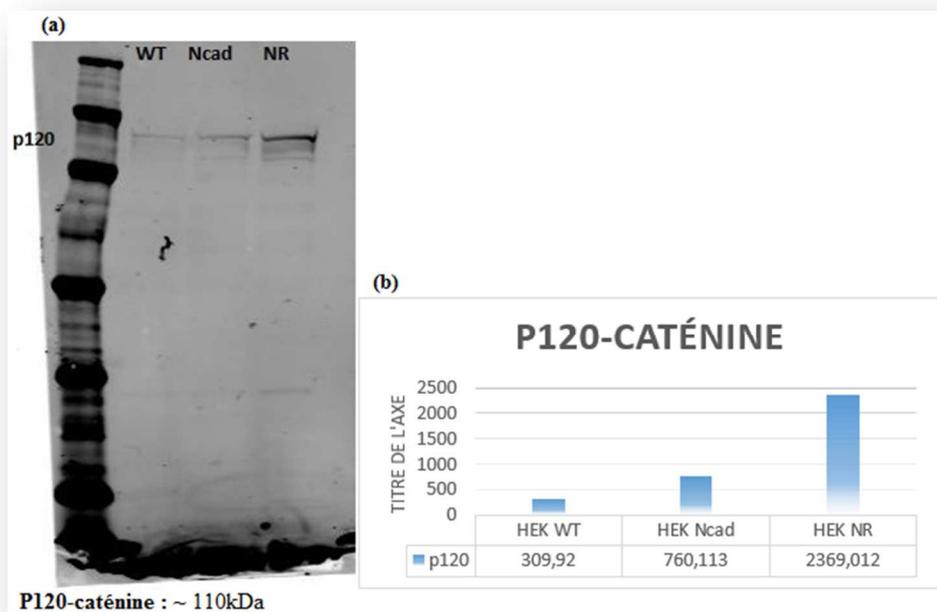


**Figure 12 : Quantification relative de la N-cadhérine au niveau des différents types cellulaires (HEK WT, HEK Ncad, HEK NR). (a) Profil électrophoretique représentant la N-cadhérine au niveau des trois types cellulaires. (b) Histogramme représentant l'intensité des bandes de N-cadhérine (relative à son expression) pour chaque type cellulaire.**

En ce qui concerne les protéines servant de partenaires intracellulaires des cadhérines dont les histogrammes sont représentés en figure 13b pour la vinculine, 13c pour la  $\beta$ -caténine et 14b pour la p120-caténine, le constat est le même, c'est-à-dire que la présence de N-cadhérine induit une plus grande quantité de ces protéines et la présence du complexe N-cadhérine-FGFR induit une encore plus grande quantité, ainsi révélé par l'intensité des bandes au niveau des profils.



**Figure 13 : Quantification relative de la vinculine et de la β-caténine au niveau des trois types cellulaires (HEK WT, HEK Ncad, HEK NR). (a) : Profil electrophoretique représentant les bandes de Vinculine et β-caténine pour les trois types cellulaires. (b) (c) : Histogrammes représentant l'intensité des bandes de Vinculine et β-caténine (relative à leur expression) pour chaque type cellulaire.**



**Figure 14 : Quantification relative de la p120-caténine au niveau des trois types cellulaires (HEK WT, HEK Ncad, HEK NR). (a) : Profil electrophoretique représentant les bandes de p120-caténine pour les trois types cellulaires. (b) : Histogramme représentant l'intensité des bandes de p120 (relative à son expression) pour chaque type cellulaire.**

Ces résultats nous permettent de déduire que les protéines d'adhésion cellulaire partenaires au cadhérines sont exprimées plus fortement chez les cellules possédant la N-cadhérine et encore plus fortement chez les cellules HEK transfectées avec la N-cadhérine et le FGFR.

Ces résultats nous mènent ainsi à penser que la présence de la protéine N-cadhérine au niveau des cellules HEK induirait une augmentation de l'expression de ses partenaires intracellulaires, ce qui concorde avec ce que nous avons obtenu en immunocytochimie, donc ce à quoi nous nous attendions puisque malgré l'absence de cadhérines au niveau des cellules HEK, les protéines intracellulaires (telles que la vinculine, la  $\beta$ -caténine ainsi que la p120-caténine) sont présentes. Elles sont donc recrutées par la N-cadhérine, et plus ces protéines sont recrutées plus elles sont synthétisées et donc plus exprimées dans les cellules.

Pour ce qui est des cellules transfectées avec la N-cadhérine et le FGFR, il y a également une hausse de l'expression des protéines servant de partenaires intracellulaires aux cadhérines par rapport aux deux autres types cellulaires, ce qui était également attendu et qui prouve la coopération positive entre la N-cadhérine et le récepteur de FGF.

En effet, des travaux réalisés par Charlotte Plesent montrent que la N-cadhérine interagirait avec le FGFR au niveau de son domaine extracellulaire. Cette interaction déclencherait des cascades de signalisations menant à une croissance cellulaire accrue (**Plesent, 2012**).

Nguyen et Mège confirment quant à eux qu'une forme active de FGFR augmente l'expression de N-cadhérines (**Nguyen et Mège, 2016**). Cette augmentation module l'environnement moléculaire de la N-cadhérine car celle-ci y lie des partenaires membranaires et cytoplasmiques qu'elle recrute davantage (**Peglion, 2012**).

Une augmentation de la croissance cellulaire accompagnée d'une surexpression de la N-cadhérine permettrait donc un recrutement plus important des partenaires intracellulaires de la N-cadhérine, en l'occurrence la vinculine la p120-caténine et la  $\beta$ -caténine. Ceci expliquerait l'augmentation de l'expression de ces protéines intracellulaires et rendrait ainsi clair les résultats que nous avons obtenu que ce soit en immunocytochimie ou pour les Western Blots.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ce stage nous avons étudié l'influence de la N-cadhérine sur la migration des cellules et sur l'expression de ses partenaires intracellulaires au niveau de cellules dépourvues de toutes cadhérines : les cellules HEK ; Human Embryonic Kidney.

Pour cela, nous avons cultivé des cellules HEK WT (forme native : dépourvues de toutes cadhérines), des cellules HEK Ncad (cellules HEK transfectées avec la N-cadhérines), et des cellules HEK NR (cellules transfectées avec la N-cadhérine et le FGFR).

Nous avons fait migré les cellules HEK WT et HEK Ncad dans le but de voir si la présence de N-cadhérine influence la migration des cellules HEK. Nos résultats nous ont clairement permis d'établir un lien entre l'engagement de la N-cadhérine et la motilité des cellules HEK puisque la présence de la N-cadhérine a induit une augmentation de la vitesse de migration des HEK.

Nous avons ensuite marqué au niveau des trois types cellulaires (HEK WT, HEK Ncad et HEK NR) les partenaires intracellulaires des cadhérines, en l'occurrence la vinculine, la p120-caténine, la  $\beta$ -caténine et l'actine.

Ces expériences nous ont d'abord permis montrer que la présence de N-cadhérines induit une expression plus forte de ses partenaires cytoplasmiques. Nous avons également pu voir que la présence du FGFR en plus de la N-cadhérine induisait une encore plus forte expression des protéines intracellulaires faisant le lien entre les cadhérines et l'actine. Ceci nous a permis de mettre en évidence la coopération du complexe N-cadhérine/FGFR qui permet d'augmenter l'invasivité des cellules en activant certaines voies de signalisation. Ce complexe permet également de favoriser l'expression de N-cadhérines qui vont à leur tour recruter davantage leurs partenaires cytoplasmiques.

En complément des expériences déjà réalisées, il serait intéressant de faire une immunoprécipitation des cadhérines et de révéler les protéines qui lui sont associées. Afin de confirmer quelles sont les protéines qui pourraient être directement recrutées par les cadhérines.

Ce travail a été réalisé dans le but d'approfondir nos connaissances concernant le rôle de la N-cadhérine, protéine qui attise toutes les convoitises des chercheurs depuis de nombreuses années car elle accentuerait le développement métastatique lors de certains cancers.

Pour conclure, suite à ces expériences la question que je me pose est : pourquoi ne pas, transfecter des cellules cancéreuses avec des N-cadhérines ?

En effet, il serait intéressant de suivre l'évolution de cellules cancéreuses transfectées avec la N-cadhérine en réalisant ces mêmes expériences pour voir si comme dans notre cas elles promeuvent l'invasion ou au contraire elles permettraient un renforcement des liens au niveau des jonctions, ce qui permettrait une mécano-transduction des signaux plus coordonnée donc une meilleure communication entre les cellules. Ce qui induirait un équilibre des tissus et empêcherait ainsi le développement anarchique des cellules causant les métastases lors des cancers.

# **ANNEXES**

## **Annexe I**

### **Préparation du milieu de culture**

450ml de DMEM + 50ml de SVF decomplémenté + 5ml de PS (pénicilline + streptomycine).  
Les milieux ainsi préparés sont conservés au réfrigérateur à 4°C et placés dans un bain marie à 37°C 20 à 30 minutes avant leur utilisation.

## **Annexe II**

### **Decomplémentation du SVF**

Chauffage du SVF à 56°C pendant 30 minutes.

## **Annexe III**

### **Entretien de cellules**

La culture cellulaire est réalisée dans des flasques de 50 ou 200ml, avec du DMEM. Ce milieu contient du Sérum de Veau Fœtal (SVF), de la pénicilline et de la streptomycine.  
Les cellules sont ensuite mises en incubateur à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont repiquées lorsqu'elles arrivent à environ 80-90% de confluence.

## **Annexe IV**

### **Conditions de stérilités et manipulations des cellules**

La culture cellulaire nécessite des conditions de stérilité absolues, toute contamination microbienne entraîne la lyse des cellules. C'est pourquoi on manipule dans des salles réservées à cet effet appelées chambres de culture cellulaire avec un sas à l'entrée qui est une petite pièce pour le rangement et la désinfection des mains.

Les cellules sont manipulées sous une hotte à flux laminaire, hotte qui génère un air purifié en particules car elle est équipée d'un système de filtration d'air. Elle génère également un flux d'air laminaire c'est-à-dire unidirectionnel et homogène.

Nous avons travaillé sous hotte à flux laminaire vertical où l'air est soufflé du « plafond » de la hotte et repris par des perforations sur les parois latérales, l'empêchant de ressortir vers le manipulateur ou l'environnement. Ceci crée donc une zone de manipulation stérile.

La zone de manipulation doit également être le plus propre possible, par décontamination régulière utilisant un décontaminant de surface (alcool). Par précaution, il faut également

nettoyer et décontaminer toute surface entrant dans la hotte : les flacons, les bouteilles, les gants, les mains... etc

Les cellules sont cultivées dans des flasques en plastique jetables stériles de 50ml ou 200ml que l'on place dans un incubateur régulièrement nettoyé.

## **Annexe V**

### **Protocole de repiquage (sous hotte à flux laminaire)**

- Aspiration du milieu.
- Lavage avec 10mL de PBS puis aspiration.
- Ajout de 3mL de trypsine 0,05% EDTA puis incubation à 37°C pendant 5 à 10 min, vérification sous microscope inversé que les cellules sont bien décollées de la surface.
- Pipetage dans une flasque de 200ml
- Rinçage de la petite flasque avec 3ml de milieu de culture neuf
- Compléter la nouvelle boîte de culture de milieu neuf qsp 10ml (4ml)
- Incuber

## **Annexe VI**

### **Fabrication des moules en forme de canaux de 200µm de largeur**

#### **Préparation des patterns : moules de 200 µm**

Sous une hotte, à l'aide d'une pipette, prélever du PDMS et couler sur les wafers (plaquette avec le motif désiré) de 200 µm de largeur (le PDMS va épouser parfaitement les motifs, puis durcir lorsqu'on le chauffe).

Placer à 80°C ON (Over Night).

#### **Préparation des lamelles recouvertes avec du PDMS (sur paille)**

Lavage des lamelles en verre (environ 2,5 cm de diamètre)

Placer les lamelles dans de l'alcool,

Soniquer dans le Plasma cleaner\*,

Rincer à l'eau et sécher en chassant l'eau,

Placer une goutte de PDMS à l'aide d'une pipette au centre de la lamelle, et à l'aide du spin coater faire pivoter la lamelle pour étaler le PDMS (permet de répartir le PDMS de façon homogène sur l'ensemble de la lamelle pour obtenir une surface bien lisse).

Placer les lamelles à 80°C ON.

## **Préparation des stamps PDMS (empreinte du moule)**

### **Microcontact printing**

Démuler les patterns de 200µm préparés, couper des blocs (9 moules par bloc) ;

Les retourner pour avoir la partie avec les moules au-dessus.

Mettre 100µl de fibronectine (5µl de Fn dans 100µl de PBS 1X) par-dessus, veiller à ce qu'il y en ait sur toute la surface.

Incuber 1 heure à T° ambiante, à l'abri de la lumière.

Mettre les lamelles recouvertes avec du PDMS sous UV pendant 15 minutes pour les activer.

Rincer les moules avec du PBS 1X.

Sécher en chassant l'eau avec une pompe à air.

Couper en bandes de 3 moules.

Placer les bandes sur les lamelles en verre avec PDMS activées aux UV (coté avec Fn sur le PDMS).

**Bloc placing** (pacage du moule sur la lamelle recouverte de PDMS pour y laisser son empreinte)

Marquer au feutre l'endroit où se trouve le début de migration et les bandes de migration.

Placer les lamelles dans les boîtes de 6 puits,

Bloquer la surface avec 1ml de Pluronic 2%

Retirer les moules des lamelles (celles-ci ont laissé leurs empreintes sur les lamelles)

Laisser incuber 1 heure avec le Pluronic à température ambiante.

Aspirer le Pluronic,

Rincer avec du PBS 1X

Sécher les lames en chassant l'eau.

Couper des bandes de PDMS rigides et placer sur la surface de migration pour la bloquer (éviter que les cellules ne s'y fixent)

Mouiller avec un peu de milieu de culture pour éviter le dessèchement avant l'ensemencement des cellules (étape décrite dans le matériel et méthode).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Bard L., Boscher C., Lambert M., Mège RM., Choquet D., Thoumine O.** (2008). A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration. *The Journal of Neuroscience*. 28:5879-90.

**Bard L.** (2009). *Dynamique des interactions protéiques lors de la maturation synaptique*. Thèse de doctorat ; Sciences Biologiques et Médicales. Bordeaux : Université Victor Segalen Bordeaux 2.

**Bohineust A.** (2013). *Rôle de la réorganisation du cytosquelette des cellules T CD4+ à la synapse immunologique dans les fonctions T*. Thèse de doctorat ; Immunologie. Paris : Université Paris V Descartes.

**Bradbury J.** (2012). N-cadherin and cell migration. *Journal of Cell Science*. 125: e1506.

**Camand E., Peglion F., Osmani N., Sanson M., Etienne-Manneville S.** (2012). N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration. *Journal of Cell Science*. 125: 844-857.

**Courjean O.** (2006). *Mécanisme et régulation de l'interaction entre molécules de cadhérines*. Thèse de doctorat ; Sciences du Vivant. Paris : Université Paris-Diderot.

**Elena E., Mayor R.** (2016). Collective cell migration in development. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 212 (2) : 143-155.

**Gautreau A.** (2013, 16 oct.) Migration cellulaire : découverte d'une protéine, frein et volant de la cellule. *Communication du CNRS*. Repéré à <http://www2.cnrs.fr/presse/communique/3285.htm> .

**Gentil Dit Maurin A.** (2010). *Propriétés différentielles de la VE- et de la N-cadhérine dans l'endothélium vasculaire*. Thèse de doctorat ; Biologie Cellulaire. Grenoble : Université Joseph-Fourier.

**Giannone G., Mege R.M., Thoumine O.** (2009). Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends Cell Biol*. 19:475-86.

**Guasch G.** (2002). *Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) réarrangés dans les hémopathies malignes*. In: IMGT Education (Lefranc M.-P. and Lefranc G., eds). IMGT, the international ImmunoGeneTics information system®, <http://www.imgt.org>, Montpellier, France.

**Gupta P., Massagué J.** (2006). Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*. 127(4):679-95.

**Hazan RB, Qiao R., Keren R., Badano I., Suyama K** (2004). Cadherin switch in tumor progression. *Annals of The New York Academy of Sciences*. 1014:155-63.

**Lüllmann-Rauch.R** (2008). *Histologie. 1<sup>er</sup> cycle des études médicales*. Stuttgart : de boeck, 678p.

**Maret T., Gruzglin E., Sadr MS., Siu V., Shan W., Koch AW., Seidah NG., Del Maestro RF., Colman DR.** (2010). Surface expression of precursor N-cadherin promotes tumor cell invasion. *Neoplasia (New York, N.Y.)*. 12(12):1066-80.

**Mège R.M., Gavard J., Lambert M.** (2006). Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*. 18: 541-548.

**Nguyen T., Mège R.M.** (2016). N-cadherin and Fibroblast Growth Factor Receptors crosstalk in the control of normal and cancer cell migration. DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.05.002.

**Pégliion F., Etienne-Manneville S.** (2012). N-cadherin expression level as a critical indicator of invasion in non-epithelial tumors. *Cell Adhesion & Migration*. 6(4):327-32.

**Peglion F.** (2012). *Mécanismes moléculaires responsables des propriétés migratoires des gliomes : rôle et dynamique des jonctions adhérentes dans la migration des astrocytes sains et tumoraux*. Thèse de doctorat ; Biologie cellulaire. Paris : Université Pierre et Marie Curie.

**Plesent C.** (2012). *Etude de l'influence de la N-cadhérine sur le recrutement et la dynamique des microtubules au cours de la formation des contacts cellulaires et de la croissance neuritique*. Thèse de doctorat ; Biologie Moléculaire et Cellulaire. Paris : Université Pierre et Marie Curie.

**Reiffers J., Viens P.** (2011). *Les cibles intracytoplasmiques*. John Libbey Eurotext. Paris : Amgen.

**Shintani Y., Fukumoto Y., Chaika N., Svoboda R., Wheelock MJ., Johnson KR.** (2008). Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 180(6) : 1277-1289

**Stéphanou A.** (2006). *La Motilité Cellulaire*. Ecole Interdisciplinaire d'échanges et de formation en biologie.  
Disponible sur : <<http://www.lptl.jussieu.fr/user/lesne/CoursMotilite.pdf> >.

**Theveneau E., Marchant L., Kuriyama S., Gull M., Moepps B., Parsons M., Mayor R.** (2010). Collective Chemotaxis Requires Contact-Dependent Cell Polarity. *Developmental Cell*. 19(1): 39–53.

**Thiery J.P., Sleeman J.P.** (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 7(2):131-42.

**Wheelock M.J., Shintani Y., Maeda M., Fukumoto Y., Johnson K.R.** (2008). Cadherin switching. *Journal of Cell Science*. 121: 727-735.